

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Física
Programa de pós-graduação em Física

**Hipertermia magnética *in vivo* com nanopartículas de MnFe_2O_4 no
tratamento de tumores sólidos e subcutâneos de Sarcoma 180**

Harley Fernandes Rodrigues

Goiânia
2017

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

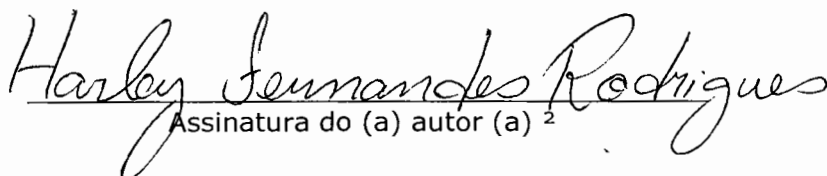
Nome completo do autor: Harley Fernandes Rodrigues

Título do trabalho: Hipertermia magnética *in vivo* com nanopartículas de MnFe₂O₄ no tratamento de tumores sólidos e subcutâneos de Sarcoma 180

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 27,03,2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Física
Programa de pós-graduação em Física

**Hipertermia magnética *in vivo* com nanopartículas de MnFe_2O_4 no
tratamento de tumores sólidos e subcutâneos de Sarcoma 180**

Harley Fernandes Rodrigues

Tese apresentada no Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em física.

Área de concentração: física experimental e aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis

Coorientadora: Prof^a. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Goiânia

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

RODRIGUES, HARLEY FERNANDES

Hipertermia magnética in vivo com nanopartículas de $MnFe_2O_4$ no tratamento de tumores sólidos e subcutâneos de Sarcoma 180 [manuscrito] / HARLEY FERNANDES RODRIGUES. - 2017. XIII, 279 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis; co-orientadora Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física (IF), Programa de Pós-Graduação em Física, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, algoritmos.

1. Hipertermia magnética. 2. Nanopartículas magnéticas. 3. Sarcoma 180. 4. Termografia por infravermelho. 5. Dose térmica. I. Figueiroa Bakuzis, Andris, orient. II. Título.

CDU 53



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Física
Programa de Pós-Graduação em Física

Ata Nº 29 de defesa de tese de **Harley Fernandes Rodrigues** para obtenção do título de Doutor em Física.

Aos 19 dias do mês de abril de 2017, às 08h45min, no Anfiteatro II do Instituto de Física da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora indicada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação, aprovada pelo Conselho Diretor e designada pela Diretoria do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, composta pelo **Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis** (orientador e presidente da Banca – IF/UFG), **Prof. Dr. Carlos Jacinto da Silva** (IF/UFAL), **Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis** (CPOM), **Prof. Dr. Renato Borges Pontes** (IF/UFG) e **Prof. Dr. Fernando Pelegrini** (IF/UFG) para julgar a tese de doutorado de **Harley Fernandes Rodrigues**, intitulada: "**Hipertermia magnética *in vivo* com nanopartículas de $MnFe_2O_4$ no tratamento de tumores sólidos e subcutâneos de Sarcoma 180**". O Presidente abriu os trabalhos agradecendo a presença dos membros da Banca Examinadora e concedeu a palavra a **Harley Fernandes Rodrigues**, que expôs detalhadamente seu trabalho. Em seguida, os membros da Banca fizeram suas considerações e procederam à arguição do candidato. Concluída essa etapa, a Banca, em sessão fechada, deu prosseguimento ao julgamento do trabalho, atribuindo os seguintes conceitos:

Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis (orientador)

APROVADO

Prof. Dr. Carlos Jacinto da Silva (IF/UFAL)

APROVADO

Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis (CPOM)

APROVADO

Prof. Dr. Renato Borges Pontes (IF/UFG)

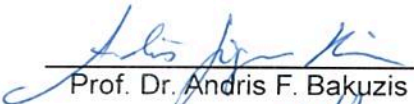
APROVADO

Prof. Dr. Fernando Pelegrini (IF/UFG)

APROVADO

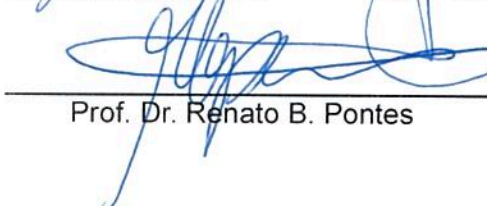
Novamente em sessão aberta, o presidente da Banca anunciou o resultado final do julgamento, declarando o candidato **Harley Fernandes Rodrigues** APROVADO pela Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora.


Goiânia, 19 de abril de 2017.


Prof. Dr. Andris F. Bakuzis


Prof. Dr. Carlos J. da Silva


Prof. Dr. Rui M. V. Reis


Prof. Dr. Renato B. Pontes


Prof. Dr. Fernando Pelegrini

AGRADECIMENTOS

Muito em especial à minha amada esposa, Halynne, por sua dedicação irrestrita e incansável apoio. Ao longo dos anos da pós-graduação de maneira muito pessoal compartilhou comigo as alegrias, sucessos, frustrações e desafios desse trabalho. Ela tem sido a minha maior incentivadora nesse período, além disso, sua virtude e trabalho em nossa jovem família são um forte pilar em nossas vidas. Agradeço a meus amados filhos Heitor e Heloísa, que já em sua tenra infância são para mim uma fonte inesgotável de coragem e perseverança. A paternidade tem sido para mim um exercício contínuo da necessidade de viver a altura do conhecimento que tenho, perante Deus e os homens.

Aos meus amados pais, Wanderlei e Maria Fernandes, por todos os anos de cuidado zeloso, incentivo e fomento em todas as oportunidades de estudo que me trouxeram até o presente momento.

Ao Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis e a Prof^a. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda pelos anos de dedicada orientação e experiências compartilhadas que fortaleceram sobremaneira meu caráter profissional.

Ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética Humana (ICB/UFG), na pessoa da bióloga Francylli Mariana dos S. M. Andrade que, além de responsável pela manutenção da linhagem tumoral de Sarcoma 180 estudada nessa tese, preparação, cuidado e monitoramento biológico dos camundongos utilizados em todos os nossos experimentos *in vivo*. Participou ativamente da elaboração, realização e interpretação de todos os ensaios pré-clínicos reportados nesse projeto de doutorado.

Aos físicos: Dr. Marcus Carrião dos Santos e Msc. Nícolás Zufelato pela síntese e ajuda na caracterização das nanopartículas magnéticas utilizadas nessa tese; ao Dr. Luis Cesar Branquinho e ao Msc. Gustavo Capistrano P. Leite, colegas no trabalho de hipertermia *in vivo* e parceiros de publicação; ao Sr. Juracy Leandro dos Santos Junior instrumentador científico responsável pelo frequente desenvolvimento de soluções em *hardware* para o nosso laboratório.

À Rede de Terapias Inovadoras Aplicadas à Nanomedicina (Rede Pro Centro-Oeste) pela oportunidade de trabalhar nesse projeto de doutorado, às agências de fomento que o patrocinaram (CAPES, CNPq e FAPEG) e, não menos importante, ao IF/UFG.

“Aquilo que persistimos em fazer torna-se mais fácil de realizar; não que a natureza da tarefa mude, mas a nossa capacidade aumenta.”

Heber J. Grant

RESUMO

Nesta tese foi desenvolvida uma metodologia de monitoramento em tempo real da hipertermia magnética (HM) *in vivo* no modelo tumoral murino Sarcoma 180 utilizando a técnica de termografia por infravermelho. As nanopartículas magnéticas (NPM) consistiam de ferritas de Mn capazes de gerar calor em baixa amplitude de campo magnético, na frequência de 300 kHz, dentro do limite de segurança determinado por Atkinson. Foi demonstrado que o valor da temperatura superficial aparente medido com a câmera de infravermelho subestima o valor da temperatura real da pele dos camundongos se a objetiva da câmera não formar um ângulo $\theta = 0^\circ$ com a direção normal à pele do animal na região de interesse sobre o tumor, podendo o erro chegar a mais do que 7,0 °C (para $\theta = 60^\circ$). Um novo modelo teórico para estimar o erro na temperatura de superfícies curvas foi desenvolvido e se mostrou válido inclusive para o caso em que a temperatura superficial diverge significativamente da ambiente. Resultados pré-clínicos do tratamento indicaram uma situação de remissão completa em animal que passou por 150 min. de hipertermia e outros casos com remissão parcial, sugerindo que análises de resposta biológica precisam ser feitas em longo tempo (> 60 dias). Medidas da temperatura intratumoral monitorada por três termômetros de fibra-óptica durante o procedimento terapêutico de HM com NPM indicaram uma entrega de calor não homogênea dentro do tumor. Adicionalmente, uma nova metodologia para o cálculo da dose térmica (CEM43) avaliada na superfície, considerando cada pixel da imagem termográfica como um termômetro na região do tumor, indicou que o valor de $T_{10}(t)$ da temperatura detectada *in vivo* na superfície da pele sobre tumores subcutâneos pode informar, com um erro da ordem de 5%, o valor da temperatura média intratumoral durante o procedimento terapêutico de HM.

ABSTRACT

In this thesis a methodology of real-time monitoring of magnetic hyperthermia (HM) *in vivo* was developed in the murine tumor model Sarcoma 180 using infrared thermography technique. Magnetic nanoparticles (NPM) consisted of Mn ferrites capable of generating heat at a low magnetic field amplitude at the 300 kHz frequency within the safety limit determined by Atkinson. It has been shown that the apparent surface temperature value measured with the infrared camera underestimates the real skin temperature value of the mice if the camera objective does not form an angle $\theta = 0^\circ$ with the normal direction to the animal's skin in the region of interest on the tumor, with the error reaching more than 7.0°C (for $\theta = 60^\circ$). A new theoretical model to estimate the error in the temperature of curved surfaces was developed and proved valid even in the case where the surface temperature diverges significantly from the environment. Preclinical treatment results indicated a complete remission condition in animal that was submitted to 150 min of hyperthermia and other cases with partial remission, suggesting that biological response analyzes need to be done in a long time (> 60 days). Measurements of the intratumoral temperature monitored by three fiber-optic thermometers during the therapeutic procedure of HM with NPM indicated an inhomogeneous heat delivery within the tumor. Additionally, a new methodology for calculating the thermal dose (CEM43) evaluated at the surface, considering each pixel of the thermographic image as a thermometer in the tumor region, indicated that the value $T_{10}(t)$ of the temperature detected *in vivo* at the surface of the skin over subcutaneous tumors can report, with an error of the order of 5%, the mean intratumoral temperature value during the therapeutic procedure of HM.

PREFÁCIO

A escolha de uma estratégia para o tratamento do câncer (de maneira geral) depende muito do tipo de tumor, sua localização no corpo do paciente e do estágio de avanço da doença no momento do diagnóstico: a cirurgia continua sendo a modalidade de eleição em pacientes com doença localizada e condições para intervenção cirúrgica e, também, pode incluir a utilização de quimioterapia (QT) e/ou radioterapia (RT) (terapêuticas já bem estabelecidas na clínica médica) ou ainda o transplante de medula óssea (quando algumas neoplasias afetam as células do sangue) [1].

Entretanto, outros procedimentos vêm se estabelecendo cada vez mais como opções para o tratamento de neoplasias malignas, *e.g.* terapias térmicas que objetivam a realização de hipertermia em tumores sólidos promovendo a elevação da temperatura tumoral na faixa de 43–49 °C por da ordem de 20–30 min. Ou ainda, o procedimento de ablação definido como aquele onde o aquecimento intratumoral acima de 50 °C é mantido por da ordem de 10–20 min. Ambos os tratamentos podem ser realizados por diferentes técnicas: radiofrequência (RF) [2]–[6]; por microondas (MW – *microwave*) [5], [7]; por ultrassom focalizado de alta intensidade (HIFU – *high intensity focused ultrasound*) [8]; ou ainda a crioblação (com o resfriamento intratumoral abaixo de – 40 °C e mantido por alguns minutos) [9], [10]. E com o grande desenvolvimento da nanotecnologia nas últimas três décadas por meio de colaborações multidisciplinares [11]–[13], novas propostas de terapias adjuvantes têm sido preconizadas como opções de alta eficiência e alta seletividade no tratamento do câncer: *e.g.* a hipertermia magnética (HM) utilizando nanopartículas magnéticas (NPM) para a geração localizada de calor, onde o mecanismo de dissipação térmica é atribuído ao fenômeno de histerese dinâmica de sua magnetização (na presença de um campo magnético alternado) mediada pela relaxação de Néel [14]–[17]. Essa é uma técnica com interessantes resultados pré-clínicos [18]–[20] e clínicos [21]–[23] já publicados demonstrando seu grande potencial no tratamento de tumores tanto superficiais, quanto de difícil acesso no corpo do paciente e com geometrias complexas.

Nessa tese de doutorado serão apresentados os primeiros resultados pré-clínicos obtidos por nosso grupo de pesquisa em Nanomagnetismo Aplicado à Medicina – baseado dentro do Instituto de Física e, também, no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas, ambos da Universidade Federal de Goiás – e numa área pioneira denominada Nanomedicina Térmica, utilizando a técnica de HM *in vivo* com NPM

VIII

para o tratamento de tumores murinos não metastáticos de Sarcoma 180 (sólidos e subcutâneos) induzidos em camundongos suíços.

O capítulo 1 traz uma revisão detalhada da literatura, e que objetiva tanto a apresentação de um panorama histórico do sucesso na utilização de terapias térmicas para o tratamento de tumores sólidos (em estudos pré-clínicos e clínicos); quanto uma reflexão sobre o estado da arte, *i.e.* os avanços conseguidos principalmente nas últimas duas décadas assim como os problemas ainda em aberto para realização de HT *in vivo*. Contudo, a produção dessa tese resultou num texto muito denso, no que diz respeito ao *background* teórico (dada sua natureza multidisciplinar) exigindo do leitor uma série de conhecimentos básicos. Nesse sentido além do uso recorrente de notas de rodapé (principalmente explicativas de conhecimentos próprios da biologia) quando, ao longo do texto, um assunto periférico ou aprofundamento em determinado conceito/modelo teórico que, apesar de importante, desviaria o leitor do foco principal de cada capítulo, também foram incluídas indicações que remetem a apêndices no final da tese. O Apêndice A trata de modelos matemáticos para o cálculo da dose térmica intratumoral durante procedimentos de HT (*in vitro* ou *in vivo*); o Apêndice B discute a geração de calor com NPM utilizando um campo magnético alternado, na perspectiva da Teoria de Resposta Linear; e o Apêndice C trata da teoria de imageamento por infravermelho de superfícies reais (absorvedoras de energia).

No capítulo 2 são apresentados os materiais utilizados, o modelo tumoral murino, a montagem experimental para realização de hipertermia *in vivo* e, também, no início dos capítulos de 3 a 5, antes da apresentação e discussão dos resultados experimentais, o leitor encontrará o detalhamento dos diferentes protocolos experimentais e objetivos pretendidos com cada sequência de medidas realizadas. Os experimentos foram conduzidos injetando diretamente nos tumores dos animais, minutos antes da realização de suas hipertermias, dois tipos de NPM feitas de ferrita de manganês com diferentes camadas de cobertura (uma com citrato e outra com DMSA), respectivamente, com diâmetros médios de (12 ± 3) nm e (15 ± 3) nm. As curvas de magnetização obtidas por magnetometria de amostra vibrante, em condições de campo magnético quase estático (~ 100 Hz), demonstram um comportamento superparamagnético desses monodomínios (com ausência de campo coercitivo) e valores de magnetização de saturação iguais a 52,2 emu/g (para as NPM de MnFe_2O_4 - Citrato) e 56,2 emu/g (para as NPM de MnFe_2O_4 - DMS). Mas sob a ação de um campo magnético alternado, *e.g.* com intensidade (valor rms) ~ 220 G (17,5 kA/m) e frequência de 301 kHz, aplicado *in vivo* por durante 30 min de hipertermia, as NPM injetadas são capazes de produzir elevado

aquecimento intratumoral nos camundongos, na faixa de 45–50 °C por aproximadamente 25 min.

A termometria da pele na região do tumor subcutâneo foi feita (em tempo real) bidimensionalmente por infravermelho e, também, pontualmente com um termômetro de fibra-óptica (valor controle). Em alguns experimentos específicos (vide capítulo 5), também foram introduzidos nos tumores até três termômetros de fibra-óptica que reportaram a temperatura intratumoral nesses camundongos em três pontos distintos. E como a pele dos animais sobre o seu tumor sólido e subcutâneo é uma superfície convexa, no capítulo 4 indicaremos como deve ser a utilização de uma câmera termográfica para a detecção correta do aquecimento superficial (devido ao calor gerado pelas NPM injetadas intratumoralmente) com um erro experimental $\sim 0,5$ °C, inclusive, apresentando um novo modelo matemático para estimativa teórica desse erro em função do ângulo formado pela direção da objetiva da câmera relativamente à direção normal à pele dos camundongos na região imagiada. Isto será feito considerando a imprecisão intrínseca na determinação de sua temperatura aparente por infravermelho, devido a alterações no valor da emissividade térmica direcional e espectral da pele desses animais [24], [25].

Além disso, utilizando os dados do mapeamento bidimensional por infravermelho, será proposta (no capítulo 5) uma nova metodologia para o cálculo da dose térmica (CEM43) avaliada na superfície considerando cada pixel da imagem termográfica como um termômetro na região do tumor. Nesse contexto, será demonstrado experimentalmente como a evolução (em função do tempo de hipertermia) do valor de temperatura excedido por apenas 10% de todas as medições realizadas, ou seja, o percentil $T_{10}(t)$ na região mais aquecida da pele sobre o tumor é capaz de estimar de maneira não invasiva (com um erro de ~ 5 %) a média da temperatura intratumoral. Em conclusão, nossos resultados pré-clínicos apresentarão a remissão tumoral completa (RC) obtida com um camundongo (seguido por mais de 180 dias depois de submetido a 150 min de HM com NPM) e, também, a diminuição da taxa de crescimento tumoral em outros camundongos (resultados de remissão tumoral parcial (RP) com recidiva da ordem de 20–50 dias após o tratamento). Para cada um desses animais as informações conseguidas com a abordagem de mapeamento bidimensional dos valores superficiais de CEM43 e monitoramento de $T_{10}(t)$, foram utilizadas na identificação e interpretação do efeito cumulativo da entrega de calor (intratumoral) para obtenção RP ou RC no tumor de S180, correlacionando alguns de nossos achados com limiares de CEM43 já identificados na literatura e associados a esse tipo de dano térmico [26].

Por fim, o Apêndice D apresenta os documentos de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás, que autorizaram a realização de todos os experimentos *in vivo* desse trabalho de doutorado. E o Apêndice E traz uma relação de artigos publicados decorrentes dos resultados obtidos com essa tese.

Harley Fernandes Rodrigues – Goiânia, março de 2017.

SUMÁRIO

1	Introdução	14
1.1	Introdução à hipertermia no tratamento de tumores sólidos.	14
1.2	Dosimetria térmica.	29
1.3	Hipertermia com nanopartículas magnéticas para o tratamento do câncer.	39
1.4	Sarcomas.	57
2	Materiais, modelo tumoral murino e metodologia experimental.	62
2.1	Fluidos magnéticos	62
2.1.1	<i>Síntese e caracterização das nanopartículas de MnFe₂O₄-Citrato</i>	64
2.1.2	<i>Síntese e caracterização das NPM de MnFe₂O₄-DMSA</i>	69
2.2	Modelo experimental de tumor murino	71
2.3	Primeira configuração experimental para realização de HM <i>in vivo</i> com as NPM.	74
2.4	Segunda configuração experimental para realização de HM <i>in vivo</i> com as NPM.	80
3	Metodologia de monitoramento em tempo real da hipertermia magnética <i>in vivo</i> com nanopartículas magnéticas utilizando termografia por infravermelho.	85
3.1	Introdução	85
3.2	Protocolos experimentais	86
3.3	Análise e discussão dos resultados experimentais	90
4	Determinação precisa da entrega de calor durante hipertermia magnética <i>in vivo</i> utilizando termografia por infravermelho.	113
4.1	Introdução	113

4.2	Protocolo experimental	116
4.3	Análise e discussão dos resultados experimentais	118
5	Efeito cumulativo da entrega de calor na observação de remissão tumoral completa em tumor murino de Sarcoma 180.	136
5.1	Introdução	136
5.2	Protocolos experimentais	143
5.3	Resultados experimentais de remissão tumoral no modelo murino de Sarcoma 180.	146
5.4	Metodologia de mapeamento bidimensional da dose térmica em tumores subcutâneos utilizando imagens de infravermelho.	161
5.5	Estimativa <i>in vivo</i> do aquecimento intratumoral durante HM com NPM, utilizando a metodologia de mapeamento bidimensional da dose térmica na superfície da pele, por imagens de infravermelho.	173
6	Conclusões e perspectivas.....	188
	APÊNDICE A – Modelos matemáticos de dose térmica: formulações físico-químicas do tipo lei de Arrhenius e equações multiparamétricas.	194
	APÊNDICE B – Princípios físicos da geração de calor com nanopartículas magnéticas utilizando um campo magnético alternado.	201
B.1	Superparamagnetismo.	203
B.2	Interação do campo eletromagnético com a matéria e o Teorema de Poynting.	211
B.3	Hipertermia magnética com nanopartículas magnéticas: Teoria de Resposta Linear.	218
	APÊNDICE C – Teoria de termografia por infravermelho.	228
C.1	Conceitos fundamentais no estudo da radiação térmica.	228

C.2 Propagação de uma onda eletromagnética em um meio dielétrico imperfeito.	236
C.3 Cálculo da refletividade e da emissividade térmica de uma superfície absorvedora de energia ($\kappa \neq 0$) utilizando as equações de Maxwell.	241
C.4 Monitoramento termográfico da temperatura de superfícies curvas: modelos de Watmough (1970) e Clark (1976).	251
APÊNDICE D – Pareceres consubstanciados referentes ao projeto de pesquisa dessa tese de doutorado protocolados junto a Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFG.	258
D.1 Primeiro parecer deferido em 14 de janeiro de 2013 sob N° 039/2012	259
D.2 Segundo parecer deferido em 03 de março de 2015 sob N° 098/14	260
APÊNDICE E – Publicações de artigos relacionados à Tese.	261
Referências Bibliográficas	262

1 Introdução

1.1 Introdução à hipertermia no tratamento de tumores sólidos.

A utilização da técnica de hipertermia (HT) para o tratamento de câncer na clínica médica já é realidade para algumas modalidades de geração localizada de calor: *e.g.* ablação de tumores sólidos por radiofrequência (RF) [2]–[6], por microondas (MW – *microwave*) [5], [7], a crioablação [9], [10], assim como a hipertermia e também ablação utilizando o ultrassom focalizado de alta intensidade (HIFU – *high intensity focused ultrasound*) [8].

Diferentes regimes de aquecimento podem ser estabelecidos durante o tratamento de tecidos neoplásicos malignos: *e.g.* a hipertermia moderada ou branda (com aquecimento tumoral na faixa de 40–45 °C), a hipertermia em regime quase ablativo (aquecimento tumoral de 46–49 °C), a ablação de tumores (aquecimento maior ou igual a 50°C), ou ainda a crioablação (com o resfriamento intratumoral abaixo de – 40 °C e mantido por alguns minutos). E de acordo com a literatura, o histórico de exposição térmica, ou seja, a temperatura acessada e o período de tempo que ela é mantida (tanto em tecidos saudáveis quanto em tecidos neoplásicos) determinam o tipo de lesão térmica (subletal ou letal) e, conseqüentemente, o tipo de resposta biológica *in vivo* (*e.g.* termotolerância celular induzida devido à expressão de proteínas celulares de estresse térmico, morte celular por apoptose, necrose, remissão tumoral parcial ou completa, aumento da sobrevida média e etc.) [27]–[29].

Essas terapias térmicas para o tratamento do câncer, em sua maioria, têm sua utilização preconizada como adjuvantes a terapias já bem estabelecidas como a radioterapia (RT) e a quimioterapia (QT). Já no final dos anos 80 e início da década de 90 resultados *in vitro* com modelos tumorais murinos [30], [31] e *in vivo* (fase II e III)¹ com tumores humanos

¹ A realização de Estudos Clínicos normalmente envolve um número muito grande de pacientes, onde são conduzidas avaliações cautelosas por especialistas. Os resultados obtidos são, então, enviados para a revisão de outros pesquisadores da área, assim como para as autoridades controladoras competentes (para sua devida aprovação quando for previsto o seu registro). Os estudos clínicos possuem fases distintas, cada uma visando responder questões específicas. Antes de qualquer novo medicamento/terapia/procedimento ser disponibilizado para estudo em seres humanos é realizado um ensaio de **Fase pré-clínica**: são conduzidos apenas testes em laboratório em culturas de células (*in vitro*) e em animais (*in vivo*) e o objetivo principal desta fase é verificar se a medicação/terapia/procedimento tem potencial para tratar determinada doença no ser humano. Por exemplo, no desenvolvimento de novas drogas, em média de 5000 substâncias testadas cerca de somente 5 são aprovadas para

(adenocarcinoma e sarcoma de partes moles) [27], comprovaram a eficácia sinérgica da associação RT + HT. E, em 2010, resultados clínicos (fase III) em pacientes de alto risco com sarcoma (humano) demonstraram, também, que a associação QT + HT foi 16,1% mais eficiente na redução tumoral local e diminuição do risco de morte dos pacientes que, apenas, quando tratados com QT [33].

Isto fica mais evidente em cenários pouco favoráveis ao sucesso da utilização tanto da RT quanto da QT. Um conhecimento já bem estabelecido na literatura é que tumores sólidos possuem regiões com muito pouca oxigenação, o suficiente para manter as células tumorais viáveis, mas não para torná-las sensíveis a radiação ionizante, ou a alguns quimioterápicos [34]. Vaupel, P. *et al.* num estudo clínico com $n = 16$ pacientes (mulheres com idade entre 37 e 81 anos), avaliou a oxigenação de tumores de câncer de mama humano. O valor (mediana) da pressão parcial de oxigênio (pO_2) nas células tumorais foi igual a 30 mmHg enquanto que, para um outro grupo de $n = 15$ mulheres saudáveis, o valor obtido foi de 65 mmHg em células normais. E 6 dos 16 tumores de mama foram classificados como hipóxicos ($pO_2 \leq 2,5$ mmHg) tal que, nessas mulheres, a proporção de células hipóxicas correspondia (na média) à 16% do volume tumoral total [35]. Noutro estudo, com tumores sólidos e subcutâneos de sarcoma murino (após duas semanas de crescimento e não tratados), Van Puttel e Kalman

continuar em desenvolvimento e passam para a fase clínica. Apenas na **Fase clínica** ocorrem os testes em seres humanos, sendo composta por outras quatro fases sucessivas:

FASE I – verifica se o tratamento é seguro e se os efeitos colaterais são suportáveis, ou seja, não têm a intenção de demonstrar sua eficiência comparativamente à terapia padrão. Também objetiva determinar sua dose e forma de administração; a reação do organismo (*e.g.* toxicidade, biodistribuição e farmacocinética). Nesta Fase I, a medicação/terapia/procedimento é testada em pequenos grupos (10–30 pessoas), geralmente, de voluntários saudáveis (no caso de doenças menos graves). No caso de doenças mais graves como câncer, seria antiético testar estes medicamentos em pessoas sadias, por isso testa-se em pacientes com a doença. De 100 novos tratamentos testados em Fase I cerca de 70 irão para a Fase II.

FASE II – o objetivo é avaliar a eficácia da medicação/terapia/procedimento, *i.e.* se ela funciona para tratar determinada doença e, também, obter informações mais detalhadas sobre a segurança (*e.g.* toxicidade). O número de pacientes que participará nessa Fase II será maior do que na Fase I (mas ainda será menor do que uma centena). De 70 novos tratamentos testados na Fase II, cerca de 30 irão para Fase III.

FASE III – o novo tratamento é comparado com o tratamento padrão existente. O número de pacientes testado aumenta para 100 até 1000. Geralmente, os estudos clínicos de Fase III são randomizados, isto é, os pacientes são divididos em dois grupos: o grupo controle (recebe o tratamento padrão) e o grupo investigacional (recebe a nova medicação/terapia/procedimento). A divisão entre os grupos é feita sob a forma de um sorteio (aleatória). Assim, os pacientes que entram em estudos de Fase III têm chances iguais de cair em um ou outro grupo de estudo. Algumas vezes, os estudos de Fase III são realizados para verificar se a combinação de dois medicamentos/terapias/procedimentos é melhor do que a utilização de um único somente.

FASE IV – o objetivo é confirmar se os resultados obtidos na fase anterior (Fase III) são aplicáveis em uma grande parte da população doente. Nesta fase, o medicamento/terapia/procedimento já foi aprovado para ser comercializado. A vantagem dos estudos de Fase IV é que eles permitem acompanhar os efeitos dos medicamentos a longo prazo. [32]

determinaram *in vivo* que a proporção de células tumorais hipóxicas correspondia em torno de 15% do volume tumoral total de cada animal [36, p. 97].

A presença de oxigênio molecular (O_2) no tecido tumoral durante a radioterapia é responsável por tornar permanentes alterações na molécula de DNA, provocadas por radicais livres, que resultam na expressão final do dano biológico causado pela radiação ionizante [36, p. 101]. E células hipóxicas são conhecidas por ser até três vezes mais resistentes a radiação do que células não-hipóxicas, todavia, não há diferença no que diz respeito à sensibilização térmica de ambas as células [37].

Em 1993, Oleson e Dewhirst publicaram resultados clínicos (fase II) de um estudo realizado com $n = 57$ pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (*non-small cell lung cancer – NSCLC* ou *non-adenocarcinoma*) cujos volumes eram da ordem de 100 cm^3 e, também, um segundo grupo com $n = 44$ pacientes com sarcoma de partes moles (*soft tissue sarcoma – STS*) com volumes no intervalo $500 - 800\text{ cm}^3$ [27]. Os tumores eram irradiados 5 dias por semana (doses de 50 Gy) e, isto, combinado com sessões de 1 hora de HT (uma ou duas vezes por semana) de 30 – 60 min depois da 5^o ou 10^o sessão de radioterapia. E durante os 60 min de HT a mediana 50% (T_{50}) da temperatura intratumoral era mantida igual a $42,5\text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados obtidos mostraram que: primeiro, a probabilidade de remissão tumoral completa para os adenocarcinomas de células não pequenas aumentou de 15% (quando tratados apenas com RT) para 30% em associação com HT; segundo, nos tumores de sarcoma humano, a terapia associada (RT + HT) aumentou de 53% para 78% a probabilidade de remissão completa (quando 80% do volume do tumor de sarcoma são células necróticas) [27]. Todos esses resultados *in vivo* são evidências de que a HT pode potencializar os efeitos da RT, e a Tabela 1.1 sumariza um meta estudo realizado por Horsman e Overgaard mostrando o resultado da associação RT + HT em 9 diferentes tipos de tumores humanos [38].

Tabela 1.1 – Meta-estudo de ensaios clínicos randomizados *in vivo* comparando a eficiência do tratamento de tumores sólidos (em humanos) por RT versus RT+ HT.

Tipo de tumor	Nº de ensaios clínicos	Nº de pacientes	Resposta ao tratamento*		Odds ratio* (95%IC)
			RT+HT	RT	
Mama (em estágio avançado)	2	143	68%	67%	1,06 (0,52–2,14)
Próstata	1	49	81%	79%	1,16 (0,28–4,77)
Carcinossarcoma (tumor mulleriano misto)	3	442	38%	34%	1,24 (0,84–1,82)
Cabeça e pescoço	5	274	51%	33%	2,08 (1,28–3,39)
Reto	2	258	19%	9%	2,27 (1,08–4,76)
Parede torácica	4	276	59%	38%	2,37 (1,46–3,86)
Bexiga	1	101	73%	51%	2,61 (1,14–5,98)
Melanoma	1	128	56%	31%	2,81 (1,36–5,80)
Cérvix (lesão pré-invasiva do colo uterino)	4	248	77%	52%	3,05 (1,77–5,27)
Todos os ensaios	23	1919	52%	38%	1,80 (1,50–2,16)

*Nota de rodapé²

HT: hipertermia; RT: radioterapia; IC: intervalo de confiança.

Adaptado de: Horsman, M. R. e Overgaard, 2016, p. 5. [38]

E no que tange a sinergia existente entre QT e HT os resultados *in vivo* mais significativos da literatura reportam: (i) aumento da absorção de drogas e/ou retenção nas células tumorais; (ii) um aumento nos danos provocados no DNA e inibição de processos de reparação; (iii) aumento da formação de radicais livres fixados pelo oxigênio; (iv) o aquecimento produzido (40°C – 44°C) é capaz de reverter, ao menos parcialmente, a resistência das células tumorais aos quimioterápicos (*e.g.* cisplatina, melfalano, nitrosoureas e doxorrubicina quando combinado com o inibidor verapamil) [37], [36, p. 501].

² No contexto dos dados apresentados na Tabela 1.1, uma “tradução aproximada” para o termo Odds ratio seria “chance” ou probabilidade de resposta ao tratamento (*e.g.* remissão tumoral parcial ou completa, diminuição da taxa de crescimento, ausência de recidiva, ou aumento da mediana de sobrevida livre da doença e etc.). Os resultados da Tabela 1.1 decorrem de estudos randomizados do tipo **caso-control**, onde o número de pacientes com câncer tratados por HT+RT (**casos**) são selecionados no início do estudo e o número de pacientes com câncer, tratados apenas por RT (**controle**), é artificialmente planejado para ser igual ao número de tratados com a terapia associada. Portanto, na Tabela 1.1, um odds ratio = 1,06 (*e.g.* câncer de mama em estágio avançado) significa que a probabilidade de resposta do paciente à terapia combinada (HT+RT) é praticamente igual ao tratamento, apenas, com RT (ou seja, 1 pra 1). Enquanto que, se odds ratio = 3,05 (*e.g.* câncer cervical, ou câncer de colo uterino) significa que a probabilidade de resposta do paciente à terapia combinada (HT+RT) é três vezes maior do que o tratamento, apenas, com RT (ou seja, 3 pra 1). O “odds ratio” deve sempre ser expresso na forma de um intervalo de confiança (IC), calculado a partir de uma margem de erro pré-determinada (nos ensaios em questão foi estabelecido o critério 95% de IC). Estatisticamente, quanto maior o espaço amostral em estudo menor será o IC, e se o objetivo for medir uma associação positiva entre o emprego da HT (como adjuvante à RT) e a resposta biológica do paciente ao tratamento da doença, então, o limite inferior do IC é o elemento importante, este deve ser um número >1 para que se possa afirmar num dado intervalo de confiança que verdadeiramente há associação [39], [40].

De 1997 a 2006, uma colaboração entre nove centros de pesquisa (na Europa e nos EUA), resultou num grande estudo randomizado (fase III) conduzido por Issels *et. al* [33], e que envolveu 341 pacientes (homens e mulheres com idade entre 18 e 70 anos) com diferentes tipos de sarcomas de partes moles (STS) e de alto risco (81% nas regiões abdominal e pélvica, 18% tronco, 1% cabeça e pescoço), todos tumores sólidos não metastáticos com diâmetro ≥ 5 cm. Os pacientes foram recrutados com doença primária ou recorrente (já anteriormente submetidos à cirurgia) e divididos: um primeiro grupo ($n = 172$) foi tratado, apenas, com um triplo complexo quimioterápico (etoposide, ifosfamida e doxorubicina (EIA)). E um segundo grupo ($n = 169$) tratado com EIA + HT – o aquecimento foi gerado por RF, sessões de 60 min, onde a temperatura intratumoral era mantida entre 40°–43°C – a dose de calor era sempre administrada no 1° e no 4° dia de cada ciclo quimioterápico. Os pacientes desses dois grupos foram seguidos, alguns por até 10 anos, e algumas das conclusões obtidas foram: (i) a associação EIA+HT encolheu o tumor diminuindo severamente sua progressão, aumentando potencialmente a sobrevida em pacientes com primário, recorrente ou STS de alto risco inadequadamente ressecados; (ii) a terapia combinada praticamente dobrou a mediana de sobrevida livre da doença, de 16,2 meses (apenas com EIA) para 31,7 meses (EIA+HT) tal que, 34 meses após o tratamento, 56 tumores apresentaram progressão local (EIA+HT) contra 76 (apenas com EIA); (iii) a taxa de resposta ao tratamento no grupo que recebeu EIA+HT foi de 28,8%, em comparação com 12,7% no grupo que recebeu apenas quimioterapia; (iv) e durante os 10 anos de acompanhamento, a proporção de pacientes com desenvolvimento progressivo da doença, foi significativamente menor no grupo EIA+HT (6,8%) em comparação com EIA sozinho (20,6%) [33], [41], [42, p. 139].

Todos esses resultados *in vivo* são evidências de que a HT pode, assim como no caso da RT, melhorar a eficácia no tratamento de tumores sólidos por QT, e a Tabela 1.2 relaciona alguns quimioterápicos que têm (ou não) sua ação potencializada pela entrega localizada de calor.

Tabela 1.2 – Quimioterápicos que têm (ou não) o seu efeito potencializado pela geração *in situ* de calor por hipertermia.

Efeito	Fármaco		
Potencializados pelo calor (Hipertermia):	Melfalano ^{1, 2, 14 e 25} Ciclofosfamida (Cytosan [®]) ^{1, 3, 4, 6, 17 e 20} Carmustina (BCNU) ^{9, 18 e 21} Cisplatina (cis-DDP, Platinil [®] , ou PlatinoI [®]) ^{2, 3, 6-10, 12-17} Mitomicina C ^{1, 8-11, 13, 15 e 19} Bleomicina ^{6, 12-14 e 18} Vincristina ^{1, 2, 12, 13, 15, 17, 18, 21-25}		
Não potencializados pelo calor:	Metotrexato ^{1, 6, 12, 17, 21, 23} Vimblastina ^{1, 6, 7, 12, 15, 17, 18 e 20}		
Vetorização favorecida pela hipertermia:	Doxorrubicina (Doxil [®]) ^{1-3, 5-7, 10, 12, 13, 15-18, 20 e 21}		
Agente antineoplásico clinicamente usado no tratamento de carcinomas de [43]:			
1. Mama	2. Ovário	3. Endometrial	4. Cólon
5. Próstata	6. Testículo	7. Bexiga	8. Pâncreas
9. Estômago	10. Esôfago	11. Gastrointestinal	12. Cabeça e pescoço
13. Cérvix	14. Tireóide	15. Pulmão	16. Garganta e boca
17. Sarcomas	18. Linfomas	19. Melanomas	20. Neuroblastomas
21. Leucemia linfocítica	22. Leucemia linfoblástica	23. Leucemia mielocítica	24. Leucemia mielomonocítica
25. Leucemia mieloma			

Adaptado de: Hall, E. J. e Giaccia, A. J., 2012, p.501 [36]

Apesar dos mecanismos biofísicos exatos ainda não estarem completamente elucidados a HT é, provavelmente, o sensibilizador biológico mais potente já identificado para RT e QT [41].

Outro conhecimento já bem estabelecido na literatura, sobre tumores sólidos, é que eles possuem características fisiopatológicas muito diferentes de tecidos ou órgãos normais [44]:

– **São conhecidos por terem uma arquitetura vascular anômala e defeituosa:** *e.g.* o fluxo sanguíneo em órgãos saudáveis, tais como rim, medula óssea, cérebro e fígado mantém-se constante independentemente de uma variação de pressão sanguínea, no entanto, os vasos sanguíneos em tumores sólidos parecem perder a capacidade de autorregulação homeostática, tal que, o aumento da pressão sanguínea é acompanhado de um aumento do fluxo e, também, um aumento da permeabilidade vascular.

– **Possuem alta densidade vascular, resultante de uma extensiva angiogênese:** tumores sólidos superexpressam fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF – *vascular endothelial growth factor*) e, também, possuem elevados níveis de fatores que aumentam a permeabilidade dos neovasos (*e.g.* bradicina, óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito (ONOO⁻)).

– **Possuem uma drenagem linfática ineficiente:** o que permite partículas (*e.g.* macromoléculas biocompatíveis, lipossomas e nanocarreadores), com tamanhos tão grandes como 150 nm e peso molecular maior que 60 kDa, entrarem e serem retidas dentro dos tumores, enquanto que substâncias de baixo peso molecular retornam para a circulação sanguínea (devido à altas pressões intersticiais).

Normalmente, o endotélio vascular (em humanos) é composto por fenestrações (poros) de tamanho entre 5 e 10 nm. Nos tumores sólidos, os neovasos têm fenestrações bem maiores (100 a 780 nm) [45]. Por exemplo, em inflamações de tecidos normais a entrega de macromoléculas para o espaço intersticial, feita pelo sistema linfático, é muito mais rápida do que em tecidos tumorais, cuja depuração é muito mais lenta (da ordem de alguns dias). Macromoléculas são capturadas e acumuladas em tumores sólidos e mantidas em altas concentrações por períodos prolongados (mais que 100 horas). Este fenômeno é conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR – *enhanced permeability and retention*), e tem sido utilizado para melhorar a eficiência terapêutica utilizando nanocarreadores [44].

A HT de tumores sólidos entre 40–42 °C aumenta o tráfego de macromoléculas do fluxo sanguíneo para o espaço intersticial, Kong *et al.*, em 2001, mostraram que conforme o tumor é aquecido, a taxa de captação para dentro do espaço intersticial (*e.g.* de lipossomas com tamanhos de 100–400 nm) dobra para cada elevação de 1°C na temperatura intratumoral entre 40°C e 42°C. E este efeito não ocorre em tecidos saudáveis, justificando o potencial uso terapêutico desse fenômeno. Os resultados, também, evidenciaram que os poros permanecem bem aumentados por até 4h após a HT e apenas 6hs depois retornam à conformação de pré-aquecimento. E, uma segunda sessão de HT (8h depois do primeiro aquecimento), não foi capaz de reabrir as fenestrações, do que os pesquisadores concluíram que este efeito estava relacionado à expressão de proteínas de estresse térmico pelo tumor (*heat shock proteins*), um fenômeno de termotolerância induzida [42, p. 279–281].

Resultados *in vivo* (em modelos tumorais murinos) já demonstraram que, quando tumores sólidos são aquecidos entre 39° – 42°C por um intervalo de tempo igual a 30 min, a

sua taxa de perfusão sanguínea é aumentada e, acompanhada, de uma reoxigenação tumoral (a mediana da pressão parcial de oxigênio (pO_2) aumenta para 4 – 10 mmHg) nas primeiras 24 horas após a sessão de HT (fase reativa). Já o aumento do tempo de aquecimento para 60 min, ou o aumento da temperatura intratumoral ($> 43^\circ\text{C}$), ambos resultam no efeito oposto [41], [46]. E para tempos de HT entre 60 – 120 min com temperatura $> 43^\circ\text{C}$ os danos à rede vascular em tumores sólidos murinos são graves (fase destrutiva), com início de estase ablativa (interrupção do fluxo sanguíneo) [41], [47]. Como comparação, a HT de tecidos normais em camundongos (pele e músculo) por 60 min: se $42^\circ\text{C} \leq T < 45^\circ\text{C}$ há aumento da perfusão sanguínea; se $T \geq 45^\circ\text{C}$ há diminuição da perfusão sanguínea; e em muitos casos se $45^\circ\text{C} \leq T \leq 47^\circ\text{C}$ (numa taxa de aquecimento igual a $0,7^\circ\text{C}/\text{min}$) há início de estase vascular [41], [28].

Todavia, a dependência da oxigenação e perfusão sanguínea tumoral com a temperatura é bem complexa, por exemplo, a fragmentação da entrega de calor em mais de uma sessão de HT produz efeitos curiosos. Song *et al.* publicaram resultados em camundongos C3H (com tumor sólido RIF-1 – *radiation-induced sarcoma*) onde, após 1 hora de HT à temperatura de $43,5^\circ\text{C}$ houve um aumento nos fluxos sanguíneos tumoral e nos tecidos em torno do tumor, na pele (por um fator de 1,8 vezes) e no músculo (por um fator de 5 vezes). Inicialmente, o fluxo sanguíneo no tumor era da ordem de 5 – 6 vezes maior que na pele e músculo. Já a partir da segunda sessão de HT (24h ou 72h depois) o fluxo sanguíneo tumoral caiu para 50% do seu valor inicial (antes da primeira HT), e da segunda até a quinta sessão assim manteve-se, enquanto que ao final de cinco sessões de 1h a $43,5^\circ\text{C}$ (a cada 3 dias) o fluxo sanguíneo na pele e no músculo era 1,5 – 2 vezes maior que antes do primeiro tratamento [41], [48]. Noutro estudo realizado por Nah *et al.*, com tumores subcutâneos em ratos Fischer (adenocarcinoma R3230), um primeiro aquecimento da região tumoral (banho térmico) por 60 min a $42,5^\circ\text{C}$ fez com que o fluxo sanguíneo na microvasculatura tumoral fosse 1,5 vezes maior que antes da HT e, uma segunda sessão de 60 min a $44,5^\circ\text{C}$ (16h, 24h ou 48h depois da primeira) promoveu aumentos nas taxas de perfusão sanguíneas do tumor ($\times 1,1$), da pele ($\times 2$) e músculo ($\times 1,4$), relativamente aos valores antes da primeira dose de calor [41], [49].

O que todos esses resultados da literatura, apresentados nos dois parágrafos anteriores, têm em comum e evidenciam é que a HT de tumores sólidos, dependendo do histórico de exposição térmica do paciente (temperatura e tempo de aquecimento), pode atuar como um modulador da oxigenação e perfusão tumoral e, também, maximizar o efeito EPR.

Com efeito, a primeira estratégia bem sucedida sobre a utilização de HT como um potencializador do efeito EPR ocorreu na vetorização passiva, para dentro de tumores sólidos, de lipossomas de longa circulação e com baixa temperatura de fusão (LTSL – *low temperature sensitive liposome*), desenvolvidos por Needham e Dewhirst em 2000, preenchidos com um agente quimioterápico (Doxorrubicina) aonde devido ao aquecimento intratumoral entre 39° – 42°C, a fusão da bicamada lipídica promovia a liberação *in situ* do fármaco em concentrações terapêuticas (tempo de liberação < 20 segundos). Kong *et al.* (2000) e Needham *et al.* (2000) foram os primeiros à avaliar *in vivo* a eficácia antitumoral da associação HT+LTSL-Dox e ambos os trabalhos concluíram que, a concentração intratumoral do quimioterápico ao final de cada procedimento *in vivo* era 25 – 30 vezes maior do que, apenas, utilizando a doxorrubicina de circulação livre ou, o Doxil[®] (lipossoma contendo doxorrubicina *peglada*, com ponto de fusão ~ 45°C e tempo de liberação ~ 30 min) [11], [42, p. 282–284].

Agora, no que tange à utilização na clínica médica de sistemas eletromagnéticos para realização de terapias térmicas no tratamento de tumores sólidos em seres humanos, *e.g.* na ablação por RF ou MW esses dois métodos invasivos promovem um intenso aquecimento tecidual local (temperatura intratumoral acima de 50°C e mantida por alguns minutos) com a introdução no tumor/órgão do paciente (*e.g.* fígado, rim, pulmão, próstata e osso) de eletrodos metálicos conduzindo corrente elétrica alternada na faixa de 450–500 kHz (na ablação por RF) ou de antenas de MW operando em frequências de 915 MHz – 2,45 GHz [42, p. 159]. De maneira geral, procedimentos ablativos devem ser vistos como tratamentos curativos e não paliativos uma vez que a desnaturação de importantes proteínas celulares e necrose provocada (volume de tecido não perfundido por corrente sanguínea após o intenso aquecimento) é um dano térmico irreversível para os tecidos dentro da zona de ablação, haja vista que são necessários alguns minutos para matar células *in vivo* a 50 °C, mas apenas segundos a temperaturas acima de 60 °C (a despeito da diferença de termotolerância entre as diferentes células/tecidos do corpo) [28].

Dessa forma a utilização de RF é recomendada para tumores sólidos com diâmetros menores que 3 cm, uma vez que existe uma maior dificuldade de se obter ablação completa com margem de segurança de 0,5–1,0 cm em lesões maiores. E um fator fortemente associado à recidiva local é a presença de grandes vasos sanguíneos na região tumoral (com diâmetro ≥ 3 mm) e que funcionam como um circuito de arrefecimento roubando calor do meio durante o aquecimento por RF, processo conhecido como *heat sink effect*, sendo necessárias múltiplas

ablações sequenciadas [6] ou simultaneamente com múltiplos eletrodos [4]. Já a ablação por MW mostra-se um procedimento mais eficiente para tumores um pouco maiores (e cuja penetração da potência transportada pela microonda na maioria dos tecidos é de 2,0–4,0 cm), onde resultados da literatura dão conta de indução de trombose completa em vasos intratumorais com mais de 10 mm de diâmetro, além da geração de calor mais rápida, intensa e de forma contínua conforme visto no gráfico da Figura 1.1 (A). Todavia, o formato em haste cilíndrica do eletrodo de RF ou da antena de MW, nesses dois tipos de tratamento produzem zonas de ablação (região de tecido necrosado) elipsoidais alongadas em torno do eixo do eletrodo/antena introduzido (vide Figuras 1.1 B e C) o que pode não ser desejável dependendo do tipo de aplicação clínica (*e.g.* dependendo da forma e localização do tumor no corpo do paciente) [42, p. 168]. Nessas duas modalidades de tratamento o monitoramento da temperatura intratumoral acessada (em tempo real) pode ser feito pontualmente por um termômetro já incorporado ao próprio eletrodo/antena e, também, pela inserção de outros cateteres (sondas de temperatura) tipicamente em 3 a 5 pontos distintos. Ou ainda, utilizando sistemas mais sofisticados de escaneamento tridimensional, *e.g.* imageamento termográfico por ressonância magnética (IRM) [50], [51]. Contudo, como a ablação por RF ou MW é um processo rápido e o aquecimento é praticamente transiente, para esse tipo de aplicação a maioria dos equipamentos comerciais (sistemas integrados de imageamento) utilizados na prática clínica são desenvolvidos com foco na determinação do tamanho e forma da zona de ablação, e não na distribuição da temperatura em todo o tecido aquecido [7].

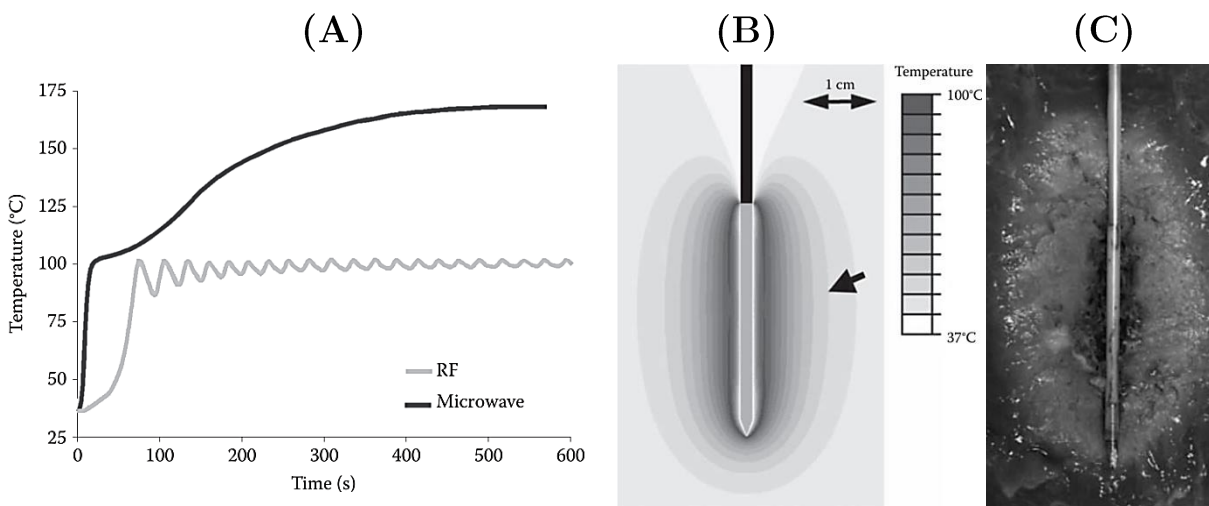


Figura 1.1 (A) Temperatura *in vivo* medida a 5 mm de distância de uma antena de microondas (MW) e de um eletrodo de radiofrequência (RF) durante uma ablação de córtex renal (parte mais externa do rim localizado entre a cápsula renal e a medula renal), demonstrando o aquecimento do tecido de forma mais rápida e contínua na ablação por MW. (B) Ilustração do perfil de aquecimento de um tumor sólido ao final de um procedimento de ablação por RF (~ 10 min de aquecimento). A parte preta do eletrodo é eletricamente isolada, e o aquecimento é provocado pelo estabelecimento de uma corrente elétrica alternada (tipicamente na faixa de 450–500 kHz) na ponta condutora em contato com o tecido: a seta indica o limite da zona de ablação (temperatura ~ 50°C). (C) Imagem *ex vivo* da zona de ablação: região de tecido necrosado (mais clara na imagem) com formato elipsoidal alongado em torno do eixo de um eletrodo de RF (ou antena de MW) introduzido no tecido (fígado). Adaptado de: MOROS, E. , 2013, p. 168 e 171 [42].

O aquecimento por HIFU, tanto no regime de hipertermia branda (43–46 °C) quanto na ablação (acima de 50 °C), já é bastante utilizado em humanos no tratamento de miomas fibroides uterinos, hiperplasia prostática benigna, câncer de próstata, câncer de mama, tumores cerebrais e tratamento paliativo de metástases ósseas para aliviar a dor [52]–[57]: a energia transportada por um feixe de ultrassom de alta intensidade (gerado por transdutores cuja frequência de operação varia de 0,95–1,35 MHz) ao atingir um determinado ponto no tecido é em parte dispersa fora do feixe principal por estruturas do próprio tecido no caminho da onda de pressão, e em parte absorvida causando o movimento de partículas durante as fases de compressão e rarefação, e a dissipação subsequente da potência acústica (espalhada e absorvida) na forma de calor provoca um aumento geral da temperatura global no tecido exposto [42, p. 82]. Essa é uma modalidade muito bem desenvolvida e já existem equipamentos dedicados integrando os transdutores a um sistema de IRM (vide Figura 1.2) para determinação do caminho do feixe no tecido e, também, o mapeamento tridimensional da temperatura intratumoral – estes sistemas foram desenvolvidos pioneiramente por uma companhia chinesa (Chongqing HIFU Technology) e com autorização (desde 1999) das agências federais de controle de procedimentos médicos dos governos chinês (SFDA), norte-americano (FDA) e da união europeia (CE) para sua utilização em humanos – onde é possível

a determinação do volume tratado (zona focal tipicamente com diâmetro variando entre 1,0–10,0 mm e comprimento de 8,0–45,0 mm), assim como a temperatura acessada em tempo real (com um *delay* $\sim 3,0$ seg) e, também, da dose térmica equivalente (CEM43) entregue dentro do volume sonicado [42, p. 181–182].

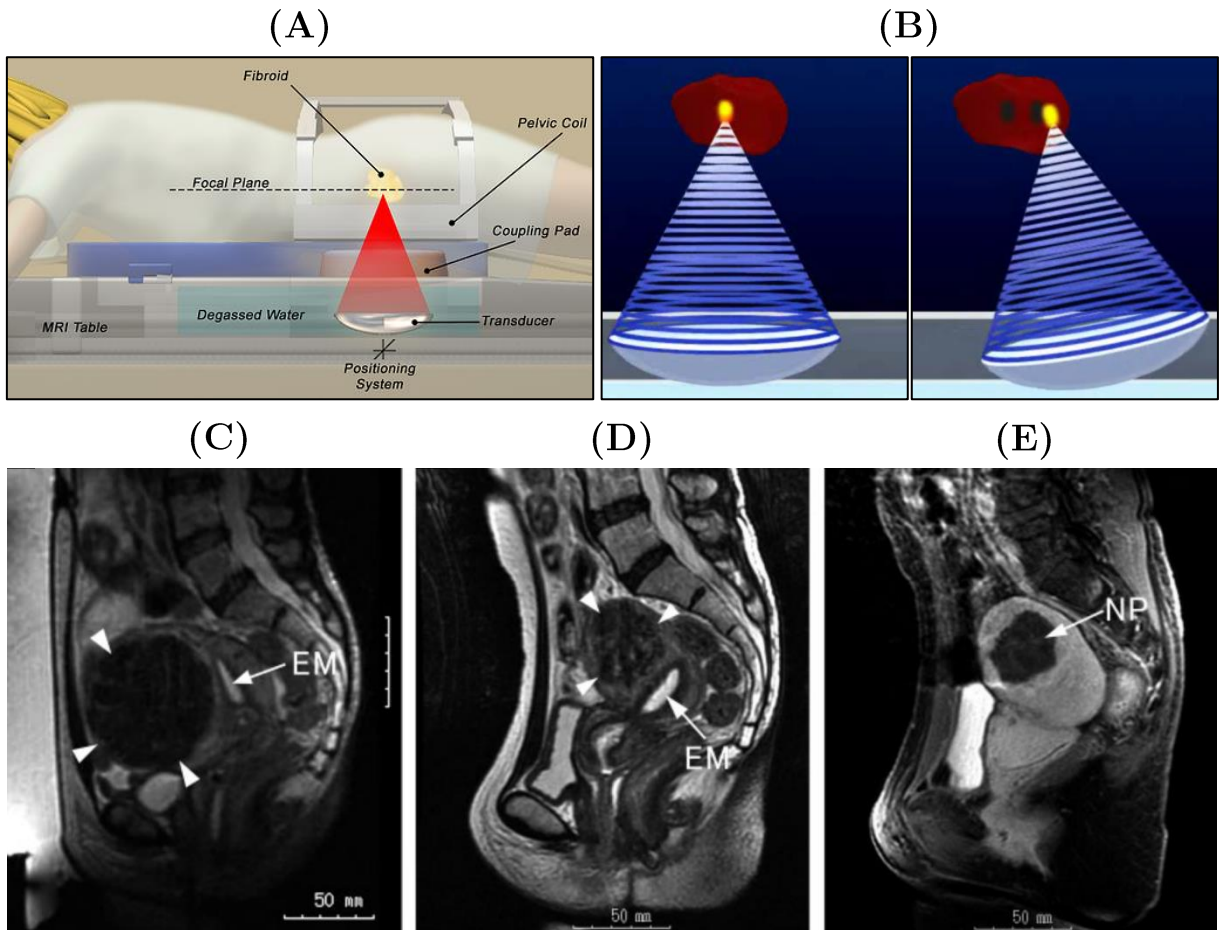


Figura 1.2 (A) Diagrama esquemático de aparelhos de HIFU guiados por IRM no tratamento de miomas fibroides uterinos. (B) Representação de como o transdutor que gera o feixe de ultrassom focalizado de alta intensidade pode ser direcionado para atingir regiões específicas dentro do volume tratado, todo o procedimento de ablação é guiado (em tempo real) por IRM. As figuras de (C) à (E) são imagens de ressonância magnética (corte sagital do útero) antes e depois de um procedimento de ablação por HIFU guiada por IRM em uma mulher de 44 anos com mioma fibroide uterino de tipo 2 e hipermenorréia: (C) imagem ponderada em T_2 antes da ablação, o volume identificado do mioma (limite indicado pelas setas brancas) foi de $228,9 \text{ cm}^3$ e a proporção da área tratada foi de 66,8%. (D) imagem ponderada em T_2 24 meses após a ablação, mostrando 81,1% de redução do volume tumoral, relativamente ao volume pré-tratamento (limite indicado pelas setas brancas). (E) Imagem ponderada em T_1 melhorada, também 24 meses após a ablação por HIFU, indicando que o volume central do mioma não é mais perfundido por corrente sanguínea (região necrosada). EM – endométrio; NP – área não perfundida. Adaptado de: FUNAKI, *et al.*, 2009, p. 585 [53].

Nas três últimas décadas, grandes esforços multidisciplinares por meio de colaborações internacionais foram empreendidos para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do câncer [12], [13], principalmente, se apropriando da grande evolução no campo da nanotecnologia (*e.g.* o desenvolvimento de uma infinidade de nanocarreadores

multifuncionais, com tamanhos na faixa de 1–1000 nm, combinando ligantes moleculares para marcação, imageamento, entrega alvo-dirigida e controlada de agentes antineoplásicos a nível celular [11]). Nesse contexto, é possível mencionar como primeiros exemplos de estratégias bem sucedidas em seres humanos a utilização do Doxil[®], OrthoBiotech (já mencionado anteriormente no texto) aprovada em 1995 pela Food and Drug Administration (FDA) nos EUA para o tratamento do sarcoma de Kaposi relacionado com o vírus HIV o qual teve, também, posteriormente aprovado o seu emprego no tratamento de câncer ovário e mieloma múltiplo [11]. Assim como a primeira aplicação clínica, também aprovada pela FDA nos EUA em 1997, de nanopartículas magnéticas (NPM) de óxido de ferro como agentes de contraste negativo na técnica diagnóstica de IRM para melhorar a detecção de tumores no fígado [58], [59].

Algumas terapias térmicas utilizam o acúmulo e retenção (seja por vetorização passiva utilizando o efeito EPR ou mesmo por injeção intratumoral direta) de nanoestruturas metálicas dentro de tumores sólidos como fontes de geração localizada de calor: *e.g.* a terapia fototérmica que tipicamente emprega nanoesferas ou nanocascas de ouro, com dimensão de 10–100 nm, e que são opticamente excitadas [60], [61]; ou ainda a hipertermia magnética (HM) utilizando NPM, compostas principalmente de ferritas do tipo magnetita (Fe_3O_4) ou maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) com tamanho de 10–20 nm, acionadas por um campo magnético alternado [14], [58], [62]–[64]. Essas duas modalidades têm sido preconizadas como terapêuticas adjuvantes e despontado como promissoras opções de alta eficiência e alta seletividade no tratamento do câncer, com resultados pré-clínicos [18]–[20], [65]–[68] e clínicos [21], [22], [69] encorajadores demonstrando grande potencial no tratamento de tumores tanto superficiais, quanto profundos de difícil acesso no corpo do paciente e com geometrias complexas. Em especial, a seção 1.3 (neste capítulo de introdução) será inteiramente dedicada ao estudo da técnica de HM com NPM, através da análise de importantes trabalhos da literatura que ilustram tanto um panorama histórico quanto de estado da arte dos avanços conseguidos e, também, das limitações ainda existentes nessa modalidade de tratamento.

Agora, continuando a discussão sobre terapias térmicas emergentes para o tratamento de carcinomas malignos, dependendo da posição de um tumor sólido no corpo, também é possível utilizar uma fonte laser para a realização de sua hipertermia, ou mesmo ablação, e os principais métodos de aplicação desse laser são: a incidência direta sobre tumores de superfície (na pele ou subcutâneos), ou a introdução de uma fibra-óptica intersticial

minimamente invasiva para irradiação de tumores profundos [65]. A profundidade de penetração em tecidos biológicos vivos de qualquer laser utilizados em aplicações biomédicas dessa natureza é sempre dependente do comprimento de onda do feixe emitido pela fonte e, de acordo com resultados da literatura, pode atingir no máximo até ~ 1 cm [70]. Nessa modalidade há outro exemplo de utilização da nanotecnologia numa terapia térmica para o tratamento de tumores sólidos que é a terapia fototérmica utilizando nanoestruturas metálicas, *e.g.* nanoesferas ou nanocascas numa estrutura *core-shell* (em geral com dimensão de 10–100 nm): quando estão presentes dentro do tumor, a dispersão do laser nessas nanoestruturas pode produzir contraste para imagens, enquanto a absorção da energia transportada pelo feixe pode ser utilizada para a geração de calor dentro do tumor de forma terapêutica (se houverem mecanismos de controle da sua intensidade e limitação da região aquecida para a preservação de tecidos sadios) [42, p. 319]. De maneira simplificada, na interação do laser com nanopartículas metálicas o campo elétrico do feixe incidente provoca a oscilação dos elétrons livres no metal e, quando a frequência da onda eletromagnética incidente é da mesma ordem da frequência de oscilação desses elétrons livres na interface do material com o meio externo (metal–tecido tumoral), então, há grande taxa de absorção de energia na superfície da nanopartícula, esse efeito é conhecido como ressonância plasmônica de superfície (RPS) [42, p. 324], [71]. Subsequentemente a energia absorvida pela nanopartícula metálica é dissipada na forma de calor; ou os fótons são espalhados elasticamente para o meio na mesma frequência (e mesma energia) do feixe incidente (dispersão de Rayleigh) ou inelasticamente numa frequência deslocada (com menor energia) (dispersão de Raman) [72, Cap. 12]. Outras estruturas das diferentes camadas teciduais no caminho do feixe também podem ser altamente dispersivas, de maneira que em tecidos biológicos vivos a propagação desde a luz visível até o infravermelho próximo (comprimentos de onda na faixa de 400–1200 nm), o caminho livre médio dos fótons entre dois eventos de espalhamento é da ordem de 0,01–0,2 mm [73, p. 28].

Por exemplo, num estudo pré-clínico conduzido por Schwartz, A. J. *et al.* (em 2009), foi realizada a ablação de tumores sólidos intracranianos em cães (modelo xenográfico ortotópico de metástase cerebral), introduzindo no tumor dos animais uma fibra óptica intersticial para condução de um feixe laser com potência de 3,5 W na região do infravermelho próximo ($\lambda = 808$ nm). Nanocascas esféricas de ouro com diâmetro de 144–150 nm (estrutura *core-shell* onde um caroço de sílica tem uma fina camada de cobertura de ouro com espessura de 12–15 nm) infundidas sistemicamente na corrente sanguínea dos cães foram acumuladas passivamente por efeito EPR nos tumores sólidos em concentrações

de 2,8–49,3 $\mu\text{g/g}$. E com apenas 3 min de irradiação com o laser a média (em 4 tumores) da temperatura intratumoral acessada foi igual a $(65,8 \pm 4,1) ^\circ\text{C}$ (em um deles chegando a $71,5 ^\circ\text{C}$) o que resultou na ablação completa de todos os tumores com uma região de edema estendendo-se de 0,5–4 mm fora dos limites do tumor. No único animal controle (tumor sem as nanocascas de ouro) o mesmo laser, no mesmo tempo de 3 min, produziu um aquecimento intratumoral de $53,1 ^\circ\text{C}$ sem causar nenhum dano letal ao tumor. A termometria *in vivo* (em tempo real) assim como a determinação do volume da zona de ablação foi realizada por IRM e todos esses achados foram confirmados por histopatologia dos tumores após sua excisão [65]. A partir desse exemplo e, também, de outros resultados da literatura onde é comparada a eficiência (*e.g.* resposta biológica do tipo remissão tumoral completa, ou parcial com aumento de sobrevida) em modelos xenográficos murinos da terapia fototérmica *in vivo* (hipertermia ou ablação a laser) com e sem a aplicação de nanoestruturas de ouro (*e.g.* *nanoshells* [66], [67], *nanorods* [66] e nanopartículas [68]), é possível concluir que a presença dessas nanoestruturas metálicas dentro do tumor (acumuladas passivamente por efeito EPR depois de prolongada circulação na corrente sanguínea [66], [68] ou injetadas diretamente no tumor [67]) reduz significativamente a potência de laser necessária para a destruição do cancro devido à absorção melhorada da energia do laser, em média, acessando temperaturas intratumorais $\sim 10 ^\circ\text{C}$ mais elevadas do que nos grupos controle (para a mesma potência radiante aplicada e na mesma janela de tempo).

Mas, em qualquer que seja o contexto ou técnica experimental utilizada para realização de HT *in vivo*, preconizando sua aplicação na clínica médica seja como terapia adjuvante ou mesmo monoterapia, a precisão na determinação do limiar de danos térmicos (subletais ou letais) nos tecidos tumorais (ou saudáveis) aquecidos é altamente dependente da precisão na medida da temperatura intratumoral, durante a entrega localizada de calor [28]. Na próxima seção de introdução (seção 1.2) será adequadamente apresentado o conceito de dose térmica (efeito cumulativo da quantidade de calor entregue intratumoralmente) e a forma como ela é calculada, levando em consideração o histórico de exposição térmica do tumor (temperatura e tempo de aquecimento). Este é um conceito chave em termometria no que diz respeito às terapias térmicas para o tratamento de câncer e, em particular, será o principal parâmetro utilizado para explicar os resultados experimentais de remissão tumoral parcial e completa que serão apresentados ao final dessa tese de doutorado (no capítulo 5).

1.2 Dosimetria térmica.

A comparação entre diferentes resultados da literatura (*in vitro* e/ou *in vivo*) com o objetivo de avaliar os efeitos da hipertermia (HT) sobre células/tecidos (normais ou neoplásicos) precisa sempre levar em consideração o histórico de exposição térmica (temperatura e tempo de aquecimento) em cada configuração experimental. E no que tange ao tratamento do câncer por HT, em qualquer que seja o ensaio realizado, a introdução de um conceito de dose térmica objetiva sempre estabelecer uma relação preditiva direta entre um número (que normalize os dados do histórico de exposição térmica) e os resultados de danos térmicos biológicos provocados pelo calor (*e.g.* danos funcionais subletais ou letais, remissão tumoral parcial ou completa). E, qualquer que seja o modelo matemático adotado para determinação do valor da dose térmica associada a uma dada resposta biológica, sua precisão estará, sempre, limitada à precisão do mapeamento da temperatura intratumoral. Onde a situação ideal seria o seu conhecimento tridimensional, e em tempo real ao procedimento de HT localizada.

Toda via, é importante começar esta seção declarando que (atualmente) não existe consenso absoluto na literatura sobre a forma correta de se calcular o valor da dose térmica. A grande maioria dos trabalhos publicados utiliza a formulação matemática (do tipo Arrhenius) proposta em 1977 por Sapareto *et al.* em seu clássico trabalho de investigação da ocorrência de danos térmicos irreversíveis em células neoplásicas de ovário de hamster chinês (CHO-10B) [74]. E que, apesar de amplamente utilizada, a equação de dose térmica proposta por Sapareto e Dewey (eq. 1.2.2), apresenta uma série de pontos fracos quando é usada para prever a eficácia de tratamento em muitos, mas não em todos, ensaios clínicos relatados na literatura [41], [75]. Ou seja, o desenvolvimento de uma abordagem matemática para o cálculo da dose térmica e que seja universalmente aceita pela comunidade científica, como sendo um valor seguramente preditivo de uma determinada resposta clínica, ainda é um problema em aberto e, inclusive, muito recentemente foi tema de uma sessão especial de encerramento (sob o título: “*house believes that measurement of thermal dose is essential for thermal therapy*”) do 12º Congresso Internacional de Hipertermia Oncológica (realizado em abril de 2016, New Orleans, LA) e que reuniu em torno desse debate experientes pesquisadores das sociedades de medicina térmica norte americana (Society for Thermal Medicine), europeia (European Society for Hyperthermic Oncology) e asiática (Asian Society of Hyperthermic Oncology)[76].

Experimentos de viabilidade celular *in vitro* objetivam avaliar, em função da temperatura e do tempo de aquecimento, a capacidade de uma cultura de células continuarem formando novas colônias. A perda dessa capacidade (ou perda de clonogenicidade) em função do histórico de exposição térmica, nesse tipo de ensaio, é identificada como morte celular. E, geralmente, as curvas de sobrevivência são construídas como o logaritmo da razão entre a população de células viáveis $S(T)$ a uma dada temperatura constante T sobre o número inicial de células clonogênicas no início do aquecimento N_0 , isto em função do tempo de exposição térmica, ou seja, o $\log\{S(T)/N_0\} \times t$. Nesse tipo de experimento (ensaios clonogênicos), tipicamente, a taxa de sobrevivência celular $\left(\frac{dS}{dt}\right)$ diminui rapidamente nos primeiros minutos de aquecimento, o “ombro” do gráfico, identificado como uma inclinação cada vez mais negativa da curva de sobrevivência até que essa taxa atinge um valor aproximadamente constante, resultado de um efeito de termotolerância induzida, principalmente, devido à ação das proteínas chaperonas de choque térmico (vide o gráfico da Figura 1.4 (A)) [75].

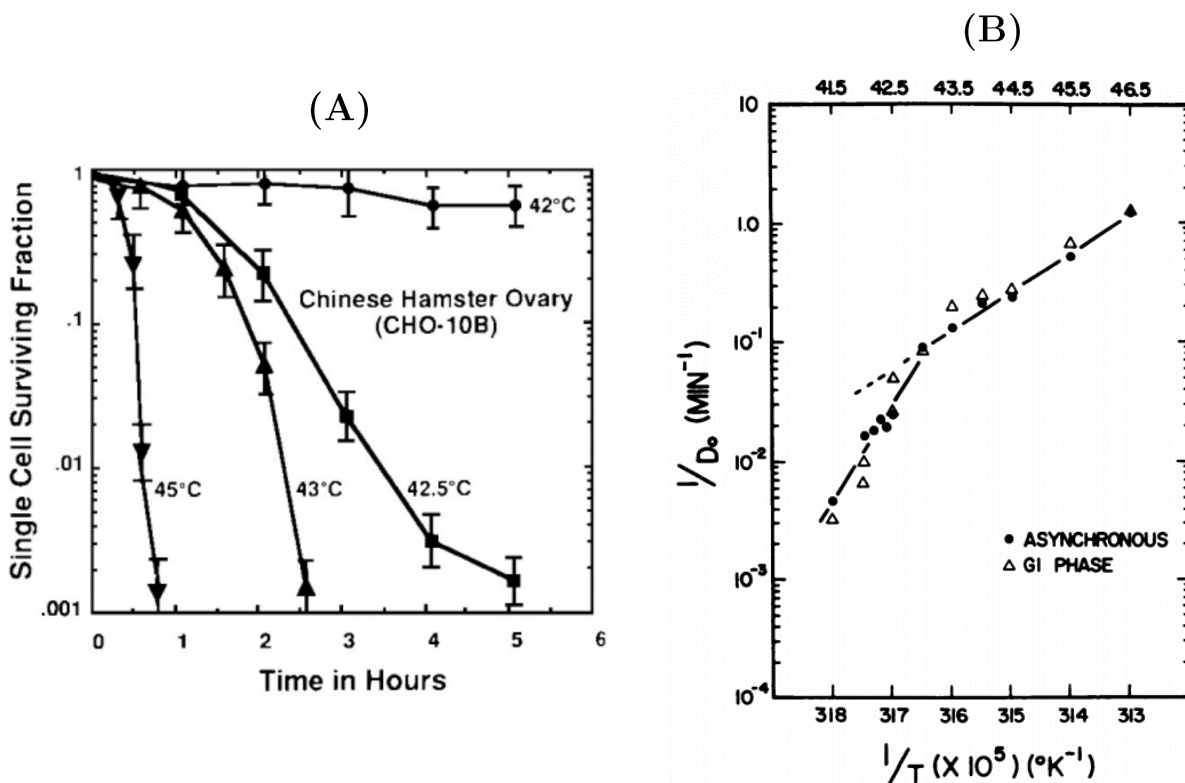


Figura 1.4 (A) Curvas de sobrevivência (*in vitro*) de células neoplásicas de ovário de hamster chinês (CHO-10B) em função do tempo de aquecimento, para diferentes valores de temperatura (constantes no tempo). Adaptado de: Dewhirst *et al.*, 2003, p. 268 [28]. (B) Curva de Arrhenius do inverso de D_0 em função da temperatura de inativação celular, onde os valores de D_0 correspondem aos máximos coeficientes angulares das curvas de sobrevivência da Figura 2.1 (A). Dados experimentais (células neoplásicas de ovário de hamster chinês) para uma população de células em crescimento assíncrono (●) e, também, na fase G1 (síncrona) do ciclo celular (△). Os valores das energias de inativação acima e abaixo da temperatura *breakpoint* (43°C) são 148 e 365 kcal/mol, respectivamente. Adaptado de: Sapareto *et al.*, 1978, p. 395 [74].

Como já mencionado anteriormente, Sapareto *et al.* propuseram uma expressão matemática (eq. 1.2.1) capaz de ajustar, somente, parte da curva de sobrevivência, depois que sua inclinação fica constante e igual a $-1/D_0$, tal que D_0 é o tempo necessário (em minutos) para que o número de colônias decaia para $S = e^{-1} \cdot N_0 = 0,368N_0$ e $\tau = (t - t_0)$ é o tempo de exposição térmica [74], [77].

$$\left. \frac{S}{N_0} \right|_t = e^{-\left[\frac{t-t_0}{D_0(T)} \right]} \Leftrightarrow \ln \left(\left. \frac{S}{N_0} \right|_\tau \right) = -\frac{\tau}{D_0(T)} \quad (1.2.1)$$

Em seus experimentos com células neoplásicas de ovário de hamster chinês (CHO), os pesquisadores observaram uma ruptura na tendência de crescimento dos valores do coeficiente ($1/D_0$) em função do aumento da temperatura de aquecimento, em torno do valor de 43°C , indicando uma mudança na termosensibilidade dessas células, ou seja, os mecanismos de morte celular têm comportamento diferente, a temperaturas $<43^\circ\text{C}$, do que ocorre a temperaturas $\geq 43^\circ\text{C}$ (vide o gráfico da Figura 1.4 (B)). Assim, baseados em suas observações e, também, nos resultados de outros autores (com diferentes linhagens de células neoplásicas murinas) propuseram o cálculo da dose térmica (entregue durante cada sessão de HT) como a conversão do histórico de exposição térmica em um número equivalente de minutos à temperatura de 43°C , o que ficou conhecido na literatura como CEM43 (*cummulative equivalente minutes at 43°C*). O cálculo do CEM43 é dado pela equação abaixo (eq. 1.2.2)[75]:

$$CEM43 = \sum_{i=1}^N \Delta t_i R_{CEM}^{(43-T_i)} = \int_0^\tau R_{CEM}^{(43-T(t))} dt \quad (1.2.2)$$

Onde a exposição térmica pode ser somada tanto em intervalos de tempo discretos (Δt_i) (tal que T_i é a **temperatura média** no intervalo de tempo Δt_i), ou contínuos, e o coeficiente $R_{CEM} = 0,5$ se $T \geq 43^\circ\text{C}$, ou $R_{CEM} = 0,25$ se $T < 43^\circ\text{C}$, significando que a taxa de morte celular dobra para cada aumento de 1°C acima da temperatura de 43°C . É importante ressaltar que essa temperatura de *breakpoint* em 43°C não é a mesma para, absolutamente, todas as células murinas (normais ou neoplásicas em diferentes tecidos) e, principalmente, para todas as espécies (vide Tabela 1.3) [28], [78].

Tabela 1.3 – Valores do coeficiente R_{CEM} para temperaturas abaixo e acima da temperatura de *breakpoint* para diferentes células/tecidos de uma mesma espécie e, também, para diferentes espécies.

Dano térmico identificado: morte de células/tecidos	Intervalo de temperatura (°C)	Temperatura de <i>breakpoint</i> (°C)	R_{CEM}		Referência
			Abaixo	Acima	
Estudos <i>in vitro</i>:					
Células neoplásicas de ovário de hamster chinês (CHO-10B)	42,0–45,0	43,0	0,250	0,500	[74], [77]
Gliosarcoma murino (9L)	42,0–45,0	42,8–43,0	0,250	0,500	
Células tronco humanas normais (granulócitos/monócitos)	41,5–45,5	43,3	0,250	0,769	
Células precursoras hematopoiéticas humanas normais (CFU _C)	41,0–45,5	42,5–43,0	0,09–0,20	0,345	[78]
Gliosarcoma humano	42,0–46,0	43,8	0,154	0,588	
Câncer de pulmão (humano) de células não pequenas	42,0–44,0	43,0	0,167	0,556	
Melanoma humano (HTB-66)	42,5–45,0	43,5	0,233	0,428	[28]
Estudos <i>in vivo</i>:					
Carcinoma mamário murino (C ₃ H/Tif)	41,5–44,5	42,5	0,167	0,476	[78]
Fibrosarcoma murino (TLD/50)	41,5–45,5	42,0	0,167	0,476	
Sarcoma murino (S180)	41,0–47,0	42,3	0,250	0,476	[78]–[80]
Necrose da pele de camundongos	43,5–45,0	42,0	0,167	0,526	[78]
Necrose da pele de porcos e humanos	44,0–55,0	47,0	0,130	0,720	[28], [78], [81]

Adaptado de: Field, S. B. e Morris, C. C., 1983, p. 182 -183 [78].

Em 1947 Henriques e Moritz publicaram resultados *in vivo* de necrose epidermal provocada em porcos e, também, em humanos (com um $n = 33$ voluntários) por realização de HT, onde a pele tanto dos animais quanto das pessoas (na parte anterior da região torácica ou na parte ventral do antebraço) era submetida a um fluxo contínuo de água aquecida a uma temperatura na faixa de 44–55 °C [81]. Eles foram os primeiros pesquisadores a interpretar a cinética de danos térmicos irreversíveis (queimadura na pele de porcos e humanos causada por hipertermia) como uma reação unimolecular irreversível, onde em seus experimentos definiram um parâmetro de dano térmico (Ω) (índice adimensional) calculado na forma da eq. 1.2.3 abaixo [75], [82]:

$$\Omega = \ln \left\{ \frac{C_0}{C(\tau)} \right\} = \int_0^{\tau} A(T) e^{\left(\frac{-E_a}{RT(t)} \right)} dt \quad (1.2.3)$$

Onde C_0 corresponde à concentração inicial de células viáveis na região aquecida (ou tecidos não danificados), $C(\tau)$ é a concentração remanente de células (ou tecidos não danificados) nessa mesma região em função do tempo de exposição térmica τ (para uma dada temperatura constante T), $A(T)$ é o parâmetro adimensional de Arrhenius, E_a é uma energia de ativação dada em J.mol^{-1} (ou seja, um limiar de quantidade de energia que deve ser fornecida às células/tecidos para que estes sejam permanentemente lesionados), $R = 8,3143 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ é a constante universal dos gases ideais e T é a temperatura em que as células/tecidos são mantidos durante o tempo τ [75], [82]. O leitor interessado no desenvolvimento matemático completo que justifica a formulação do parâmetro de dano térmico (Ω) conforme a eq. 1.2.3, deverá dirigir-se ao apêndice A no final da tese. É importante ressaltar que, assim como o valor de CEM43 (eq. 1.2.2), o valor de Ω também é comumente utilizado na literatura para definir limiares de danos térmicos irreversíveis à células/tecidos sob regime de HT.

Entretanto, o cálculo da dose térmica via CEM43 (eq. 1.2.2) possui grandes limitações intrínsecas. Primeiramente, uma modelagem matemática do tipo Arrhenius falha, em muitos, mas não em todos os casos, ao superestimar a taxa de morte celular nos primeiros minutos da hipertermia moderada (aquecimento de 43–46°C) *in vitro* de células neoplásicas, o que pode levar a conclusões superotimistas sobre os limiares de danos térmicos (vide a Figura 1.5 (A), abaixo) [83]. E como já mencionado anteriormente a eq. 1.2.1 consegue ajustar, apenas, a parte linear da curva de sobrevivência ($\log \{S(T)/N_0\} \times$ tempo de aquecimento), ignorando o “ombro” do gráfico e não reportando nenhum parâmetro associado à região transiente do processo de indução de termotolerância [82], [84]. Segundo, tanto no cálculo do CEM43 quanto de Ω no modelo de Arrhenius a taxa de morte celular contabiliza, apenas, a perda de clonogenicidade em função da temperatura e do tempo de aquecimento. Contudo, o processo de morte celular por HT é muito mais complexo, intrincado e ainda não completamente elucidado. Envolvendo, além da perda da capacidade clonogênica, múltiplos processos paralelos de danos térmicos já identificados na literatura: *e.g.* cascata de caspases que resultam na indução de apoptose, necrose, necroptose, danos funcionais irreversíveis na membrana celular, nulcear e no citoesqueleto [41], [75]. Por exemplo, num estudo realizado por Bhowmick *et al.* com células neoplásicas de um modelo murino para câncer de próstata

(AT-1 Dunning), através de análises histológicas do tumor (após HT) foi possível identificar um acentuado processo de morte celular por necroptose tal que, a curva de sobrevivência desses dados apresenta uma temperatura de *breakpoint* em 50°C, e é muito bem ajustada pelo modelo de reação irreversível de Arrhenius (parâmetro de dano térmico Ω). Contudo, esse mesmo estudo também avaliou a perda de clonogenicidade, e outros danos causados devido ao calor na membrana das células neoplásicas que também pudessem levar à morte celular – apoptose devido à perda de calceína (indicador de diminuição de atividade esterásica intracelular e alterações físico-químicas na membrana celular) e captura do marcador nuclear fluorescente iodeto de propídio (PI) (o que torna possível verificar as alterações nucleares características dos estágios tardios da apoptose, como resultado do aumento da permeabilidade de membrana) [85] – os pesquisadores concluíram que, diferentemente do resultado anterior, o ajuste das curvas de sobrevivência (para perda de clonogenicidade, perda de calceína e captura de PI) pelo modelo de Arrhenius para danos térmicos (eq. 1.2.3 quando T é constante) superestima, substancialmente, a taxa de morte celular o que pode ser verificado pelo gráfico da Figura 1.5 (B) (logo abaixo)[75], [84], [86].

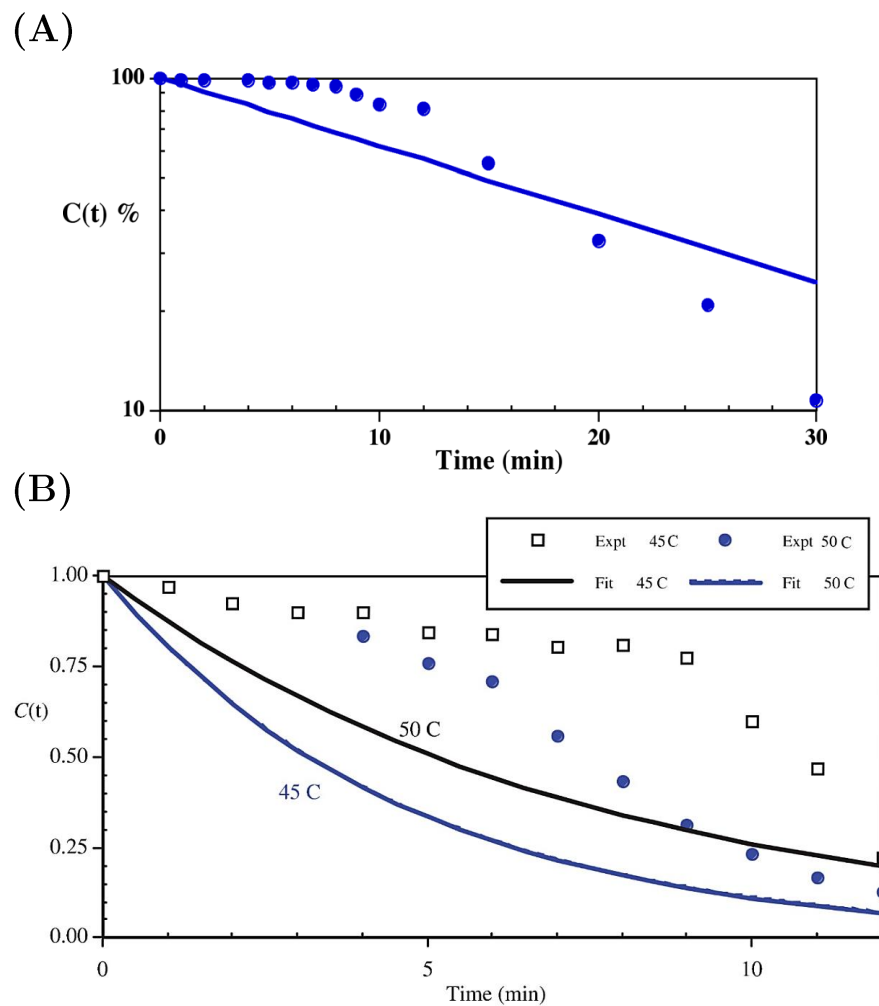


Figura 1.5 (A) Curva de sobrevivência de células neoplásicas de PC3 (linhagem de câncer de próstata humano) à temperatura de 44 °C, os dados experimentais (●) foram ajustados pelo modelo de reação irreversível de Arrhenius para danos térmicos (eq. 1.2.3) (linha contínua). O parâmetro indicativo de morte celular foi a captura do marcador fluorescente iodeto de propídio (PI) pela membrana nuclear (utilizado para monitorar apoptose tardia). Adaptado de: Pearce, J. A., 2015, p.3 [84]. (B) Curva de sobrevivência de células neoplásicas de Dunning AT-13 (modelo murino de câncer de próstata) às temperaturas de 45 °C (Expt □) e 50 °C (Expt ●), os dados experimentais foram ajustados pelo modelo de reação irreversível de Arrhenius para danos térmicos (eq. 1.2.3) (linha preta 45°C e linha azul 50°C). Adaptado de: Pearce, 2013, p. 276 [75].

Gerard C. van Rhoon [41], num recente trabalho de revisão (publicado em abril de 2016) analisou o estado da arte sobre a relevância do cálculo de CEM43 como parâmetro preditivo de respostas biológicas *in vivo* no tratamento de neoplasias por HT. Ele conclui que, apesar das limitações discutidas nos parágrafos anteriores, os resultados da literatura ainda indicam o cálculo da dose térmica (via CEM43), entregue intratumoralmente durante um procedimento de HT, como uma solução prática de integração dos dados de temperatura e tempo de exposição térmica. Também afirma que o principal fator limitante no uso das equações 1.2.2 e 1.2.3, ou qualquer outra equação multiparamétricas (vide apêndice A) de

cálculo da dose térmica [75], é o grau de precisão no monitoramento tridimensional da temperatura intratumoral em tempo real.

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 (IRM) que, por exemplo, já é realidade na prática clínica de ablação de tumores sólidos em humanos por HIFU [42, p. 181–182], contudo, essa é também uma modalidade de termometria muito cara e não compatível com todas as formas de terapia térmica para o tratamento de carcinomas (*e.g.* é o caso da hipertermia com nanopartículas magnéticas) [41], [87]. Outra limitação atual diz respeito à imprecisão (por vezes alta) na correlação entre mapas tridimensionais de CEM43 *in vivo*, ou seja, a determinação de volumes de dose térmica intratumoral (VDT) construídos por termometria de IRM (onde o valor de CEM43 é calculado por voxel da imagem termográfica), que não correspondem exatamente às regiões de tecidos necrosados (*e.g.* após ablação) dentro do mesmo tumor sólido e que, também, são identificadas por IRM (são os volumes não perfundidos por corrente sanguínea – VNP). Em experimentos clínicos de ablação por RF ou por HIFU de tumores desmóides de parede abdominal, como sarcomas de partes moles e outros tipos de tumores sólidos fibrosos em humanos, cujo limiar de necrose considerado é $CEM43 \geq 240$ min por voxel da região imagiada, resultados da literatura mostrando a superposição dos VDT (calculados) com os VNP (imagiados) mostram coincidências entre esses volumes variando desde 93% (resultados mais precisos) até 58% (resultados menos precisos) [2], [88]. Ou seja, a falta de acurácia na determinação dos VDT pode subestimar significativamente o volume verdadeiramente tratado por ablação (vide Figura 1.6 (B)).

Em um interessante trabalho recentemente publicado por Bitton *et al.* (2016), foram mostrados resultados clínicos (na ablação por HIFU de tumores sólidos de sarcoma de partes moles) em que a o aumento na precisão do cálculo do VDT (via IRM) pode ser conseguido levando em consideração o efeito cumulativo do calor depositado intratumoralmente. Em seus experimentos o tumor de cada paciente era aquecido por um tempo total de 32 min, dividido em sucessivas sonicações de 20 s cada, com intervalos de 60 s entre as sonicações para o resfriamento da região tratada. Acontece que, na maneira tradicional como a termometria por IRM é realizada (em tempo real com a ablação por HIFU) o valor de referência para a temperatura inicial (*baseline temperature*) é obtido imageando a região tratada imediatamente antes do início de sua primeira sonicação. E no mapeamento termográfico do tumor durante as sucessivas ablações, esse valor não é atualizado sob o argumento de que o equilíbrio térmico é

atingido entre a região tratada e a temperatura basal do paciente durante os intervalos de resfriamento (*immediate baseline method*). Contudo, os resultados experimentais mostraram que, quando as temperaturas de ablação são bem altas, a dose pode continuar a acumular-se após o ultrassom ter sido desligado. Tal que, a temperatura inicial do tumor antes de cada nova sonicação era de 4–13 °C mais elevada do que a temperatura inicial da primeira ablação. Em seu trabalho propuseram um algoritmo de atualização recursiva do mapeamento 3D da temperatura inicial, antes de cada sonicação, e consequente correção no valor acumulado de CEM43 por voxel das imagens geradas em função do tempo de ablação (*prior baseline method*). Este procedimento resultou em maior acurácia na estimativa do VDT e sua melhor correspondência com o VNP (vide Figura 1.6 (C)). Em suas conclusões finais, afirmam que essa metodologia pode evitar a realização de ablações desnecessárias indicando, em seus resultados experimentais, que o limiar de danos térmicos irreversíveis (≥ 240 min/voxel) poderia ser alcançado (e mantido) com um tempo total de ablação muito menor que 32 min [88].

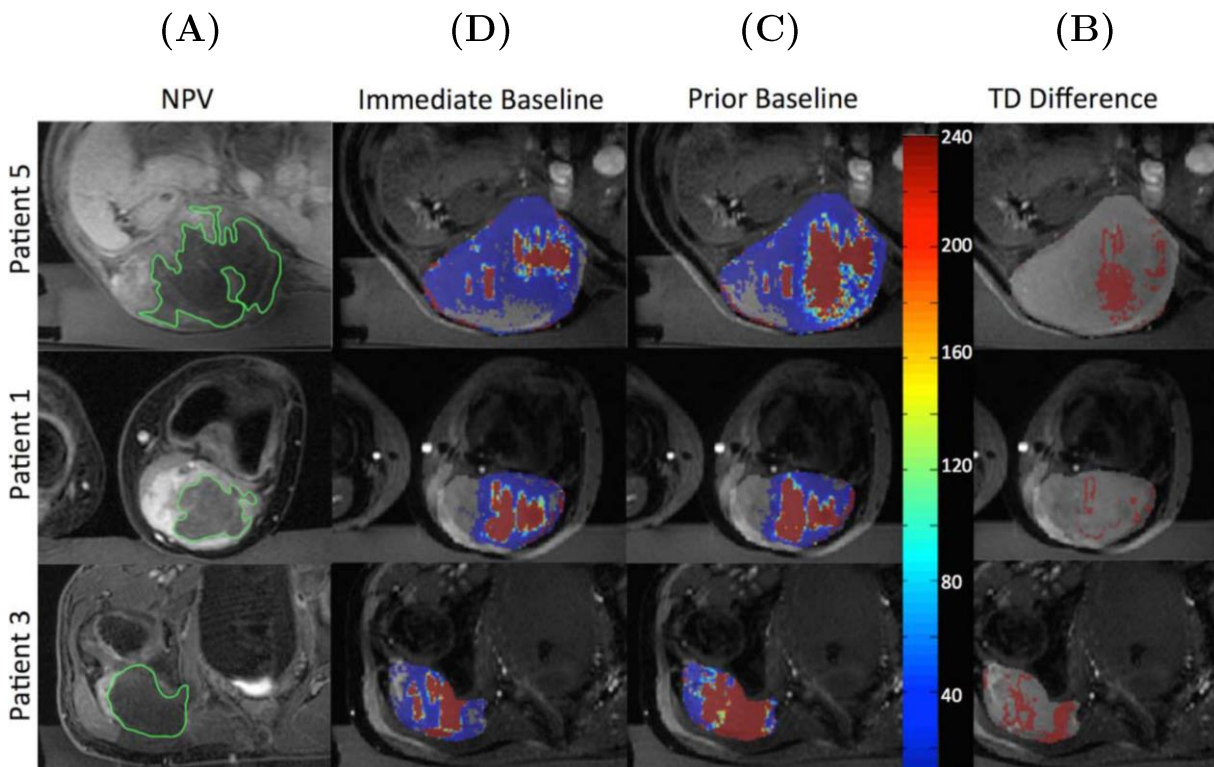


Figura 1.6 Comparação entre *slices* equivalentes do volume de dose térmica intratumoral (VDT) e a região necrosada do tumor após ablação por HIFU (volume não perfundido por corrente sanguínea - VNP). A coluna (A) mostra a região de VNP (delimitada pelo contorno em verde) identificada por IRM. A região de dose térmica (CEM43) entregue intratumoralmente é calculada (por pixel do *slice*) com base no mapeamento termográfico do tumor por IRM, a dose térmica letal (CEM43 ≥ 240 min) é indicada nas imagens pelos pixels em vermelho escuro. A coluna (B) corresponde à estimativa do VDT pelo método tradicional (*Immediate Baseline method*) e na coluna (C) considerando o efeito cumulativo do depósito de calor no tumor aplicando o algoritmo de correção da temperatura inicial (*Prior Baseline method*). Comparando os *slices* das colunas (A) e (B) é possível concluir que a região com pixels em que o valor da dose térmica é ≥ 240 min é bem menor do que a área real de tecido necrosado. Já na comparação de (A) com (C) a correspondência do VDT com o VNP é melhor. Na coluna (D) é mostrada a diferença do VDT calculado pelos dois métodos. Adaptado de: Bitton *et al.*, 2016, p. 15 [88].

A discussão sobre dosimetria térmica durante procedimentos de HT será retomada no capítulo 5 dessa tese de doutorado, onde serão discutidos alguns resultados preliminares do tratamento de tumores murinos de S180 (sólidos e subcutâneos) por HM *in vivo* com NPM de MnFe_2O_4 – DMSA (diâmetro de (15 ± 3) nm e SLP *in vitro* igual a 126,2 W/g) (vide caracterização das NPM no capítulo 2), correlacionando alguns de nossos achados de regressão tumoral parcial e total com limiares de CEM43 já identificados na literatura e associados a esse tipo de dano térmico.

E para o leitor interessado numa discussão mais aprofundada sobre os modelos matemáticos de cálculo da dose térmica via CEM43, modelo de Arrhenius (Ω) e outras equações multiparamétricas mais recentemente propostas na literatura, é feito um desenvolvimento nesse sentido no apêndice A.

1.3 Hipertermia com nanopartículas magnéticas para o tratamento do câncer.

Utilizando as equações de Maxwell do eletromagnetismo e o teorema de Poynting (eq. 1.3.1) é possível demonstrar que, de maneira geral, quando um meio material sofre a ação de um campo eletromagnético variável no tempo (campo elétrico $\vec{E}(t)$ e magnético $\vec{H}(t)$), há geração de calor nesse meio (dQ) devido ao trabalho (dW) realizado pelo campo externo sobre a amostra, convertendo energia eletromagnética em energia térmica [89, p. 98–102]:

$$\oint_{\text{Ciclo}} dQ = \oint_{\text{Ciclo}} dW = \int_V \left(\oint_{\text{Ciclo}} \vec{E} \cdot \vec{J}_F dt - \oint_{\text{Ciclo}} \vec{P} \cdot d\vec{E} - \oint_{\text{Ciclo}} \mu_0 \vec{M} \cdot d\vec{H} \right) dV \quad (1.3.1)$$

onde \vec{J}_F é a densidade de corrente elétrica no meio material devida a portadores de carga livres, \vec{P} é o vetor polarização elétrica do meio, \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 eq. 1.3.1) explicita a interação do campo externo com as cargas elétricas livres (no caso de sistemas biológicos principalmente íons) é identificado como o termo de dissipação 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, dada pela interação do campo magnético com os momentos de dipolo magnéticos da amostra. Para mais detalhes dos mecanismos de dissipação de calor descritos pela eq. 1.3.1 vide o Apêndice B, seção B.2.

A hipertermia magnética (HM) com nanopartículas magnéticas (NPM) consiste no aumento da temperatura das NPM (centros de calor) como consequência da interação dos seus momentos de dipolo magnéticos com um campo magnético alternado [58], [62], [63]. A dissipação de energia térmica por perda histerética (terceira integral no lado direito da eq. 1.3.1 acima) depende do tamanho, da magnetização, da anisotropia, da polidispersão (propriedades que obviamente dependem da constituição das NPM), e pode ocorrer através do mecanismo de relaxação de Néel [90]–[92] (com a rápida reorientação da magnetização, dentro dessa partícula monodomínio magnético, sem a rotação da mesma), assim como pelo

aquecimento friccional devido à rotação física das NPM (mecanismo de relaxação browniano) [93], [94]. Estes fenômenos ocorrem em função da frequência e amplitude de excitação periódica de um campo magnético alternado externamente aplicado (sua descrição matemática está adequadamente discutida no Apêndice B, seções B.1 e B.3).

De fato, a ideia de usar o fenômeno de dissipação histerética em materiais magnéticos para gerar calor e tratar o câncer não é nova, o cirurgião Robert Gilchrist *et al.* (no St. Luke's Hospital, Chicago, Illinois) publicaram em 1957 resultados de um estudo pioneiro com cães que apresentavam carcinoma colorretal metastático (tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto) [95]. Foi observado que a ressecção dos tumores desses cães não era capaz de eliminar as metástases alojadas nos linfonodos do tecido retroperitoneal, ou seja, os tumores secundários formados por células neoplásicas que migraram através do sistema linfático e se desenvolveram nos gânglios linfáticos do espaço anatômico na parte posterior da cavidade abdominal. 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 0,02–0,10 μm (injeções nos tecidos subserosos, subcutâneo e subperitoneal), na expectativa de que as nanopartículas pudessem ser carregadas pelo sistema linfático e se acumularem nos linfonodos doentes. Após a retirada (*post mortem*) em bloco da área injetada e da área de drenagem linfática, apresentaram resultados de análise histológica comprovando a presença das nanopartículas magnéticas nos linfonodos da camada subserosa do intestino dos animais (na concentração de 5mg/g de linfonodo). Então, aproximando uma bobina dessas peças anatômicas realizaram sua hipertermia magnética *ex vivo* aplicando um campo alternado 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 três minutos de aplicação, onde o monitoramento da temperatura foi realizado, em apenas um ponto, com um termômetro de coluna de álcool (muito grande para ser introduzido num tumor com o animal vivo). Concluíram que a concentração no tecido a ser tratado, o desempenho de aquecimento e o tamanho (0,02–0,10 μm) de suas partículas eram inadequados para proporcionar o aquecimento suficiente (terapêutico) para destruir as metástases *in vivo*. Também não realizaram nenhum experimento *in vivo* por temerem que os animais pudessem sofrer prejuízos a sua saúde (*e.g.* queimaduras na pele causadas por *eddy currents*) na faixa de intensidade e frequência de campo magnético utilizada. Toda via, diante da clara necessidade de um procedimento mais eficiente do que, apenas, a excisão cirúrgica de um tumor principal deixando para trás metástases, e a despeito das limitações tecnológicas

e conceituais de sua época Gilchrist *et al.* preconizaram com bastante otimismo (e há 60 anos) a possibilidade de transporte (passivo) por via sistêmica de nanopartículas magnéticas *in vivo* até os nodos metastáticos de uma neoplasia maligna, e sua posterior utilização para entrega localizada de calor por dissipação histerética, propondo futuras aplicações em carcinomas metastáticos de mama, estômago, colorretal, bexiga e próstata [95].

É interessante notar como os problemas identificados por Gilchrist *et al.* já elencavam as principais dificuldades (ainda atuais) de implementação definitiva do procedimento HM com NPM na clínica médica [62].

Primeiramente, a questão da vetorização sistêmica das NPM: os resultados até agora publicados sobre as aplicações clínicas da técnica de HM com NPM (*e.g.* no tratamento de glioblastoma [21] e carcinoma de próstata [22], [23], [96]) reportam a realização de injeções intratumorais de FM contendo NPM com diâmetros ~ 20 nm. A injeção intratumoral direta das NPM depende do grau de dificuldade de acesso ao tumor no corpo do paciente, obviamente mais fácil de ser realizada em tumores subcutâneos [14] e, em tumores mais profundos, podendo ser guiada por ultrassom [23], ou por TC via fluoroscopia de raios-x [97]. Já no que diz respeito à entrega via sistêmica o tamanho da nanoestrutura é um parâmetro fundamental. Estudos demonstram que a rota de eliminação renal acontece com nanopartículas menores do que 8 nm, enquanto para partículas maiores o processo ocorre por rota hepática [98]. Por outro lado, também se sabe que a maioria dos tumores sólidos tem uma arquitetura vascular defeituosa, angiogênese extensa e drenagem linfática defeituosa, 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. Este fenômeno é conhecido como o efeito de permeabilidade e retenção melhorado (EPR), e tem sido utilizado para melhorar a eficácia terapêutica utilizando nanopartículas (vetorização passiva) [99]. Também nas últimas três décadas tem sido grande o desenvolvimento de nanocarreadores multifuncionais (numa variada faixa de tamanhos de 1–1000 nm), principalmente utilizando a adsorção de biomoléculas à superfície da nanopartícula (*e.g.* ácido fólico, anticorpos, fragmentos de anticorpos, receptores moleculares) com objetivo de aumentar a captação desses nanocarreadores por células alvo (vetorização ativa) para marcação, imageamento e entrega controlada de fármacos a nível celular [11], [58], [100].

Desde o trabalho pioneiro de Paul Ehrlich o qual sugeriu o conceito da bala mágica [101] vem-se buscando uma eficiência de entrega de agentes terapêuticos em quantidade

suficiente para o tratamento adequado de neoplasias malignas. Entretanto, estudos recentes como o relatado por Wilhelm *et al.* indicam uma eficiência de entrega cuja mediana é de apenas 0,7 % – nesse *review* foram avaliadas nanopartículas utilizadas em 232 trabalhos publicados desde 2005 até 2015, que tratavam de sua vetorização passiva (175 artigos) ou ativa (56 artigos) para tumores sólidos [102]. Conseqüentemente, até o momento não foi possível por via sistêmica fazer 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 [103], [104]. Além disso, supondo que a concentração de nanopartículas intratumoral via rota sistêmica pudesse ser aumentada significativamente, existem relatos na literatura que após o processo endocitótico dessas nanoestruturas ocorre uma diminuição da eficiência magnetotérmica decorrente de processos de agregação e, portanto, interação dipolar entre as NPM [15], [105].

Segunda dificuldade, o estabelecimento de um limiar seguro de campo e frequência: a aplicação de um campo eletromagnético alternado em tecidos vivos induz a geração de correntes elétricas de Foucault (ou *eddy currents*) aquecendo por efeito Joule (dissipação resistiva) e de maneira não específica toda a região do corpo exposta ao campo externo. Essa dissipação por *eddy currents* pode ser útil, por exemplo, na ablação de tumores sólidos por RF, onde o campo elétrico oscilante (na faixa de 450–500 kHz) acelera na forma de corrente elétrica os íons (K^+ , Na^+ e Cl^-) do tecido tumoral em contato com os eletrodos metálicos [106, p. 159]. Contudo, durante a HM com NPM, a potência dissipada de forma não localizada por *eddy currents* (P_{eddy}) (eq. 1.3.2) além de escalar com o quadrado da intensidade (H) e da frequência (f) do campo magnético alternado aplicado externamente ao corpo do paciente, também aumenta radialmente de maneira que, para os mesmos valores de H e f o aquecimento detectado na superfície da pele do paciente seria maior no seu torso (maior diâmetro) do que nas extremidades (supondo que todo o corpo experimentasse o mesmo campo magnético alternado) [58], [106, p. 294]. Dessa forma, aproximando a anatomia do torso do paciente por um cilindro de raio (r) com densidade tecidual volumétrica uniforme, calcula-se:

$$P_{eddy} = \sigma(\mu_0\pi Hfr)^2 \quad (1.3.2)$$

onde σ é a condutividade elétrica do tecido e $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$ V.seg/A.m (no SI). É certo, também, que essa dissipação por *eddy currents* pode provocar o aquecimento de tecidos não-específicos, uma vez que os tecidos/órgãos têm íons intra e extra-celulares.

E diferentemente do que ocorre, por exemplo, no caso da utilização de IRM em que existem diretrizes orientadoras (*guidelines*) determinadas pelo FDA e que suportam sua utilização na clínica médica, ainda não há *guidelines* para a técnica de HM com NPM estabelecendo critérios de segurança. Na maioria dos resultados publicados *in vivo* (estudos pré-clínicos e clínicos) é adotado um limiar para o produto (intensidade de campo \times frequência) igual a $4,85 \times 10^8$ A/m.s [58], acima do qual podem haver prejuízos para a saúde do paciente, *e.g.* Oleson, R. J. registrou que o aquecimento por *eddy currents* pode causar a formação de bolhas na pele quando esse limite é ultrapassado [107]. 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 os membros de suas extremidades (com um raio da ordem de 15 cm) submetidos a um campo magnético alternado com frequência constante de 13,56 MHz e várias amplitudes de campo magnético. Em seus resultados identificou que o produto $Hf < 4,85 \times 10^8$ A/m.s era bem tolerado por todos os pacientes testados [108]. Portanto, é desejável que as NPM magnéticas para aplicação *in vivo* de HM sejam desenhadas, *i.e.* suas dimensões, a escolha do material e o tipo da estrutura magnética (se homogênea ou do tipo *core-shell*) para acessar uma condição de máxima eficiência térmica dentro do limiar estabelecido pelo critério de Atkinson [109, p. 53].

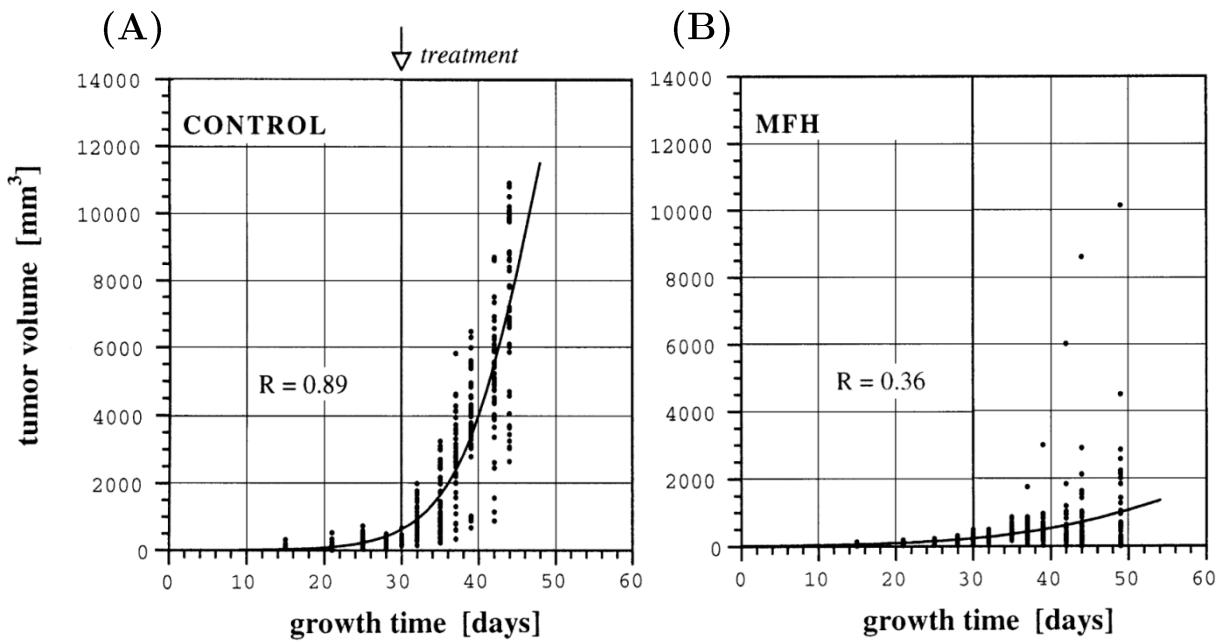
Agora, uma vez tendo sido resolvido o problema de acumular o agente de aquecimento magnético no local de interesse (*e.g.* por injeção intratumoral direta quando o acesso ao tumor é relativamente fácil) em quantidade e com eficiência magnetotérmica suficientes, dentro de um limite seguro de intensidade e frequência de campo magnético alternado (numa configuração que minimize o aquecimento não localizado por *eddy currents*). Ainda permanecem questões sobre qual é o limiar de temperatura e tempo de aquecimento necessário para causar danos térmicos biológicos irreversíveis às células neoplásicas (vide seção 1.2 sobre dosimetria térmica). E cujas respostas dependem, essencialmente, do monitoramento (em tempo real) da distribuição espacial da temperatura intratumoral [28], [41]. No caso de Gilchrist *et al.* a opção que eles tinham ao uso de termopares metálicos (obviamente incompatíveis com o emprego de campos magnéticos alternados) era o uso de termômetros de coluna de álcool inviáveis para utilização *in vivo* [95].

Atualmente, prevalece a utilização de cateteres (termômetros de fibra-óptica com diâmetros $\sim 0,5\text{--}1,5$ mm) na região tratada e, tipicamente, são inseridas de 1–5 sondas dentro do tumor (uma vez que o seu próprio tamanho 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 (devida a não homogeneidade na distribuição das NPM e também pelo arrefecimento provocado pela perfusão sanguínea intratumoral). Como a utilização da poderosa técnica de imageamento termográfico por ressonância magnética (com o *hardware* atual) é incompatível com a realização de HM com NPM, devido ao seu forte campo DC bloquear o momento de dipolo magnético das NPM impedindo a dissipação histerética [87]. A termometria tridimensional em tempo real nessa modalidade de terapia térmica permanece, ainda, como uma questão em aberto. E, até agora, os melhores resultados clínicos de determinação volumétrica da temperatura intratumoral durante HM com NPM são obtidos calculando esses valores de temperatura ponto a ponto no espaço – a partir da identificação do volume ocupado pelas NPM dentro do tumor, *e.g.* por tomografia computadorizada (TC) – e resolvendo numericamente a equação de difusão de biocalor de Pennes (vide eq. 3.6 na seção 3.3, utilizando como parâmetros de ajuste um valor médio da taxa de perfusão sanguínea e do SLP *in vivo*, os quais são determinados combinando as temperaturas calculadas com algumas medições diretas (termômetros de fibra-óptica) em pontos de referência dentro ou perto da região alvo [21], [22], [97].

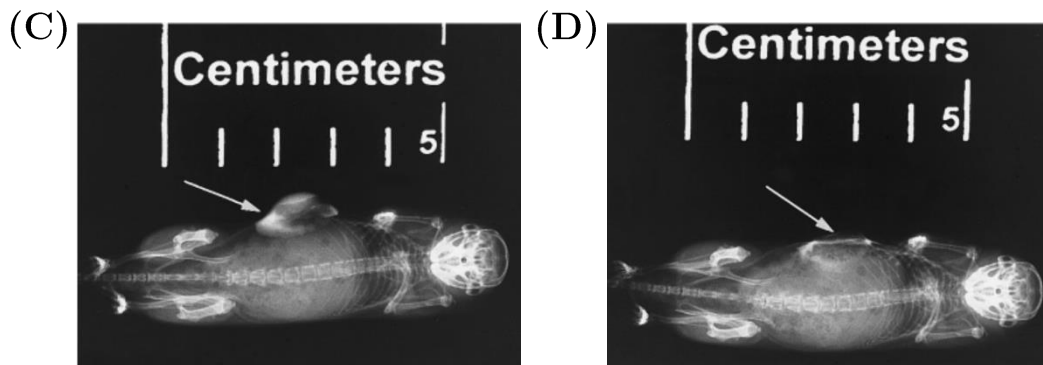
Esta tese irá focar em estudos pré-clínicos da HM com NPM. Há na literatura diversos estudos mostrando a sinergia entre a quimioterapia e a geração localizada de calor por HM. Ao leitor interessado sugerimos a leitura de um review recente de Torres-Lugo e Rinaldi [110]. Por outro lado, estudos *in vivo* pré-clínicos demonstrando a eficácia de hipertermia magnética iniciam-se basicamente no final da década de 90. Jordan *et al.* em 1999 [111] divulgaram resultados usando nanopartículas a base de magnetita, com dimensão da ordem de 10 nm, numa configuração de hipertermia com $f = 500$ kHz e campo de 10 kA/m ($\cong 126$ Oe). O modelo xenográfico estudado foi o C3H que se trata de um carcinoma mamário induzido em camundongos. No trabalho publicado não está claro a quantidade de material 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. A Figura 1.7 (A) e (B), abaixo, mostra a evolução do volume tumoral de diversos animais ($n = 20$) por um período de até 50 dias. Quando comparado com o controle (animais não tratados) fica clara a diminuição na

velocidade de crescimento tumoral dos camundongos após HM com NPM. Além disso, parece haver animais com aparente remissão tumoral completa (RC), apesar de tal resposta biológica não ser destacada em seu artigo.

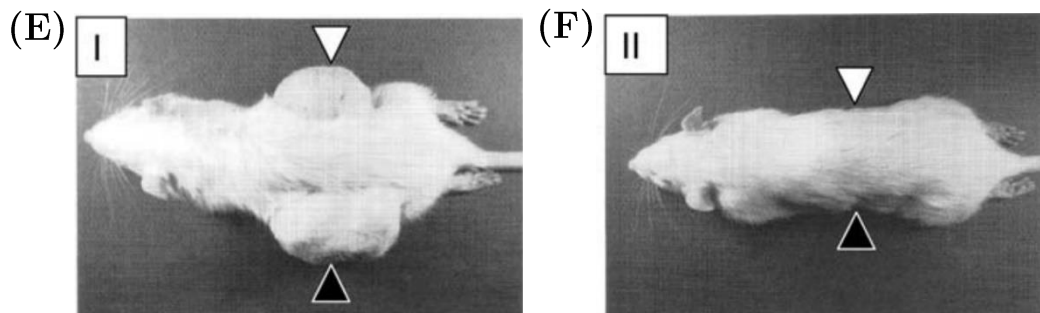
Em 2001, Hilger *et al.* [112] investigaram a possibilidade de ablação térmica utilizando NPM de magnetita. O modelo tumoral foi o MX-1 e o estudo usou 10 camundongos. Temperaturas intratumorais de até 70 °C são reportadas, em tratamentos de 4 min, numa configuração de campo magnético alternado de 6,5 kA/m e frequência de 400 kHz. Neste caso foram injetados intratumoralmente 21 mg de material magnético. Todos os animais foram sacrificados após os tratamentos. Na Figura 1.7 (C) e (D) (abaixo no texto) há uma imagem do tumor de um dos camundongos antes e depois da magneto ablação. Durante a mesma época o grupo de Kobayashi *et al.* (em 2006) [19] investigaram o efeito da magneto hipertermia usando magnetolipossomas, os quais consistem em vesículas da ordem 100nm contendo nanopartículas de magnetita em seu interior. O grupo relata estudos em diversos modelos tumorais B16, MM46, Os515, Vx-7 e T-9. Em particular, neste ultimo modelo (um glioma) um estudo com a indução de dois tumores (localizados em posições diametralmente opostas no abdômen do camundongo) foi realizado usando campo alternado de 384 Oe (\cong 30,6 kA/m) e $f = 118$ kHz. Entretanto, diferentemente de estudos anteriores, apenas em um dos tumores foi injetado nanopartículas magneticas. De acordo com os autores, em alguns casos, apesar de tratar apenas um dos tumores, no 28º dia após a HM ocorreu a RC dos dois tumores do animal (vide Figura 1.7 (E) e (F) abaixo no texto). Matando as células tumorais com calor também foi induzida uma forte resposta imune do hospedeiro. Houve uma superexpressão de proteínas chaperonas de estresse térmico (*heat shock proteins* – HSP) que foram reguladas e liberadas a partir das células neoplásicas durante a hipertermia influenciando nas respostas imunitárias antitumorais. Estudos recentes tem discutido este importante resultado na perspectiva de uma futura aplicação da HM como uma espécie de “vacina” no combate ao câncer [113]–[115].



Jordan *et al.* (1999)



Hilger *et al.* (2001)



Kobayashi *et al.* (2006)

Figura 1.7 (A) Crescimento do carcinoma mamário C3H em camundongos não tratados (controle) e em (B) vemos o mesmo tipo de tumor sólido tratado por HM com NPM (temperatura tumoral de 47°C durante 30 min) com uma redução da taxa de crescimento tumoral em 44% dos animais tratados. Adaptado de: Jordan *et al.*, 1999, p.416 [111]. Na segunda parte da figura, as radiografias de um rato mostram o tumor macroscópico (seta) em (C) antes e (D) após a termoablação magnética. Adaptado de: Hilger *et al.*, 2001, p. 514 [112]. Na terceira parte da figura, (E) mostra uma fotografia de um camundongo com dois tumores sólidos não tratados indicados pelas setas na imagem (animal controle). Nesse trabalho, o tratamento de apenas um dos tumores, por HM com magnetolipossomas (MNL), induziu uma resposta imune antitumoral de maneira que, em alguns camundongos, no 28º dia após o tratamento ambos os tumores tinham desaparecido. A figura (E) é a imagem de um dos animais que apresentaram remissão tumoral completa, onde o triângulo aberto indica o lado sem MNL; e o triângulo fechado é o lado com a injeção de MNL. Adaptado de: Kobayashi *et al.*, 2006, p.322 [19].

Voltando ao tratamento pela entrega seletiva de calor podemos relatar ainda o trabalho de Ivkov *et al.* (em 2009) [100] o qual observa RC em 75% dos animais tratados (estudo com $n = 4$) usando uma nanopartícula comercial (BNF) em alta amplitude de campo magnético 700 Oe (43,8 kA/m) e $f = 150$ KHz no modelo tumoral murino MTG-B (carcinoma mamário). Os camundongos foram seguidos por 60 dias e a dose injetada intratumoral de NPM foi de 5mg de Fe/cm³ de tumor (vide Figura 1.8 (A) abaixo no texto). Finalmente, ressaltamos o artigo de Lee *et al.* (em 2011) [116], que investigou a realização de HM utilizando NPM *core-shell*. Os autores apresentaram resultados pré-clínicos com $n = 3$ animais no modelo tumoral murino U87MG, campo de 37,3 kA/m e $f = 500$ kHz, injetando intratumoralmente, de acordo com os autores, apenas 75 µg de nanopartículas de CoFe₂O₄-MnFe₂O₄. Os camundongos foram seguidos por apenas 26 dias, e neste caso aparentam ter tido RC neste período (vide Figura 1.8 (B) abaixo no texto). De qualquer forma, em comparação com casos controle e com animais tratados com o quimioterápico Doxorubicina, fica claro a melhor eficácia da HM para o tratamento tumoral. O potencial terapêutico de NPM *core-shell* é realmente animador e tem sido o foco de trabalhos recentes em nosso grupo de nanomedicina térmica na UFG [117].

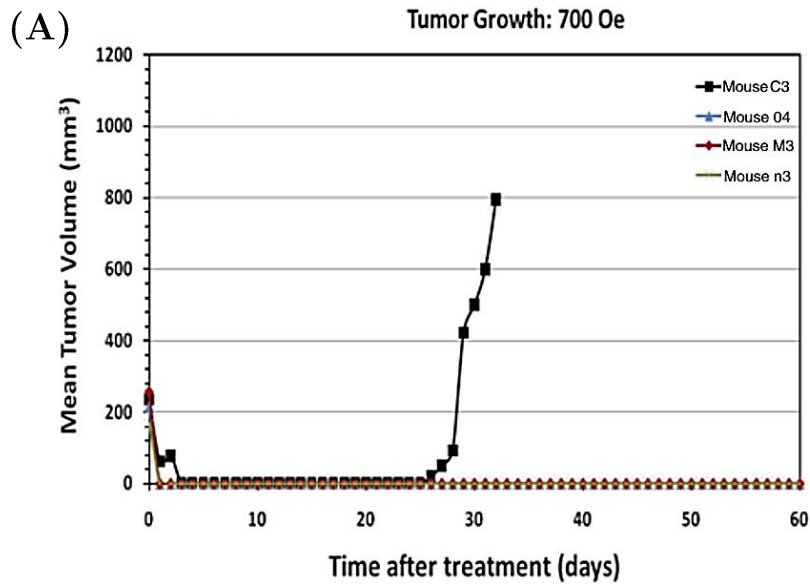
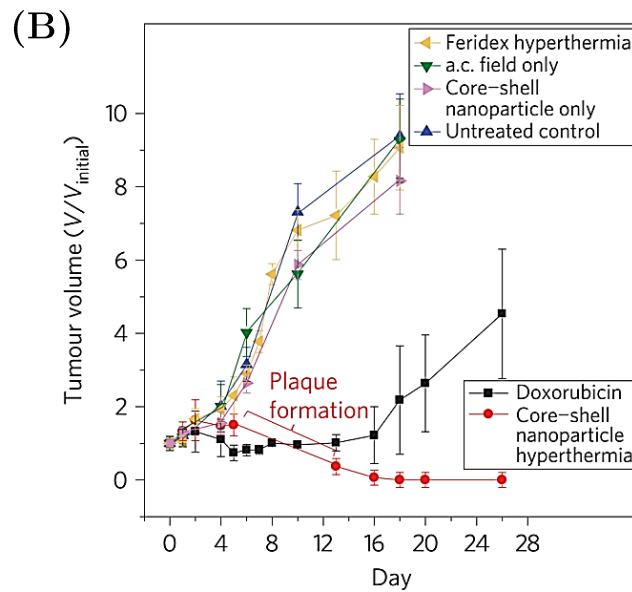
Ivkov *et al.* (2009)Lee *et al.* (2011)

Figura 1.8 (A) Curvas de crescimento do carcinoma mamário em 4 camundongos tratados por HM com NPM no regime de campo alto ($H = 700$ Oe (43,8 kA/m) e $f = 150$ KHz), onde 3 animais apresentaram regressão tumoral quase completa numa janela de até 60 dias após o tratamento. Adaptado de: Ivkov *et al.*, 2009, p.6 [100]. (B) Gráfico da razão do volume tumoral após o tratamento (V) pelo volume inicial antes da hipertermia (V_0) em função dos dias após o tratamento dos animais por: HM com nanopartículas *core-shell* (●), apenas a administração de doxorubicina (■), HM com nanopartículas Feridex® (◄), apenas a aplicação do campo magnético A.C. (*eddy currents*) (▼), apenas com a injeção das nanopartículas *core-shell* (campo magnético desligado) (►) e o grupo controle (não tratado) (▲). No grupo tratado com doxorubicina (■), o crescimento do tumor diminuiu inicialmente, mas após 18 dias houve recidiva. No grupo tratado com hipertermia de nanopartículas *core-shell* (●), o tumor foi claramente eliminado em 18 dias. A supressão do crescimento tumoral não foi observada para os grupos: de HM com a nanopartícula Feridex® (◄), aplicação apenas do campo magnético alternado (▼), apenas com a injeção das nanopartículas *core-shell* (►) e o controle não tratado (▲). Adaptado de: Lee *et al.*, 2011, p. 421 [116].

Abaixo, a Tabela 1.4 sumariza os resultados da literatura discutidos nos parágrafos anteriores e permite um panorama geral de alguns dos resultados pré-clínicos mais relevantes (das últimas duas décadas) no tratamento de tumores sólidos por HM com NPM.

Tabela 1.4 – Sumário de alguns dos resultados pré-clínicos mais relevantes (das últimas duas décadas) no tratamento de tumores sólidos por hipertermia magnética (HM) com nanopartículas magnéticas (NPM).

Grupo	Animais	Modelo Tumoral	NPM	H (kA/m)	f (kHz)	Massa de NPM injetada	Aquecimento tumoral	Dias após HM	Resposta biológica
Jordan <i>et al.</i> 1999 [111]	$n \sim 20$	C3H carcinoma mamário	Fe ₃ O ₄ -Aminossilane (10 nm) Fe ₃ O ₄ -Dextrana (3 nm)	10	500	—	47°C mantido por 30 min	~ 50	RP ¹
Hilger <i>et al.</i> 2001 [112]	$n \sim 10$	MX-1 adenocarcinoma	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 <i>et al.</i> 2006 [19]	—	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 <i>et al.</i> 2009 [100]	$n = 4$	MTG-B carcinoma mamário	Fe ₃ O ₄ -BNF (50 nm)	43,8	150	5 mg/cm ³ de tumor	de 40,5–55°C em 15 min	60	75% de RC
Lee <i>et al.</i> 2011 [116]	$n = 3$	U87MG neoplasia cerebral	Core-shell (15 nm) (CoFe ₂ O ₄ –MnFe ₂ O ₄)	37,3	500	75 µg	Temperatura não informada 10min de HM	26	Encolhimento do tumor e aparente RC

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

Todavia, a utilização da técnica de HM com NPM na clínica médica já é realidade em alguns centros de excelência na Europa e nos EUA para o tratamento de tumores malignos de alto risco no cérebro, como o glioblastoma multiforme (tratado em associação com RT) e, também, o câncer de próstata (tratado em associação com a braquiterapia de baixa taxa de dose (LDR)³). De fato é recente a aplicação clínica dessa tecnologia e a empresa alemã MagForce AG desenvolveu o primeiro sistema de HM com NPM dedicado a seres humanos – o NanoActivator[®] segundo a empresa 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

³ Esta técnica é mais comumente utilizada para tratar câncer de próstata, e é realizada sob anestesia geral. Consiste no implante de sementes radioativas feito entre o escroto e o reto, sem a necessidade de se fazer incisões no paciente, e todo o procedimento é guiado por ultrassom. São implantes permanentes, ou seja, não são retiradas após o término da atividade do material radioativo. As sementes decaem emitindo a uma pequena taxa de dose (LDR – *low dose rate*) ao longo de várias semanas ou meses, dependendo do tipo de elemento radioativo utilizado. Em geral levando de 2 a 6 meses para deixar de estar radioativo [118].

aprovação regulamentar europeia (CE conformity marking) para o início de tratamentos comerciais em colaboração com o hospital universitário Charité na capital Berlin e, anteriormente, no ano de 2015 também recebeu autorização do FDA nos EUA para realização de estudos clínicos em pacientes com tumor de próstata na cidade de Seattle, Washington [119].

Os estudos clínicos com HM utilizando NPM começaram apenas recentemente. Em 2007 Johanssen, M. *et al.* publicaram resultados de um estudo clínico de fase I, envolvendo 10 pacientes (faixa etária de 62–79 anos) com tumores de próstata recorrente: estes pacientes não eram adequados para prostatectomia radical de resgate ou recusavam-se a fazê-lo, onde a média e a mediana dos volumes tumorais era, respectivamente, igual a 19,1 cm³ e 15,8 cm³ conforme determinado por tomografia computadorizada (TC) e por IRM; todos os tumores já haviam sido tratados anteriormente por uma ou mais terapias (*e.g.* prostatectomia radical, quimioterapia, radioterapia externa, braquiterapia de alta (ou baixa) taxa de dose e terapia hormonal), onde 6 desses pacientes antes da primeira hipertermia possuíam níveis de PSA⁴ aumentados (entre 5,9 e 19,1 ng/ml) e os outros quatro estavam no intervalo de 0,8–3,0 ng/ml. Todos receberam diretamente em cada tumor uma injeção de um fluido magnético (FM) (dispersão aquosa na concentração de 112 mg/ml) com NPM de 15 nm de diâmetro (caroço de magnetita Fe₃O₄) revestidas com uma camada de cobertura de aminosilane, a mediana do volume de FM injetado foi igual a 11,4 ml (o acesso ao tumor na próstata do paciente para realização da injeção era guiado por ultrassom). Estes pacientes tiveram seus tratamentos anteriores interrompidos e foram submetidos a 6 sessões de HM com NPM com duração de 60 min cada, uma vez por semana, onde a de intensidade de campo magnético alternado (com frequência igual a 100 kHz) inicialmente igual a 2,5 kA/m era aumentada até que o paciente relatasse sensações subjetivas de desconforto (*e.g.* intenso aquecimento e desconforto na

⁴ Antígeno prostático específico (PSA— *prostate-specific antigen*) é uma enzima (glicoproteína) produzida pelas células da glândula prostática (é encontrado principalmente no sêmen, mas uma pequena quantidade é também encontrada no sangue) sendo utilizado para o diagnóstico, monitoramento e controle do carcinoma de próstata. Os níveis sanguíneos de PSA são elevados em homens com câncer de próstata e o teste de PSA foi primeiramente aprovado pelo FDA em 1986 para monitorar a evolução da doença em pacientes já diagnosticados e, a partir de 1994 o FDA aprovou o seu uso em conjunto com o exame digital retal como teste assintomático [120]. A maioria dos homens saudáveis têm níveis abaixo de 4 ng/ml de sangue. A chance de um homem desenvolver câncer de próstata aumenta proporcionalmente com o aumento do nível do PSA. Entretanto, quase 15% dos homens com PSA abaixo de 4 ng/ml são diagnosticados com câncer de próstata na biópsia. Os homens com nível de PSA na faixa de 4–10 ng/ml, têm uma chance de 1 em 4 de ter a doença. Se o PSA se encontra acima de 10 ng/ml, a possibilidade de ter câncer de próstata é superior a 50% [121].

região da virilha e perineal) até o valor de 4,0–5,0 kA/m (intensidade bem tolerada por todos os pacientes) e, então, mantido por 60 min de aquecimento [69], [96].

O monitoramento em tempo real da temperatura foi realizado de maneira invasiva com a introdução de quatro termômetros de fibra-óptica nos tumores, tal que (nos 10 pacientes) o valor médio das máximas temperaturas intratumorais registradas pontualmente foi igual 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 quatros pontos monitorados). E, também, foi prevista teoricamente a temperatura intratumoral que haveria de ser acessada durante os 60 min de HM com NPM: resultado de um cálculo numérico tridimensional supondo uma taxa de perfusão sanguínea constante (parâmetro de ajuste) para cada tumor na solução da equação de difusão de biocalor de Pennes (vide eq. 3.6, na página 106) [122], isto feito com base no mapeamento do volume ocupado pelas NPM dentro tumor de cada paciente conforme determinado por TC antes de cada hipertermia (com a detecção de 89,5% das NPM injetadas correspondendo a uma mediana de 50 mg de material magnético nanoparticulado distribuído de forma não homogênea dentro do volume tumoral). Dessa forma também foi estimado (por paciente) o valor do SLP *in vivo* das NPM, com mediana igual a 115 W/kg. Assim a mediana dos valores calculados (tridimensionalmente) para os percentis T_{20} , T_{50} e T_{90} da temperatura intratumoral (temperatura excedida por 20%, 50% e 90% do volume da próstata aquecida) foram, respectivamente, iguais a 41,1 °C (no intervalo 40,0–47,4 °C), 40,8 °C (no intervalo 39,5–45,4 °C) e 40,1 °C (no intervalo 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 seis tratamentos: a média e a mediana do valor de $CEM43_{T90}$ foram, respectivamente, iguais a 20,9 min e 7,8 min [22], [69]. 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 NPM [96]. Posteriormente, em 2010 Johannsen, M. *et al.* publicaram outros resultados clínicos de fase I envolvendo novos 8 pacientes, também com carcinoma de próstata recorrente, agora, tratados por HM com NPM combinada com braquiterapia-LDR (sementes de iodine-125 foram implantadas juntamente com a injeção de NPM). Seguindo o mesmo protocolo de hipertermia do estudo anterior, nesse segundo grupo de terapia combinada, obtiveram-se mediana $T_{90} = 39,3$ °C e $CEM43_{T90} = 5,8$ min. Estas foram doses

térmicas adequadas para o tratamento combinado, mas seriam insuficientes pensando na HM com NPM como monoterapia [22].

Outro interessante resultado da literatura, e que também ilustra a eficiência da técnica de HM com NPM no tratamento de tumores sólidos complexos e de alto risco, foi publicado em 2011 por Maier-Hauff, K. *et al.* encerrando um estudo clínico de fase II envolvendo 59 pacientes com carcinoma cerebral de glioblastoma multiforme recorrente, cuja expectativa média de vida era ≥ 3 meses e o tamanho de cada tumor não ultrapassava 7 cm de diâmetro (23 pacientes com idade < 50 anos e os outros 36 com idade ≥ 50 anos, onde 54% de todos eles eram homens). Todos os tumores já haviam sido tratados anteriormente, alguns por mais de um tipo de terapia: 56 cirurgicamente (ressecção), 58 por RT e 51 por QT [21].

Cada paciente recebeu uma injeção intratumoral do mesmo tipo de FM utilizado nos experimentos de Johannsen, M. *et al.* (Fe_3O_4 -Aminosilane), agora, com NPM de diâmetro um pouco menor (igual a 12 nm): a mediana do volume injetado foi igual a 4,5 ml correspondendo a uma concentração de 0,28 ml de FM / cm^3 de tumor, e essa injeção envolvia um procedimento cirúrgico minimamente invasivo, guiado por ultrassom, de perfuração do crânio e acesso ao tumor no cérebro do paciente. Todos os pacientes foram tratados empregando duas sessões de 60 min de HM com NPM por semana, durante 6 semanas (totalizando 720 min de aquecimento), combinando com administrações de RT, cuja mediana das doses administradas foi igual a 30 Gy fracionada em 5×2 Gy/semana, antes (ou depois) de cada hipertermia. A intensidade de campo magnético alternado (com frequência igual a 100 kHz) no intervalo de 3,8–13,5 kA/m era bem tolerada por todos os pacientes, com relatos de alguns efeitos colaterais: *e.g.* 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 branda, mas em 3 pacientes ao menos uma de suas sessões teve que ser abortada devido a dor intensa (provavelmente resultante do aumento da pressão intracranial devido o aquecimento local); em 9,1 % a temperatura corpórea chegou ao valor de 38 °C. Através do mesmo acesso para injeção das NPM, também foi introduzido um termômetro de fibra-óptica no tumor de cada paciente para o monitoramento em tempo real da temperatura intratumoral, e 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) [21].

A estimativa tridimensional da temperatura intratumoral (em função do tempo de HM) foi realizada utilizando o mesmo protocolo de Johannsen, M. *et al.* (publicado em 2007 e discutido nos parágrafos anteriores), calculando o seu valor ponto a ponto na região tratada, numa simulação numérica da equação de biocalor (vide eq. 3.6, na página 106) usando como *input* a localização dos centros de calor (volume ocupado pelas NPM dentro do tumor) o que é determinado por imagens de TC e, também, fazendo a suposição de uma taxa média de perfusão sanguínea intratumoral constante no tempo (vide Figura 1.9 abaixo no texto). A resposta biológica à terapia combinada de RT + HM com NPM foram medianas de sobrevivência iguais a 13,4 meses após o segundo diagnóstico positivo de glioblastoma (todos pacientes com tumores recorrentes) e igual a 23,2 meses após o primeiro diagnóstico positivo, respectivamente, um aumento de 7,6 meses e de 8,6 meses quando comparado a outros resultados da literatura de pacientes tratados apenas por quimioterapia (atual modalidade de eleição na clínica médica) [21], [42, p. 311–312].

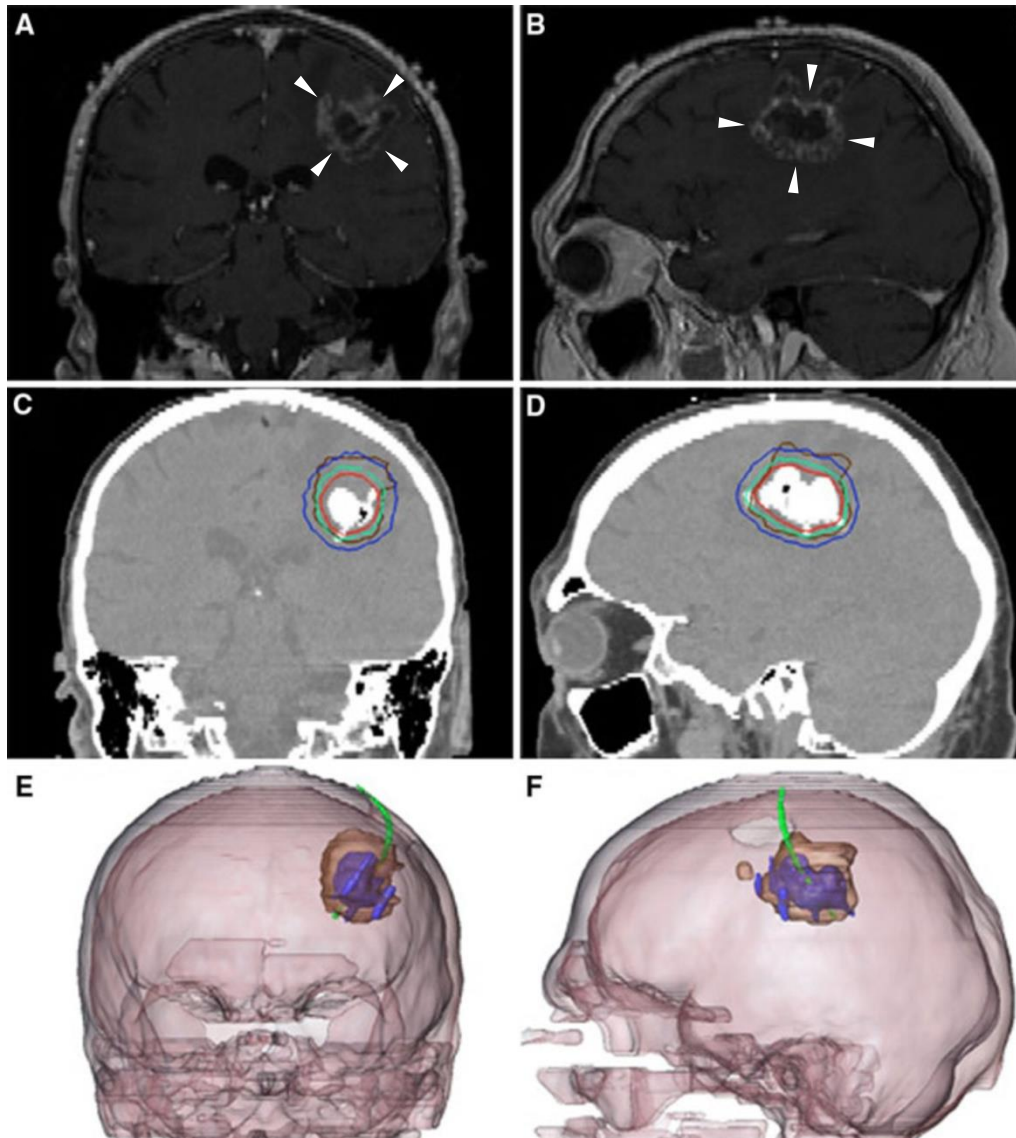


Figura 1.9 (A) e (B) são imagens obtidas por IRM do cérebro do paciente antes do tratamento de HM com NPM onde é possível identificar o do tumor de glioblastoma multiforme recorrente (indicado pelas setas brancas). (C) e (D) são imagens de TC após a injeção de NPM diretamente no tumor do paciente, nessa imagem é possível identificar a região ocupada pelas NPM dentro do tumor (área mais clara na imagem). Linhas isotérmicas indicam as fronteiras das temperaturas de tratamento, calculadas numericamente com base no volume ocupado, na massa identificada e no SLP *in vivo* das NPM dentro do tumor (para uma taxa de perfusão atribuída e suposta constante e, também, em função da intensidade e da frequência do campo magnético alternado empregado durante a hipertermia): regiões aquecidas até 40 °C (linha azul) e até 50 °C (linha vermelha). A linha marrom representa o limite do volume tumoral. (E) e (F) mostram uma fusão das imagens de IRM e TC: do volume reconstruído do tumor após a injeção de NPM e antes da HM (na cor marrom), do volume ocupado pelas NPM dentro do tumor (na cor azul) e, também, o volume ocupado pelo termômetro de fibra-óptica (na cor verde). Adaptado de: MAIER-HAUFF, *et al.*, 2011, p. 319 [21].

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: (i) para a delimitação precisa da região aquecida e preservação de tecidos saudios; determinação das distribuições de temperatura intratumorais (devida a não homogeneidade na entrega de calor); (ii) para a validação da eficiência de um procedimento, principalmente dos

efeitos de resposta biológica ao tratamento em termos da dose térmica equivalente, ou seja, a identificação de um limiar de temperatura e tempo de aquecimento necessários para provocar danos irreversíveis aos tecidos [29], [123], [124]. Atualmente, a modalidade de eleição na clínica médica para realização de termometria tridimensional intratumoral (de forma precisa, não invasiva e não ionizante), é a técnica de IRM (*e.g.* empregada durante a hipertermia (ou ablação) de tumores sólidos fibrosos por HIFU [8], [106, p. 181–182], por radiofrequência [2], [88], ou por microondas [5], [7]). Contudo, o seu princípio de funcionamento não é compatível com todas as modalidades de terapias térmicas – *e.g.* em procedimentos de hipertermia utilizando NPM como fontes de calor intratumoral – uma vez que o forte campo magnético estático do equipamento de IRM (1,5–3,0 T) impede que os monodomínios magnéticos dissipem calor por perda histerética [87].

Portanto, no que diz respeito à HM com NPM, uma alternativa para termografia *in vivo* e em tempo real poderia ser a técnica de imageamento termográfico ultrassônico (IUS), também não invasiva, não utiliza radiação ionizante, bem mais barata que o IRM e com a possibilidade de *hardware* portátil. Resultados interessantes da literatura têm mostrado que esta 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 de zonas de ablação [106, Cap. 13], [125]. Outra modalidade de termometria não invasiva possível de ser utilizada para monitorar em tempo real um procedimento de HM com NPM, contudo, aplicável somente a tumores superficiais, mas com potencial impacto clínico significativo (em termos de precisão, facilidade de utilização, custo e benefício), é o imageamento bidimensional por infravermelho o qual já tem sido utilizado na detecção precoce de tumores de mama [126] e melanoma [127] evitando biópsias desnecessárias.

Nessa tese, foram realizados experimentos de HM *in vivo* com NPM em camundongos Swiss com o modelo tumoral murino de Sarcoma 180 (sólido, subcutâneo e não metastático) e cujos resultados serão apresentados e discutidos nos capítulos de 3 a 5. A termometria *in vivo* durante a hipertermia utilizou tanto termômetros de fibra-óptica quanto a termografia por infravermelho (imageamento com uma câmera termográfica) para monitorar o aquecimento da pele na região de interesse sobre o tumor de cada animal. Em alguns experimentos específicos (vide seção 5.3) a temperatura intratumoral de alguns camundongos também foi monitorada com a introdução de três termômetros de fibra-óptica em seus tumores.

Na sequência, a seção 1.4 apresentará informações sobre o tumor de Sarcoma em humanos, uma neoplasia maligna em geral com mau prognóstico para os pacientes e que acomete principalmente crianças. O tratamento padrão dos tumores malignos de sarcomas de partes moles é a ressecção do tumor com uma grande margem de segurança em associação com a administração de QT. O objetivo da seção 1.4 é situar o leitor quanto às motivações do presente trabalho na escolha do modelo xenográfico de S180 e nossa proposição de uma alternativa de tratamento adjuvante (por HM com NPM) ao o tratamento tradicional dessas neoplasias.

1.4 Sarcomas.

O modelo xenográfico utilizado nessa tese, para realização dos experimentos de hipertermia magnética *in vivo*, foi o tumor murino de Sarcoma S180 (sólido, subcutâneo e não metastático).

Em humanos, os sarcomas são tumores raros, correspondendo a cerca de 1% de todas as neoplasias malignas diagnosticadas em adultos [128]. Todavia, com estimativas entre 8.300 e 10.390 novos casos identificados por ano nos EUA [129], [130] e no Brasil cerca de 7.500 [131].

De maneira geral, os pacientes diagnosticados correspondem com menor frequência (~ 20% dos casos) a tumores ósseos malignos (os principais são o osteossarcoma, sarcoma de Ewing e o condrossarcoma); e com maior frequência (~ 80% dos casos) aos sarcomas de partes moles (*i.e.* tumores sólidos malignos que podem se desenvolver nos músculos, tendões, nervos do corpo e gorduras) e que possui mais de 50 variações catalogadas na literatura classificados de acordo com o tipo de tecido histológico dos quais derivam [131]. Os sarcomas de partes moles tem sua origem em células-tronco mesenquimais, principalmente mesodérmicas, que são responsáveis pela origem do tecido conectivo distribuído pelo corpo (*e.g.* o pericárdio, pleura, endotélio de vasos sanguíneos, músculos liso e estriado, osso, cartilagem e sinovial), portanto, a doença pode se desenvolver praticamente em todas as regiões do corpo humano [129]. Apesar de se manifestar predominantemente nas extremidades: 46% nos membros inferiores e 13% nos membros superiores; 19% no tronco; 12% no retroperitônio; 9% cabeça e pescoço e 1% em outras localidades [128].

São neoplasias de mau prognóstico [132], [133], sendo que em pacientes com lesão de alto grau a probabilidade de disseminação metastática é $> 50\%$ [129], e nesses casos o tempo médio de sobrevivência desde o momento do diagnóstico é de 8–12 meses [132]. Nos pacientes com sarcomas de partes moles em até 50% dos casos as metástases são encontradas nos pulmões, em 13% dos pacientes são detectadas nos linfonodos, podendo também ser identificadas no fígado, ossos e cérebro. Já nos tumores ósseos em 7% das vezes estão nos linfonodos, mas, em 80% dos diagnósticos de osteossarcomas, são encontradas metástases nos pulmões [128], [129].

O tratamento padrão para os sarcomas de partes moles é a ressecção cirúrgica em bloco (com grande margem de segurança) – no passado com a amputação do membro doente – atualmente, devido à utilização combinada de quimioterapia (com a doxorrubicina como fármaco padrão no tratamento de adultos desde 1970), em 90% dos procedimentos cirúrgicos o membro do paciente é preservado. Contudo, esses tumores ainda apresentam uma baixa resposta biológica à quimioterapia convencional como monoterapia, apenas alguns quimioterápicos induzem resposta em mais de 15% dos pacientes, incluindo doxorrubicina, ifosfamida, epirubicina, dacarbacina (DTIC), dactinomicina e metotrexato [129], [132]. A sobrevida geral em 5 anos é da ordem de 50–60 %, com cerca de 80% dos pacientes (com lesões em estágio avançado) morrendo de doença metastática entre 2 a 3 anos após o diagnóstico inicial [129].

As informações da literatura sobre os sarcomas são ainda mais preocupantes quando é avaliada a sua incidência em crianças, correspondendo (em escala mundial) a cerca de 15 % de todos os casos de câncer infantil diagnosticados [128], [129]. Contudo existem variantes geográficas, e em países da Ásia Oriental e da América Central e do Sul esse índice tende a ser inferior, *e.g.* no Brasil o Instituto Nacional de Câncer (INCA) numa publicação de 2008 considera uma taxa de incidência entre 4% e 8% dos tumores pediátricos [134], [135]. Essa é uma frequência relativa adotada para a maioria das populações fora da África, uma vez que nesse continente os sarcomas compreendem de 8% a 16% das neoplasias malignas em crianças [135].

Em crianças a incidência dos tumores ósseos malignos de Ewing e o osteossarcoma é aproximadamente 5% dos tumores infantis [134], [135], predominando a ocorrência de sarcomas de partes moles:

- i) De 51–67 % são **rabdomiossarcomas** [135] – tumores sólidos do músculo estriado (ou esquelético) que afetam principalmente, em 30–40% dos casos, a cabeça e o pescoço; de 20–25% atinge os aparelhos urinário e reprodutor; de 18–20% os braços e pernas; e da ordem de 7% a região do peito [136].
- ii) De 14–24 % são **fibrossarcomas** – cuja principal célula desse tipo histológico é o fibroblasto, e a doença compromete mais frequentemente as extremidades, tronco e pescoço [135].
- iii) De 19–25 % são sarcomas de partes moles não especificados [135].

De maneira geral, crianças do sexo feminino tem uma sobrevida geral menor do que as crianças do sexo masculino e, na faixa etária dos 10 aos 14 anos, também apresentam um pior prognóstico [134], [135]. No Brasil, *e.g.* dados do A.C. Camargo Cancer Center (em São Paulo-SP) para crianças com sarcomas de partes moles de diferentes tipos, acompanhadas de 1991 a 2002, mostram uma sobrevida geral em 5 anos depois do diagnóstico igual a 25% (com doença metastática), a 57,4% (com doença em estágio avançado) e 72% (com doença localizada) [134].

Em Goiânia-GO, assim como em outras regiões do país, são realizados registros de câncer de base populacional (RCBP⁵) que, entre outros parâmetros, avaliam a incidência de sarcoma infanto-juvenil por tipo de tumor maligno, valor absoluto de casos identificados (V_{abs}) e taxa bruta (TB)⁶ por 1.000.000 de crianças e adolescentes. A Tabela 1.5 (abaixo) apresenta um excerto dessa base de dados (avaliada no período de 1999 a 2003), segundo o sexo e faixas etárias específicas. Esses dados publicados pelo INCA em 2008 revelam, primeiramente, que a incidência de tumores ósseos entre a população de meninos (TB = 26,04 casos/milhão) é bem maior do que entre a população de meninas (TB = 10,41 casos/milhão), mas nos dois grupos um maior número (em valores absolutos) de diagnósticos foi identificado na faixa etária de 10–18 anos. Segundo, no que diz respeito à ocorrência de sarcomas de partes moles, a situação é pior para as meninas (TB = 18,73 casos/milhão) comparativamente aos meninos (TB = 11,46 casos/milhão). Enquanto para as meninas, um maior número (em valores absolutos) de diagnósticos foi identificado na faixa etária de 5–14 anos, entre os meninos isso ocorreu para as faixas etárias de 1–4 anos e de 10–14 anos.

⁵ O RCBP do município de Goiânia-GO, desde 1994, conta com suporte físico, financeiro e recursos humanos da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) ligada ao Hospital Araújo Jorge. Os dados são coletados ativamente em 340 fontes notificadoras: quatro hospitais públicos, dois hospitais filantrópicos, 43 hospitais particulares, 33 laboratórios de anatomia patológica, 120 laboratórios de análises clínicas e 138 consultórios médicos. Além de determinar a incidência e a mortalidade do câncer em Goiânia, as informações são disponibilizadas para investigações clínicas e pesquisas multicêntricas, bem como instrumento de gestão em saúde pública pela Secretária Estadual de Saúde de Goiás (SES-GO) [134, p. 92–96].

⁶ Esse índice é avaliado como a razão: $Taxa\ bruta = \left(\frac{\text{número total de um evento num período definido}}{\text{população de referência para o período definido}} \right) \times 10^6$

E faz uma projeção do número de casos identificados de câncer infanto-juvenil por um milhão de crianças e adolescentes, relativamente à população de risco por faixa etária, sexo e período determinado (na região geográfica em específico). A base populacional (total) de risco para Goiânia (de 1999 a 2003) que serviu de referência para o cálculo de TB na Tabela 1.5 (na faixa etária de 0–18 anos) foi de 960.050 crianças do sexo masculino e de 961.015 crianças do sexo feminino [134, p. 93].

Tabela 1.5 – Incidência por tipo de sarcoma infanto-juvenil em Goiânia-GO (período avaliado de 1999 a 2003): valores absolutos (V_{abs}) de casos diagnosticados, taxa bruta (TB) por 1.000.000 de crianças e adolescentes (de 0–18 anos), segundo o sexo e faixas etárias específicas.

Tumores pediátricos	Masculino							Feminino						
	N° de casos (V_{abs}) por faixa etária							N° de casos (V_{abs}) por faixa etária						
	0	1–4	5–9	10–14	15–18	0–18	TB ¹	0	1–4	5–9	10–14	15–18	0–18	TB ¹
Tumores ósseos (TO)	0	0	2	11	12	25	26,04	1	1	2	3	3	10	10,41
Osteossarcomas	0	0	1	5	6	12	12,50	0	1	1	2	0	4	4,16
Condrossarcomas	0	0	0	0	1	1	1,04	0	0	0	1	0	1	1,04
TE ² e sarcomas ósseos relacionados	0	0	1	6	3	10	10,42	0	0	1	0	2	3	3,12
Outros TO especificados	0	0	0	0	2	2	2,08	0	0	0	0	0	0	0,00
TO não especificados	0	0	0	0	0	0	0,00	1	0	0	0	1	2	2,08
SPM³ e outros sarcomas extra-ósseos	0	3	1	4	3	11	11,46	1	6	4	1	6	18	18,73
Rabdomiossarcomas	0	1	0	2	2	5	5,21	0	5	3	1	2	11	11,45
FB ⁴ , BNP ⁴ e outras neoplasias	0	0	1	0	0	1	1,04	0	0	0	0	2	2	2,08
Sarcoma de Kaposi	0	0	0	0	0	0	0,00	0	0	0	0	0	0	0,00
Outros SPM especificados	0	2	0	2	1	5	5,21	1	1	0	0	2	4	4,16
SPM não especificados	0	0	0	0	0	0	0,00	0	0	1	0	0	1	1,04

¹ Nota de rodapé 6 (acima no texto)

² TE = Tumor de Ewing

³ SPM = Sarcoma de partes moles

⁴ FB = Fibrossarcomas; BNP = tumor da Bainha Nervo Periférica;

Adaptado de: Instituto Nacional de Câncer (Brazil) e Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica, Orgs., 2008, p. 92 [134]

Portanto, a identificação de estratégias terapêuticas mais eficazes para tratar o sarcoma é de grande importância [132], [137], [138]. De fato, em um recente estudo clínico de fase III [130] resultado da colaboração entre nove centros de pesquisa (na Europa e nos EUA), que no período de 1997 a 2006, seguiu 341 pacientes (homens e mulheres com idade entre 18 e 70 anos) com diferentes tipos de sarcomas de partes moles de alto risco – recrutados com doença primária ou recorrente (já anteriormente submetidos à cirurgia) – e de alto risco (81% nas regiões abdominal e pélvica, 18% tronco, 1% cabeça e pescoço), todos tumores sólidos não metastáticos com diâmetro ≥ 5 cm. Os pacientes foram divididos em um primeiro grupo controle ($n = 172$) tratado, apenas, com um triplo complexo quimioterápico (etoposide, ifosfamida e doxorubicina (EIA)). E um segundo grupo ($n = 169$) tratado com EIA + Hipertermia (HT) – o aquecimento foi gerado por RF, sessões de 60 min, onde a temperatura intratumoral era mantida entre 40°–43°C. Os resultados desse ensaio clínico demonstraram que a terapia combinada aumentou a mediana de sobrevida livre da doença, de 16,2 meses (apenas com EIA) para 31,7 meses (EIA+HT). Também observaram que, em 10 anos de

monitoramento, apenas 6,8% dos pacientes do grupo EIA+HT apresentou desenvolvimento progressivo da doença, contra 20,6 % no grupo controle [41], [42, p. 139], [130]. Esse importante resultado da literatura é uma confirmação adicional do conhecimento bem estabelecido de que a hipertermia tem efeitos sinérgicos com quimioterapia e radioterapia [110], [139].

2 Materiais, modelo tumoral murino e metodologia experimental

Neste capítulo 2 apresentaremos de maneira detalhada as diferentes montagens experimentais empregadas em nossos experimentos de hipertermia magnética *in vivo* com nanopartículas magnéticas, assim como o modelo experimental murino que foi estudado durante esse projeto de doutorado e, também, a completa caracterização dos diferentes fluidos magnéticos utilizados. O leitor mais interessado numa discussão teórica fundamental sobre o fenômeno físico de geração de calor com nanopartículas magnéticas devido à ação de um campo magnético alternado deve dirigir-se ao Apêndice B. E para uma melhor compreensão sobre os efeitos da emissividade direcional espectral, na determinação da temperatura aparente de uma superfície curva utilizando uma câmera termográfica, encontrará uma discussão teórica completa no Apêndice C.

2.1 Fluidos magnéticos

Não é parte do escopo dessa tese dissertar em profundidade sobre a teoria relacionada às diferentes classes de materiais magnéticos existentes na natureza (e.g. paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos, antiferromagnéticos) [140], contudo, no que diz respeito aos materiais superparamagnéticos (que é o caso das nanopartículas magnéticas utilizadas em nossos experimentos de hipertermia *in vivo*) há uma seção dedicada ao seu estudo no Apêndice B.1. Também não é pretensão do autor estabelecer uma profunda discussão sobre materiais magnéticos nanoestruturados com aplicações biomédicas, cujo desenvolvimento, caracterização e finalidades são amplamente conhecidos na literatura [141]. Será apresentada ao leitor uma definição muito breve sobre o que são os fluidos magnéticos, a síntese e caracterização das nanopartículas magnéticas utilizadas nos experimentos aqui relatados.

O fluido magnético (FM) é uma suspensão coloidal estável de nanopartículas magnéticas (NPM) com diâmetro da ordem de 10 – 20 nm dispersas em um líquido carreador, que pode ser um fluido polar (e.g. a água), ou apolar (e.g. óleo mineral ou vegetal). As NPM são compostas, principalmente, de ferritas (e.g. magnetita (Fe_3O_4), maguemita ($\gamma-Fe_2O_3$) e etc.) e devido sua dimensão reduzida são matematicamente modeladas como monodomínios magnéticos (e.g. com volume esférico) e sua resposta à aplicação de um campo magnético externo, ou seja, a sua curva de magnetização é superparamagnética (com ausência de campo

coercitivo) quando verificada por meio de experimentos de baixa frequência (~ 100 Hz) e quando essa medida for realizada por meio de experimentos de alta frequência, então, poderá apresentar campo coercitivo não nulo (vide Apêndice B.1). No coloide a agitação térmica contribui fortemente para manter as nanopartículas suspensas (movimento Browniano), contudo, *e.g.* devido à interação dipolar o sistema pode se auto-organizar formando arranjos de cadeias lineares e, portanto, a estabilidade desse material magnético nanoparticulado é o resultado de diferentes energias potenciais de interação atrativas e/ou repulsivas (vide a Tabela 2.1) [142].

Tabela 2.1 – Energias potenciais de interação entre as nanopartículas magnéticas (monodômios magnéticos) num fluido magnético [142].

Tipos de interação	Energia Potencial de interação	Força entre as nanopartículas
Van der Waals [Hamaker]	$U_{vdw} = -\frac{A}{6} \left[\frac{2d^2}{C^2 - (2d^2)} + \frac{2d^2}{C^2} + \ln \frac{C^2 - (2d^2)}{C^2} \right]$ <p>Onde: $A = \frac{3}{4} k_B T \left(\frac{\varepsilon_p - \varepsilon_s}{\varepsilon_p + \varepsilon_s} \right)^2 + \frac{3h\nu_C(n_p^2 - n_s^2)}{16\sqrt{2}(n_p^2 - n_s^2)^{2/3}}$ (Coeficiente de Hamaker), ε_p (constante dielétrica da partícula), ε_s (constante dielétrica do solvente), h (constante de Plank), ν_C (frequência característica de absorção), n_p e n_s (o índice de refração da partícula e do solvente)</p>	Atrativa
Dipolar Magnética	$U_{dm} = \frac{\mu_0}{4\pi} \left[\frac{\vec{m}_i \cdot \vec{m}_j}{r^3} - \frac{3}{r^5} (\vec{m}_i \cdot \hat{r})(\vec{m}_j \cdot \hat{r}) \right]$ <p>Onde: $m = \frac{\pi}{6} M_s d^3$ (momento dipolar magnético da nanopartícula), M_s (magnetização de saturação).</p>	Atrativa ou repulsiva
Repulsão Estérica	$\frac{U_{re}}{k_B T} = \begin{cases} \frac{\pi d^2 \xi}{2} \left[2 - \frac{l+2}{t} \ln \left(\frac{1+t}{1+l/2} \right) - \frac{l}{t} \right]; & \text{se } x \leq 2\delta \\ 0 & ; \text{se } x \geq 2\delta \end{cases}$ <p>Onde: δ (espessura da camada de cobertura), ξ (<i>grafting</i>), $l = \frac{2x}{d}$ e $t = \frac{2\delta}{d}$</p>	Repulsiva
Eletrostática	$U_{el} = 4\varepsilon_{liq} d^2 \left(\frac{k_B T}{q} \gamma \right)^2 \frac{e^{2\kappa(r-d)}}{r}$ <p>Onde: ε_{liq} (permissividade elétrica do líquido carreador), q (a carga do contra-íon da dupla camada elétrica), κ (inverso do raio de Debye), Ψ_s (potencial de Stern ou potencial zeta) e $\gamma = \tanh \left(\frac{q\Psi_s}{4k_B T} \right)$</p>	Repulsiva

Assim, durante a síntese dos FM diferentes rotas químicas são empregadas com o objetivo de manter a estabilidade da suspensão magnética, criando interações repulsivas: (i) do tipo estérica adsorvendo à superfície dessas NPM uma camada molecular surfactante e que também serve para funcionalizá-las (FM surfactado); (ii) ou do tipo eletrostática criando uma densidade superficial de cargas elétricas (camada iônica) de mesmo sinal em todas elas (FM iônico); (iii) existe ainda a possibilidade de combinar ambas estratégias (FM iônico-surfactado) [143]. A Figura 2.1 é um esquema simplificado dessas NPM em diferentes meios carreadores e com diferentes camadas de cobertura

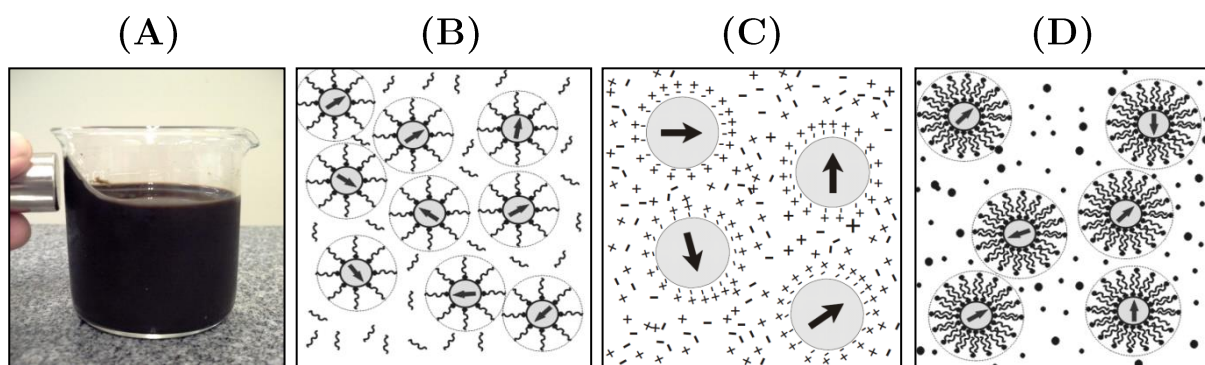


Figura 2.1 Em (A) vê-se uma fotografia de um FM dentro de um béquer sendo atraído por um ímã. Na sequência, há uma representação dos diferentes tipos de nanopartículas magnéticas: (B) dispersas em solvente apolar, com uma camada surfactante de cobertura (FM surfactado); (C) dispersas em solvente polar ($\text{pH} > 7$), o meio básico ocasiona uma distribuição superficial de cargas e, então, contra-íons da solução são atraídos formando a dupla camada iônica (FM iônico); e (D) dispersas em solvente polar, mas com recobrimento molecular também polar (FM iônico-surfactado). As setas simbolizam a orientação do momento dipolar magnético das nanopartículas.

2.1.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de MnFe_2O_4 -Citrato

O FM utilizado nos experimentos relatados na primeira parte dessa tese e que serão discutidos no capítulo 3 (vide protocolos experimentais na seção 3.2) consiste em NPM de ferritas de manganês (MnFe_2O_4) recobertas com citrato ($[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]^{3-}$) suspensas em água, foram sintetizadas utilizando o método de coprecipitação (em nosso próprio grupo de pesquisa) e também caracterizadas: no Instituto de Física – IF/UFG utilizando as técnicas de magnetometria de amostra vibrante (MAV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) (no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução – LabMic) e, também, difratometria de Raios-X (DRX) (no Instituto de Química – IQ/UFG).

Para a síntese de nossas NPM de ferrita de manganês, primeiramente, 50 nmol de FeCl_3 e 25 nmol de MnCl_2 (ambos dissolvidos em 100 ml de HCL 3% w/w) foram adicionados num volume de 500 ml de metilamina (2 mol/L) em ebulição, e a mistura foi mantida sob vigorosa agitação. Após 30 min de reação, a parte sólida obtida foi separada magneticamente do sobrenadante e lavada três vezes em água destilada. O precipitado formado foi acidificado com uma solução de HNO_3 a 0,5 mol/L e separado magneticamente do sobrenadante, o qual foi descartado. Os nanogrãos obtidos foram tratados hidrotermicamente numa solução de 0,5 mol/L de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ mantida em ebulição por 30 min, onde o excesso de nitrato férrico foi removido da solução por decantação magnética. Para elaboração da amostra de fluido magnético, o precipitado formado foi fracionado e as nanopartículas pipetadas numa solução aquosa, modificando sua superfície usando citrato de sódio, sob agitação durante 30 min, com uma fração mássica de 5% entre $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ e a ferrita de manganês, num volume de 50 ml de água. O precipitado obtido foi magneticamente separado e o sobrenadante descartado. Finalmente, o precipitado obtido foi lavado três vezes em acetona, então, a quantidade desejava de água foi adicionada e o excesso de acetona evaporado formando, assim, a amostra final do fluido magnético de nanopartículas magnéticas de ferritas de manganês recobertas com citrato (MnFe_2O_4 – Citrato), na concentração $C = 23,24$ mg/ml. O coloide obtido tem pH fisiológico e é uma solução estável de nanopartículas dispersas em água [14].

Essas NPM de MnFe_2O_4 – Citrato foram extensivamente caracterizadas. Sua microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada com um microscópio JEOL JEM-2100 cuja voltagem de aceleração do feixe de elétrons é de 200 kV e que permite resolução de 2,5 Å entre pontos. A partir das imagens de MET o diâmetro médio das NPM foi calculado utilizando a função lognormal para análise da distribuição de tamanhos (eq. 2.1):

$$g(D) = \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi}D\delta_D} \right) \exp \left(- \frac{\ln^2 \left(\frac{D}{D_0} \right)}{2\delta_D^2} \right) \quad (2.1)$$

onde D_0 é o diâmetro modal e δ_D é a dispersão na medida do diâmetro, esses dois parâmetros são obtidos utilizando a eq. 2.1 para ajustar os resultados experimentais (histograma da frequência de tamanhos obtidos analisando as imagens de MET). O desvio padrão foi calculado usando a expressão abaixo (eq. 2.2):

$$SD = \sqrt{(\exp(\delta_D^2) - 1) \cdot D_0^2 \exp(\delta_D^2)} \quad (2.2)$$

A caracterização magnética foi feita utilizando um magnetômetro de amostra vibrante (MAV) modelo ADE EV9 operado numa faixa de intensidade de campo magnético igual a $-20.000 \text{ Oe} \leq H \leq 20.000 \text{ Oe}$ (em unidades do CGS) e frequência de oscilação da amostra igual a 100 Hz. A difração de Raios-X das NPM de MnFe_2O_4 – Citrato foi realizada num difratômetro Shimadzu[®] XRD 6000 em modo de reflexão, com radiação CuK_α (40 kV e 20 mA) de comprimento de onda 1,54 Å com *default* em ângulos entre 10° e 80°, e o resultado de nossas amostras foi comparado com um espectro padrão para confirmar sua estrutura espinélio.

A Figura 2.2 (A) mostra uma imagem de MET de uma amostra das NPM de MnFe_2O_4 – Citrato. O gráfico da Figura 2.2 (B) é o histograma da distribuição de tamanhos, a partir do qual, é obtido o diâmetro médio para essas nanopartículas igual a $D = (12 \pm 3) \text{ nm}$ (média \pm desvio padrão). No gráfico da Figura 2.2 (C) é mostrado um difratograma de Raios-X caracterizando a ferrita de manganês, o que confirma a estrutura espinélio do caroço dessas nanopartículas, com o diâmetro de Raios-X igual a $D_{RX} = (13,7 \pm 2,1) \text{ nm}$ (obtido pela relação de Scherrer: $D_{RX} = \frac{0,93\lambda}{\Delta \cos \theta}$). Por fim, na Figura 2.2 (D) é mostrada a curva de magnetização das NPM de MnFe_2O_4 – Citrato obtida por MAV (amostra em pó com massa igual a $m_{pó} = (0,10690 \pm 0,00005) \text{ g}$), onde foi medido um valor de magnetização de saturação igual a $M_{pó} = 52,2 \text{ emu/g}$ e sem campo coercitivo. Ou seja, essa amostra responde ao campo magnético do MAV no regime superparamagnético. Também foi medida a magnetização de saturação de uma amostra do FM (alíquota de volume igual a 60 μl com massa igual a $m_{FM} = (0,05992 \pm 0,00005) \text{ g}$) e o valor obtido foi igual a $M_{FM} = 1,22 \text{ emu/g}$ (gráfico não mostrado).

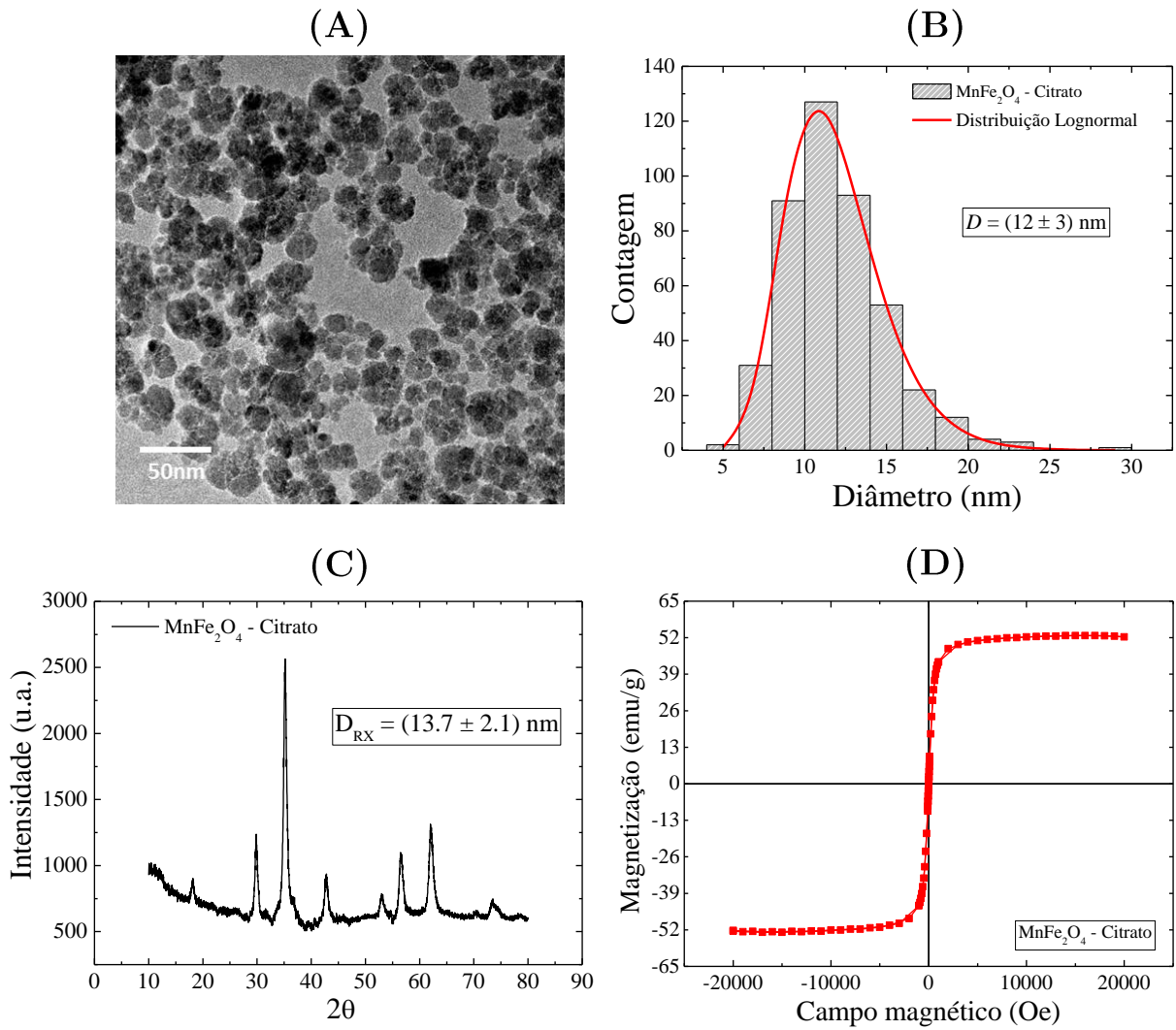


Figura 2.2 Caracterização das nanopartículas: (A) imagem de MET das NPM de MnFe_2O_4 - Citrato; (B) histograma do diâmetro dessas nanopartículas com ajuste lognormal (curva sólida) – o diâmetro médio é igual a $D = (12 \pm 3)$ nm; (C) difratograma de Raios-X caracterizando a ferrita de manganês no caroço das NPM – o diâmetro de Raios-X é igual à $D_{RX} = (13,7 \pm 2,1)$ nm (obtido pela relação de Scherrer: $D_{RX} = \frac{0,93\lambda}{\Delta \cos \theta}$); (D) mostra a curva de magnetização das NPM de MnFe_2O_4 - Citrato obtida por MAV.

A fração volumétrica de um FM determina o percentual de seu volume total que corresponde às NPM, ou seja:

$$\phi = \frac{NV_{np}}{V_{FM}} \quad (2.3)$$

onde N é o número de nanopartículas presentes em um volume V_{FM} de fluido magnético e V_{np} é o volume médio de cada nanopartícula (suposta esférica).

A função de Langevin $L(\xi)$ (limite clássico da função de Brillouin) descreve o comportamento superparamagnético da curva de magnetização de um FM (com ausência de campo coercitivo) visto na Figura 2.2 (D), tal que:

$$M_{FM} = \frac{\rho_{np}}{\rho_{FM}} \phi M_{np} L(\xi) \quad (2.4)$$

onde:

$$\xi = \frac{\mu_{np} H}{k_B T} \quad \text{e} \quad L(\xi) = \coth(\xi) - \frac{1}{\xi} \quad (2.5)$$

Na eq. (2.4) M_{FM} é a magnetização de uma amostra do FM (dado em emu/g) quando aplicado um campo magnético externo H , ρ_{np} é a densidade da NPM, ρ_{FM} é a densidade do FM e M_{np} é a magnetização média de uma nanopartícula (dada em emu/g). E no cálculo da função de Langevin (eq. 2.5) $\mu_{np} = M_{pó} V_{np}$ é o momento magnético da NPM (onde sua magnetização de saturação corresponderá à magnetização de saturação do pó medida por MAV), k_B é a constante de Boltzman e T a temperatura do sistema (na escala Kelvin). Temos que para altos valores de campo H a função $L(\xi) \rightarrow 1$, de onde é possível calcular teoricamente a magnetização do FM como sendo $M_{FM} = (\rho_{np}/\rho_{FM})\phi M_{np}$. Agora, admitindo que a densidade do FM possa ser escrita em termos da densidade das NPM e da densidade do líquido carreador ($\rho_{líq}$) segundo a relação $\rho_{FM} = (\rho_{np} - \rho_{líq})\phi + \rho_{líq}$; e como fração volumétrica de um FM geralmente é muito pequena ($\sim 10^{-6}$ – 10^{-3}), então, fazendo a aproximação de $\phi \rightarrow 0$ implica dizer que $\rho_{FM} \approx \rho_{líq}$.

A partir dessa aproximação e no limite em que $L(\xi) \rightarrow 1$ (quando atingida a magnetização de saturação) é possível calcular a fração volumétrica de cada amostra como sendo [144, p. 114]:

$$\phi = \frac{M_{FM}}{M_{np}} \cdot \frac{\rho_{líq}}{\rho_{np}} \quad (2.6)$$

os dois FM utilizados em todos os experimentos que serão discutidos nessa tese são constituídos de nanopartículas de ferrita de manganês (MnFe_2O_4) cuja a densidade do *bulk* é

$\rho_{np} = 5,1 \text{ g/cm}^3$, e estão dispersas em água logo a densidade do líquido carreador é igual a $\rho_c = 1,0 \text{ g/cm}^3$. Os valores da magnetização de saturação tanto do FM (M_{FM}) quanto do pó (que corresponderá à magnetização de saturação das nanopartículas M_{np}) são determinados experimentalmente a partir das medidas de MAV. Portanto, substituindo os valores experimentais obtidos para o FM de MnFe_2O_4 – Citrato na eq. (2.6), a fração volumétrica calculada foi igual a $\phi = 0,0046$.

2.1.2 Síntese e caracterização das NPM de MnFe_2O_4 – DMSA

O FM utilizado nos experimentos que serão apresentados e discutidos nos capítulos 4 e 5 (vide os protocolos experimentais nas seções 4.2 e 5.2) consiste em NPM de ferritas de manganês (MnFe_2O_4) recobertas com ácido dimercaptossuccínico ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{S}_2$), ou DMSA, e foi sintetizado e caracterizado no Instituto de Física – IF/UFG. O caroço continua o mesmo das nanopartículas caracterizadas na seção anterior (e usadas apenas nos experimentos que serão relatados no capítulo 3), mas agora com outra camada de cobertura e com diâmetro maior.

Para formação dessa nova camada de cobertura, o FM de nanopartículas de MnFe_2O_4 foi diluído em 50 ml de água destilada e adicionados 2,0 g de DMSA (Sigma Aldrich). Então, a solução foi aquecida até atingir 80°C , sendo mantida sob agitação nessa temperatura durante 30 minutos. Após o resfriamento, a amostra foi separada magneticamente e descartado o sobrenadante, sendo lavada três vezes com acetona. Após a lavagem, foi acrescentado mais 50 ml de água destilada e aguardou-se o processo de evaporação da acetona. Posteriormente a essa etapa, o pH foi ajustado resultando, assim, num FM estável de biocompatível de MnFe_2O_4 – DMSA.

Além da caracterização por MET, MAV e DRX (vide seção 2.1.1) três novas caracterizações estruturais foram acrescentadas: a determinação do diâmetro hidrodinâmico por espalhamento dinâmico de luz (EDL); do potencial elétrico efetivo da superfície da NPM, ou seja, seu potencial Zeta; e a análise por termogravimetria da camada de cobertura, o que permitiu determinar a magnetização de saturação específica do caroço das NPM. Os resultados de todas essas seis análises estão reunidos nos gráficos da Figura 2.3, abaixo.

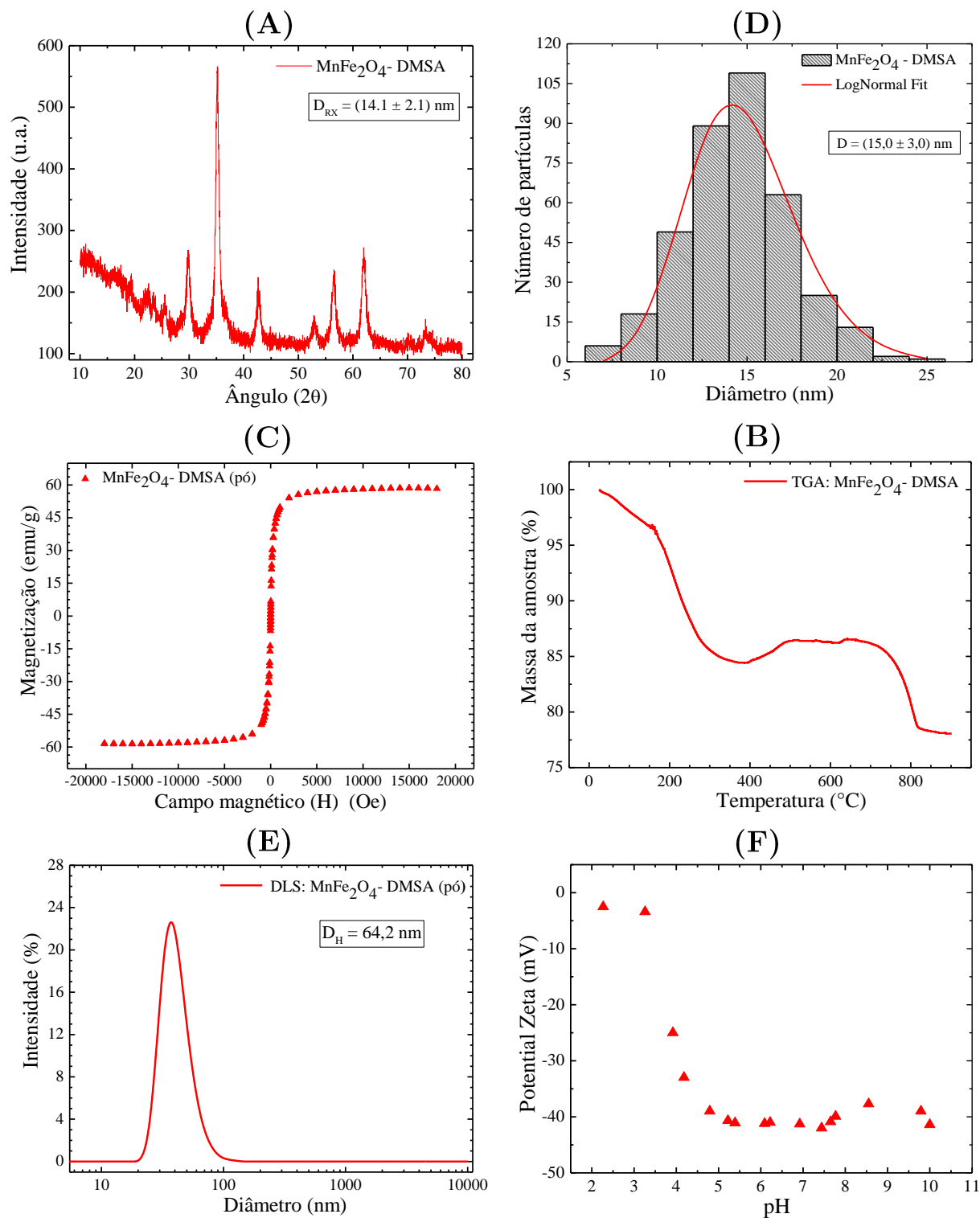


Figura 2.3 Caracterização das nanopartículas de MnFe₂O₄ – DMSA: (A) difratograma de Raios-X caracterizando a ferrita de manganês no carço das NPM, $D_{RX} = (14,1 \pm 2,1) \text{ nm}$ (obtido pela relação de Scherrer: $D_{RX} = \frac{0,93\lambda}{\Delta \cos \theta}$); (B) histograma do diâmetro das nanopartículas com ajuste lognormal (curva sólida) – o diâmetro médio é igual a $D = (15 \pm 3) \text{ nm}$; (C) curva de magnetização específica das NPM de MnFe₂O₄ – DMSA obtida por MAV; (D) termogravimetria da camada de cobertura de DMSA; (E) diâmetro hidrodinâmico médio igual a 64,2 nm, obtido EDL; (F) potencial Zeta em função do pH da amostra.

A Figura 2.3 (A) é um difratograma de Raios-X confirmando a estrutura cristalina do tipo espinélio do caroço das NPM e, a partir do qual é calculado (pela relação de Scherrer: $D_{RX} = \frac{0,93\lambda}{\Delta \cos \theta}$) o seu diâmetro de Raios-X igual $D_{RX} = (14,1 \pm 2,1)$ nm. Analisando algumas imagens de MET de amostras das NPM de $MnFe_2O_4$ – DMSA (microscopias não mostradas no texto) foi construído o histograma da distribuição de tamanhos mostrado no gráfico da Figura 2.3 (B), a partir do qual é obtido o diâmetro médio para essas nanopartículas igual a $D = (15,0 \pm 3,0)$ nm (média \pm desvio padrão). A Figura 2.3 (C) é a curva de magnetização das NPM de $MnFe_2O_4$ – DMSA (amostra em pó) obtida por MAV, foi medido um valor de magnetização de saturação igual a 56,2 emu/g e sem campo coercitivo, ou seja, as NPM de $MnFe_2O_4$ – DMSA respondem ao campo magnético do MAV ($-20.000 \text{ Oe} \leq H \leq 20.000 \text{ Oe}$) no regime superparamagnético, e a fração volumétrica calculada para esse segundo FM (utilizando a eq. 2.6) foi igual a $\phi = 0,0046$. A Figura 2.3 (D) é a curva de termogravimetria (analisador termogravimétrico Shimadzu[®] DTG 60/60H), e a partir destes dados foi possível extrair informação sobre a quantidade de DMSA (22% da massa total da NPM) e utilizá-la para corrigir a medida da magnetização. A Figura 2.3 (E) é a curva de espalhamento dinâmico de luz onde o pico de máxima intensidade determina o diâmetro hidrodinâmico médio da NPM no coloide cujo valor é igual a 64,2 nm e, finalmente, a Figura 2.3 (F) mostra como o potencial Zeta da amostra varia em função do pH, o que permite concluir que para as NPM de $MnFe_2O_4$ – DMSA o seu valor é aproximadamente igual a -40 mV em pH fisiológico.

2.2 Modelo experimental de tumor murino

Em todos os experimentos *in vivo* que serão apresentados e discutidos nessa tese de doutorado (capítulos 3, 4 e 5), as cobaias utilizadas foram camundongos *Swiss* albinos, com idade entre 6–8 semanas e com massa corporal no intervalo de 25–40 g. Esses animais eram mantidos sob condições laboratoriais padrão (temperatura ambiente no intervalo de 22–25 °C respeitando seu ciclo diurno/noturno de 12/12h) dentro de gaiolas montadas num rack ventilado, sendo um máximo de três animais por gaiola, com livre acesso à ração seca e água (dieta *ad libitum*). Cabe ressaltar que, após os esses camundongos serem recebidos no biotério do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética – no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, ICB/UFG (coord. Prf.^a Dr.^a Elisângela Silveira-Lacerda) – foi

tomado o cuidado de ambientá-los ao laboratório, não os submetendo a qualquer procedimento experimental antes de cinco dias após sua chegada.

O modelo experimental de tumor murino utilizado foi o Sarcoma 180 (ATCC número TIB-66). No Laboratório de Genética Molecular e Citogenética – ICB/UFG, a linhagem de células de S180 é mantida em camundongos *Swiss*, na forma ascítica dentro de sua cavidade peritoneal (tumor não metastático), e transplantado de um para outro animal por meio de passagens sucessivas, na quantidade de 2×10^6 células ajustada para um volume final de 0,2 ml.

Noutro grupo de camundongos o crescimento do tumor murino S180, na forma sólida e subcutânea, é induzido na virilha direita desses animais para realização dos experimentos de tratamento da neoplasia utilizando a técnica de hipertermia magnética com NPM. Para tanto, um dos animais transplantados e com S180 na forma ascítica é selecionado sete dias depois de receber a inoculação de células de S180. Esse animal é anestesiado com uma solução de 0,2 ml/100g de Ketamina (100 mg/ml) e Xilazina (100 mg/ml) e sacrificado por deslocamento cervical. O seu fluido peritoneal com células de S180 é aspirado com uma seringa (vide Figura 2.4 A), as células são lavadas numa solução de PBS (esterilizada) e uma alíquota das células em suspensão é colocada em azul de tripano 1% (m/v) (Sigma Chemical Co.). Então, essas células tumorais são contadas utilizando um quantificador automático de células (modelo LunaTM – Logos, Biosystems), apenas diluições celulares com viabilidade celular $\geq 90\%$ são usadas para os estudos *in vivo* [145].

Os animais preparados para os experimentos *in vivo* de MH com NPM foram sedados e receberam, na região da virilha direita, uma injeção subcutânea de uma solução contendo células tumorais na concentração de $2,3 \times 10^6$ células/ml (com viabilidade celular igual a 99,8%), para indução do crescimento do tumor sólido e subcutâneo de S180 (vide Figura 2.4 B). De acordo com a literatura, tumores sólidos de sarcomas de partes moles (vide seção 1.4) como é o caso do S180, crescem centrifugamente, com os tecidos normais adjacentes à lesão sendo comprimidos e, à medida que se atrofiam, contribuem para o aparecimento grosseiro da circunscrição [146].

Todos os procedimentos descritos acima foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (pareceres consubstanciados nº 039/2012 nº 098/2014) (vide Apêndice D).

Depois de realizada a inoculação dessas células tumorais esses animais foram monitorados diariamente (massa corporal, consumo de água e ração seca, produção de excretas) e, a partir do momento em que o tumor torna-se palpável/protuberante seu tamanho também é medido. O protocolo de monitoramento diário do crescimento desses tumores consiste em: medir com um paquímetro digital (incerteza igual a $\pm 0,05$ mm), sobre a pele do animal o eixo maior (D) e eixo menor (d) do tumor, então, o volume do tumor é calculado através da seguinte equação (eq. 2.6) [147]:

$$V = \frac{D \cdot d^2}{2} \quad (2.7)$$

A Figura 2.4 é um esquema sumarizando todo o procedimento anteriormente descrito de indução do tumor sólido e subcutâneo na virilha dos animais.

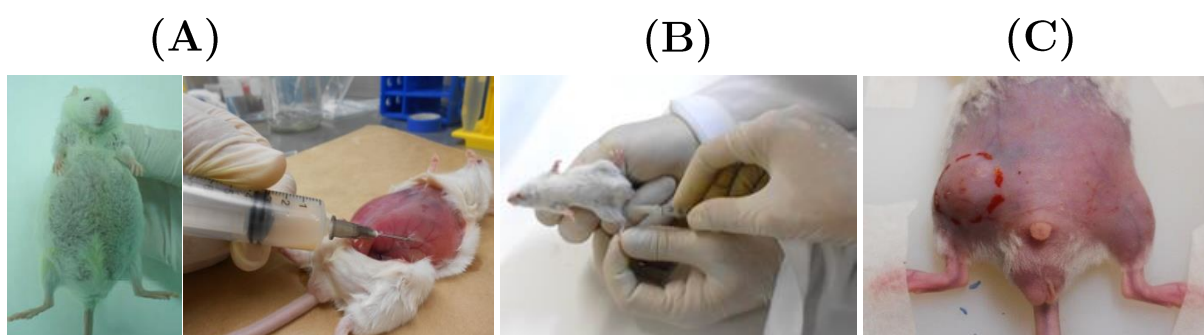


Figura 2.4 Processo de indução de crescimento do tumor murino S180 sólido e subcutâneo em camundongos *Swiss*: na imagem (A) vemos um camundongo macho transplantado (passagens sucessivas) no qual era mantido o tumor S180 ascítico. Depois que o animal é sacrificado por deslocamento cervical é sugado seu fluido peritoneal contendo células tumorais. Essas células são centrifugadas (1500 rpm por 10 min), lavadas em PBS e suspensas em azul de Tripiano 1% (m/v) para serem contadas e, então, na imagem (B) vemos que é feita uma injeção subcutânea, na região da virilha do animal, de uma solução contendo $2,3 \times 10^6$ células/ml (com viabilidade celular de 99,8%) (o animal foi sedado antes da inoculação). Já na imagem (C) vemos o tumor S180 induzido na forma sólida e subcutânea, 25 dias após o procedimento de inoculação (nessa foto o animal também estava sedado).

Todos os animais utilizados nos experimentos de HM com NPM *in vivo* e cujo tumor S180 (sólido e subcutâneo) foi induzido foram mantidos vivos até o momento em que o volume de seus tumores atingiu o valor limite igual a $2,0 \text{ cm}^3$. A fim de não prolongar seu sofrimento e de acordo com as recomendações da CEUA da UFG, então, os camundongos que atingiram esse limite de tamanho foram anestesiados com uma solução de 0,2 ml/100g de Ketamina (100 mg/ml) e Xilazina (100 mg/ml) e sacrificados por deslocamento cervical.

2.3 Primeira configuração experimental para realização de HM *in vivo* com as NPM

Nesta seção será detalhada a primeira configuração experimental utilizada para realização de HM *in vivo* com NPM em nosso laboratório e cujos resultados já estão publicados [14]. A metodologia que inicialmente é apresentada nesta seção 2.3 foi utilizada, apenas, nos experimentos que serão discutidos no capítulo 3.

Da literatura observa-se que desde a década de 90 muitos grupos de pesquisa também têm investigado a HM com NPM *in vivo* em modelos tumorais murinos [148], [149], [150], [100]. Grande parte desses grupos trabalha com frequências de campo magnético alternado numa faixa de 100 – 500 kHz e em muitas publicações a montagem experimental é tal que, o animal é colocado dentro da bobina. Há, também, alguns grupos que têm concentrado seus esforços no desenvolvimento das bobinas utilizadas para geração de campo magnético alternado, objetivando o melhor controle espacial da uniformidade e da intensidade de campo magnético e conseqüente efeito de aquecimento produzido no corpo da cobaia [151].

Nos experimentos de HM *in vivo* com NPM discutidos no capítulo 3 (vide protocolos experimentais na seção 3.2), optamos por uma configuração experimental em que o camundongo não é colocado dentro da bobina, mas esta é aproximada de seu corpo na região do tumor sólido e subcutâneo (**primeira configuração experimental**). E como a Figura 2.5 ilustra como a intensidade (valor rms) do campo magnético alternado que o corpo do animal experimenta é não uniforme (representado pelas linhas de campo não igualmente espaçadas na região do tumor). É importante ressaltar que há na literatura, resultados clínicos (fase III) com sarcomas de partes moles (vide capítulo 1), demonstrando o sucesso no tratamento dessa classe de tumores sólidos (em humanos) utilizando um aquecimento não uniforme (gerado por uma antena de RF) [33], fato que poderá vir a influenciar e inspirar o trabalho de outros pesquisadores, no sentido de simplificar o *design* do equipamento de hipertermia para aplicações clínicas [36, p. 501].

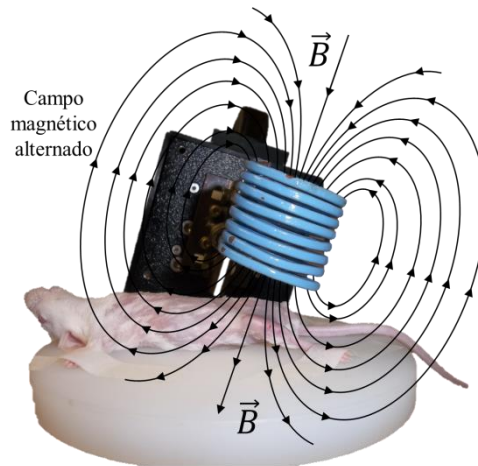


Figura 2.5 Esquema ilustrando a geometria não uniforme das linhas de campo magnético alternado a que o corpo do camundongo está sujeito durante o procedimento de HM *in vivo*. O cabeçote com a bobina indutora é aproximado do corpo do animal, onde a distância entre uma das faces da bobina e a virilha do camundongo é igual a 10 mm (primeira configuração experimental).

Até onde sabemos da literatura, uma configuração experimental bem semelhante a essa foi empregada pela primeira vez (com cães) no trabalho pioneiro de Gilchrist *et al.* na década de 50 [152].

O equipamento de hipertermia magnética que utilizamos em nosso laboratório é um modelo EasyHeat-LI[®] (Ameritherm Inc., Scottsville, NY). E, para realização dos experimentos que serão discutidos na seção 3.3, foi escolhida uma bobina cilíndrica de comprimento igual a 3,5 cm e secção reta circular (raio igual a 2 cm), com oito voltas e refrigerada por um circuito fechado de água com etileno glicol (temperatura da bobina em torno de 10°C quando a corrente elétrica está desligada e em torno de 50°C quando energizada). A frequência de campo magnético alternado é igual a 301 kHz, gerando uma amplitude de campo magnético de baixa intensidade (valor RMS) numa faixa de 123 – 173 G (9,79 – 13,77 kA/m). Concentramos nossos esforços na síntese de fluidos magnéticos que, sob essas condições experimentais de campo e frequência, permitam dentro do tumor do animal ser possível acessar (e manter por mais de 20 min) temperaturas terapêuticas (43 – 47 °C) como será mostrado em nossos resultados experimentais na seção 3.3.

A Figura 2.6 (A) mostra o mapeamento bidimensional da intensidade (valor rms) do campo magnético alternado ($f = 301$ kHz) e não uniforme gerado pela bobina em função da posição nas direções axial (eixo z) e radial (R); essa medida foi realizada com o equipamento de hipertermia magnética na mesma configuração experimental dos procedimentos de HM *in vivo*, utilizando uma sonda Hall para medições de campo magnético alternado (adquirida da

AMF Lifesystems[®]). A origem do sistema de coordenadas ($z = 0$ e $R = 0$) é colocada no centro geométrico da face da bobina que fica voltada para a superfície da pele do animal durante os procedimentos de HM *in vivo*. Como esperado, o módulo do campo magnético alternado diminui com o aumento da distância, relativamente à face da bobina. Já a Figura 2.6 (B) mostra o valor rms da intensidade de campo magnético alternado, apenas, ao longo da direção do eixo da bobina. E, ao longo desse eixo z , é importante notar que a intensidade de campo magnético alternado na face ($z = 0$ e $R = 0$) é igual a 422 G (422 Oe ou 33,6 kA/m) enquanto que, à distância de 15 mm da face da bobina ($z = 15$ mm e $R = 0$), esse valor cai para 123 G (123 Oe ou 9,8 kA/m).

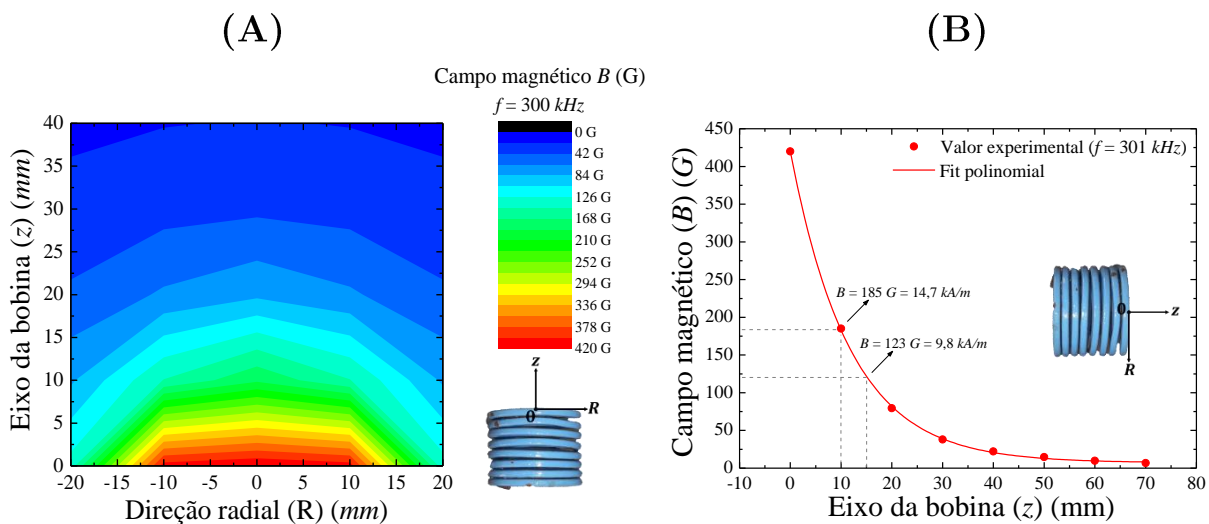


Figura 2.6 (A) Mapeamento bidimensional do campo magnético alternado e não uniforme gerado pela bobina na condição experimental dos procedimentos de HM *in vivo*. (B) Amplitude de campo magnético alternado (valor rms) apenas ao longo do eixo z da bobina (direção axial com $R = 0$).

Essa montagem também incluía uma câmera termográfica, utilizada para monitorar em tempo real a temperatura da superfície da pele dos animais sob a ação do campo magnético alternado. Além do monitoramento por infravermelho a temperatura foi monitorada, também, pontualmente na superfície da pele na região do tumor por outro termômetro, uma fibra-óptica (sonda) colocada na região de maior aquecimento da pele sobre o tumor subcutâneo (região identificada pela imagem de infravermelho). A Figura 2.7 mostra essa montagem experimental, completa, para realização de MH *in vivo* com NPM.



Figura 2.7 Primeira montagem experimental para realização de Hipertermia Magnética *in vivo*: (1) imagem termográfica da superfície da pele no camundongo durante o procedimento de HM com NPM; (2) registro do termômetro de fibra óptica (ponto sobre a pele na região do tumor subcutâneo); (3) gerador de campo magnético alternado; (4) câmera termográfica; (5) cabeçote com a bobina (indutor); (6) apoio para o camundongo montado sobre um elevador que permite seu movimento de aproximação da face da bobina (que fica voltada para superfície da pele do animal).

A câmera termográfica utilizada em todos os experimentos (relatados nos capítulos 3, 4 e 5) foi um modelo SC620 da empresa FLIR[®], configurada na resolução temporal de 60 *fps* (frames por segundo). O que permite uma aquisição de 60 valores de temperatura a cada segundo por pixel da cena mostrada numa imagem termográfica (com resolução de 640×480 pixels). Seu intervalo espectral de aquisição é na faixa do infravermelho longo (de $7,5\text{--}13,0$ μm) e capacidade de medida no intervalo de -40°C até 500°C com incerteza de $\pm 2\%$, um detector do tipo microbolômetro⁷ não resfriado (matriz de plano focal com 640×480 pixels).

Durante os procedimentos de HM *in vivo* (nessa primeira configuração experimental) a objetiva da câmera termográfica esteve sempre posicionada a uma distância de 50 cm da superfície da pele do camundongo na região do tumor (segundo uma hipotenusa imaginária conforme ilustrado na Figura 2.8). E a direção que essa câmera fazia com a normal à superfície da pele do animal na região do tumor formava um ângulo de $(60^\circ \pm 5^\circ)$ (vide esquema na Figura 2.8).

⁷ Um microbolômetro LWIR (*long wave infrared*) não refrigerado é um sensor térmico onde basicamente cada pixel funciona como um resistor. A estrutura do microbolômetro do modelo SC620 da FLIR é constituída de óxido de vanádio (VOx). O valor da resistência muda de acordo com a quantidade de radiação incidente, pois a radiação incidente infravermelha aquece a estrutura do resistor. Esta mudança de resistência em cada pixel é então medida e processada e, em seguida, usada para criar uma imagem. Normalmente a estrutura do microbolômetro é otimizada para melhor sensibilidade em comprimentos de onda entre $7,0$ e $14,0$ μm (infravermelho longo).

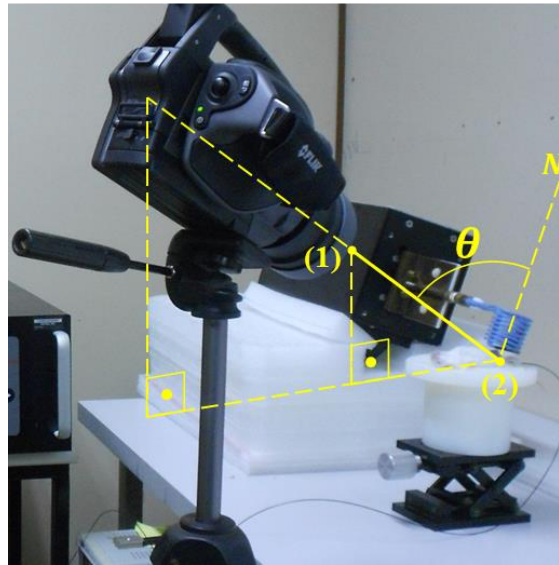


Figura 2.8 Esquema geométrico representando a direção de captura da câmera térmica em relação à direção normal (N) à superfície da pele do animal na região do tumor; a distância (“hipotenusa”) entre a objetiva da câmera – ponto (1) – e a virilha do animal – ponto (2) – foi sempre mantida igual a 50 cm.

Note que o posicionamento relativo (bobina – animal – câmera) é extremamente relevante nesse tipo de experimento. E, a fim de minimizar erros de ajuste dessas posições e buscar maior conformidade e comparação entre os repetidos experimentos, primeiramente, aplicamos uma ideia simples de elaborar um gabarito de teflon com uma ponta de comprimento ajustável (ao longo da direção do eixo da bobina). Introduzindo esse gabarito no interior da bobina, garante-se o posicionamento correto de sua face relativamente à superfície da pele do animal na região do tumor. A distância entre a face da bobina e a pele do camundongo é ajustável e, sempre, medida com um paquímetro analógico (incerteza $\pm 0,05$ mm). Após o correto posicionamento do animal em relação à face da bobina, distantes de $(10,00 \pm 0,05)$ mm, então, esse gabarito é removido antes de ser ligado o campo magnético alternado.

A lente da câmera possui uma distância focal igual a 19,31 mm e, segundo especificações do fabricante [153] para o modelo de câmera que utilizamos, quando sua distância até o alvo (fonte de calor) é igual a 50 cm, então, a matriz de plano focal (MPF) com 640×480 pixels (onde cada pixel tem dimensão quadrada igual a $(0,65 \times 0,65)$ mm²) corresponde a uma superfície real (plana e retangular) de aquisição de valores de temperatura com área aproximadamente igual a 1298 cm²: dimensão vertical igual a 312 mm (campo de visão vertical – CVV) e dimensão horizontal igual a 416 mm (campo de visão horizontal – CVH) (vide Figura 2.9).

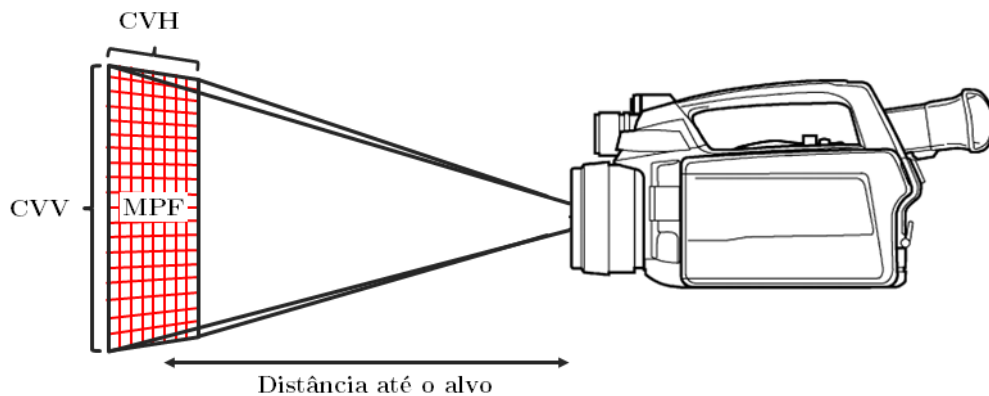


Figura 2.9 Câmera de infravermelho com lente objetiva de distância focal igual a 19,31mm, distante 50 cm do alvo (fonte de calor): CVH = 640 px = 416 mm, CVV = 480 px = 312 mm, MPF = 640 × 480 pixels.

Dadas as dimensões do corpo do camundongo, da bobina e, principalmente, a pequena distância de 10 mm entre sua face e a pele do animal na região do tumor (vide Figuras 2.7 e 2.8 acima no texto), nessa primeira configuração experimental o ângulo sólido de captura das imagens de infravermelho com a câmera é muito pequeno restringindo o seu posicionamento, uma dificuldade intrínseca à configuração experimental adotada.

Verificamos ainda que a inclinação de $(60^\circ \pm 5^\circ)$ causou um erro no valor registrado pela câmera termográfica da temperatura (aparente) na superfície da pele do animal, subestimando esse valor de 5,0–7,0 °C aproximadamente, em relação ao mesmo valor medido com o termômetro de fibra-óptica (para pontos correspondentes). A estimativa desse erro é feita com base nos trabalhos de Watmough *et al.* [154] (cujo desenvolvimento completo é apresentado no Apêndice C.4) e, também, nos resultados experimentais que serão discutidos no capítulo 4. Isto ocorre porque durante a aquisição de uma imagem termográfica de uma superfície curva (como é a superfície da pele na região do tumor subcutâneo) a emissividade térmica $\epsilon(\lambda, \theta)$ detectada pela câmera de infravermelho é, também, função do ângulo de captura da radiação emitida pela superfície (vide a eq. C.68 no Apêndice C.3). Conseqüentemente, muitíssimo importante também é o posicionamento angular da câmera termográfica em relação ao animal para uma correta aferição de sua temperatura superficial.

Serão adequadamente apresentados no capítulo 4 os resultados experimentais de uma série de medidas que nos permitiram avaliar corretamente a dependência do valor da temperatura superficial (medida com a câmera termográfica) em função do ângulo formado entre sua objetiva (direção de captura da radiação infravermelho) e a direção normal à superfície da pele do camundongo (num intervalo de $0^\circ \leq \theta \leq 60^\circ$). Cabe, aqui, ressaltar que

os valores de temperatura (adquiridos por infravermelho) apresentados nas tabelas e gráficos da seção 3.3 já estão todos corrigidos.

2.4 Segunda configuração experimental para realização de HM *in vivo* com as NPM

Nessa segunda configuração experimental que será apresentada nesta seção 2.4, tudo foi modificado, além de uma nova bobina que permitiu o melhor posicionamento da câmera termográfica (para uma detecção mais acurada), nos experimentos de HM *in vivo* foi utilizado o FM de MnFe_2O_4 -DMSA (vide seção 2.1.2). Essa segunda configuração foi empregada nos experimentos que serão apresentados e discutidos nos capítulos 4 e 5 (vide seções 4.3 e 5.3), onde optamos por uma montagem experimental em que o camundongo é colocado entre duas bobinas circulares (de mesmo raio e número de voltas), coaxiais e com faces paralelas (à semelhança de uma bobina de Helmholtz), diferentemente do que foi apresentado anteriormente na seção 2.3.

O equipamento de hipertermia magnética (gerador de corrente alternada) continua sendo um modelo EasyHeat-LI[®] (Ameritherm Inc., Scottsville, NY). Foi escolhida outra bobina cilíndrica que, na verdade, é a associação duas bobinas circulares de mesmo diâmetro interno ($\varnothing = 65$ mm) cada uma com duas voltas e comprimento igual a 33 mm (o tubo do qual é feita a bobina tem seção reta circular com diâmetro externo $\varnothing = 6,7$ mm), são coaxiais e com faces paralelas separadas por uma distância de 38 mm (ao longo de seu eixo). São percorridas por corrente elétrica no mesmo sentido e o sistema todo é refrigerado por um circuito fechado de água com etileno glicol (a temperatura da bobina fica em torno de 10°C quando a corrente elétrica alternada está desligada e em torno de 50°C quando energizada). A frequência utilizada de campo magnético alternado foi igual a 301 kHz, gerando um campo magnético aproximadamente uniforme e de baixa intensidade, cujo valor rms é da ordem de 220 G (17,5 kA/m) na região onde é posicionado o tumor do animal durante os experimentos de HM *in vivo* com NPM (um volume de $\sim 1,0$ cm³ no espaço entre as bobinas) (vide Figura 2.10 abaixo).

A Figura 2.10 (A) além de indicar as dimensões da bobina também define a orientação do sistema de coordenadas cilíndricas utilizado no mapeamento do campo magnético, com origem escolhida em seu centro geométrico (no ponto médio do eixo das duas bobinas coaxiais e paralelas). Já a Figura 2.10 (B) mostra o mapeamento bidimensional (plano $y = 0$ em coordenadas cilíndricas) da intensidade (valor rms) de campo magnético alternado ($f = 301$ kHz) gerado pelo par de bobinas. Essa medida foi realizada com o equipamento de hipertermia magnética na mesma configuração experimental dos procedimentos de HM *in vivo*, utilizando uma sonda Hall para medições de campo magnético alternado (adquirida da AMF Lifesystems[®]). Como esperado, o módulo do campo magnético alternado diminui com o aumento da distância, relativamente a qualquer das faces do par de bobinas coaxiais.

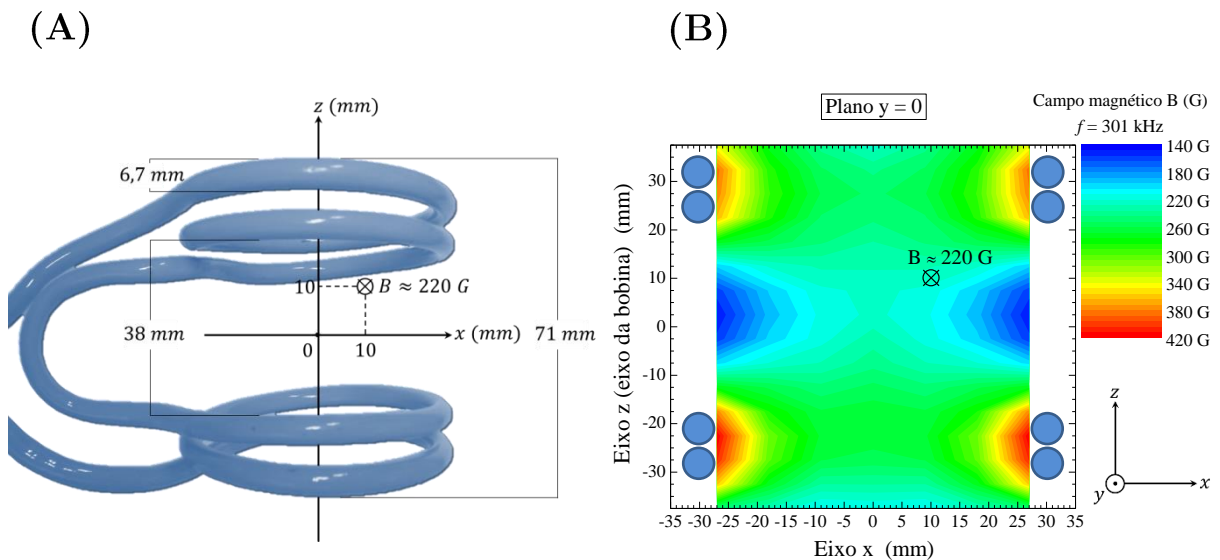


Figura 2.10 (A) Dimensões da bobina e orientação do sistema de coordenadas (cilíndricas) utilizado no mapeamento do campo magnético. (B) Mapeamento bidimensional (plano $y = 0$) do campo magnético alternado e não uniforme gerado pela bobina (valor rms) na condição experimental dos procedimentos de HM *in vivo*; o inset no gráfico corresponde à intensidade ($B \approx 220$ G) na local onde o tumor de cada camundongo é posicionado durante seu aquecimento.

A montagem dessa segunda configuração experimental para realização de HM *in vivo* também inclui a mesma câmera termográfica (modelo SC 620 FLIR[®]), novamente utilizada para monitorar em tempo real a temperatura da superfície da pele dos animais sob a ação do campo magnético alternado.

É preciso ressaltar ao leitor que, em particular para os resultados experimentais que serão apresentados e discutidos somente no capítulo 4, essa segunda configuração experimental foi empregada de maneira especial, com o objetivo específico de investigar a dependência no valor da temperatura superficial aparente, medida com a câmera termográfica,

em função do ângulo formado entre sua objetiva (direção de captura da radiação infravermelha) e a direção normal à superfície da pele do camundongo (num intervalo de $0^\circ \leq \theta \leq 60^\circ$) (vide Figura 2.11 abaixo). Nesse experimento (cujo protocolo está detalhado na seção 4.2) cada um dos animais foi submetido a um total de cinco sessões de HM com NPM de MnFe_2O_4 – DMSA (cada uma com duração de 30 min de aquecimento e intercaladas de 20 min) totalizando 150 min de hipertermia. A objetiva da câmera foi sempre mantida a 50 cm de distância da pele do animal (na região do tumor) e, inicialmente, em $\theta = 0^\circ$ (direção paralela à normal em relação à pele do camundongo). Da primeira para a segunda sessão de HM com NPM, a inclinação da câmera foi incrementada de 15° e assim sucessivamente, da segunda até a quinta sessão, terminando em $\theta = 60^\circ$ (vide Figura 2.11 (B)). Foi, também, colocado um termômetro de fibra-óptica sobre a pele do animal na região de maior aquecimento da pele sobre o tumor (identificada na imagem de infravermelho) (vide as Figuras 2.11 (C) e (D)). E a temperatura por ele registrada foi utilizada como valor de referência (controle) para comparação com as medidas feitas com a câmera em diferentes posições angulares (esses dados experimentais serão apresentados na seção 4.3). Em todos os detectores (e em todas as cinco sessões de hipertermia), a temperatura foi monitorada, inicialmente, por durante 1 min antes de o campo magnético ser ligado (temperatura inicial do animal), durante os 30 min de aquecimento por HM com NPM (campo ligado), e durante os primeiros 5 min após desligado o campo magnético.

A Figura 2.11 (A) mostra uma fotografia da configuração dos experimentos do capítulo 4 de HM *in vivo* (camundongo sedado e posicionado dentro da bobina) seguida de um diagrama na Figura 2.11 (B) (imagem ampliada) mostrando o ângulo (θ) formado entre a direção da objetiva da câmera termográfica e a direção normal à pele do camundongo na região do tumor subcutâneo (denotado pela letra *N*).

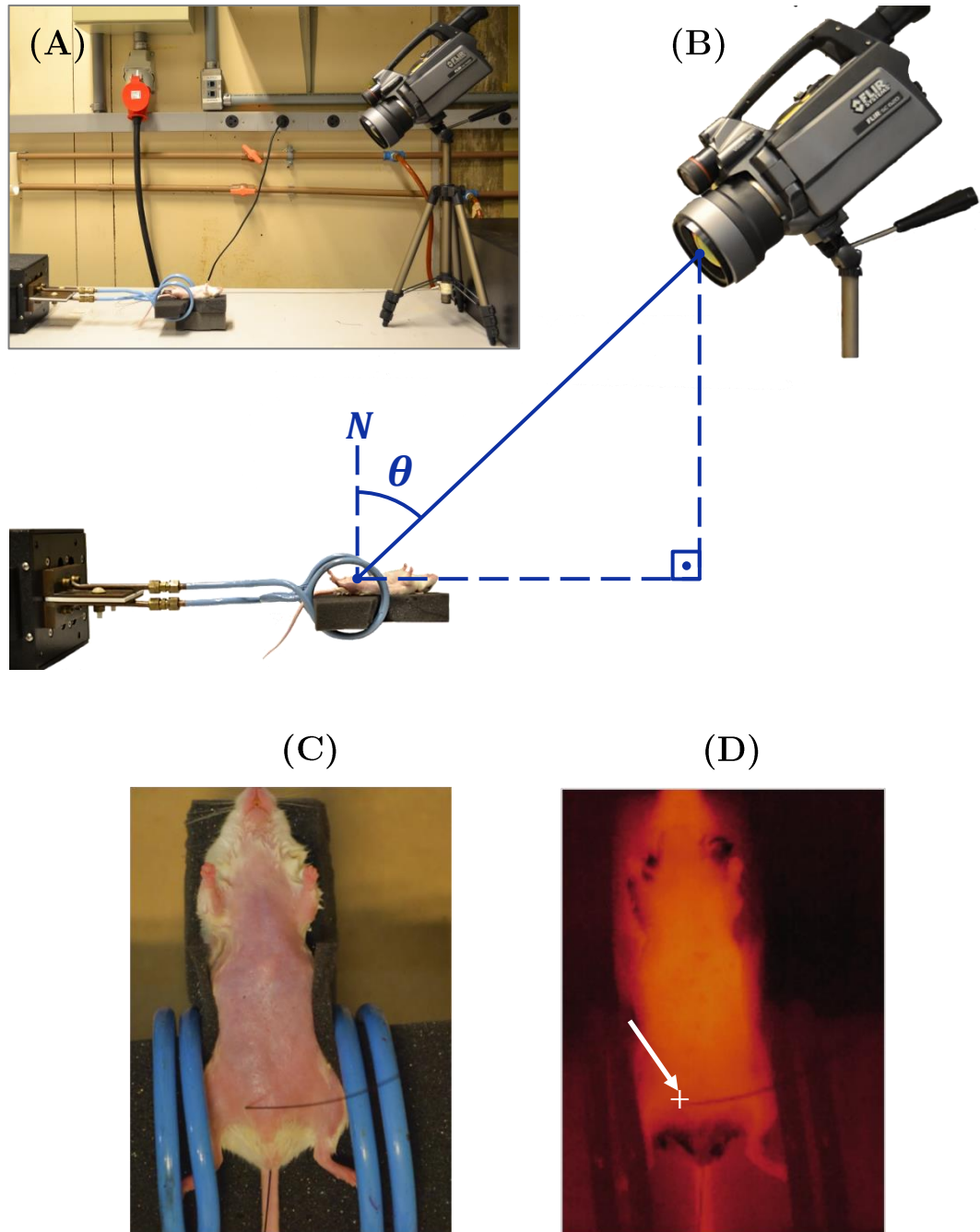


Figura 2.11 (A) Fotografia do experimento de HM *in vivo* com NPM (camundongo sedado) (resultados experimentais no capítulo 4). (B) Diagrama mostrando o ângulo (θ) formado entre a direção da objetiva da câmera termográfica e a direção normal à pele do camundongo (denotada pela letra N) na região do tumor subcutâneo. Nas cinco sessões de hipertermia à que o animal foi submetido, a posição angular da câmera termográfica (em cada sessão) foi respectivamente igual a: $\theta = 0^\circ$, $\theta = 15^\circ$, $\theta = 30^\circ$, $\theta = 45^\circ$ e $\theta = 60^\circ$ (sempre distante 50 cm do alvo). (C) Imagem de referência captada pela câmera termográfica, utilizando a opção de captura no espectro visível. (D) A mesma imagem anterior, agora tomada no espectro infravermelho, é possível identificar a posição da fibra-óptica sobre o tumor.

Como a topografia da pele do animal na região do tumor é convexa (à semelhança de hemisfério elipsoidal) e possui uma superfície muito pequena, comparativamente a área da matriz plano focal definida pelo ângulo sólido de captura da objetiva da câmera. A superfície

de apoio do camundongo dentro da bobina (paralela à mesa onde o experimento foi montado) foi adotada como superfície horizontal de referência para as medidas de $0^\circ \leq \theta \leq 60^\circ$.

Por fim, a configuração experimental adotada para a série de experimentos de tratamento que serão discutidos somente no capítulo 5 (cujos protocolos estão descritos na seção 5.2) é muito parecida com a utilizada nos experimentos do capítulo 4, descrita nos parágrafos anteriores. Com a importante diferença que a posição angular da câmera termográfica agora é fixa, sempre mantida perpendicularmente à superfície da pele do camundongo (a 50 cm de distância), ou seja, em $\theta = 0^\circ$, com erro da ordem de $0,5^\circ\text{C}$ na medida da temperatura superficial, relativamente à temperatura aferida com a fibra-óptica (controle) também na superfície da pele do animal. Esse erro é estimado com base nos resultados experimentais que serão discutidos no capítulo 4, onde provaremos que essa é a configuração experimental mais acurada para detecção por infravermelho do aquecimento da pele sobre o tumor subcutâneo, devido o calor gerado pelas NPM injetadas intratumoralmente e acionadas pelo campo magnético alternado.

3 Metodologia de monitoramento em tempo real da hipertermia magnética *in vivo* com nanopartículas magnéticas utilizando termografia por infravermelho.

3.1 Introdução

Nesse capítulo 3 daremos início a discussão de alguns dos resultados experimentais da tese sobre a realização de HM *in vivo* com NPM de MnFe_2O_4 – Citrato (cujo diâmetro é igual a (12 ± 3) nm e SLP *in vitro* igual a 27,3 W/g), onde camundongos Swiss foram avaliados numa configuração de campo magnético alternado não uniforme (valor rms ~ 10 kA/m e frequência de 301 kHz), basicamente divididos em dois grupos: o primeiro de animais saudáveis e outro de animais com tumor sólido e subcutâneo. Primeiramente, todos os animais foram submetidos à HM sem receber injeção de FM (subcutânea ou intratumoral). Depois, foram novamente submetidos à mesma condição anterior de campo e frequência mas, agora, após receber uma injeção de FM.

O objetivo principal da análise que será conduzida nas próximas sessões será avaliar a eficiência de nossa metodologia experimental no que diz respeito: i) à utilização de uma NPM cuja síntese foi realizada para obtermos uma boa eficiência magnetotérmica (aquecimento acima de 43°C e mantido por mais de 20 min), numa condição *in vivo* de campo e frequência que minimiza o depósito não específico de calor no corpo dos animais; ii) à qualidade na detecção do aquecimento tumoral (em tempo real) a partir de seu monitoramento por infravermelho na superfície da pele do animal; iii) à utilização de uma solução analítica (unidimensional) da equação de biocalor de Pennes para modelar a variação de temperatura medida na superfície da pele desses animais, supondo uma distribuição homogênea das NPM dentro do tumor e com taxa de perfusão sanguínea nula.

3.2 Protocolos experimentais

Todos os protocolos experimentais descritos a seguir foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (pareceres consubstanciados nº 039/2012 nº 098/2014) (vide Apêndice D).

Para os resultados discutidos na seção 3.3, o número total de animais utilizados foi igual a cinco ($n = 5$), subdivididos em três grupos e cinco experimentos: dois animais saudáveis (1º e 2º experimentos), dois animais com S180 sólido e subcutâneo (3º e 4º experimentos) e um quinto animal, também com S180 sólido e subcutâneo, submetido a um protocolo experimental um pouco diferente dos dois anteriores (5º experimento). Estes cinco experimentos foram realizados com base nos seguintes protocolos e objetivos:

- **Animais sadios ($n = 2$):**

1º. No 1º experimento dois animais sadios (animais #1 e #2) foram submetidos ao procedimento de HM sem injeção de FM. **Objetivo:** investigar o quão acurado é a câmera termográfica na identificação do aquecimento (não específico) na superfície da pele do animal devido às correntes parasitas (*eddy-currents*). Distância entre a face da bobina e a superfície da pele do animal (na região da virilha): $d = 10 \text{ mm}$. Tempo de HM: $\Delta t = 3 \text{ min}$. Monitoramento da temperatura do animal:

– Fibra-óptica: num ponto da superfície da pele (virilha) do animal.

– Câmera termográfica: diferentes regiões na superfície da pele (virilha, abdômen e face).

2º. No 2º experimento, os mesmos dois animais #1 e #2 (sem tumor) do 1º experimento, foram submetidos a uma segunda sessão de HM logo após receberem, na região da virilha, uma injeção subcutânea de 90 μl do FM (MnFe_2O_4 – Citrato), volume correspondente a uma massa de 2 mg de material magnético nanoparticulado. **Objetivo:** investigar o quão acurado é a câmera termográfica na identificação do aquecimento (localizado) devido às nanopartículas magnéticas. E, também, por comparação com o resultado do 1º experimento, distinguir essa entrega localizada de calor do aquecimento produzido por *eddy-currents*. Distância entre a face da bobina e a superfície da pele do animal (na região da virilha): $d = 10 \text{ mm}$. Tempo de HM: $\Delta t = 3 \text{ min}$.

Monitoramento da temperatura do animal:

- Fibra-óptica: num ponto da superfície da pele (virilha) do animal.
- Câmera termográfica: diferentes regiões na superfície da pele (virilha, abdômen e face).

• **Animais com S180 sólido e subcutâneo (n = 2):**

3°. No 3° experimento dois animais (#3 e #4) com S180 (sólido e subcutâneo) foram submetidos ao procedimento de HM, primeiramente, sem injeção de FM. Os volumes tumorais desses animais no dia do experimento correspondiam, respectivamente, a 491 mm³ e 470 mm³. **Objetivo:** investigar se há diferença significativa entre o aquecimento (não específico) na superfície da pele sobre o tumor subcutâneo devido às *eddy-currents*, comparativamente aos resultados obtidos com os animais saudáveis (1° experimento). Distância entre a face da bobina e a superfície da pele na região do tumor (virilha) do animal: $d = 10 \text{ mm}$. Tempo de HM: $\Delta t = 3 \text{ min}$.

Monitoramento da temperatura do animal:

- Fibra-óptica: num ponto da superfície da pele do animal na região do tumor.
- Câmera termográfica: diferentes regiões na superfície da pele (virilha, abdômen e face).

4°. No 4° experimento, os mesmos dois animais (#3 e #4) com S180 do 3° experimento, foram submetidos a uma segunda sessão de HM logo após receberem a injeção diretamente em seu tumor de 90 µl do FM (MnFe₂O₄ – Citrato), volume correspondente a uma massa de 2 mg de material magnético nanoparticulado. Esse volume foi fracionado em três injeções de 30 µl cada, feitas a 5 mm de profundidade abaixo da pele do animal em três posições distintas ao longo do eixo maior do tumor, a fim de obter uma melhor distribuição intratumoral das NPM (vide Figura 3.7 (A)). **Objetivo:** investigar o quão acurado é a câmera termográfica na identificação do aquecimento (localizado) devido às NPM injetadas no tumor subcutâneo. E na região do tumor, por comparação com o resultado do 3° experimento, distinguir essa entrega localizada de calor do aquecimento provocado por *eddy-currents*. Distância entre a face da bobina e a superfície da pele na região do tumor (virilha) do animal: $d = 10 \text{ mm}$. Tempo de HM: $\Delta t = 3 \text{ min}$

Monitoramento da temperatura do animal:

- Fibra-óptica: num ponto da superfície da pele do animal na região do tumor.
- Câmera termográfica: diferentes regiões na superfície da pele (virilha, abdômen e face).

- **Animal com S180 sólido e subcutâneo ($n = 1$): monitoramento intratumoral.**

5°. No 5° experimento um animal (#5) com S180 (sólido e subcutâneo, com volume igual a 983 mm^3) foi submetido a apenas uma sessão de HM, também, logo após receber uma injeção diretamente em seu tumor de $90 \text{ } \mu\text{l}$ do FM (MnFe_2O_4 – Citrato), volume correspondente a uma massa de 2 mg de material magnético nanoparticulado. Novamente esse volume foi fracionado em três injeções de $30 \text{ } \mu\text{l}$ cada, feitas a 5 mm de profundidade abaixo da pele do animal em três posições distintas ao longo do eixo maior do tumor, a fim de obter uma melhor distribuição intratumoral das NPM (vide Figura 3.7 (A)). Nesse experimento, diferentemente dos anteriores (3° e 4°), a fibra-óptica foi introduzida no tumor a fim de reportar o valor da temperatura de um ponto dentro do tumor, cheio de NPM. **Objetivo:** investigar o quão diferente é o valor de temperatura medida com a câmera termográfica na superfície da pele sobre o tumor, da temperatura medida num ponto (aproximadamente central a 5 mm de profundidade sob a pele) dentro do tumor. E com os dados dessas duas medições, trabalhar na construção de uma modelagem matemática que permita estimar a temperatura interna do tumor utilizando, apenas, o valor registrado na superfície da pele do animal. Distância entre a face da bobina e a superfície da pele na região do tumor (virilha) do animal: $d = 10 \text{ mm}$. Tempo de HM: $\Delta t = 30 \text{ min}$

Monitoramento da temperatura do animal:

- Fibra-óptica: num ponto (a 5 mm de profundidade sob a pele) dentro do tumor.
- Câmera termográfica: diferentes regiões na superfície da pele (virilha, abdômen e face).

Nesses cinco experimentos de HM (com e sem a injeção de NPM) os camundongos eram mantidos sedados durante todo o procedimento, sendo anestesiados com uma solução de 0,2 ml/100g de Ketamina (100 mg/ml) e Xilazina (100 mg/ml).

É importante ressaltar que a virilha do animal (local da injeção de FM nos animais sadios e com S180) durante a HM era mantida distante 10 mm da face da bobina. Portanto, a intensidade de campo magnético alternado gerado pela bobina nessa posição ($z = 10 \text{ mm}$ e $R = 0$) ao longo do seu eixo é igual a 184,5 G (184,5 Oe ou 14,7 kA/m) (vide Figura 2.6, na seção 2.3). Já no caso dos camundongos com S180, as NPM foram injetadas a 5 mm de profundidade (aproximadamente no centro do tumor) e, nessa posição, aproximadamente à 15 mm de distância da face da bobina ($z = 15 \text{ mm}$ e $R = 0$), a intensidade do campo magnético produzido é igual a 123 G (123 Oe ou 9,8 kA/m) (vide Figura 2.6, na seção 2.3).

Tanto para os cinco camundongos cujos resultados serão discutidos na seção 3.3, como para todos os animais utilizados em todos os experimentos de HM *in vivo* desse projeto de doutorado, as cobaias foram monitoradas diariamente: foi medida a sua massa corporal; o consumo de água e de ração seca; também foi pesada a caixa dos animais com a serragem ainda limpa (a cada troca) e depois de suja, todos os dias para acompanhar a produção de excretas (urina e fezes).

Em particular para os cinco animais utilizados nesses primeiros cinco experimentos, após terem sido submetidos ao procedimento de HM (com ou sem injeção de FM), esses camundongos continuaram a ser monitorados diariamente por mais 15 dias. Então, finalizado esse período, todos eles foram anestesiados com uma solução de 0,2 ml/100g de Ketamina (100 mg/ml) e Xilazina (100 mg/ml) e sacrificados por deslocamento cervical. E para os animais com S180 (#3, #4 e #5) foi feita a excisão do tumor: a peça foi pesada e teve medido o tamanho de seu eixo maior (D) e menor (d), então, foi calculado o seu volume *ex-vivo* utilizando novamente a eq. 2.7 (vide seção 2.2).

3.3 Análise e discussão dos resultados experimentais

Antes da realização dos experimentos *in vivo* (vide os protocolos descritos na seção 3.2), foi realizado um experimento de HM *in vitro* para checar a resposta, apenas, do FM ao campo magnético alternado e não uniforme gerado pela bobina. Para tanto, um eppendorf contendo a mesma quantidade de 90 μl do FM (MnFe_2O_4 – Citrato) que é injetado nos camundongos para realização dos experimentos *in vivo* foi posicionado em frente a uma das faces da bobina de tal forma que esse volume estivesse, inicialmente, distante 5 mm da mesma ao longo do seu eixo (posição $z = 5$ mm e $R = 0$ num sistema de referência em coordenadas cilíndricas com origem na face da bobina). Então, na mesma condição de operação dos experimentos *in vivo*, foi estabelecida uma corrente elétrica alternada na bobina com intensidade igual a $i = 250$ A e frequência $f = 300$ kHz o que (na posição $z = 5$ mm) produz um campo magnético com valor (rms) igual a $B = 278$ G (22,2 kA/m) (vide o mapeamento do campo gerado pela bobina ao longo do seu eixo na Figura 2.6, na seção 2.3).

A amostra (presa à ponta de uma haste rígida de plástico) era deslocada com um passo de 5 mm ao longo do eixo da bobina (direção z) (dentro do intervalo $5 \text{ mm} \leq z \leq 25 \text{ mm}$). A cada nova posição, o campo magnético alternado era ligado por durante um intervalo de tempo igual a 30 s, e o aumento da temperatura da amostra foi monitorado com um termômetro de fibra-óptica mergulhado no FM. Veja abaixo no texto, um esquema representando esse procedimento experimental de HM *in vitro* das NPM na Figura 3.1 (A). Já a Figura 3.1 (B) mostra as curvas de aquecimento dessas NPM de MnFe_2O_4 – Citrato (diâmetro igual a (12 ± 3) nm) em função do tempo de hipertermia e para as diferentes posições do volume de FM ao longo do eixo z . Em cada hipertermia, a temperatura da amostra foi monitorada por durante 10 s antes de o campo magnético ser ligado (temperatura inicial), durante os 30 s de aquecimento por HM (campo ligado), e durante os primeiros 20 s após o campo magnético ter sido desligado.

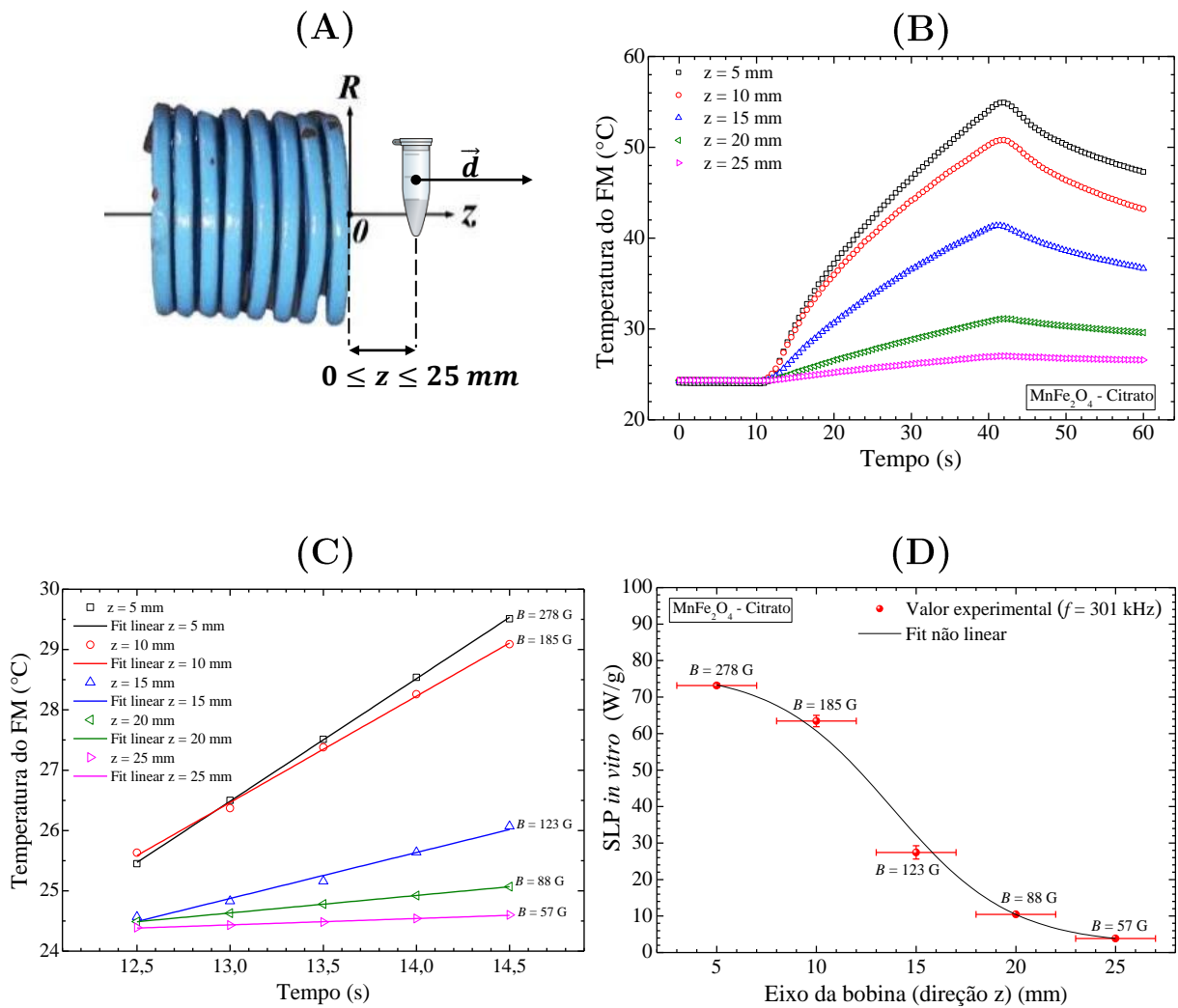


Figura 3.1 (A) Um eppendorf contendo a mesma quantidade de 90 μl do FM que é injetado nos camundongos para realização dos experimentos *in vivo*, é deslocado ao longo do eixo da bobina (direção z) ($5,0 \leq z \leq 25,0 \text{ mm}$ e $R = 0$). A cada nova posição o FM foi submetido à ação do campo magnético alternado durante 30s e a temperatura da amostra é monitorada com o termômetro de fibra-óptica. (B) Temperatura do FM em função do tempo para diferentes distâncias (d) entre a amostra e a face da bobina. (C) Valor experimental da taxa de aquecimento (inclinação inicial) das curvas de HM mostradas na figura (B) para Δt bem pequeno (primeiros 4 seg com o campo magnético ligado). (D) SLP *in vitro* das NPM de MnFe_2O_4 - Citrato (diâmetro igual a $(12 \pm 3) \text{ nm}$) calculado pela eq. 3.2 (na aproximação em que o aumento da temperatura do FM é linear com o tempo sob ação do campo magnético alternado externo).

A Figura 3.1 (C) mostra o valor experimental da taxa de aquecimento (inclinação inicial $\Delta T/\Delta t$) das curvas de HM mostradas na Figura 3.1 (B) para Δt bem pequeno (primeiros 4 s com o campo magnético ligado). É possível observar que, inicialmente, a temperatura de aquecimento da amostra cresce linearmente com o tempo sob a ação do campo magnético alternado externo. E a cada nova posição, com a diminuição da intensidade de campo magnético alternado a taxa de aquecimento também diminui. Então, utilizando uma metodologia experimental conhecida na literatura como método calorimétrico [111], [155]–[157], o valor do SLP (W/g) *in vitro* foi estimado através dos coeficientes angulares (*fit* linear

dos dados experimentais), considerando a seguinte aproximação linear com a temperatura (eq. 3.2):

$$SLP \equiv \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \left(\frac{m_{FM} c_{FM} \Delta T}{m_{np} \cdot \Delta t} \right) = c_{FM} \left(\frac{V_{FM}}{NV_{np}} \right) \frac{\rho_{FM}}{\rho_{np}} \cdot \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)$$

$$SLP = c_{FM} \frac{1}{\phi} \frac{\rho_{FM}}{\rho_{np}} \cdot \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right) \quad (3.2)$$

onde m_{FM} , m_{np} , c_{FM} , V_{FM} , V_{np} , ϕ , ρ_{FM} e ρ_{np} são respectivamente a massa do FM, a massa de todas as NPM dentro do FM, o calor específico do FM, o volume do FM, o volume médio de cada NPM, a fração volumétrica do FM, as densidades do FM e de cada NPM. Para o FM de $MnFe_2O_4$ – Citrato, temos que: $\phi = 0,0046$, $\rho_{np} = 5,1 \text{ g/cm}^3$, $\rho_{FM} \cong \rho_{H_2O} = 1,0 \text{ g/cm}^3$ e $c_{FM} \cong c_{H_2O} = 4,181 \text{ J/g} \cdot ^\circ\text{C}$ (vide seção 2.1.1, no capítulo 2). O SLP foi experimentalmente determinado nesse procedimento *in vitro* como função da distância entre o volume de FM e a face da bobina, e o resultado de seu cálculo (utilizando a aproximação linear proposta pela eq. 3.2) é mostrado no gráfico da Figura 3.1 (D).

Embora o valor do SLP diminua claramente com diminuição na intensidade de campo magnético alternado – de fato segundo a Teoria de Resposta Linear o seu valor escala com o quadrado da intensidade de campo magnético (H^2) e com o quadrado da frequência (f^2) (vide eq. B.53 no apêndice B.3) – ainda se pôde obter um resultado bastante considerável para essas nanopartículas de ferrita-macia em nossa configuração experimental de campo e frequência. E para esclarecer o que significa, experimentalmente, realizar HM *in vivo* com NPM em regime de baixa intensidade de campo magnético alternado. Primeiramente, chamamos atenção para o valor do campo magnético à distância de 15 mm da face da bobina (123 G ou 9,8 kA/m) que é, também, a distância aproximada até o centro do tumor sólido e subcutâneo (local da injeção de NPM de $MnFe_2O_4$ – Citrato) nos experimentos *in vivo* que serão discutidos nesse capítulo.

Comercialmente, já existem pelo menos dois FM disponíveis para esse tipo de aplicação, chamados BNF-starch[®] e Nanomag-D-spion[®], ambos à base de magnetita. De acordo com a literatura, sob ação de um campo magnético alternado ($\sim 150 \text{ kHz}$) com intensidade igual a 12 kA/m (150,8 G), o BNF-starch apresenta um valor de SLP *in vitro* em torno de 11 W/g e o Nanomag-D-spion perto de 44 W/g. E numa intensidade um pouco maior

igual 24 kA/m (301,6 G) o BNF-starch consegue chegar a 78 W/g e o Nanomag-D-spion em 91 W/g (também *in vitro* e mantida a frequência de 150 kHz) [100], [155]. Comparativamente, o campo gerado em nosso equipamento (para $z = 15\text{mm}$) também é da ordem de 10 kA/m, mas numa frequência mais alta (300 kHz) e, de acordo com o gráfico da Figura 3.1 (D), nossas NPM (MnFe_2O_4 – Citrato) conseguem (*in vitro*) produzir um SLP no valor de 27,3 W/g. E quando o campo magnético é igual a 22,2 kA/m (278 G) o valor do SLP *in vitro* já é igual a 72,9 W/g. Essa boa eficiência na geração de calor obtida com nossas nanopartículas (comparativamente à eficiência térmica dos já comercializados BNF-starch[®] e Nanomag-D-spion[®]) é uma propriedade característica das ferritas-macias que, diferentemente das ferritas-duras, mesmo em baixo campo apresentam alto valor de SLP [158], [16]. O mecanismo de dissipação térmica é atribuído ao fenômeno de histerese dinâmica de sua magnetização mediada pela relaxação de Néel [14]–[17] (vide eq. B.8 no Apêndice B.1).

E no que diz respeito ao critério de Atkinson como limiar de intensidade e frequência do campo magnético alternado que minimize o depósito não específico de calor no corpo dos camundongos, é interessante notar o valor do produto (Hf) à distância de 10 mm da face da bobina (mesma distância entre o indutor e a superfície da pele dos animais durante a hipertermia), cujo valor corresponde a $Hf = (14,7 \text{ kA/m} \times 301 \text{ kHz}) = 4,42 \times 10^9 \text{ A/m.s}$; maior do que o limite já estabelecido na literatura igual a $4,85 \times 10^8 \text{ A/m.s}$ (para que não haja prejuízos à saúde dos animais) [108].

Contudo essa avaliação não deve ser realizada sem levar em consideração a dependência do valor da condutividade elétrica (σ) da pele dos camundongos em função da frequência da radiação eletromagnética incidente. Se a pele for modelada matematicamente como um meio dielétrico, verifica-se que na condição em que o critério de Atkinson foi determinado (com $f = 13,56 \text{ MHz}$) a condutividade elétrica da pele humana (seca) corresponde à $\sigma \cong 0,238 \text{ S/m}$ (no SI: onde um Simiens corresponde à $[\text{S}] = 1 \text{ A}^2 \cdot \text{s}^3 / \text{kg} \cdot \text{m}^2$); enquanto que na frequência de 301 kHz esse mesmo valor cai para $\sigma \cong 1,944 \times 10^{-3} \text{ S/m}$ [58], [159]. Agora, utilizando esses parâmetros da pele humana para reavaliar o produto (Hf) para os camundongos em nossa configuração experimental, considere que:

– Primeiramente, supondo que a mesma potência dissipada de forma não específica identificada por Atkinson *et al.* em seus experimentos clínicos como causa associada à sensações de desconforto nos pacientes testados, e cujo o raio da seção reta dos tecidos

aquecidos por *eddy currents* era igual a 15 cm [108], novamente fosse dissipada na superfície desses tecidos quando a frequência de aplicação do campo magnético alternado caísse para 301 kHz, então (vide eq. 1.32, na seção 1.3):

$$P'_{eddy} = P_{eddy} \Leftrightarrow \sigma'(\mu_0\pi H' f' r)^2 = \sigma(\mu_0\pi H f r)^2 \quad (3.3)$$

$$H' = \frac{1}{f'} \sqrt{\frac{\sigma}{\sigma'}} (4,85 \times 10^8 \text{ A/m} \cdot \text{s}) \cong 17,83 \text{ kA/m}$$

Seria necessário um campo magnético mais intenso do que os 14,7 kA/m utilizados em nossos experimentos para começar a causar sensações de desconforto nos camundongos (que permanecem sedados durante todo o procedimento de HM).

– Segundo, como parte do abdômen do camundongo e região pélvica (cujo diâmetro é ~ 3,0 cm de um animal para outro) é a região do corpo desses animais com maior dimensão radial exposta ao campo magnético alternado em nossos experimentos de HM, então, aproximando sua anatomia à uma forma geométrica cilíndrica (com densidade tecidual uniforme) e condutividade elétrica $\sigma \cong 1,944 \times 10^{-3}$ S/m quando $f = 301$ kHz (para uma intensidade de campo magnético uniforme), então, o produto (intensidade de campo \times frequência) calculado teoricamente é igual a:

$$H' f' = \sqrt{\frac{\sigma}{\sigma'}} (4,85 \times 10^8 \text{ A/m} \cdot \text{s}) \cong 5,37 \times 10^9 \text{ A/m} \cdot \text{s} \quad (3.4)$$

E, portanto, o nosso valor experimental ($4,42 \times 10^9$ A/m.s) está dentro do limiar de segurança previsto teoricamente de acordo com a literatura [58], [106, p. 294–295], [108].

Agora, dando início à discussão dos resultados de HM *in vivo* dos camundongos, a montagem (primeira configuração experimental) utilizada para realização dos experimentos *in vivo* já foi adequadamente apresentada no capítulo 2 (vide Figuras 2.7 e 2.8, na seção 2.3). A seguir, na Figura 3.2, estão representados os dois procedimentos de aquisição (durante HM *in vivo* com NPM) da temperatura na superfície da pele dos camundongos. O registro é feito por durante 1 min antes de o campo magnético ser ligado (temperatura inicial do animal), durante

os 30 min de hipertermia (campo ligado), e durante os primeiros 5 min após o campo magnético ter sido desligado.

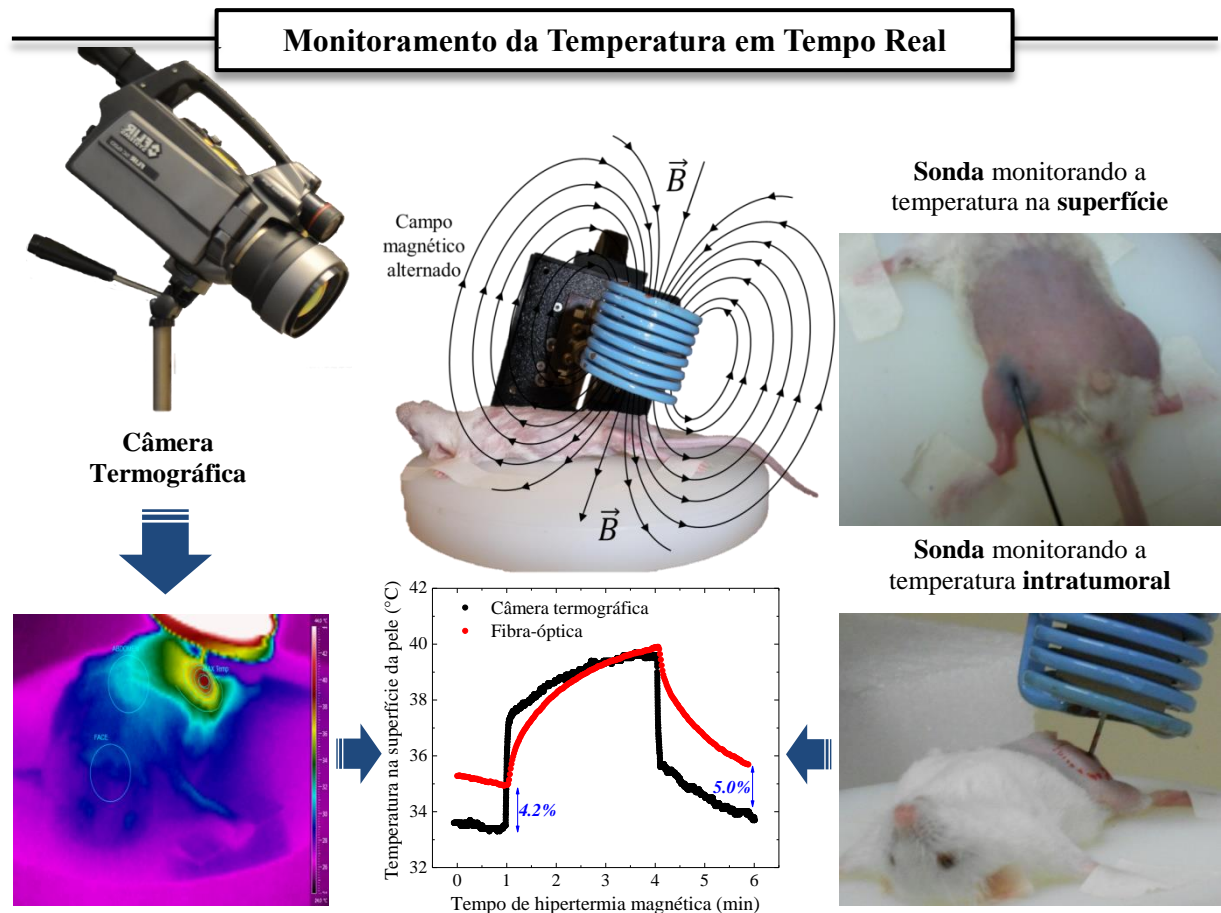


Figura 3.2 Procedimentos de monitoramento, em tempo real, da temperatura durante a HM com NPM: um conjunto de dados é obtido com o registro da câmera termográfica (via representada no lado esquerdo da figura) e o outro com a utilização de um termômetro de fibra-óptica (via representada no lado direito da figura).

Um conjunto de dados é obtido com o registro da câmera termográfica (via representada no lado esquerdo da Figura 3.2) e o outro com a utilização de um termômetro de fibra-óptica (via representada no lado direito da Figura 3.2). No que tange a utilização da fibra-óptica é preciso ressaltar que, primeiramente, nos animais #1 e #2 essa sonda foi fixada num ponto da superfície da pele na região da virilha desses camundongos (sem tumor); e, no caso dos animais #3 e #4, a sonda foi colocada num ponto da região de maior aquecimento da pele sobre o seu tumor subcutâneo. O valor de adquirido com a fibra-óptica foi comparado com a mesma medida feita pela câmera termográfica num ponto equivalente (identificado e marcado na imagem de infravermelho). Agora, para o animal #5 em que essa sonda foi introduzida em seu tumor a fim de medir a temperatura intratumoral, a temperatura superficial continuou sendo monitorada apenas com a câmera termográfica. Contudo, mesmo utilizando

o termômetro de fibra-óptica dentro do tumor do animal #5, apenas um ponto da variação tridimensional de temperatura pôde ser monitorado, o que implica numa informação subestimada do verdadeiro aquecimento intratumoral.

Ainda ao centro da Figura 3.2 apresentada anteriormente, também, é ilustrado um de nossos resultados (um gráfico) o qual indica uma diferença da ordem de 5,0 % entre o valor da temperatura superficial medido por infravermelho e com a fibra-óptica (no mesmo ponto sobre a pele). De fato, essa discrepância já era esperada devido à direção que a câmera fazia com a normal à superfície da pele do animal na região do tumor, formando um ângulo de $(60^\circ \pm 5^\circ)$ (veja o esquema na Figura 2.7, na seção 2.3). Esse fenômeno ocorre devido à variação da emissividade da pele do camundongo (detectada pela câmera) em função do comprimento de onda e da direção de aquisição da radiação de infravermelho emitida pela pele do animal. Posteriormente (no capítulo 4), serão discutidos outros resultados experimentais que nos permitiram avaliar corretamente (*in vivo*) a dependência do valor da temperatura superficial (medida com a câmera termográfica) em função do ângulo (θ) formado entre sua objetiva (direção de captura da radiação infravermelha) e a direção normal à superfície da pele do camundongo (num intervalo de $0^\circ \leq \theta \leq 60^\circ$). Cabe, aqui, ressaltar ao leitor que os valores de temperatura (adquiridos por infravermelho) apresentados nas tabelas e gráficos desta seção 3.3 já estão todos corrigidos.

A Figura 3.3 mostra algumas imagens termográficas do animal #1 (utilizado no 1º e 2º experimento com animais sem tumor) durante o procedimento de HM *in vivo*: primeiramente, antes de o camundongo receber a injeção de NPM em (A) (antes de o campo magnético ser ligado) e em (B) (depois de 3 min com o campo magnético ligado); segundo, após ele receber uma injeção subcutânea de NPM em (C) (antes de o campo magnético ser ligado) e em (D) (depois de 3 min com o campo magnético ligado).

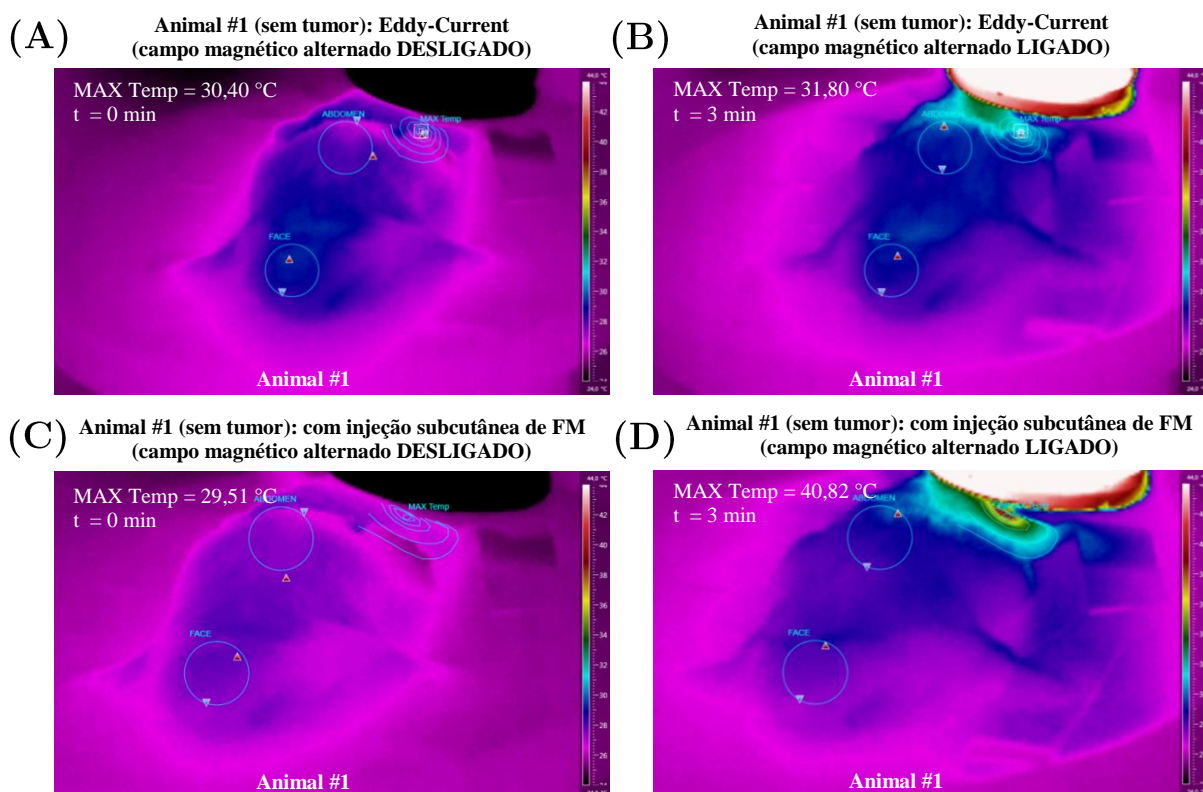


Figura 3.3 HM *in vivo*: [1º experimento] (A) Termografia do animal #1 (sem tumor) e sem injeção de FM, antes de o campo magnético alternado ser ligado. (B) animal #1 após 3 min de HM, o aquecimento nesse caso foi devido, apenas, ao efeito de eddy-currents. [2º experimento] (C) Termografia do animal #1 (sem tumor), após receber uma injeção subcutânea de 90 μ l de FM (2mg de NPM de MnFe_2O_4 - Citrato), antes de o campo magnético alternado ser ligado. (D) mesmo animal #1, agora, após 3 min de HM com NPM.

Nessas quatro termografias (Figura 3.3) são comparados (visualmente) resultados de dois experimentos. No primeiro deles ($n = 2$ animais) foi investigado o quão acurado é a capacidade de detecção com a câmera termográfica do aquecimento (não localizado) provocado na pele dos camundongos devido, apenas, ao efeito de correntes elétricas parasitas (*eddy-currents*) em animais saudáveis e sem injeção de FM. Já no segundo experimento, o animal #1 e o animal #2 (cujas imagens de infravermelho não são mostradas no texto), utilizados no procedimento anterior receberam uma injeção subcutânea de 90 μ l de FM (na região da virilha). Comparando as Figuras 3.3 (C) e (D), concluímos que a utilização da câmera termográfica (apenas por simples inspeção visual da imagem de infravermelho) permite identificar a variação de temperatura na superfície da pele dos camundongos, provocada pelo calor gerado com as nanopartículas magnéticas, e distingui-la do aquecimento ocorrido por *eddy-currents*. No 1º e no 2º experimento, o tempo de HM foi de apenas 3 min.

Também foram realizados outros dois experimentos de HM, agora, utilizando dois animais com S180 sólido e subcutâneo (animais #3 e #4): primeiramente, os animais #3

(volume tumoral igual a 491 mm^3) e #4 (volume tumoral igual a 470 mm^3) foram submetidos a 3 min de HM sem nanopartículas magnéticas (3º experimento na seção 3.2); na sequência receberam (cada um) uma injeção de $90 \mu\text{l}$ FM diretamente em seu tumor, então, cerca de 20 min após a injeção, foram submetidos a novos 3 min de HM com NPM (4º experimento na seção 3.2). A Figura 3.11 mostra um gráfico da variação no valor da temperatura média (ΔT) na superfície da pele (virilha) dos camundongos sadios (#1 e #2) e, também, sobre o tumor subcutâneo dos camundongos doentes (#3 e #4). É comparado o aquecimento ocasionado por eddy-currents (EC) com o aquecimento devido, também, às NPM resumizando os resultados obtidos com os quatro experimentos realizados: EC (Sadio) no 1º experimento; NPM (Sadio) no 2º experimento; EC (S180) no 3º experimento e NPM (S180) no 4º experimento.

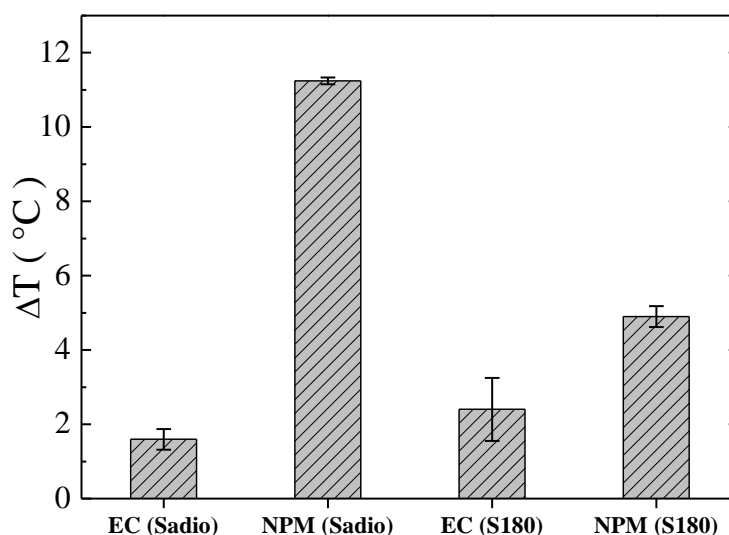


Figura 3.4 Elevação da temperatura (ΔT) da pele dos camundongos (em 3 min de HM) em diferentes casos investigados: (i) aquecimento devido, apenas, a eddy-currents em animais sadios (#1 e #2) – grupo EC (Sadio); (ii) aquecimento, também, devido às NPM em animais sadios (#1 e #2) – grupo NPM (Sadio); (iii) aquecimento devido, apenas, a eddy-currents em animais com S180 sólido e subcutâneo (#3 e #4) – grupo EC (S180); (iv) aquecimento, também, devido às NPM em animais com S180 sólido e subcutâneo (#3 e #4) – grupo NPM (S180).

Com o software de aquisição e análise de dados da câmera termográfica (FLIR ResearchIR®) é possível desenhar (numa imagem de infravermelho) múltiplos elementos geométricos de medida: tanto áreas (elementos fechados na forma de círculos, elipses e/ou retângulos) quanto linhas poligonais (abertas ou fechadas) de aquisição de valores de temperatura (máxima, mínima, média e até a subtração entre dois elementos) e monitorá-los em função do tempo simultaneamente. Nesta seção 3.3 são mostradas as termografias, apenas, do animal #1 (Figura 3.4 acima no texto) e do animal #5 (Figura 3.5 alguns parágrafos abaixo no texto). Contudo, em todas as imagens de infravermelho de todos os camundongos (do 1º ao

5º experimento), foram criados sempre os mesmos elementos de medida para monitorar as variações no valor da **temperatura média**, em diferentes regiões da pele dos animais: na face (ΔT_{FC}) e no abdômen (ΔT_{Ab}) dentro de uma área circular com 30 px de diâmetro; e na virilha/tumor subcutâneo (ΔT_{HR}), dentro de um pequeno círculo (com 5 px de diâmetro) concêntrico com a região mais aquecida da pele sobre o tumor (*hottest region*). Cada pixel da imagem de infravermelho tem dimensão quadrada igual a $(0,65 \times 0,65)$ mm² (vide seção 2.3), e os pixels dentro do elemento HR (52 px no total) registram os valores mais elevados de temperatura (mais vermelhos na escala de cores), correspondendo de 7% a 10% de todas as medidas realizadas (pixel a pixel) sobre o tumor subcutâneo dos camundongos⁸.

A Tabela 3.1 reporta para os animais de #1 até #4 as variações no valor da **temperatura média**, aferida apenas com a câmera termográfica, na superfície da pele desses camundongos.

⁸ Sobre a utilização desses elementos de medida (criados nas imagens de infravermelho) para monitoramento das variações de temperatura ocorridas na pele do camundongo sobre o tumor subcutâneo (devido ao calor gerado por HM com NPM). Uma análise bem mais elaborada será apresentada no final da tese (nas seções 5.4 e 5.5) na perspectiva de uma nova abordagem experimental, onde cada pixel da imagem termográfica será utilizado como um “termômetro”. O monitoramento da temperatura média somente dentro da área delimitada pelo elemento HR, ignora todo o perfil de temperatura superficial (na região do tumor subcutâneo) visto nas termografias: diferentes halos de mesma temperatura/cor concêntricos com a região de maior aquecimento. É, portanto, necessário que um critério seja estabelecido para a determinação de qual região (ou qual conjunto de pixels) na imagem termográfica da superfície da pele, contém a informação (quantitativa) mais fortemente correlacionada com o real aquecimento intratumoral. Nesse sentido, um tratamento estatístico será utilizado para buscarmos este critério e, portanto, o leitor interessado poderá antecipar essa discussão dirigindo-se ao capítulo 5.

Tabela 3.1 – Dados de monitoramento termográfico (do 1° até o 4° experimento) procedimentos de HM *in vivo* (com e sem NPM):

				Monitoramento termográfico da superfície da pele								
Identificação				Região mais quente sobre a virilha/tumor subcutâneo			Face			Abdômen		
Animal	Volume Tumoral	Tipo de HM	Tempo de HM	T_0 (°C)	T_F (°C)	ΔT_{HR} (°C)	T_0 (°C)	T_F (°C)	ΔT_{FC} (°C)	T_0 (°C)	T_F (°C)	ΔT_{Ab} (°C)
#1	sem tumor	EC	3 min	30,40	31,80	1,40	29,49	29,49	0,00	28,90	30,90	2,00
		NPM	3 min	29,51	40,82	11,31	28,70	28,80	0,10	28,40	29,90	1,50
#2	sem tumor	EC	3 min	30,78	32,57	1,79	29,70	30,20	0,50	30,20	31,90	0,80
		NPM	3 min	29,77	40,95	11,18	29,30	29,40	0,10	29,10	30,20	1,10
#3	491 mm ³	EC	3 min	32,30	34,10	1,80	29,60	30,10	0,50	31,10	32,30	1,20
		NPM	3 min	30,90	36,00	5,10	30,20	30,20	0,00	30,90	32,60	1,70
#4	470 mm ³	EC	3 min	31,70	33,70	3,00	30,40	31,00	0,60	31,50	33,00	1,50
		NPM	3 min	29,90	34,60	4,70	29,70	30,10	0,40	29,40	31,50	2,10

Um quinto experimento foi conduzido (5° experimento na seção 3.2), onde o animal #5 com S180 (volume tumoral igual a 983 mm³ no dia do experimento), também recebeu uma injeção de 90 µl de FM diretamente em seu tumor, e foi submetido ao procedimento de HM com NPM durante um tempo muito maior, igual a 30 min de aquecimento. Nesse experimento, diferentemente dos anteriores, a fibra-óptica foi introduzida no tumor (a 5,0 mm de profundidade) a fim de reportar o valor, ao menos num ponto, da temperatura intratumoral.

As quatro termografias apresentadas na Figura 3.5 de (A) até (D), a partir do instante inicial do procedimento em $t = 0$ min (campo magnético alternado desligado), mostram na sequência o aumento da temperatura da pele na região do tumor em função do tempo de HM (campo ligado). Já a Figura 3.5 (E), 1 min após o campo magnético ter sido desligado, mostra o resfriamento natural da pele do animal #5.

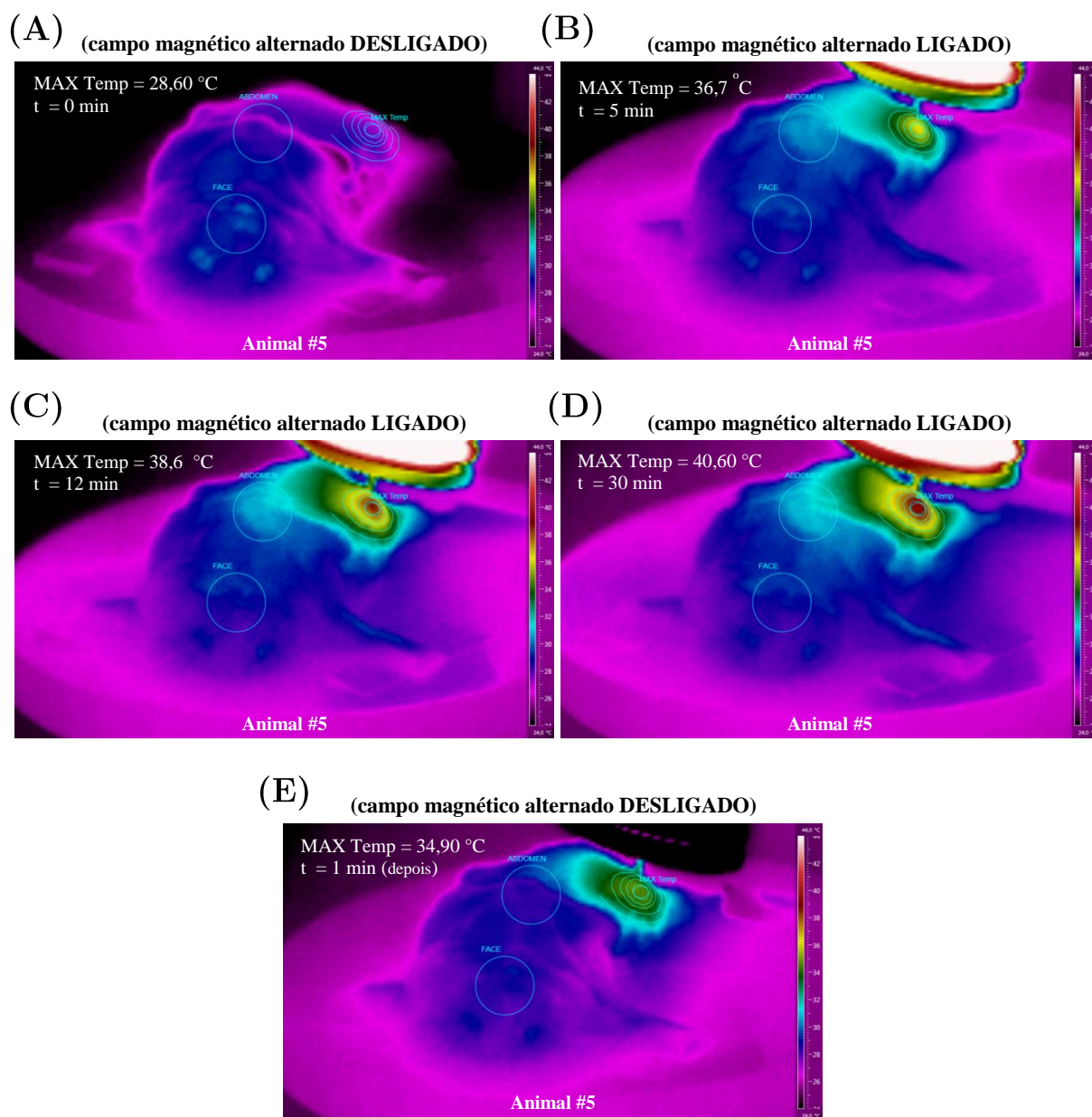


Figura 3.5 Experimento de HM *in vivo* com NPM: (A) animal #5 com S180 (subcutâneo e sólido) depois de receber uma injeção de 90 μ l de FM (2mg de NPM de MnFe_2O_4 - Citrato) antes do campo magnético alternado ser ligado (t = 0 min); respectivamente de (B) até (D) após 5 min, 12 min e 30 min de HM com NPM (campo ligado); (E) 1 min após o campo magnético ser desligado (resfriamento).

No gráfico da Figura 3.6 são mostradas as curvas de temperatura para o animal #5, em função do tempo de hipertermia, nas regiões da face, abdômen e região mais quente sobre o tumor subcutâneo (HR). Há, também, a informação da temperatura de um ponto (aproximadamente central) dentro do tumor monitorado com o termômetro de fibra-óptica.

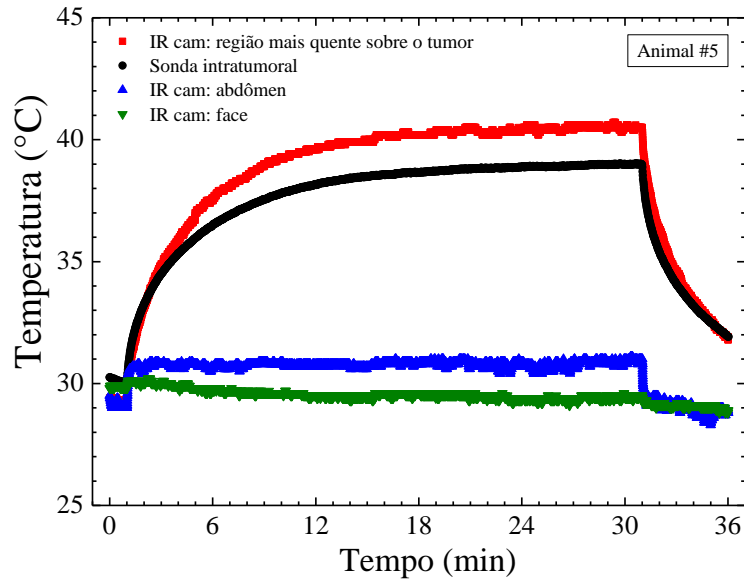


Figura 3.6 Temperatura do animal #5 (5° experimento) durante procedimento de HM com NPM (MnFe₂O₄ - Citrato): com a câmera termográfica (infrared camera – IR cam) foi monitorada a temperatura (média) superficial em diferentes regiões (áreas) sobre a pele do camundongo (região mais quente da pele sobre o tumor; na face e no abdômen). Já a fibra-óptica fornece uma medida pontual da temperatura dentro do tumor.

É possível observar no gráfico da Figura 3.6 (e também na Tabela 3.2 abaixo no texto) que o valor da temperatura inicial (antes de o campo magnético ser ligado), ou seja, T_0 aferido por infravermelho na região mais aquecida da pele sobre o tumor tinha um valor menor do que a temperatura intratumoral (fibra-óptica) no mesmo instante. Isto se deve, bastante, às trocas de calor que ocorrem continuamente na interface da pele do animal com o ambiente, principalmente, antes do acionamento bobina, uma vez que ela é refrigerada (mantida em 10 °C antes da corrente alternada ser estabelecida no indutor) e está distante apenas 10 mm da superfície da pele do camundongo.

Imediatamente após o campo magnético alternado ser ligado, vê-se um rápido aumento da temperatura intratumoral nos seis primeiros minutos de HM. E, em torno de quinze minutos, é atingido um regime quase estacionário. Curiosamente, o comportamento da temperatura superficial, na região do tumor, monitorado com a câmera termográfica é muito semelhante. Contudo, numa janela de tempo da ordem de 30 min, a temperatura na região mais aquecida da pele sobre o tumor é em torno de 1,5 °C maior que a temperatura de um ponto (aproximadamente central) dentro do tumor. Em outro experimento (vide capítulo 5), cuja temperatura intratumoral de outros quatro animais foi monitorada com maior precisão (com até três sondas introduzidas a 5 mm de profundidade sob a pele, em três pontos distintos ao longo do eixo maior do tumor de cada animal) verificou-se comportamento semelhante.

Em que a temperatura medida na superfície da pele sobre o tumor é aproximadamente igual à temperatura intratumoral, em pelo menos um dos pontos monitorados. Todavia, estes resultados experimentais serão completamente discutidos apenas na seção 5.5.

A Tabela 3.2, abaixo, sumariza todos os dados experimentais adquiridos no 5º experimento de HM *in vivo* com as NPM (MnFe₂O₄ - Citrato):

Tabela 3.2 – 5º experimento de HM *in vivo* com NPM: dados de monitoramento termográfico (superfície da pele) e temperatura intratumoral (num ponto).

Identificação				Monitoramento termográfico da superfície da pele									Temperatura Intratumoral		
				Região mais quente* sobre o tumor			Face			Abdômen					
Animal	Volume tumoral	Tipo de HM	Tempo de HM	T ₀ (°C)	T _F (°C)	ΔT _{HR} (°C)	T ₀ (°C)	T _F (°C)	ΔT _{FC} (°C)	T ₀ (°C)	T _F (°C)	ΔT _{AB} (°C)	T ₀ (°C)	T _F (°C)	ΔT _{In} (°C)
#5	983 mm ³	NPM	30 min	29,20	40,5	11,3	30,7	32,2	1,50	30,30	32,20	1,90	30,40	38,99	8,59

Logo após o fim do 5º experimento de HM, o animal #5 foi novamente anestesiado e sacrificado por deslocamento cervical. Foi feita a excisão do seu tumor e medidos os valores reais de seu eixo maior (*D*) e menor (*d*), então, foi calculado o seu volume *ex-vivo* (novamente utilizando fórmula $V = \frac{D \cdot d^2}{2}$) é interessante notar que, em geral, esses tumores apresentam um formato elipsoidal. A Tabela 3.3 é uma comparação entre os volumes calculados *in vivo* e *ex-vivo* do tumor do animal #5.

Tabela 3.3 – Medidas do tumor do animal #5: comparação dos dados *in vivo* e *ex-vivo*.

<i>In vivo</i>			<i>Ex vivo</i>			
Eixo maior (<i>D</i>) (mm)	Eixo menor (<i>d</i>) (mm)	Volume <i>in vivo</i> (mm ³)	Eixo maior (<i>D</i>) (mm)	Eixo menor (<i>d</i>) (mm)	Volume <i>ex vivo</i> (mm ³)	Massa do tumor (g)
18,90	10,20	983	20,21	11,54	1346	0,79

De acordo com a literatura, tumores sólidos de sarcomas de partes moles (vide seção 1.4) como é o caso do S180, crescem centrifugamente, com os tecidos normais adjacentes à lesão sendo comprimidos e, à medida que se atrofiam, contribuem para o aparecimento grosseiro da circunscrição [146]. A análise histopatológica do tumor sólido de sarcoma de partes moles revela que ele possui uma pseudocápsula bastante vascularizada (região quiescente), através da qual as células neoplásicas permeiam e infiltram os tecidos normais

adjacentes. Esse envelope tecidual fibroso (interface com os tecidos saudáveis) é uma região de reação inflamatória peritumoral e intensa diferenciação celular [146], [160]. No interior dessa falsa cápsula, a avaliação microscópica revela um arranjo nodular das células neoplásicas com degeneração central e necrose [129]. De fato, quando esse tipo de carcinoma já está em estágio bem desenvolvido, essa região central necrosada corresponde a um percentual $> 15\%$ da massa tumoral total [146], [160].

A Figura 3.7 mostra imagens *ex vivo* do animal #5 utilizado no quinto experimento, onde na Figura 3.7 (A) os três pontos escuros que correspondem, exatamente, às três posições ao longo do maior eixo do tumor onde foram feitas as injeções de FM (30 μ l cada) antes da sessão de 30 min de HM. Após excisão, o tumor desse animal foi avaliado apenas macroscopicamente (não foi coletado nenhum material para estudo histopatológico) e, conforme mostrado na Figura 3.7 (C), aparentemente as nanopartículas ocupam grande parte do interior da falsa cápsula do tumor (região escura “manchada” pelo fluido magnético injetado intratumoralmente). Contudo, apenas essa simples inspeção visual não permite inferir muito sobre a distribuição dessas nanopartícula no volume tumoral, a não ser que ela se dá de maneira não uniforme também sendo visualizado fluido magnético na superfície do tumor (próximo ao local onde foram realizadas as três injeções).

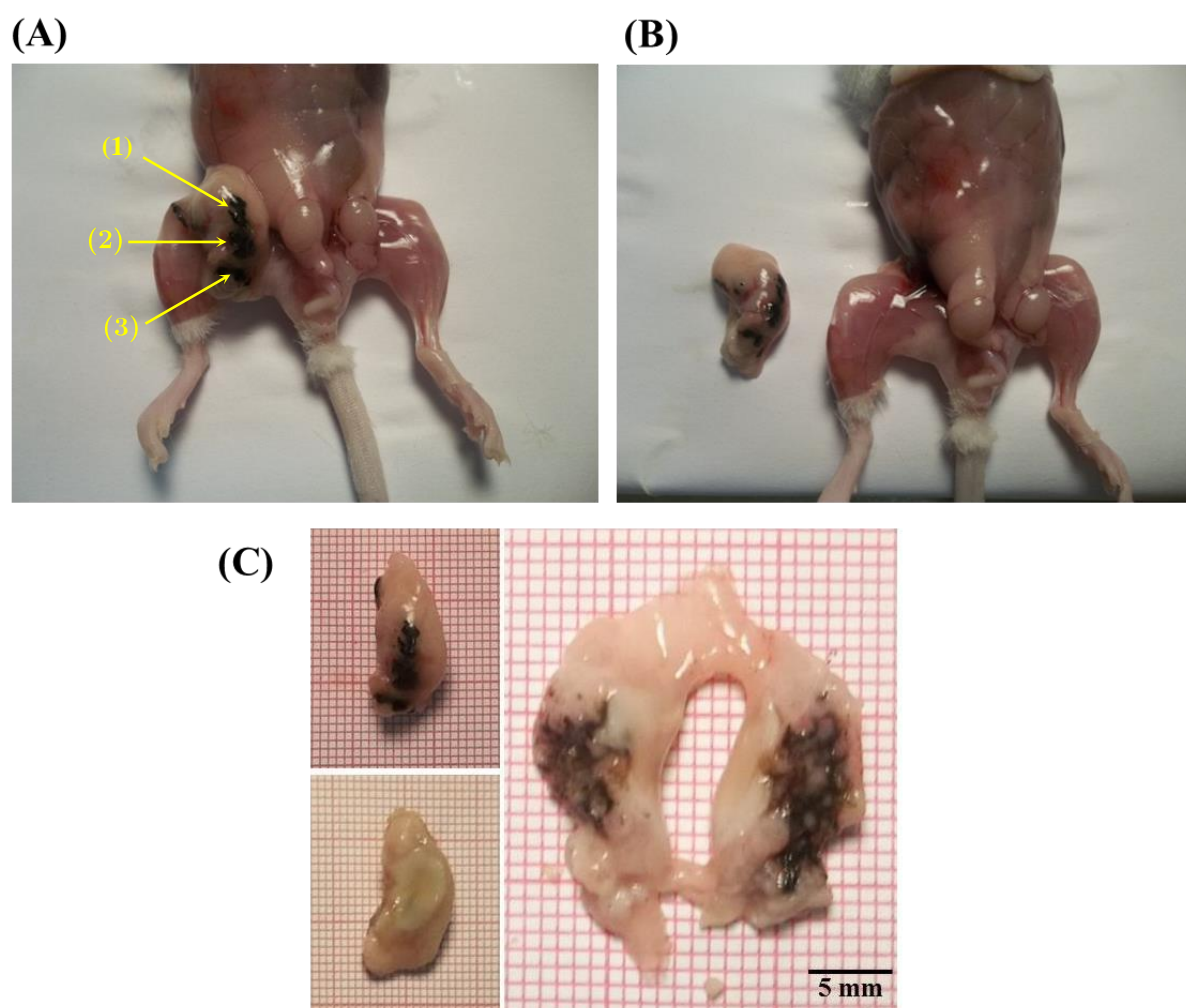


Figura 3.7 (A) Imagem *ex vivo* do camundongo utilizado no 5º experimento mostrando seu tumor S180 antes da excisão, note também as posições (1), (2) e (3) onde foram feitas as injeções de NPM (ao longo do eixo maior do tumor). (B) Tumor depois de feita a excisão. (C) Imagens do tumor depois da excisão mostrando, macroscopicamente, a distribuição do FM dentro do tumor.

O cálculo exato da quantidade de calor entregue volumetricamente no tumor (durante um procedimento de HM) demandaria além da determinação experimental do SLP *in vivo*, o conhecimento preciso da localização das fontes de calor dentro do tumor, ou seja, o mapeamento tridimensional do volume ocupado pelas NPM de MnFe_2O_4 – Citrato. Esse é um problema central na utilização da técnica de HM com NPM para o tratamento de neoplasias objetivando sua aplicação na clínica médica: a determinação precisa (e em tempo real) da dose térmica entregue volumetricamente [41].

No que diz respeito aos fenômenos que envolvem a geração e transferência de calor em tecidos biológicos vivos, há dois principais: a geração celular de calor metabólico e a troca de calor entre o sangue em escoamento e o tecido circundante [161]. 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 muscular [162]. Parte de seus objetivos 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 de escoamento de sangue por m^3 de tecido) pela diferença entre a temperatura do sangue arterial (T_b) e a temperatura local dos tecidos (T) [163]:

$$\dot{Q}_p = \rho_b c_b \omega_b (T_b - T) \quad (3.5)$$

No SI [\dot{Q}_p] = W, e os parâmetros ρ_b e c_b são respectivamente a massa específica (ou densidade) (kg/m^3) e o calor específico do sangue ($\text{J}/\text{kg}\cdot^\circ\text{C}$). 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 [162], [163] (eq. 3.6), que modela a taxa temporal de variação da temperatura num meio biológico:

$$\rho_n c_n \frac{\partial T_n}{\partial t} = \vec{\nabla} \cdot (\kappa_n \vec{\nabla} T_n) + \rho_b c_b \omega_b (T_b - T_n) + \dot{Q}_{met} + \dot{Q}_{hist} \quad (3.6)$$

No contexto em que a eq. 3.6 será utilizada nessa tese de doutorado, o subíndice (n) faz diferença entre os tecidos em consideração (tumor ou tecidos normais) enquanto que ρ_n , c_n , κ_n são, respectivamente, a massa específica do tecido, o calor específico e sua condutividade térmica. O primeiro termo no lado direito da eq. 3.6 representa a difusão de calor no meio (lei de Fick) e o último (\dot{Q}_{hist}) denota a potência térmica volumétrica dissipada pelas NPM interagindo com um campo magnético externo alternado (mecanismo de perda

histerética) (vide definição nos Apêndices B.2 e B.3). Obviamente, esse último termo deve ser considerado apenas no tumor (que em nossos experimentos recebe injeções de FM) [164].

A Figura 3.8 (A) (abaixo no texto) mostra outra imagem termográfica do animal #5, agora, focada somente na região do seu tumor (região de interesse) após 30 min de HM com NPM. É fácil observar que, além da existência de uma pequena área central mais aquecida ($40,5^{\circ}\text{C}$), há também a formação de regiões de mesma temperatura (mesma cor na imagem de infravermelho), ou seja, isothermas na forma de halos quase concêntricos em relação à região mais quente dessa superfície, e cuja temperatura diminui afastando-se ao longo de uma direção radial. Para monitorar esse gradiente de temperatura, foram construídos elementos de análise na forma de linhas poligonais, a fim de medir a **temperatura média** ao longo de caminhos com temperatura aproximadamente constante. O gráfico da Figura 3.8 (B) mostra a dependência temporal desse perfil de aquecimento, detectado na pele do animal sobre o seu tumor, e é interessante notar que após 11 min de HM esse perfil de temperaturas atinge um regime quase estacionário. O gráfico dessas “isothermas” – elementos de medida denotados por IT_1 até IT_5 na Figura 3.8 (A) – é gerado a partir dos dados adquiridos, somente, com a câmera termográfica.

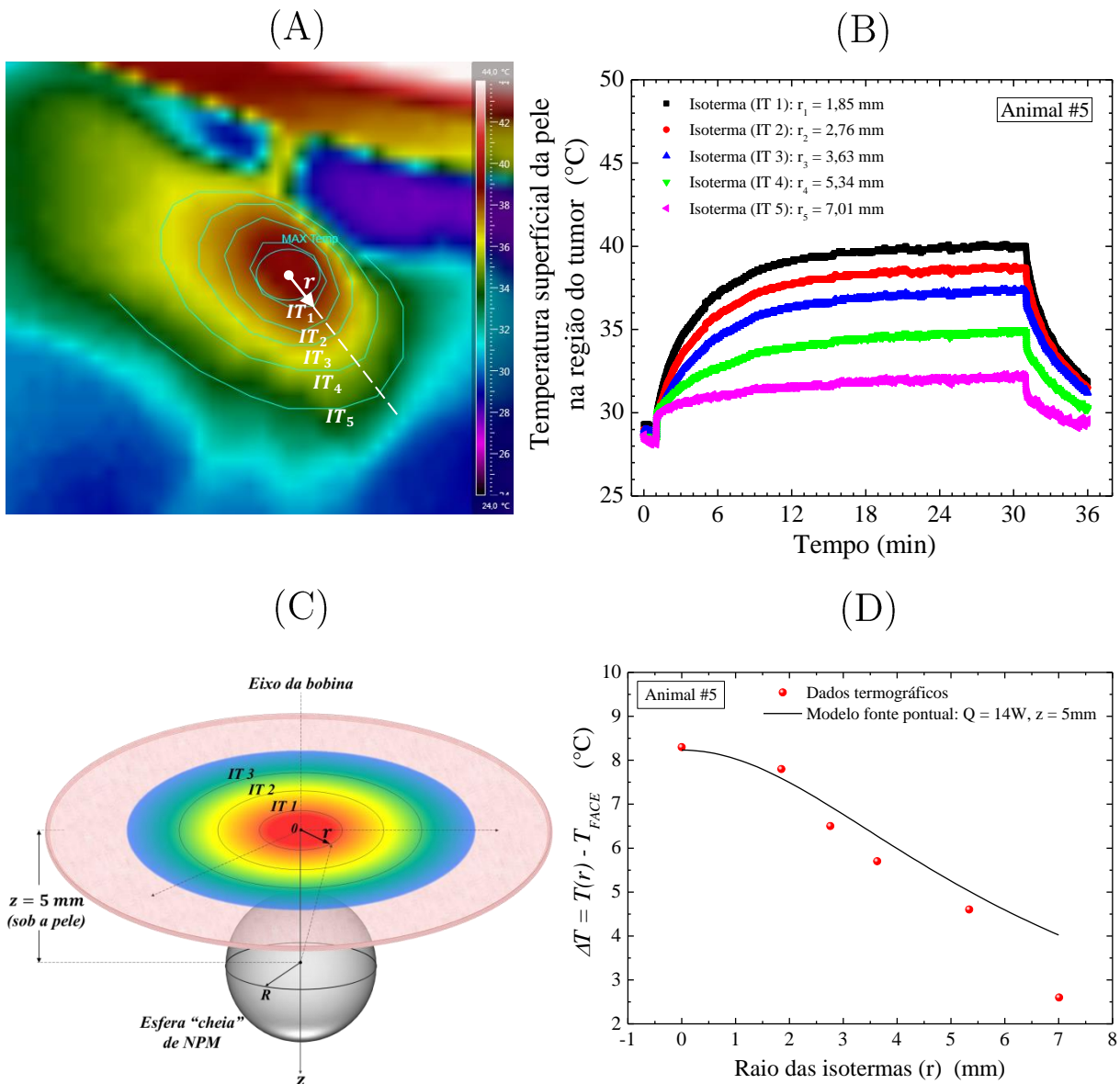


Figura 3.8 Modelagem analítica da entrega de calor intratumoral: (A) na termografia do tumor (sólido e subcutâneo), depois de 30 min de HM, é possível identificar halos isotérmicos (concêntricos com a região de máximo aquecimento); (B) temperatura ao longo das isothermas; (C) idealização do volume esférico ocupado pelas NPM ($MnFe_2O_4$ - Citrato) dentro tumor; (D) (i) (pontos ●) diferença entre a temperatura sobre cada “isoterma” $T(r)$ e num ponto distante sobre a pele do animal T_{FACE} (após 30 min de HM); (ii) (linha sólida) é uma curva teórica calculada para o modelo simplificado de uma fonte pontual de calor (constante no tempo) dentro do tumor.

De fato, estamos supondo que (dentro do tumor) as NPM de $MnFe_2O_4$ – Citrato estão concentradas homogeneamente num volume esférico (com raio estimado em 4,5 mm). E tal aproximação levou em consideração a profundidade de 5 mm em que é feita a injeção de FM (supondo a espessura da pele da ordem de 0,5 mm) e as observações feitas do tumor *ex vivo* (vide Figura 3.7). Logo, a Figura 3.8 (C) é uma representação esquemática dessa idealização, onde é denotado por r o raio de cada “isoterma” na superfície da pele do camundongo, e o

valor $r = 0$ corresponde ao ponto central da região de máxima temperatura. O centro da região mais aquecida na superfície da pele sobre o tumor foi escolhido como a origem do sistema de coordenadas, e a distância entre essa origem e o centro do volume esférico de FM (dentro do tumor) foi estimada em $z = 5$ mm. Já na Figura 3.8 (D) é apresentado um gráfico com o valor experimental (pontos ●) da diferença entre a temperatura medida sobre cada “isoterma” $T(r)$ e um ponto distante sobre a pele do animal T_{face} (temperatura na face do animal, suposta inalterada pelo aquecimento produzido no tumor e nos tecidos vizinhos devido às NPM). Essa diferença ($\Delta T_{exp} = T(r) - T_{face}$) é calculada como função da distância (r) do perímetro de cada “isoterma” ao centro da região de máximo aquecimento da pele sobre o tumor. O valor de r foi estimado (em escala real) diretamente na termografia utilizando o software Digimizer[®] para análise dessa imagem.

Na tentativa de obtermos algum conhecimento (em nossos experimentos) da relação entre a temperatura medida na superfície da pele do camundongo (imageamento por infravermelho) e seu valor (fibra-óptica) no interior do tumor sólido e subcutâneo durante HM com NPM. Buscamos, primeiramente, uma abordagem matemática simples utilizando uma solução analítica da equação de biocalor de Pennes (eq. 3.6) no regime estacionário (ou seja, quando $\partial T_n / \partial t = 0$), onde a distribuição volumétrica intratumoral das NPM é idealizada como uma fonte pontual de calor (dentro do tumor) e com potência térmica (\dot{Q}) constante no tempo. Trata-se de um resultado proposto por Gescheit *et al.* em 2009 [165] (eq. 3.7 abaixo no texto), onde foram impostas as seguintes condições: **(i)** tanto o tecido que constitui o tumor (suposto sólido) quanto o meio em torno dele (suposto semi-infinito) são homogêneos, isotrópicos e com as mesmas propriedades físicas constantes (densidade ρ , calor específico c e condutividade térmica κ); **(ii)** as dimensões do tumor são muito pequenas comparativamente à sua profundidade abaixo da superfície da pele; **(iii)** a taxa de perfusão sanguínea é considerada nula ($\omega_b = 0$); **(iv)** a potência térmica devida ao calor metabólico é desprezível comparativamente à taxa de geração de calor por histerese ($\dot{Q}_{hist} \gg \dot{Q}_{met} \Leftrightarrow \dot{Q}_{hist} \cong \dot{Q}$); **(v)** considera-se que o valor da condutância térmica efetiva (E) na superfície da pele (interface com o meio externo) (dada em $W/m^2 \cdot ^\circ C$ no SI) engloba todas as possíveis trocas de calor devido a convecção, radiação e processos evaporativos, tal que $E = (E_{conv} + E_{rad} + E_{evap})$ (condições de contorno newtonianas [166], [167] e [168]). Abaixo, a Figura 3.9 é um esquema representando em coordenadas cilíndricas esse problema de condução térmica:

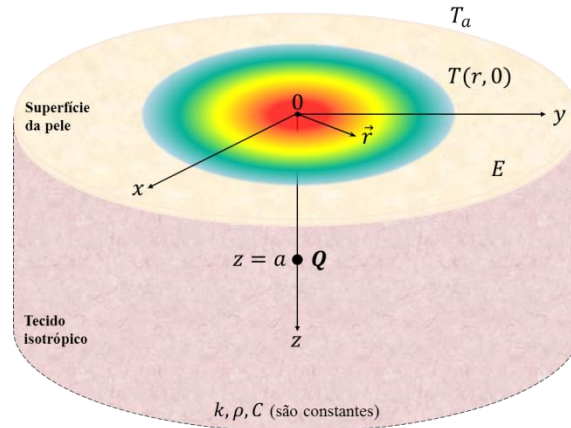


Figura 3.9 Problema de uma fonte pontual (subcutânea) de calor \dot{Q} com potência constante localizada na profundidade $z = a$; o meio (tumor/tecido) é homogêneo e isotrópico com propriedades físicas constantes (densidade ρ , calor específico c e condutividade térmica κ). T_a é a temperatura ambiente; $T(r, 0)$ é a temperatura na superfície da pele (em $z = 0$) em função da distância r medida em relação ao centro da região de máximo aquecimento da pele sobre o tumor (origem do sistema de coordenadas);

Portanto, a linha sólida no gráfico da Figura 3.8 (D) (acima no texto) é a curva teórica que melhor se ajusta aos dados experimentais ($\Delta T_{exp} = T(r) - T_{face}$), isto segundo a eq. 3.7 abaixo (solução da eq.3.6 obtida por Gescheit *et al.* Em 2009) [165], [166]:

$$\Delta T = T(r, 0) - T(r \rightarrow \infty, 0) = \frac{\dot{Q}}{2\pi} \int_0^{\infty} \frac{e^{-\lambda a} \lambda J_0(\lambda r)}{E + \kappa \lambda} d\lambda \quad (3.7)$$

A integral da eq.3.7 foi resolvida numericamente utilizando o Maplesoft® sem a indicação específica de um método de solução numérica, o que significa que a rotina do software utiliza mais de uma técnica e, havendo singularidades na função em seu intervalo de integração, então o eixo λ é dividido em subintervalos e a integração é realizada utilizando o método de quadratura Gaussiana [166], [169]. Onde: $T(r \rightarrow \infty, 0) = T_{Face} = 32,20$ °C (região longe o suficiente da região tumoral para que a temperatura seja suposta inalterada pelo calor gerado pelas NPM) e $T(r \rightarrow \infty, 0) > T_a$ (temperatura ambiente); $E = 12,5$ W/m².°C; $\kappa = 0,4$ W/m.°C [165]. $J_0(\lambda r)$ é a função de Bessel de ordem zero em coordenadas cilíndricas [170, p. 488] e para uma fonte pontual de calor, na posição subcutânea $a = z = 5,0$ mm, o valor de potência térmica constante $\dot{Q} = 0,14$ W fornece o melhor ajuste teórico (possível com a eq.3.7) para os valores de ΔT_{exp} *in vivo* na superfície da pele do camundongo.

Já a potência térmica dissipada pelas NPM de MnFe_2O_4 – Citrato por unidade de massa de material magnético, ou seja, o SLP calculado nesse procedimento (uma estimativa teórica *in vivo*) foi igual a (eq. 3.8):

$$SLP = \frac{0,14 \text{ W}}{2 \text{ mg}} = 70 \text{ W/g} \quad (3.8)$$

onde a massa de nanopartículas dentro do tumor é, aproximadamente, igual a 2 mg (*i.e.* todas as NPM injetadas).

Agora, para que também pudéssemos estimar teoricamente o aumento da temperatura intratumoral (ΔT_{tumor}) com base nos dados experimentais de temperatura superficial (ΔT_{exp}) (registro por infravermelho) e, também, utilizando o valor teórico de $\dot{Q} = 0,14 \text{ W}$. Foi feita outra idealização, onde o volume ocupado pelas NPM dentro do tumor corresponde a uma esfera (com raio igual a 4,5 mm e volume $0,38 \text{ cm}^3$) com densidade homogênea. E, para o cálculo da variação de temperatura dentro do tumor, foi utilizado um resultado (equações 3.9 e 3.10) proposto por W. Andrä *et al.* [171] que permite calcular a distribuição da temperatura (em função do tempo) no espaço em torno de uma pequena fonte de calor esférica num procedimento de HM com NPM: novamente sob a imposição que tanto o tecido que constitui o tumor (suposto sólido) quanto o meio em torno dele (agora suposto infinito) são homogêneos, isotrópicos e com as mesmas propriedades físicas constantes (densidade ρ , calor específico c e condutividade térmica κ). Nesse contexto, a taxa volumétrica de geração de calor por histerese (\dot{Q}_{hist}), ou potência térmica magnética por unidade de volume, foi calculada como:

$$\dot{Q}_{hist} = \frac{\dot{Q}}{V_{mag}} = \frac{0,14 \text{ W}}{0,38 \text{ cm}^3} \cong 0,37 \text{ W/cm}^3 \quad (3.9)$$

Com esse último resultado é possível calcular teoricamente o aumento de temperatura dentro do tumor (*in vivo*) num ponto aproximadamente central (estimado em 5 mm sob a pele), após 30 min de aquecimento, como sendo igual a (eq. 3.10) [171]:

$$\Delta T_{tumor} = \frac{\dot{Q}_{Hist} R_{mag}^2}{2k} = \frac{0,37 \text{ W/cm}^3 \cdot (4,5 \text{ mm})^2}{2 \cdot 0,4 \text{ W/m} \cdot \text{°C}} \cong 9,36 \text{ °C} \quad (3.10)$$

Enquanto que o valor verificado experimentalmente com a fibra-óptica em um ponto (aproximadamente central) dentro do tumor foi $\Delta T_{tumor}^{exp} = 8,59 \text{ °C}$ (vide Tabela 3.3, acima no texto), uma diferença percentual relativa igual a 9%.

Note-se que a máxima temperatura registrada (num ponto aproximadamente central) dentro do tumor foi igual a $38,99 \text{ °C}$ (Tabela 3.3). Obviamente que, para propósitos terapêuticos, a temperatura dentro do tumor precisa ser mantida acima de 43 °C e por um intervalo de tempo da ordem de 20–30 min [28], [41]. Contudo os resultados experimentais que serão apresentados nos capítulos 4 e 5 – utilizando outra bobina ($f = 300 \text{ kHz}$, $B = 220 \text{ G}$) e outra NPM (MnFe_2O_4 – DMSA) – mostrarão que em nosso laboratório, devido a expertise adquirida com a realização desses primeiros experimentos (relatados nesse capítulo 3) e a evolução de nossa compreensão do problema (o que culminou na proposição de uma segunda configuração experimental mais adequada e uma metodologia mais eficiente), agora, durante a hipertermia *in vivo* conseguimos acessar e manter (por mais de 20 min) temperaturas na superfície da pele (sobre o tumor subcutâneo) da ordem 44 – 53 °C em todos animais. E naqueles que, também, tiveram sua temperatura intratumoral monitorada por uma (ou até três sondas em pontos distintos) o valor medido sempre foi da ordem de 42 – 56 °C .

Na sequência, o capítulo 4 discutirá os resultados experimentais obtidos que permitirão avaliar, quantitativamente, o erro na medida da temperatura com a câmera termográfica, caso sua objetiva não esteja direcionada perpendicularmente à superfície da pele dos animais durante o procedimento de HM com NPM. Mais do que isso, esses resultados validarão uma metodologia experimental que permitirá monitorar a temperatura da superfície da pele dos camundongos de maneira muito mais acurada do que o apresentado até agora.

4 Determinação precisa da entrega de calor durante hipertermia magnética *in vivo* utilizando termografia por infravermelho.

4.1 Introdução

Grande o número de nanoestruturas que podem gerar calor por interação com campos eletromagnéticos e este fenômeno pode ser utilizado para liberação controlada de fármacos [172], ativação de resposta imunológica [173] e tratamento de neoplasias [174]. Dois exemplos desse tipo de estratégia são a terapia fototérmica e a hipertermia magnética com nanopartículas magnéticas [14], [174]–[178]. No Apêndice B.3 estão demonstrados os mecanismos físicos de geração de calor devido à interação entre os momentos magnéticos das nanopartículas magnéticas e a ação externa de campos magnéticos alternados. E como os resultados clínicos da literatura estão sempre correlacionados ao histórico de exposição térmica das células neoplásicas (temperatura e tempo de aquecimento), a precisão na determinação de limiares de danos térmicos biológicos depende, diretamente, da precisão no monitoramento da temperatura. Recentemente, muitos estudos pré-clínicos têm relatado a utilização da termografia por infravermelho para o monitoramento da temperatura durante hipertermia [14], [175]–[178].

A termografia é uma técnica diagnóstica precisa, quantificável e sem contato, usada para visualizar (numa imagem bidimensional em escala codificada por cores) as mudanças ocorridas na temperatura de uma superfície (qualquer) usando câmeras de infravermelho. É uma modalidade não invasiva com promissoras aplicações biomédicas, a qual já tem sido utilizada na detecção precoce de tumores de mama [126] e melanoma [127] evitando biópsias desnecessárias. É, também, utilizada em alguns procedimentos cirúrgicos (imagem térmico intraoperativo), e.g. para determinar margens de segurança na excisão de tumores do cérebro, auxiliar na identificação do córtex sensorio-motor, ou ainda, monitorar a viabilidade do tubo gástrico durante uma esofagectomia [179]–[182]. Contudo, essa metodologia precisa ser adequadamente empregada ou pode resultar em erros grosseiros na determinação da temperatura de uma superfície/região de interesse, ou mesmo diagnósticos falso positivo ou falso negativo (e.g. equívoco na distinção entre o calor gerado por uma lesão pré-cancerosa ou cancerosa, e o aquecimento devido ao calor metabólico dos tecidos saudáveis em torno do tumor,

e às trocas de calor devida à vascularização superficial e também profunda)[127]. E, principalmente, tratando-se de superfícies curvas, a precisão na determinação de sua temperatura aparente é fortemente dependente do ângulo (θ) formado entre a direção da objetiva do sistema de aquisição de imagens termográficas e a direção normal à superfície imageada, devida a dependência espectral e direcional da emissividade térmica conforme demonstrado por Watmough *et. al.* [154]. Por outro lado, Clark, J. A. indicou que o erro na determinação da temperatura aparente de uma superfície curva, além dos efeitos de emissividade, também é fortemente dependente da diferença entre a temperatura da superfície e a temperatura ambiente [183]. Essas duas modelagens matemáticas diferentes (propostas por Watmough e Clark) têm sido utilizadas em importantes trabalhos da literatura que sugerem boas práticas no monitoramento via termografia da temperatura superficial de animais em experimentos *in vivo* [184].

Nos resultados experimentais *in vivo* que serão apresentados e discutidos nesse capítulo 4, indicaremos como deve ser a utilização de uma câmera termográfica, para monitorar o aquecimento de tumores (S180) sólidos e subcutâneos por HM com NPM, e conseguir determinar sua temperatura superficial com um erro $\sim 0,5$ °C. Entretanto, deve-se ter em mente que (na metodologia apresentada) as imagens termográficas são de fato relevantes, apenas, no tratamento de tumores superficiais. Para um monitoramento da temperatura (durante HM) de tecidos mais profundos e, preferencialmente, de maneira não invasiva outras modalidades poderiam ser empregadas/desenvolvidas *e.g.* o imageamento por ressonância magnética (IRM) que, na clínica médica atual é a modalidade de eleição para o monitoramento não invasivo da temperatura em tecidos vivos [51], [185], mas cuja utilização durante um procedimento de HM com NPM ainda é impossível (devido o forte campo estático do magneto permanente do equipamento de IRM impedir a geração de calor por perda histerética com NPM, ao menos com a tecnologia de hoje) [64], [87]. A utilização de nanopartículas que, de acordo com a capacidade de penetração de determinados comprimentos de onda da luz em tecidos biológicos, possam ser opticamente excitadas comportando-se como nanotermômetros ópticos [186]. Ou ainda, ao contrário das limitações inerentes a uma estratégia óptica, e devida à alta capacidade de penetração do campo magnético em tecidos biológicos e relativa facilidade de detecção de sondas com sinal magnético. É, portanto, promissora a utilização de NPM que além de fontes de calor para HM poderiam, também, ser usadas como nanotermômetros magnéticos, uma vez que mudanças em suas propriedades magnéticas que são temperatura-dependentes (*e.g.* magnetização e

susceptibilidade magnética) estariam associadas às mudanças na temperatura do tecido tumoral [187], [188]. Contudo, ainda não existem resultados experimentais *in vivo* comprovando, efetivamente, a validade e aplicabilidade do conceito de nanotermometria magnética.

4.2 Protocolo experimental

Todo o procedimento experimental descrito a seguir foi revisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (pareceres consubstanciados nº 039/2012 nº 098/2014) (vide Apêndice D).

Para os resultados que serão apresentados e discutidos na seção 4.3 foram utilizados apenas dois animais ($n = 2$), camundongos *Swiss* albinos machos, idade entre 6–8 semanas: animal #1 (massa corporal 40 g) e animal #2 (massa corporal 38 g) ambos com S180 sólido e subcutâneo na região da virilha direita e cujos volumes tumorais no dia do tratamento por HM eram, respectivamente, iguais a 751 mm^3 e 560 mm^3 . Cada animal foi submetido a 5 sessões de HM com NPM de MnFe_2O_4 – DMSA (com diâmetro igual a $(15 \pm 3) \text{ nm}$ e $\text{SLP}_{in vitro} = 126,2 \text{ W/g}$), com duração de 30 min cada e intervalos de 20 min entre cada procedimento (um total de 150 min de hipertermia). A primeira sessão de HM de cada camundongo ocorreu logo após os animais receberem (e apenas na primeira sessão) a injeção diretamente em seu tumor de $90 \mu\text{l}$ do FM (correspondendo a uma massa de 2,3 mg de NPM injetada). Esse volume foi fracionado em três injeções de $30 \mu\text{l}$ cada, feitas a 5 mm de profundidade abaixo da pele do animal em três posições ao longo do eixo maior do tumor, a fim de obter uma melhor distribuição intratumoral das NPM.

A indução do tumor murino de sarcoma e manipulação do animal durante os experimentos (e.g. sedação); os cuidados com a manutenção desses camundongos no biotério (acomodação, alimentação e ciclo diurno-noturno); assim como seu monitoramento diário (consumo de ração seca, água, produção de excretas, massa corporal e tamanho do volume tumoral), tudo foi feito de acordo os protocolos já anteriormente descritos no capítulo 2 (vide seção 2.2).

O objetivo desse experimento ao variarmos a posição angular da câmera termográfica foi investigar o quão acurado (ou não) são as imagens de infravermelho na identificação do aquecimento tumoral por HM com NPM (detectado pela variação da temperatura na superfície da pele), isto em função do ângulo (θ) formado entre a direção da objetiva da câmera e a direção normal à superfície da pele do camundongo na região do tumor (vide Figura 2.11, na seção 2.4).

As cobaias foram mantidas sedadas durante todos os cinco procedimentos e, posicionadas entre o par de bobinas circulares, de maneira que seu tumor permaneceu localizado numa região cuja intensidade de campo magnético alternado é aproximadamente igual a 220 G (17,5 kA/m) (valor rms) (vide Figura 2.10, na seção 2.4).

O monitoramento da temperatura foi feito de duas maneiras:

– Termômetros de Fibra-óptica: uma primeira fibra-óptica foi colocada num ponto da superfície da pele do animal na região mais aquecida da pele sobre o tumor subcutâneo (temperatura controle); e uma segunda fibra-óptica foi introduzida no reto do animal (registro da temperatura basal).

– Câmera termográfica: temperatura na superfície da pele em diferentes regiões (tumor, abdômen e face).

Em todos os sensores a temperatura foi monitorada, inicialmente, por durante 1 min antes de o campo magnético ser ligado (temperatura inicial do animal), durante os 30 min de aquecimento por HM com NPM (campo ligado), e durante os primeiros 5 min após desligado o campo magnético alternado.

Após a realização das cinco sessões de HM com NPM, o tamanho dos tumores dos animais (eixo maior e eixo menor) foi monitorado diariamente com um paquímetro digital (imprecisão de $\pm 0,05$ mm), sendo que o animal #2 foi seguido por um total de 49 dias, tendo seu volume tumoral monitorado (*in vivo*) diariamente. Após esse tempo e ao atingir um volume tumoral igual a 1807 mm^3 , então, de acordo com a recomendação da CEUA da UFG (vide seção 2.2), antes que o volume de seu tumor atingisse o valor limite igual a 2000 mm^3 , o camundongo foi anestesiado com uma solução de 0,2 ml/100g de Ketamina (100 mg/ml) e Xilazina (100 mg/ml) e sacrificado por deslocamento cervical.

Em particular, o animal #1 utilizado nesse experimento (após a realização das cinco sessões) foi seguido por mais de 170 dias e apresentou remissão tumoral completa – resultado que será profundamente discutido nas seções 5.3, 5.4 e 5.5, num contexto completamente diferente do abordado nesse capítulo 4, onde será estudado o efeito cumulativo da entrega de calor na observação de remissão tumoral total em tumor murino de sarcoma 180.

4.3 Análise e discussão dos resultados experimentais

Inicialmente, foi determinada a resposta *in vitro* das NPM de MnFe_2O_4 – DMSA ao campo magnético alternado. Um eppendorf contendo a mesma quantidade de 90 μl de FM que é injetada no camundongo para realização dos experimentos *in vivo* foi posicionado no espaço entre as duas bobinas paralelas, na mesma região ocupada pelo tumor do animal quando da realização da HM *in vivo*. Então, na mesma condição de operação dos experimentos *in vivo*, foi estabelecida na bobina uma corrente elétrica alternada $i = 350$ A com frequência $f = 300$ kHz gerando um campo magnético $B \approx 220$ G (17,5 kA/m) (valor rms) no ponto onde a amostra está localizada (vide Figura 2.10, na seção 2.4). O gráfico da Figura 4.1 mostra o aquecimento do volume de FM dentro do eppendorf em função do tempo, o monitoramento da temperatura foi feito com um termômetro de fibra-óptica mergulhado no fluido: inicialmente por 10 seg com o campo magnético desligado (temperatura inicial); durante os 30 seg de aquecimento (campo ligado); e nos primeiros 20 seg após o desligamento do campo alternado. O SLP *in vitro* calculado para essa amostra foi igual a 126,2 W/g, utilizando novamente a eq. 3.2 (vide seção 3.3) e os resultados experimentais de sua caracterização magnética por MAV (vide seção 2.1.2, no capítulo 2). Esse valor é consideravelmente alto para um campo magnético alternado de baixa intensidade, ou seja, o produto $Hf = 5,27 \times 10^9$ A/m.s ainda está dentro do limiar de segurança ($\cong 5,37 \times 10^9$ A/m.s) para realização de HM *in vivo* sem que haja um depósito significativo de calor de forma não específica por *eddy currents* (vide discussão nas páginas 94 e 95 da seção 3.3). E, devido ao tamanho das NPM ($15,0 \pm 3,0$) nm e sua baixa anisotropia magnética (o caroço de MnFe_2O_4 é um material magnetomacio), o mecanismo de dissipação térmica é atribuído ao fenômeno de histerese dinâmica de sua magnetização mediada pela relaxação de Néel [14]–[17] (vide eq. B.8 no Apêndice B.1).

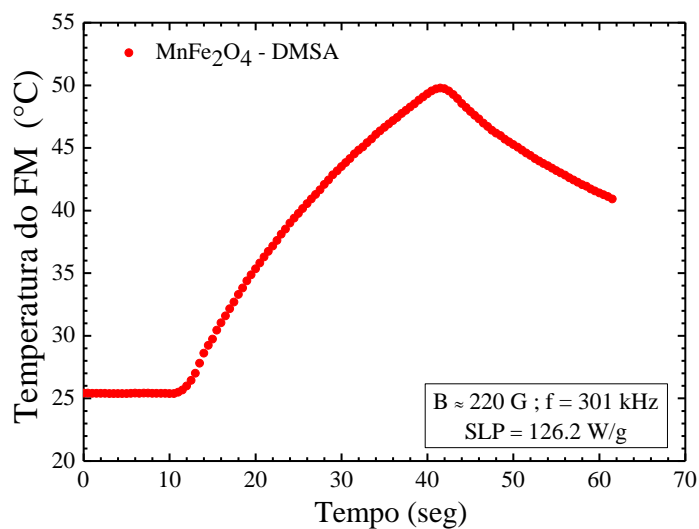


Figura 4.1 Hipertermia magnética *in vitro* do FM de nanopartículas magnéticas de MnFe₂O₄ – DMSA: $d = (15 \pm 3)$ nm, $B \approx 220$ G, $f = 301$ kHz, $SLP_{in\ vitro} = 126,2$ W/g.

A seguir, na Figura 4.2 são mostradas três sequências de imagens de infravermelho do animal #2 (em função do tempo de hipertermia) para três posições angulares diferentes da câmera termográfica correspondendo, respectivamente, à: $\theta = 0^\circ$ (1ª sessão de HM) com a objetiva direcionada paralelamente à direção normal à superfície da pele do camundongo na região do tumor; em $\theta = 30^\circ$ (3ª sessão de HM) e $\theta = 60^\circ$ (5ª sessão de HM). Todas as imagens estão na mesma escala de temperatura e magnificação.

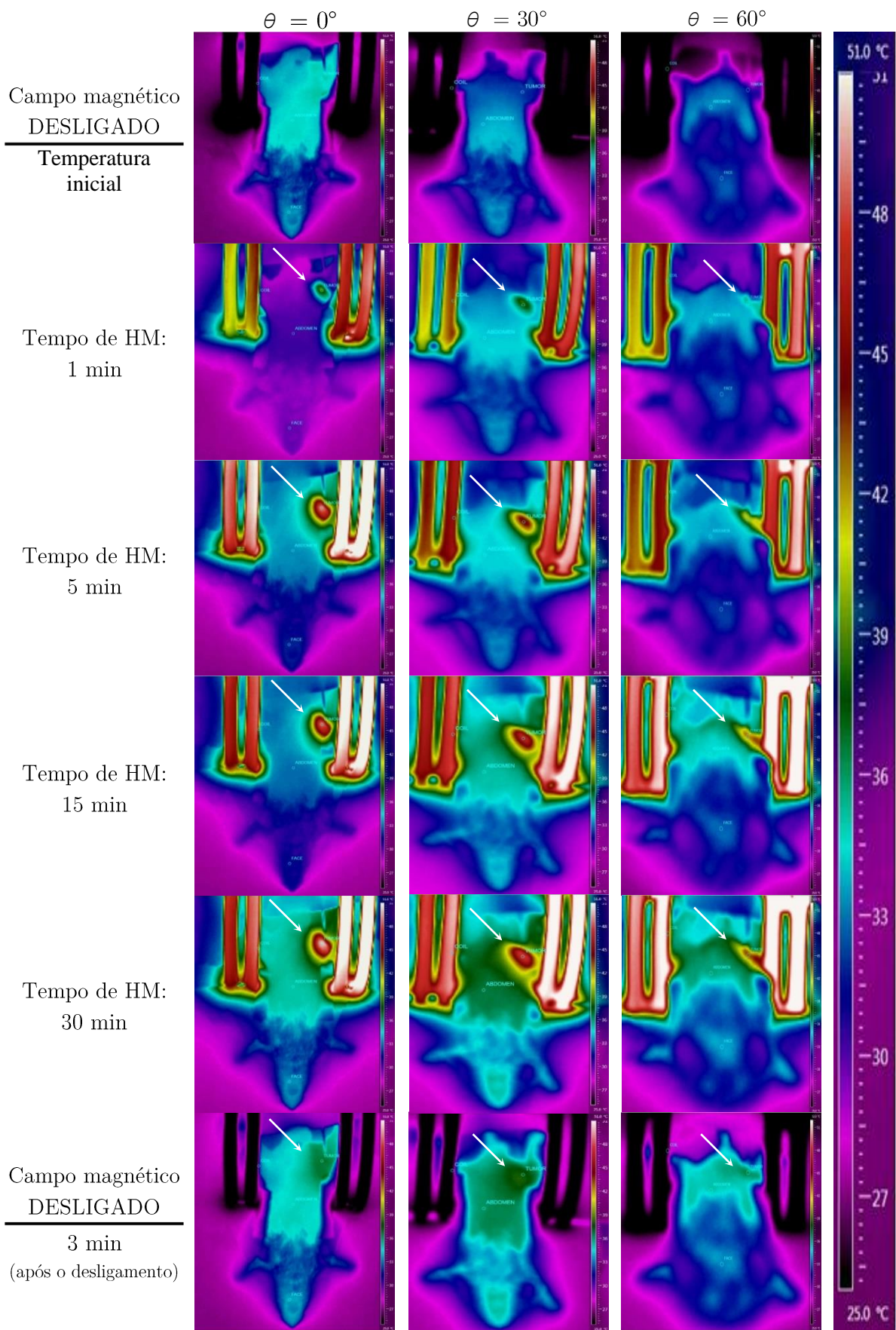


Figura 4.2 Animal #2: sequências de imagens de infravermelho (colunas) em função do tempo de hipertermia (linhas) para três posições angulares diferentes da câmera termográfica correspondendo, respectivamente, a $\theta = 0^\circ$ (1ª sessão de HM com NPM), $\theta = 30^\circ$ (3ª sessão de HM com NPM) e $\theta = 60^\circ$ (5ª sessão de HM com NPM). Segunda configuração experimental ($B \approx 220\text{G}$, $f = 301\text{ kHz}$) (vide seção 2.4, no capítulo 2) utilizando NPM de $\text{MnFe}_2\text{O}_4 - \text{DMSA}$ (com diâmetro $d = (15 \pm 3)\text{ nm}$) e $\text{SLP}_{\text{in vitro}} = 126,2\text{ W/g}$.

Já a Figura 4.3 são imagens termográficas do mesmo animal #2, agora, apenas da região de interesse (superfície da pele sobre o tumor subcutâneo) após 30 min de HM com as NPM de $\text{MnFe}_2\text{O}_4 - \text{DMSA}$, para todas as 5 sessões. Todas as imagens estão na mesma escala de temperatura e com a mesma magnificação.

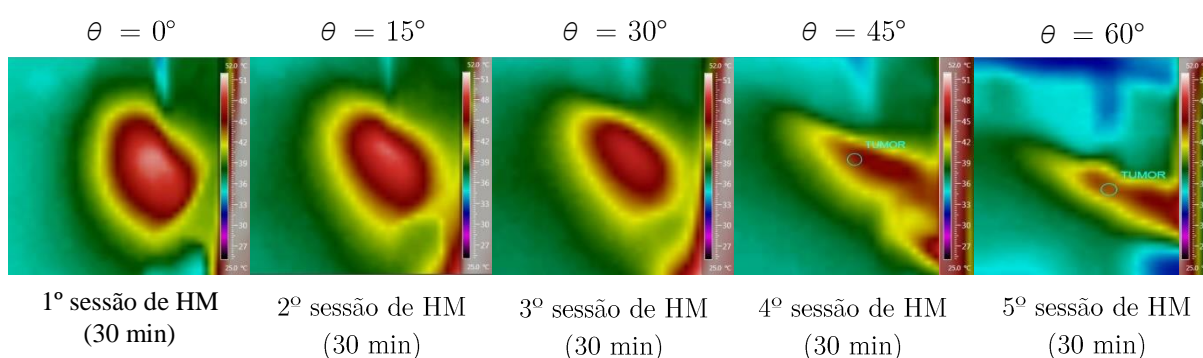


Figura 4.3 Animal #2: sequência de imagens de infravermelho (linha) no instante $t = 30\text{ min}$ de hipertermia (colunas) para todas as cinco sessões de aquecimento correspondendo, respectivamente, às posições angulares da câmera termográfica em $\theta = 0^\circ$ (1ª sessão), $\theta = 15^\circ$ (2ª sessão), $\theta = 30^\circ$ (3ª sessão), $\theta = 45^\circ$ (4ª sessão), e $\theta = 60^\circ$ (5ª sessão). Segunda configuração experimental ($B \approx 220\text{G}$, $f = 301\text{ kHz}$) (vide seção 2.4, no capítulo 2) utilizando NPM de $\text{MnFe}_2\text{O}_4 - \text{DMSA}$ (com diâmetro $d = (15 \pm 3)\text{ nm}$) e $\text{SLP}_{\text{in vitro}} = 126,2\text{ W/g}$.

O gradiente de temperatura superficial na região do tumor, observado nas imagens de infravermelho da Figura 4.3, muito provavelmente carrega alguma informação quantitativa sobre a entrega tridimensional de calor dentro do tumor. Contudo, qualquer que seja a estratégia adotada (ou modelo elaborado) para determinar matematicamente essa correlação (analiticamente ou via simulação numérica) antes é necessário conhecer de maneira precisa a temperatura da superfície/região de interesse. E, principalmente, tratando-se de superfícies curvas como é a topografia da superfície da pele do camundongo na região do tumor subcutâneo, a precisão na determinação de sua temperatura utilizando uma câmera termográfica é função da emissividade direcional espectral $\epsilon(\lambda, \theta)$ da pele do animal, como demonstrado por Watmough *et. al.* (em 1970) [154].

Como é rigorosamente discutido no apêndice B.3, Hejazi e Spangler (em 1992) demonstraram para a interface ar-pele, onde a pele é modelada como um meio dielétrico real ($\kappa \neq 0$) com superfície opaca e especular, que o valor de $\epsilon(\lambda, \theta)$ é calculado como [25]:

$$\epsilon(\lambda, \theta) = 1 - \frac{\rho_{\parallel}(\lambda, \theta) + \rho_{\perp}(\lambda, \theta)}{2} \quad (4.1)$$

Onde:

$$\rho_{\parallel}(\lambda, \theta) = \frac{[(n^2 - \kappa^2)\cos\theta - n_{ar} q]^2 + [2n\kappa \cos\theta - n_{ar} p]^2}{[(n^2 - \kappa^2)\cos\theta + n_{ar} q]^2 + [2n\kappa \cos\theta + n_{ar} p]^2} \quad (4.2)$$

$$\rho_{\perp}(\lambda, \theta) = \frac{(q - n_{ar} \cos\theta)^2 + p^2}{(q + n_{ar} \cos\theta)^2 + p^2} \quad (4.3)$$

$$p^2 = \frac{1}{2}(-n^2 + \kappa^2 + n_{ar}^2 \sin^2\theta) + \frac{1}{2}\sqrt{(n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \sin^2\theta)^2 + 4n^2\kappa^2} \quad (4.4)$$

$$q^2 = \frac{1}{2}(n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \sin^2\theta) + \frac{1}{2}\sqrt{(n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \sin^2\theta)^2 + 4n^2\kappa^2} \quad (4.5)$$

$$\kappa = \frac{\alpha\lambda}{4\pi} \quad (4.6)$$

Utilizando parâmetros experimentais encontrados na literatura, é possível resolver o conjunto de equações acima e estudar o comportamento da emissividade direcional espectral da pele do camundongo, comparativamente à pele humana.

O valor *in vivo* da emissividade normal (quando $\theta = 0^\circ$, ou seja, a radiação térmica é emitida perpendicularmente à superfície) para a epiderme do camundongo é igual a $\epsilon_0 = (0.971 \pm 0.005)$ [189] e, para a epiderme humana (caucasiana) *in vivo* é igual a $\epsilon_0 = (0.98 \pm 0.01)$ [25], [154], [189], [190]. A parte real do índice de refração da pele pode ser calculada utilizando a fórmula de Fresnel (quando $\theta = 0^\circ$) como segue abaixo [25]:

$$1 - \epsilon_0 = \left(\frac{n - 1}{n + 1}\right)^2 \quad (4.7)$$

O valor calculado para a parte real do índice de refração da epiderme do camundongo *in vivo* é igual a $n = 1,41$ e para a epiderme humana (caucasiana) *in vivo* é igual a $n = 1,33$.

Em todo o espectro da radiação térmica – infravermelho próximo de 0,75–3,0 μm (*near infrared* – NIR), infravermelho médio de 3,0–6,0 μm (*middle infrared* – MIR) e infravermelho longo de 6,0–25,0 μm (*long wave infrared* – LWIR) – a absorção de muitos tecidos biológicos (e.g. epiderme, tecido muscular, sangue, fígado, rim, tecido ósseo, cerebelo e etc.) é dominada principalmente pela absorção de moléculas de água. A absorção por outras moléculas, e.g. glicose, desempenha um papel insignificante [191, p. 74]. O coeficiente linear de absorção da epiderme humana (caucasiana) *in vivo* é aproximadamente igual ao da água pura para uma grande faixa espectral, em particular para o comprimento de onda $\lambda = 10 \mu\text{m}$ seu valor será $\alpha(\lambda) = 638,37 \text{ cm}^{-1}$ (vide Figura 4.4 (A)) [191, p. 75–76], [192, p. 176], [193]. Para a epiderme do camundongo, quando $\lambda = 1,4 \mu\text{m}$, o valor experimental *in vivo* é $\alpha(\lambda) = 6 \text{ cm}^{-1}$ [194]. E como pode ser observado na Figura 4.4 (B), para uma faixa de comprimentos de onda de 1,0–2,4 μm a absorvidade *in vivo* da pele na região da orelha de camundongos é bem próxima da absorvidade da água pura. Utilizando esses valores de $\alpha(\lambda)$ na eq. 4.6 é possível calcular os valores do coeficiente de extinção para a epiderme humana $\kappa(\lambda = 10 \mu\text{m}) = 0,0508$ [193] e, também, para a epiderme do camundongo $\kappa(\lambda = 1,4 \mu\text{m}) = 0,000067$ [194].

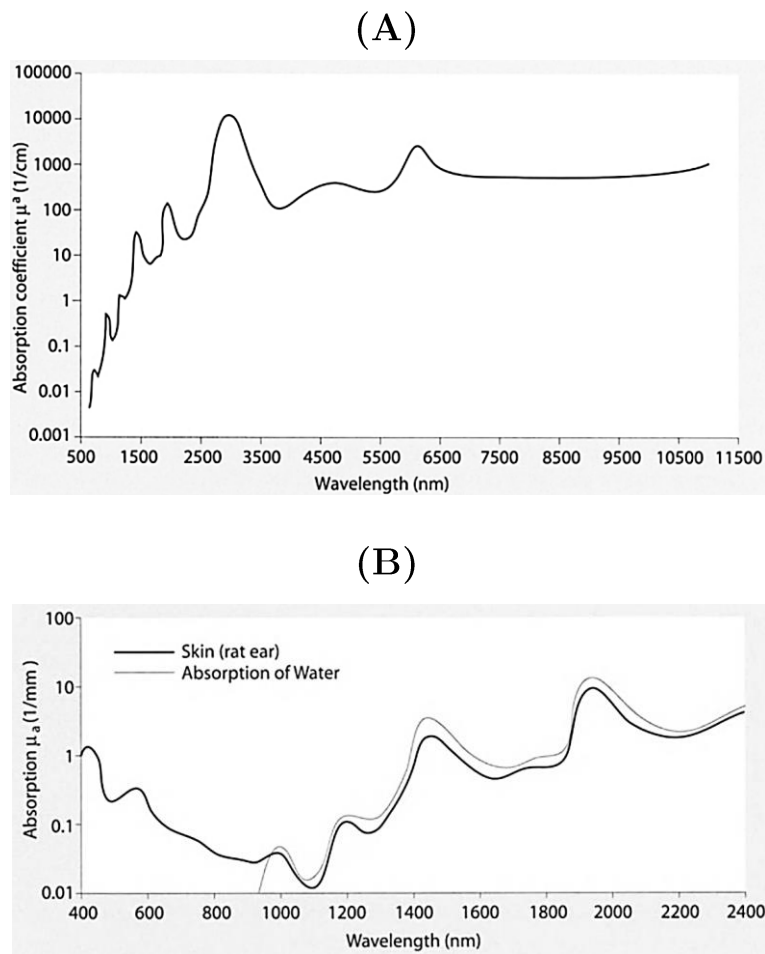


Figura 4.4 (A) Coeficiente de absorção espectral ($\mu_a \equiv \alpha$) da água pura no intervalo desde o infravermelho próximo até a região do infravermelho longo. (B) Comparação entre o coeficiente de absorção *in vivo* da pele de camundongos na região da orelha e o coeficiente de absorção da água pura na região do infravermelho próximo. Adaptado de: BERLIEN, H. P. e Müller, G. J. 2003, p. 75 e 82 [191].

Agora, substituindo os valores de n , $\alpha(\lambda)$ e $\kappa(\lambda)$ nas equações de 4.4 e 4.5 calcula-se os parâmetros $p(\theta)$ e $q(\theta)$ e, portanto, é possível determinar os valores de $\epsilon(\lambda, \theta)$ em função da direção de emissão da radiação térmica para a epiderme do camundongo (em $\lambda=1.4 \mu\text{m}$) e para a epiderme humana (em $\lambda = 10 \mu\text{m}$) utilizando a eq. 4.1. As Figuras 4.5 (A) e (B) mostram os respectivos gráficos de emissividade direcional para essas duas espécies.

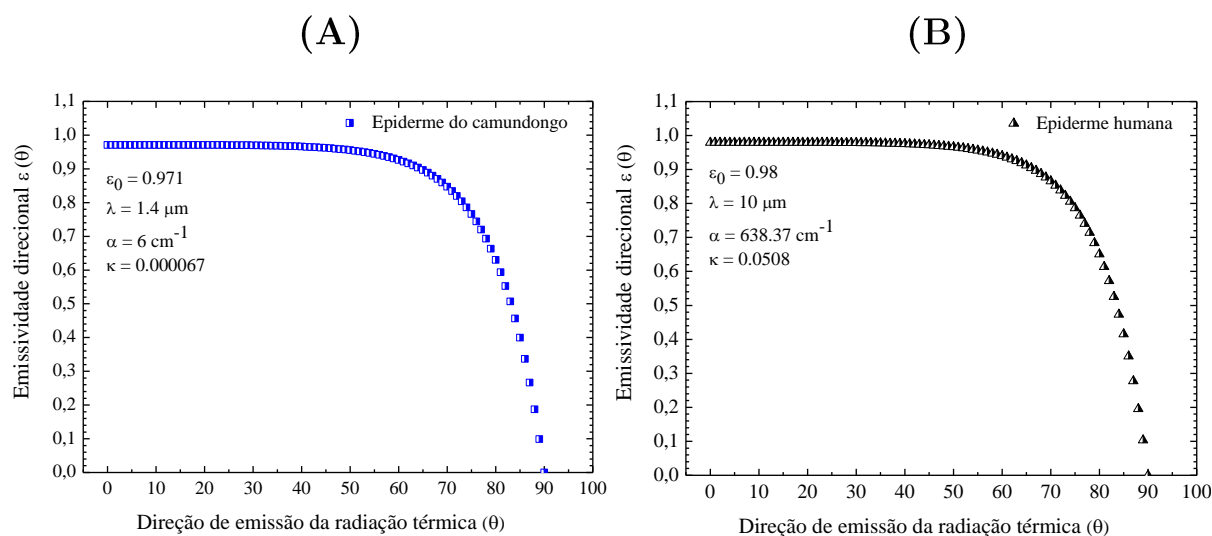


Figura 4.5 (A) Emissividade direcional da epiderme do camundongo em função da direção de emissividade (θ) para o comprimento de onda $\lambda = 1.4 \mu\text{m}$. (B) Emissividade direcional da epiderme humana (caucasiana) em função da direção de emissividade (θ) para o comprimento de onda $\lambda = 10 \mu\text{m}$.

Nas imagens de infravermelho de cada animal, dentro da região de interesse sobre o tumor, foram construídos alguns elementos de medida da temperatura: o elemento 1 nas Figuras 4.6 de (A) e (B) identifica uma circunferência com diâmetro igual a 5 pixels, concêntrica com o ponto (posição) do termômetro de fibra-óptica na imagem termográfica que é aproximadamente correspondente à sua posição real sobre a pele do camundongo (*area around probe*); já o elemento 2 (*hottest region*) identifica outra circunferência com diâmetro igual a 5 pixels que monitora a região mais quente da pele sobre o tumor subcutâneo. Através do software da câmera termográfica é possível determinar as temperaturas máxima (seta vermelha na imagem), mínima (seta azul na imagem) e a temperatura média dentro dessa área de $\cong 8,3 \text{ mm}^2$ (cada pixel tem dimensão quadrada igual a $0,65 \times 0,65 \text{ mm}^2$ quando $\theta = 0^\circ$ e a objetiva da câmera está a 50 cm de distância do alvo).

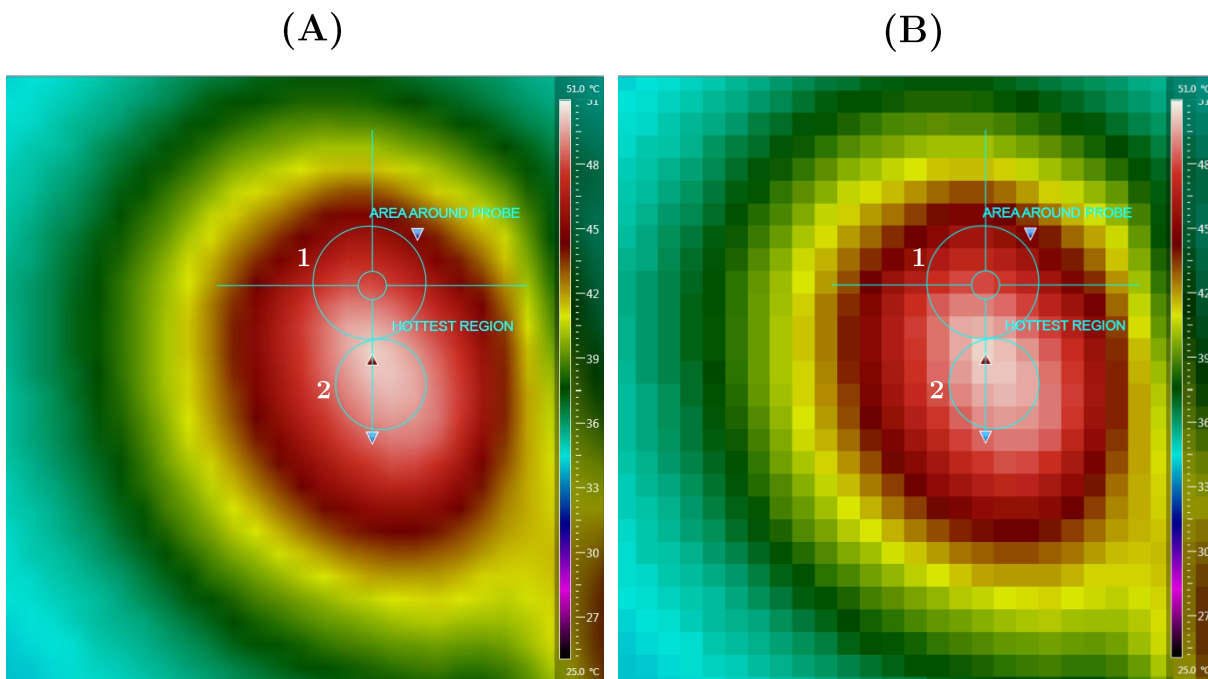


Figura 4.6 Imagem de infravermelho do animal #1 no instante $t = 30$ min de sua primeira sessão de HM com NPM: (A) é a imagem termográfica e (B) é a matriz plano focal de 25×25 pixels da região de interesse sobre o tumor. Nas duas figuras é possível identificar os elementos de medida construídos para aquisição dos valores de temperatura superficial: o número 1 identifica uma circunferência com diâmetro igual a 5 pixels, concêntrica com o ponto (posição) do termômetro de fibra-óptica na imagem termográfica que é aproximadamente correspondente à sua posição real sobre a pele do camundongo (*area around probe*); já o elemento 2 (*hottest region*) identifica outra circunferência com diâmetro igual a 5 pixels que monitora a região mais quente da pele sobre o tumor subcutâneo.

Na sequência, os gráficos das Figuras 4.7 de (A) à (E) (animal #1) e Figuras 4.8 de (A) à (E) (animal #2), demonstram como cresce significativamente a diferença entre a temperatura superficial medida pela fibra-óptica e a câmera termográfica (em pontos correspondentes) conforme aumenta o ângulo (θ) de inclinação da câmera em relação à direção normal à pele dos camundongos. Os dados de infravermelho são denotados nos gráficos por *IR cam* (*infrared camera*), e dizem respeito à média da temperatura na região circunscrita pelo elemento de medida 1 nas Figuras 4.6 (A) e (B). A curva controle nesse experimento é a temperatura obtida a partir do registro da fibra-óptica colocada sobre a pele do camundongo na região de maior aquecimento tumoral, identificada na termografia pelo ponto concêntrico com o elemento de medida 1 nas Figuras 4.6 de (A) e (B). Uma segunda fibra-óptica também foi mantida no reto do camundongo durante cada procedimento de hipertermia *in vivo*, um registro de sua temperatura basal.

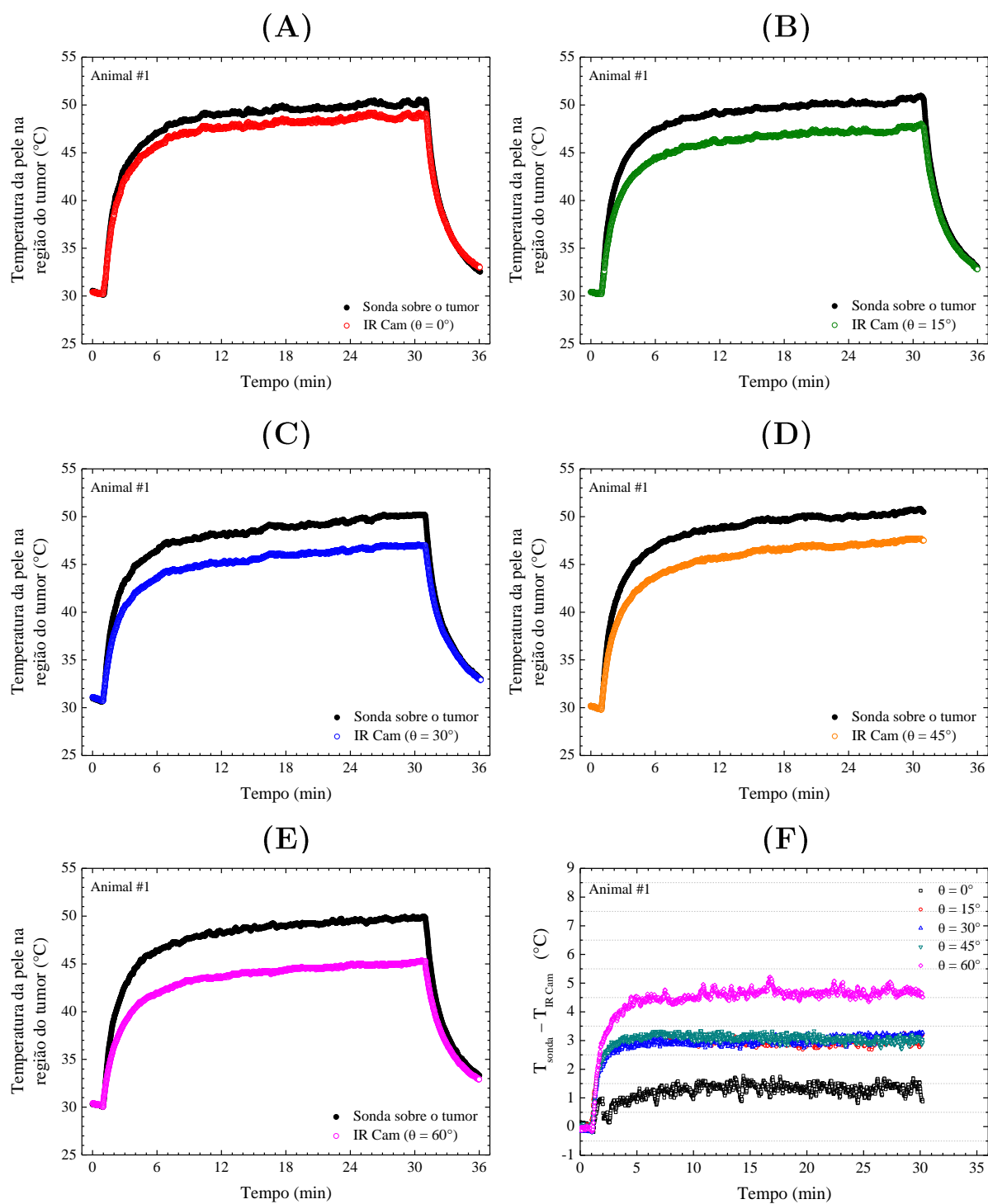


Figura 4.7 Animal #1 – HM in vivo com NPM de MnFe_2O_4 – DMSA de diâmetro $d = (15 \pm 3)$ nm, $B \approx 220\text{G}$, $f = 301$ kHz, $\text{SLP}_{\text{in vitro}} = 126,2$ W/g : os gráficos das figuras de (A) até (E) mostram como aumenta a diferença entre a temperatura medida com a câmera termográfica (T_{IRcam}) e temperatura medida com a fibra-óptica (T_{Sonda}) colocada sobre a pele na região do tumor subcutâneo, em função de θ (ângulo formado entre a direção da objetiva da câmera e a normal à superfície da pele). Em (F) vemos $[T_{\text{IRcam}}(\theta) - T_{\text{Sonda}}(\theta)] \times$ tempo de hipertermia desde o instante $t = 0$ min até $t = 31$ min.

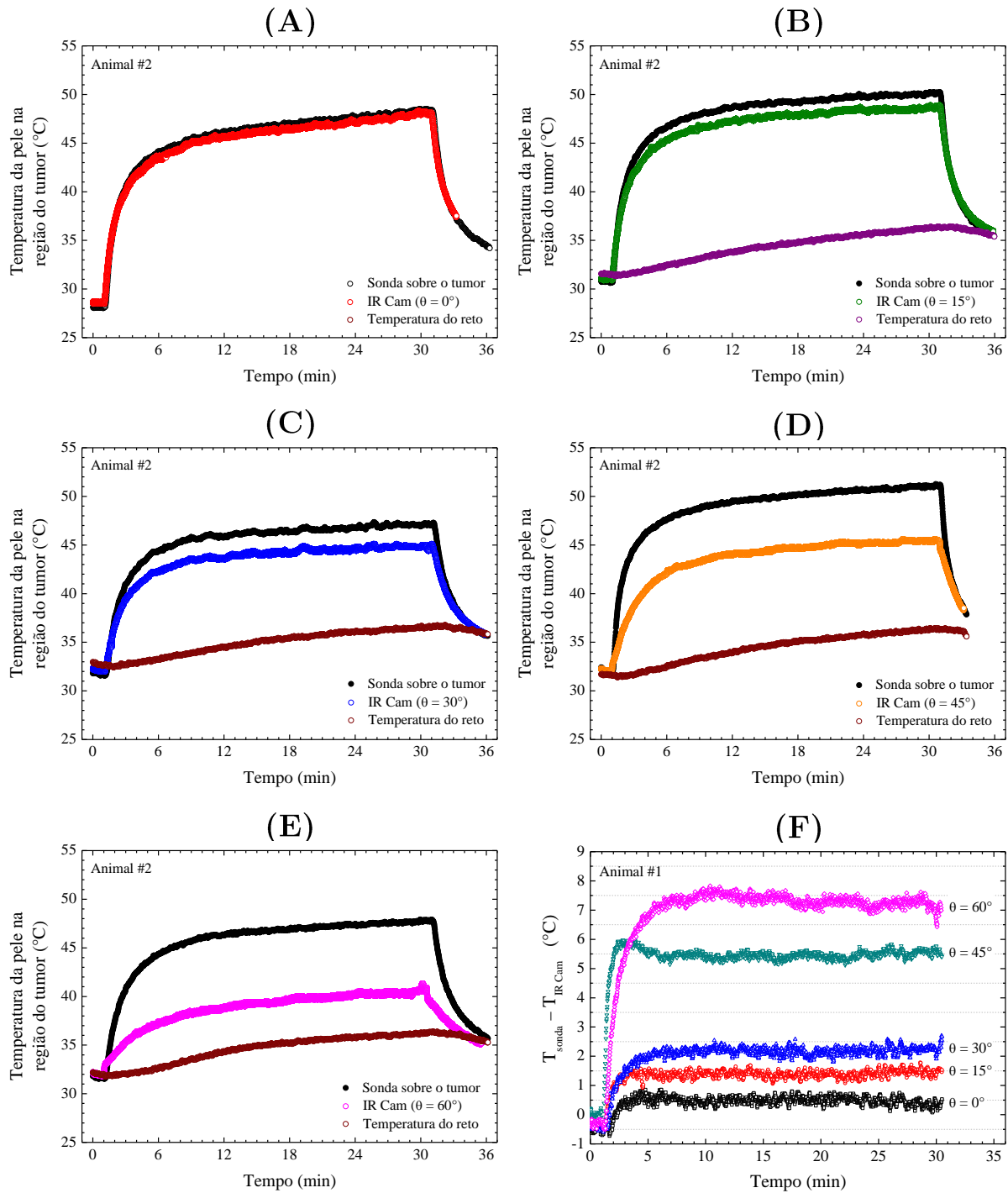


Figura 4.8 Animal #2 – HM in vivo com NPM de MnFe_2O_4 – DMSA de diâmetro $d = (15 \pm 3)$ nm, $B \approx 220\text{G}$, $f = 301$ kHz, $\text{SLP}_{\text{in vitro}} = 126,2$ W/g : os gráficos das figuras de (A) até (E) mostram como aumenta a diferença entre a temperatura medida com a câmera termográfica (T_{IRcam}) e a temperatura medida com a fibra-óptica (T_{Sonda}) colocada sobre a pele na região do tumor subcutâneo, em função de θ (ângulo formado entre a direção da objetiva da câmera e a normal à superfície da pele). Em (F) vemos $[T_{\text{IRcam}}(\theta) - T_{\text{Sonda}}(\theta)] \times \text{tempo}$ de hipertermia desde o instante $t = 0$ min até $t = 31$ min. Esses resultados demonstram que $\theta = 0^\circ$ corresponde à configuração mais acurada de utilização da câmera termográfica para monitoramento da hipertermia in vivo.

Nos gráficos das Figuras 4.7 (F) e 4.8 (F) é mostrado o valor da diferença entre o monitoramento da temperatura superficial com a fibra óptica e a câmera termográfica em função do tempo de HM, ou seja, $(T_{Sonda} - T_{IR\ cam})$ para as cinco sessões a que foram submetidos os animais #1 e #2. Em particular, o gráfico do animal #2 mostra muito mais claramente o comportamento que já era teoricamente esperado, ou seja, um ao aumento do erro na medida da câmera (temperatura aparente) devido à diminuição no valor da emissividade direcional da pele do camundongo $\epsilon(\theta)$ com o aumento no valor do ângulo θ (vide Figura 4.5 (A)). Também é possível notar que a partir do quinto minuto de hipertermia o aquecimento atinge um regime quase estacionário, de maneira que o valor da diferença permanece aproximadamente constante no tempo. O valor reportado pela sonda é sempre maior que o valor reportado pela câmera e o monitoramento por infravermelho (temperatura aparente) subestima o valor real da temperatura superficial, conforme mostrado na Tabela 4.1 abaixo no texto.

Tabela 4.1 – Valor da diferença $\Delta T(\theta)$ (na região do tumor) conforme aumenta o ângulo (θ) de inclinação da câmera em relação à direção normal à pele dos camundongos.

Animal	$\Delta T(\theta)^* = T_{Sonda} - T_{IR\ cam}$				
	$\theta = 0^\circ$	$\theta = 15^\circ$	$\theta = 30^\circ$	$\theta = 45^\circ$	$\theta = 60^\circ$
#1	1,3 °C	2,9 °C	3,0 °C	3,1 °C	4,7 °C
#2	0,5 °C	1,4 °C	2,2 °C	5,5 °C	7,3 °C

* Diferença média calculada a partir do quinto minuto de aquecimento tumoral, após as temperaturas registradas na superfície da pele sobre o tumor dos camundongos atingirem um regime quase estacionário.

Comparando os resultados dos dois animais (em $\theta = 0^\circ$) vemos que a partir de 5 min da primeira hipertermia, quando suas temperaturas superficiais se mantêm entre 45–50 °C, a imprecisão instrumental ($\pm 2\%$ do valor medido) na medida feita com a câmera termográfica é da ordem de $\pm 1,0^\circ\text{C}$. É interessante notar que, de acordo com as Figuras 4.7 (F) e 4.8 (F) e também com a Tabela 4.1 (acima no texto), o erro de $-1,3^\circ\text{C}$ na medida da temperatura aparente (em $\theta = 0^\circ$) para o animal #1 está apenas um pouco acima da própria incerteza na medida, enquanto que para o animal #2 o erro de $-0,5^\circ\text{C}$ ainda está dentro do erro instrumental. Há, também, a dificuldade experimental de identificar na imagem de infravermelho o ponto exato monitorado pela sonda, que é um objeto muito pequeno e com pouco contraste na imagem de infravermelho.

Lembrando que a câmera utilizada em nossos experimentos opera num intervalo espectral de aquisição na faixa do infravermelho longo (de 7,5–13,0 μm), podemos utilizar os

parâmetros ópticos da epiderme humana quando $\lambda = 10 \mu\text{m}$, para modelar de maneira aproximada o comportamento emissivo da pele do camundongo. Primeiramente, utilizando o modelo de Watmough (vide eq. C.79, no Apêndice C.4) que prevê teoricamente o valor de $\Delta T(\theta) \equiv (T_{sonda} - T_{IR\ cam})$, o erro na medida da temperatura com a câmera de infravermelho e que pode ser calculado como [154]:

$$\Delta T(\theta) = T_{sonda} \left(1 - \sqrt[m]{\frac{\epsilon_{\theta}}{\epsilon_0}} \right) \quad (4.8)$$

A emissividade direcional ϵ_{θ} e o parâmetro $m(\lambda)$ são calculados como:

$$m(\lambda) = \frac{C_2}{\lambda T} = \frac{1.439 \times 10^4 \mu\text{m} \cdot \text{K}}{\lambda T} \quad (4.9)$$

Tal que,

$$C_2 = \frac{hc_0}{k} \quad (4.10)$$

onde $C_2 = \frac{hc_0}{k} = 1,439 \times 10^4 \mu\text{m} \cdot \text{K}$, $h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ é a constante de Planck, $c_0 = 2,998 \times 10^8 \text{ m/s}$ é a velocidade da luz no vácuo e $k = 1,381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$ é a constante de Boltzmann [161]. Contudo, esse modelo idealiza a pele como um dielétrico perfeito ($\kappa = 0$) e ignora efeitos de atenuação da energia térmica ($\alpha = 0$), assim como a reflexão da radiação ambiente na superfície da pele do camundongo.

Já a equação proposta por Clark, J. A. [183], [184] (vide eq. C.82, no Apêndice C.4), transcrita na forma da eq. 4.11 (abaixo no texto) é um segundo modelo da literatura que, diferentemente da eq. 4.8, inclui a radiação emitida pelo meio e refletida na superfície da pele do camundongo no cálculo de $\Delta T(\theta)$ (onde o ambiente em que o animal se encontra durante a realização de HM com as NPM é considerado um recinto isotérmico difuso, cujo valor da temperatura ambiente é denotado por T_a). O valor real da temperatura da superfície corresponderá aos dados adquiridos com a fibra-óptica ($T_s \equiv T_{sonda}$) e a temperatura do laboratório em que os experimentos de hipertermia *in vivo* são realizados é mantida em torno de 25°C.

$$\Delta T(\theta) = C(1 - \epsilon_\theta) \cdot (T_s - T_a) \quad (4.11)$$

Tal que $C = \sigma(T_s + T_a)(T_s^2 + T_a^2)$. Em seu modelo, Clark considerou a validade da eq. 4.11 limitada ao intervalo de comprimentos de onda curtos e, também, quando a diferença entre T_s e T_a é pequena [183].

Além da utilização dos modelos de Watmough (eq. 4.8) e Clark (eq. 4.11) (as demonstrações desses dois modelos são feitas completamente no Apêndice C.4), também propomos uma nova modelagem matemática. Como, em geral, as câmeras de infravermelho funcionam em uma faixa de comprimento de onda restrita, a consideração direta da lei de Stefan-Boltzmann pode ser questionável (integral sobre λ desde $0 \rightarrow \infty$). De fato, é possível obter uma expressão semelhante à eq. 4.11, reescrevendo erro (ΔE) (diferença entre o valor da potência radiante emitida e refletida por uma superfície real, comparativamente à superfície de um corpo negro à mesma temperatura) na forma da eq. 4.12 abaixo:

$$\Delta E(\lambda, \theta) = \dot{Q}_{cn}(\lambda, T_s) - \left(\dot{Q}_{real}^{emit}(\lambda, T_s) + \dot{Q}_{real}^{ref}(\lambda, T_a) \right)$$

$$\Delta E(\lambda, \theta) = \frac{C_1}{\lambda^5 \left[e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T_s}\right)} - 1 \right]} - \left\{ \epsilon_{\lambda, \theta} \cdot \frac{C_1}{\lambda^5 \left[e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T_s}\right)} - 1 \right]} + (1 - \epsilon_{\lambda, \theta}) \cdot \frac{C_1}{\lambda^5 \left[e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T_a}\right)} - 1 \right]} \right\}$$

Tal que, se $e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T}\right)} \gg 1$, então:

$$\frac{C_1}{\lambda^5 \left[e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T}\right)} - 1 \right]} = \frac{C_1}{\lambda^5 e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T}\right)} \left[1 - \frac{1}{e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T}\right)}} \right]} \approx \frac{C_1}{\lambda^5} e^{-\left(\frac{C_2}{\lambda T}\right)}$$

Logo,

$$\Delta E(\lambda, \theta) = (1 - \epsilon_{\lambda, \theta}) \cdot \frac{C_1}{\lambda^5} e^{-\left(\frac{C_2}{\lambda T_s}\right)} \left[1 - e^{\frac{C_2}{\lambda} \left(\frac{1}{T_s} - \frac{1}{T_a}\right)} \right]$$

$$\Delta E(\lambda, \theta) = (1 - \epsilon_{\lambda, \theta}) \cdot \frac{C_1}{\lambda^5} e^{-\left(\frac{C_2}{\lambda T_s}\right)} \left[1 - e^{-\frac{C_2}{\lambda T_s T_a} (T_s - T_a)} \right] \quad (4.12)$$

Note que a eq. 4.12 acima possui dois limites interessantes. Primeiramente, se $T_s \gg T_a$ e $\left(\frac{C_2}{\lambda T_a}\right) \gg 1$, então:

$$\Delta E(\lambda, \theta) \cong (1 - \epsilon_{\lambda, \theta}) \cdot \dot{Q}_{cn}(\lambda, T_s) \quad (4.13)$$

Por outro lado, se a diferença entre a temperatura da superfície da pele e a temperatura ambiente for muito pequena ($T_s \approx T_a$), então:

$$\frac{C_2}{\lambda T_s T_a} (T_s - T_a) \ll 1$$

Consequentemente,

$$\Delta E(\lambda, \theta) \cong \frac{C_2 \dot{Q}_{cn}(\lambda, T_s)}{\lambda T_s T_a} (1 - \epsilon_{\lambda, \theta}) \cdot (T_s - T_a) \quad (4.14)$$

Assim, de acordo com a modelagem que estamos propondo com as equações de 4.12 à 4.14, o erro $\Delta T(\theta)$ na medida da temperatura superficial aparente ($T_{IR\ cam}$) monitorada com a câmera termográfica pode ser escrito como sendo diretamente proporcional ao cálculo de $\Delta E(\lambda, \theta)$, ou seja, $\Delta T(\theta) \equiv (T_{sonda} - T_{IR\ cam}) \propto \Delta E(\lambda, \theta)$.

Logo, para o caso em que $T_s \approx T_a$ calcula-se:

$$\Delta T(\theta) = A_1 (1 - \epsilon_{\lambda, \theta}) \cdot (T_s - T_a) \quad (4.15)$$

Com A_1 sendo um parâmetro adimensional obtido a partir do ajuste dos dados experimentais utilizando a eq. 4.15 e que, de fato, pode depender de vários parâmetros intrínsecos (e.g. parâmetros termo-ópticos constitutivos do material) e extrínsecos (e.g. a temperatura ambiente). Acreditamos que esta expressão poderia ser relevante, por exemplo, para estudos que preconizam a utilização de imagens de infravermelho na detecção precoce de

tumores superficiais (e.g. melanoma[127] e câncer de mama [195]) uma vez que no ambiente clínico, em geral, a temperatura da pele do paciente não difere muito da temperatura do meio.

No entanto, durante a realização de nossos experimentos *in vivo* a temperatura ambiente era mantida em 25 °C e para os animais #1 e #2 a temperatura superficial média da pele na região do tumor após 30 min de aquecimento foi igual a $(48,9 \pm 1,7)$ °C (nas cinco sessões de HM com NPM que cada animal foi submetido). Portanto, nos resultados experimentais até agora apresentados neste capítulo 4, levando em consideração a influência da radiação ambiente refletida na superfície da pele dos camundongos, o erro praticado em nossas medidas será mais bem estimado com base na eq. 4.12 (solução geral), tal que $\Delta T(\theta) \propto \Delta E(\lambda, \theta)$ e portanto:

$$\Delta T(\theta) = A_2 \cdot (1 - \epsilon_{\lambda, \theta}) \cdot \frac{C_1}{\lambda^5} e^{-\left(\frac{C_2}{\lambda T_s}\right)} \left[1 - e^{-\frac{C_2}{\lambda T_s T_a}(T_s - T_a)} \right] \quad (4.16)$$

Tal que o parâmetro A_2 terá dimensão de temperatura e será obtido através do ajuste do erro experimental pela eq. 4.16.

Todavia, é importante salientar que apenas dois camundongos foram utilizados para realização dos experimentos *in vivo* de HM e, portanto, a incerteza no cálculo da temperatura superficial média na região do tumor dos animais #1 e #2 (ao final de cada sessão de 30 min de aquecimento com as NPM); e o valor médio da diferença entre a temperatura medida por infravermelho e com a fibra-óptica sobre a pele ($\overline{\Delta T}(\theta) = \frac{(T_{sonda}^{\#1} - T_{IR\ cam}^{\#1}) + (T_{sonda}^{\#2} - T_{IR\ cam}^{\#2})}{2}$), em qualquer desses cálculos o erro praticado não pode ser igual ao desvio padrão da média (σ). O fato de termos poucas repetições das medidas realizadas (vide Figuras 4.7 e 4.8) contribui para o aumento no valor da incerteza. Como as estimativas de um espaço amostral pequeno não são absolutamente confiáveis, a distribuição *t-student* foi utilizada para avaliar mais corretamente essa maior incerteza no cálculo dos valores médios [196]. Assim, a barra de erro que aparece nos dados experimentais ($\overline{\Delta T}$) do gráfico da Figura 4.9 abaixo no texto ($\overline{\Delta T}(\theta)$ na região mais aquecida da pele sobre os tumores dos animais #1 e #2, após 30 min de HM com NPM) é o resultado da multiplicação de σ pelo fator de abrangência⁹ $t = 1,84$.

⁹ Fator de abrangência (t) – fator numérico usado como multiplicador da incerteza padronizada combinada de modo a obter uma incerteza expandida. Neste estudo, o valor utilizado para o parâmetro t-student é igual a 1,84

O gráfico da Figura 4.13 é uma comparação do valor médio $\overline{\Delta T}(\theta)$ do erro experimental cometido no monitoramento da temperatura superficial na região do tumor com a câmera termográfica (para os ângulos de 0° , 15° , 30° , 45° e 60°) e o erro teórico calculado utilizando as equações de Watmough (eq.4.8), Clark (eq.4.8) e o modelo que desenvolvemos (eq.4.16). Para o cálculo das funções contínuas de $\Delta T(\theta)$ com $0^\circ \leq \theta \leq 90^\circ$ nos três modelos teóricos (linhas contínuas no gráfico) a temperatura real da superfície da pele dos camundongos (depois de 30 min de aquecimento) foi suposta constante para as cinco sessões de HM com NPM e, portanto, adotado o valor $T_s = \bar{T}_{sonda} = 48.9^\circ\text{C}$ (média aritmética da temperatura real da pele medida com a fibra-óptica na região do tumor dos animais #1 e #2 no instante $t = 31$ min nos gráficos das Figuras 4.11 e 4.12).

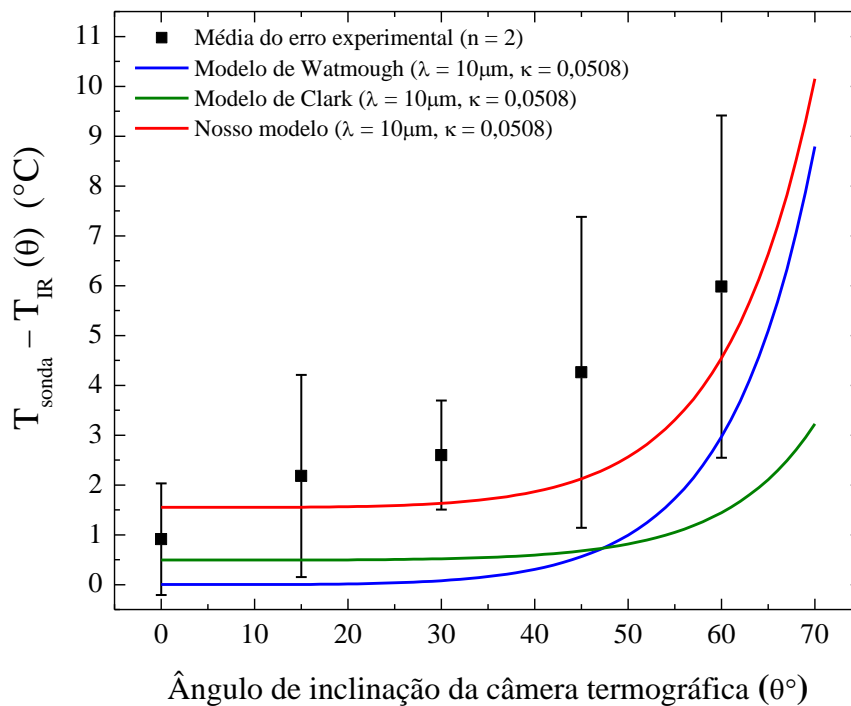


Figura 4.9 Valor médio $\overline{\Delta T}(\theta)$ do erro experimental na medida da temperatura superficial com a câmera termográfica (\blacksquare), comparado com o erro teórico calculado segundo os modelos de Watmough (eq.4.8), Clark (eq.4.8) e o modelo que desenvolvemos (eq.4.16), isto para diferentes ângulos de inclinação da câmera de infravermelho em relação à direção normal à pele do camundongo na região do tumor.

(com um nível de confiança de 68,27%), determinado de acordo com o número (ν) de graus de liberdade do conjunto de medidas (calculado como $\nu = n - 1$) e, em nossos experimentos, o número total de repetições da medida de temperatura foi $n = 2$ (número de eventos do espaço amostral) [196]. Nesse contexto, o valor médio das temperaturas é estimado e não determinado, sendo escrito como $(\bar{T} \pm t\sigma)$ (média aritmética simples \pm fator de abrangência \times desvio padrão).

Portanto, a abordagem apresentada nesse capítulo 4 nos permitiu estimar experimentalmente o erro praticado na utilização de uma câmera termográfica para visualizar e quantificar as mudanças na temperatura da pele sobre tumores subcutâneos, durante um procedimento de hipertermia. Ao provarmos que o direcionamento da objetiva da câmera perpendicularmente à superfície imagiada (em $\theta = 0^\circ$) é a configuração mais acurada (com erro da ordem de $\pm 1,0^\circ\text{C}$), evitando erros na determinação da temperatura aparente maiores que 4°C já a partir de $\theta = 30^\circ$, esses resultados nos permitiram um melhor ajuste de nossa própria metodologia experimental para o tratamento de tumores de S180 (sólidos e subcutâneos) por HM com NPM, e cuja discussão será apresentada no capítulo 5. Além disso, o modelo teórico que desenvolvemos (eq.4.16) mostrou-se mais eficiente que outros modelos da literatura (Watmough [154] e Clark [183]) ao prever o valor de $\Delta T(\theta)$ dentro da barra de erro de nossos resultados experimentais, o que consideramos ser uma relevante contribuição para outros grupos de pesquisa que também utilizem a técnica de imageamento por infravermelho no monitoramento do aquecimento (ou resfriamento) de superfícies curvas.

5 Efeito cumulativo da entrega de calor na observação de remissão tumoral completa em tumor murino de sarcoma 180.

5.1 Introdução

No ano de 2003 Dewhirst *et al.* publicaram um artigo de revisão [28] que resumia os resultados *in vitro* e *in vivo* (pré-clínicos e clínicos) de 109 artigos publicados desde 1960 até 2002, discutindo o conhecimento que se tinha à época sobre os efeitos da Hipertermia (HT) a tecidos saudáveis em humanos. Em 2009 Yarmolenko *et al.* [197] publicaram uma atualização do artigo de revisão de Dewhirst, agora, incluindo importantes descobertas publicadas entre 2002 e 2009. Um extenso trabalho de identificação de 463 artigos científicos e que, dentre os quais, apenas 152 proviam informações acuradas e confiáveis sobre o monitoramento correto da temperatura *in situ* durante HT e, também, a correta identificação e quantificação dos danos térmicos causados nos tecidos durante e/ou após entrega localizada de calor. Esses dois importantes trabalhos surgiram dentro do contexto de um workshop patrocinado pela Organização Mundial de Saúde (realizado na primavera 2002) para estabelecer diretrizes orientadoras (*guide lines*) preconizando o uso clínico da HT em humanos. O objetivo era discutir os princípios básicos que governam as relações entre o histórico de exposição térmica (temperatura e tempo de aquecimento) e os potenciais danos térmicos causados, principalmente, em tecidos normais.

A partir dos resultados da literatura, são identificados limiares de danos térmicos teciduais relacionados ao efeito cumulativo da quantidade de calor entregue durante HT localizada. Ou seja, uma clara tentativa de estabelecer quantitativamente, e com apropriada significância estatística, uma relação preditiva entre limiares de danos biológicos funcionais, subletais e letais diretamente associados a um dado valor de dose térmica (CEM43). São estudos translacionais, confrontando dados *in vivo* de 11 espécies diferentes, reportando limiares de dose térmica com fortes evidências associativas a danos térmicos em 31 diferentes tipos de tecidos/órgãos. E os achados identificados demonstram uma variação muito grande de sensibilidade ao calor tanto entre diferentes tecidos/órgãos de uma mesma espécie, quanto entre os mesmos tecidos/órgãos de diferentes espécies. Os dois gráficos abaixo são exemplos demonstrando o tempo necessário, em função da temperatura de aquecimento, para provocar

danos letais (e.g. necrose celular, queimaduras e perda de fertilidade) em tecidos saudáveis de camundongos (Figura 5.1 (A)) e, também, necrose epidermal em três espécies distintas (humanos, porcos e camundongos) (Figura 5.1 (B)) [28].

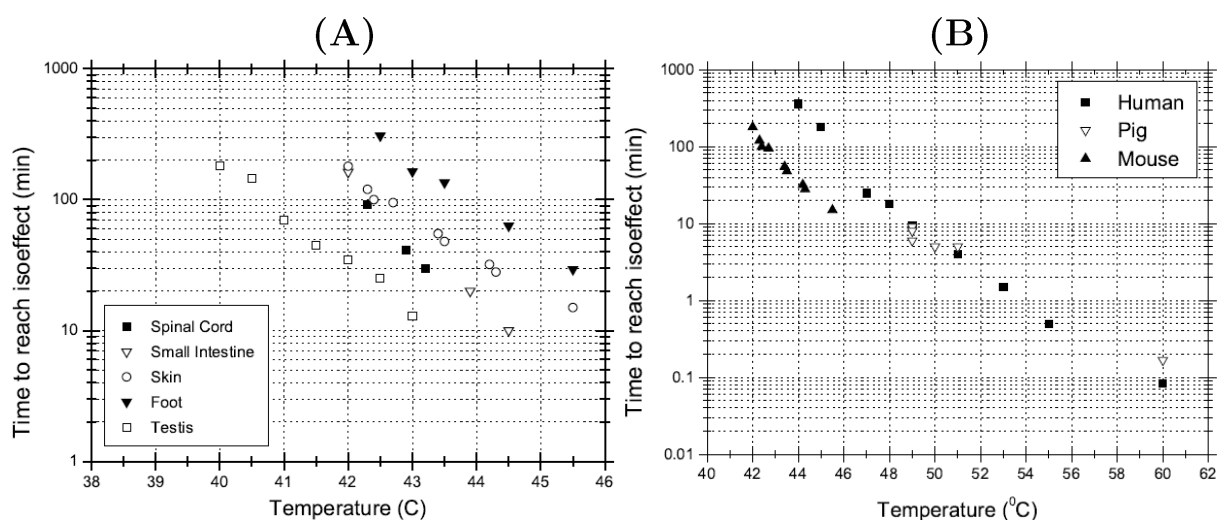


Figura 5.1 (A) Tempo necessário, em função da temperatura de aquecimento, para provocar danos letais em diferentes tecidos normais de camundongos: e.g. desmielinização na medula espinhal por injúria térmica (■); dano irreversível da superfície vilosa do intestino delgado (alta taxa de diminuição de criptas por injúria térmica) (▽); necrose da pele da orelha (○) e das patas (▼); e perda de fertilidade (diminuição do potencial proliferativo de células do testículo) (□). (B) Tempo necessário, em função da temperatura de aquecimento, para provocar danos letais em tecidos normais de diferentes espécies: e.g. necrose da pele de humanos (■), de porcos (▽) e de camundongos (▲). Adaptado de: Dewhirst *et al.*, 2003, p. 271, 275 [28].

Entre os resultados já publicados, em três ensaios diferentes (*in vivo*) a necrose epidermal de camundongos sadios provocada por HT em diferentes partes do corpo dos animais, foi associada aos seguintes valores de dose térmica: CEM43 = 74 min, necrose na pele da orelha (aquecimento entre 41,5°– 45,5°C por 13 – 592 min) [198]; CEM43 = 80 min, necrose na pele da calda (aquecimento entre 41,8°– 46,0°C por 10 – 422 min) [78]; e CEM43 = 210 min, necrose na pele das pernas e patas (aquecimento entre 43,5°– 45,5°C por 37 – 149 min) [78].

Enquanto que para a pele de humana (*in vivo*), Werner *et al.* reportaram a ocorrência de eritemas agudos (vermelhidão na pele devido à vasodilatação dos capilares cutâneos) com duração de até 4 h após a realização de HT, isto para um CEM43 de 112 min (aquecimento a 47 °C por 12 min) [199]. Já a necrose da pele humana, em outros achados, foi associada a valores de doses térmicas muito maiores que no caso de camundongos: 600 min < CEM43 < 720 min (aquecimento a 44 °C por 5 – 6 min) [81]; 480 min < CEM43 < 960 min resultando em queimaduras superficiais imediatas [200]; e CEM43 = 850 min associado a queimaduras

tanto na pele humana quanto de porcos (aquecimento entre 44°– 55°C por 0,5 – 425 min) [81].

Além de testes de segurança há na literatura, também, interessantes trabalhos investigando o efeito da dose térmica sobre a remissão parcial ou completa de tumores sólidos. Já em 1989 Perez, C. A. e Sapareto, S. A. avaliaram em humanos (tumores superficiais metastáticos ou recorrentes, com diferentes histologias e em locais variados) a resposta biológica de 118 pacientes (seguidos por até dois anos) ao tratamento combinado de RT+HT, onde a dose térmica foi um dos parâmetros diretamente correlacionados aos achados clínicos. Esses pacientes foram submetidos de 5–10 sessões de HT por micro-ondas (aquecimento por 60 min à temperatura média intratumoral igual a 42,5 °C resultando num CEM43 = 30 min) intercaladas a cada 72h, de 15–20 min após cada tratamento de RT (doses entre 2000 – 4000 Gy divididas em duas frações semanais de 400 Gy), e a temperatura intratumoral era monitorada em dois pontos distintos (cateteres) [77]. Nos quatro tipos de tumores tratados nesse estudo clínico – cabeça e pescoço (53), parede torácica (37), melanoma (23) e apenas 1 paciente com sarcoma de partes moles – dentre os pacientes que responderam bem ao tratamento, foi observado uma proporção de remissão tumoral completa muito maior (igual a 60%) entre aqueles com lesões de diâmetro menor que 4 cm, do que entre as lesões com diâmetro maior que 4 cm (apenas 33%). Os pesquisadores também registraram um aquecimento mais eficiente nos tumores com diâmetro ≤ 2 cm (64,6% com temperatura intratumoral média $\geq 42,5$ °C) comparativamente aos tumores com mais de 4 cm (50% com temperatura intratumoral média $\geq 42,5$ °C). E nenhuma remissão completa foi observada em lesões com mais de 4 cm e temperaturas ≤ 41 °C. As Tabelas 5.1 e 5.2 sumarizam os principais resultados desse trabalho.

Tabela 5.1 – Correlação entre o tamanho do tumor (tratado por HT+RT) e a temperatura média intratumoral (60 min de hipertermia).

Tipo de neoplasia	Número de tumores tratados (HT+RT) organizados por tamanho e respectiva temperatura intratumoral média								
	diâmetro ≤ 2 cm volume ~ 4 cm ³			diâmetro 2,1 – 4 cm volume $\sim 4,6 - 32$ cm ³			diâmetro > 4 cm volume ~ 32 cm ³		
	$\leq 41^\circ\text{C}$	$41^\circ-42^\circ\text{C}$	$\geq 42,5^\circ\text{C}$	$\leq 41^\circ\text{C}$	$41^\circ-42^\circ\text{C}$	$\geq 42,5^\circ\text{C}$	$\leq 41^\circ\text{C}$	$41^\circ-42^\circ\text{C}$	$\geq 42,5^\circ\text{C}$
Cabeça e pescoço (carcinoma epidermóide)	3	3	13	4	7	12	3	3	5
Parede torácica (adenocarcinoma)	1	4	14	--	5	4	2	2	5
Melanoma, Sarcoma	2	5	7	1	2	7	--	2	2
Total	6 (11,4%)	12 (22,8%)	34 (64,6%)	5 (12%)	14 (33%)	23 (55%)	5 (21%)	7 (29%)	12 (50%)

Adaptado de: Perez, C. A. e Sapareto, S. A., 1984, p. 4820 [77].

Tabela 5.2 – Correlação entre o tamanho do tumor (tratado por HT+RT) e a observação e remissão tumoral completa (60 min de hipertermia).

Tipo de neoplasia	Observação de remissão completa / N° de tumores no respectivo tamanho					
	diâmetro ≤ 2 cm volume ~ 4 cm ³		diâmetro 2,1 – 4 cm volume $\sim 4,6 - 32$ cm ³		diâmetro > 4 cm volume ~ 32 cm ³	
Cabeça e pescoço (carcinoma epidermóide)	12/19	(63,2%)	13/23	(56,5%)	1/11	(9,1%)
Parede torácica (adenocarcinoma)	8/19	(42,1%)	6/9	(66,7%)	5/9	(55,6%)
Melanoma	9/13	(69,2%)	5/6	(83,3%)	2/4	(50,0%)
Sarcoma	1/1	(100%)	3/4	(75,0%)	--	--
Total	30/52	(57,7%)	27/42	(64,0%)	8/24	(33,0%)

Adaptado de: Perez, C. A. e Sapareto, S. A., 1984, p. 4820 [77].

Num ensaio clínico de fase II, conduzido por Oleson *et al.*, 44 pacientes com sarcomas de partes moles (volume tumoral de 500 – 800 mm³) foram tratados combinando sessões de 60 min de HT (de 1 a 2 vezes por semana, durante 5 semanas) realizadas de 30 – 60 min após cada paciente ser tratado por RT (dose igual a 50 Gy). De 4–5 semanas depois de finalizado o tratamento, era feita a excisão do tumor de cada paciente e, se fosse identificada uma porção de tecido necrosado $\geq 80\%$ do volume tumoral total, então, este resultado era identificado como um achado clínico de paciente com remissão tumoral completa (RC). Em 27 tumores (61,4% dos pacientes) foi observada RC, dentre os quais a mediana da temperatura intratumoral (monitorada por 4 sondas em posições distintas) foi de $T_{50} = 42,5$ °C, resultando em $CEM43_{T_{50}} = 237$ min [27]. Em suas conclusões finais, Oleson *et al.* estabeleceram critérios de qualidade para uma hipertermia eficiente e sugeriram que: uma exigência mais rigorosa por, pelo menos, 95% de certeza de obtenção de RC (*e.g.* num ensaio clínico de fase III) com tumores sólidos em humanos (tamanho ~ 100 mm³) se tratados por RT (dose total ~ 5000 Gy) associada com HT, então, esse percentual de sucesso no tratamento é possível de ser conseguido com no mínimo $T_{90} = 42,5$ °C e $T_{50} = 44,6$ °C de temperatura intratumoral (mantida por durante 60 min), para um número médio de 7 sessões de aquecimento. O que resulta num limiar de $CEM43_{T_{90}} \cong 210$ min e $CEM43_{T_{50}} \cong 1273$ min, para observação de RC em tumores sólido em humanos [27], [28], [31].

Noutro estudo pré-clínico Crile, G. investigou o resultado da combinação RT+HT no tratamento de tumores sólidos de Sarcoma 180 (induzidos na sola das patas de camundongos SWR com idade entre 6–8 semanas) [79], [80]. Os diâmetros dos tumores eram de 7–10 mm (da ordem de 7 dias após a inoculação das células neoplásicas) e, para realização de HT, a pata de cada animal com tumor era mergulhada n'água a temperatura controlada de 44 °C por um tempo de 30–45 min. Os animais eram seguidos por 21–28 dias após HT e em mais da

metade dos achados de remissão tumoral completa (um total de 23 em 27 animais) a dose térmica entregue foi um $CEM_{43} \cong 66$ min. A dose de radiação ionizante administrada à estes animais (17,5 Gy) foi menos da metade necessária para obter o mesmo efeito de remissão completa no grupo controle (tratado apenas por RT). Entre os muitos ensaios realizados nesse extenso trabalho, também foi investigada a correlação entre as observações de remissão completa para o Sarcoma 180 e o histórico de exposição térmica dos animais (pontos abertos no gráfico da Figura 5.2).

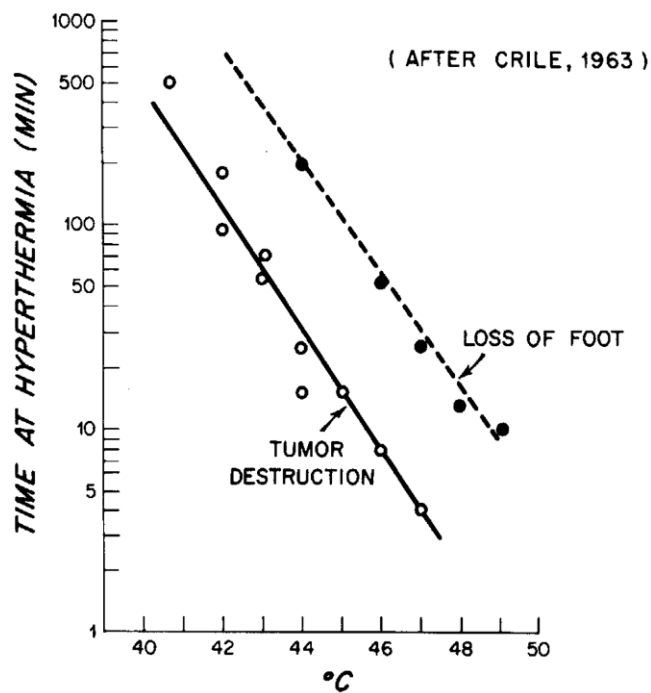


Figura 5.2 Tempo de hipertermia em função da temperatura de aquecimento (banho térmico à temperatura constante), necessário para provocar danos letais (necrose completa) no modelo tumoral murino de S180 (sólido e subcutâneo, com diâmetro variando de 7–10 mm) induzido na sola da pata de camundongos SWR (pontos abertos ○). Contudo, devido ao tipo de HT não localizada empregada nesses ensaios, foi observado, também, que para valores de CEM_{43} variando entre 400 min (44 °C por 200 min) e 640 min (49 °C por 10 min) a remissão completa ocorria, mas metade dos animais tratados nesse intervalo de dose térmica perdeu sua pata alguns dias após o banho térmico (pontos sólidos ●). Adaptado de: Suit, H. D., 1977, p. 483 [201].

E como em alguns animais a remissão completa parecia estar correlacionada com uma reação inflamatória no local do tumor após a HT. Num terceiro experimento, outros 21 animais receberam uma injeção intratumoral de 2,5 mg de serotonina, imediatamente antes da sessão de HT (ainda combinada com RT). Em 13 desses animais a remissão tumoral completa foi conseguida com metade da dose térmica dos achados anteriores, com temperatura intratumoral média igual a 44 °C por um tempo de 20 min. Como a serotonina é uma substância mediadora de inflamações agudas, as conclusões desse trabalho sugerem que uma reação inflamatória consequente de prolongadas exposições térmicas (20 – 30 min de

aquecimento entre 42 °C e 50 °C) pode favorecer, fortemente, a morte de células neoplásicas *in vivo* [79], [80], [201]. Contudo, devido ao tipo de HT não localizada empregada nesses ensaios (banho térmico da pata dos animais) – e diferentemente do que ocorre na técnica de hipertermia magnética com nanopartículas magnéticas, em que a entrega de calor é muito bem localizada [14] – foi observado, também, que para valores de CEM43 variando entre 400 min (44 °C por 200 min) e 640 min (49 °C por 10 min) a remissão completa ocorria, mas metade dos animais tratados nesse intervalo de dose térmica perdeu sua pata alguns dias após o banho térmico (pontos sólidos (●) no gráfico da Figura 5.2) devido a uma grave reação inflamatória no tumor e também nos tecidos normais [79], [80].

Em contraponto às informações até agora apresentadas nessa sessão de introdução, mais recentemente, em abril de 2016 numa publicação do *International Journal of Hyperthermia*, Gerard C. van Rhoon colocou em questionamento a validade de uma relação preditiva direta entre os achados da literatura sobre danos térmicos biológicos e valores calculados de CEM43 [41] (vide seção 1.2 no capítulo 1 e, também, o Apêndice A):

– Primeiramente, devido às limitações intrínsecas de uma modelagem matemática do tipo Arrhenius que falha, em muitos, mas não em todos os casos, ao superestimar a taxa de morte celular (perda de clonogenicidade) nos primeiros minutos da hipertermia moderada *in vitro* de células neoplásicas (aquecimento de 43–46 °C), o que pode levar a conclusões superotimistas sobre os limiares de danos térmicos. E tanto o cálculo de CEM43 (eq. 1.2.2, na seção 1.2), quanto do parâmetro de dano térmico (Ω) (eq. 1.2.3, na seção 1.2) é capaz de ajustar, apenas, parte de uma curva de sobrevivência, depois que a taxa de morte celular (por exposição térmica) atinge um valor aproximadamente constante. Um modelo matemático incapaz de fornecer qualquer parâmetro associado ao efeito transiente de termotolerância induzida (o “ombro” do gráfico) e que, principalmente, normaliza todas as diferentes espécies e os diferentes tecidos/órgãos a uma mesma temperatura de breakpoint (43°C) quando, definitivamente, isso não é verdade [75], [84].

– Segundo, parte de hipóteses muito simplificadoras considerando, por exemplo, a morte celular apenas como a perda de clonogenicidade em função da temperatura e do tempo de aquecimento. Contudo, o processo de morte celular por HT é muito mais complexo, intrincado e ainda não completamente elucidado. Envolvendo, além da perda da capacidade clonogênica, múltiplos processos paralelos de danos térmicos já

identificados na literatura: *e.g.* cascata de caspases que resultam na indução de apoptose, necrose, necroptose, danos funcionais irreversíveis na membrana celular, nulcear e no citoesqueleto [41], [75].

– E por fim, o principal fator limitante no uso das equações 1.2.2 e 1.2.3 (ou qualquer outra equação com múltiplos parâmetros de cálculo da dose térmica [75]) é o grau de precisão no monitoramento tridimensional da temperatura intratumoral em tempo real.

Neste capítulo 5 serão discutidos alguns resultados preliminares dos primeiros experimentos realizados em nosso laboratório objetivando o tratamento de tumores murinos de S180 (sólido e subcutâneo) por HM *in vivo* com NPM; correlacionando alguns de nossos achados de remissão tumoral parcial e total com limiares de CEM43 já identificados na literatura e associados a esse tipo de dano térmico. Contudo, os resultados que serão apresentados e discutidos na seção 5.3, não têm a devida significância estatística que se faz necessária a uma avaliação pré-clínica, adequada, da eficiência (ou não) de nossa metodologia experimental no tratamento de tumores sólidos, isto porque foram estudados apenas seis animais ($n = 6$). Assim, os dois principais objetivos da discussão que será estabelecida nas próximas páginas (sessões 5.3, 5.4 e 5.5) são: (i) a proposição de uma nova metodologia de mapeamento bidimensional da dose térmica entregue a cada animal, calculada na superfície da pele sobre a região do tumor subcutâneo, a partir de suas imagens de infravermelho; (ii) a utilização da informação conseguida com essa abordagem, na identificação e interpretação do efeito cumulativo da entrega de calor (intratumoral) para observação de remissão tumoral parcial, ou completa, no modelo tumoral murino de Sarcoma 180.

5.2 Protocolos experimentais

Todo o procedimento experimental descrito a seguir foi revisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (pareceres consubstanciados nº 039/2012 nº 098/2014) (vide Apêndice D).

Para os resultados discutidos nas seções 5.3.1 e 5.3.2 (a seguir no texto) doze animais foram utilizados ($n_{total} = 12$), camundongos *Swiss* albinos (machos com idade entre 6–8 semanas e massa corporal no intervalo de 37–40 g no dia do experimento), todos os doze animais com S180 sólido e subcutâneo na região da virilha direita tal que, dois destes não passaram por nenhuma sessão de HM com NPM (grupo controle $n = 2$), enquanto que os outros dez foram submetidos ao procedimento. A indução do tumor murino de S180 e manipulação dos animais durante os experimentos (*e.g.* sedação); os cuidados com sua manutenção no biotério (acomodação, alimentação e ciclo diurno-noturno); assim como seu monitoramento diário (consumo de ração seca, água, produção de excretas, massa corporal e tamanho do volume tumoral), tudo foi feito de acordo o protocolo já anteriormente descrito no capítulo 2 (vide seção 2.2).

Os experimentos realizados tiveram dois objetivos:

– Primeiramente, investigar o efeito cumulativo da entrega de calor para observação de regressão tumoral total no modelo tumoral murino de S180. E o parâmetro utilizado para avaliação da resposta biológica dos animais ao tratamento de HM com as NPM de $MnFe_2O_4$ – DMSA foi o valor de CEM43 (eq. 1.2.2 na seção 1.2) calculado de acordo com o histórico de exposição térmica de cada animal.

– Segundo, estabelecer uma relação preditiva capaz de estimar a temperatura acessada e o calor entregue intratumoralmente (durante HM com NPM) a partir do mapeamento bidimensional da dose térmica em tumores subcutâneos, calculada utilizando os dados de monitoramento por infravermelho da pele dos animais.

A configuração escolhida (de campo e frequência) para realização de todos os experimentos que serão discutidos nesse capítulo 5, assim como no capítulo 4, é aquela em que os camundongos são introduzidos no espaço entre duas bobinas coaxiais e paralelas à

semelhança de uma bobina de Helmholtz (segunda configuração experimental para realização de HM *in vivo*) conforme detalhado no capítulo 2 (vide seção 2.4).

Os dez animais com S180, e que foram submetidos ao procedimento de HM com as NPM de MnFe_2O_4 – DMSA, foram divididos em quatro subgrupos:

– Grupo 1 ($n = 2$): animais #1 e #2 cujos volumes tumorais no dia do tratamento por HM eram iguais a 751 mm^3 e 560 mm^3 , respectivamente. Cada animal foi submetido a 5 sessões (com duração de 30 min cada) de HM com NPM de MnFe_2O_4 – DMSA, sequenciadas e com intervalos de 20 min entre sessões (um total de 150 min de hipertermia). Cada camundongo passou pela primeira sessão de HM logo após receber (apenas uma vez) a injeção diretamente em seu tumor de $90 \mu\text{l}$ do FM, fracionada em três aplicações em três pontos distintos ao longo de seu eixo maior (correspondendo a uma massa de 2,3 mg de NPM injetada).

– Grupo 2 ($n = 2$): animais #3 e #4 cujos volumes tumorais no dia do tratamento por HM eram iguais a 392 mm^3 e 252 mm^3 , respectivamente. Cada animal foi submetido a 2 sessões (com duração de 30 min cada) de HM com NPM de MnFe_2O_4 – DMSA, sequenciadas e com intervalos de 20 min entre sessões (um total de 60 min de hipertermia). Cada camundongo passou pela primeira sessão de HM logo após receber (apenas uma vez) a injeção diretamente em seu tumor de $90 \mu\text{l}$ do FM, fracionada em três aplicações em três pontos distintos ao longo de seu eixo maior (correspondendo a uma massa de 2,3 mg de NPM injetada).

– Grupo 3 ($n = 2$): animais #5 e #6 cujos volumes tumorais no dia do tratamento por HM eram iguais a 845 mm^3 e 862 mm^3 , respectivamente. Cada animal foi submetido a, apenas, uma sessão (com duração de 30 min) de HM com NPM de MnFe_2O_4 – DMSA. Cada camundongo passou pela sessão de HM logo após receber (apenas uma vez) a injeção diretamente em seu tumor de $90 \mu\text{l}$ do FM, fracionada em três aplicações em três pontos distintos ao longo de seu eixo maior (correspondendo a uma massa de 2,3 mg de NPM injetada). (correspondendo a uma massa de 2,3 mg de NPM injetada).

– Grupo 4 ($n = 4$): identificados respectivamente como animais #7 (tumor: 997 mm^3), #8 (1.048 mm^3), #9 (1.132 mm^3) e #10 (1.161 mm^3) – onde todos receberam a injeção

de 90 μl do FM de MnFe_2O_4 – DMSA diretamente em seus tumores, fracionada em três aplicações em três pontos distintos ao longo de seu eixo maior. É importante ressaltar que o FM foi um pouco evaporado antes de ser utilizado nesse experimento, a fim de tornar sua concentração para mais elevada, resultando em $\cong 3,9$ mg de NPM injetadas (para o mesmo volume de 90 μl). Cada animal foi submetido a 30 min de HM na **mesma configuração experimental** que os animais de #3 à #6 (grupos 2 e 3): campo magnético (220 G), frequência (300 kHz) e posicionamento da câmera termográfica (em $\theta = 0^\circ$). A novidade desse experimento consiste no monitoramento da temperatura intratumoral – com a introdução de três fibras-ópticas a 5 mm de profundidade, em três pontos distintos (separados por $\cong 5\text{mm}$) ao longo do eixo maior do tumor de cada animal – e o monitoramento da temperatura superficial ficou limitado, apenas, à câmera termográfica.

Os animais foram mantidos sedados durante cada tratamento e, finalizadas as sessões de HM, foram seguidos por mais de 170 dias, tendo seu volume tumoral monitorado (*in vivo*) diariamente (medições do eixo maior e menor com um paquímetro digital). Aqueles animais que atingiram um volume tumoral $\geq 2.000 \text{ mm}^3$, de acordo com a recomendação da CEUA da UFG (vide seção 2.2, no capítulo 2), foram anestesiados com uma solução de 0,2 ml/100g de Ketamina (100 mg/ml) e Xilazina (100 mg/ml) e sacrificados por deslocamento cervical.

5.3 Resultados experimentais de remissão tumoral no modelo murino de Sarcoma 180.

Nesta seção 5.3 serão apresentados os resultados dos primeiros experimentos realizados em nosso laboratório objetivando o tratamento de tumores murinos de S180 (sólido e subcutâneo) por HM *in vivo* com NPM. Serão estudados os grupos experimentais 1, 2 e 3 (animais de #1 à #6), primeiramente, realizando o mesmo tipo de análise já apresentada no capítulo 3, de monitoramento termográfico por infravermelho da pele dos camundongos na região dos seus tumores (cujo controle continua sendo o valor da temperatura monitorada com um termômetro de fibra-óptica num ponto da pele dentro da região mais aquecida sobre o tumor subcutâneo) e a utilização desses dados de temperatura superficial para estimar o aquecimento intratumoral através dos modelos teóricos de Gescheit *et al.* [165], [202] e W. Andrä *et al.* [14], [171]. Também será calculada a dose térmica (pontual superficial) entregue a cada animal (durante cada sessão hipertermia a que foi submetido) a partir da equação proposta por Sapareto e Dewey [75], [77], [203] (cálculo do valor de CEM 43 através da eq. 1.2.2, apresentada na seção 1.2), utilizando os dados do termômetro de fibra-óptica colocado num ponto sobre a pele dos camundongos.

Inicialmente, é preciso esclarecer ao leitor que os dados de monitoramento termográfico dos animais #1 e #2 (Grupo 1) foram adquiridos com a objetiva da câmera termográfica em diferentes posições angulares (vide Tabela 5.3), relativamente à direção normal a superfície da pele dos camundongos na região do tumor. Isto porque esses dois animais, na verdade, foram primeiramente utilizados para realização do experimento de variação da posição angular da câmera termográfica, cujos resultados foram profundamente discutidos no capítulo 4 (vide seções 4.2 e 4.3) e que, naquele contexto, sua análise tinha por objetivo investigar o quão acurado (ou não) são as imagens de infravermelho na identificação do aquecimento tumoral por HM com NPM, isto em função do posicionamento da objetiva da câmera relativamente à direção normal a superfície da pele do camundongo na região do tumor. Uma das importantes conclusões obtidas nesse estudo apresentado no capítulo anterior provou que a configuração experimental ideal (mais acurada) de aquisição das imagens termográficas (durante a HM) é em $\theta = 0^\circ$ (com erro da ordem de $0,5^\circ\text{C}$).

Todavia, nos dias que se seguiram ao final das cinco sessões (150 min) de HM com NPM a que esses dois camundongos foram submetidos, o animal #2 apresentou remissão tumoral parcial e o animal #1 uma resposta biológica ainda melhor, ou seja, remissão tumoral completa. Esses dois achados nos motivaram a realização de novos experimentos (Grupos 2 e 3, descritos na seção anterior) a fim de investigar, mais adequadamente, o efeito cumulativo da dose térmica entregue (durante HM *in vivo* com NPM) na observação de remissão parcial (RP), ou completa (RC), do tumor murino de S180.

A Tabela 5.3 contém todos os dados experimentais de monitoramento da temperatura superficial (na região do tumor) para os animais #1 e #2, para cada uma das 5 sessões de 30 min de aquecimento intratumoral. Observa-se que, para o animal #1, a média da temperatura final (em 30 min) registrada pela câmera termográfica, na região mais aquecida da pele sobre o tumor, foi igual a $(49,1 \pm 0,4)^\circ\text{C}$ e a média dos valores medidos com a fibra-óptica num ponto dentro dessa mesma região foi igual a $(50,5 \pm 0,4)^\circ\text{C}$. Enquanto que, para o animal #2, os respectivos valores foram $(47,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ (por infravermelho) e $(49,0 \pm 1,6)^\circ\text{C}$ (com a fibra-óptica).

Tabela 5.3 – Dados experimentais de monitoramento da temperatura superficial (na região do tumor) para os animais #1 e #2.

Identificação						Temperatura na superfície da pele								
						Câmera termográfica						Fibra-óptica		
						Abdômen			Região mais aquecida sobre o tumor*			Sobre o tumor		
Animal	Volume tumoral	Massa de NPM	Tempo de HM	Sessões	Posição da câmera	T ₀ (°C)	T _r (°C)	ΔT (°C)	T ₀ (°C)	T _r (°C)	ΔT (°C)	T ₀ (°C)	T _r (°C)	ΔT (°C)
#1	751 mm ³	2,3 mg	150 min	1°	θ = 0°	32,7	33,2	0,5	30,0	48,4	18,4	30,16	50,52	20,36
				2°	θ = 15°	32,7	33,3	0,6	30,1	49,1	19,0	30,43	50,94	20,51
				3°	θ = 30°	32,4	33,0	0,6	30,3	49,1	18,8	30,87	50,18	19,31
				4°	θ = 45°	31,5	33,3	1,8	29,7	49,5	19,8	30,00	50,78	20,78
				5°	θ = 60°	32,0	33,9	1,9	29,7	49,5	19,8	30,14	49,95	19,81
#2	560 mm ³	2,3 mg	150 min	1°	θ = 0°	28,9	35,1	6,2	28,3	49,4	21,1	28,16	48,39	20,23
				2°	θ = 15°	32,5	36,6	4,1	30,8	48,4	17,6	30,70	50,22	19,52
				3°	θ = 30°	33,9	36,7	2,8	32,2	47,0	14,8	30,68	47,29	16,61
				4°	θ = 45°	32,4	35,8	3,4	31,5	45,4	13,9	31,85	51,16	19,31
				5°	θ = 60°	33,1	35,8	2,7	30,2	44,7	14,5	31,59	47,89	16,30

* **Média dos valores de temperatura** registrados pelos pixels de uma área circular (elemento de medida da temperatura denotado por *hottest region* nas Figuras 5.3 (A) e (D) abaixo no texto) com diâmetro igual a 5 px nas termografias dos animais #1 e #2, sempre construído na região mais aquecida da pele sobre os seus tumores.

Assim como na análise dos resultados experimentais apresentados no capítulo 3 (vide páginas 109 a 112, na seção 3.3), na região da pele sobre o tumor dos camundongos #1 e #2, e ao final dos 30 min de HM com as NPM (em cada sessão), novamente utilizamos uma

solução analítica (unidimensional) da equação de biocalor de Pennes (eq. 3.6) para a estudar o gradiente de temperatura superficial identificado nas imagens de infravermelho desses animais (regiões de mesma temperatura na forma de halos concêntricos vistos nas Figuras 5.3 (A) e (D) abaixo no texto).

Foi calculado o valor experimental $\Delta T_{exp} = T(r) - T_{abd}$, ou seja: a diferença entre a temperatura $T(r)$ em cada um dos pontos (elementos de medida) criados nas termografias dos animais #1 e #2 ao longo dos eixos maior e menor de seus tumores (também identificados nas Figuras 5.3 (A) e (D) abaixo no texto); e a temperatura num ponto distante sobre a pele do animal T_{abd} (e.g. a temperatura na região do abdômen do camundongo, inalterada pelo aquecimento produzido no tumor e nos tecidos vizinhos devido às NPM). Também foi calculado o valor teórico dessa mesma diferença através da eq. 5.1 (abaixo no texto), ou seja, $\Delta T = T(r, 0) - T(r \rightarrow \infty, 0)$ para cada animal (após 30 min de HM) (vide seção 3.3, p.109–112), utilizando novamente o modelo de condução térmica de uma fonte pontual de calor (intratumoral) com potência constante no tempo (\dot{Q}), conforme proposto por Gescheit *et al.* [14], [165], [202]:

$$\Delta T = T(r, 0) - T(r \rightarrow \infty, 0) = \frac{\dot{Q}}{2\pi} \int_0^{\infty} \frac{e^{-\lambda a} \lambda J_0(\lambda r)}{E + \kappa \lambda} d\lambda \quad (5.1)$$

onde $T(r \rightarrow \infty, 0) = T_{abd}$, $E = 12,5 \text{ W/m}^2 \cdot ^\circ\text{C}$, $\kappa = 0,4 \text{ W/m} \cdot ^\circ\text{C}$ [165], $a = z = 5,0 \text{ mm}$, $J_0(\lambda r)$ é a função de Bessel de ordem zero em coordenadas cilíndricas [170, p. 488] e o valor de \dot{Q} (parâmetro de ajuste) foi determinado para cada animal (em cada sessão de HM com NPM) ao longo das direções do eixo maior (\dot{Q}_{maior}) e do eixo menor (\dot{Q}_{menor}) de seu tumor, a partir dos valores de ΔT_{exp} em cada ponto nas imagens de infravermelho (são mostradas no texto apenas as termografias da 1ª sessão dos animais #1 e #2 nas Figuras 5.3 (A) e (D)).

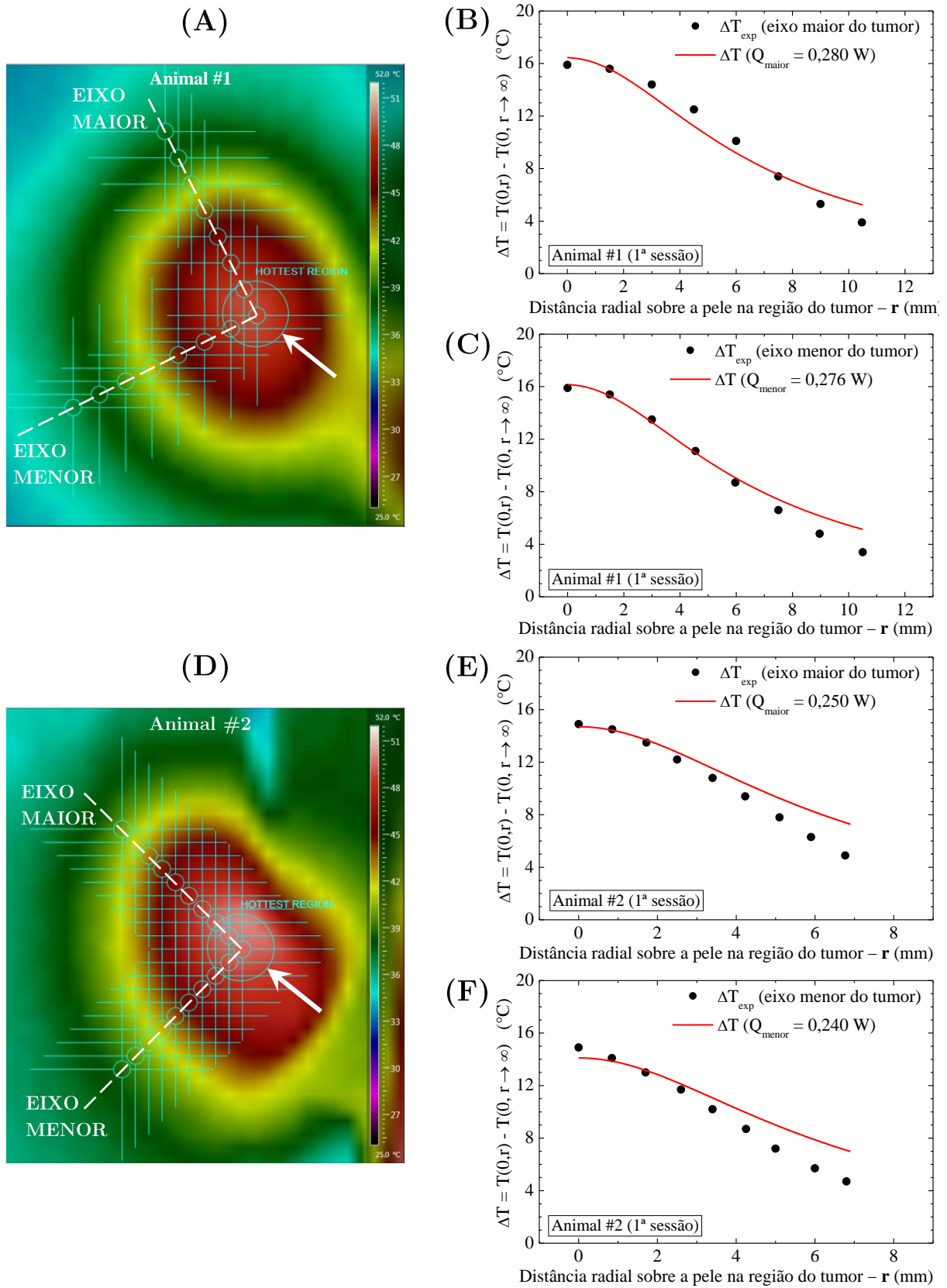


Figura 5.3 (A) e (D) são termografias dos animais #1 e #2 na região do tumor subcutâneo após 30 min da 1ª sessão de HM com NPM. As setas brancas indicam a área do elemento de medida (*hottest region*) com diâmetro de 5 px utilizado para monitorar a temperatura média na região mais aquecida da pele. Em (B) e (C) (para o animal #1), (E) e (F) (para o animal #2) são apresentados os gráficos com os valores de ΔT_{exp} (pontos \bullet) nas direções dos eixos maior e menor dos tumores, ajustados pelos valores teóricos de ΔT (linhas sólidas) utilizando o modelo de uma fonte pontual de calor com potência constante no tempo (eq. 5.1).

Nas Figuras 5.3 (B) e (C) (para o animal #1), (E) e (F) (para o animal #2) são apresentados os gráficos com os valores de ΔT_{exp} (pontos ●) ajustados pelos valores teóricos ΔT (linhas sólidas), nas direções dos eixos maior e menor dos tumores de cada animal (e somente para a 1ª sessão de HM com NPM, quando $\theta = 0^\circ$). Os valores que preenchem a coluna \dot{Q}_{med} na Tabela 5.4 (abaixo no texto) foram calculados através da média aritmética entre os valores de \dot{Q}_{maior} e \dot{Q}_{menor} que fornecem o melhor ajuste teórico (possível com a eq.5.1) para os valores de ΔT_{exp} *in vivo* na superfície da pele, nas direções dos eixos maior e menor dos tumores de cada camundongo.

Também foi utilizada novamente, assim como já visto no capítulo 3, a aproximação proposta por W. Andrä *et al.* [14], [171] que permite estimar teoricamente a variação de temperatura ocorrida dentro do tumor (ΔT_{intra}) (vide página 113, na seção 3.3): supondo que o volume intratumoral ocupado pelas NPM injetadas (quantidade em massa igual a 2,3 mg) corresponde a uma esfera de FM com densidade homogênea e cujo raio é estimado em 4,5 mm, levando em conta a profundidade de 5 mm em que é feita a injeção de FM e supondo a espessura da pele da ordem de 0,5 mm. Portanto, os valores nas colunas SLP e ΔT_{intra} (*in vivo*) para os animais #1 e #2 (por sessão de HM) mostrados na segunda parte da Tabela 5.4 são calculados teoricamente através das equações 5.2 e 5.3, respectivamente:

$$SLP = \frac{\dot{Q}_{med}}{2 mg} \quad (5.2)$$

$$\Delta T_{intra} = \frac{\dot{Q}_{med}}{V_{mag}} \cdot \frac{R_{mag}^2}{2k} \quad (5.3)$$

Tabela 5.4 – Estimativa do aumento da temperatura intratumoral (ΔT_{intra}) utilizando o modelo analítico de uma fonte pontual de calor (com potência constante \dot{Q}_{med}); do SLP_{in vivo} (idealização de uma distribuição esférica intratumoral de NPM); e cálculo do CEM43 (pontual) na superfície da pele na região do tumor subcutâneo.

Identificação					Modelo de fonte pontual de calor			Dose térmica pontual (na superfície)			
Animal	Volume tumoral	Tempo de HM	Sessões	Posição da câmara	\dot{Q}_{med} (W)	SLP (W/g)	ΔT_{intra} (°C)	Δt (min)	T_{med} (°C)	CEM 43 (min)	ΣCEM 43°C (min)
#1	751 mm ³	150 min	1°	$\theta = 0^\circ$	0,278	139,0	18,4	28,2	48,9	1.684	9745
			2°	$\theta = 15^\circ$	0,270	135,0	17,9	28,2	49,2	2.073	
			3°	$\theta = 30^\circ$	0,270	135,0	17,9	28,2	48,4	1.191	
			4°	$\theta = 45^\circ$	0,280	140,0	18,6	28,2	50,0	3.610	
			5°	$\theta = 60^\circ$	0,260	130,0	17,2	28,1	48,4	1.187	
#2	560 mm ³	150 min	1°	$\theta = 0^\circ$	0,245	122,5	16,2	26,4	46,7	343	4984
			2°	$\theta = 15^\circ$	0,210	105,0	14,2	28,2	48,7	1466	
			3°	$\theta = 30^\circ$	0,185	92,5	12,3	27,0	46,2	248	
			4°	$\theta = 45^\circ$	0,165	82,5	10,9	28,8	49,5	2607	
			5°	$\theta = 60^\circ$	0,155	77,5	10,3	26,4	46,6	320	

A terceira parte da Tabela 5.4, acima, também inclui os valores de CEM43 calculados usando os dados de monitoramento da temperatura na região mais aquecida da pele sobre o tumor, por sessão de HM com NPM, a partir da equação proposta por Sapareto e Dewey (eq. 5.4) [75], [77], [203]:

$$CEM43 = \sum_{i=1}^N \Delta t_i R_{CEM}^{(43-T_i)} \quad (5.4)$$

onde Δt_i é o intervalo de tempo de aquecimento, T_i é a temperatura média no intervalo de tempo Δt_i e o coeficiente $R_{CEM} = 0,25$ (se $T < 43^\circ\text{C}$), ou $R_{CEM} = 0,5$ (se $T \geq 43^\circ\text{C}$) significando que a taxa de morte celular dobra para cada aumento de 1°C acima da temperatura de 43°C (*breakpoint*) (vide seção 1.2).

É importante ressaltar que, numa única sessão de HM com NPM, o histórico de exposição térmica do animal é subdividido em dois intervalos de tempo, tal que: um primeiro valor de CEM43 é calculado no intervalo tempo enquanto $T < 43^\circ\text{C}$ (a temperatura da pele na região do tumor) e, depois, somado com um segundo valor de CEM43 calculado no intervalo de tempo em que a temperatura da pele na região se mantém acima da temperatura de *breakpoint*, ou seja $T \geq 43^\circ\text{C}$. Então, a dose térmica total, ao final das cinco sessões de HM com NPM, é calculada como a soma dos valores de $\Sigma CEM43$ em cada sessão (última coluna da Tabela 5.4, acima no texto).

E como nem todos os dados de monitoramento termográfico dos animais #1 e #2 (Grupo 1) foram todos adquiridos com a objetiva da câmera termográfica direcionada perpendicularmente à pele dos camundongos, então, os valores de CEM43 foram calculados utilizando os dados de temperatura adquiridos com a fibra-óptica em apenas um ponto dentro da região de maior aquecimento da pele sobre o tumor (identificável na imagem termográfica). Ainda na Tabela 5.4 vemos que, para o animal #1, em apenas 1,8 min a temperatura superficial na região do tumor já acessava o valor de 43°C (em todas as cinco sessões de HM com NPM) e que, na média, manteve-se por 28,2 min acima desse patamar, tal que, a temperatura média (acima da temperatura de *breakpoint*) por sessão variou de 48,4–50,0 °C, resultando em um valor de CEM43 (por sessão) variando de 1187 – 3610 min. Um aquecimento nesse intervalo de temperaturas (acima de 48°C) e por um tempo maior que 20 min é característico de um regime ablativo [41], [197], [203]. Assim como o valor total de dose térmica ($\Sigma\text{CEM43} = 9745$ min), calculado na superfície em apenas um ponto, entregue ao animal #1 no final de cinco sessões, é da mesma ordem de grandeza de valores intratumorais tipicamente observados em resultados da literatura (CEM43 $\sim 10^4$ – 10^{10} min) associados à identificação e delimitação tecidual (*in vivo*) de necrose causada por ablação (volumes não perfundidos por corrente sanguínea – VNP), em experimentos clínicos com tumores sólidos fibrosos em humanos (cujo limiar de necrose considerado é $\text{CEM43} \geq 240$ min) aquecidos tanto por radiofrequência (RF) [204], como sonicados por HIFU (*high intensity focused ultrasound*) [88].

Ao compararmos os animais #1 e #2, que passaram pelo mesmo número de tratamentos, vemos pelo gráfico da Figura 5.4 (abaixo) que, em todas as cinco sessões, a eficiência de aquecimento do tumor do animal #1 parece ter sido melhor que do animal #2, ao passo que não temos seu monitoramento intratumoral e, somente por isso, não podemos afirmar categoricamente. É, também, interessante notar que ambos receberam, uma única vez, a injeção de 90 μl do fluido magnético de NPM de MnFe_2O_4 – DMSA (correspondendo a uma massa de 2,3 mg de NPM). E de uma sessão para outra a geração de calor monitorada na superfície da pele (e produzida dentro do tumor) oscilou, atingindo maior eficiência na 4ª sessão e, então, na 5ª sessão resultou num aquecimento menor que na 1ª. Esse comportamento parece sugerir que as fontes de calor, ou seja, as nanopartículas magnéticas estão se redistribuindo espacialmente na região intratumoral como consequência do aumento de temperatura. De tal forma que a cada nova seção de hipertermia uma configuração de centros de calor espacialmente diferente fornece uma nova dose de calor para a matriz tumoral.

Tal conclusão está em concordância com alguns resultados experimentais, que não são apresentados nessa tese de doutorado, mas foram obtidos em outros trabalhos que, paralelamente, também estão sendo desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa na UFG (resultados ainda não publicados), aonde a configuração espacial intratumoral *in vivo* das nanopartículas, antes e depois de cada hipertermia, é obtida imagiamento tomográfico por fluorescência molecular de nanocarreadores multifuncionais desenvolvidos pelo grupo.

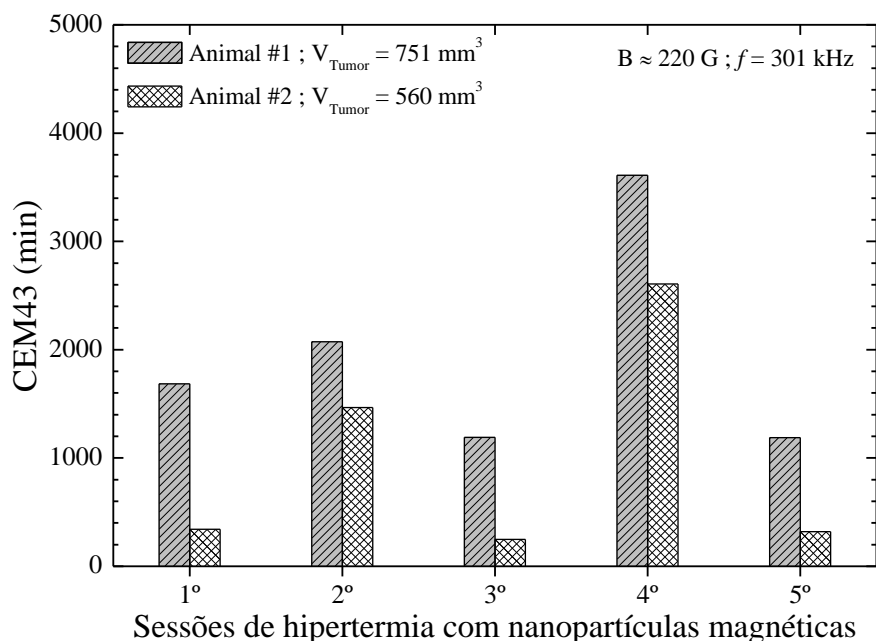


Figura 5.4 Dose térmica (CEM43) calculada a partir da temperatura monitora em apenas um ponto (fibra-óptica) na região mais aquecida da pele sobre o tumor S180 (sólido e subcutâneo). Nesse gráfico são comparadas (a cada sessão de 30 min de HM com NPM) as cinco doses recebidas pelos animais #1 e #2. A hipertermia foi realizada *in vivo* com nanopartículas magnéticas de MnFe_2O_4 – DMSA (diâmetro $d = 15$ nm e $\text{SLP}_{in vitro} = 126,2$ W/g), num campo magnético alternado $B \approx 220$ G e $f = 301$ kHz.

A seguir, a Tabela 5.5 contém todos os dados experimentais de monitoramento da temperatura superficial (na região do tumor) para os animais #3 e #4 (60 min de HM com NPM) e, também, para os animais #5 e #6 (30 min de HM com NPM):

Tabela 5.5 – Dados experimentais de monitoramento da temperatura superficial (na região do tumor) para os animais #3 e #4 (grupo 2), #5 e #6 (grupo 3).

Identificação						Temperatura na superfície da pele								
						Câmera termográfica						Fibra-óptica		
						Abdômen			Região mais aquecida sobre o tumor*			Sobre o tumor		
Animal	Volume tumoral	Massa de NPM	Tempo de HM	Posição da câmera	Sessões	T ₀ (°C)	T _f (°C)	ΔT (°C)	T ₀ (°C)	T _f (°C)	ΔT (°C)	T ₀ (°C)	T _f (°C)	ΔT (°C)
#3	392 mm ³	2,3 mg	60 min	θ = 0°	1°	33,5	37,5	4,0	3,9	51,3	19,4	31,9	48,8	16,9
					2°	33,8	37,5	3,7	30,8	53,5	22,7	31,3	52,4	21,1
#4	252 mm ³	2,3 mg	60 min	θ = 0°	1°	33,5	37,3	3,8	31,0	45,9	14,9	30,7	47,9	17,2
					2°	33,9	38,1	4,2	30,9	49,1	18,2	30,9	50,6	19,7
#5	845 mm ³	2,3 mg	30 min	θ = 0°	--	28,8	33,7	4,9	26,5	47,1	20,6	26,83	46,51	19,68
#6	862 mm ³	2,3 mg	30 min	θ = 0°	--	25,7	34,1	8,4	24,2	43,8	19,6	25,38	43,50	18,12

* **Média dos valores de temperatura** registrados pelos pixels de uma área circular com diâmetro igual a 5 px nas termografias dos animais de #3 à #6 (cujas imagens de infravermelho não são mostradas no texto), esse elemento de medida é sempre construído na região mais aquecida da pele sobre os tumores dos camundongos (*e.g.* vide Figuras 5.3 (A) e (D) acima no texto).

Já a Tabela 5.6 abaixo, contém os valores calculados (por animal e por sessão de HM) de \dot{Q}_{med} – empregando novamente o modelo proposto por Gescheit *et al.* [165], [202] de uma fonte pontual intratumoral de calor e com potência constante no tempo, utilizando as equações 5.1, e 5.2 e 5.3 (as imagens termográficas e as curvas de ΔT_{exp} dos animais de #3 à #6 não são mostradas no texto) – os valores de SLP e ΔT_{intra} utilizando a aproximação proposta por W. Andrä *et al.* [14], [171]; e a terceira parte da Tabela 5.6 é preenchida com os valores de CEM43 calculados através da eq. 5.4 utilizando os dados de temperatura adquiridos com a fibra-óptica em apenas um ponto dentro da região de maior aquecimento da pele sobre o tumor (identificável na imagem termográfica):

Tabela 5.6 – Estimativa do aumento da temperatura intratumoral (ΔT_{intra}) utilizando o modelo analítico de uma fonte pontual de calor (com potência constante \dot{Q}_{med}) e do $SLP_{in vivo}$ (idealização de uma distribuição esférica intratumoral de NPM); cálculo do CEM43 (pontual) na superfície da pele na região do tumor subcutâneo.

Identificação					Modelo de fonte pontual de calor			Dose térmica pontual (na superfície)			
Animal	Volume tumoral	Tempo de HM	Posição da câmara	Sessões	\dot{Q}_{med} (W)	SLP (W/g)	ΔT_{intra} (°C)	Δt (min)	T_{med} (°C)	CEM 43 (min)	$\Sigma CEM 43^{\circ}C$ (min)
#3	392 mm ³	60 min	$\theta = 0^{\circ}$	1 ^o	0,258	129	17,1	26,4	47,0	422	4044
				2 ^o	0,290	145	19,2	26,4	50,1	3622	
#4	252 mm ³	60 min	$\theta = 0^{\circ}$	1 ^o	0,160	80	10,6	27,0	46,6	328	2659
				2 ^o	0,205	102	13,6	27,6	49,4	2331	
#5	845 mm ³	30 min	$\theta = 0^{\circ}$	--	0,240	120	15,9	23,4	45,6	142	142
#6	862 mm ³	30 min	$\theta = 0^{\circ}$	--	0,170	85	11,3	15,0	43,4	20	20

Todos os animais foram monitorados diariamente por mais de 90 dias após a realização das sessões de HM com NPM, em particular, o animal #1 por mais de 180 dias. A Figura 5.5 (A) é um gráfico da evolução tumoral dos seis animais (grupos 1, 2 e 3) em função dos dias após hipertermia, comparativamente ao grupo controle (dois animais não tratados). Enquanto que, a Figura 5.5 (B) é um gráfico da dose térmica pontual total (calculada na superfície da pele sobre o tumor subcutâneo) para cada animal, utilizando os valores de temperatura obtidos com o termômetro de fibra-óptica.

hipertermia). Acontece que, estes três animais (após o final de todas as suas sessões de HM com NPM) apresentaram queimadura e uma reação inflamatória intensa na região do tumor aquecido: começando por um edema subcutâneo (grande inchaço e vermelhidão aguda) já nas três primeiras horas após a última hipertermia, seguido de lesão espessada e com formação de escaras (necrose da derme) nas primeiras 24h, mas com progressiva cicatrização nos primeiros 15–20 dias. As seqüências de imagens da Figura 5.6 são fotografias das lesões dos animais #2 e #4 que apresentaram remissão tumoral parcial, com recidiva do crescimento tumoral em um pouco mais que 18 dias após o tratamento. Em particular para o animal #1 (Figura 5.7), o único que apresentou remissão tumoral completa, além de suas fotografias também são mostradas duas imagens de tomografia por fluorescência: onde foi utilizado um marcador molecular alvo específico (IntegriSense™ 750, Perkin Elmer®) fluorescente no comprimento de onda $\lambda = 750$ nm, que permite a visualização e quantificação *in vivo* da integrina $\alpha_v\beta_3$ nas células neoplásicas de S180 bem como na neovasculatura, para monitorar o crescimento tumoral, a angiogênese tumoral e a eficácia do tratamento [205]. A primeira tomografia foi feita no dia zero, minutos antes de sua primeira sessão de HM (mas 24 h após a injeção do agente de contraste) identificando a existência do tumor (dia zero na Figura 5.7); e uma segunda tomografia no 41º dia após o animal receber as cinco doses térmicas, um resultado biomolecular que atesta a observação de remissão tumoral completa no animal #1 (ao menos nessa janela de tempo).

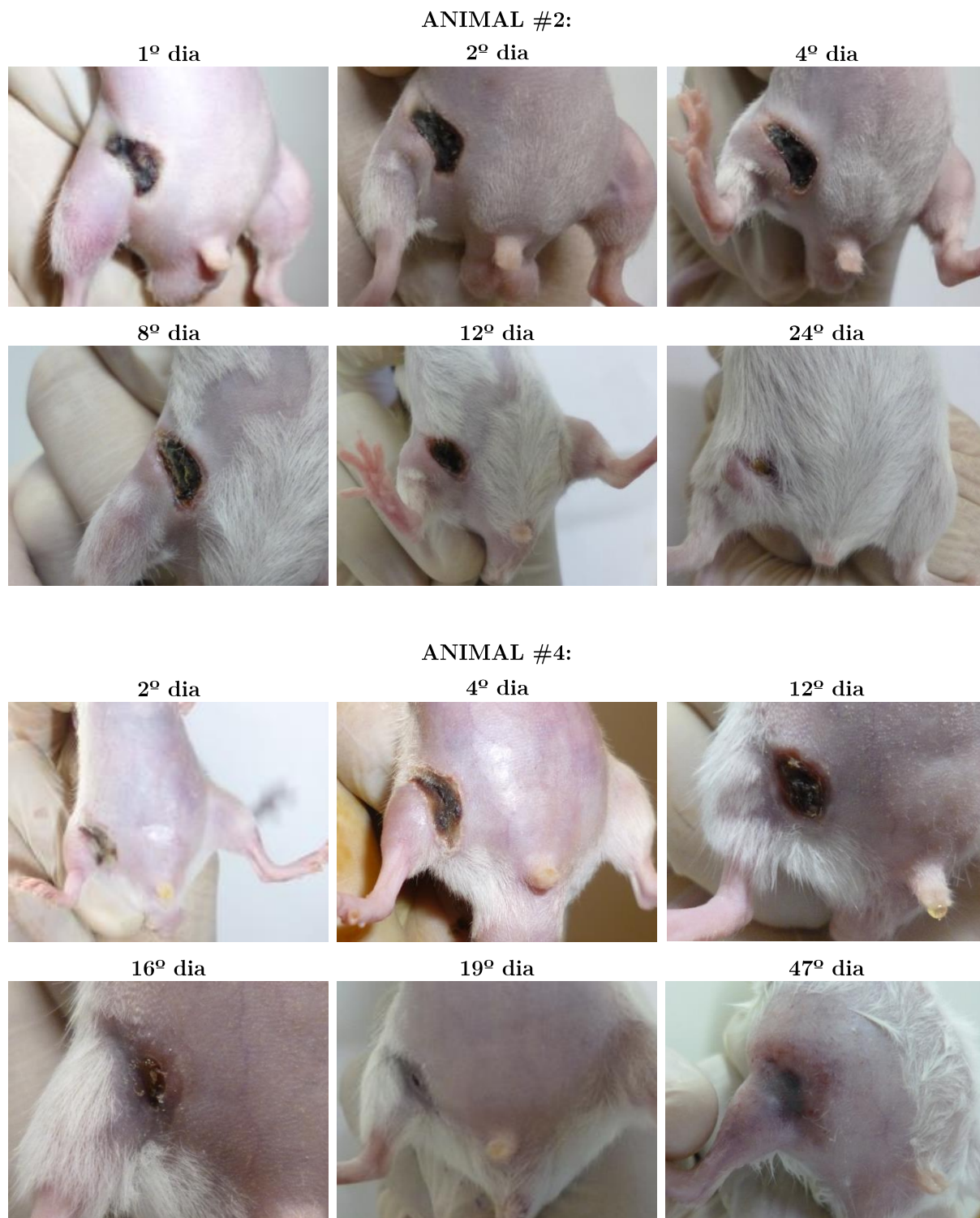


Figura 5.6 Fotografias dos tumores do animal #2 que passou por 150 min de HM com NPM (primeiras duas linhas) e do animal #4 que passou por 60 min de HM com NPM (últimas duas linhas). São registros do monitoramento diário após o tratamento. É possível observar as lesões (queimaduras) na região do tumor tratado: uma reação inflamatória aguda seguida de lesão espessada e com formação de escaras (necrose epidermal) nas primeiras 24 h, mas com progressiva cicatrização nos primeiros 15–20 dias.

ANIMAL #1:

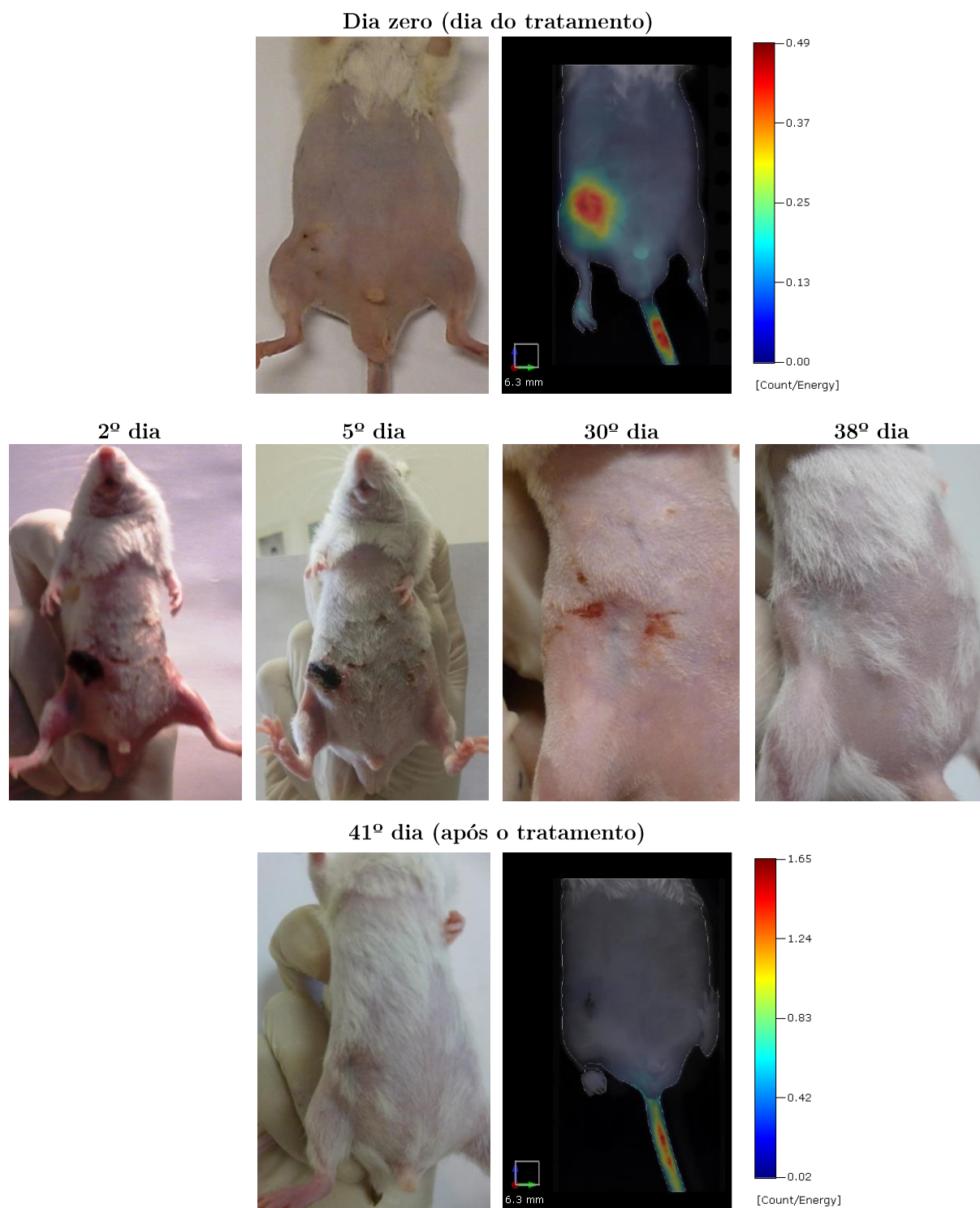


Figura 5.7 Fotografias do animal #1 que passou por 150 min de HM com NPM, são registros do monitoramento diário do tumor após o tratamento. Foram realizadas tomografias de fluorescência *in vivo* para imageamento do tumor antes (dia zero) e depois do tratamento (no 41º dia): utilizou-se um marcador molecular de integrina (IntegriSense™ 750, Perkin Elmer®) e é fluorescente em 750 nm. Esse animal foi monitorado por mais de 170 dias e foi o único que apresentou remissão tumoral completa. Como a injeção endovenosa do agente de contraste é feita na veia lateral da cauda do animal, isto explica a sua fluorescência na imagem.

Os animais #5 e #6 (30 min de HM com NPM) apresentaram apenas eritema e um pouco de inchaço (nas primeiras 2–3 horas após hipertermia), mas sem nenhuma lesão ou intensa reação inflamatória. O animal #3 morreu na primeira hora após sua 2ª sessão de HM (aparentemente por efeitos da sedação administrada).

É interessante notar que, os animais que tiveram uma reação inflamatória aguda seguida de necrose epidermal, apresentaram a melhor resposta biológica ao aquecimento provocado com as NPM de MnFe_2O_4 – DMSA. Este é um resultado coerente com outros da literatura, que comprovam um aumento de até 50% na eficiência de obtenção de remissão completa de tumores de S180 tratados *in vivo* por radioterapia combinada com hipertermia, seguida pela indução de reações inflamatórias agudas em consequência do aquecimento tumoral [79], [80].

Entre os seis animais avaliados até agora (nessa seção 5.3), apesar de o animal #4 (60 min de HM com NPM e $\text{CEM}_{43} = 2659$ min) ter recebido uma dose térmica superficial bem menor que o animal #2 (150 min de HM com NPM e $\text{CEM}_{43} = 4984$ min), sua resposta à terapia térmica foi melhor. Possivelmente, porque o seu volume tumoral no dia do tratamento (252 mm^3) era, aproximadamente, metade do volume tumoral do animal #2 (560 mm^3) e, como já observado por Perez, C. A. e Sapareto, S. A. [77] em estudo clínico randomizado com mais de cem pacientes (tumores de cabeça e pescoço (53), parede torácica (37), melanoma (23) e apenas 1 paciente com sarcoma de partes moles) tratados com a associação de RT+HT onde um aquecimento intratumoral $\sim 42^\circ\text{C}$ era mantido por 60 min (calor gerado por uma fonte de micro-ondas): quanto menor o tamanho do tumor melhor é sua resposta à hipertermia. Contudo, ao menos para o nosso modelo experimental de tumor murino e para a nossa metodologia de tratamento *in vivo*, apenas o observado com os animais #2 e #4 não é evidência suficiente de uma regra geral.

Estes animais #2 e #4 apresentaram remissão tumoral parcial e é possível observar pelo gráfico da Figura 5.5 (A) que, o tumor do animal #2 tornou-se novamente mensurável (utilizando um paquímetro digital) a partir do 21º dia após HM (96 mm^3) e dobrando de tamanho (relativamente ao dia do tratamento) após o 46º dia de acompanhamento (1135 mm^2). Já o tumor do animal #4 tornou-se novamente mensurável somente a partir do 56º dia após HM (43 mm^3), dobrando de tamanho após o 74º dia depois do tratamento (570 mm^3). Também de acordo com a tabela Tabela 5.6, nas cinco doses térmicas que o animal #2 recebeu, sua temperatura média (num ponto da região mais aquecida da pele sobre o tumor)

manteve-se em $(47,5 \pm 1,5)^\circ\text{C}$ por mais de 26 min (em cada sessão); enquanto que a mesma medida para o animal #4 manteve-se em $(48 \pm 2)^\circ\text{C}$ por mais de 27 min, em cada uma das duas doses térmicas que recebeu. Outra evidência de que o procedimento de HM com NPM foi mais eficiente no animal #4 (relativamente ao animal #2).

É importante lembrar ao leitor que o objetivo principal da análise de todos os resultados experimentais obtidos com os animais de #1 à #6 é investigar o efeito cumulativo da entrega de calor (devido à realização de sucessivas hipertermias) para observação de remissão tumoral (parcial ou total) no modelo tumoral murino de S180. E que o parâmetro utilizado para avaliação da resposta biológica dos animais ao tratamento de HM com as NPM de MnFe_2O_4 – DMSA foi o valor de CEM43 calculado de acordo com o histórico de exposição térmica de cada camundongo. Nesse sentido, uma nova metodologia será construída nas próximas sessões 5.4 e 5.5, onde alguns dos resultados até agora apresentados serão revisitados e melhor interpretados nessa nova abordagem.

5.4 Metodologia de mapeamento bidimensional da dose térmica em tumores subcutâneos utilizando imagens de infravermelho.

Como já discutido na seção 1.2 do capítulo de introdução (dosimetria térmica), muitos autores questionam a validade do cálculo do CEM43 (na forma da eq. 1.2.2) para temperaturas ablativas argumentando, principalmente, que os limiares de danos térmicos identificados na literatura muitas vezes não estão corretos devido às limitações no monitoramento da temperatura, quase sempre restrito a poucos sensores (de 1 a 4) inseridos no tumor, subestimando assim o aquecimento intratumoral tridimensional [204]. Por exemplo, mesmo quando o mapeamento da temperatura intratumoral é feito pela técnica de imageamento termográfico por ressonância magnética nuclear (*e.g.* durante ablação de tumores sólidos por RF ou HIFU) os resultados da literatura dão conta de diferenças variando entre 7% a 42% na superposição dos volumes calculados de dose térmica entregue intratumoralmente (VDT), com os volumes não perfundidos por corrente sanguínea (VNP)

após ablação, ou seja, os VDT calculados subestimam o volume verdadeiramente necrosado devido à entrega de calor dentro do tumor [88], [204].

Insistimos na tese que o imageamento termográfico *in vivo* da superfície da pele na região do tumor (sólido e subcutâneo) em função do tempo durante uma sessão de HM com NPM, muito provavelmente, carrega informação quantitativa sobre a temperatura intratumoral. Uma vez que o perfil de temperaturas observado na superfície (halos de regiões de mesma temperatura e, aproximadamente, concêntricos com a região de maior aquecimento sobre o tumor, conforme vistos nas Figuras 5.3 (A) e (D) na seção anterior) é resultado do calor gerado intratumoralmente pelas NPM, propagado através de diferentes camadas teciduais não isotrópicas e com diferentes condutividades térmicas e taxas de perfusão sanguínea (e.g tecido tumoral, estroma, músculo, gordura e as diferentes camadas da derme). Nesse sentido, em nossos resultados experimentais, buscamos melhorar a precisão na determinação da dose térmica, que ainda será calculada na superfície da pele do animal, mas agora utilizando cada pixel das imagens termográficas como um termômetro na região de interesse sobre o tumor (ROI_{Tumor} – *region of interest on tumor*).

Assim, nesta seção 5.4 serão revisitados alguns dos resultados experimentais obtidos com os grupos experimentais 1, 2 e 3 (animais de #1 à #6). Porém, agora nossos objetivos são: primeiramente, estabelecer critérios e boas práticas (em HM *in vivo* com NPM) de monitoramento termográfico do efeito cumulativo da entrega de calor, na observação de remissão tumoral em tumor murino de sarcoma 180. E, segundo, estabelecer uma nova metodologia de mapeamento bidimensional do valor de CEM43 para tumores subcutâneos, calculado ponto a ponto da superfície da pele dos camundongos na região tumoral, a partir do monitoramento por infravermelho da temperatura.

Como já mencionado anteriormente no texto (vide seção 2.3, no capítulo 2), a resolução temporal da câmera termográfica utilizada em todos os nossos experimentos foi de 60 *fps* (frames por segundo). O que permite uma aquisição de 60 valores de temperatura a cada segundo por pixel da cena mostrada numa imagem termográfica (com incerteza de $\pm 2\%$ do valor de medido). Durante os procedimentos de HM *in vivo* relatados nesse capítulo 5 (animais de #3 à #10) a objetiva da câmera termográfica esteve sempre direcionada perpendicularmente ($\theta = 0^\circ$) (exceto para as quatro últimas hipertermias dos animais #1 e #2) e mantida a uma distância de 50 cm da superfície da pele do camundongo na região do tumor. A lente da objetiva da câmera possui uma distância focal igual a 19,31 mm e, quando

posicionada (em $\theta = 0^\circ$) à distância de 50 cm do alvo, o seu campo de visão (CV) corresponde a $45^\circ \times 34^\circ$ – definido como o ângulo horizontal (azimutal) \times ângulo vertical (polar) que pode ser visto a partir da lente da câmera termográfica (vide Figuras 5.8 (A) e (B)). Segundo especificações do fabricante da câmera [153] para o modelo que utilizamos, esse valor de CV define uma matriz de plano focal (MPF) com 640×480 pixels, correspondendo a uma superfície retangular plana real com dimensão vertical igual a 312 mm (campo de visão vertical – CVV) e dimensão horizontal igual a 416 mm (campo de visão horizontal – CVH) (vide Figura 5.8 (C)). O tamanho real do menor elemento de medida da temperatura com a câmera de infravermelho (campo de visão instantâneo – CVI) corresponde ao tamanho real de um pixel que, na configuração descrita acima, tem dimensão quadrada igual à $(0,65 \times 0,65) = 0,4225 \text{ mm}^2$ (vide Figura 5.8 (D)).

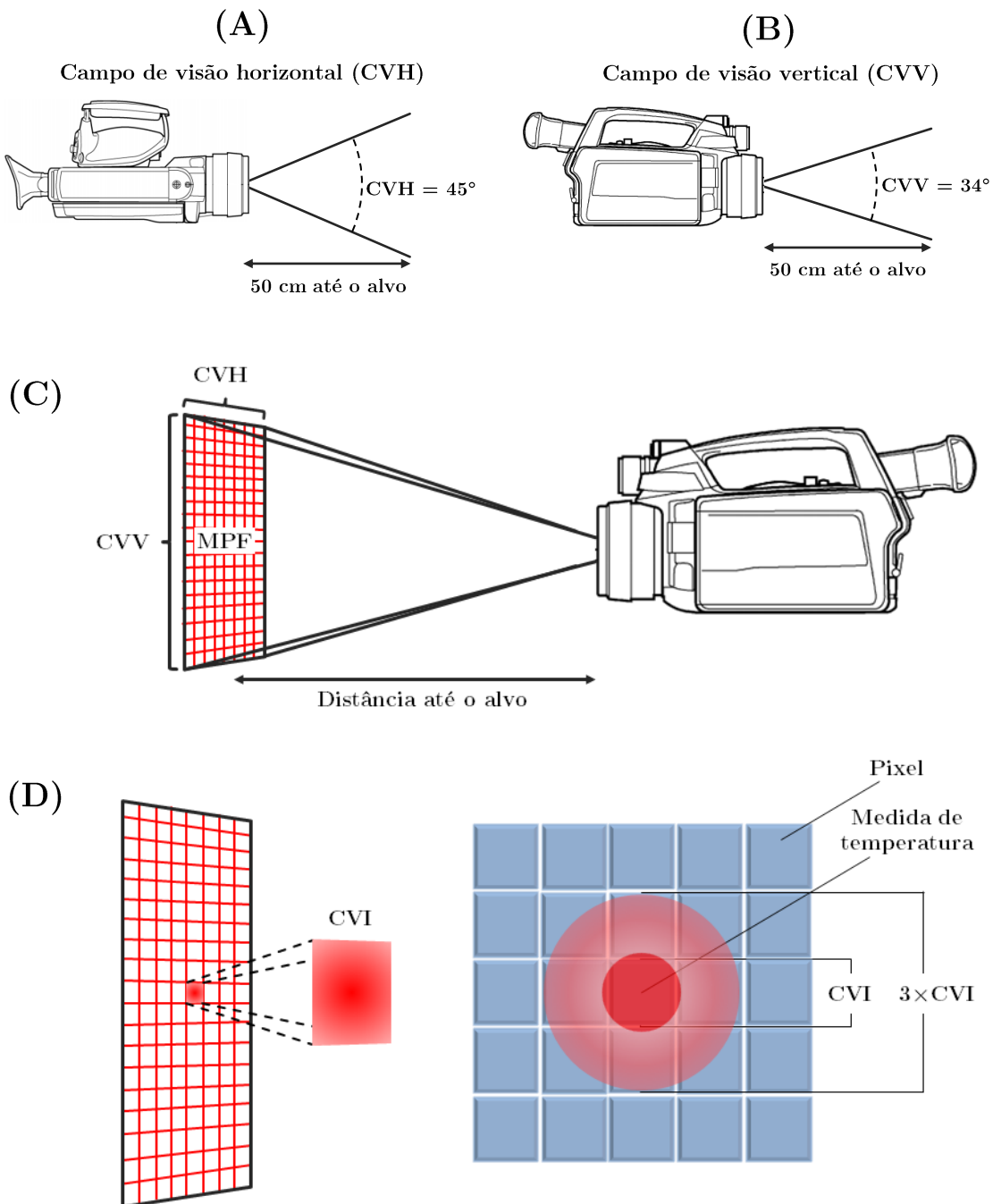


Figura 5.8 (A) ângulo horizontal (azimutal) e (B) ângulo vertical (polar) que podem ser vistos a partir da objetiva da câmera termográfica (distância focal da lente igual a 19,31mm), distante 50 cm do alvo (fonte de calor) definindo um campo de visão $CV = 45^\circ \times 34^\circ$. Em (C) são definidas as dimensões lineares reais do $CVH = 416$ mm (associado ao ângulo de abertura vertical) e do $CVV = 312$ mm (associado ao ângulo de abertura horizontal). Nessa configuração a MPF (640×480 px) corresponde a uma superfície plana real de aquisição aproximadamente igual a 1298 cm^2 . Em (D) $CVI = 0,65$ mm é tamanho da aresta do menor elemento de detecção da temperatura (dimensão de um pixel).

Na prática, o ROI_{Tumor} (vide Figura 5.9 abaixo) será sempre um elemento de medida da temperatura construído (utilizando o software da câmera – FLIR ResearchIR[®]) na forma de uma área retangular (ou quadrada) na imagem *in vivo* de infravermelho, de maneira a encerrar

dentro de seu perímetro todo o gradiente de temperatura identificado na termografia da superfície da pele do camundongo na região do tumor aquecido pelas NPM.

Por exemplo, ao reanalisarmos os dados termográficos do animal #4 (vide Figura 5.9), o ROI_{Tumor} selecionado em suas imagens de infravermelho a cada intervalo de tempo $\Delta t = 1$ min de hipertermia (ou seja, em $\Delta t = 1, 2, \dots, 30$ min) corresponde a uma matriz com dimensão de 25×25 pixels, isto implica em 625 “sondas” de temperatura dentro dessa região.

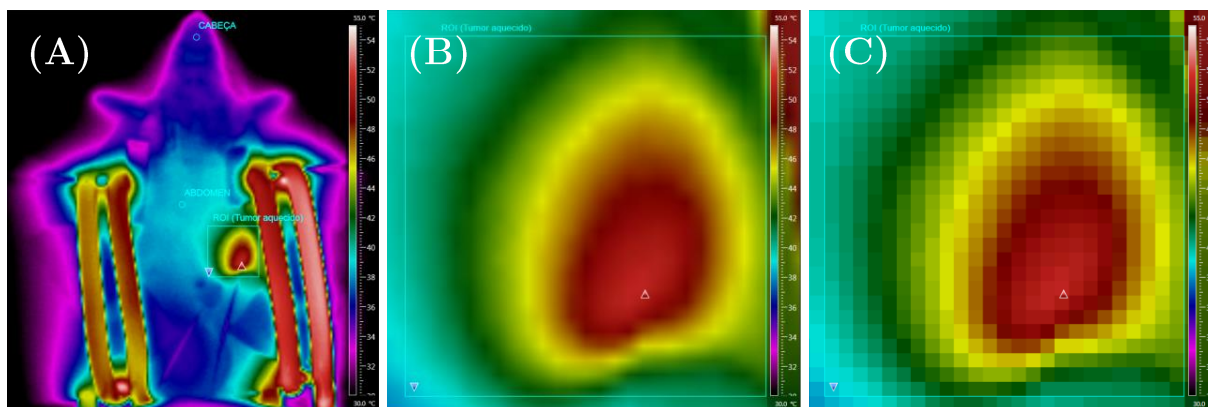


Figura 5.9 (A) Imagem termográfica do animal #4 no instante $t = 30$ min de sua segunda sessão de hipertermia. (B) Imagem termográfica ampliada na região de interesse sobre o tumor subcutâneo aquecido (ROI_{Tumor}). (C) Matriz de 25×25 pixels no ROI_{Tumor} : cada pixel é utilizado como uma sonda de temperatura na superfície da pele do animal #4. Os dados dessa matriz (com 625 “termômetros”) são utilizados para a criação de um mapa bidimensional de CEM43 (calculado na superfície) a cada intervalo de tempo $\Delta t = 1$ min, então, o somatório (por pixel) ao final de todo o histórico de exposição térmica do animal #4 (30 mapas) resulta na distribuição total de valores de dose térmica superficial (por pixel), calculados ao final de sua segunda sessão de HM com NPM.

E havendo suas imagens de infravermelho sido capturadas numa resolução de 640×480 pixels com CVI igual a 0,65 mm, então, esse ROI_{Tumor} corresponde aproximadamente a uma superfície de $(16,25 \times 16,25) \cong 264 \text{ mm}^2$, ou seja, uma densidade da ordem $\sim 2,4$ sondas/ mm^2 sobre a pele do camundongo na região do tumor. Nessa perspectiva, o valor de CEM43 (eq. 5.4) foi recalculado por pixel do ROI_{Tumor} a cada intervalo de tempo $\Delta t = 1$ min, o que nos permite construir um mapa bidimensional de CEM43 na superfície da pele sobre o tumor do animal, para cada minuto de aquecimento. Assim, ao final de uma sessão de 30 min de HM com NPM, o mapa de CEM43 mostra (por pixel do ROI_{Tumor}) o somatório de 30 valores calculados de dose térmica. Por exemplo, a Figura 5.10 (A) mostra o mapa da temperatura superficial extraído de uma imagem de infravermelho do ROI_{Tumor} (no instante $t = 31$ min) para o animal #4, ao final de sua 2ª sessão de HM com NPM. Já Figura 5.10 (B) é o correspondente mapa de CEM43 (somatório por pixel ao final de 30 min de aquecimento) do histórico de exposição térmica, também, apenas do segundo tratamento desse mesmo animal #4.

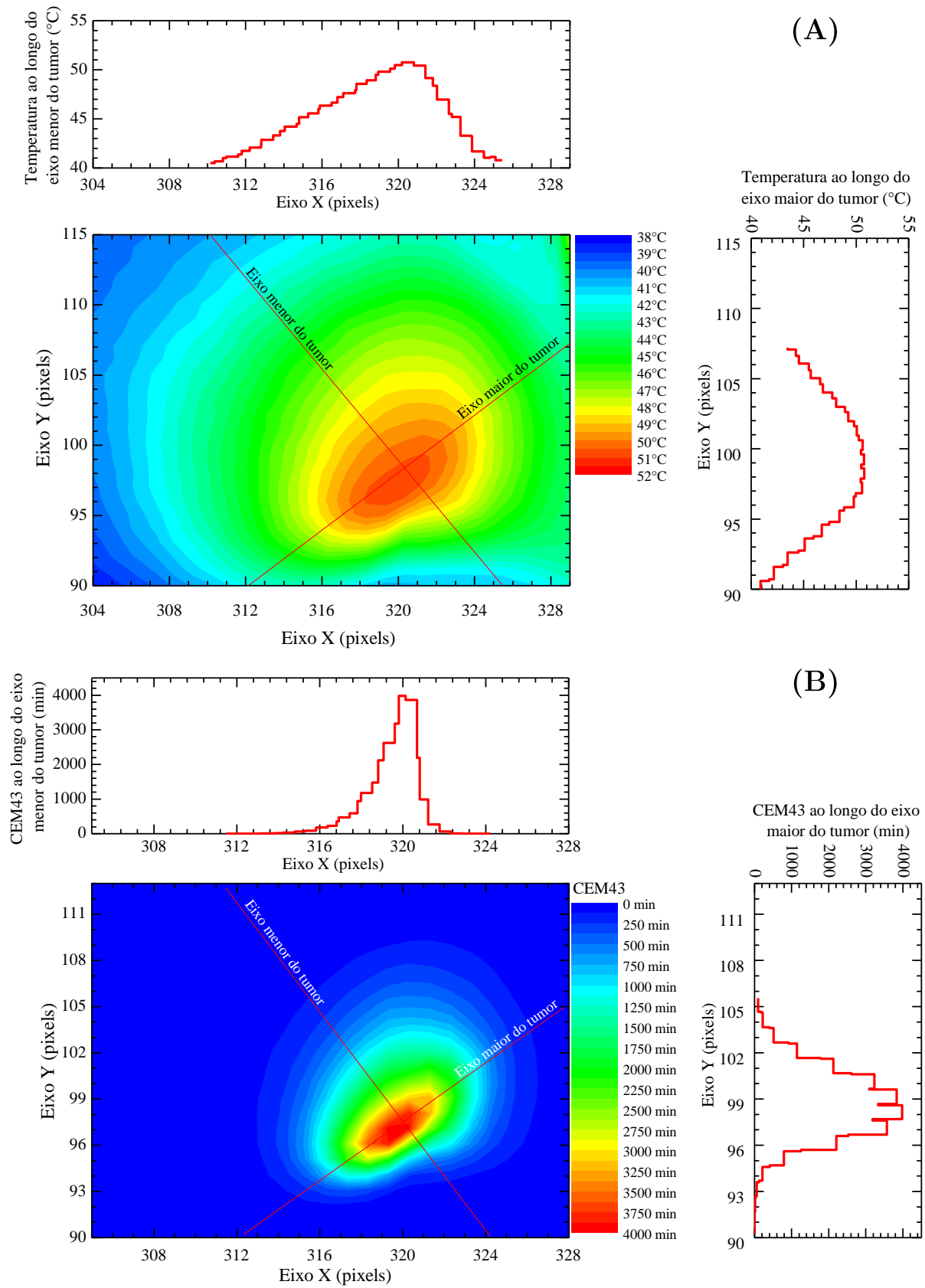


Figura 5.10 (A) Mapa da temperatura superficial extraído de uma imagem de infravermelho do ROI_{Tumor} (no instante $t = 30$ min) para o animal #4, ao final de sua 2^o sessão de HM com NPM. (B) Correspondente mapa de CEM43 (somatório em 30 min por pixel) do histórico de exposição térmica desse mesmo animal #4 (apenas para seu segundo tratamento).

Nessa nova abordagem, o mapa de CEM43 superficial total é construído através do somatório (por pixel) de todos os mapas gerados ao final de cada tratamento (e.g. após o animal ter sido submetido a 1, 2 ou 5 sessões de hipertermia). Novamente para o animal #4, o seu mapa de CEM43 superficial total equivale a uma soma de 60 valores calculados de dose térmica (por pixel), ou seja, o resultado final de duas sessões de 30 min de HM com NPM. As Figuras 5.11 (A) e (B), logo abaixo, permitem a comparação entre o mapa de CEM43 superficial total dos animais #4 e #5 que passaram, respectivamente, por 60 min e 30 min de HM com NPM de MnFe_2O_4 - DMSA. Note, também, na Figura 5.11 (B) que o mapa bidimensional de CEM43 do animal #5 está numa escala muito menor (de 0 min à 375 min) em comparação com o animal #4 (de 0 min à 4250 min), de outra forma, não seria possível a comparação entre os dois camundongos uma vez que a dose de calor entregue ao #5 foi muitíssimo menor em relação ao #4.

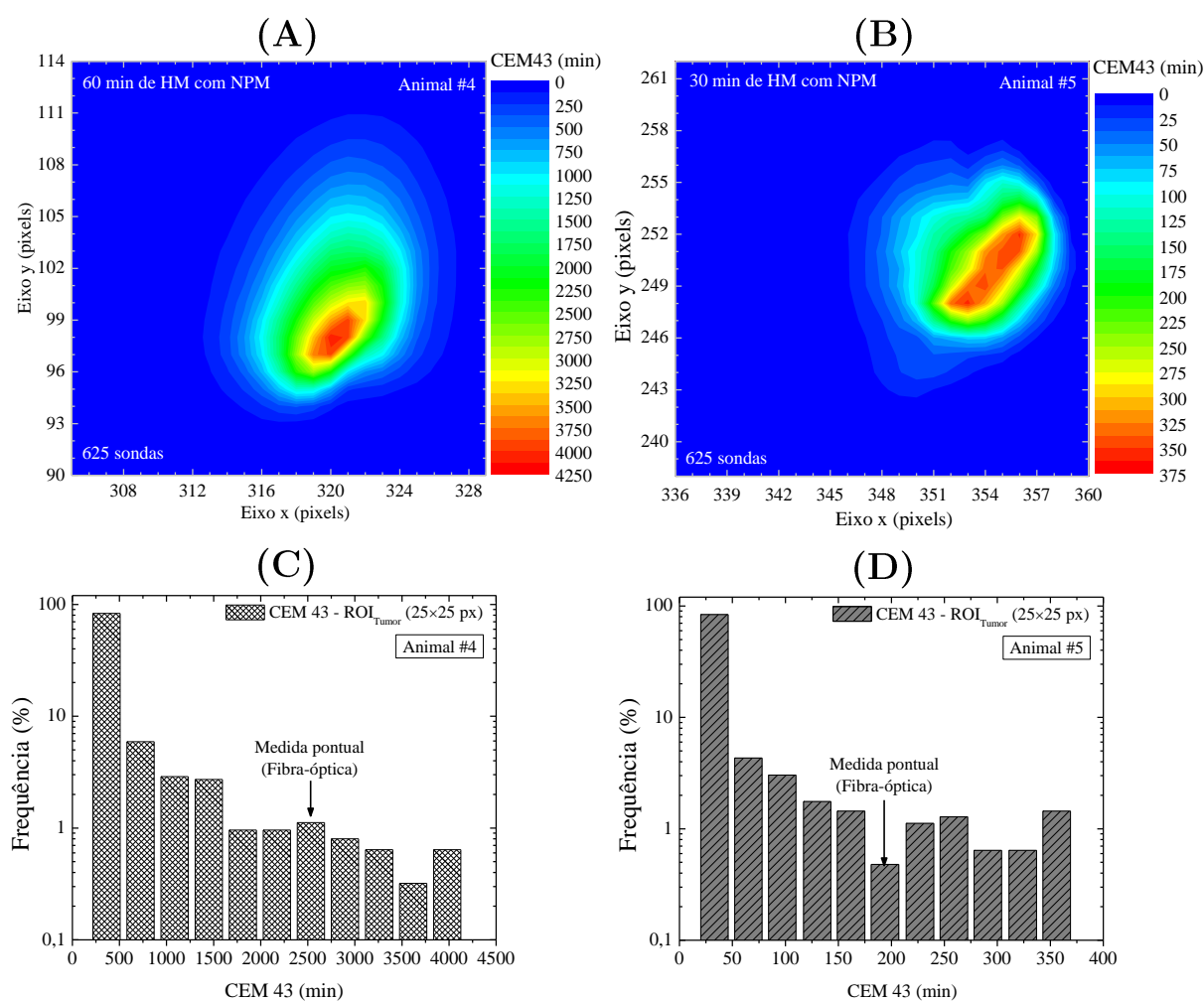


Figura 5.11 (A) e (B) são mapas de CEM43 superficial total dos animais #4 e #5, respectivamente, 60 min e 30 min de HM com NPM de MnFe_2O_4 - DMSA. Note em (B) que o mapa bidimensional de CEM43 do animal #5 está numa escala muito menor (de 0–375 min) relativamente ao animal #4 (de 0–4250 min), de outra forma não seria possível a comparação, pois os valores de CEM43 superficial do #5 foram muitíssimo menores. (C) e (D) são os correspondentes histogramas de valores totais de CEM43 calculados na superfície para o ROI_{tumor} dos animais #4 e #5. O ROI_{tumor} escolhido nos dois animais corresponde a uma matriz de 25×25 pixels, ou seja, 625 sondas de temperatura sobre a pele na região do tumor.

Já as Figuras 5.11 (C) e (D) acima, mostram respectivamente os histogramas da frequência de valores totais de CEM43 calculados na superfície para o ROI_{tumor} dos animais #4 (que passou por 60 min de HM com NPM) e #5 (que passou por 30 min de HM com NPM). Para a contagem do número de elementos de cada classe (frequência dos valores de CEM 43) foram obedecidos os critérios para a determinação dos intervalos de classe de Sturges¹⁰ [206].

É fácil perceber, por esses dois histogramas, como a utilização de apenas um termômetro de fibra-óptica – propositalmente colocado num ponto dentro da região de maior aquecimento da pele sobre o tumor subcutâneo – reporta valores de temperatura em função do tempo de aquecimento, associados a uma faixa muitíssimo estreita do conjunto de N valores de dose térmica superficial total, calculados pixel a pixel, através do mapa bidimensional de CEM43.

Os valores totais de dose térmica pontual calculada para os animais #4 e #5 utilizando os dados da fibra-óptica na superfície (vide Figura 5.5 (B)) foram, respectivamente, CEM43 = 2.658 min e CEM43 = 142 min. Nos histogramas do mapa de dose térmica superficial total de cada um desses camundongos, respectivamente, estes dois valores estão dentro de um intervalo correspondente a 1,5% dos 625 valores calculados dentro do ROI_{Tumor} do animal #4 (seta na Figura 5.11 (C)) e apenas 0,5% dos 625 valores calculados dentro do ROI_{Tumor} do animal #5 (seta na Figura 5.11 (D)).

É considerável a não uniformidade da temperatura superficial que, em nossos experimentos, há alguns pontos da pele do camundongo sobre o tumor (dentro do ROI_{Tumor}) diferindo por até 10°C durante uma sessão de 30 min de HM com NPM. Obviamente, isso resulta numa distribuição superficial também não uniforme dos valores calculados de CEM43 dentro do ROI_{tumor}. Portanto, é intuitivo buscar avaliar qual o percentual de valores calculados de CEM43 na superfície que, provavelmente, está mais fortemente associado à resposta biológica de cada animal à terapia térmica.

¹⁰ O número k de intervalos para cada conjunto discreto de observações com $N = 625$ valores de CEM 43 calculados na superfície (dentro do ROI_{Tumor} de cada camundongo) pode ser calculado como: $k = 1 + 3,322(\log_{10} N)$ (fórmula de Sturges [206]). O tamanho C de cada intervalo de classe é obtido pela divisão do valor R da diferença entre o maior e o menor valor de CEM 43 dentro desse espaço amostral (ou seja, $R = CEM\ 43_{\max} - CEM\ 43_{\min}$), pelo número de intervalos k : $C = R / k$. Por fim, para que essa frequência pudesse ser expressa em valores percentuais (%), a contagem dentro de cada intervalo de classe foi dividida por N .

Um método já bem estabelecido na literatura [28], [31], [41] consiste em analisar a distribuição de valores de temperatura (registrados por diferentes sensores colocados em posições distintas dentro de um tumor sólido) por meio de percentis do espaço amostral de medidas: *e.g.* a determinação da mediana das temperaturas intratumorais (denotada por T_{50}) e cujo valor corresponde à temperatura excedida por 50% de todas as medições realizadas num mesmo instante de tempo. Equivalentemente, também é possível avaliar a uniformidade (espacial) da temperatura intratumoral determinando o percentil T_{90} , ou seja, o valor de temperatura que é excedido por 90% das medidas intratumorais. E fazendo a transposição dessa ideia para o cálculo da dose térmica (eq. 5.4) é possível, por exemplo, calcular os valores de $CEM43_{T50}$ e $CEM43_{T90}$ utilizando, respectivamente, os valores de T_{50} e T_{90} das temperaturas médias registradas por cada termômetro (em diferentes posições), num mesmo intervalo de tempo Δt .

Agora, no contexto da metodologia que estamos propondo de mapeamento superficial da dose térmica entregue a cada animal, a partir de suas imagens de infravermelho (na região do tumor subcutâneo). Em cada mapa da temperatura superficial (gerado ao final de cada minuto de HM com NPM) foram determinados os percentis T_{90} , T_{50} e T_{10} das temperaturas registradas por todos os pixels do ROI_{Tumor} – *e.g.* para o animal #5 que passou por apenas uma sessão de 30 min de HM, foram calculados 30 valores (um para cada minuto de HM) de cada um dos percentis de temperatura T_{90} , T_{50} e T_{10} . E, respectivamente, são calculados os valores de $CEM43_{T90}$, $CEM43_{T50}$ e $CEM43_{T10}$ para cada $\Delta t = 1$ min do histórico de exposição térmica de cada animal (em cada tratamento por hipertermia). A Tabela 5.7, logo abaixo no texto, descreve o algoritmo que utilizamos para converter cada minuto do histórico de exposição térmica de cada animal, por exemplo, num único valor de $\Sigma CEM43_{T50}$.

Tabela 5.7 – Algoritmo utilizado para converter cada minuto do histórico de exposição térmica de cada animal num único valor de $\Sigma\text{CEM43 } T_{(X\%)}$: é ilustrado o exemplo do cálculo de ΣCEM43_{T50} .

Tempo (min)	Câmara termográfica: pixels dentro do ROI _{Tumor}					T50% _(i) (°C)	CEM43 T50% (min)
	Px ₍₁₎	Px ₍₂₎	Px ₍₃₎	•••	Px _(N)		
1	T ₁₁	T ₁₂	T ₁₃	•••	T _{1N}	T50 ₍₁₎	CEM43 T50 ₍₁₎
2	T ₂₁	T ₂₂	T ₂₃	•••	T _{2N}	T50 ₍₂₎	CEM43 T50 ₍₂₎
•						•	•
•						•	•
•						•	•
t _i	T _{i1}	T _{i2}	T _{i3}	•••	T _{iN}	T50 _(i)	CEM43 T50 _(i)
Σt_i							$\Sigma\text{CEM43 } T50_{(i)}$ (min)

Adaptado de: Oleson *et. al*, 1993, p. 290 [27].

Portanto, os valores totais que aparecem na Tabela 5.8 abaixo no texto (colunas ΣCEM43_{T90} , ΣCEM43_{T50} e ΣCEM43_{T10}), por exemplo, correspondem à soma em 60 min (duas doses térmicas) e em 30 min (uma dose térmica) para os animais #4 e #5, respectivamente.

Tabela 5.8 – Cálculo da dose térmica na superfície da pele na região do tumor subcutâneo: comparação entre os valores de CEM43 pontual (fibra-óptica sobre a pele) e os percentis obtidos com o mapeamento termográfico bidimensional (ΣCEM43_{T10} , ΣCEM43_{T50} e ΣCEM43_{T90}) utilizando as temperaturas T₁₀, T₅₀ e T₉₀.

Identificação				Dose térmica pontual (na superfície)				Mapeamento bidimensional da dose térmica ROI _{Tumor} (625 pixels)					
				Δt (min)	T _{med} (°C)	CEM43 (min)	Total (min)	ΣCEM_{T10} (min)	Total (min)	ΣCEM_{T50} (min)	Total (min)	ΣCEM_{T90} (min)	Total (min)
#4	252 mm ³	60 min	1°	27,0	46,6	328	2659	159	981	2,5	26	0,05	0,3
			2°	27,6	49,4	2331		822		23,5		0,25	
#5	845 mm ³	30 min	--	23,4	45,6	142	142	81	81	0,13	0,13	0,002	0,002

Já os dois gráficos abaixo mostram a evolução dos percentis T₉₀(t), T₅₀(t) e T₁₀(t) e, também, a temperatura média T_{med}(t) no ROI_{Tumor} para cada minuto do tempo de aquecimento, apenas para a 2ª sessão de HM com NPM do animal #4 (Figura 5.12 (A)) e, também, no único tratamento a que o animal #5 foi submetido (Figura 5.12 (B)).

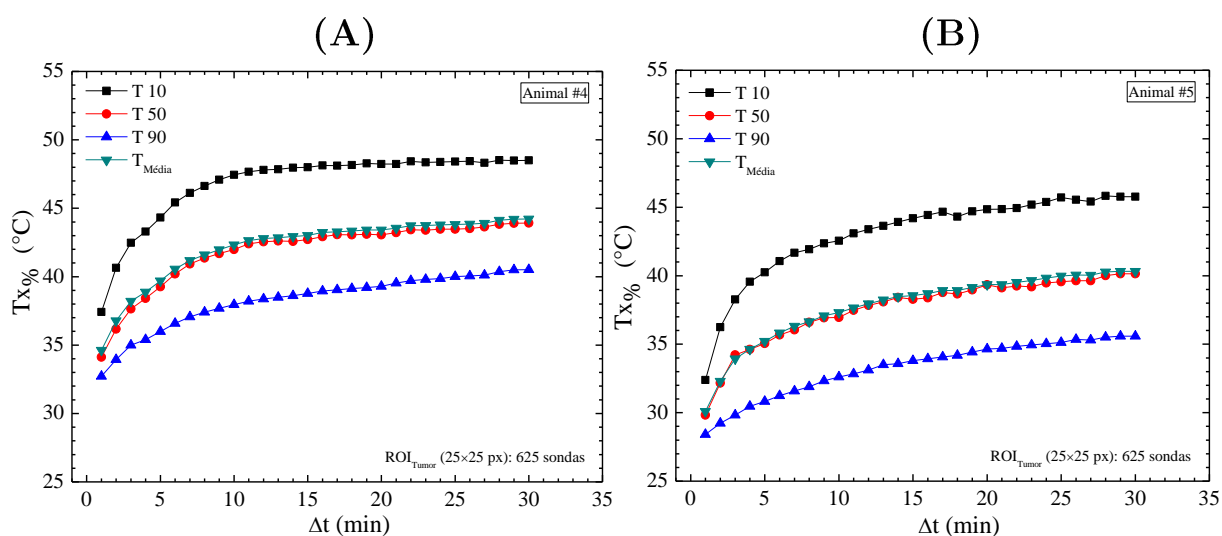


Figura 5.12 Evolução temporal dos percentis de temperatura superficial do $ROI_{Tumor} - T_{X\%}$: $T_{10}(t)$, $T_{50}(t)$ e $T_{90}(t)$ – (A) durante a segunda hipertermia do animal #4; (B) durante a única hipertermia do animal #5. O ROI_{Tumor} escolhido nos dois animais corresponde a uma matriz de 25×25 pixels, ou seja, 625 sondas de temperatura sobre a pele na região do tumor.

Numa situação ideal, em que fosse possível o monitoramento *in vivo* tridimensional e em tempo real (durante hipertermia) da temperatura intratumoral, a evolução temporal do percentil $T_{90}(t)$ (e consequentemente de $CEM43_{T90}(t)$) seria uma valiosa informação da eficiência (ou não) na entrega de calor dentro do tumor: garantindo que 90% da matriz tumoral está acima (ou abaixo) de um determinado limiar de aquecimento correlacionado a alguma resposta fisiológica (*e.g.* uma redução na quantidade de hipóxia tumoral, o que aumenta a capacidade das células neoplásicas de responderem bem à radiação ionizante [27], [207]) e, portanto, nesse contexto o valor de $T_{90}(t)$ funcionaria como um bom preditor da resposta biológica do paciente ao tratamento.

E, na hipótese de que a ocorrência de remissão tumoral completa é causada principalmente pelas temperaturas mais elevadas dentro do tumor [31], então, a evolução em função do tempo de hipertermia do percentil $T_{50}(t)$ (e consequentemente de $CEM43_{T50}(t)$), permitiria determinar a partir de que instante (e por durante quanto tempo) 50% do volume tumoral acessaria, e por quanto tempo se manteria, num limiar de dano térmico necessário para causar a morte completa das células tumorais. Esta suposição é baseada na quantidade relativamente grande de calor necessária tanto para matar células neoplásicas *in vitro*, quanto para danificar tecidos vivos (normais e tumorais) em modelos animais [208] e em seres humanos [209].

Os resultados apresentados até agora não provam nenhuma correlação quantitativa clara, e muito menos preditiva, entre o mapa bidimensional da temperatura (ou de CEM43) determinado na superfície da pele sobre o tumor subcutâneo, e qual deve ser o seu correspondente mapa tridimensional da temperatura (ou dose térmica) intratumoral. Esse é um problema em aberto e que está além do escopo dessa tese de doutorado.

Todavia, os resultados apresentados na Tabela 5.8, acima no texto, permitem-nos concluir ao menos duas coisas: (i) o valor calculado de CEM43 utilizando a temperatura medida (num único ponto) dentro da região de maior aquecimento da pele sobre o tumor subcutâneo, é estatisticamente pouco representativo da verdadeira dose térmica calculada (bidimensionalmente) na superfície da pele do animal; (ii) o valor do CEM43 “pontual” é maior até que o $\Sigma\text{CEM43}_{T_{10}}$ (associado ao percentil $T_{10\%}$) e sua utilização pode superestimar o valor da dose térmica entregue ao tumor durante a hipertermia.

Na seção 5.5 (a seguir no texto) serão avaliados os camundongos do grupo 4 (vide protocolos experimentais na seção 5.2) cuja temperatura intratumoral *in vivo* (durante HM com NPM) foi monitorada por três fibras-ópticas, introduzidas a 5 mm de profundidade dentro dos tumores dos animais em três pontos distintos. Para estes mesmos camundongos, seus dados de temperatura intratumoral (em função do tempo de hipertermia) serão confrontados com a evolução de seus respectivos percentis $T_{90}(t)$, $T_{50}(t)$ e $T_{10}(t)$ monitorados bidimensionalmente por infravermelho na superfície da pele na região do tumor subcutâneo. A análise dos resultados desse último experimento, utilizando a metodologia proposta nessa seção 5.4, permitirá conhecer de forma mais precisa a correlação entre o aquecimento detectado de maneira não invasiva na superfície e a eficiência na entrega de calor intratumoral. Por fim, ao serem reavaliados alguns dos resultados experimentais obtidos com os animais dos grupos 1 e 2 (vide seção 5.3), a discussão que será estabelecida na seção 5.5 também permitirá um melhor entendimento das respostas de remissão tumoral parcial (ocorrida com o animal #4) e total (ocorrida com o animal #1).

5.5 Estimativa *in vivo* do aquecimento intratumoral durante HM com NPM, utilizando a metodologia de mapeamento bidimensional da dose térmica na superfície da pele, por imagens de infravermelho.

Nesta seção 5.3.2 serão analisados e discutidos os resultados experimentais obtidos, apenas, com o grupo 4 (animais de #7 à #10) cujo objetivo é tentar validar o mapeamento bidimensional da dose térmica (utilizando os dados de monitoramento por infravermelho da temperatura da pele dos camundongos na região do tumor sólido e subcutâneo) como uma metodologia preditiva (*in vivo*) da temperatura e do valor de CEM 43 intratumoral durante um procedimento de HM com NPM.

Nos resultados obtidos com os animais #4 e #5 (respectivamente grupos 2 e 3, apresentados na seção anterior) entendemos que as curvas das Figuras 5.12 (A) e (B) (página 171 acima no texto), assim como os mapas de CEM43 das Figuras 5.11 (A) e (B) (página 167 acima no texto), por mais que informem como se dá a distribuição de temperatura (e também da dose térmica) detectada na superfície da pele sobre o tumor subcutâneo, reconhecemos que ainda não são informações quantitativas suficientes para que sejamos capazes de estabelecer uma relação precisa e preditiva sobre o verdadeiro aquecimento intratumoral onde estão localizadas as NPM (fontes de calor). Contudo, a nossa principal hipótese por traz da configuração experimental e metodologia de análise dos resultados experimentais até agora discutidos (nos capítulos 3, 4 e 5), é que o imagiamento termográfico da pele na região do tumor subcutâneo (em tempo real ao procedimento de HM com NPM) carrega informação (quantitativa) sobre a temperatura intratumoral. Nesse sentido, paralelamente aos experimentos realizados com os grupos 1, 2 e 3 (vide seções 5.2 e 5.3.1), medidas adicionais foram realizadas com quatro novos animais (grupo 4) – camundongos *Swiss* machos de 6–8 semanas de vida e, também, com S-180 (sólido e subcutâneo), que serão identificados respectivamente como animais #7 (tumor: 997 mm³), #8 (1.048 mm³), #9 (1.132 mm³) e #10 (1.161 mm³) (vide o protocolo experimental descrito na seção 5.2). A novidade desse experimento consiste no monitoramento em tempo real da temperatura intratumoral – com a introdução de três fibras-ópticas a 5 mm de profundidade, em três pontos distintos (separados por \cong 5mm) ao longo do eixo maior do tumor de cada animal – e o monitoramento da temperatura superficial ficou limitado apenas à câmera termográfica.

Numa primeira análise das imagens de infravermelho, dentro da região de interesse sobre o tumor de cada animal, foi construído um elemento de medida da temperatura na forma de uma circunferência com diâmetro igual a 8 pixels. A Figura 5.13, abaixo, mostra as termografias (ao final de 30 min de HM com NPM) dos animais de #7 até #8, onde este elemento de medida é denotado por *hottest region* (HR) (indicado pelas setas brancas). Através do software da câmera termográfica é possível determinar a **temperatura média** dentro dessa área de $\cong 22 \text{ mm}^2$ (formada por 52 px), onde cada pixel tem dimensão quadrada igual a $(0,65 \times 0,65) \text{ mm}^2$ quando a objetiva da câmera está posicionada perpendicularmente a 50 cm de distância do alvo.

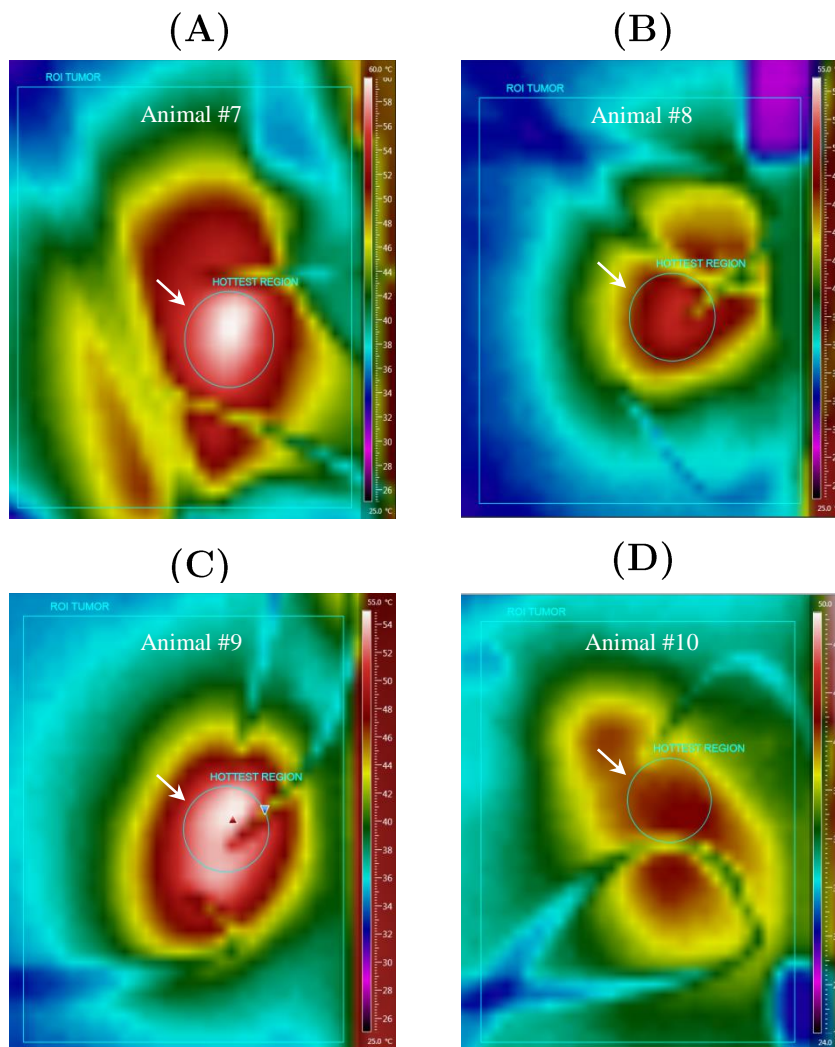


Figura 5.13 Imagens de infravermelho do $\text{ROI}_{\text{Tumor}}$ dos animais de #7 à #10 após 30 min de aquecimento por HM com NPM: as setas brancas indicam o elemento de medida da temperatura na região mais aquecida da pele sobre o tumor (*hottest region*), uma circunferência com diâmetro igual a 8 pixels. Através do software da câmera termográfica é possível determinar a temperatura média dentro dessa área de $\cong 21,2 \text{ mm}^2$.

Nas Figuras 5.14 de (A) à (D) são mostrados (para cada camundongo) os valores de temperatura medidos dentro do tumor utilizando as fibras-ópticas (em três pontos distintos ao longo do seu eixo maior), comparando-os com a temperatura média (denotada nos gráficos por *IR cam*) medida por infravermelho dentro da área delimitada pelo elemento de medida HR construído na região de maior aquecimento da pele sobre o tumor subcutâneo, conforme explicado no parágrafo anterior.

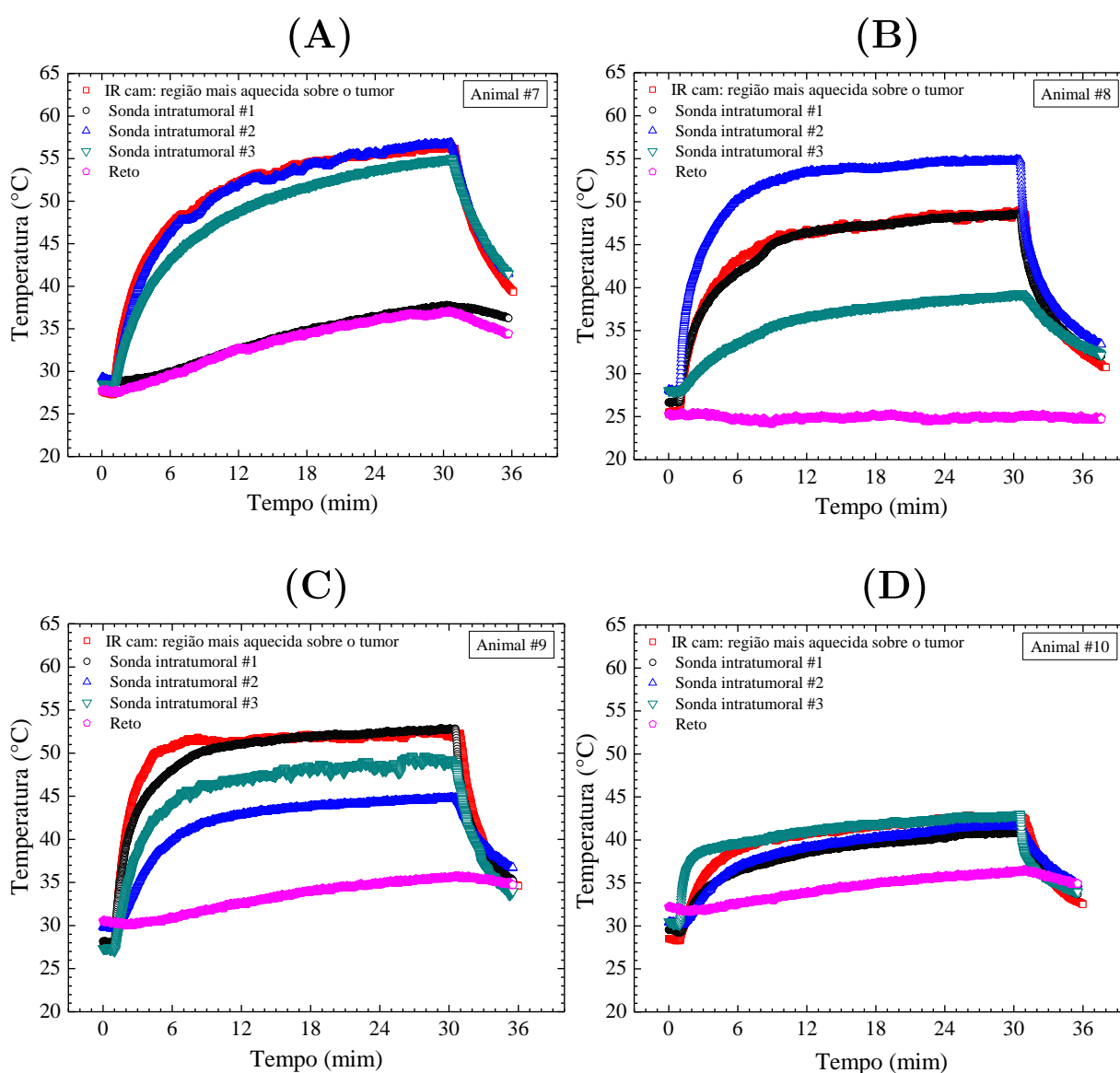


Figura 5.14 Temperatura dos animais #7 (A), #8 (B), #9 (C) e #10 (D) (série de experimentos do grupo 4) durante procedimento de HM ($f = 300$ kHz; $B = 220$ G) com NPM ($\text{MnFe}_2\text{O} - \text{DMSA}$ com 15 nm de diâmetro, SLP in vitro igual a 126,2 W/g): com a câmera termográfica (*infrared camera* – *IR cam*) foi monitorada a temperatura superficial (média) da região mais aquecida sobre o tumor de cada animal. Já as fibras-ópticas introduzidas (5 mm sob a pele) em três posições distintas dentro do tumor (S180 sólido e subcutâneo) fornecem a medida da temperatura intratumoral de, ao menos, três pontos (distantes entre si da ordem de 5 mm) ao longo da direção do eixo maior do tumor.

O monitoramento do aquecimento intratumoral com três fibras-ópticas evidencia a entrega não homogênea de calor, uma vez que termômetros colocados em diferentes pontos dentro do tumor registram temperaturas muitíssimo diferentes em função do tempo de aquecimento com as NPM e, excetuando o animal #10, todos os outros camundongos registraram temperaturas intratumorais ablativas por mais de 20 min (em pelo menos um dos três pontos monitorados). Um resultado que chama atenção para a eficiência das NPM de $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-DMSA}$ (com 15 nm de diâmetro e SLP *in vitro* igual a 126,2 W/g) na geração *in vivo* de calor em baixa intensidade de campo magnético ($B \approx 220$ G e $f = 300$ kHz). Além disso, nos gráficos das Figuras 5.14 (A) até (D) é curioso notar que (ao menos para estes quatro animais) a temperatura média numa pequena porção da região mais aquecida da pele sobre o tumor (registro termográfico) é aproximadamente igual à temperatura intratumoral em pelo menos um dos pontos monitorados.

Devido à significativa diferença de temperatura registrada pelas três sondas dentro do tumor, o cálculo de CEM43 pontual intratumoral (utilizando a eq. 5.4) inevitavelmente leva a resultados também muito diferentes para o mesmo tumor (vide Tabela 5.10), por exemplo, para o animal #7 obtém-se:

- i. Para a sonda #1, $T_1 = 33,7^\circ\text{C}$ (média durante os 30 min de HM) e $\Delta t_1 = 30$ min, resultando em $\text{CEM43}_{(1)} \cong 0$;
- ii. Para a sonda #2, $T_2 = 52,8^\circ\text{C}$ (média durante o tempo em que a temperatura manteve-se $\geq 43^\circ\text{C}$, até o instante $t = 31$ min) e $\Delta t_2 = 26,4$ min (tempo em que a temperatura manteve-se $\geq 43^\circ\text{C}$, até o instante $t = 31$ min), resultando em $\text{CEM43}_{(2)} = 23534$ min;
- iii. Para a sonda #3, $T_3 = 51^\circ\text{C}$ (média durante o tempo em que a temperatura manteve-se $\geq 43^\circ\text{C}$, até o instante $t = 31$ min) e $\Delta t_3 = 24,6$ min (tempo em que a temperatura manteve-se $\geq 43^\circ\text{C}$, até o instante $t = 31$ min), resultando em $\text{CEM43}_{(3)} = 6298$ min.

Na sequência são apresentadas duas tabelas para os animais de #7 a #10. Primeiramente, a Tabela 5.9 sumariza (em sua segunda parte) todos os dados experimentais de monitoramento com a câmera termográfica da temperatura superficial da pele na região do tumor (valor médio dentro do elemento HR) e na região do abdômen, cuja temperatura média é aferida dentro de um grande elemento circular de medida construído com 30 px de diâmetro (imagem não mostrada no texto). A temperatura do abdômen do camundongo é utilizada como valor de referência da sua temperatura corpórea em regiões suficientemente distantes do tumor e, portanto, inalteradas pelo aquecimento localizado produzido pelas NPM. Ainda nessa mesma tabela, em sua última parte, vemos os valores da temperatura intratumoral (três

fibras-ópticas). Já a Tabela 5.10 contém os valores pontuais de dose térmica calculados utilizando a eq. 5.4 (por animal) a partir do registro da temperatura intratumoral de cada sonda (colunas CEM43₍₁₎, CEM43₍₂₎ e CEM43₍₃₎), sendo que a última coluna da Tabela 5.10 contém os valores totais (Σ CEM43), ou seja, a soma dos três valores de dose térmica calculados para o mesmo tumor (em 30 min de HM com as NPM de MnFe₂O₄-DMSA).

Tabela 5.9 – Dados experimentais de monitoramento da temperatura superficial da pele (na região do tumor e no abdômen) com a câmera termográfica e, também, intratumoral (fibras-ópticas) para os animais do de #7 a #10 (experimentos do grupo 4).

Identificação		Câmara termográfica																				
		Região mais quente sobre o tumor						Abdômen														
		Temperatura basal (reto)			Temperatura intratumoral (fibra-óptica)			Temperatura basal (reto)			Temperatura intratumoral (fibra-óptica)											
Animal	Volume Tumoral	Massa de NPM	Tempo de HM	Posição da câmera	T_0 (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	T_0 (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	T_0 (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	T_0 (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)						
#7	997 mm ³	3.9 mg	30 min	$\theta = 0^\circ$	27.3	56.2	28.9	28	31.4	3.4	27.62	36.84	9.22	28.52	37.68	9.16	28.9	56.71	27.81	28.06	54.91	26.85
#8	1048 mm ³	3.9 mg	30 min	$\theta = 0^\circ$	25.5	48.4	22.9	28.3	32.9	4.6	25.05	25.32	0.27	26.86	48.54	21.68	28.6	54.78	26.18	28.04	39.24	11.20
#9	1132 mm ³	3.9 mg	30 min	$\theta = 0^\circ$	27.6	52.3	24.7	29	34.3	5.3	30.80	35.70	4.90	28.25	52.81	24.56	29.73	44.78	15.05	27.01	48.51	21.50
#10	1161 mm ³	3.9 mg	30 min	$\theta = 0^\circ$	28.3	42.4	14.1	29.9	33.7	3.8	31.74	36.42	4.68	29.26	40.86	11.60	30.28	41.82	11.54	30.86	42.9	12.04

Tabela 5.10 – Cálculo da dose térmica em três pontos distintos dentro do tumor subcutâneo, a partir das temperaturas registradas com as fibras-ópticas durante HM com as NPM de MnFe_2O_4 – DMSA, para os animais do de #7 a #10 (experimentos do grupo 4).

Identificação		Temperatura intratumoral (fibra-óptica)																										
		Dose térmica (CEM43) pontual intratumoral																										
		Sonda #1		Sonda #2		Sonda #3		Sonda #1		Sonda #2		Sonda #3		Soma														
Animal	Volume Tumoral	Massa de NPM	Tempo de HM	T_0 (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	T_0 (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	T_0 (°C)	T_f (°C)	ΔT (°C)	$T_{\text{méd}}$ (°C)	Δt (min)	$T_{\text{méd}}$ (°C)	Δt (min)	$T_{\text{méd}}$ (°C)	Δt (min)	$T_{\text{méd}}$ (°C)	Δt (min)	$T_{\text{méd}}$ (°C)	Δt (min)	$T_{\text{méd}}$ (°C)	Δt (min)	$T_{\text{méd}}$ (°C)	Δt (min)	$T_{\text{méd}}$ (°C)	Δt (min)
#7	997 mm ³	3.9 mg	30 min	28.52	37.68	9.16	28.9	56.71	27.81	28.06	54.91	26.85	29.4	33.6	0.0	26.4	52.8	23534	24.6	51	6298	29832						
#8	1048 mm ³	3.9 mg	30 min	26.86	48.54	21.68	28.6	54.78	26.18	28.04	39.24	11.20	22.80	47.1	391	28.20	52.9	26943	29.40	36.3	0.003	27334						
#9	1132 mm ³	3.9 mg	30 min	28.25	52.81	24.56	29.73	44.78	15.05	27.01	48.51	21.50	27.6	50.9	6592	18.6	44	37	25.8	47.6	626	7255						
#10	1161 mm ³	3.9 mg	30 min	29.26	40.86	11.60	30.28	41.82	11.54	30.86	42.9	12.04	29.4	38.4	0.05	29.4	39	0.1	29.4	41.1	2	2.2						

Contudo, o monitoramento por infravermelho da temperatura da pele na região do tumor subcutâneo, somente dentro da área delimitada pelo elemento HR (e que contém apenas 52 px), ignora todo o gradiente de temperatura superficial anteriormente visto nas termografias das Figuras 5.13 de (A) à (D) (construídas com mais de 1200 px). É, portanto, necessário que um critério seja estabelecido para a determinação de qual região (ou qual conjunto de pixels) na imagem termográfica contém a informação mais fortemente correlacionada com o real aquecimento intratumoral.

Nesse sentido, agora iremos aplicar a metodologia estabelecida anteriormente na seção 5.4, criando nas imagens de infravermelho dos animais do grupo 4 um elemento de medida da temperatura (ROI_{Tumor}) na forma de uma matriz retangular com dimensão de 30×40 px (resultando em 1200 termômetros na superfície da pele na região do tumor), de maneira a encerrar dentro de seu perímetro todo o perfil de temperatura identificado na termografia da superfície da pele do camundongo na região do tumor subcutâneo aquecido pelas NPM.

Na Figura 5.15 abaixo, por exemplo, são mostradas: na imagem (A) uma termografia de corpo inteiro do animal #9 no instante $t = 31$ min de sua sessão de HM com NPM; na imagem (B) o elemento de medida designado como ROI_{Tumor} , que corresponde à uma superfície plana real com dimensão aproximadamente igual a $(19,5 \text{ mm} \times 26,0 \text{ mm}) \cong 507 \text{ mm}^2$, ou seja, uma densidade da ordem de $\sim 2,4$ sondas/ mm^2 sobre a pele do camundongo na região do tumor; por fim na imagem (C) a correspondente matriz de aquisição. É importante notar, também, nas Figuras 5.15 (B) e (C) a “sombra” na imagem de infravermelho (posições (1), (2) e (3) indicadas pelas setas brancas) dos três termômetros de fibra-óptica introduzidos no tumor do animal #9.

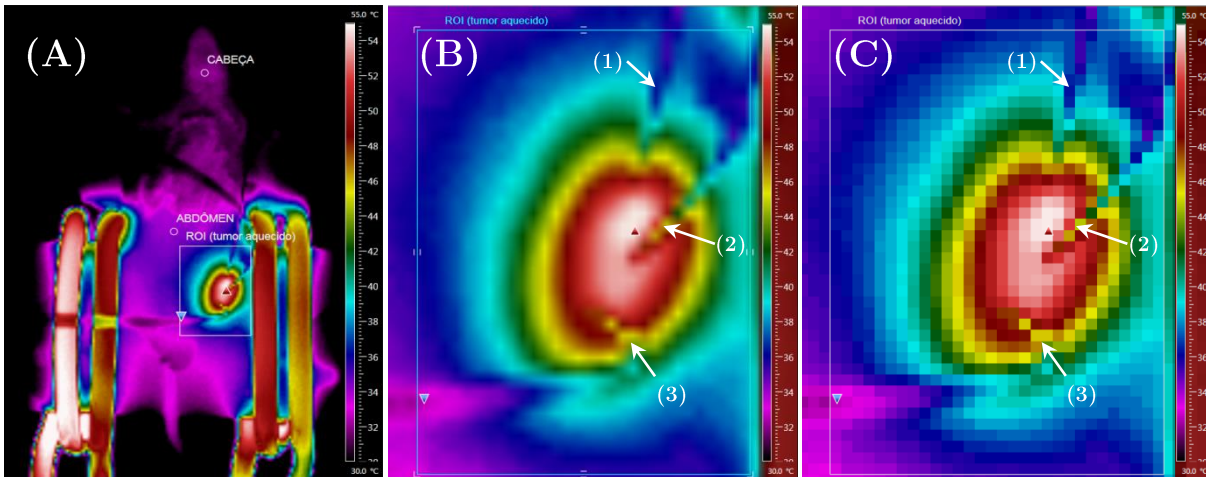


Figura 5.15 (A) Imagem termográfica do animal #9 no instante $t = 31$ min de sua sessão de HM com as NPM ($\text{MnFe}_2\text{O}_4 - \text{DMSA}$ com 15 nm de diâmetro, SLP *in vitro* igual a 126,2 W/g) sob a ação de um campo magnético alternado com intensidade igual a 220G. (B) Imagem termográfica ampliada na região de interesse sobre o tumor subcutâneo aquecido ($\text{ROI}_{\text{Tumor}}$). (C) Matriz de 30×40 pixels no $\text{ROI}_{\text{Tumor}}$: cada pixel é utilizado como um termômetro na pele do animal #4. Com os dados dessa matriz (com 1200 “termômetros”) é possível: (i) determinar os percentis da temperatura superficial (T_{10} , T_{50} e T_{90}) e temperatura média; (ii) a criação de um mapa bidimensional de CEM43 (calculado na superfície) a cada intervalo de tempo $\Delta t = 1$ min, então, o somatório (por pixel) ao final de todo o histórico de exposição térmica do animal #9 (30 mapas) resulta na distribuição total de valores de dose térmica superficial (por pixel), calculados ao final de sua sessão de HM com NPM.

Nesse contexto, dentro do $\text{ROI}_{\text{Tumor}}$ de cada animal foram obtidos os percentis da temperatura superficial $T_{10}(t)$, $T_{50}(t)$, $T_{90}(t)$ e temperatura média $T_{\text{med}}(t)$ para cada minuto do tempo de hipertermia (ou seja $\Delta t = 1, 2, \dots, 30$ min). A Figura 5.16 (abaixo) é uma comparação entre esses resultados do monitoramento por infravermelho dentro do $\text{ROI}_{\text{Tumor}}$ com as medidas intratumorais feitas com os três termômetros de fibra-óptica.

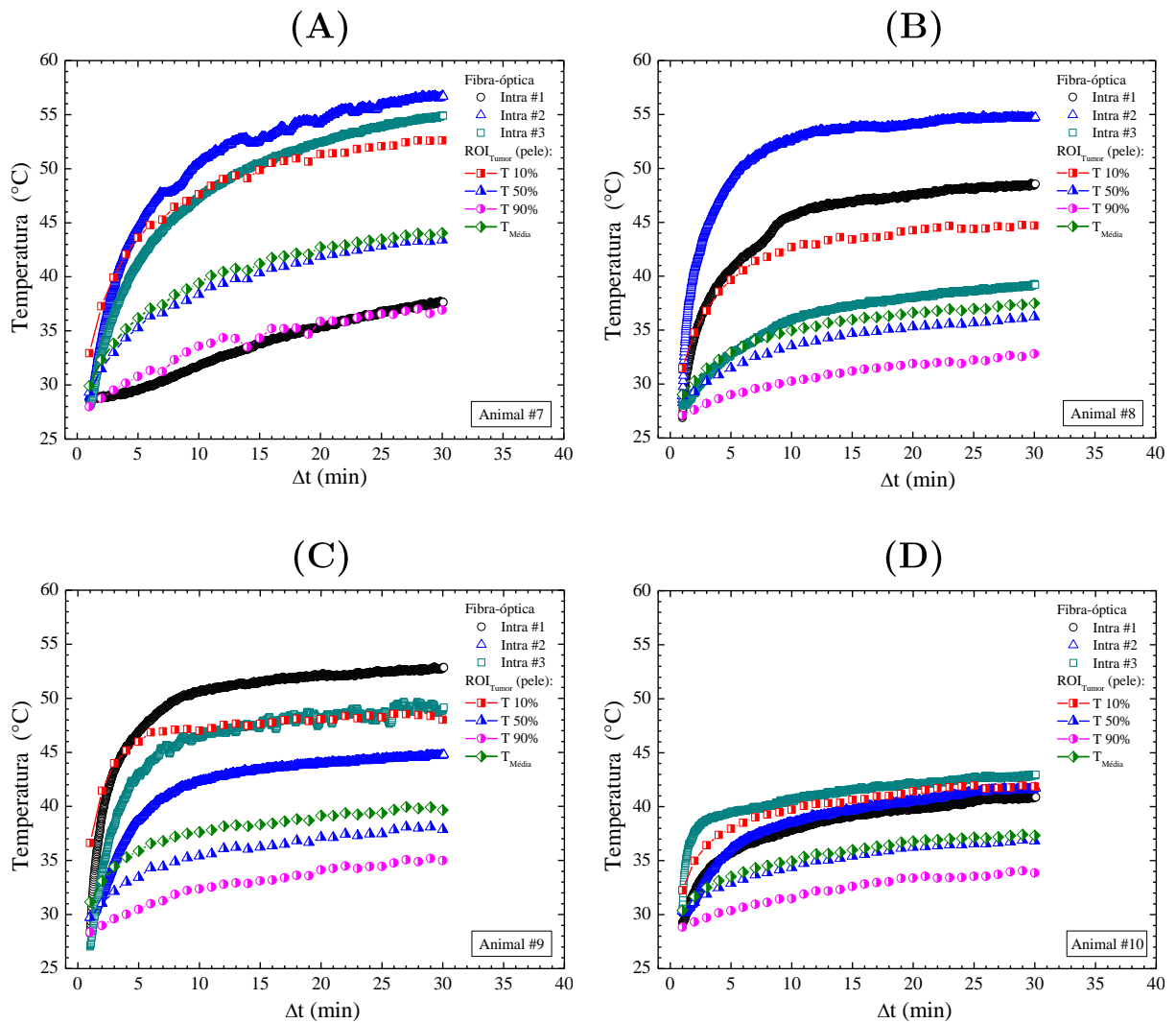


Figura 5.16 Grupo experimental 4: dados do mapeamento termográfico bidimensional na região do tumor subcutâneo (percentis $T_{10}(t)$, $T_{50}(t)$, $T_{90}(t)$ e temperatura média $T_{med}(t)$) comparados com a temperatura intratumoral em três pontos distintos (para cada animal). O ROI_{Tumor} escolhido (em cada animal) corresponde a uma matriz de 30×40 pixels, ou seja, 1200 termômetros sobre a pele na região do tumor aquecido por HM com as NPM ($MnFe_2O_4$ – DMSA com 15 nm de diâmetro, SLP *in vitro* igual a 126,2 W/g) sob a ação de um campo magnético alternado com intensidade igual a 220G.

E no que diz respeito ao percentil $T_{10}(t)$ da temperatura da pele na região do tumor subcutâneo, é interessante notar que o seu valor em função do tempo é sempre muito próximo (ao menos para estes quatro animais) do valor da média aritmética de suas temperaturas intratumorais (\bar{T}_{sonda}), conforme os gráficos da Figura 5.17 abaixo. Tal que, a partir de 5 min de HM com NPM, a diferença percentual relativa entre $T_{10}(t)$ e \bar{T}_{sonda} (ou seja, $\Delta\% = \left| \frac{T_{10} - \bar{T}_{sonda}}{\bar{T}_{sonda}} \right| \times 100$) para cada camundongo foi de: 3,8% para o animal #7, 5,1% para o animal #8, 1,3% para os animais #9 e #10.

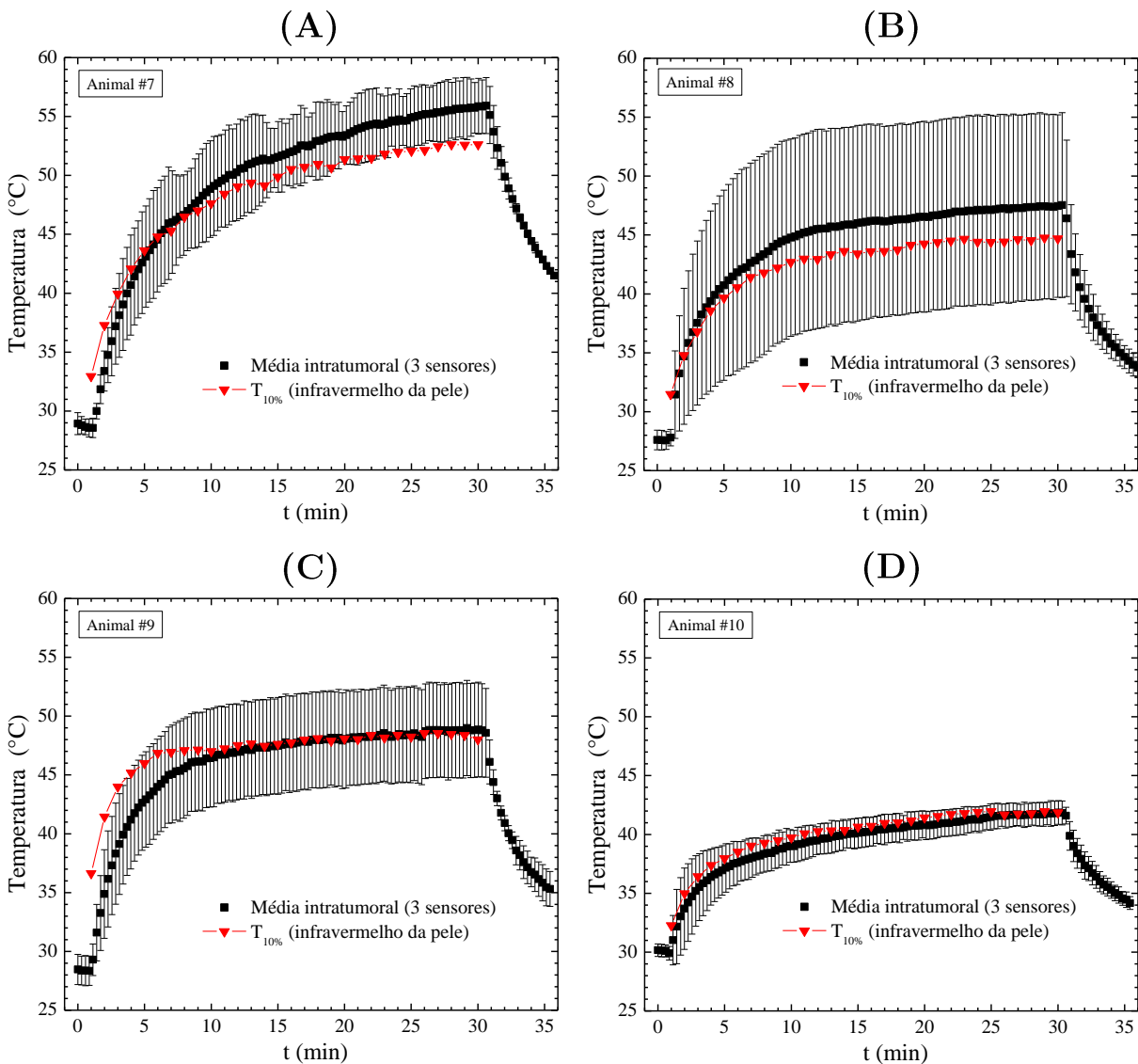


Figura 5.17 Grupo experimental 4: comparação entre o percentil $T_{10}(t)$ da temperatura da pele na região do tumor subcutâneo (pontos ▼) com a média da temperatura intratumoral em três pontos distintos (para cada animal) (pontos ■).

A dose térmica total (somatório em 30 min) calculada com base na temperatura excedida por apenas 10% de todas as medições realizadas na superfície (T_{10}) a cada minuto utilizando os 1200 pixels foi: $\Sigma CEM43_{T_{10}} = 2898$ min para o **animal #7** ($\Delta t = 26$ min e $T_{méd} = 49,8$ °C); $\Sigma CEM43_{T_{10}} = 40$ min para o **animal #8** ($\Delta t = 20$ min e $T_{méd} = 44,0$ °C); $\Sigma CEM43_{T_{10}} = 864$ min para o **animal #9** ($\Delta t = 27$ min e $T_{méd} = 48,0$ °C) e $\Sigma CEM43_{T_{10}} \approx 0$ min para o **animal #10** (para esse camundongo tanto \bar{T}_{sonda} (intratumoral), quanto o valor de $T_{10}(t)$ (sobre a pele) ficaram sempre abaixo de 43°C).

Portanto, é razoável concluir a partir desses últimos resultados experimentais que, assim como ocorre tridimensionalmente dentro do tumor, na superfície da pele há uma

variação considerável tanto na temperatura detectada, como no valor calculado (bidimensionalmente) da dose térmica entregue. E, muito provavelmente, o percentil de temperaturas superficiais (e dose térmica) mais elevadas, ou seja, o T_{10} associado à temperatura excedida por apenas 10% das medições realizadas dentro do ROI_{Tumor} (sobre a pele na região do tumor subcutâneo) contém a informação quantitativa mais fortemente correlacionada ao que, de fato, ocorre dentro do tumor durante a HM com NPM.

Em nosso levantamento bibliográfico, os limiares de dose térmica *in vivo* (que identificamos na literatura) já correlacionados à remissão tumoral parcial (RP) ou completa (RC) de tumores sólidos, tanto em humanos quanto em modelos tumorais murinos, resultam todos de terapias combinadas (RT+HT ou QT+HT). Mais especificamente, Crile, G. (1962) em um estudo com tumores sólidos e subcutâneos de S180 ($\sim 500 \text{ mm}^3$), reportou que 27 camundongos foram tratados por RT (dose administrada igual a 17 Gy) combinada com HT (banho térmico a $44 \text{ }^\circ\text{C}$ por um tempo de 30–45 min). Os animais foram seguidos por 21–28 dias após a HT, onde 23 camundongos apresentaram RC e, em mais da metade destes, a dose térmica entregue foi um $CEM_{43} \cong 66 \text{ min}$ [79], [80]. E como já mencionado anteriormente na introdução do capítulo (seção 5.1), foi a partir de resultados obtidos num estudo clínico de fase II – onde 44 pacientes com sarcomas de partes moles (volume tumoral de $500\text{--}800 \text{ mm}^3$) foram tratados combinando sessões de 60 min de HT (de 1 a 2 vezes por semana) realizadas de 30–60 min após cada paciente ser tratado por RT (dose igual a 50 Gy) [27] – que Oleson *et al.* sugeriram os seguintes critérios: para satisfazer uma exigência mais rigorosa por, pelo menos, 95% de certeza de observação de RC de tumores sólidos em humanos se tratados por RT + HT (*e.g.* num ensaio clínico de fase III), então, esse percentual de sucesso no tratamento é possível de ser conseguido com no mínimo $T_{90} = 42,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $T_{50} = 44,6 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura intratumoral (mantidos por durante 60 min), para um número médio de 7 sessões de aquecimento. O que resulta num limiar de $CEM_{43_{T90}} \sim 220 \text{ min}$ e $CEM_{43_{T50}} \sim 1300 \text{ min}$, para observação de RC em tumores sólidos em humanos [27], [28], [31].

Assim, se nossa interpretação dos resultados experimentais obtidos com os animais do grupo 4 puder ser generalizada para todos os tumores sólidos e subcutâneos até agora estudados nesse capítulo 5 (animais de #1 à #6), então, o percentil T_{10} da temperatura superficial também poderá ser utilizado como estimativa do aquecimento intratumoral desses outros camundongos (*e.g.* estimando sua temperatura interna média). Além disso, é possível utilizar a informação conseguida com essa abordagem para compararmos nossos resultados experimentais de RP e RC (vide seção 5.3) com o limiar de danos térmicos irreversíveis

($\text{CEM43}_{T50} \sim 1300$ min) para tumores sólidos na faixa de tamanho em que temos trabalhado ($\sim 100\text{--}1000$ mm³) [27], [28], [31].

Nesse contexto, *e.g.* para o animal #4 que apresentou o melhor resultado de RP (cujo volume tumoral era igual a 252 mm³ antes da hipertermia), durante o seu 1^a tratamento o valor médio do percentil $T_{10}(t)$, avaliado dentro de um $\text{ROI}_{\text{Tumor}}$ (com 25×25 px) na região da pele sobre o tumor subcutâneo (vide Figura 5.18 (C) abaixo) foi igual a $(45,5 \pm 0,6)$ °C, com mediana 45,6 °C (no intervalo 43,4–46,1 °C), mantido por um tempo de 26 min. Os respectivos valores para o seu 2^o tratamento foram $(47,6 \pm 1,3)$ °C, com mediana 48,1 °C (no intervalo 43,3–48,5 °C), também mantido por um tempo de 26 min (vide os gráficos da Figura 5.18 (D) abaixo). Então, considerando as duas hipertermias desse camundongo, a média do valor do percentil 10% da temperatura de aquecimento superficial é igual a $\bar{T}_{10} = (46,6 \pm 1,5)$ °C (média \pm desvio padrão) e, de acordo com nossa hipótese, a temperatura intratumoral média durante os dois tratamentos do animal #4 pode ser estimada em $\bar{T}_{intra} = (\bar{T}_{10} \pm 5\%)$, ou seja, $\bar{T}_{intra} = (46,6 \pm 2,7)$ °C (onde o erro desse valor foi calculado aplicando soma quadrática das incertezas $\delta\bar{T}_{intra} = \sqrt{(1,5)^2 + (2,3)^2} \cong 2,7$). Já o valor de dose térmica calculada (bidimensionalmente) por infravermelho na superfície da pele sobre o tumor foi $\Sigma\text{CEM43}_{T10} = 981$ min, ao final de 60 min de HM com NPM. Essa estimativa do valor experimental *in vivo* está $\sim 24,5$ % abaixo do limiar de dano térmico irreversível (1300 min) o que, muito provavelmente, resultou na recidiva do tumor a partir do 56^o dia após HM (com volume igual a 43 mm³), isto supondo que o valor calculado na superfície de $\Sigma\text{CEM43}_{T10} \approx \Sigma\text{CEM43}_{T50}$ dentro do tumor.

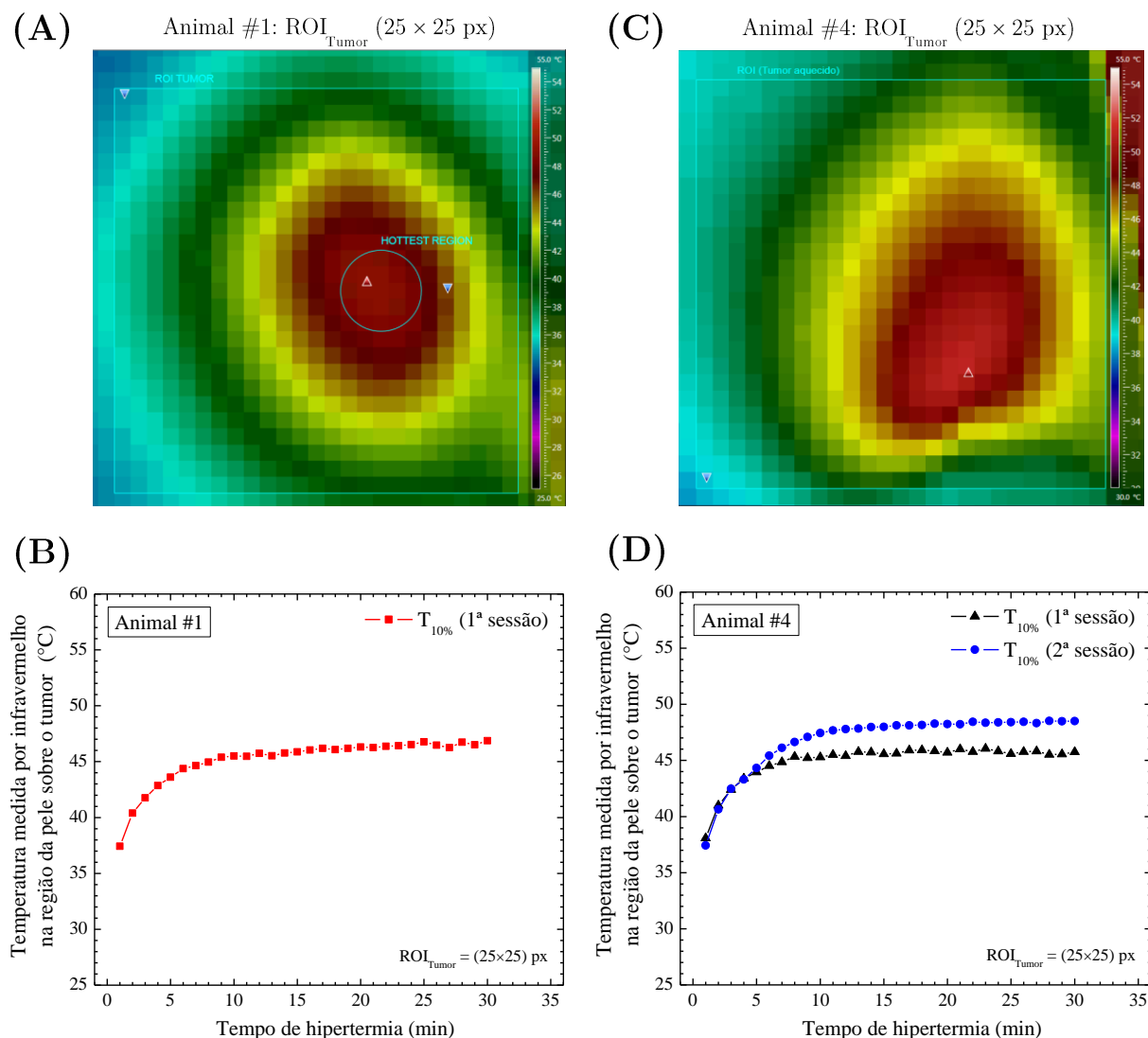


Figura 5.18 O ROI_{Tumor} escolhido nos dois animais (em (A) para o animal #1 e em (C) para o animal #4) corresponde a uma matriz de 25×25 pixels, ou seja, 625 termômetros sobre a pele na região do tumor aquecido por HM com as NPM. (B) percentil $T_{10}(t)$ da temperatura dentro do ROI_{Tumor} do animal #1 em função do tempo de hipertermia (medida apenas da 1ª sessão, única em que $\theta = 0^\circ$). (D) percentil $T_{10}(t)$ da temperatura dentro do ROI_{Tumor} do animal #4 em função do tempo de hipertermia (para as suas duas sessões de aquecimento).

Essa hipótese sobre o percentil T_{10} também pode ajudar a compreender melhor a resposta biológica do animal #1, o único em que ocorreu RC. Utilizando novamente a metodologia de mapeamento bidimensional da dose térmica superficial, apenas para os dados de monitoramento por infravermelho de sua 1ª sessão de HM com NPM (a única em que $\theta = 0^\circ$), obtém-se o valor $\Sigma\text{CEM43}_{T_{10}} = 220$ min (somatório em 30 min de aquecimento a partir da temperatura monitorada na superfície da pele sobre o tumor do camundongo), e cujo valor médio do percentil $T_{10}(t)$ dentro do ROI_{Tumor} foi igual a $(45,9 \pm 0,8)$ °C, com mediana 46,2 °C (no intervalo 43,6–46,9 °C), mantido por um tempo de 25 min (vide Figuras 5.18 (A) e (B) acima). E, tal qual fizemos para o animal #4, podemos estimar a temperatura média

intratumoral do animal #1 (apenas durante seu primeiro tratamento) por $\bar{T}_{intra} = (\bar{T}_{10} \pm 5\%)$, ou seja, igual a $\bar{T}_{intra} = (45,9 \pm 2,4) \text{ } ^\circ\text{C}$ (onde o erro desse valor foi calculado aplicando soma quadrática das incertezas $\delta\bar{T}_{intra} = \sqrt{(0,8)^2 + (2,3)^2} \cong 2,4$).

Ocorre que da 2^a até a 5^a sessão de HM, o ângulo θ formado entre a direção da objetiva da câmera termográfica e a direção normal à superfície da pele deste camundongo na região do seu tumor, foi aumentado até o valor de $\theta = 60^\circ$ comprometendo significativamente sua medida termográfica (erro $\sim 7^\circ\text{C}$ no valor da temperatura aparente da superfície) (vide seção Tabela 4.1, no capítulo 4). Poderíamos, então, supor que o valor de $\Sigma\text{CEM43}_{T10} = 220$ min houvesse se repetido nas quatro sessões seguintes de HM levando ao valor total de $5 \times \Sigma\text{CEM43}_{T10} = 1100$ min. Um número próximo, mas ainda abaixo do valor de 1300 min (adotado como limiar de dano térmico biológico irreversível).

Todavia, o monitoramento do valor correto da temperatura com o termômetro de fibra-óptica (em apenas um ponto) na região mais aquecida da pele sobre o tumor, nos permitiu concluir para esse animal #1 que, experimentalmente, a dose térmica (calculada nesse ponto da superfície) por sessão variou desde a 1^a até a 5^a hipertermia conforme verificado na Figura 5.4 (na página 154).

Então, caso o registro termográfico do aquecimento da pele do camundongo #1 houvesse ocorrido sempre com $\theta = 0^\circ$ (durante os 150 min de aquecimento do tumor subcutâneo), certamente a determinação (bidimensional) da temperatura excedida por apenas 10% de todos os pixels da imagem de infravermelho (na região do seu tumor), definiria um conjunto de pixels cujo valor da temperatura (em função do tempo de hipertermia) também incluiria o ponto monitorado pela fibra-óptica. O valor de CEM43 pontual na 1^a sessão foi de 1684 min, que se multiplicado por cinco tratamentos forneceria uma dose térmica total de 8420 min. Acontece que, a dose total calculada pontualmente fornece um valor acumulado de 9745 min, ou seja, 15,7 % maior do que a estimativa anterior de cinco vezes o valor do primeiro tratamento. Seguindo esse mesmo raciocínio, uma estimativa mais adequada do valor de ΣCEM43_{T10} (avaliado bidimensionalmente por infravermelho na superfície) resultaria igual a 1273 min. Um valor estimado (*in vivo*) muito próximo, apenas 2,1% abaixo do limiar de 1300 min que, segundo a literatura, é necessário para a obtenção de RC em tumores sólidos na faixa de tamanho entre $\sim 100\text{--}1000 \text{ mm}^3$ [27], [28], [31].

É muito importante lembrar ao leitor que (de acordo com a literatura), a exigência de que um determinado limiar de $CEM43_{T_{50}}$ (ou da mediana T_{50}) seja excedido dentro do tumor é uma condição necessária, mas não suficiente, para que este manifeste boa resposta biológica ao tratamento de hipertermia. Sendo uma exigência adicional para observação de remissão tumoral *in vivo* que $CEM43_{T_{90}}$ (ou o percentil T_{90}) intratumoral também alcance um determinado valor de dano térmico irreversível para as células neoplásicas [27], [31], [207]. Assim, nos experimentos realizados com os animais de #7 à #10 ainda é razoável afirmar que a mediana T_{50} (dentro do tumor) pode ser aproximada pela média aritmética de suas temperaturas intratumorais, porém nada afirmamos sobre o valor de T_{90} intratumoral para estes camundongos, uma vez que o seu cálculo com apenas três medidas seria bastante impreciso. E da forma como os experimentos dos grupos 1, 2 e 3 foram realizados, utilizando apenas os dados de monitoramento por infravermelho da temperatura (na região mais aquecida da pele sobre o tumor) também nenhuma inferência poderia ser feita sobre o valor intratumoral de $CEM43_{T_{90}}$ (ou o percentil T_{90}) para os animais de #1 à #6.

Contudo, a correlação experimental por nós observada, de que o valor de $T_{10}(t)$ da temperatura detectada *in vivo* na superfície da pele sobre tumores subcutâneos (aquecidos por HM com NPM) pode informar com uma pequena margem de erro o valor da temperatura média intratumoral. Este é um resultado muito promissor e que precisa ser testado em mais do que apenas uma dezena de animais, e numa configuração experimental em que o monitoramento da temperatura intratumoral seja com pelo menos 3–5 sondas, uma vez que o próprio tamanho dos tumores de S180 (~ 10–20 mm de diâmetro) é um fator limitante para introdução de mais fibras-ópticas.

Toda essa abordagem apresentada nas seções 5.4 e 5.5 constitui uma metodologia experimental quantitativa e minimamente invasiva (uma vez que o valor de referência da temperatura tumoral ainda é conseguido utilizando termômetros de fibra-óptica), do monitoramento *in vivo*, e em tempo real, da eficiência de aquecimento intratumoral durante a de hipertermia de tumores superficiais. Onde os padrões visuais de uma imagem termográfica codificada em escala de cores, não são interpretados apenas a olho nu. Estamos sugerindo uma quantificação estatística da evolução da temperatura (ou das diferenças de temperatura entre diferentes regiões) na superfície da pele em função do tempo de aquecimento do tumor subcutâneo, e provando experimentalmente sua correspondência com o aquecimento intratumoral.

6 Conclusões e perspectivas

No que tange à intensidade e frequência de campo magnético alternado utilizado em todos os experimentos *in vivo*, os valores do produto (intensidade \times frequência) tanto na primeira quanto na segunda configuração experimental, respectivamente, iguais a $4,42 \times 10^9$ A/m.s e $5,27 \times 10^9$ A/m.s, ambos satisfazem o critério de Atkinson que estabelece um limiar de segurança (com valor igual a $5,37 \times 10^9$ A/m.s) para evitar o aquecimento intenso de forma não específica dos tecidos (esse limiar foi determinado para a nossa configuração experimental considerando a condutividade da pele dos camundongos $\sigma \cong 1,944 \times 10^{-3}$ S/m para a frequência de 301 kHz de excitação do campo externo aplicado) [58], [107], [108], [159]. Esses valores indicam que essa montagem experimental minimiza o depósito de calor por *eddy currents*. Fato que foi confirmado pela termometria por infravermelho do corpo dos animais (em tempo real aos procedimentos de hipertermia) indicando apenas pequenas variações de temperatura na pele dos camundongos: igual a $(2,3 \pm 1,3)^\circ\text{C}$ na região do abdômen e, na região da virilha, onde a intensidade de campo magnético é maior devido ao seu posicionamento mais próximo à bobina indutora, o aumento médio na temperatura da pele (apenas por *eddy currents*) foi igual a $(1,6 \pm 0,3)^\circ\text{C}$ nos animais saudáveis e $(2,4 \pm 0,8)^\circ\text{C}$ nos animais com S180 sólido e subcutâneo (sem injeção de FM). As configurações de campo e frequência adotadas em nossos experimentos são, portanto, adequada para a realização de estudos pré-clínicos sem oferecer prejuízos à saúde dos animais utilizados. Além disso, foi possível concluir que a utilização de uma câmera termográfica permite quantificar (em tempo real), ao menos para tumores subcutâneos, a variação de temperatura na superfície da pele provocada pelo calor gerado com as nanopartículas magnéticas (NPM) e, principalmente, distingui-la do aquecimento ocorrido por *eddy-currents*.

Tanto as NPM de MnFe_2O_4 -Citrato ($D = (12 \pm 3)$ nm, $M_s = 52,2$ emu/g e SLP *in vitro* no valor de 27,3 W/g, para um campo de 10 kA/m e frequência de 300 kHz), quanto as de MnFe_2O_4 -DMSA ($D = (15 \pm 3)$ nm, $M_s = 56,2$ emu/g e SLP *in vitro* no valor de 126,2 W/g, para um campo de 17,5 kA/m e frequência de 301 kHz), mesmo na condição de campo magnético alternado não uniforme e de baixa intensidade demonstraram boa eficiência magnetotérmica durante os experimentos de HM *in vivo*. Note que as diferenças no SLP podem ser entendidas como decorrentes do maior diâmetro da NPM recoberta com DMSA.

Em particular, no caso das nanopartículas de MnFe_2O_4 -DMSA foi possível acessar e manter (por mais de 20 min) temperaturas na superfície da pele, sobre o tumor subcutâneo, da ordem 44–53 °C em todos animais. E naqueles que também tiveram sua temperatura intratumoral monitorada (por três sondas em pontos distintos) o valor médio foi da ordem de 42–56 °C (por um tempo médio de 25 min), esse regime de aquecimento está dentro da faixa terapêutica de hipertermia para o tratamento oncológico [28], [41], [197], [203].

A potência térmica dissipada por perda histerética (\dot{Q}_{hist}) está relacionada com o valor do SLP por $\dot{Q}_{hist} = SLP \times c$, onde c é a concentração em massa de centros de calor calculada como a massa de NPM injetadas (de 2,0–2,3 mg em nossos experimentos) dividida pelo volume ocupado pelas NPM dentro do tumor. Em nossos cálculos teóricos utilizamos uma solução analítica (válida no regime estacionário) da equação de biocalor de Pennes para estimar teoricamente a temperatura na superfície da pele na região tumoral, supondo que a taxa de perfusão sanguínea dentro do tumor subcutâneo é nula ($\omega_b = 0$) e, também, que as NPM (centros de calor) comportam-se como uma fonte pontual intratumoral de calor com potência constante no tempo [210]. Nesse modelo matemático a correspondência do valor teórico de temperatura superficial com os dados experimentais medidos bidimensionalmente por infravermelho, em função da posição sobre a pele na região do tumor, também permite estimar teoricamente o valor de SLP *in vivo*. Os cálculos utilizando dados experimentais do imageamento termográfico de seis animais, na configuração experimental em que a câmera de infravermelho é posicionada perpendicularmente a pele dos camundongos (em $\theta = 0^\circ$), campo de 17,5 kA/m e frequência de 301 kHz (vide seção 5.3), resultaram em um valor médio (*in vivo*) de SLP igual a (115 ± 24) W/g, com mediana de 121 W/g (no intervalo 80–145 W/g), para o caso das NPM de MnFe_2O_4 -DMSA. Este valor está em excelente concordância com o determinado experimentalmente (*in vitro*) igual a 126,2 W/g.

Estes valores teóricos de $SLP_{in vivo}$ ainda foram utilizados noutra aproximação [171], onde consideramos que o espaço ocupado pelas NPM dentro dos tumores corresponderia a um volume esférico com densidade uniforme de material magnético nanoparticulado, e dessa forma estimamos para todos os camundongos (e em cada sessão de HM com NPM) o aumento da temperatura num ponto aproximadamente central dentro de seus tumores (à profundidade de 5 mm sob a pele). Tal que, a média desses valores para os mesmos seis animais mencionados anteriormente foi igual a $\Delta T_{intra} = (15,3 \pm 3,2)$ °C, com mediana de 16 °C (no intervalo 10,6–19,2 °C) (vide seção 5.3). Entretanto, para estes camundongos não

foram realizadas medidas de temperatura intratumoral durante seus tratamentos e, portanto, não é possível avaliar a acurácia (ou não) dessa estimativa.

Agora, no que diz respeito à modalidade de termometria por infravermelho adotada para o monitoramento dos experimentos de hipertermia *in vivo* estudados nessa tese. A variação no valor (aparente) da emissividade direcional e espectral de uma superfície curva influencia fortemente na determinação correta de sua temperatura, quando medida termograficamente por infravermelho. Como a superfície da pele dos animais sobre o seu tumor sólido e subcutâneo é convexa, em nossos resultados experimentais demonstramos que a utilização de uma câmera termográfica para a detecção correta do aquecimento superficial com um erro $\sim 0,5$ °C, deve ser feita com a objetiva da câmera formando um ângulo $\theta = 0^\circ$ com a direção normal à pele do animal na região de interesse sobre o tumor (vide capítulo 4). Indicando, ainda, como o valor da temperatura superficial aparente $T_{IR}(\theta)$ medido com a câmera de infravermelho subestima o valor da temperatura real T_s da pele dos camundongos, com um erro que aumenta para ângulos maiores: da ordem de 1,0 °C (para $\theta = 15^\circ$), 2,0 °C (para $\theta = 30^\circ$), 5,5 °C (para $\theta = 45^\circ$) e mais do que 7,0 °C (para $\theta = 60^\circ$).

Um novo modelo teórico acerca do erro na determinação da temperatura superficial medida pela técnica de termografia por infravermelho (com uma câmera termográfica) foi desenvolvido. Na equação proposta o cálculo do erro está relacionado com o desvio no valor da emissividade, que é dependente do ângulo θ de emissão da radiação térmica a partir da pele dos animais, e também com os valores de temperatura superficial real (T_s) e do ambiente (T_a) (numa relação funcional mais complexa do que a encontrada no modelo de Clark [183]). Diferentemente da equação de Clark, que estima teoricamente o erro experimental $\Delta T(\theta) = T_s - T_{IR}$ assumindo a lei de Stefan-Boltzmann, o presente trabalho utiliza diretamente a distribuição espectral de Planck, fazendo uma aproximação na faixa do infravermelho de maneira consistente com a detecção de radiação pela câmera termográfica (em nossos experimentos na faixa do infravermelho longo de 7,5–13,0 μm). Também ao contrário do modelo citado anteriormente, a nova expressão obtida é válida em qualquer faixa de diferença entre as temperaturas da superfície imagiada e do ambiente, inclusive indicando claramente a faixa de validade do modelo de Clark. As medidas experimentais do erro da temperatura superficial aparente, medido por infravermelho em função de θ , estão em excelente concordância com o novo modelo proposto (vide capítulo 4).

Os resultados pré-clínicos de tratamento discutidos na seção 5.3 mostraram, primeiramente, um caso de remissão tumoral completa (RC) obtida com o animal #1 (cujo volume tumoral antes do tratamento era $\cong 751 \text{ mm}^3$), depois de ele ter sido submetido a 150 min de HM com as NPM de MnFe_2O_4 -DMSA (divididos em cinco tratamentos de 30 min cada), em que o valor médio da temperatura monitorada com o termômetro de fibra-óptica, num ponto da região mais aquecida da pele sobre o tumor subcutâneo desse animal (por sessão) variou de 48,4–50,0 °C e manteve-se nessa faixa por um tempo médio igual a 28,2 min (em cada sessão). Esse camundongo foi seguido por mais de 180 dias e a erradicação do tumor subcutâneo de S180 foi confirmada molecularmente, por meio de sua tomografia por fluorescência (realizada no 41º dia após o tratamento) utilizando um marcador alvo específico (fluorescente em 750 nm) que permite a visualização e quantificação *in vivo* da integrina $\alpha_v\beta_3$ nas células neoplásicas bem como na neovasculatura, para monitorar o crescimento tumoral, a angiogênese tumoral e a eficácia do tratamento.

O cálculo do valor de CEM43 avaliado na superfície da pele desse camundongo que apresentou RC, utilizando os dados de monitoramento da temperatura com apenas um termômetro de fibra-óptica (colocado num ponto da região mais aquecida da pele sobre o tumor subcutâneo), indicou: i) um maior valor de dose térmica quanto maior o tempo de hipertermia do animal; ii) curiosamente, a realização de sucessivas hipertermias indicou uma variação no valor calculado de CEM43 (pontual) a cada novo tratamento, isto sugere uma redistribuição espacial das NPM dentro de seu tumor após (ou durante) cada sessão de aquecimento; iii) o valor total calculado pontualmente de $\text{CEM43} = 9745 \text{ min}$ (ao final de 150 min de HM com NPM) é da ordem de valores tipicamente obtidos em tratamentos ablativos ($\sim 10^4$ – 10^{10} min). Contudo, há na literatura severas críticas questionando a validade do cálculo do CEM43 no regime de temperaturas ablativas argumentando, principalmente, que os limiares de danos térmicos já publicados muitas vezes não estão corretos devido às limitações no monitoramento da temperatura. Quase sempre restrito a poucos sensores (de 1 a 4) inseridos no tumor, subestimando assim o verdadeiro aquecimento intratumoral tridimensional [211].

Experimentalmente, quatro outros animais tiveram sua temperatura intratumoral monitorada por três termômetros de fibra-óptica durante o procedimento terapêutico de HM com NPM (vide seção 5.5). Os seus dados indicam uma entrega de calor não homogênea dentro do tumor. Além disso, utilizando os dados do mapeamento bidimensional por infravermelho em tempo real durante a HM com NPM destes camundongos, foi proposta uma

nova metodologia para o cálculo da dose térmica (CEM43), ainda avaliada na superfície, mas agora considerando cada pixel da imagem termográfica como um termômetro na região do tumor. Dessa forma foi demonstrado, para esses quatro animais, que o valor de temperatura excedido por apenas 10% de todas as medições realizadas (na superfície por infravermelho), ou seja, o percentil $T_{10}(t)$ na região mais aquecida da pele sobre o tumor é capaz de estimar de maneira não invasiva (com um erro de $\sim 5\%$) a média da temperatura intratumoral em função do tempo de hipertermia.

Aplicando a abordagem de mapeamento bidimensional dos valores superficiais de CEM43 e o monitoramento de $T_{10}(t)$ para o animal #1 (o único que apresentou RC), foi possível estimar, avaliando apenas sua primeira sessão de HM com NPM (a única em que $\theta = 0^\circ$), uma temperatura intratumoral média igual a $\bar{T}_{intra} = (45,9 \pm 2,4)^\circ\text{C}$, mantida por um tempo de 25 min e um $\text{CEM43}_{T50} = 220$ min (apenas para o primeiro tratamento). Assumindo que esse valor se repetisse nas outras quatro sessões de hipertermia a que esse camundongo foi submetido, então, estima-se uma mediana da dose térmica intratumoral total de 1100 min. Entretanto, experimentalmente, a dose térmica por sessão variou conforme verificado na medida pontual com o termômetro de fibra-óptica colocado na região mais aquecida da pele sobre o tumor (vide Figura 5.4). Caso o registro termográfico do aquecimento da pele do camundongo #1 houvesse ocorrido sempre com $\theta = 0^\circ$ (durante os 150 min de aquecimento do tumor subcutâneo), certamente a determinação (bidimensional) da temperatura excedida por apenas 10% de todos os pixels da imagem de infravermelho (na região do seu tumor), definiria um conjunto de pixels cujo valor da temperatura (em função do tempo de hipertermia) também incluiria o ponto monitorado pela fibra-óptica. O valor de CEM43 pontual na 1ª sessão foi de 1684 min, que se multiplicado por cinco tratamentos forneceria uma dose térmica total de 8420 min. Acontece que, a dose total calculada pontualmente fornece um valor acumulado de 9745 min, ou seja, 15,7 % maior do que a estimativa anterior de cinco vezes o valor do primeiro tratamento. Seguindo esse mesmo raciocínio, uma estimativa mais adequada do valor de CEM43_{T50} (avaliado na superfície) resultaria igual a 1273 min. Um resultado muito próximo do limiar de 1300 min que, segundo a literatura, é necessário para a obtenção de RC em tumores sólidos na faixa de tamanho entre $\sim 100\text{--}1000\text{ mm}^3$ [27], [28], [31].

A correlação experimental, por nós observada, de que o valor de $T_{10}(t)$ da temperatura detectada *in vivo* na superfície da pele sobre tumores subcutâneos (aquecidos por HM com

NPM) pode informar com uma pequena margem de erro o valor da temperatura média intratumoral, é um resultado importante e que precisa ser rigorosamente testado em mais do que apenas uma dezena de animais e, também, em outros modelos tumorais. A perspectiva é que essa abordagem experimental de termometria bidimensional por infravermelho, discutida e sugerida nos resultados dessa tese, tem um potencial impacto clínico (em termos de precisão, facilidade de utilização, custo e benefício), no tratamento por hipertermia (tanto magnética quanto fototérmica) de tumores superficiais.

Ficou claro, também, que precisamos desenvolver ou utilizar técnicas experimentais (*e.g.* IRM e TC) capazes de determinar tridimensionalmente a distribuição espacial das NPM (centros de calor) na região intratumoral. A partir dessa informação, somada a uma adequada representação espacial tanto do tumor como do corpo do animal, espera-se ser possível resolver numericamente a equação de biocalor e determinar a distribuição de temperatura na superfície da pele sobre o tumor. Neste caso, o monitoramento bidimensional por termografia de infravermelho combinada com a simulação computacional poderia indicar de maneira não invasiva a entrega de calor intratumoral tridimensional. A prova de tal conceito deverá ser feita comparando o volume calculado de dose térmica (VDT) com o volume de tecido não perfundido por corrente sanguínea (VNP), ou seja, a região necrosada após o tratamento por nanoterapia térmica.

APÊNDICE A – Modelos matemáticos de dose térmica: formulações físico-químicas do tipo lei de Arrhenius e equações multiparamétricas.

Esse apêndice objetiva discutir em maior profundidade a formulação matemática de Sapareto e Dewey para o cálculo do valor de CEM43 (eq. 1.2.2, na página 32), primeiramente, mostrando que o coeficiente R_{CEM} possui uma dependência explícita com a temperatura de hipertermia, o que pode ser obtido utilizando o formalismo matemático da cinética de reações químicas proposta por Arrhenius [212]. Além disso, serão apresentadas outras abordagens matemáticas também capazes de converter o histórico de exposição térmica de um sistema em um (ou mais) parâmetro(s) diretamente correlacionado(s) aos danos biológicos decorrentes do depósito de calor nas células/tecidos [75].

Os valores de R_{CEM} obtidos experimentalmente *in vitro* para a linhagem celular de CHO ($R_{CEM} = 0,5$ se $T \geq 43^\circ\text{C}$, ou $R_{CEM} = 0,25$ se $T < 43^\circ\text{C}$) foram calculados através do modelo de CEM43, primeiramente, utilizando a eq. 1.2.1 (na página 31) para determinar os valores dos coeficientes angulares das retas tangentes à cada curva de sobrevivência na Figura 1.4 (A) (na página 31) gerando, assim, os dados do gráfico da Figura 1.4 (B) (na página 31) no qual é identificado o valor de 43°C como temperatura de *breakpoint* e, por exemplo, obtêm-se os valores $D_0(43^\circ\text{C}) = 11,1 \text{ min} = 666 \text{ s}$ e $D_0(46,35^\circ\text{C}) = 1 \text{ min} = 60 \text{ s}$. Agora, utilizando o cálculo de CEM43 na forma da eq. A.1 (mesma eq. 1.2.2, na página 32), então, podemos escrever [82]:

$$CEM43 = \sum_{i=1}^N \Delta t_i R_{CEM}^{(43-T_i)} \quad (\text{A.1})$$

$$D_0(43^\circ\text{C}) \equiv CEM43 \Leftrightarrow \frac{CEM43}{\Delta t_i} = R_{CEM}^{(43-T_i)} \Leftrightarrow \ln(R_{CEM}) = \frac{\ln \left[\frac{D_0(43^\circ\text{C})}{\Delta t_i} \right]}{(43 - T_i)} \quad (\text{A.2})$$

Tal que:

$$\ln(R_{CEM}) = \frac{\ln \left(\frac{11,1}{1} \right)}{(43 - 46,35)} \cong -0,7185 \quad \Leftrightarrow \quad R_{CEM} \cong 0,487$$

Assim é obtido o valor $R_{CEM} \cong 0,487 \sim 0,5$ para temperaturas $\geq 43^\circ\text{C}$. Procedendo analogamente para temperaturas $< 43^\circ\text{C}$, por exemplo, para $D_0(41,5^\circ\text{C}) = 204,1 \text{ min} = 12.246 \text{ s}$, calcula-se $R_{CEM} \cong 0,144$. Onde para esse tipo de linhagem tumoral murina (CHO) o intervalo de valores para R_{CEM} (para $T < 43^\circ\text{C}$) é de $0,125-0,25$.

A eq. A.1 é empírica, mas tem sua fundamentação matemática na lei de Svanté Arrhenius (de 1889) sobre a dependência com a temperatura da velocidade de reações químicas, a qual estabelece que a razão entre as velocidades de uma mesma reação química em duas temperaturas diferentes ($k(T_2)/k(T_1)$) é dada pela equação A.3 [212, p. 49]:

$$k(T) = Ae^{\frac{\mu}{2T}} \Leftrightarrow \frac{k(T_2)}{k(T_1)} = e^{\frac{\mu}{2} \frac{(T_2 - T_1)}{T_2 T_1}} \quad (\text{A.3})$$

O conceito de barreira de energia de ativação (E_a) e transição de estados foi introduzido mais tarde (final do séc. XX) por Henry Eyring, tal que a lei de Arrhenius é reescrita como a equação de Eyring-Polyani (eq. A.4):

$$k(T) = e^{\left(\frac{-\Delta G^*}{RT}\right)} = \left(\frac{RT}{Nh_p}\right) e^{\left(\frac{\Delta S^*}{R} + 1\right)} e^{\left(\frac{-\Delta H^*}{RT}\right)} \cong \left(\frac{RT}{Nh_p}\right) e^{\left(\frac{\Delta S^*}{R}\right)} e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} = Ae^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \quad (\text{A.4})$$

Onde a energia livre de Gibbs de formação é igual a $\Delta G^* = (\Delta H^* - T\Delta S^*)$; T é a temperatura na escala Kelvin; ΔH^* é a entalpia de ativação (J.mol^{-1}); ΔS^* é a entropia de ativação ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$); $R = 8,3143 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ é a constante universal dos gases ideais; $N = 6,23 \times 10^{23}$ é o número de Avogadro e $h_p = 6,63 \times 10^{-34} \text{ J.s}$ é a constante de Planck. E, para reações de primeira ordem, a razão $(\Delta S^*/R) \gg 1$ tal que $E_a = \Delta H^* - RT \cong \Delta H^*$ [82].

Reescrevendo a lei de Arrhenius (eq. A.3) em termos da razão entre os tempos de reação (τ_2/τ_1), onde pela eq. A.4 o parâmetro de ajuste (μ) será calculado como $\mu = 2E_a/R$ e, ainda, considerando que a temperatura de reação mude pouco de um processo para o outro aumentando seu valor em apenas uma unidade (ou seja, $T_2 = T_1 + 1$). Então, a dependência linear do coeficiente $A(T)$ com a temperatura (e exponencial com $\Delta S^*/R$) na eq. A.4 fará com que $A(T_2) \cong A(T_1)$, logo se tem que:

$$k(T_1) \cdot \tau_1 = k(T_2) \cdot \tau_2 \Leftrightarrow \frac{\tau_2}{\tau_1} = \left(e^{-\frac{E_a}{RT_2 T_1}} \right)^{(T_2 - T_1)} \quad (\text{A.5})$$

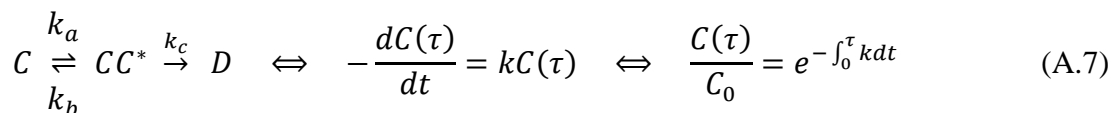
Agora, pensando num procedimento de HT (*e.g.* ensaio clonogênico) e, identificando o tempo equivalente de exposição térmica a 43°C ($CEM43 = \Delta t_{43}$) com o tempo de duração de uma reação química à temperatura constante T_2 ($\tau_2 \equiv CEM43$), das equações A.1 e A.5 é possível escrever:

$$\frac{\tau_2}{\tau_1} \equiv \frac{CEM43}{\Delta t_i} \Leftrightarrow R_{CEM} = \left(e^{-\frac{E_a}{RT_2 T_1}} \right) = \left(e^{-\frac{E_a}{RT(T+1)}} \right) \quad (\text{A.6})$$

Assim, vemos que (a rigor) o valor de $R_{CEM}(T)$ também é função da temperatura de aquecimento. E se $T_2 = T_1 + 1$ (onde $T_1 = 43^\circ\text{C} = 316,16 \text{ K}$), então, $R_{CEM} = \exp(-1,995 \times 10^{-6} \cdot E_a)$.

De fato, Henriques e Moritz (em 1947) [81] foram os primeiros a interpretar a cinética de danos térmicos irreversíveis (queimadura na pele de porcos e humanos causada por hipertermia) como uma reação unimolecular irreversível, onde em seus experimentos a concentração remanente $C(\tau)$ de células viáveis (ou tecidos não danificados) em função do tempo de exposição térmica τ (para uma dada temperatura constante T) foi obtida, relativamente à concentração inicial C_0 de células/tecidos viáveis, pela solução da equação de Bernoulli (eq. A.7) (abaixo no texto) onde k é a velocidade de reação (s^{-1}), ou seja, a taxa de conversão de $C(\tau)$ em células/tecidos permanentemente lesionados [75], [81].

Nesse contexto, a reação química que descreveria o processo de dano térmico é tal que: $C(\tau)$ é identificado com a concentração remanente de moléculas em seu estado nativo, sendo termicamente excitadas ao ponto de superar uma barreira energética $E_a \cong \Delta H^*$ e, portanto, formando um complexo ativo CC^* (com velocidade de ativação k_a) que, depois de algum tempo, pode tanto relaxar de volta ao seu estado nativo (com velocidade de relaxação k_b), ou progredir para o seu estado desnaturado D (células/tecidos permanentemente lesionados) (com velocidade de desnaturação do complexo ativo k_c), logo a velocidade global da reação será denotada por k [75], [82].



$$\Omega = \ln \left\{ \frac{C_0}{C(\tau)} \right\} = \int_0^\tau k dt = \int_0^\tau A e^{\left(\frac{-E_a}{RT(t)} \right)} dt \quad (\text{A.8})$$

Substituindo a eq. A.4 na eq. A.7 é definindo o parâmetro de dano térmico Ω (eq. A.8) que também ficou conhecido na literatura como o modelo de Arrhenius para determinação de danos térmicos [82]. Assim como o valor de CEM43 o valor de Ω é, também, comumente utilizado na literatura para definir limiares de danos térmicos irreversíveis à células/tecidos sob regime de HT. Por exemplo, se $\Omega = 2,3$ implica num valor de $C(\tau) = 10\%$, o que é considerado perda completa de clonogenicidade e que, nos trabalhos de Henriques e Moritz, esse valor foi associado à necrose epidermal [75].

Agora, comparando o modelo de Arrhenius (Ω) (eq. A.8) com o modelo de dose térmica calculada via CEM43, considerando um aquecimento à temperatura constante T, é possível escrever:

$$\ln \left(\frac{S}{N_0} \Big|_{\tau} \right) = -\frac{\tau}{D_0(T)} = \ln \left\{ \frac{C(\tau)}{C_0} \right\} = -k\tau \Leftrightarrow k = \frac{1}{D_0(T)} = A e^{\left(\frac{-E_a}{RT} \right)} \quad (\text{A.9})$$

ou ainda:

$$D_0(T) = \frac{e^{\left(\frac{E_a}{RT} \right)}}{A} \Leftrightarrow \ln[D_0(T)] = \frac{E_a}{RT} - \ln(A) \quad (\text{A.10})$$

E a correspondência entre esses dois modelos de danos térmicos (em função do tempo de exposição térmica τ a uma dada temperatura de referência/*breakpoint*) permite a determinação, experimental, dos parâmetros de Arrhenius A e E_a .

Por exemplo, novamente para as células neoplásicas de CHO (onde $D_0(43^\circ\text{C}) = 11,1 \text{ min} = 666 \text{ s}$), os dados do gráfico da Figura 1.4 (B) (na página 31), podem ser novamente plotados como mostra a Figura A.1 abaixo, e ajustados pela eq. A.10 de maneira a obter os valores: $E_a/R = 74,417$ ($E_a = 6,19 \times 10^5 \text{ J.mol}^{-1}$) e $\ln(A) = 229,0$ ($A = 2,84 \times 10^{99}$), que ajustam a região $T \geq 43^\circ\text{C}$ (pontos \square no gráfico); $E_a/R = 206,035$ ($E_a = 1,71 \times 10^6 \text{ J.mol}^{-1}$) e $\ln(A) = 645,2$ ($A = 1,67 \times 10^{280}$), que ajustam a região $T < 43^\circ\text{C}$ (pontos \bullet no gráfico) [82].

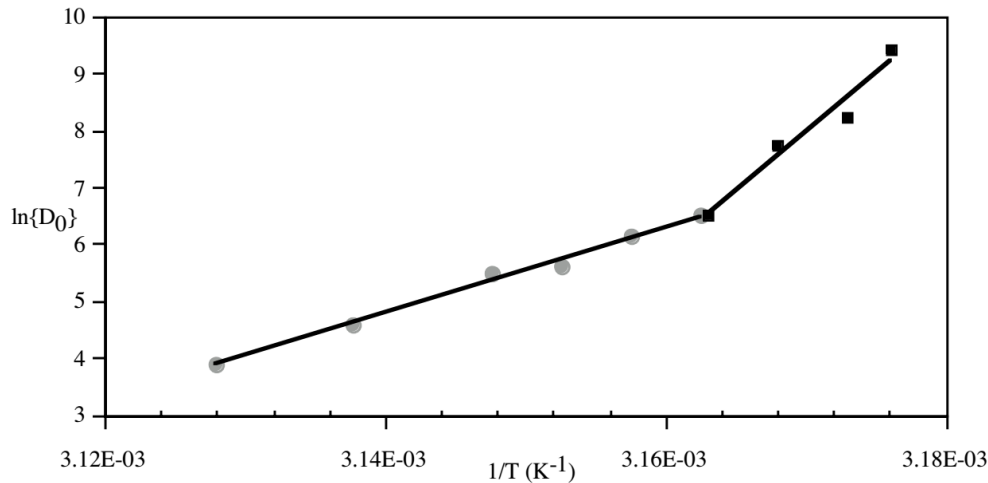


Figura A.1 Obtenção dos parâmetros de Arrhenius A e E_a utilizando a eq. A.10 para ajustar os dados experimentais das curvas de sobrevivência (*in vitro*) de células neoplásicas de ovário de hamster chinês em função do tempo de aquecimento, para diferentes valores de temperatura (constantes no tempo). Adaptado de: Pearce, J. A., 2009, p. 4 [82].

John A. Pearce já tem proposto na literatura mais de um método de ajuste do tipo multi-parâmetros (com soluções analíticas e também numéricas) para modelar dados de sobrevivência celular devido a múltiplos processos paralelos de danos térmicos [75], [84]. Além de discutir profundamente (em importantes artigos de revisão) proposições relevantes de outros autores apresentando, inclusive, um modelo para o cálculo de um coeficiente equivalente ao parâmetro de dano térmico (Ω) para o regime de temperaturas ablativas $\geq 48^\circ\text{C}$ (onde o cálculo do CEM43 tem sua validade muito questionada) [75], [76], [82], e [42, Cap. 2]. Os gráficos apresentados na Figura A.2 (abaixo no texto) mostram a comparação entre um desses modelos multi-parâmetros (a eq. A.11 proposta por Feng *et al.* em 2008) com o modelo de reação irreversível de Arrhenius (eq. A.10). O modelo de transição entre dois estados de Feng (eq. A.11) requer a determinação de três parâmetros de ajuste (α , β e γ) é capaz de ajustar muito melhor curvas de sobrevivência de células neoplásicas de uma linhagem de câncer de próstata humano PC3 (altamente metastático) e cuja temperatura de *breakpoint* igual a 44°C [83].

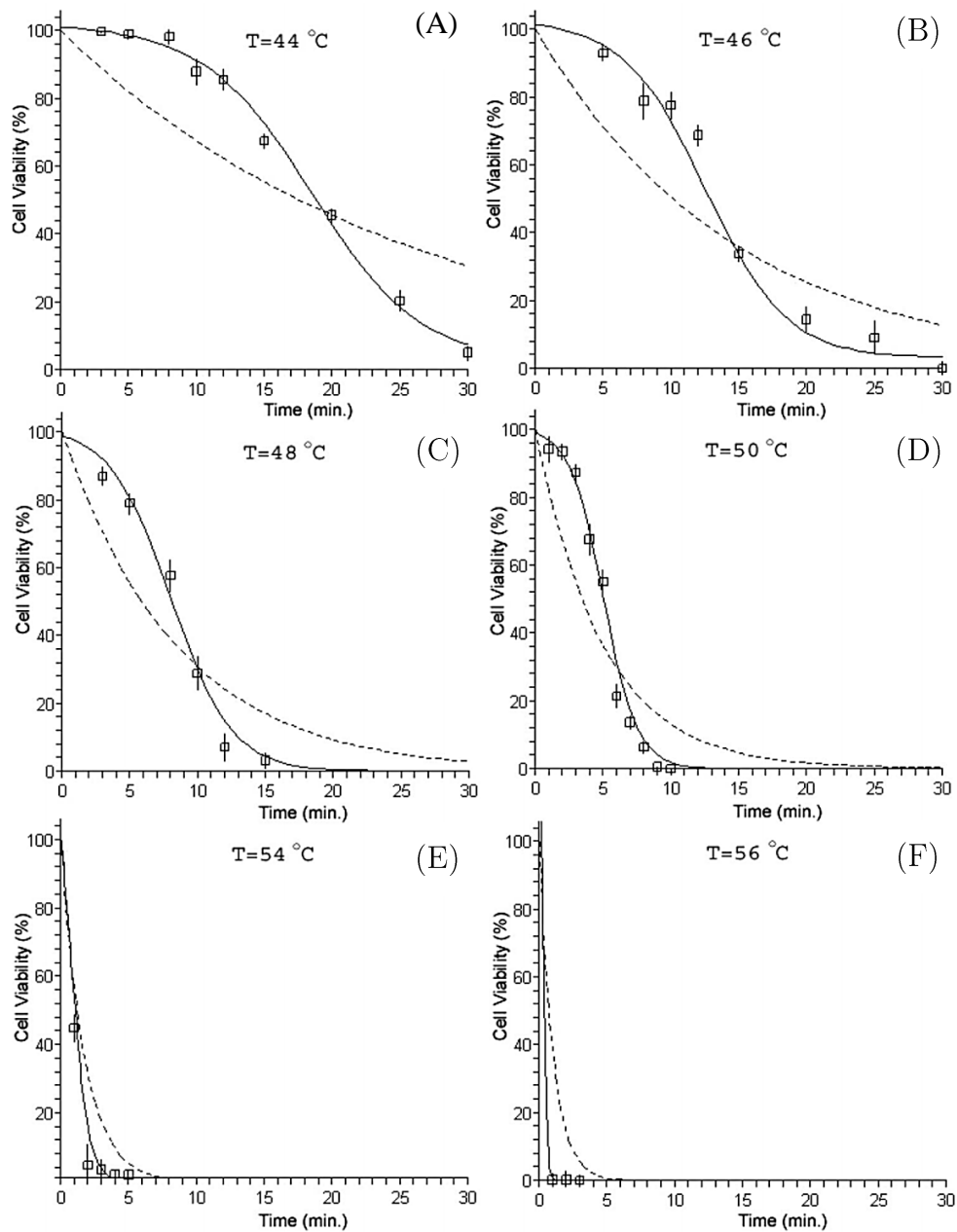


Figura A.2 Comparação, de (A) até (F), entre o modelo de transição entre dois estados de Feng (eq. A.11) (curva sólida) versus o modelo de reação irreversível de Arrhenius para danos térmicos (eq. A.10) (curva tracejada). Os pontos nos gráficos (\square) são dados experimentais das curvas de sobrevivência de células neoplásicas de PC3 (linhagem de câncer de próstata humano) às temperaturas de 44–56 °C. Adaptado de: Feng *et al.*, 2008, p. 19 [83].

A população de colônias viáveis ($g(\tau) = C(\tau, T)$) no modelo de transição de dois estados é dada em função do tempo de exposição térmica como segue abaixo:

$$\ln \left\{ \frac{C(\tau, T)}{1 - C(\tau, T)} \right\} = \frac{\gamma}{T} - \beta - \alpha\tau$$

tal que:

$$C(\tau, T) = \frac{e^{\left(\frac{\gamma}{T} - \beta - \alpha\tau\right)}}{1 + e^{\left(\frac{\gamma}{T} - \beta - \alpha\tau\right)}} = \frac{1}{1 + e^{-\left(\frac{\gamma}{T} - \beta - \alpha\tau\right)}} = g(\tau) \quad (\text{A.11})$$

onde para os dados experimentais da Figura A.2, $\alpha = 0,00493 \text{ s}^{-1}$, $\beta = 215,64$ (adimensional) e $\gamma = 70031 \text{ K}$ [75], [83].

Contudo, a despeito do aparente sucesso do ajuste da curva teórica aos dados experimentais na Figura A.2, a eq. A.11 é um modelo também limitado e leva a conclusões erradas sobre o acúmulo de danos térmicos irreversíveis a baixas temperaturas, *e.g.* uma exposição térmica de 34 min a temperatura de 37°C, de acordo com esse modelo, implica em $C(\tau) = 0,5$ o que é uma situação completamente não realista [75].

APÊNDICE B – Princípios físicos da geração de calor com nanopartículas magnéticas utilizando um campo magnético alternado.

As propriedades magnéticas de um meio material são caracterizadas, fundamentalmente, pela forma como sua magnetização $\vec{M}(H)$ varia em função do campo magnético externo \vec{H} aplicado. Onde a taxa de variação da magnetização em relação ao campo define sua susceptibilidade magnética (χ) (eq. B.1) [213, p. 393–394], [214, p. 1–5]:

$$\chi = \frac{\partial M}{\partial H} \quad (\text{B.1})$$

tal que ,

$$[\chi] = \frac{[M]}{[H]} = \frac{A/m}{A/m} = 1 \text{ (no SI)} \quad \text{ou} \quad [\chi] = \frac{[M]}{[H]} = \frac{emu}{Oe.cm^3} = 1 \text{ (no CGS)}$$

Essa grandeza física apresenta valores distintos (em sinal e módulo), *e.g.* para os três tipos básicos de comportamento magnético dos materiais na natureza: o diamagnetismo ($\chi < 0$ e com valor pequeno), paramagnetismo e antiferromagnetismo ($\chi > 0$ e com valor pequeno), ferromagnetismo e ferrimagnetismo ($\chi > 0$ e com valor alto) [140, p. 14–16].

Uma típica curva de magnetização (M vs. H), *e.g.* de materiais ferromagnéticos (vide Figura B.1), no regime de alta intensidade de campo magnético externo aplicado – o suficiente para, em baixas temperaturas, alinhar os momentos de dipolo magnéticos da amostra em uma única direção – a magnetização do material atinge um valor constante limite, ou seja, uma magnetização de saturação (M_s). E depois de atingida a saturação, se o módulo do campo externo for diminuído até zero ($H = 0$), então o valor da magnetização não se anula e o material mantém uma magnetização remanente (M_r). Com a inversão de sentido e o aumento da intensidade do campo externo aplicado ($-H$) promove a diminuição no módulo da magnetização do material até que esta seja anulada, ou seja, $M = 0$ tal que $H_c = -H$ é definido como o campo magnético coercitivo. A continuação desse processo também inverte o sentido da magnetização no material uma vez que, novamente ocorrerá o alinhamento dos momentos de dipolo magnético com o campo externo, até que o valor de saturação seja novamente acessado [141, p. 26–27].

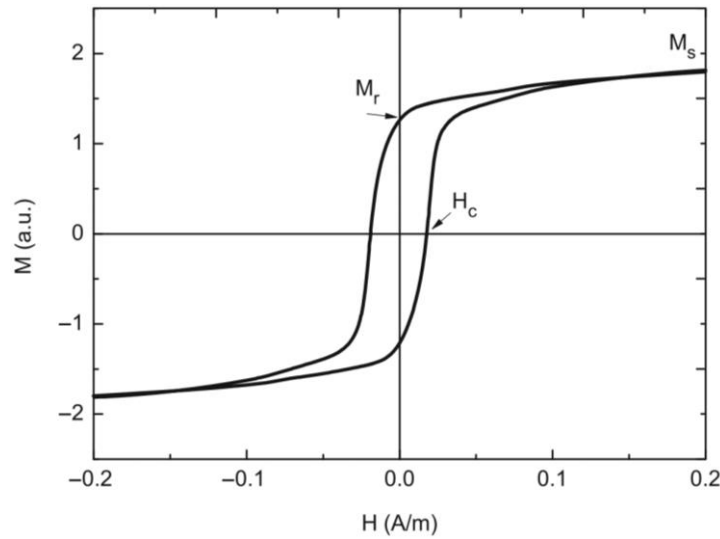


Figura B.1 Exemplo de histerese da curva de magnetização de uma amostra de material ferromagnético, mostrando alguns dos parâmetros físicos que caracterizam a resposta do material a um campo magnético externo aplicado: a magnetização de saturação (M_s), a magnetização remanente (M_r) e o campo coercitivo (H_c). Adaptado de: Guimaraes, A. P., 2009, p. 27 [141].

E num gráfico como a da Figura B.1, a área sob a curva (*loop* da histerese) é calculada como a integral (eq. B.2):

$$\text{Área} = \oint_{\text{ciclo}} \mu_0 \vec{M} \cdot d\vec{H} \quad (\text{B.2})$$

Utilizando o teorema de Poynting (eq. B.3) é possível demonstrar que, quando um meio material sofre a ação de um campo eletromagnético variável no tempo ($\vec{E}(t)$ e $\vec{H}(t)$), há geração de calor nesse meio (dQ) devido ao trabalho realizado pelo campo sobre a amostra (dW), convertendo energia eletromagnética em energia térmica [89, p. 98–102]:

$$\oint_{\text{ciclo}} dQ = \oint_{\text{ciclo}} dW = \int_V \left(\oint_{\text{ciclo}} \vec{E} \cdot \vec{J}_F dt - \oint_{\text{ciclo}} \vec{P} \cdot d\vec{E} - \oint_{\text{ciclo}} \mu_0 \vec{M} \cdot d\vec{H} \right) dV \quad (\text{B.3})$$

onde \vec{J}_F é a densidade de corrente elétrica no meio material devida a portadores de carga livres, \vec{P} é o vetor polarização elétrica do meio e dV é um elemento infinitesimal de volume da amostra.

A terceira integral no lado direito da eq. B.3 é conhecida na literatura como termo de perda (ou dissipação) histerética. Essa contribuição para o calor total dissipado no material é devida, somente, à resposta da magnetização do meio ao campo magnético externo aplicado. Uma quantidade física numericamente igual à área do *loop* da histerese (eq. B.2) numa curva de magnetização com campo coercitivo não nulo. O termo de perda histerética é de fundamental importância para a discussão e entendimento (em nossos resultados experimentais) dos mecanismos físicos de produção do aquecimento intratumoral por hipertermia magnética *in vivo*, utilizando nanopartículas magnéticas como fontes de calor. As seções B.1, B.2 e B.3, a seguir, detalharão os processos de geração de calor com nanopartículas magnéticas sob a ação de um campo eletromagnético oscilante no tempo, no regime em que a magnetização desse sistema responde linearmente (e fora de fase) ao campo alternado externamente aplicado.

B.1 Superparamagnetismo.

As nanopartículas magnéticas utilizadas em nossos experimentos de hipertermia magnética *in vivo* (vide as seções 2.1.1 e 2.1.2 no capítulo 2) possuem diâmetros menores que 20 nm e, portanto, são monodomínios magnéticos: devido ao seu tamanho reduzido a formação de paredes de domínio torna-se energeticamente desfavorável [140, p. 360–362]. De maneira simplificada, essa nanopartícula pode ser tratada (matematicamente) como um único momento de dipolo magnético $\vec{\mu} = V\vec{M}$, enorme em comparação com o momento de dipolo magnético de cada um de seus átomos (onde V e \vec{M} são, respectivamente, o volume e a magnetização total da partícula). A uma dada temperatura (T), na ausência de um campo magnético externo aplicado ($|\vec{H}| = 0$), a orientação de $\vec{\mu}$ (no monodomínio magnético) depende da energia de anisotropia $E = K_{ef}V$ (onde K_{ef} é a constante de anisotropia efetiva da nanopartícula) e, também, da energia térmica dada por $k_B T$ (onde $k_B = 1,3806503 \times 10^{-23}$ J/K é a constante de Boltzmann) [141, p. 59]. E quando um campo externo \vec{H} é aplicado girando o vetor \vec{M} de uma partícula monodomínio magnético (fora da sua direção inicial quando $|\vec{H}| = 0$), a rotação ocorre contra a força restauradora de alguma anisotropia, geralmente de forma, tensão, magnetocristalina, ou alguma combinação destas [140, p. 314].

Por exemplo, dependendo da estrutura cristalina, *i.e.* a forma como estão espacialmente ordenados os átomos ou moléculas de um material magnético, a maior parte de seus momentos de dipolo magnético atômicos alinha-se espontaneamente (por um processo de minimização de energia) paralelamente em determinadas direções, fazendo com que existam determinados eixos de fácil magnetização desse material, ou seja, uma anisotropia magnetocristalina. Tal que, para uma nanopartícula monodomínio magnético com formato elipsoidal e anisotropia uniaxial, cuja direção de fácil magnetização se dá ao longo do seu eixo maior (eixo c na Figura B.2). Na ausência de campos externos, quando o vetor \vec{M} dessa nanopartícula faz um ângulo (θ) com seu eixo de fácil magnetização, sua energia de anisotropia magnetocristalina é calculada como: $E \cong KV\text{sen}^2\theta$ onde K é a constante de anisotropia uniaxial (nessa expressão foram desprezados termos de quarta ordem no seno, ou seja, $O(\text{sen}^4\theta)$ que não serão considerados em nossa discussão). E a energia de agitação térmica ($k_B T$) faz com que a projeção de sua magnetização ao longo do eixo de anisotropia fique variando (flutuação na direção de \vec{M}) [215].

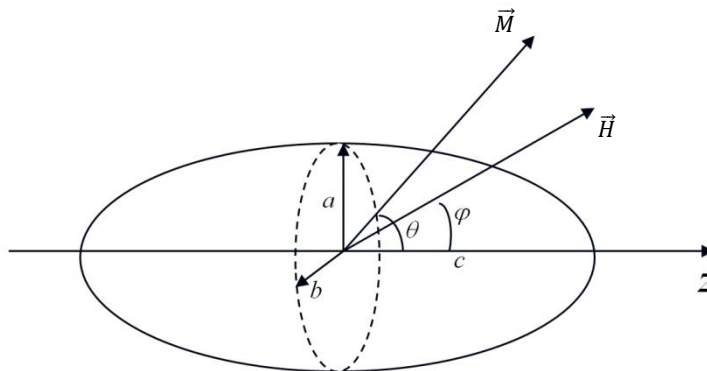


Figura B.2 Partícula elipsoidal monodomínio magnético com simetria magnetocristalina uniaxial na direção do seu eixo maior (cujo vetor \vec{M} forma um ângulo θ com o eixo de fácil magnetização), sob a ação de um campo magnético externo \vec{H} aplicado (que forma um ângulo φ com o eixo de fácil magnetização). Adaptado de: GUIMARÃES, A. P., 2009, p.80 [141].

Assim, no exemplo acima se $KV \gg k_B T$ para um conjunto desses elipsoides alongados e não interagentes entre si (*e.g.* nanopartículas de um material magnético macio, dispersas numa matriz não magnética com baixa fração volumétrica, e cuja maior dimensão esteja no intervalo $20 \text{ nm} < D_c < 100 \text{ nm}$), o seu vetor \vec{M} será estável e a influência da energia térmica na orientação de $\vec{\mu}$ pode ser desprezada [141, p. 69]. Nessa condição, se houver a ação de um campo externo numa determinada direção (φ) (relativamente ao eixo de fácil magnetização) (eixo c na B.2 acima no texto), então, de acordo com o modelo de Stoner-Wohlfarth a energia total de cada nanopartícula é calculada como:

$$E = KV\text{sen}^2\theta + \mu_0\vec{\mu} \cdot \vec{H}$$

$$E = V[K\text{sen}^2\theta + \mu_0MH \cos(\varphi - \theta)] \quad (\text{B.4})$$

Minimizando essa energia (ou seja, fazendo $\left(\frac{\partial E}{\partial \theta}\right)_{\theta_0} = 0$ e $\left(\frac{\partial^2 E}{\partial \theta^2}\right)_{\theta_0} > 0$ na eq. B.4) é possível escrever $M(H)$ para cada valor de θ e, somando sobre todos os ângulos, é possível construir as curvas de magnetização desse sistema (vide Figura B.3) [215].

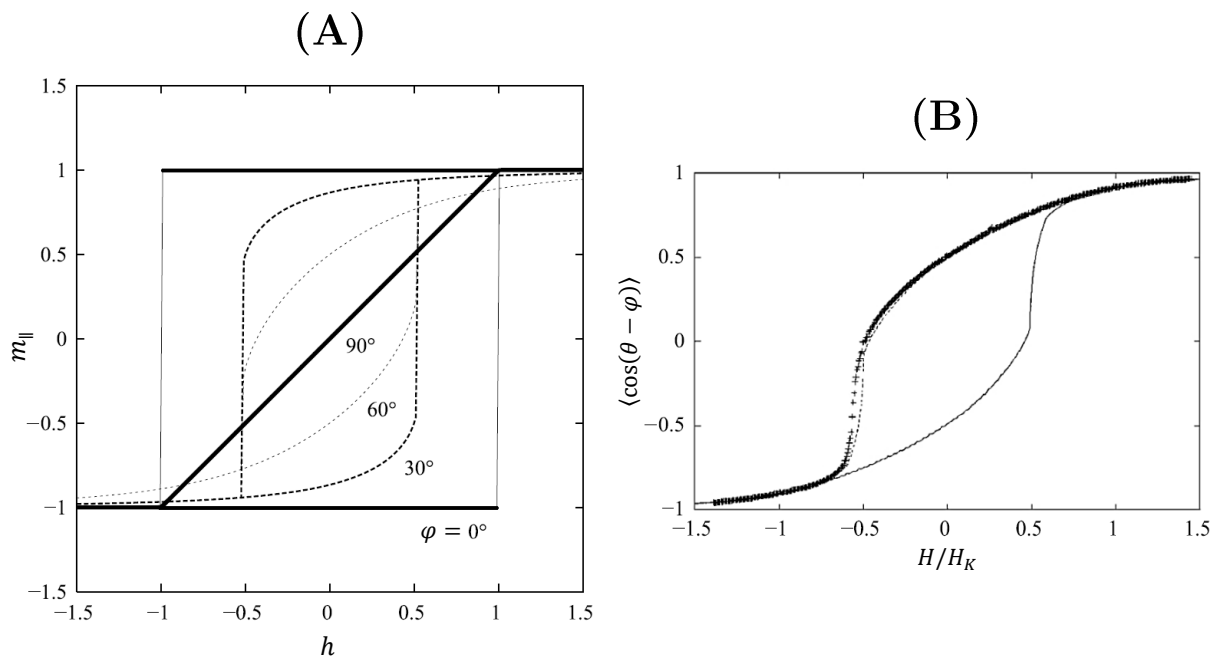


Figura B.3 (A) Curva da magnetização reduzida (m_{\parallel}) versus o campo magnético reduzido (h) para uma única partícula elipsoidal monodomínio magnético com anisotropia magnetocristalina uniaxial e homogênea magnetizada por um campo externo (H), no regime bloqueado da magnetização ($KV \gg k_B T$). Onde: $m_{\parallel} = \frac{M}{M_s} = \cos(\theta - \varphi)$; $h = \frac{H}{H_A}$ e $H_A = \frac{2K}{\mu_0 M_s}$ é o campo de anisotropia na ausência de um campo de desmagnetização. (B) Curva de histerese construída utilizando o modelo de Stoner-Wohlfarth para um *ensemble* de partículas: cálculo do valor médio da magnetização reduzida $\langle m_{\parallel} \rangle$ com todos os valores possíveis de θ , dentro de uma esfera unitária no intervalo $0 \leq \varphi \leq \frac{\pi}{2}$ (pontos (+) apenas no ramo superior do gráfico). A linha contínua foi calculada a partir de uma integração numérica de $\langle m_{\parallel} \rangle$ (procedimento não discutido no texto). Adaptado de: GUIMARÃES, A. P., 2009, p.80-90 [141].

Agora, numa segunda condição em que $k_B T \sim KV$ (o que ocorre para nanopartículas com diâmetro < 20 nm) e na ausência de campos externos, então, com grande frequência no tempo (da ordem de $10^9 - 10^{12}$ Hz) ocorrerá espontaneamente (por ativação térmica) uma reversão total no sentido da magnetização do monodomínio magnético, tornando-se completamente instável a orientação de $\vec{\mu}$ quando a temperatura da nanopartícula está acima

de uma determinada temperatura de bloqueio da magnetização ($T > T_b$) (onde T_b é a temperatura abaixo da qual as flutuações térmicas da magnetização se estabilizam e, também, é função do volume da partícula) [141, p. 16]. E, se um campo magnético for aplicado a um conjunto dessas nanopartículas magnéticas com tamanho bem reduzido, \vec{H} criará uma tendência de alinhamento de todos os momentos de dipolo magnético paralelamente à sua direção, enquanto que a energia térmica criará uma tendência de desalinhamento. Portanto, essa coleção desses monodomínios magnéticos com anisotropia magnetocristalina se comportará como uma amostra de material paramagnético, mas com a expressiva diferença que o módulo do seu momento magnético efetivo será gigante, tipicamente da ordem de 10^2 – 10^4 vezes maior que o momento magnético por unidade de átomo de uma amostra paramagnética que é, apenas, da ordem de alguns magnétons de Bohr ($\mu_B = 9,27400899 \times 10^{-24}$ J/T), daí a designação de superparamagnetismo [140, p. 383].

Assim, no exemplo que foi discutido nos parágrafos anteriores, a redução do volume da partícula abaixo de um volume crítico superparamagnético (V_{spm}), aumenta muito a probabilidade de que a energia térmica supere a barreira potencial que separa os dois estados de menor energia possíveis a um monodomínio magnético com simetria magnetocristalina uniaxial.

Em 1949 Louis Néel [92] propôs um modelo que foi utilizado para descrever o comportamento superparamagnético em que, para um conjunto de partículas monodomínios magnéticos com eixos de anisotropia efetiva aleatoriamente orientados (em campo nulo e à temperatura $T \neq 0$ K), cada uma delas é tratada de maneira simplificada como um sistema de dois níveis. E se esse *ensemble* for magnetizado na direção de um campo externo \vec{H} (resultando numa magnetização de saturação M_s). Após o desligamento do campo magnético externo a partir do instante $t_0 = 0$ s (quando $M_0 = M_s$), então, o módulo da magnetização do sistema de partículas $M(t)$ diminuirá com o tempo seguindo uma taxa de decaimento do tipo lei de Arrhenius, tal que [140, p. 383–390]:

$$-\frac{dM}{dt} = \frac{M}{\tau} \Leftrightarrow M(t) = M_0 e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)} \quad (\text{B.5})$$

Em que o parâmetro (τ) é definido como o tempo de relaxação e, quando $t = \tau$ a magnetização do sistema estará em apenas 37% do valor inicial. Néel também propôs que o tempo de relaxação fosse escrito como (eq. B.6):

$$\tau = \tau_0 e^\sigma \quad (\text{B.6})$$

Onde:

$$\sigma = \frac{K_{ef}V}{k_B T} \quad (\text{B.7})$$

O tempo τ_0 é tipicamente da ordem de $10^{-12} - 10^{-9}$ segundos e fisicamente significa que, sob a influência da energia térmica quando $k_B T \gg K_{ef}V$ (e na ausência de um campo magnético externo), ocorrem $\frac{1}{\tau_0}$ reversões por segundo na orientação da magnetização da partícula [141, p. 68]. Em 1963 Brown, W. F. [91], [216] corrigiu a expressão de Néel para o tempo de relaxação (eq. B.8) no desenvolvimento de um modelo que ficou conhecido na literatura como teoria de Néel-Brown, de maneira que [94], [109]:

$$\tau_N = \frac{\tau_0 e^\sigma}{\sqrt{\sigma}} \quad (\text{B.8})$$

Onde:

$$\tau_0 = \mu_0 \frac{\sqrt{\pi}}{2} \cdot \frac{M_s(1 + \alpha^2)}{\alpha \gamma_0 K_{ef}} \quad (\text{B.9})$$

Nessa abordagem τ_0 é calculado em uma função da magnetização de saturação (M_s), da constante de anisotropia efetiva (K_{ef}), do fator de *damping* (α) e da razão giromagnética do elétron ($\gamma_0 = 2,21 \times 10^5$ m/A.s), e a expressão para o tempo de relaxação de Néel-Brown (τ_N) escrito na forma da eq. B.8 é válido apenas para $\sigma \geq 2$ [94], [109].

Até agora nesta seção B.1 foi considerada, apenas, a possibilidade de ocorrer a inversão do vetor magnetização com a nanopartícula permanecendo estática. Mas para o caso em que as nanopartículas estejam dispersas num líquido carreador, ou seja, uma suspensão coloidal de monodomínios magnéticos há, também, a possibilidade que a nanopartícula

rotacione fisicamente sob ação de um campo magnético externo. Conforme apontado por Shliomis, M. I.:

Numa suspensão de partículas monodomínio magnético, a orientação de equilíbrio dos momentos magnéticos num campo aplicado pode ser atingida também pela rotação das próprias partículas em relação à matriz líquida. Este mecanismo de relaxação da magnetização é caracterizado pelo tempo de difusão rotacional browniano [94, p. 156].

Nesse caso é definido, também, o tempo de relaxação Browniano (τ_B), dado pela seguinte expressão (eq. B.10) [93], [94]:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad (\text{B.10})$$

Onde (η) é o coeficiente de viscosidade do líquido carreador (dispersão coloidal) e (V_H) é o volume hidrodinâmico da nanopartícula magnética, calculado como $V_H = (1 + \delta/R)^3 V_p$, onde (V_p) é o volume de material magnético (caroço da nanopartícula) e (δ) é a espessura da camada molecular (*e.g.* surfactante) na superfície da nanopartícula.

Portanto, os dois processos de inversão da magnetização também podem ocorrer simultaneamente. Neste caso o tempo de relaxação efetivo (τ) pode ser obtido pela seguinte expressão (eq. B.11):

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_B} + \frac{1}{\tau_N} \quad (\text{B.11})$$

A Figura B.4 mostra τ , τ_B e τ_N em função do diâmetro de nanopartículas dispersas num líquido carreador, considerando que estas sejam esféricas, com volume dado por $V_p = \pi D_p^3 / 6$. Os cálculos teóricos foram realizados utilizando os parâmetros experimentais de amostras analisadas em trabalho publicado por Branquinho, L. C. (2014): $K_{ef} = 2,5 \times 10^4$ erg/cm³, $\delta = 1,1$ nm, $\eta = 0,01002$ (para T=295 K) e $\tau_0 = 10^{-9}$ s. É possível perceber pelo gráfico que um tempo de relaxação efetivo (τ) (eq. B.11), resultado da combinação de (τ_B) (eq. B.10) e (τ_N) (eq. B.8), só é necessário em uma pequena faixa de diâmetro, onde estes dois últimos são aproximadamente da mesma ordem de grandeza. Para diâmetros menores do que

~ 19 nm, prevalece o tempo de relaxação de Néel-Brown, e para diâmetros maiores do que ~ 32 nm, prevalece o tempo de relaxação Browniano [144].

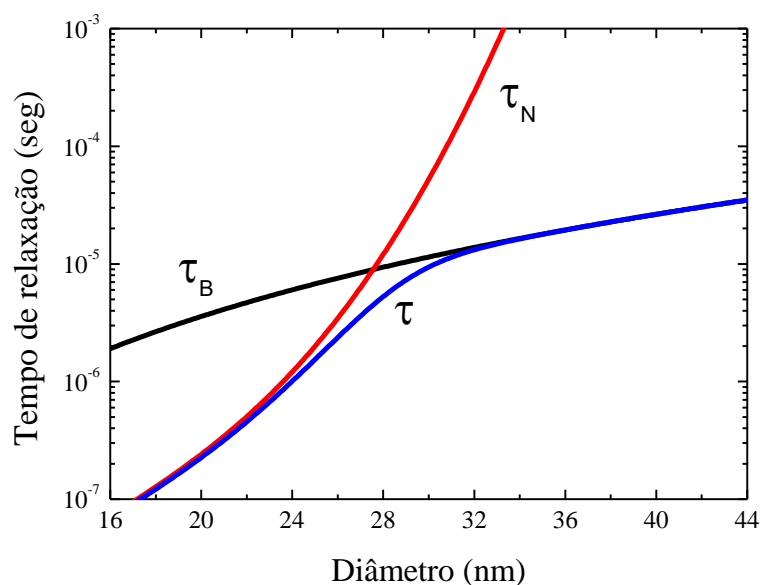


Figura B.4 Tempo de relaxação em função do tamanho para nanopartículas magnéticas esféricas (equações B.8, B.10 e B.11). Adaptado de: BRANQUINHO, L. C., 2014, p.34 [144].

Desde a primeira discussão acerca do fenômeno de superparamagnetismo proposta por Néel (em 1949), já foi estabelecida a relação entre o tempo de relaxação característico e o tempo (t_m) de uma medida realizada sobre o sistema de nanopartículas magnéticas. Por simples inspeção da eq. B.5 é fácil concluir que se $t \gg \tau$ então $M(t) \rightarrow 0$.

Portanto, a curva de magnetização de um *ensemble* de nanopartículas magnéticas (com diâmetro < 20 nm) tem um comportamento superparamagnético com ausência de campo coercitivo ($H_C = 0$), ou apresenta um *loop* de histerese ($H_C \neq 0$), dependendo da janela de tempo da medida realizada. Por exemplo, utilizando um magnetômetro de amostra vibrante (MAV) (intensidade de campo magnético variando no intervalo $-20 \text{ kOe} < H < 20 \text{ kOe}$ e com frequência $f \approx 100 \text{ Hz}$) em que o tempo de medida $t_m \approx 10^{-2} \text{ s}$ é maior que tempo de relaxação, tipicamente da ordem de $10^{-12} - 10^{-9} \text{ s}$ para nanopartículas abaixo de um volume crítico V_{spm} , a resposta da magnetização da amostra ao campo do MAV num ciclo é **superparamagnética** e a dependência de $M(T, H)$ com a temperatura e o campo magnético é descrita por uma função de Langevin $L(\xi)$ (que é o limite clássico de uma função de Brillouin):

$$M = M_s L(\xi) = M_s \left[\coth \left(\frac{\mu H}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{\mu H} \right] \quad (\text{B.12})$$

Enquanto que, em medidas de caracterização magnética *e.g.* por espectroscopia de Mössbauer (determinação da relação entre estruturas cristalinas e os campos magnéticos internos dos materiais) cujo tempo de medida é $t_m \approx 10^{-9} - 10^{-7}$ s, as nanopartículas são identificadas no regime bloqueado (comportamento ferro- ou ferrimagnético) [141, p. 68–76]. Ou seja:

- i. Se $t_m > \tau \leftrightarrow$ magnetização no regime superparamagnético (função de Langevin).
- ii. Se $t_m < \tau \leftrightarrow$ magnetização no regime bloqueado ($H_C \neq 0$).

Agora, é preciso ressaltar ao leitor que o tempo de relaxação de Néel-Brown (τ_N) escrito na forma da eq. B.8 é uma aproximação válida, apenas, para $\sigma \geq 2$. Coffey, W. T. e Kalmykov, Y. P. [144], [217] utilizando diretamente a equação de Landau-Lifshitz-Gilbert, mostraram que para o mesmo caso de anisotropia uniaxial com $\sigma > 2$, o tempo de relaxação pode ser reescrito em função do campo magnético reduzido $h = \left(\frac{H}{H_A} \right)$, onde $H_A = \left(\frac{2K}{\mu_0 M_s} \right)$ é o campo de anisotropia na ausência de um campo de desmagnetização, da seguinte forma (eq. B.13):

$$\tau(h) = \frac{\tau_0}{\sqrt{\sigma}(1-h^2)} \left[(1+h)e^{-\sigma(1+h)^2} + (1-h)e^{-\sigma(1-h)^2} \right]^{-1} \quad (\text{B.13})$$

Nesse mesmo trabalho Coffey e Kalmykov obtiveram uma segunda expressão (válida para qualquer valor de σ), um resultado aproximado calculado numericamente, onde o tempo de relaxação não depende de H sendo escrito na forma da eq. B.14 (abaixo) [144], [217]:

$$\tau_N = \tau_0 (e^\sigma - 1) \left(2^{-\sigma} + \frac{2\sigma^{3/2}}{\sqrt{\pi}(1+\sigma)} \right)^{-1} \quad (\text{B.14})$$

O parâmetro τ_0 continua sendo escrito na forma da eq. B.9 e se forem aplicados os limites de $h \ll 1$ na eq. B.13 e $\sigma \gg 1$ na eq. B.14, então, ambos resultados recuperam τ_N na forma da eq. B.8 (proposta originalmente por Brown).

A Figura B.5, abaixo, mostra os dois tempos de relaxação em função do tamanho da nanopartícula, onde (τ_N -usual) é o tempo de relaxação dado pela eq. B.8, e (τ_N -numérico) é o tempo de relaxação dado pela equação eq. B.14. Vemos que (τ_N -usual) começa a crescer novamente com a diminuição de (σ) para diâmetros menores que 15 nm, enquanto que (τ_N -numérico) corrige essa inconsistência presente para pequenos valores de (σ).

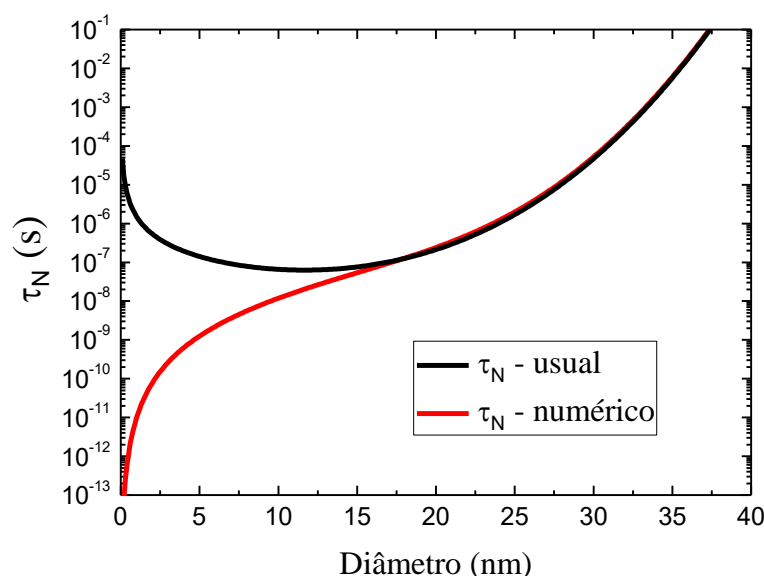


Figura B.5 Tempo de relaxação de Néel-Brown dados pela eq. B.8 (τ_N -usual) proposto por Brown e pela eq. B.14 (τ_N -numérico) proposto por Coffey e Kalmykov. Os cálculos foram realizados considerando $K_{ef} = 2,5 \times 10^4 \text{ erg/cm}^3$, $T = 295 \text{ K}$, $\tau_0 = 10^{-9} \text{ s}$ e as nanopartículas com formato esférico ($\pi D^3/6$). Adaptado de: BRANQUINHO, L. C., 2014, p.35 [144].

B.2 Interação do campo eletromagnético com a matéria e o Teorema de Poynting.

Seja um meio material linear sujeito a ação de um campo eletromagnético variável no tempo $\vec{E}(\vec{r}, t)$ e $\vec{B}(\vec{r}, t)$, e cuja permissividade elétrica (ϵ) e permeabilidade magnética (μ) não variam em função desses campos externos aplicados.

O campo elétrico $\vec{E}(\vec{r}, t)$ da onda eletromagnética interage com esse meio alterando a orientação de seus momentos de dipolo elétricos moleculares (\vec{p}_i), realizando o trabalho de polarizar o material numa direção específica. Então, o vetor polarização elétrica (\vec{P}) desse meio (quantidade física macroscópica) é definido como a razão do número total de momentos de dipolo elétricos moleculares ($\sum \vec{p}_i$) sobre o volume total da amostra (V) (eq. B.15). Defina-

se, também, o vetor deslocamento elétrico (\vec{D}) como uma quantidade física vetorial com a mesma unidade da polarização (no SI é dado em C/m^2) tal que \vec{D} e $\vec{E}(\vec{r}, t)$ estão relacionados através da eq. B.16, abaixo no texto. Já a interação do campo magnético $\vec{H}(t)$ dessa mesma onda altera a orientação do vetor magnetização (\vec{M}) desse meio material linear, que é definido como a razão do número total de seus momentos de dipolo magnéticos intrínsecos ($\sum \vec{m}_i$) sobre o volume total da amostra (V) (eq. B.17). Sua relação com os vetores intensidade de campo magnético $\vec{H}(t)$ e densidade de fluxo magnético $\vec{B}(t)$ é expressa através da eq. B.18 (no SI), abaixo no texto. Onde o módulo do campo magnético (H) e da magnetização (M) tem a mesma unidade no SI (A/m) assim como no CGS (Oe) tal que, algumas vezes na literatura \vec{H} é também chamado de força de magnetização de um polo magnético [140, p. 3].

$$\vec{P} = \frac{1}{V} \sum_{i=1}^N \vec{p}_i \quad (\text{B.15}) \quad \vec{D} = (\epsilon_0 \vec{E} + \vec{P}) \quad (\text{B.16})$$

onde: $\epsilon_0 = 8,854 \times 10^{-12} \text{ C}^2 / \text{N.m}^2$ (no SI)

$$\vec{M} = \frac{1}{V} \sum_{i=1}^N \vec{m}_i \quad (\text{B.17}) \quad \vec{B} = \mu_0 (\vec{H} + \vec{M}) \quad (\text{B.18})$$

onde: $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} \text{ V.s /A.m}$ (no SI)

Por sua vez, o meio magnetizado é capaz de produzir um novo campo magnético no ambiente externo a essa amostra. Esse campo magnético tem origem no movimento eletrônico em torno dos núcleos atômicos (correntes elementares numa concepção semi-clássica), e também devido ao momento magnético intrínseco de *spin* do elétron. Portanto, admitindo que não exista uma densidade de correntes de transporte devido a portadores de carga livres ($J_F = 0$), ainda assim existirá num elemento de volume (dV') desse meio magnetizado uma densidade de correntes com origem nas propriedades eletrônicas microscópicas ($\vec{J}_{micro}(\vec{r}')$) tal que, o efeito macroscópico de todas essas contribuições dá origem a uma densidade de corrente de magnetização (\vec{J}_M) como mostrado na expressão abaixo (eq. B.19) [89, p. 81–82], [218]:

$$\vec{J}_M = \frac{1}{V} \int_V \vec{J}_{micro}(\vec{r}') dV' \quad (\text{B.19})$$

onde \vec{r}' é a posição do elemento infinitesimal de volume dV' dentro do volume total de material magnetizado.

Agora, caso esse meio também seja submetido a uma diferença de potencial elétrico, poderá existir ainda uma densidade de corrente de transporte de portadores de cargas livres ($J_F \neq 0$). Nessas condições o potencial vetor magnético $\vec{A}(\vec{r})$ total em um determinado ponto \vec{r} do espaço (fora do volume da amostra) será calculado através da eq. B.20 [20], [219]:

$$\vec{A}(\vec{r}) = \frac{\mu_0}{4\pi} \left[\int_V \frac{\vec{J}_F(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} dV' + \int_V \frac{\vec{\nabla}' \times \vec{M}(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} dV' + \oint_S \frac{\vec{M}(\vec{r}') \times \hat{n}}{|\vec{r} - \vec{r}'|} dA' \right] \quad (\text{B.20})$$

Comparando as duas primeiras integrais na eq. B.20, vemos que a quantidade $\vec{\nabla}' \times \vec{M}(\vec{r}')$ deverá ter dimensão de densidade de corrente. Já a terceira integral representa a contribuição para o potencial vetor magnético devido, apenas, à densidade de corrente na superfície S do material (sua interface com o meio externo), mas com origem nas correntes atômicas que geram a magnetização $\vec{M}(\vec{r}')$. Contudo, a densidade de corrente de magnetização \vec{J}_M , definida de forma mais geral pela eq. B.19, não comporta qualquer fluxo macroscópico de cargas em todo o corpo (uma consequência do fato de que ela descreve circuitos de corrente confinados a distâncias atômicas), então, pode ser restringida ao caso onde os efeitos de superfície podem ser desprezados, pois a integral de \vec{J}_M ao longo da superfície de uma seção transversal genérica feita no volume V é igual à zero. Podemos, então, escrever que [89, p. 83]:

$$\vec{J}_M = \vec{\nabla} \times \vec{M} = \frac{1}{V} \int_V \vec{J}_{micro}(\vec{r}') dV' \quad (\text{B.21})$$

A densidade de corrente \vec{J}_F poderia surgir devido a uma diferença de potencial de origem eletrostática aplicada por uma fonte externa. Contudo, como estamos analisando a interação da matéria com uma onda eletromagnética, nesse contexto a sua origem é devida a

ação de uma força eletromotriz induzida pela variação da densidade de fluxo magnético (leis de Faraday e Lenz).

Há ainda outras duas contribuições para a densidade total (\vec{J}_T) de correntes na amostra que devemos levar em consideração. A primeira delas é a densidade de corrente de deslocamento (\vec{J}_D), quantidade vetorial proposta por Maxwell na correção da lei de Ampère (em 1861), e que não representa uma corrente elétrica real, mas uma quantidade física que possui dimensão de densidade de corrente, com origem na variação do campo elétrico no tempo (eq. B.22). Por fim, a última contribuição a ser considerada se deve à polarização elétrica do meio na presença do campo $\vec{E}(t)$, e é chamada de densidade de corrente de polarização (\vec{J}_P) (eq. B.23)[89], [220]:

$$\vec{J}_D = \epsilon_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad (\text{B.22})$$

$$\vec{J}_P = \frac{\partial \vec{P}}{\partial t} \quad (\text{B.23})$$

Portanto, a densidade de corrente total (\vec{J}_T) num meio material linear sujeito a ação de um campo eletromagnético variável no tempo $\vec{E}(\vec{r}, t)$ e $\vec{B}(\vec{r}, t)$, é finalmente escrita como (eq. B.24):

$$\vec{J}_T = \vec{J}_F + \vec{J}_M + \vec{J}_P + \vec{J}_D$$

$$\vec{J}_T = \vec{J}_F + (\vec{\nabla} \times \vec{M}) + \frac{\partial \vec{P}}{\partial t} + \epsilon_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad (\text{B.24})$$

Nesse contexto, a lei de Ampère-Maxwell pode ser escrita da seguinte forma (eq. B.25):

$$\vec{\nabla} \times \vec{B} = \mu_0 \vec{J}_T = \mu_0 \vec{J}_F + \mu_0 \vec{\nabla} \times \vec{M} + \mu_0 \frac{\partial \vec{P}}{\partial t} + \mu_0 \epsilon_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t}$$

$$\vec{\nabla} \times \left(\frac{\vec{B}}{\mu_0} - \vec{M} \right) = \vec{J}_F + \frac{\partial}{\partial t} (\vec{P} + \epsilon_0 \vec{E}) \Leftrightarrow \vec{\nabla} \times \vec{H} = \vec{J}_F + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (\text{B.25})$$

A energia transportada por uma frente de onda eletromagnética (no vácuo μ_0), por unidade de tempo e por unidade de área, é dada pelo módulo do vetor de Poynting (\vec{S}) (eq. B.26).

$$\vec{S} = \frac{1}{\mu_0} \vec{E} \times \vec{B} \quad (\text{B.26})$$

Onde [S] = J/m².s (no SI).

As leis de Ampère-Maxwell (eq. B.27) e de Faraday (eq. B.28) podem ser manipuladas de maneira a escrevermos:

$$\vec{E} \cdot (\vec{\nabla} \times \vec{H}) = \vec{E} \cdot \vec{J}_F + \vec{E} \cdot \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (\text{B.27})$$

$$\vec{H} \cdot (\vec{\nabla} \times \vec{E}) = -\vec{H} \cdot \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (\text{B.28})$$

Utilizando a seguinte identidade vetorial:

$$\vec{\nabla} \cdot (\vec{a} \times \vec{b}) = (\vec{\nabla} \times \vec{a}) \cdot \vec{b} - \vec{a} \cdot (\vec{\nabla} \times \vec{b}) \quad (\text{B.29})$$

Resulta que,

$$\begin{aligned} (\vec{\nabla} \times \vec{E}) \cdot \vec{H} - \vec{E} \cdot (\vec{\nabla} \times \vec{H}) &= -\vec{H} \cdot \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} - \vec{E} \cdot \vec{J}_F - \vec{E} \cdot \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \\ -\vec{\nabla} \cdot (\vec{E} \times \vec{H}) &= -\vec{\nabla} \cdot \vec{S} = \vec{E} \cdot \vec{J}_F + \vec{E} \cdot \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} + \vec{H} \cdot \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \end{aligned} \quad (\text{B.30})$$

Por fim, integrando dos dois lados dessa igualdade num volume (V) delimitado por uma superfície fechada (S), resulta em:

$$-\oint_S \vec{S} \cdot d\vec{A} = \int_V \left(\vec{E} \cdot \vec{J}_F + \vec{E} \cdot \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} + \vec{H} \cdot \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \right) dV \quad (\text{B.31})$$

A eq. B.31 é conhecida na literatura como o teorema de Poynting e tem dimensão de J/s (no SI), ou erg/s (no CGS), onde o termo $\left(\oint_S \vec{S} \cdot \hat{n} dA \right)$ deve ser interpretado como o fluxo (ou taxa) de energia por unidade de tempo (potência) absorvida pelo meio material de volume (V) através de sua superfície (S). Tal que se pode escrever:

$$P_{ot} = \frac{dW}{dt} = -\oint_S \vec{S} \cdot d\vec{A} \quad (\text{B.32})$$

Portanto, integrando os dois lados da eq. B.32 em relação ao tempo obtemos o trabalho total realizado pelos campos $\vec{E}(t)$ e $\vec{B}(t)$ sobre o sistema, desde um instante inicial (t_0) até um instante qualquer (t):

$$\int_{W(t_0)}^{W(t)} dW = -\int_{t_0}^t \left(\oint_S \vec{S} \cdot \hat{n} dS \right) dt = \int_{t_0}^t \left(\int_V \vec{E} \cdot \vec{J}_F dV + \int_V \vec{E} \cdot \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} dV + \int_V \vec{H} \cdot \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} dV \right) dt$$

$$\int_{W(t_0)}^{W(t)} dW = \int_{t_0}^t \left(\int_V \vec{E} \cdot \vec{J}_F dV \right) dt + \int_V \left(\int_{D(t_0)}^{D(t)} \vec{E} \cdot d\vec{D} \right) dV + \int_V \left(\int_{B(t_0)}^{B(t)} \vec{H} \cdot d\vec{B} \right) dV \quad (\text{B.33})$$

Agora, seja o caso particular em que $\vec{E}(t)$ e $\vec{B}(t)$ oscilem periodicamente no tempo com frequência ω , tal que o período de oscilação é dado por $T = 2\pi/\omega$. Então, se o trabalho for calculado num ciclo completo ($t = t_0 + T$), isso implicará que:

$$E(t_0) = E(t) \quad \text{B.34 (a)}$$

$$B(t_0) = B(t) \quad \text{B.34 (b)}$$

Reescrevendo as diferenciais totais dos campos elétrico e magnético:

$$d(\vec{E} \cdot \vec{D}) = \vec{E} \cdot d\vec{D} + \vec{D} \cdot d\vec{E} \quad \text{B.35 (a)} \quad d(\vec{H} \cdot \vec{B}) = \vec{H} \cdot d\vec{B} + \vec{B} \cdot d\vec{H} \quad \text{B.35 (b)}$$

Substituindo a eq. B.34 (a) e eq. B.35 (a) na segunda integral do lado direito da eq. B.33, e utilizando $\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P}$, teremos:

$$\begin{aligned} \int_V \left(\int_{D(t_0)}^{D(t)} \vec{E} \cdot d\vec{D} \right) dV &= \int_V \left(\oint_{\text{ciclo}} d(\vec{E} \cdot \vec{D}) - \oint_{\text{ciclo}} (\epsilon_0 \vec{E} + \vec{P}) \cdot d\vec{E} \right) dV \\ \int_V \left(\int_{D(t_0)}^{D(t)} \vec{E} \cdot d\vec{D} \right) dV &= \int_V \left(\oint_{\text{ciclo}} d(\vec{E} \cdot \vec{D}) - \oint_{\text{ciclo}} \epsilon_0 \vec{E} \cdot d\vec{E} - \oint_{\text{ciclo}} \vec{P} \cdot d\vec{E} \right) dV \\ \int_V \left(\int_{D(t_0)}^{D(t)} \vec{E} \cdot d\vec{D} \right) dV &= - \int_V \left(\oint_{\text{ciclo}} \vec{P} \cdot d\vec{E} \right) dV \end{aligned} \quad \text{B.36 (a)}$$

E substituindo a eq. B.34 (b) e eq. B.35 (b) na segunda integral do lado direito da eq. B.33, e utilizando $\vec{B} = \mu_0(\vec{H} + \vec{M})$, teremos:

$$\begin{aligned} \int_V \left(\int_{B(t_0)}^{B(t)} \vec{H} \cdot d\vec{B} \right) dV &= \int_V \left(\oint_{\text{ciclo}} d(\vec{H} \cdot \vec{B}) - \oint_{\text{ciclo}} \mu_0 \vec{H} \cdot d\vec{H} - \oint_{\text{ciclo}} \mu_0 \vec{M} \cdot d\vec{H} \right) dV \\ \int_V \left(\int_{B(t_0)}^{B(t)} \vec{H} \cdot d\vec{B} \right) dV &= - \int_V \left(\oint_{\text{ciclo}} \mu_0 \vec{M} \cdot d\vec{H} \right) dV \end{aligned} \quad \text{B.36 (b)}$$

De volta com os resultados das eq. B.36 (a) e eq. B.36 (b) na eq. B.33, então, o trabalho total realizado pelo campo eletromagnético sobre o meio material (em um ciclo completo) fica escrito da seguinte forma:

$$\oint_{\text{ciclo}} dW = \int_V \left(\oint_{\text{ciclo}} \vec{E} \cdot \vec{J}_F dt - \oint_{\text{ciclo}} \vec{P} \cdot d\vec{E} - \oint_{\text{ciclo}} \mu_0 \vec{M} \cdot d\vec{H} \right) dV \quad (\text{B.37})$$

B.3 Hipertermia magnética com nanopartículas magnéticas: Teoria de Resposta Linear.

Seja um material magnético de volume (V) delimitado por uma superfície (S) colocado no interior de um solenoide conduzindo uma corrente elétrica alternada periodicamente no tempo (vide Figura B.6) e, portanto, sujeito a ação de um campo eletromagnético alternado externo. Suponha, também, que sua permissividade elétrica (ϵ) e permeabilidade magnética (μ) não variam em função desses campos externos aplicados, um material linear e do tipo ôhmico cuja condutividade elétrica é igual a (σ), tal que $\vec{J}_F = \sigma \vec{E}$.

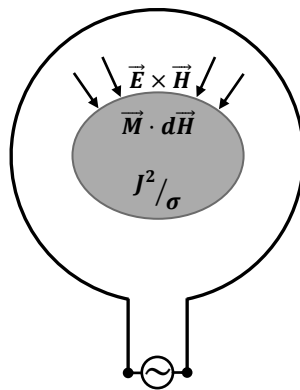


Figura B.6 Termos de energia envolvidos no Teorema de Poynting (eq. B.37). Adaptado de: BERTOTTI, 1998, p.100 [89].

O teorema de Poynting na forma da eq. B.37 (vide a seção B.2) permite calcular o trabalho realizado sobre um meio material (qualquer) quando colocado na presença de campos elétricos e magnéticos oscilando no tempo. Da primeira lei da termodinâmica (eq. B.38), temos que a variação da energia interna (dU) é igual à diferença entre o calor (dQ) gerado no meio material e o trabalho (dW) realizado pelo agente externo sobre a amostra.

$$dU = dQ - dW \quad (\text{B.38})$$

Num ciclo completo, em que o estado termodinâmico final desse material será igual ao seu estado inicial, a variação de sua energia interna é nula, ou seja, todo o trabalho realizado sobre o sistema é dissipado na forma de calor.

$$\oint_{\text{Ciclo}} dQ = \oint_{\text{Ciclo}} dW \quad (\text{B.39})$$

Tal que,

$$\oint_{\text{Ciclo}} dQ = \int_V \left(\int_{t_0}^t \frac{J_F^2}{\sigma} dt - \oint_{\text{Ciclo}} \vec{P} \cdot d\vec{E} - \oint_{\text{Ciclo}} \mu_0 \vec{M} \cdot d\vec{H} \right) dV \quad (\text{B.40})$$

Em particular, por se tratar de um material magnético, caso a resposta de sua magnetização $M(H)$, em função do campo magnético externo aplicado, apresente um comportamento histerético (campo coercitivo $H_C \neq 0$). A área do *loop* de sua histerese na curva de magnetização (vide Figura B.1, na introdução do apêndice A) é calculada pela seguinte integral (eq. B.41):

$$\text{Área da histerese} = \oint_{\text{Ciclo}} \mu_0 \vec{M} \cdot d\vec{H} \quad (\text{B.41})$$

Essa integral (eq. B.41) é identificada na literatura como o termo de perda (ou dissipação) histerética, e representa a conversão irreversível da energia armazenada no campo magnético externo em calor no meio material [89, p. 99–100].

A integral do termo ôhmico $\left(\frac{J_F^2}{\sigma}\right)$ representa a dissipação de calor por efeito joule, devido à indução de correntes elétricas parasitas (*eddy currents*) no material por ação do campo elétrico alternado externo. Essa integral é identificada na literatura como o termo de perda por *eddy currents* [89, p. 99–100].

A integral no termo $(\vec{P} \cdot d\vec{E})$ é a potência necessária para criar a polarização do meio. Essa integral é identificada na literatura como o termo de perda dielétrica, e surge da interação do campo elétrico alternado com os dipolos elétricos do meio material [221, Cap. 6].

O termo de perda por histerese é de fundamental importância no entendimento dos resultados experimentais que serão apresentados nessa tese de doutorado, para a discussão dos mecanismos físicos de aquecimento intratumoral por hipertermia magnética *in vivo* utilizando nanopartículas magnéticas como fontes geradoras de calor, acionadas por um campo magnético alternado externamente aplicado ao corpo dos animais.

Agora, ao considerar o problema de um sistema de nanopartículas magnéticas sujeitas à ação de um campo magnético alternando, dada sua dimensão reduzida e que em geral ferritas não são boas condutoras elétricas, os termos de perda dielétrica e por *eddy currents* na eq. B.40 podem ser desprezados, prevalecendo apenas a contribuição da magnetização da partícula para a geração de calor [42, Cap. 17]. O tratamento matemático que será apresentado a seguir (aproximação inspirada no modelo de Debye) é uma teoria macroscópica cujas previsões têm boa concordância com resultados experimentais da literatura, no regime de campos magnéticos de baixa intensidade, nanoestruturas homogêneas de 15nm até 30 nm (constituída inteiramente de um mesmo material magnético) e desprezando mecanismos de interação dipolar entre partículas [17], [222], [223]. Esse é o modelo mais utilizado na literatura para descrever o fenômeno de hipertermia com nanopartículas magnéticas sob a ação de um campo magnético alternado, chamado de Teoria de Resposta Linear (TRL) [223]. Contudo, a TRL pressupõe que todos os *spins* presentes na nanopartícula respondem de forma idêntica à excitação do campo externo, admitindo simetria translacional e rotação coerente de todos os momentos dipolo magnético e ignorando o fato que, mesmo para nanopartículas magnéticas homogêneas, os átomos de sua superfície respondem de maneira diferente dos

átomos de seu interior (*e.g.* por que possuem um menor número de vizinhos), um efeito que se torna mais evidente quanto menor é a dimensão dessa nanoestrutura, ou seja, quanto maior for a razão superfície-volume. Da mesma forma, quando se aumenta o diâmetro, os efeitos de nucleação de estados de vórtice e surgimento de multidomínios tornam-se importantes, destruindo a uniformidade da chamada hipótese do *spin* gigante, proposta por Brown [17], [109].

No contexto da TRL, seja $H(t)$ uma excitação externa cossenoidal (*input* do sistema), onde (H_0) é a amplitude do campo alternado e (ω) é sua frequência angular, escrito como (eq. B.42):

$$H(t) = \text{Re}(H_0 e^{i\omega t}) = H_0 \cos(\omega t) \quad (\text{B.42})$$

Considere, também, que a resposta da magnetização das nanopartículas (*output* do sistema) é dada por (eq. B.43):

$$M(t) = \text{Re}(M_0 e^{i(\omega t - \varphi)}) = M_0 \cos(\omega t - \varphi) \quad (\text{B.43})$$

Diferindo do *input* somente pela existência de uma fase (φ) , onde (M_0) é a amplitude de oscilação da magnetização.

O regime linear é definido de tal forma que, a resposta da magnetização $M(H)$ das nanopartículas magnéticas deve ser linearmente proporcional ao campo H (aproximação de primeira ordem). Tal que:

$$M(t) \cong \text{Re}\left(\frac{\partial M}{\partial H} H(t)\right) = \text{Re}(\chi H(t)) \quad (\text{B.44})$$

onde $\chi = \chi' - i\chi''$ é a susceptibilidade magnética com parte real (χ') e parte imaginária (χ'') .

Desenvolvendo, primeiramente, a eq. B.44, se tem:

$$M(t) = \text{Re}(\chi H(t)) = \text{Re}[(\chi' - i\chi'')H_0(\cos(\omega t) + i\text{sen}(\omega t))]]$$

$$M(t) = \text{Re}[(\chi' H_0 \cos(\omega t) + \chi'' H_0 \text{sen}(\omega t)) + i(\chi' H_0 \text{sen}(\omega t) - \chi'' H_0 \cos(\omega t))]]$$

$$M(t) = \chi' H_0 \cos(\omega t) + \chi'' H_0 \text{sen}(\omega t) \quad \text{B.45 (a)}$$

Agora, desenvolvendo a eq. B.43, escreve-se:

$$M(t) = M_0 \cos(\omega t - \varphi) = M_0 \cos(\omega t) \cos(\varphi) + M_0 \text{sen}(\omega t) \text{sen}(\varphi) \quad \text{B.45 (b)}$$

Comparando as equações B.45 (a) e (b) conclui-se que:

$$\chi' = \frac{M_0 \cos(\varphi)}{H_0} \quad \text{B.46 (a)} \quad \chi'' = \frac{M_0 \text{sen}(\varphi)}{H_0} \quad \text{B.46 (b)}$$

Definindo $|\chi| = \left(\frac{M_0}{H_0}\right)$, então, é possível escrever a diferença de fase entre $M(t)$ e $H(t)$ em termos das componentes real e imaginária da susceptibilidade magnética da nanopartícula:

$$\cos\varphi = \frac{\chi'}{|\chi|} \quad \text{B.47 (a)} \quad \text{sen}\varphi = \frac{\chi''}{|\chi|} \quad \text{B.47 (b)}$$

Para calcularmos o calor dissipado num ciclo (por cada nanopartícula), com período de excitação do campo magnético externo igual a $T = \left(\frac{2\pi}{\omega}\right)$, reescrevemos o teorema de Poynting (eq. B.40) apenas para o termo de perda histerética utilizando as equações B.42 e B.43:

$$\oint_{\text{ciclo}} dQ = \oint_{\text{ciclo}} dW = - \int_{V_{np}} \left(\oint_{\text{ciclo}} \mu_0 \vec{M} \cdot d\vec{H} \right) dV$$

$$\oint_{\text{ciclo}} dQ = -\mu_0 \int_{V_{np}} \left\{ \oint_0^{2\pi/\omega} \left[\left(\frac{M_0 \cos \varphi}{H_0} \right) H_0 \cos \omega t + \left(\frac{M_0 \sen \varphi}{H_0} \right) H_0 \sen \omega t \right] (-\omega H_0 \sen \omega t) dt \right\} dV$$

$$\oint_{\text{ciclo}} dQ = \mu_0 \int_{V_{np}} \left\{ \chi' \omega H_0^2 \oint_0^{2\pi/\omega} \frac{1}{2} \sen(2\omega t) dt + \chi'' \omega H_0^2 \oint_0^{2\pi/\omega} \sen^2(\omega t) dt \right\} dV$$

$$\oint_{\text{ciclo}} dQ = \mu_0 \int_{V_{np}} \left\{ \chi'' \omega H_0^2 \left(\frac{t}{2} \Big|_0^{2\pi/\omega} - \frac{1}{4\omega} \sen(2\omega t) \Big|_0^{2\pi/\omega} \right) \right\} dV$$

$$\oint_{\text{ciclo}} dQ = \int_{V_{np}} \mu_0 \pi H_0^2 \chi'' dV$$

Tal que a densidade volumétrica de calor dissipado pela nanopartícula magnética é igual a (eq. B.48):

$$\frac{1}{V_{np}} \oint_{\text{ciclo}} dQ = \mu_0 \pi H_0^2 \chi'' = \mu_0 \pi M_0 H_0 \sen \varphi \quad (\text{B.48})$$

E a potência térmica dissipada por unidade de volume num ciclo será igual a (eq. B.49):

$$\frac{P_{ot}}{V_{np}} = \left(\frac{1}{T} \cdot \frac{1}{V_{np}} \oint_{\text{ciclo}} dQ \right) = \left(\frac{f}{V_{np}} \oint_{\text{ciclo}} dQ \right) \equiv SLP$$

$$SLP = \mu_0 \pi f H_0^2 \chi'' = \mu_0 \pi f H_0 M_0 \sen \varphi \quad (\text{B.49})$$

Tal que:

$$[SLP] \equiv \frac{[P_{ot}]}{[V_{np}]} = \frac{W}{m^3} \quad (\text{no SI}) \quad [SLP] = \frac{erg}{s.cm^3} \quad (\text{no CGS})$$

Onde $f = \frac{1}{\tau}$ é a frequência linear de excitação do campo magnético alternado externo e SLP (*specific loss power*) quantidade física que representa a perda de potencia específica relacionada à eficiência magnetotérmica.

É muito importante notar na eq. B.49 que não havendo diferença de fase ($\varphi = 0$) entre a excitação $H(t)$ (*input* do sistema) e a resposta $M(t)$ (*output* do sistema), não haverá dissipação de calor.

A dinâmica da magnetização da amostra em relação ao campo externo, nessa situação de deslocamento de fase, pode ser descrita pela equação de movimento da magnetização (ou equação de Bloch) [223]:

$$\frac{\partial M}{\partial t} = \frac{1}{\tau} [M_0(t) - M(t)] \quad (\text{B.50})$$

onde (τ) é o tempo de relaxação da magnetização da nanopartícula magnética (descrito anteriormente no texto). Substituindo na equação de Bloch os termos de magnetização iguais à $M_0(t) = \chi_0 H_0 e^{i\omega t}$ e $M(t) = \chi H_0 e^{i\omega t}$, onde χ_0 é a susceptibilidade magnética no equilíbrio (*e.g.* quando da aplicação de um campo magnético estático), se tem que:

$$\frac{\partial}{\partial t} (\chi H_0 e^{i\omega t}) = \frac{1}{\tau} (\chi_0 H_0 e^{i\omega t} - \chi H_0 e^{i\omega t})$$

$$i\omega \chi H_0 e^{i\omega t} = \frac{1}{\tau} (\chi_0 - \chi) H_0 e^{i\omega t}$$

$$\chi(1 + i\omega\tau) = \chi_0 \Leftrightarrow \chi(\omega) = \frac{\chi_0}{(1 + i\omega\tau)}$$

Ou ainda,

$$\chi = \frac{\chi_0}{(1 + i\omega\tau)} \frac{(1 - i\omega\tau)}{(1 - i\omega\tau)} = \frac{\chi_0}{1 + (\omega\tau)^2} - i \frac{\chi_0\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2}$$

$$\chi = \frac{\chi_0}{1 + (2\pi f\tau)^2} - i \frac{\chi_0 2\pi f\tau}{1 + (2\pi f\tau)^2} = \chi' - i\chi'' \quad (\text{B.51})$$

A eq. B.51 é a susceptibilidade magnética definida no modelo de Debye [224].

Assim, reescreve-se o SLP (eq. B.49) em termos da susceptibilidade magnética de Debye (eq. B.40) da seguinte forma [42, Cap. 17]:

$$SLP \equiv \frac{P_{ot}}{V_p} = \mu_0 \pi \chi_0 f H_0^2 \frac{\chi_0 2\pi f\tau}{1 + (2\pi f\tau)^2} \quad (\text{B.52})$$

É comum na literatura encontrar o valor do SLP expresso em unidades de W/g . A eq. B.52 fornece a potência por unidade de volume de material magnético, o que no CGS corresponderia à quantidade (erg/s.cm³). Portanto, dividindo a eq. B.52 pela densidade do material magnético ρ_{np} (dado em g/cm³) e convertendo a unidade de energia (onde 1 erg = 10⁻⁷ J), escreve-se:

$$SLP \equiv \frac{P_{ot}}{V_{np}} = \frac{10^{-7}}{\rho_{np}} \mu_0 \pi \chi_0 f H_0^2 \frac{2\pi f\tau}{1 + (2\pi f\tau)^2} \quad (\text{B.53})$$

Onde:

$$[SLP] = \frac{W}{g}$$

A eq. B.53 é correta desde que todos os parâmetros na expressão sejam substituídos com unidades no CGS.

Agora, o tempo de relaxação (τ) na equação eq. B.53 acima está correlacionado com os mecanismos de relaxação de Néel-Brown (eq. B.8) e browniana (eq. B.10) para nanopartículas magnéticas, conforme proposto por Shliomis [94] através da eq. B.11 (apresentada anteriormente na seção B.1 deste apêndice):

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_B} + \frac{1}{\tau_N} \quad (\text{B.11})$$

Onde:

$$\tau_N = \frac{\tau_0 e^\sigma}{\sqrt{\sigma}} \quad (\text{B.8}) \quad \text{e} \quad \tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad (\text{B.10})$$

Contudo, lembrando ao leitor que o tempo de relaxação de Néel-Brown (τ_N) escrito na forma da eq. B.8 é uma aproximação válida, apenas, para $\sigma \geq 2$. Então, esse termo (τ_N) pode ser escrito na eq. B.11 conforme a eq. B.14 (apresentada anteriormente na seção B.1 deste apêndice) e que foi obtida por Coffey, W. T. e Kalmykov, Y. P. [144], [217] utilizando diretamente a equação de Landau-Lifshitz-Gilbert, que é válida para qualquer valor de σ e que fornece resultados mais precisos para nanopartículas magnéticas menores que 15 nm:

$$\tau_N = \tau_0 (e^\sigma - 1) \left(2^{-\sigma} + \frac{2\sigma^{3/2}}{\sqrt{\pi}(1 + \sigma)} \right)^{-1} \quad (\text{B.14})$$

Por fim, como foram determinadas explicitamente as componentes real (χ') e imaginária (χ'') da susceptibilidade dinâmica no modelo de Debye (eq. B.51), é possível reescrever a equação da magnetização (eq. B.43) em termos de parâmetros constitutivos da nanopartícula (χ_0 e τ), do campo externo aplicado (H_0 e f) e do tempo (t) de excitação da radiação eletromagnética externa.

Primeiramente, escrevemos:

$$|\chi| = \sqrt{(\chi')^2 + (\chi'')^2} = \frac{\chi_0}{\sqrt{1 + (2\pi f \tau)^2}} \quad (\text{eq. B.54}) \quad \text{onde: } M_0 = |\chi| H_0$$

A diferença de fase (φ) pode ser obtida calculando a tangente a partir das equações eq. B.47 (a) e (b):

$$\frac{\text{sen}(\varphi)}{\text{cos}(\varphi)} = \text{tg}(\varphi) = \frac{\chi''}{\chi'} = 2\pi f \tau \quad (\text{B.55})$$

Substituindo eq. B.54 e eq. B.55 na equação da magnetização (eq. B.43), escreve-se:

$$M(t) = M_0 \cos(\omega t - \varphi) = \frac{\chi_0}{\sqrt{1 + (2\pi f\tau)^2}} H_0 \cos[\omega t - \arctg(2\pi f\tau)] \quad (\text{B.56})$$

O gráfico da magnetização no regime linear descrita pela eq. B.56, em função do campo aplicado $H(t) = H_0 \cos(\omega t)$, é uma curva com *loop* de histerese em formato elipsoidal (desde que $\varphi \neq 0$), como foi observado experimentalmente por Tomitaka, A. *et al.* [225].

APÊNDICE C – Teoria de termografia por infravermelho.

C.1 Conceitos fundamentais no estudo da radiação térmica.

O conceito de radiação térmica está associado à taxa na qual a energia é emitida na forma de calor (radiação eletromagnética) pela matéria devida a sua temperatura não ser nula (na escala Kelvin). Por exemplo, um objeto sólido cuja temperatura de sua superfície (T_s) é mais elevada que a temperatura do ambiente em que se encontra (T_a), e supondo que seja feito vácuo entre ele e outros objetos na sua vizinhança, ainda assim ele emitirá calor até entrar em equilíbrio térmico com essa vizinhança. Havendo também outras fontes de calor, então, a energia radiante do ambiente incidente sobre a sua superfície será em parte refletida novamente para a vizinhança e, em parte, absorvida e transmitida através de sua interface para dentro do meio material (*e.g.* meios semitransparentes).

A radiação térmica emitida por uma superfície não é, apenas, função de sua temperatura T , inclui também uma faixa de comprimentos de onda (λ). Tal que sua magnitude varia com o comprimento de onda emitido (distribuição espectral) e, também, com a direção de emissão dessa radiação (θ) relativamente à direção normal a essa superfície emissora (distribuição direcional) (vide Figura C.1).

Para que seja possível determinar toda a potência radiante (\dot{Q}) (dada em W no SI) emitida e refletida por uma superfície real (a uma dada temperatura $T \neq 0$ K), o padrão utilizado como referência é a emissão (\dot{Q}_{cn}) de um corpo negro à mesma temperatura. O corpo negro é, por definição, um absorvedor e emissor perfeito, ou seja:

- A superfície de um corpo negro absorve toda a radiação incidente, independente do seu comprimento de onda ou de sua direção de incidência.
- Para uma dada temperatura (T) e comprimento de onda (λ), nenhuma superfície pode emitir mais energia do que um corpo negro.
- Embora a radiação emitida por um corpo negro seja uma função do comprimento de onda (distribuição espectral), ela é sempre independente da direção de emissão (emissor difuso).

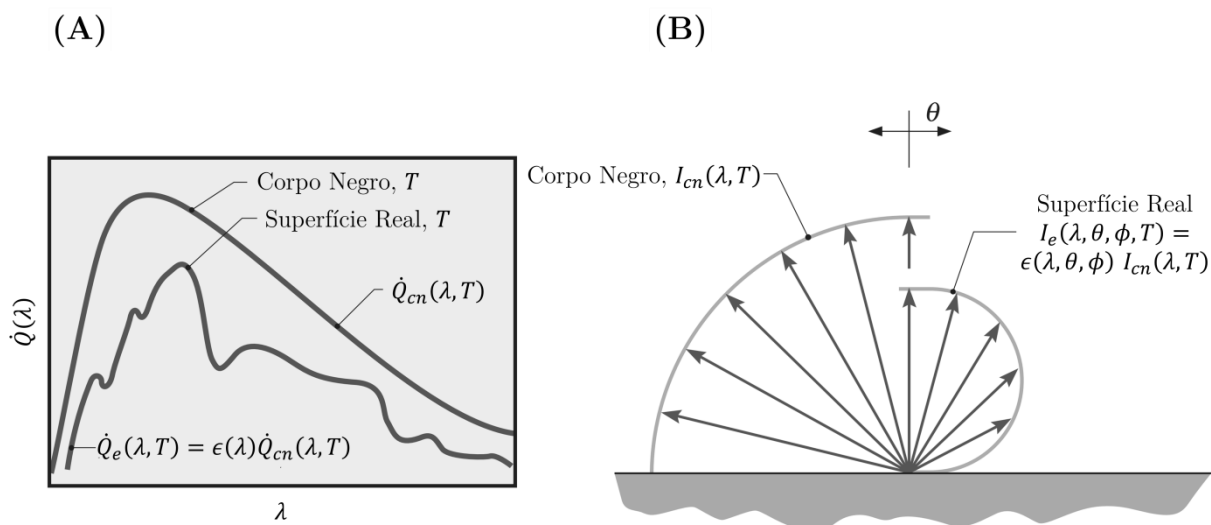


Figura C.1 Comparação de emissões de um corpo negro e de uma superfície real. (A) Distribuição espectral. (B) Distribuição direcional. Adaptado de: BERGMAN, T. L. e INCROPERA, F. P. 2011, p. 792 [161].

A *intensidade espectral e direcional de radiação emitida* $I_e(\lambda, \theta, \phi, T)$ por uma superfície é definida como: a taxa de energia térmica emitida no comprimento de onda λ , por unidade de tempo e por unidade de comprimento de onda ($d\dot{Q}/d\lambda$), por unidade de área da superfície emissora (projetada perpendicularmente à direção de propagação da radiação, ou seja, $dA \cdot \cos\theta$), e por unidade de ângulo sólido ($d\Omega$). Matematicamente expressa por (vide Figura C.1, acima no texto):

$$I_e(\lambda, \theta, \phi, T) = \left(\frac{d\dot{Q}_e(\lambda, \theta, \phi, T)}{d\lambda \cdot dA \cos\theta \cdot d\Omega} \right) \quad (\text{C.1})$$

Onde:

$$d\Omega = \sin\theta d\theta d\phi \ ; \ [I_e(\lambda, \theta, \phi, T)] = \text{W}/\text{m}^2 \cdot \mu\text{m} \cdot \text{sr}$$

Portanto, se a intensidade espectral e direcional $I_e(\lambda, \theta, \phi, T)$ for conhecida, então, é possível calcular a *poder emissivo hemisférico espectral* $\dot{Q}_{\lambda,e}(\lambda, T)$ integrando a eq. C.1 ao longo de todas as direções de emissão possíveis ($0 \leq \theta \leq \pi/2$ e $0 \leq \phi \leq 2\pi$) dentro de um hemisfério centrado num elemento infinitesimal de área dA da superfície emissora (vide Figura C.2). Ou seja:

$$\dot{Q}_{\lambda,e}(\lambda, T) = \int d\dot{Q}_\lambda = \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi/2} I_e(\lambda, \theta, \phi, T) \cdot \cos\theta \, d\Omega \quad (\text{C.2})$$

Onde:

$$d\dot{Q}_\lambda \equiv \frac{d\dot{Q}_e(\lambda, \theta, \phi, T)}{d\lambda \, dA},$$

é a taxa com que a potência radiante emitida no comprimento de onda λ atravessa a superfície $dA_\perp = dA \cos\theta$, e sua dimensão é usualmente expressa em: $[\dot{Q}_{\lambda,e}(\lambda)] = \text{W/m}^2 \cdot \mu\text{m}$.

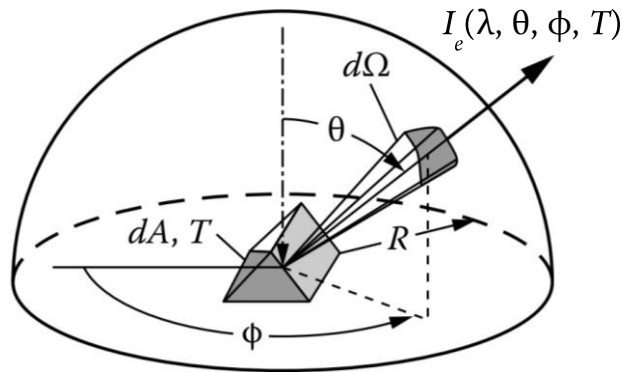


Figura C.2 Intensidade espectral e direcional de radiação térmica emitida $I_e(\lambda, \theta, \phi, T)$ a partir de um elemento infinitesimal de área dA de uma superfície macroscópica à temperatura $T \neq 0$ K, dentro de um hemisfério hipotético concêntrico com dA . Adaptado de: ROBERT, S. e HOWELL, J. R. 1992, p. 49 [192].

A radiância espectral de corpo negro proposta por Planck (1959) é calculada como a seguinte intensidade:

$$I_{cn}(\lambda, T) = \frac{2hc_0^2}{\lambda^5 \left[e^{\left(\frac{hc_0}{\lambda kT}\right)} - 1 \right]} \quad (\text{C.3})$$

Tal que a aplicação da eq. C.2 a um corpo negro resultará em:

$$\dot{Q}_{cn}(\lambda, T) = \pi \cdot I_{cn}(\lambda, T) = \frac{C_1}{\lambda^5 \left[e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T}\right)} - 1 \right]} \quad (\text{C.4})$$

Onde: $C_1 = 2\pi hc_0^2 = 3,742 \times 10^8 \text{ W} \cdot \mu\text{m}^4/\text{m}^2$, $C_2 = \frac{hc_0}{\kappa} = 1,439 \times 10^4 \mu\text{m} \cdot \text{K}$, $h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ (constante de Planck), $c_0 = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$ (velocidade da luz no vácuo) e $k = 1,381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$ (constante de Boltzmann) [161, Cap. 12].

A eq. C.4 quando integrada sobre todos os comprimentos de onda possíveis de serem emitidos pela superfície de um corpo negro à uma dada temperatura T , leva à conhecida Lei de Stefan-Boltzmann que determina o poder emissivo total de um corpo negro [161, Cap. 12]:

$$\dot{Q}_{cn}(T) = \int_0^{\infty} \frac{C_1}{\lambda^5 \left[e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T}\right)} - 1 \right]} d\lambda = \sigma T^4 \quad (\text{C.5})$$

onde a constante Stefan-Boltzmann (σ) depende dos valores de C_1 e C_2 e possui valor numérico igual a $\sigma = 5,670 \times 10^{-8} \text{ W/m}^2 \text{ K}^4$.

É importante ressaltar que a emissão radiativa de uma superfície real não é difusa e possui distribuição espectral diferente de um corpo negro (vide Figura C.1 acima no texto). Portanto, define-se o parâmetro *emissividade direcional espectral* $\epsilon(\lambda, \theta, \phi)$ de uma superfície real a uma dada temperatura $T \neq 0 \text{ K}$, como: a razão entre a intensidade de radiação $I_e(\lambda, \theta, \phi, T)$ emitida no comprimento de onda (λ) e na direção θ e ϕ , e a intensidade de radiação emitida por um corpo negro nos mesmos valores de T e λ .

$$\epsilon(\lambda, \theta, \phi) = \frac{I_e(\lambda, \theta, \phi, T)}{I_{cn}(\lambda, T)} \quad (\text{C.6})$$

Também é possível calcular a *emissividade hemisférica espectral* $\epsilon(\lambda)$ de uma superfície real:

$$\epsilon(\lambda, \theta, \phi) = \frac{\int_0^{2\pi} \int_0^{\pi/2} I_e(\lambda, \theta, \phi, T) \cdot \cos\theta \, d\Omega}{\dot{Q}_{cn}(\lambda, T)} \quad (\text{C.7})$$

Agora, no que diz respeito à interação da radiação eletromagnética com a interface de separação entre dois meios materiais, de maneira geral define-se a refletividade (ρ) como a

fração da potência radiante incidente que é refletida por uma superfície. Essa é uma propriedade inerentemente bidirecional (vide Figura C.3), ou seja, além de depender da direção da radiação incidente (contida no ângulo sólido de incidência $d\Omega_i$ definido pelos ângulos θ_i e ϕ_i), a rigor, ela também depende da direção da radiação refletida (contida no ângulo sólido de reflexão $d\Omega_r$ definido pelos ângulos θ_r , ϕ_r).

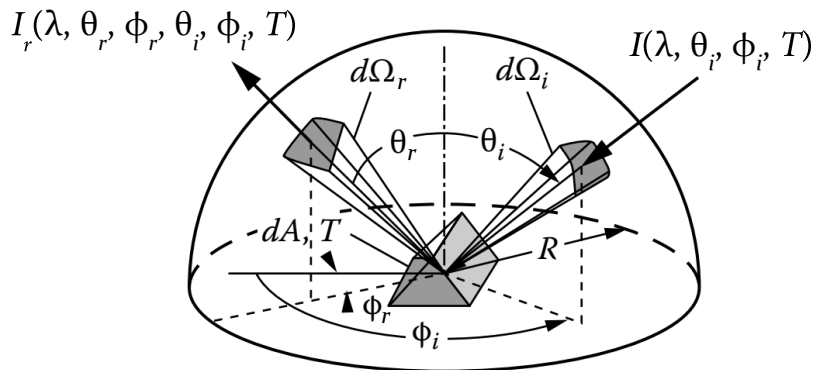


Figura C.3 Intensidade espectral bidirecional de radiação térmica refletida $I_r(\lambda, \theta_r, \phi_r, \theta_i, \phi_i, T)$ produzida pela energia incidente a partir de apenas uma direção particular (θ_i, ϕ_i) dentro de um hemisfério hipotético concêntrico com dA . Adaptado de: ROBERT, S. e HOWELL, J. R. 1992, p. 49 [192].

Logo, a *intensidade direcional espectral refletida* $I_r(\lambda, \theta_r, \phi_r, T)$ corresponde à soma de toda a potência radiante refletida produzida pelas *intensidades direcionais espectrais incidentes* $I_i(\lambda, \theta_i, \phi_i, T)$ provenientes de todas as direções de incidência ($0 \leq \theta_i \leq \pi/2$ e $0 \leq \phi_i \leq 2\pi$) dentro do hemisfério que rodeia um elemento infinitesimal de área dA da superfície irradiada. E a contribuição para $I_r(\lambda, \theta_r, \phi_r, T)$ produzida pela energia incidente a partir de apenas uma direção particular (θ_i, ϕ_i) é a *intensidade bidirecional espectral refletida* $I_r(\lambda, \theta_r, \phi_r, \theta_i, \phi_i, T)$ (vide Figura C.3, acima no texto).

Assim, define-se o parâmetro óptico *refletividade bidirecional espectral* $\rho(\lambda, \theta_r, \phi_r, \theta_i, \phi_i)$ de uma superfície real como a seguinte razão [161, p. 477], [192, p. 73]:

$$\rho(\lambda, \theta_r, \phi_r, \theta_i, \phi_i) = \frac{I_r(\lambda, \theta_r, \phi_r, \theta_i, \phi_i, T)}{I_i(\lambda, \theta_i, \phi_i, T) \cdot \cos\theta_i d\Omega_i} \quad (\text{C.8})$$

Onde:

$$d\Omega_i = \text{sen}\theta_i d\theta_i d\phi_i$$

Agora, multiplicando $I_r(\lambda, \theta_r, \phi_r, \theta_i, \phi_i, T)$ por $d\lambda \cdot dA \cos\theta_r \cdot d\Omega_r$ e integrando sobre todo o hemisfério com centro no elemento de área dA da superfície refletora (ou seja $0 \leq \theta_r \leq \pi/2$ e $0 \leq \phi_r \leq 2\pi$), então, é possível calcular a potência radiante refletida em todas as direções θ_r e ϕ_r possíveis devida a radiação incidente proveniente de uma única direção (θ_i, ϕ_i) , ou seja, $d\dot{Q}_r(\lambda, \theta_i, \phi_i, T)$ (dada em W no SI):

$$d\dot{Q}_r(\lambda, \theta_i, \phi_i, T) = d\lambda dA \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi/2} I_r(\lambda, \theta_r, \phi_r, \theta_i, \phi_i, T) \cdot \cos\theta_r d\Omega_r$$

E substituindo $I_r(\lambda, \theta_r, \phi_r, \theta_i, \phi_i, T)$ a partir da eq. C.8, escreve-se:

$$d\dot{Q}_r = I_i(\lambda, \theta_i, \phi_i, T) d\lambda dA \cos\theta_i d\Omega_i \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi/2} \rho(\lambda, \theta_r, \phi_r, \theta_i, \phi_i, T) \cos\theta_r d\Omega_r \quad (\text{C.9})$$

Já a potência radiante incidente proveniente de uma direção particular (θ_i, ϕ_i) , ou seja, $d\dot{Q}_i(\lambda, \theta_i, \phi_i, T)$ pode ser calculada como:

$$d\dot{Q}_i(\lambda, \theta_i, \phi_i, T) = I_i(\lambda, \theta_i, \phi_i, T) d\lambda dA \cos\theta_i d\Omega_i \quad (\text{C.10})$$

Agora, dividindo a eq. C.9 pela C.10 é possível obter a fração da potência radiante incidente proveniente de uma direção particular (θ_i, ϕ_i) que é refletida em todas as direções, ou seja, a *refletividade direcional hemisférica espectral* $\rho(\lambda, \theta_i, \phi_i)$ (vide Figura C.4):

$$\rho(\lambda, \theta_i, \phi_i) = \frac{d\dot{q}_r(\lambda, \theta_i, \phi_i)}{d\dot{q}_i(\lambda, \theta_i, \phi_i)}$$

$$\rho(\lambda, \theta_i, \phi_i) = \frac{I_i(\lambda, \theta_i, \phi_i) d\lambda dA \cos\theta_i d\Omega_i \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi/2} \rho(\lambda, \theta_r, \phi_r, \theta_i, \phi_i) \cos\theta_r d\Omega_r}{I_i(\lambda, \theta_i, \phi_i) d\lambda dA \cos\theta_i d\Omega_i}$$

$$\rho(\lambda, \theta_i, \phi_i) = \int_0^{2\pi} \int_0^{\pi/2} \rho(\lambda, \theta_r, \phi_r, \theta_i, \phi_i) \cos \theta_r d\Omega_r \quad (\text{C.11})$$

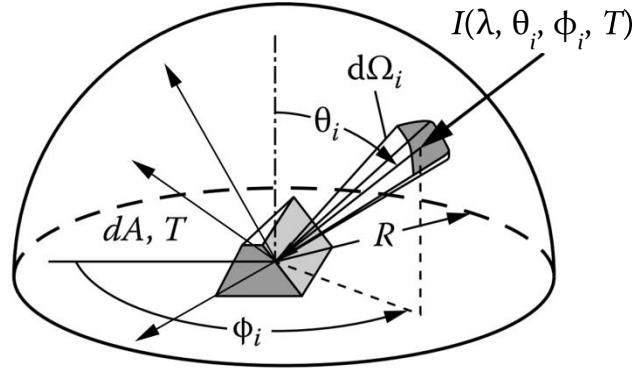


Figura C.4 Radiação térmica refletida em todas as direções dentro de um hemisfério hipotético concêntrico com dA produzida pela energia incidente $I_i(\lambda, \theta_i, \phi_i, T)$ proveniente de apenas uma direção particular (θ_i, ϕ_i) . Adaptado de: ROBERT, S. e HOWELL, J. R. 1992, p. 49 [192].

Um importante caso limite da refletividade bidirecional espectral trata-se de superfícies refletoras bem polidas, onde a reflexão especular de um feixe incidente proveniente de uma (θ_i, ϕ_i) ocorre segundo os mesmos ângulos relativamente à direção normal à superfície refletora, ou seja:

$$\theta_r = \theta_i \quad \text{e} \quad \phi_r = \phi_i + \pi \quad (\text{C.12})$$

E em todas as outras direções a refletividade bidirecional espectral de uma superfície especular é nula e, conseqüentemente, função apenas da direção de incidência, tal que:

$$\rho(\lambda, \theta_r = \theta_i, \phi_r = \phi_i + \pi, \theta_i, \phi_i) = \rho(\lambda, \theta_i, \phi_i) \quad (\text{C.13})$$

Logo, define-se a *refletividade direcional espectral especular* $\rho_s(\lambda, \theta_i, \phi_i)$ como a fração da intensidade espectral incidente na direção (θ_i, ϕ_i) que é refletida especularmente pela superfície, ou seja:

$$\rho_s(\lambda, \theta_i, \phi_i) \equiv \frac{I_r(\lambda, \theta_r, \phi_r, T)}{I_i(\lambda, \theta_i, \phi_i, T)} \quad (\text{C.14})$$

E, também, a *refletividade hemisférica espectral especular* $\rho_s(\lambda)$ como:

$$\rho_s(\lambda) \equiv \frac{\int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} \rho_s(\lambda, \theta, \phi) I_i(\lambda, \theta_i, \phi_i, T) \cos\theta_i d\Omega_i}{\int_0^{2\pi} \int_0^{\pi} I_i(\lambda, \theta_i, \phi_i, T) \cos\theta_i d\Omega_i} \quad (\text{C.15})$$

A absortividade (α) e a transmissividade (τ) são outros dois parâmetros ópticos que determinam, respectivamente, a fração da potência radiante incidente que é absorvida e transmitida através da superfície de um meio semitransparente (vide Figura C.5 (A)). E assim como no caso da refletividade, as superfícies podem apresentar tanto uma absortividade quanto uma transmissividade seletiva em relação ao comprimento de onda (λ) e a direção (θ_i, ϕ_i) da radiação incidente. Portanto, definem-se a *absortividade direcional espectral* $\alpha(\lambda, \theta_i, \phi_i)$ e a *transmissividade direcional espectral* $\tau(\lambda, \theta_i, \phi_i)$.

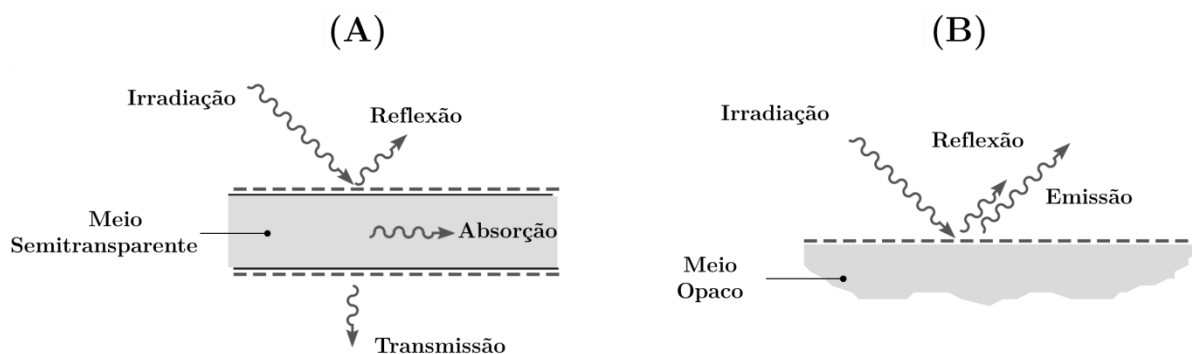


Figura C.5 Reflexão, absorção e transmissão de uma onda eletromagnética incidente sobre a interface de um meio semitransparente (A) e de um meio opaco (B). Adaptado de: BERGMAN, T. L. e INCROPERA, F. P. 2011, p. 771 [161].

Logo, aplicando o princípio de conservação da energia conclui-se que:

$$\rho(\lambda, \theta_i, \phi_i) + \alpha(\lambda, \theta_i, \phi_i) + \tau(\lambda, \theta_i, \phi_i) = 1 \quad (\text{C.16})$$

E para meios opacos em que a transmissividade é nula, ou seja, $\tau(\lambda, \theta_i, \phi_i) = 0$ (vide Figura C.5 (B)):

$$\rho(\lambda, \theta_i, \phi_i) + \alpha(\lambda, \theta_i, \phi_i) = 1 \quad (\text{C.17})$$

De acordo com a lei de Kirchhoff para a radiação térmica [161], [192], aplicável a qualquer tipo de material a uma dada temperatura T emitindo num comprimento de onda λ , a absorvidade direcional espectral deve ser igual à sua emissividade direcional espectral. Logo:

$$\alpha(\lambda, \theta_i, \phi_i) = \epsilon(\lambda, \theta_i, \phi_i) \quad (\text{C.18})$$

Tal que:

$$\rho(\lambda, \theta_i, \phi_i) + \epsilon(\lambda, \theta_i, \phi_i) = 1 \quad (\text{C.19})$$

C.2 Propagação de uma onda eletromagnética em um meio dielétrico imperfeito.

Dentro de um meio dielétrico, na ausência de portadores de carga elétrica livres ($\rho = 0$) e cuja densidade de corrente de transporte de cargas livres também é nula ($J_F = 0$) as equações de Maxwell são escritas como [219, p. 382]:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = 0 \quad (\text{C.20}) \quad \vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (\text{C.22})$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (\text{C.21}) \quad \vec{\nabla} \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (\text{C.23})$$

Onde, $\vec{D} = (\epsilon_0 \vec{E} + \vec{P})$ (no SI $\epsilon_0 = 8,854 \times 10^{-12} \text{ C}^2/\text{N.m}^2$) e $\vec{B} = \mu_0 \vec{H}$ (no SI $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} \text{ V.seg/A.m}$).

Supondo ainda que a resposta da polarização do meio seja linear com a intensidade um campo elétrico externo aplicado ao material (dielétrico linear), então, escreve-se a relação constitutiva:

$$\vec{P} = \varepsilon_0 \chi_e \vec{E} \quad (\text{C.24})$$

onde χ_e é a susceptibilidade elétrica do material isolante (parâmetro adimensional).

Da equação C.24 decorre que,

$$\vec{D} = \varepsilon \vec{E} = \varepsilon_0 (1 + \chi_e) \vec{E}$$

$$K = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_0} = (1 + \chi_e) \quad (\text{C.25})$$

onde K é a constante dielétrica do meio (parâmetro adimensional) [221, p. 154].

Uma onda eletromagnética plana (e linearmente polarizada ao longo de uma direção arbitrária \hat{n}) propagando-se nesse meio material pode ser matematicamente modelada como [219, p. 397]:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = E_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} \hat{n} \quad \text{C.26 (a)}$$

$$\vec{H}(\vec{r}, t) = \frac{\vec{k} \times \vec{E}}{\mu \omega} = \frac{\mathbb{K}}{\mu \omega} E_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} (\hat{k} \times \hat{n}) \quad \text{C.26 (b)}$$

onde a amplitude do vetor campo elétrico (E_0) é uma quantidade complexa e, também, possui a informação da fase da onda (φ), ou seja:

$$\vec{E}_0 = E_0 \hat{n} = (E_{0x} e^{i\varphi}) \hat{n}_x + (E_{0y} e^{i\varphi}) \hat{n}_y + (E_{0z} e^{i\varphi}) \hat{n}_z \quad (\text{C.27})$$

Define-se, também, o vetor de onda \vec{k} que dá a direção de propagação da radiação eletromagnética no espaço, tal que:

$$\vec{\mathbb{K}} \cdot \hat{n} = 0 \quad \Leftrightarrow \quad \vec{\mathbb{K}} = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right) \hat{\mathbb{K}} = \left(\frac{\omega}{c}\right) \hat{\mathbb{K}} \quad (\text{C.28})$$

Ou ainda:

$$\mathbb{K} = \frac{n\omega}{c_0} \quad (\text{C.29})$$

Na eq. C.29 n é o índice de refração do material, definido pela razão da velocidade de propagação da luz no vácuo ($c_0 = 3,00 \times 10^8$ m/s² no SI) pela sua velocidade de propagação no meio:

$$n = \frac{c_0}{c} = \sqrt{\frac{\mu_0 \epsilon_0}{\mu \epsilon}} \quad (\text{C.30})$$

A partir da lei de Faraday (eq. C.22) é possível escrever a seguinte equação de onda:

$$\nabla^2 \vec{E} - \mu_0 \epsilon_0 \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = \mu_0 \frac{\partial^2 \vec{P}}{\partial t^2} \quad (\text{C.31})$$

Que admite como soluções,

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 e^{i(\vec{\mathbb{K}} \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad \text{C.32 (a)} \quad \vec{P}(\vec{r}, t) = \vec{P}_0 e^{i(\vec{\mathbb{K}} \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad \text{C.32 (b)}$$

Cujo significado físico é que o campo elétrico da radiação eletromagnética de frequência (ω) excita o meio dielétrico polarizando-o na mesma frequência. Contudo, a resposta da polarização pode ocorrer fora de fase com a ação externa. Essa diferença de fase é mais pronunciada em dielétricos não ideais (isolantes reais), ou seja, em materiais que atenuam a energia transportada pela onda eletromagnética [221].

Agora, utilizando a linearidade da polarização com o campo elétrico externo (eq. C.24) – considerando a possibilidade que $E_0(\omega)$ e $P_0(\omega)$ possam oscilar fora de fase o que leva a susceptibilidade elétrica $\chi_e(\omega)$ ser um número complexo – e de volta com as soluções C.32 (a) e (b) na equação de onda, se tem que:

$$-\mathbb{K}^2 E_0 e^{i(\vec{\mathbb{K}} \cdot \vec{r} - \omega t)} + \mu_0 \varepsilon_0 \omega^2 E_0 e^{i(\vec{\mathbb{K}} \cdot \vec{r} - \omega t)} = -\mu_0 \omega^2 (\varepsilon_0 \chi_e E_0) e^{i(\vec{\mathbb{K}} \cdot \vec{r} - \omega t)}$$

$$\mathbb{K} = \frac{\omega}{c_0} \sqrt{1 + \chi_e} \quad (\text{C.33})$$

Comparando esse resultado com a eq. C.29 é possível reescrever o índice de refração como uma quantidade complexa, tal que:

$$\mathbb{K} = \frac{\omega}{c_0} \sqrt{1 + \chi_e} = \frac{\bar{n}\omega}{c_0} \quad \Leftrightarrow \quad \bar{n} \equiv n + i\kappa = \sqrt{1 + \chi_e} \quad (\text{C.34})$$

Quando a radiação eletromagnética propaga-se através de um meio dielétrico não ideal (ou mesmo um condutor de condutividade elétrica σ finita) parte da energia transportada pela frente de onda é absorvida pelo material, esse fenômeno está diretamente associado à parte imaginária do índice de refração ($\kappa \neq 0$), chamado na literatura de coeficiente de extinção [192, p. 100].

Portanto, substituindo a eq. C.34 na eq. C.32 (a) reescreve-se o vetor campo elétrico como,

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = E_0 e^{-\left(\frac{\kappa\omega}{c_0}\right)\hat{\mathbb{K}} \cdot \vec{r}} e^{i\omega\left[\left(\frac{n}{c_0}\right)\hat{\mathbb{K}} \cdot \vec{r} - t\right]} \hat{n} \quad (\text{C.35})$$

A energia transportada por uma frente de onda eletromagnética, por unidade de tempo e por unidade de área, é dada pelo módulo do vetor de Poynting (\vec{S}):

$$\vec{S} = \vec{E} \times \vec{H} \quad (\text{C.36})$$

Onde $[S] = J/m^2 \cdot s$ (no SI)

Logo, o vetor \vec{S} pode ser explicitamente calculado como segue abaixo:

$$\vec{S} = \frac{1}{2}(\vec{E} + \vec{E}^*) \times \frac{1}{2}(\vec{H} + \vec{H}^*)$$

$$\vec{S} = \frac{1}{4\mu\omega} \left[e^{2i(\vec{k}\cdot\vec{r} - \omega t)} (\vec{E}_0 \times \vec{k} \times \vec{E}_0) + e^{i(\vec{k} - \vec{k}^*)\cdot\vec{r}} (\vec{E}_0 \times \vec{k}^* \times \vec{E}_0^*) \right. \\ \left. + e^{i(\vec{k} - \vec{k}^*)\cdot\vec{r}} (\vec{E}_0^* \times \vec{k} \times \vec{E}_0) + e^{-2i(\vec{k}^*\cdot\vec{r} - \omega t)} (\vec{E}_0^* \times \vec{k}^* \times \vec{E}_0^*) \right]$$

$$\vec{S} = \frac{1}{4\mu\omega} [\vec{k}(\vec{E}_0 \cdot \vec{E}_0^*) + \vec{k}^*(\vec{E}_0^* \cdot \vec{E}_0)] e^{i(\vec{k} - \vec{k}^*)\cdot\vec{r}}$$

$$\vec{S} = \frac{(\vec{k} + \vec{k}^*)}{4\mu\omega} |E_0|^2 e^{i(\vec{k} - \vec{k}^*)\cdot\vec{r}}$$

Que utilizando a eq. C.34, ficará:

$$\vec{S} = \frac{1}{4\mu\omega} [(n + i\kappa) + (n - i\kappa)] \frac{\omega}{c_0} \hat{k} \cdot |E_0|^2 e^{i[(n+i\kappa)-(n-i\kappa)]\frac{\omega}{c_0}\hat{k}\cdot\vec{r}}$$

$$\vec{S} = \frac{1}{2} \left[\frac{n}{\mu c_0} |E_0|^2 e^{-\left(\frac{2\kappa\omega}{c_0}\right)\hat{k}\cdot\vec{r}} \right] \hat{k} \quad (C.37)$$

Na eq. C.37 é possível identificar o termo de atenuação da energia (absorvida pelo meio material), ou seja, a exponencial negativa:

$$e^{-\left(\frac{2\kappa\omega}{c_0}\right)\hat{k}\cdot\vec{r}} = e^{-\left(\frac{2\kappa}{c_0} \frac{2\pi c_0}{\lambda}\right)\hat{k}\cdot\vec{r}} = e^{-\left(\frac{4\pi\kappa}{\lambda}\right)\hat{k}\cdot\vec{r}} = e^{-\alpha \hat{k}\cdot\vec{r}}$$

onde também é definido o coeficiente de absorção da radiação eletromagnética (α),

$$\alpha = \frac{4\pi\kappa}{\lambda} \quad (C.38)$$

tal que, no SI $[\alpha] = \text{m}^{-1}$.

O vetor de Poynting escrito na forma da eq. C.37 é uma quantidade real, cujo módulo pode ser escrito de maneira a revelar explicitamente a dependência espectral da energia transportada pela radiação [192, p. 112]:

$$|\vec{S}(\lambda)| = \langle \vec{S}(\lambda) \rangle_t = \frac{1}{2} \left[\frac{n}{\mu c_0} |E_0|^2 e^{-\left(\frac{4\pi\kappa}{\lambda}\right) \hat{\mathbb{K}} \cdot \vec{r}} \right] \quad (\text{C.39})$$

onde subíndice t denota uma média temporal.

C.3 Cálculo da refletividade e da emissividade térmica de uma superfície absorvedora de energia ($\kappa \neq 0$) utilizando as equações de Maxwell.

A partir dos resultados obtidos na seção anterior (seção C.2) considere, agora, o caso de uma onda eletromagnética interagindo com a interface de separação entre dois meios dielétricos semi-infinitos (*e.g.* ar – pele humana). Supondo sua direção de propagação ao longo do eixo x (ou seja $\hat{\mathbb{K}} = \hat{i}$), com o vetor campo elétrico linearmente polarizado no plano xy (ou seja $\vec{E}_y = E_y \hat{j}$) e, conseqüentemente, o vetor campo magnético polarizado no plano xz (ou seja $\vec{H}_z = H_z \hat{k}$) (vide Figura C.6 abaixo no texto). Nesse contexto os vetores \vec{E}_y e \vec{H}_z (de acordo com a eq. C.35) podem ser escritos como segue abaixo:

$$\vec{E}_y = E_{0y} e^{-\left(\frac{\kappa\omega}{c_0}\right)x} e^{i\omega\left(\frac{n}{c_0}x - t\right)} \hat{j} \quad \text{C.40 (a)}$$

$$\vec{H}_z = \left(\frac{\bar{n}}{\mu c_0} E_y \right) \hat{k} = \frac{(n + i\kappa)}{\mu c_0} E_{0y} e^{-\left(\frac{\kappa\omega}{c_0}\right)x} e^{i\omega\left(\frac{n}{c_0}x - t\right)} \hat{k} \quad \text{C.40 (b)}$$

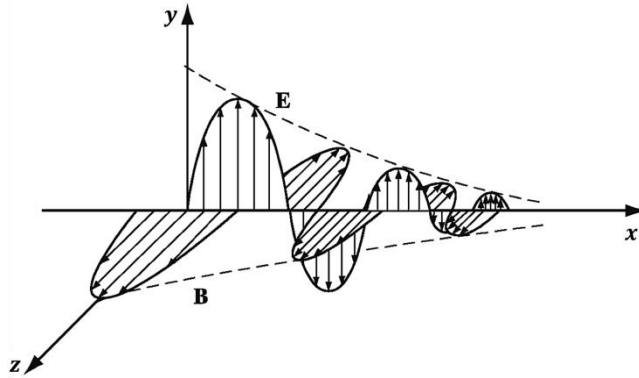


Figura C.6 Onda eletromagnética polarizada na direção y propagando-se num meio dielétrico imperfeito com coeficiente de extinção ($\kappa \neq 0$) da energia transportada pela frente de onda. Adaptado de: GRIFFITHS, D. J. 2013, p. 415 [219].

Primeiramente, essa interação dependerá da orientação relativa da direção (θ_i) de propagação da radiação eletromagnética incidente (proveniente do meio 1) com respeito a direção normal à superfície de separação entre os dois meios (o que define o plano de incidência). Por exemplo, as Figuras C.7 (A) e (B) são dois diagramas representando uma interface absorvedora ($\kappa \neq 0$) na qual ocorrem a reflexão (direção θ_r) e a refração (direção χ) de uma onda eletromagnética plana polarizada paralelamente ao plano de incidência (campo elétrico no plano $x'y'$ e cuja amplitude oscila na direção y' , tal que $\vec{E}_{\parallel,i} = (E_{0\parallel,i}) \hat{j}'$).

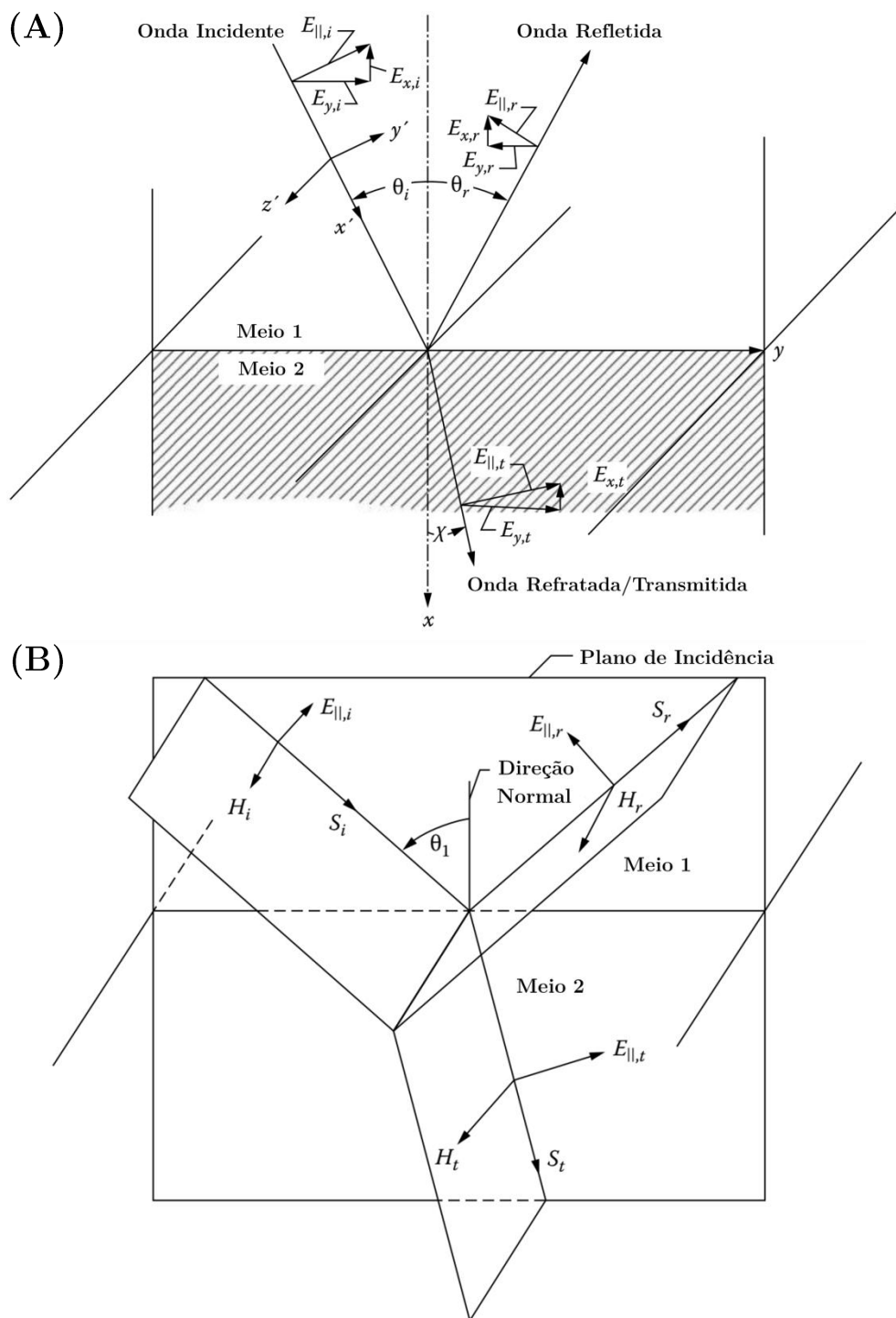


Figura C.7 Interação de uma onda eletromagnética com a interface de separação entre dois meios. (A) O campo elétrico da onda plana está polarizado paralelamente ao plano de incidência xy . (B). Mostra as direções dos campos elétrico e magnético e do vetor de Poynting. Adaptado de: ROBERT, S. e HOWELL, J. R. 1992, p. 104 [192].

Agora, tomando apenas a parte real da radiação incidente na superfície de separação entre os meios 1 (índice de refração \bar{n}_1) e 2 (índice de refração \bar{n}_2), ou seja:

$$\operatorname{Re}\{E_{\parallel,i}\} = E_{0\parallel,i} \cos\left(\frac{\bar{n}_1 \omega}{c_0} x' - \omega t\right) \quad (\text{C.41})$$

Com o auxílio da Figura C.7 (A) é possível escrever a parte real das componentes do campo elétrico incidente nas direções x , y e z :

$$E_{x,i} = -E_{\parallel,i} \operatorname{sen}\theta_i \quad \text{C.42 (a)}$$

$$E_{y,i} = E_{\parallel,i} \cos\theta_i \quad \text{C.42 (b)}$$

$$E_{z,i} = 0 \quad \text{C.42 (c)}$$

A distância (x') percorrida no tempo por uma frente de onda está geometricamente relacionada com a distância (y) da mesma frente de onda até a interface de separação através da equação:

$$x' = y \operatorname{sen}\theta_i \quad (\text{C.43})$$

Logo,

$$E_{x,i} = -E_{0\parallel,i} \operatorname{sen}\theta_i \cos\left(\frac{\bar{n}_1 \omega}{c_0} y \operatorname{sen}\theta_i - \omega t\right) \quad \text{C.44 (a)}$$

$$E_{y,i} = E_{0\parallel,i} \cos\theta_i \cos\left(\frac{\bar{n}_1 \omega}{c_0} y \operatorname{sen}\theta_i - \omega t\right) \quad \text{C.44 (b)}$$

Equações equivalentes podem ser escritas para a parte real das componentes x , y e z do campo elétrico refletido ($E_{\parallel,r}$) e transmitido (ou refratado) ($E_{\parallel,t}$), tal que:

$$E_{x,r} = -E_{0\parallel,r} \operatorname{sen}\theta_r \cos\left(\frac{\bar{n}_1 \omega}{c_0} y \operatorname{sen}\theta_r - \omega t\right) \quad \text{C.45 (a)}$$

$$E_{y,r} = -E_{0\parallel,r} \cos\theta_r \cos\left(\frac{\bar{n}_1\omega}{c_0}y \operatorname{sen}\theta_r - \omega t\right) \quad \text{C.45 (b)}$$

$$E_{z,r} = 0 \quad \text{C.45 (c)}$$

$$E_{x,t} = -E_{0\parallel,t} \operatorname{sen}\chi \cos\left(\frac{\bar{n}_2\omega}{c_0}y \operatorname{sen}\chi - \omega t\right) \quad \text{C.46 (a)}$$

$$E_{y,t} = E_{0\parallel,t} \cos\chi \cos\left(\frac{\bar{n}_2\omega}{c_0}y \operatorname{sen}\chi - \omega t\right) \quad \text{C.46 (b)}$$

$$E_{z,t} = 0 \quad \text{C.46 (c)}$$

As condições de contorno que devem ser satisfeitas na interface de dois meios dielétricos lineares, na ausência de portadores de carga elétrica livres ($\rho = 0$) e cuja densidade de corrente de transporte de cargas livres também é nula ($J_F = 0$), para as componentes paralelas (E_{\parallel} e H_{\parallel}) e perpendiculares (E_{\perp} e H_{\perp}) dos campos elétrico e magnético são [219, p. 344]:

$$\varepsilon_1 E_{\perp_1} = \varepsilon_2 E_{\perp_2} \quad \text{C.47 (a)} \quad E_{\parallel_1} = E_{\parallel_2} \quad \text{C.47 (b)}$$

$$B_{\perp_1} = B_{\perp_2} \quad \text{C.47 (c)} \quad H_{\parallel_1} = H_{\parallel_2} \quad \text{C.47 (d)}$$

Da eq. C.47 (b) decorre que:

$$(E_{y,i} + E_{y,r})_{x=0} = (E_{y,t})_{x=0} \quad \text{(C.48)}$$

Tal que,

$$\left[E_{0\parallel,i} \cos\theta_i \cos\left(\frac{\bar{n}_1\omega}{c_0}y \operatorname{sen}\theta_i - \omega t\right) - E_{0\parallel,r} \cos\theta_r \cos\left(\frac{\bar{n}_1\omega}{c_0}y \operatorname{sen}\theta_r - \omega t\right) \right]_{x=0}$$

$$= \left[E_{0\parallel,R} \cos\chi \cos\left(\frac{\bar{n}_2\omega}{c_0}y \operatorname{sen}\chi - \omega t\right) \right]_{x=0}$$

Sendo a frequência de propagação do sinal igual nos dois meios ($\omega_1 = \omega_2 = \omega$), então, a eq. C.48 é válida somente se:

$$\bar{n}_1 \operatorname{sen}\theta_i = \bar{n}_1 \operatorname{sen}\theta_r = \bar{n}_2 \operatorname{sen}\chi \quad (\text{C.49})$$

Decorrendo que:

$$\theta_i = \theta_r \quad (\text{C.50})$$

e

$$\frac{\operatorname{sen}\chi}{\operatorname{sen}\theta_i} = \frac{\bar{n}_1}{\bar{n}_2} \quad (\text{Lei de Snell}) \quad (\text{C.51})$$

Portanto, conclui-se da eq. C.48 que:

$$(E_{0\parallel,i} \cos\theta_i - E_{0\parallel,r} \cos\theta_i)_{x=0} = (E_{0\parallel,t} \cos\chi)_{x=0} \quad (\text{C.52})$$

Agora, utilizando a condição de contorno para o campo magnético (eq. C.47 (d)), decorre que:

$$(H_{\parallel,i} + H_{\parallel,r})_{x=0} = (H_{\parallel,t})_{x=0} \quad (\text{C.53})$$

Lembrando que,

$$|\vec{H}| = \frac{\bar{n}}{\mu c_0} |\vec{E}| \quad (\text{C.54})$$

E, portanto, contabilizando apenas a parte real da eq. C.53, se tem que (onde $\mu_1 \approx \mu_2$):

$$(\bar{n}_1 E_{0\parallel,i} + \bar{n}_1 E_{0\parallel,r})_{x=0} = (\bar{n}_2 E_{0\parallel,t})_{x=0} \quad (\text{C.55})$$

Agora, dividindo a eq. C.52 pela eq. C.55 é possível eliminar o termo $E_{0\parallel,t}$ e escrever o *coeficiente de reflexão paralela*, ou seja, a razão entre as componentes paralelas das amplitudes de campo elétrico refletido e incidente, tal que:

$$\left(\frac{E_{0\parallel,r}}{E_{0\parallel,i}}\right)_{x=0} = \left(\frac{\bar{n}_2 \cos\theta_i - \bar{n}_1 \cos\chi}{\bar{n}_2 \cos\theta_i + \bar{n}_1 \cos\chi}\right)_{x=0} \quad (\text{C.56})$$

Aplicando as condições de contorno para as componentes perpendiculares ao plano de incidência dos campos elétrico e magnético (equações C.47 (a) e (c)) e procedendo analogamente ao realizado até agora para as componentes paralelas, então, é possível obter o *coeficiente de reflexão perpendicular*, ou seja, a razão entre as componentes perpendiculares das amplitudes de campo elétrico refletido ($E_{0\perp,r}$) e incidente ($E_{0\perp,i}$), tal que:

$$\left(\frac{E_{0\perp,r}}{E_{0\perp,i}}\right)_{x=0} = -\left(\frac{\bar{n}_2 \cos\chi - \bar{n}_1 \cos\theta_i}{\bar{n}_2 \cos\chi + \bar{n}_1 \cos\theta_i}\right)_{x=0} \quad (\text{C.57})$$

Nas equações C.56 e C.57 as partes real e imaginária correspondem, respectivamente, a uma mudança na amplitude e na fase da radiação refletida em relação à radiação incidente [192, p. 111].

A análise até agora desenvolvida nessa seção, utilizando as equações de Maxwell para explicar a interação de uma onda eletromagnética com uma superfície absorvedora ($\kappa \neq 0$), considerou a reflexão especular da radiação incidente nessa interface o que está explicitamente expresso na eq. C.50. E como as ondas incidente ($\vec{E}_{\parallel,i}$) e refletida ($\vec{E}_{\parallel,r}$) estão no mesmo plano (o plano de incidência) isto significa, também, que não há dependência da refletividade com o ângulo ϕ (simetria azimutal), mas há uma dependência espectral devido a variação de parâmetros ópticos do meio material com o comprimento de onda (*i.e.* $n(\lambda)$, $\kappa(\lambda)$ e $\alpha(\lambda)$).

Então, de acordo com a eq. C.39 se tomarmos o quadrado dos coeficientes de reflexão, ou seja $\left(\frac{E_{0,r}}{E_{0,i}}\right)^2$, obteremos a fração da energia incidente proveniente de uma direção particular (θ_i) que é refletida na interface de separação entre os dois meios dielétricos. Assim, são

definidas a *refletividade direcional espectral especular paralela* $\rho_{\parallel}(\lambda, \theta)$ e *perpendicular* $\rho_{\perp}(\lambda, \theta)$ como:

$$\rho_{\parallel}(\lambda, \theta_i) = \left(\frac{E_{0\parallel,r}}{E_{0\parallel,i}} \right)^2 \quad \text{C.58 (a)} \quad \rho_{\perp}(\lambda, \theta_i) = \left(\frac{E_{0\perp,r}}{E_{0\perp,i}} \right)^2 \quad \text{C.58 (b)}$$

Agora, como exemplo de aplicação, seja caso particular em que radiação eletromagnética proveniente do ar atmosférico ($\bar{n}_1 = n_{ar}$ suposto um dielétrico ideal, ou seja, $\kappa_{ar} = 0$) seja refletida na superfície da pele humana (modelada como um dielétrico real, ou seja, $\bar{n}_2 = n + ik$). Nesse contexto, as equações C.58 (a) e (b) assumem a forma:

$$\rho_{\parallel}(\lambda, \theta_i) = \left| \frac{(n + ik) \cos\theta_i - n_{ar} \cos\chi}{(n + ik) \cos\theta_i + n_{ar} \cos\chi} \right|^2 \quad \text{C.59 (a)}$$

$$\rho_{\perp}(\lambda, \theta_i) = \left| \frac{(n + ik) \cos\chi - n_{ar} \cos\theta_i}{(n + ik) \cos\chi + n_{ar} \cos\theta_i} \right|^2 \quad \text{C.59 (b)}$$

E para eliminar a dependência com o ângulo de refração χ no cálculo da refletividade, reescreve-se a lei de Snell (eq. C.51) na seguinte forma:

$$\text{sen}\chi = \text{sen}\theta_i \frac{n_{ar}}{(n + ik)} \Leftrightarrow \text{sen}\chi = \text{sen}\theta_i \frac{n_{ar}}{(n^2 - k^2)} (n - ik) \quad \text{(C.60)}$$

Tal que:

$$[(n + ik) \cos\chi]^2 = (n + ik)^2 (1 - \text{sen}^2\chi)$$

$$(n + ik) \cos\chi = \sqrt{(n + ik)^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2\theta_i} \equiv (q - ip) \quad \text{(C.61)}$$

O número complexo com parte real (q) e parte imaginária (p) definido na eq. C.61 acima pode ser explicitamente escrito em função dos parâmetros constitutivos dos dois meios materiais (n_{ar} , n e k) e do ângulo de incidência (θ_i) [25]:

$$(q - ip)^2 = (n + i\kappa)^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i$$

$$(q^2 - p^2) - 2pq i = (n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i) - 2n\kappa i$$

Tal que:

$$\text{i)} \quad p = \frac{n\kappa}{q} \quad \text{C.62 (a)}$$

$$\text{ii)} \quad q^2 - p^2 = n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i$$

$$q^4 - q^2(n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i) - n^2 \kappa^2 = 0 \quad \text{C.62 (b)}$$

A solução da equação de segundo grau em q^2 será:

$$q^2 = \frac{1}{2}(n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i) + \frac{1}{2} \sqrt{(n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i)^2 + 4n^2 \kappa^2} \quad \text{(C.63)}$$

Substituindo a eq. C.53 em C.62 (a), obtém-se:

$$\frac{p^2}{2} = \frac{n^2 \kappa^2}{(n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i) + \sqrt{(n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i)^2 + 4n^2 \kappa^2}}$$

$$\frac{p^2}{2} = \frac{n^2 \kappa^2 [(n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i) - \sqrt{(n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i)^2 + 4n^2 \kappa^2}]}{(n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i)^2 - (n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i)^2 - 4n^2 \kappa^2}$$

$$p^2 = \frac{1}{2}(-n^2 + \kappa^2 + n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i) + \frac{1}{2} \sqrt{(n^2 - \kappa^2 - n_{ar}^2 \text{sen}^2 \theta_i)^2 + 4n^2 \kappa^2} \quad \text{(C.64)}$$

Agora, de volta à eq. C.59 (a) substituindo $(n + i\kappa)\cos\chi$ por $q - ip$ e multiplicando a razão por seu complexo conjugado, então, calcula-se o valor de $\rho_{\parallel}(\lambda, \theta)$ (com base nas equações C.63 e C.64) [25]:

$$\rho_{\parallel}(\lambda, \theta_i) = \left| \frac{(n + i\kappa)^2 \cos\theta_i - n_{ar}(n + i\kappa) \cos\chi}{(n + i\kappa)^2 \cos\theta_i + n_{ar}(n + i\kappa) \cos\chi} \right|^2$$

$$\rho_{\parallel}(\lambda, \theta_i) = \left| \frac{[(n^2 - \kappa^2)\cos\theta_i + i(2n\kappa \cos\theta_i)] - n_{ar}(q - ip)}{[(n^2 - \kappa^2)\cos\theta_i + i(2n\kappa \cos\theta_i)] + n_{ar}(q - ip)} \right|^2$$

$$\rho_{\parallel}(\lambda, \theta_i) = \left\{ \frac{[(n^2 - \kappa^2)\cos\theta_i + i(2n\kappa \cos\theta_i)] - n_{ar}(q - ip)}{[(n^2 - \kappa^2)\cos\theta_i + i(2n\kappa \cos\theta_i)] + n_{ar}(q - ip)} \right\} \cdot \left\{ \frac{[(n^2 - \kappa^2)\cos\theta_i - i(2n\kappa \cos\theta_i)] - n_{ar}(q + ip)}{[(n^2 - \kappa^2)\cos\theta_i - i(2n\kappa \cos\theta_i)] + n_{ar}(q + ip)} \right\}$$

onde,

$$\frac{(a + bi) - (c - di)}{(a + bi) + (c - di)} \cdot \frac{(a - bi) - (c + di)}{(a - bi) + (c + di)} = \frac{(a - c)^2 + (b + d)^2}{(a + c)^2 + (b - d)^2}$$

$$\rho_{\parallel}(\lambda, \theta_i) = \frac{[(n^2 - \kappa^2)\cos\theta_i - n_{ar} q]^2 + [2n\kappa \cos\theta_i - n_{ar} p]^2}{[(n^2 - \kappa^2)\cos\theta_i + n_{ar} q]^2 + [2n\kappa \cos\theta_i + n_{ar} p]^2} \quad (\text{C.65})$$

Fazendo as mesma substituições na eq. C.59 (b), então, calcula-se o valor de $\rho_{\perp}(\lambda, \theta_i)$ (com base nas equações C.63 e C.64) [25]:

$$\rho_{\perp}(\lambda, \theta_i) = \left| \frac{(q - ip) - n_{ar} \cos\theta_i}{(q - ip) + n_{ar} \cos\theta_i} \right|^2$$

$$\rho_{\perp}(\lambda, \theta_i) = \left[\frac{(q - n_{ar} \cos\theta_i) - ip}{(q + n_{ar} \cos\theta_i) - ip} \right] \cdot \left[\frac{(q - n_{ar} \cos\theta_i) + ip}{(q + n_{ar} \cos\theta_i) + ip} \right]$$

Tal que:

$$\rho_{\perp}(\lambda, \theta_i) = \frac{(q - n_{ar} \cos\theta_i)^2 + p^2}{(q + n_{ar} \cos\theta_i)^2 + p^2} \quad (\text{C.66})$$

E para um caso mais geral, feita a suposição que o feixe proveniente do ar e incidente sobre a superfície do dielétrico imperfeito não é polarizado em nenhuma direção específica.

Então, pode-se afirmar que a refletividade de uma onda não polarizada é composta por contribuição igual de suas componentes e paralela perpendicular, ou seja [25], [192, p. 117]:

$$\rho(\lambda, \theta_i) = \frac{\rho_{\parallel}(\lambda, \theta_i) + \rho_{\perp}(\lambda, \theta_i)}{2} \quad (\text{C.67})$$

Ou ainda, de acordo com os resultados obtidos na seção C.1, a substituição da eq. C.67 na eq. C.19 permite determinar emissividade direcional espectral da interface ar-pele humana (suposta um dielétrico imperfeito e de superfície especular e opaca), tal que [25]:

$$\epsilon(\lambda, \theta_i) = 1 - \rho(\lambda, \theta_i) = 1 - \frac{\rho_{\parallel}(\lambda, \theta_i) + \rho_{\perp}(\lambda, \theta_i)}{2} \quad (\text{C.68})$$

C.4 Monitoramento termográfico da temperatura de superfícies curvas: modelos de Watmough (1970) e Clark (1976).

A termografia é uma técnica diagnóstica precisa, quantificável e sem contato físico, usada para visualizar e quantificar as mudanças nas temperaturas de uma superfície usando câmeras de infravermelho. É uma técnica não invasiva com promissoras aplicações biomédicas, a qual já tem sido utilizada na detecção precoce de tumores de mama [126] e melanoma [127] evitando biópsias desnecessárias.

A correta avaliação e interpretação dos resultados de um mapeamento termográfico dependem de cuidadosa análise dos princípios físicos que influenciam na formação do padrão de distribuição de temperatura sobre a superfície do corpo. Por exemplo, a despeito da uniformidade da temperatura de uma superfície curva, a sua emissão direcional não uniforme de radiação térmica provoca distorções e imprecisão na determinação de sua temperatura real utilizando uma câmera de infravermelho. Assim, as temperaturas aparentes (T_0 e T_{θ}) registradas por um radiômetro (e.g. uma câmera termográfica) de dois pontos diferentes A e B sobre uma mesma superfície cilíndrica isotérmica (com temperatura superficial real denotada

por T_s) é, portanto, função da emissividade espectral e direcional dessa superfície ($\epsilon_{\lambda, \theta}$), tal qual representado pelo diagrama da Figura C.8.

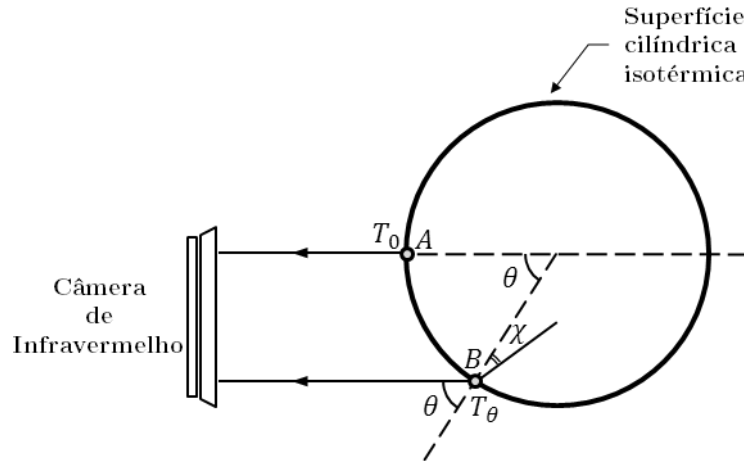


Figura C.8 Temperaturas aparentes (T_0 e T_θ) registradas por uma câmera de infravermelho de dois pontos diferentes A e B sobre uma mesma superfície cilíndrica isotérmica. Adaptado de: WATMOUGH, D. J. 1970, p. 03 [154].

O valor registrado pela câmera termográfica ao longo da direção normal à superfície emissora (quando $\theta = 0^\circ$) corresponde à temperatura real da superfície, ou seja, $T_0 = T_s$. Logo, o cálculo da diferença $\Delta T(\theta) = (T_s - T_\theta)$ entre a temperatura real da superfície isotérmica e a temperatura aparente (T_θ) registrada pela câmera termográfica numa direção qualquer com $0^\circ \leq \theta \leq 90^\circ$, permite determinar o erro praticado nessa medida.

Watmough *et al.*, num trabalho pioneiro em 1970 [154], consideraram o problema do imageamento por infravermelho da superfície do corpo humano e a determinação do erro no valor da temperatura aparente em função do ângulo (θ) formado pela objetiva da câmera e a direção normal à superfície da pele na região de interesse. Propuseram uma modelagem matemática em que a superfície da pele é um meio dielétrico ideal não absorvedor de energia térmica ($\kappa = 0$) e, portanto, seu índice de refração é real. Além disso, também desprezam a influência da reflexão da radiação ambiente na superfície da pele, sobre a leitura da câmera.

A partir do que já foi desenvolvido nas seções anteriores, essas considerações físicas equivalem a anular o coeficiente de extinção nas equações C.65 e C.66 e, também considerando o ar como dielétrico ideal com índice de refração $n_{ar} = 1$, a emissividade direcional espectral da pele pode ser calculada como:

$$\epsilon(\lambda, \theta) = 1 - \frac{1}{2} \left(\frac{\beta - \cos\theta}{\beta + \cos\theta} \right)^2 \cdot \left[1 + \left(\frac{\beta \cos\theta - \sin^2\theta}{\beta \cos\theta + \sin^2\theta} \right)^2 \right] \quad (\text{C.69})$$

onde,

$$\beta = \sqrt{(n^2 - \sin^2\theta)} \quad (\text{C.70})$$

A potência de radiação emitida por uma superfície real pode ser escrita em termos da radiância espectral de um corpo negro como (utilizando as equações C.4 e C.6 apresentadas na seção C.1 desse apêndice):

$$\dot{Q}(\lambda, \theta) = \epsilon(\lambda, \theta) \cdot \frac{C_1}{\lambda^5 \left[e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T}\right)} - 1 \right]} \quad (\text{C.71})$$

Em 1963, Dreyfus desenvolveu um cálculo para estimar a taxa de variação da radiação de um corpo negro em uma região espectral estreita em função da temperatura. Para tanto, utilizando a eq. C.4 (apresentada anteriormente na seção C.1 desse apêndice), calcula-se a seguinte quantidade [226]:

$$\frac{1}{\dot{Q}_{cn}(\lambda)} \cdot \frac{d\dot{Q}_{cn}(\lambda)}{dT}$$

Tal que:

$$\frac{d\dot{Q}_{cn}}{dT} = \frac{C_1}{\lambda^5} \frac{e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T}\right)}}{\left[e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T}\right)} + 1 \right]^2} \frac{C_2}{\lambda T^2}$$

Logo:

$$\frac{1}{\dot{Q}_{cn}} \cdot \frac{d\dot{Q}_{cn}}{dT} = \frac{C_2}{\lambda T^2} \cdot \frac{e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T}\right)}}{\left[e^{\left(\frac{C_2}{\lambda T}\right)} + 1 \right]} \quad (\text{C.72})$$

Em seu artigo também foi definido o seguinte parâmetro espectral $m(\lambda)$, como a taxa:

$$m(\lambda) = \frac{\left(\frac{d\dot{Q}_{cn}}{\dot{Q}_{cn}}\right)}{\left(\frac{dT}{T}\right)}$$

Tal que:

$$\frac{m(\lambda)}{T} = \frac{1}{\dot{Q}_{cn}} \cdot \frac{d\dot{Q}_{cn}}{dT} \quad (\text{C.73})$$

A potência radiante espectral emitida por um corpo negro possui um máximo e o comprimento de onda associado a esse máximo (λ_{max}) depende da temperatura T de sua superfície. Esse poder emissivo espectral máximo é deslocado para comprimentos de onda menores com o aumento da temperatura, conforme estabelecido na lei do Deslocamento de Wien [161], [226]:

$$\lambda_{max}T = \frac{C_2}{\alpha} = 2898 \mu\text{m} \cdot \text{K} \quad (\text{C.74})$$

onde $\alpha \cong 5$ é o parâmetro adimensional que maximiza a função $\left(\frac{x^5}{e^x - 1}\right)$.

Agora, definindo o parâmetro adimensional $\beta = \left(\frac{\lambda}{\lambda_{max}}\right)$ e substituindo na eq. C.74:

$$\frac{\alpha}{\beta} = \frac{C_2}{\lambda T} = \gamma \Leftrightarrow \gamma \cong \frac{5}{\beta} \quad (\text{C.75})$$

É possível reescrever a eq. C.73 como:

$$m(\lambda) = \frac{\gamma}{\left(1 - \frac{1}{e^\gamma}\right)} \quad (\text{C.76})$$

E quando $\gamma \gg 1$ isso implica em $m(\lambda) = \gamma$.

Dreyfus ainda propôs heurísticamente escrever o poder emissivo espectral de um corpo negro como:

$$\dot{Q}_{cn} = k_{\lambda} T^m \quad (\text{C.77})$$

Tal que:

$$\frac{1}{\dot{Q}_{cn}} \cdot \frac{d\dot{Q}_{cn}}{dT} = \frac{1}{k_{\lambda} T^m} k_{\lambda} T^{(m-1)} = \frac{m(\lambda)}{T}$$

onde k_{λ} é constante para um dado comprimento de onda λ .

Apesar da eq. C.77 ser uma aproximação Watmough e Oliver em seus resultados experimentais (1969) confirmaram a validade dessa expressão para pequenos valores de temperatura onde $m(\lambda)$ é aproximadamente constante [154]. Portanto, a eq. C.71 é reescrita em termos da eq. C.77 e a razão entre a potência emitida por unidade de área e por unidade de comprimento de onda pelos pontos A e B da Figura C.8:

$$\frac{\dot{Q}(\lambda, \theta)}{\dot{Q}(\lambda, 0)} = \frac{\epsilon(\lambda, \theta) \cdot k_{\lambda} T^m(\lambda, \theta)}{\epsilon(\lambda, 0) \cdot k_{\lambda} T^m(\lambda, 0)}$$

$$\frac{T_{\theta}}{T_0} = \sqrt[m]{\frac{\epsilon_{\theta}}{\epsilon_0}} \quad (\text{C.78})$$

Lembrando que $\Delta T(\theta) = (T_s - T_{\theta})$ e $T_s = T_0$, então erro na medida da temperatura aparente de uma superfície curva devido o efeito da emissividade direcional ϵ_{θ} (supondo a superfície um meio dielétrico perfeito e desprezando a reflexão da radiação térmica ambiental) é calculado como:

$$\Delta T(\theta) = T_s \left(1 - \sqrt[m]{\frac{\epsilon_\theta}{\epsilon_0}} \right) \quad (\text{C.79})$$

É importante enfatizar a dependência espectral do erro na medida da temperatura devido ao índice da raiz $m(\lambda)$ (eq. C.76).

Há ainda na literatura outro importante modelo teórico para o cálculo de $\Delta T(\theta)$ e que mais recentemente foi utilizado por Cheng *et al.* (em 2012) para ajustar com boa concordância resultados experimentais que indicam a utilização correta da técnica de termografia por infravermelho no monitoramento acurado da temperatura de superfícies curvas [184]. Esse segundo modelo foi inicialmente proposto por Clark, J. A. em 1976 [183] e leva em consideração a radiação térmica do ambiente refletida na superfície da pele e sua influência sobre o registro da câmera termográfica. Porém, assim como no modelo de Watmough, a pele é idealizada como um dielétrico perfeito ($\kappa = 0$) e sua emissividade direcional e espectral também é calculada utilizando a eq. C.69. Ele propõe que o ambiente pode ser tratado como um grande recinto isotérmico com temperatura T_a , de maneira que a radiação ambiental experimentada por qualquer objeto em seu interior é difusa e igual à emissão de um corpo negro à mesma temperatura T_a e, portanto, a potência radiante proveniente do ambiente que é refletida na superfície da pele (e detectada pelo radiômetro) é calculada como:

$$\dot{Q}_a = (1 - \epsilon_\theta) \sigma T_a^4 \quad (\text{C.80})$$

Assim, para qualquer superfície no interior desse ambiente vale a lei de Kirchhoff (eq. C.18), ou seja, $\epsilon(\lambda, \theta, \phi) = \alpha(\lambda, \theta, \phi)$ a emissividade hemisférica total da superfície da pele será igual à sua absorvidade hemisférica total [161, Cap. 12].

Além disso, Clark assume diretamente a lei de Stefan-Boltzmann (eq. C.5) e define o erro (ΔE) como a diferença entre o valor da potência radiante emitida por um corpo negro ($\dot{Q}_{cn}(T_s) = \sigma T_s^4$) à mesma temperatura (T_s) da superfície real emissora, e a potência radiante total: emitida ($\dot{Q}_s(T_s) = \epsilon_\theta \sigma T_s^4$) e refletida (\dot{Q}_a) pela superfície real. Com base nessa abordagem, conclui-se que o erro pode ser calculado como [183]:

$$\Delta E(\theta) = \sigma T_s^4 - [\epsilon_\theta \sigma T_s^4 + (1 - \epsilon_\theta) \sigma T_a^4]$$

$$\Delta E(\theta) = (1 - \epsilon_\theta)(\sigma T_s^4 - \sigma T_a^4) \quad (\text{C.81})$$

A dependência direcional do cálculo de $\Delta E(\theta)$ é devida à emissividade direcional (ϵ_θ) da superfície da pele.

A eq. C.81 ainda pode ser reescrita na forma das eq. C.82 abaixo:

$$\Delta E(\theta) = C(1 - \epsilon_\theta)(T_s - T_a) \equiv \Delta T(\theta) \quad (\text{C.82})$$

Tal que $C = \sigma(T_s + T_a)(T_s^2 + T_a^2)$ e $\Delta T(\theta) = (T_s - T_\theta) \propto \Delta E(\theta)$ onde T_θ é a temperatura aparente registrada pela câmera termográfica (dependente do ângulo θ formado entre a direção de sua objetiva e a direção normal à pele na região imageada). Em seu modelo, Clark considerou a validade da eq. C.82 limitada ao intervalo de comprimentos de onda curtos e, também, quando a diferença entre T_s e T_a é pequena [183].

As equações C.79 e C.82 são dois resultados muito importantes da literatura e serão utilizadas no capítulo 4 para ajustar teoricamente alguns de nossos resultados experimentais. Além da utilização dos modelos de Watmough e Clark, também será proposta uma nova modelagem matemática inspirada nesses trabalhos.

APÊNDICE D – Pareceres consubstanciados referentes ao projeto de pesquisa dessa tese de doutorado protocolados junto a Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFG.

D.1 Primeiro parecer deferido em 14 de janeiro de 2013 sob N° 039/2012:



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 14 de janeiro 2013.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA
PROTOCOLADO NA CEUA SOB O N°. 039/2012**

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** Estudo do perfil toxicológico, atividade antitumoral, mutagenicidade, genotoxicidade e mecanismo de indução de morte celular de diferentes complexos de rutênio em camundongos
2. **Pesquisador Responsável:** Elisângela de Paula Silveira Lacerda
3. **Pesquisadores colaboradores**
Andris Figueiroa Bakuzis
Aliny Pereira Lima
Cesar Augusto Sam-Tiago Vila Nova
Flávia de Castro Pereira
Francielli Mariana dos Santos Mello
Wanessa Carvalho Pires
Wanderson Lucas da Costa
4. **Unidade/Órgão:** ICB – UFG
5. **Unidade onde será realizado:** ICB
6. **Data de apresentação do protocolo na CEUA:** 04/04/2012
7. **Data do relato:** 14/05/2012
8. **Data de Atendimento das Pendências:** 11/01/2013

II - Parecer da CEUA:

Após reunião com a coordenadora do projeto foi apresentada uma carta com o atendimento das pendências quanto à analgesia dos animais.

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.

III - Data da reunião: 14/01/13

Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera

Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG

Prof.ª Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.

Email: ceua.ufg@gmail.com

D.2 Segundo parecer deferido em 03 de março de 2015 sob Nº 098/14:



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 03 de março de 2015.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE
PENDÊNCIA DO PROTOCOLO Nº. 098/14**

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** Estudo do perfil toxicológico, atividade antitumoral, mutagenicidade, genotoxicidade e mecanismo de indução de morte celular de diferentes nanopartículas magnéticas após tratamento por hipertermia em camundongos.
2. **Pesquisador Responsável:** Sônia Fátima Oliveira Santos
3. **Unidade/Órgão do pesquisador:** Laboratório de Genética Molecular e Citogenética - ICB/UFV
4. **Pesquisadores Participantes:** Elisangela de Paula Silveira Lacerda (doutora, coordenadora); Andris Figueiroa Bakuzis (doutor, orientador); Francielli Mariana dos Santos Mello (doutoranda, aluna); Hugo Delleon da Silva (pós-doutorando, aluno orientador); Wanessa Carvalho Pires (doutoranda, aluna); Paula Francinete Faustino da Silva (mestranda, aluna); Harley Fernandes Rodrigues (doutorando, aluno física); Gustavo Capistrano (mestrando, aluno física); Milton Rodrigues da Silva Junior (mestrando, aluno física) e Nicholas Zufelato (mestrando da física).
5. **Unidade onde será realizado:** Instituto de Ciências Biológicas (ICB)
6. **Data de apresentação do protocolo a CEUA:** 30/10/14
7. **Data parecer da CEUA:** 08/12/2014
8. **Data de Atendimento das Pendências:** 24/02/2015

II - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **aprovou**, o projeto acima referido e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFV o **Relatório Final** baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em **outubro de 2018**.

III - Data da reunião: 02/03/2015

Dra. Renata Mazaro e Costa
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFV

APÊNDICE E – Publicações de artigos relacionados à Tese.

[1] H. F. Rodrigues, F. M. Mello, L. C. Branquinho, N. Zufelato, E. P. Silveira-Lacerda, e A. F. Bakuzis, “Real-time infrared thermography detection of magnetic nanoparticle hyperthermia in a murine model under a non-uniform field configuration”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 29, n° 8, p. 752–767, dez. 2013. DOI: 10.3109/02656736.2013.839056.

[2] H. Rodrigues, G. Capistrano, F. Mello, N. Zufelato, E. Silveira-Lacerda, e A. F. Bakuzis, “Precise determination of the heat delivery during in vivo magnetic nanoparticle hyperthermia with infrared thermography”, *Phys. Med. Biol.*, mar. 2017. DOI: 10.1088/1361-6560/aa6793.

Referências Bibliográficas:

- [1] “INCA - CÂNCER - Tratamento”. [Online]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>. [Acessado: 14-fev-2017].
- [2] M. Lepetit-Coiffé *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”, *Eur. Radiol.*, vol. 20, n° 1, p. 193–201, jan. 2010.
- [3] “Ablation Therapy”, *MD Anderson Cancer Center*. [Online]. Disponível em: <https://www.mdanderson.org/treatment-options/ablation-therapy.html>. [Acessado: 22-jun-2016].
- [4] P. F. Laeseke *et al.*, “Multiple-Electrode Radiofrequency Ablation of Hepatic Malignancies: Initial Clinical Experience”, *Am. J. Roentgenol.*, vol. 188, n° 6, p. 1485–1494, jun. 2007.
- [5] H. Rhim, “Review of Asian experience of thermal ablation techniques and clinical practice”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 20, n° 7, p. 699–712, nov. 2004.
- [6] M.-H. Chen *et al.*, “Large Liver Tumors: Protocol for Radiofrequency Ablation and Its Clinical Application in 110 Patients—Mathematic Model, Overlapping Mode, and Electrode Placement Process”, *Radiology*, vol. 232, n° 1, p. 260–271, jul. 2004.
- [7] T. P. Ryan, P. F. Turner, e B. Hamilton, “Interstitial microwave transition from hyperthermia to ablation: Historical perspectives and current trends in thermal therapy”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 26, n° 5, p. 415–433, ago. 2010.
- [8] E. Maloney e J. H. Hwang, “Emerging HIFU applications in cancer therapy”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 31, n° 3, p. 302–309, abr. 2015.
- [9] J. G. Baust, A. A. Gage, T. E. Bjerklund Johansen, e J. M. Baust, “Mechanisms of cryoablation: Clinical consequences on malignant tumors”, *Cryobiology*, vol. 68, n° 1, p. 1–11, fev. 2014.
- [10] “Crioablação usa sistema de congelamento contra tumores”. [Online]. Disponível em: <https://www.hospitalsiriolibanes.org.br/sua-saude/Paginas/tecnica-usa-sistema-congelamento-contrapequenos-tumores.aspx>. [Acessado: 22-jun-2016].
- [11] R. A. Petros e J. M. DeSimone, “Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications”, *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9, n° 8, p. 615–627, ago. 2010.

- [12] D. B. Agus e F. Michor, “The sciences converge to fight cancer”, *Nat. Phys.*, vol. 8, n° 11, p. 773–774, nov. 2012.
- [13] M. Ferrari, “Cancer nanotechnology: opportunities and challenges”, *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, n° 3, p. 161–171, mar. 2005.
- [14] H. F. Rodrigues, F. M. Mello, L. C. Branquinho, N. Zufelato, E. P. Silveira-Lacerda, e A. F. Bakuzis, “Real-time infrared thermography detection of magnetic nanoparticle hyperthermia in a murine model under a non-uniform field configuration”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 29, n° 8, p. 752–767, dez. 2013.
- [15] L. C. Branquinho *et al.*, “Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia”, *Sci. Rep.*, vol. 3, out. 2013.
- [16] E. L. Verde, G. T. Landi, J. A. Gomes, M. H. Sousa, e A. F. Bakuzis, “Magnetic hyperthermia investigation of cobalt ferrite nanoparticles: Comparison between experiment, linear response theory, and dynamic hysteresis simulations”, *J. Appl. Phys.*, vol. 111, n° 12, p. 123902, 2012.
- [17] M. S. Carrião e A. F. Bakuzis, “Mean-field and linear regime approach to magnetic hyperthermia of core–shell nanoparticles: can tiny nanostructures fight cancer?”, *Nanoscale*, vol. 8, n° 15, p. 8363–8377, 2016.
- [18] R. Di Corato *et al.*, “Combining Magnetic Hyperthermia and Photodynamic Therapy for Tumor Ablation with Photoresponsive Magnetic Liposomes”, *ACS Nano*, vol. 9, n° 3, p. 2904–2916, mar. 2015.
- [19] A. Ito, H. Honda, e T. Kobayashi, “Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of ‘heat-controlled necrosis’ with heat shock protein expression”, *Cancer Immunol. Immunother. CII*, vol. 55, n° 3, p. 320–328, mar. 2006.
- [20] B. Le *et al.*, “Preparation of Tumor-Specific Magnetoliposomes and Their Application for Hyperthermia.”, *J. Chem. Eng. Jpn.*, vol. 34, n° 1, p. 66–72, 2001.
- [21] K. Maier-Hauff *et al.*, “Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme”, *J. Neurooncol.*, vol. 103, n° 2, p. 317–324, jun. 2011.
- [22] M. Johannsen, B. Thiesen, P. Wust, e A. Jordan, “Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 26, n° 8, p. 790–795, dez. 2010.

- [23] M. Johannsen *et al.*, “Thermotherapy of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Feasibility, Imaging, and Three-Dimensional Temperature Distribution”, *Eur. Urol.*, vol. 52, n° 6, p. 1653–1662, dez. 2007.
- [24] D J Watmough and Patricia W Fowler and R Oliver, “The thermal scanning of a curved isothermal surface: implications for clinical thermography”, *Phys. Med. Biol.*, vol. 15, n° 1, p. 1, 1970.
- [25] S. Hejazi e R. Spangler, “Theoretical modeling of skin emissivity”, 1992, p. 258–259.
- [26] W. C. Dewey, “Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 25, n° 1, p. 3–20, jan. 2009.
- [27] J. R. Oleson *et al.*, “Sensitivity of hyperthermia trial outcomes to temperature and time: Implications for thermal goals of treatment”, *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 25, n° 2, p. 289–297, jan. 1993.
- [28] M. W. Dewhirst, B. L. Viglianti, M. Lora-Michiels, M. Hanson, e P. J. Hoopes, “Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 19, n° 3, p. 267–294, jan. 2003.
- [29] P. S. Yarmolenko *et al.*, “Thresholds for thermal damage to normal tissues: An update”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 27, n° 4, p. 320–343, jun. 2011.
- [30] S. A. Sapareto e W. C. Dewey, “Thermal dose determination in cancer therapy”, *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 10, n° 6, p. 787–800, abr. 1984.
- [31] W. C. Dewey, “Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 25, n° 1, p. 3–20, jan. 2009.
- [32] International Myeloma Foundation - Latin America, “Estudos Clínicos”. [Online]. Disponível em: http://www.myeloma.org.br/estudo_clinico.php. [Acessado: 14-dez-2016].
- [33] R. D. Issels *et al.*, “Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study”, *Lancet Oncol.*, vol. 11, n° 6, p. 561–570, jun. 2010.
- [34] M. Nordmark *et al.*, “Hypoxia in human soft tissue sarcomas: adverse impact on survival and no association with p53 mutations”, *Br. J. Cancer*, vol. 84, n° 8, p. 1070–1075, abr. 2001.
- [35] P. Vaupel, K. Schlenger, C. Knoop, e M. Höckel, “Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements”, *Cancer Res.*, vol. 51, n° 12, p. 3316–3322, jun. 1991.

- [36] E. J. Hall e A. J. Giaccia, *Radiobiology for the radiologist*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- [37] M. W. Dewhirst, E. Jones, T. Samulski, Z. Vujaskovic, C. Li, e L. Prosnitz, “Chapter 41 Hyperthermia”, in : *Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. Holland-Frei, Cancer Medicine*, 6th ed., Hamilton, Ont. ; Lewiston, NY: BC Decker, 2003, p. 623–626.
- [38] M. R. Horsman e J. Overgaard, “The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy”, *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, p. rrw007, mar. 2016.
- [39] M. B. Wagner e S. M. C. Jacques, “Medidas de associação em estudos epidemiológicos: risco relativo e odds ratio.”, *J. Pediatr. (Rio J.)*, vol. 74, n° 1, p. 247–251, 1998.
- [40] D. Rumel, “‘Odds ratio’: algumas considerações”, *Rev. Saúde Pública*, vol. 20, p. 253–258, 1986.
- [41] G. C. van Rhoon, “Is CEM43 still a relevant thermal dose parameter for hyperthermia treatment monitoring?”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 32, n° 1, p. 50–62, jan. 2016.
- [42] E. Moros, *Physics of thermal therapy fundamentals and clinical applications*. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis, 2013.
- [43] V. L. de Almeida, A. Leitão, L. del C. B. Reina, C. A. Montanari, C. L. Donnici, e M. T. P. Lopes, “Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.”, *Quím. Nova*, vol. 28, p. 118–129, 2005.
- [44] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, e K. Hori, “Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review”, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 65, n° 1–2, p. 271–284, mar. 2000.
- [45] L. C. de Oliveira, E. J. F. Taveira, L. G. Souza, R. N. Marreto, E. M. Lima, e S. F. Taveira, “Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura”, *Revista Brasileira de Cancerologia*, vol. 58, n° 4, p. 695–701, 2012.
- [46] C. W. Song, H. Park, e R. J. Griffin, “Improvement of tumor oxygenation by mild hyperthermia”, *Radiat. Res.*, vol. 155, n° 4, p. 515–528, abr. 2001.
- [47] A. van den Berg-Block e H. Reinhold, “Time-temperature relationship for hyperthermia induced stoppage of the microcirculation in tumors”, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 10, n° 5, p. 737–740, maio 1984.
- [48] C. W. Song, M. S. Patten, L. M. Chelstrom, J. G. Rhee, e S. H. Levitt, “Effect of multiple heatings on the blood flow in RIF-1 tumours, skin and muscle of C3H mice”,

- Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group*, vol. 3, n° 6, p. 535–545, dez. 1987.
- [49] B. S. Nah, I. B. Choi, W. Y. Oh, J. L. Osborn, e C. W. Song, “Vascular thermal adaptation in tumors and normal tissue in rats”, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 35, n° 1, p. 95–101, abr. 1996.
- [50] S. Toupin *et al.*, “Feasibility of real-time MR thermal dose mapping for predicting radiofrequency ablation outcome in the myocardium in vivo”, *J. Cardiovasc. Magn. Reson.*, vol. 19, n° 1, dez. 2017.
- [51] D. L. Carter *et al.*, “Magnetic resonance thermometry during hyperthermia for human high-grade sarcoma”, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 40, n° 4, p. 815–822, mar. 1998.
- [52] D. Gianfelice, C. Gupta, W. Kucharczyk, P. Bret, D. Havill, e M. Clemons, “Palliative Treatment of Painful Bone Metastases with MR Imaging–guided Focused Ultrasound”, *Radiology*, vol. 249, n° 1, p. 355–363, out. 2008.
- [53] K. Funaki, H. Fukunishi, e K. Sawada, “Clinical outcomes of magnetic resonance-guided focused ultrasound surgery for uterine myomas: 24-month follow-up”, *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, vol. 34, n° 5, p. 584–589, nov. 2009.
- [54] H. Furusawa *et al.*, “Magnetic Resonance–Guided Focused Ultrasound Surgery of Breast Cancer: Reliability and Effectiveness”, *J. Am. Coll. Surg.*, vol. 203, n° 1, p. 54–63, jul. 2006.
- [55] B. Liberman *et al.*, “Pain Palliation in Patients with Bone Metastases Using MR-Guided Focused Ultrasound Surgery: A Multicenter Study”, *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 16, n° 1, p. 140–146, jan. 2009.
- [56] N. McDannold, G. T. Clement, P. Black, F. Jolesz, e K. Hynynen, “Transcranial Magnetic Resonance Imaging– Guided Focused Ultrasound Surgery of Brain Tumors: Initial Findings in 3 Patients”, *Neurosurgery*, vol. 66, n° 2, p. 323–332, fev. 2010.
- [57] L. Zhang e Z.-B. Wang, “High-intensity focused ultrasound tumor ablation: Review of ten years of clinical experience”, *Front. Med. China*, vol. 4, n° 3, p. 294–302, set. 2010.
- [58] B. Kozissnik, A. C. Bohorquez, J. Dobson, e C. Rinaldi, “Magnetic fluid hyperthermia: Advances, challenges, and opportunity”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 29, n° 8, p. 706–714, dez. 2013.
- [59] M. A. Busquets, J. Estelrich, e M. J. Sánchez-Martín, “Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents”, *Int. J. Nanomedicine*, p. 1727, mar. 2015.

- [60] X. Huang, I. H. El-Sayed, W. Qian, e M. A. El-Sayed, “Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, n° 6, p. 2115–2120, fev. 2006.
- [61] M. Hu *et al.*, “Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications”, *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, n° 11, p. 1084, 2006.
- [62] R. Ivkov, “Magnetic nanoparticle hyperthermia: A new frontier in biology and medicine?”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 29, n° 8, p. 703–705, dez. 2013.
- [63] C. L. Dennis e R. Ivkov, “Physics of heat generation using magnetic nanoparticles for hyperthermia”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 29, n° 8, p. 715–729, dez. 2013.
- [64] A. Jordan, P. Wust, H. Fähling, W. John, A. Hinz, e R. Felix, “Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia”, *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group*, vol. 9, n° 1, p. 51–68, fev. 1993.
- [65] J. A. Schwartz *et al.*, “Feasibility Study of Particle-Assisted Laser Ablation of Brain Tumors in Orthotopic Canine Model”, *Cancer Res.*, vol. 69, n° 4, p. 1659–1667, fev. 2009.
- [66] G. von Maltzahn *et al.*, “Computationally Guided Photothermal Tumor Therapy Using Long-Circulating Gold Nanorod Antennas”, *Cancer Res.*, vol. 69, n° 9, p. 3892–3900, maio 2009.
- [67] L. R. Hirsch *et al.*, “Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, n° 23, p. 13549–13554, nov. 2003.
- [68] A. M. Gobin, E. M. Watkins, E. Quevedo, V. L. Colvin, e J. L. West, “Near-Infrared-Resonant Gold/Gold Sulfide Nanoparticles as a Photothermal Cancer Therapeutic Agent”, *Small*, vol. 6, n° 6, p. 745–752, mar. 2010.
- [69] “Johannsen et al. - 2007 - Thermotherapy of Prostate Cancer Using Magnetic Na.pdf”. .
- [70] Q. Peng *et al.*, “Lasers in medicine”, *Rep. Prog. Phys.*, vol. 71, n° 5, p. 056701, maio 2008.
- [71] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, e M. A. El-Sayed, “Review of Some Interesting Surface Plasmon Resonance-enhanced Properties of Noble Metal Nanoparticles and Their Applications to Biosystems”, *Plasmonics*, vol. 2, n° 3, p. 107–118, set. 2007.
- [72] M. F. Modest, *Radiative heat transfer*, Third Edition. New York: Academic Press, 2013.
- [73] A. J. Welch e M. J. van Gemert, Orgs., *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue*, 2. ed. Dordrecht: Springer, 2011.

- [74] S. A. Sapareto, L. E. Hopwood, W. C. Dewey, M. R. Raju, e J. W. Gray, “Effects of hyperthermia on survival and progression of Chinese hamster ovary cells”, *Cancer Res.*, vol. 38, n° 2, p. 393–400, fev. 1978.
- [75] J. A. Pearce, “Comparative analysis of mathematical models of cell death and thermal damage processes”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 29, n° 4, p. 262–280, jun. 2013.
- [76] G. C. van Rhoon, J. A. Pearce, P. Corry, E. Repasky, e P. Stauffer, “house believes that measurement of thermal dose is essential for thermal therapy.”, apresentado em 12th International Congress of Hyperthermic Oncology, New Orleans, Louisiana, USA, 2016.
- [77] C. A. Perez e S. A. Sapareto, “Thermal dose expression in clinical hyperthermia and correlation with tumor response/control”, *Cancer Res.*, vol. 44, n° 10 Suppl, p. 4818s–4825s, out. 1984.
- [78] S. B. Field e C. C. Morris, “The relationship between heating time and temperature: its relevance to clinical hyperthermia”, *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.*, vol. 1, n° 2, p. 179–186, nov. 1983.
- [79] G. Crile, “The effects of heat and radiation on cancers implanted on the feet of mice”, *Cancer Res.*, vol. 23, p. 372–380, mar. 1963.
- [80] G. Crile, “Selective destruction of cancers after exposure to heat”, *Ann. Surg.*, vol. 156, p. 404–407, set. 1962.
- [81] A. R. Moritz e F. C. Henriques, “Studies of Thermal Injury: II. The Relative Importance of Time and Surface Temperature in the Causation of Cutaneous Burns”, *Am. J. Pathol.*, vol. 23, n° 5, p. 695–720, set. 1947.
- [82] J. A. Pearce, “Relationship between Arrhenius models of thermal damage and the CEM 43 thermal dose”, 2009, p. 718104.
- [83] Y. Feng, J. Tinsley Oden, e M. N. Rylander, “A Two-State Cell Damage Model Under Hyperthermic Conditions: Theory and In Vitro Experiments”, *J. Biomech. Eng.*, vol. 130, n° 4, p. 041016, 2008.
- [84] J. A. Pearce, “Improving Accuracy in Arrhenius Models of Cell Death: Adding a Temperature-Dependent Time Delay”, *J. Biomech. Eng.*, vol. 137, n° 12, p. 121006, nov. 2015.
- [85] P. F. R. Palma, “Avaliação da Anexina-V e Calceína-AM como marcadores de apoptose em linfócitos”, Florianópolis, SC, 2005.
- [86] S. Bhowmick, J. E. Coad, D. J. Swanlund, e J. C. Bischof, “In vitro thermal therapy of AT-1 Dunning prostate tumours”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 20, n° 1, p. 73–92, fev. 2004.

- [87] B. Mehdaoui *et al.*, “Influence of a transverse static magnetic field on the magnetic hyperthermia properties and high-frequency hysteresis loops of ferromagnetic FeCo nanoparticles”, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 100, n° 5, p. 052403, jan. 2012.
- [88] R. R. Bitton, T. D. Webb, K. B. Pauly, e P. Ghanouni, “Improving thermal dose accuracy in magnetic resonance-guided focused ultrasound surgery: Long-term thermometry using a prior baseline as a reference: Improving Thermal Dose Accuracy in MRgFUS”, *J. Magn. Reson. Imaging*, vol. 43, n° 1, p. 181–189, jan. 2016.
- [89] G. Bertotti, *Hysteresis in magnetism: for physicists, materials scientists, and engineers*. San Diego: Academic Press, 1998.
- [90] W. F. Brown, “Thermal Fluctuations of a Single-Domain Particle”, *Phys. Rev.*, vol. 130, n° 5, p. 1677–1686, jun. 1963.
- [91] W. Brown, “Thermal fluctuation of fine ferromagnetic particles”, *IEEE Trans. Magn.*, vol. 15, n° 5, p. 1196–1208, set. 1979.
- [92] L. Néel, “Théorie du traînage magnétique des substances massives dans le domaine de Rayleigh”, *J. Phys. Radium*, vol. 11, n° 2, p. 49–61, 1950.
- [93] Frenkel, J., *The Kinetic Theory of Liquids*. New York: Dover Publications, Inc, 1955.
- [94] M. I. Shliomis, “Magnetic fluids”, *Sov. Phys. Uspekhi*, vol. 17, n° 2, p. 153–169, fev. 1974.
- [95] R. K. Gilchrist, R. Medal, W. D. Shorey, R. C. Hanselman, J. C. Parrott, e C. B. Taylor, “Selective inductive heating of lymph nodes”, *Ann. Surg.*, vol. 146, n° 4, p. 596–606, out. 1957.
- [96] M. Johannsen *et al.*, “Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: Results of a prospective phase I trial”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 23, n° 3, p. 315–323, jan. 2007.
- [97] >Peter Wust *et al.*, “Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy – feasibility, tolerance and achieved temperatures”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 22, n° 8, p. 673–685, jan. 2006.
- [98] R. Weissleder, M. Nahrendorf, e M. J. Pittet, “Imaging macrophages with nanoparticles”, *Nat. Mater.*, vol. 13, n° 2, p. 125–138, jan. 2014.
- [99] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, e K. Hori, “Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review”, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 65, n° 1–2, p. 271–284, mar. 2000.

- [100] C. L. Dennis *et al.*, “Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia”, *Nanotechnology*, vol. 20, n° 39, p. 395103, set. 2009.
- [101] K. Strebhardt e A. Ullrich, “Paul Ehrlich’s magic bullet concept: 100 years of progress”, *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, n° 6, p. 473–480, jun. 2008.
- [102] S. Wilhelm *et al.*, “Analysis of nanoparticle delivery to tumours”, *Nat. Rev. Mater.*, vol. 1, n° 5, p. 16014, abr. 2016.
- [103] S. E. A. Gratton *et al.*, “The effect of particle design on cellular internalization pathways”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, n° 33, p. 11613–11618, ago. 2008.
- [104] Y. Rabin, “Is intracellular hyperthermia superior to extracellular hyperthermia in the thermal sense?”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 18, n° 3, p. 194–202, jan. 2002.
- [105] R. Di Corato *et al.*, “Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs”, *Biomaterials*, vol. 35, n° 24, p. 6400–6411, ago. 2014.
- [106] E. Moros, *Physics of thermal therapy fundamentals and clinical applications*. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis, 2013.
- [107] J. R. Oleson, “A Review of Magnetic Induction Methods for Hyperthermia Treatment of Cancer”, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. BME-31, n° 1, p. 91–97, jan. 1984.
- [108] W. J. Atkinson, I. A. Brezovich, e D. P. Chakraborty, “Usable Frequencies in Hyperthermia with Thermal Seeds”, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. BME-31, n° 1, p. 70–75, jan. 1984.
- [109] M. S. Carrião, “Magnetohipertermia em nanopartículas core-shell”, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2016.
- [110] M. Torres-Lugo e C. Rinaldi, “Thermal potentiation of chemotherapy by magnetic nanoparticles”, *Nanomed.*, vol. 8, n° 10, p. 1689–1707, out. 2013.
- [111] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Fähling, e Roland Felix, “Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles”, *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 201, n° 1–3, p. 413–419, jul. 1999.
- [112] I. Hilger, W. Andrä, R. Hergt, R. Hiergeist, H. Schubert, e W. A. Kaiser, “Electromagnetic Heating of Breast Tumors in Interventional Radiology: In Vitro and in Vivo Studies in Human Cadavers and Mice”, *Radiology*, vol. 218, n° 2, p. 570–575, fev. 2001.

- [113] S. Toraya-Brown *et al.*, “Local hyperthermia treatment of tumors induces CD8+ T cell-mediated resistance against distal and secondary tumors”, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, vol. 10, n° 6, p. 1273–1285, ago. 2014.
- [114] T. Kobayashi, K. Kakimi, E. Nakayama, e K. Jimbow, “Antitumor immunity by magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia”, *Nanomed.*, vol. 9, n° 11, p. 1715–1726, ago. 2014.
- [115] S. Toraya-Brown e S. Fiering, “Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 30, n° 8, p. 531–539, dez. 2014.
- [116] J.-H. Lee *et al.*, “Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction”, *Nat. Nanotechnol.*, vol. 6, n° 7, p. 418–422, jun. 2011.
- [117] M. S. Carrião e A. F. Bakuzis, “Mean-field and linear regime approach to magnetic hyperthermia of core–shell nanoparticles: can tiny nanostructures fight cancer?”, *Nanoscale*, vol. 8, n° 15, p. 8363–8377, 2016.
- [118] I. Oncoguia, “Braquiterapia de Baixa Taxa de Dose (LDR)”, *Instituto Oncoguia*. [Online]. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/braquiterapia-de-baixa-taxa-de-dose-ldr/4656/711/>. [Acessado: 27-fev-2017].
- [119] MagForce AG, “MagForce AG – About Us”. [Online]. Disponível em: <http://www.magforce.de/en/unternehmen/ueber-uns.html>. [Acessado: 27-fev-2017].
- [120] NCI, “Prostate-Specific Antigen (PSA) Test”, *National Cancer Institute - USA*. [Online]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/prostate/psa-fact-sheet>. [Acessado: 28-fev-2017].
- [121] I. Oncoguia, “Antígeno Prostático Específico (PSA) no Diagnóstico do Câncer de Próstata”, *Instituto Oncoguia*. [Online]. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/antigeno-prostatico-especifico-psa-no-diagnostico-do-cancer-de-prostata/1202/289/>. [Acessado: 28-fev-2017].
- [122] E. H. Wissler, “Pennes’ 1948 paper revisited”, *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 85, n° 1, p. 35–41, jul. 1998.
- [123] G. C. van Rhoon, “Is CEM43 still a relevant thermal dose parameter for hyperthermia treatment monitoring?”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 32, n° 1, p. 50–62, jan. 2016.
- [124] M. W. Dewhirst, B. L. Viglianti, M. Lora-Michiels, M. Hanson, e P. J. Hoopes, “Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 19, n° 3, p. 267–294, jan. 2003.
- [125] R. M. Arthur, “Developing ultrasonic temperature imaging to aid cancer treatment”, *SPIE Newsroom*, 2007.

- [126] E. Y.-K. Ng, “A review of thermography as promising non-invasive detection modality for breast tumor”, *Int. J. Therm. Sci.*, vol. 48, n° 5, p. 849–859, maio 2009.
- [127] C. Herman, “The role of dynamic infrared imaging in melanoma diagnosis”, *Expert Rev. Dermatol.*, vol. 8, n° 2, p. 177–184, abr. 2013.
- [128] B. Shmookler, J. Bickels, J. Jelinek, P. Sugarbaker, e M. Malawer, “Bone and Soft-tissue Sarcomas: Epidemiology, Radiology, Pathology and Fundamentals of Surgical Treatment”, in *Musculoskeletal Cancer Surgery*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004, p. 3–35.
- [129] C. E. R. Santos, J. F. N. Rezende, G. S. S. de Carvalho, e L. F. Nunes, “Sarcomas de partes moles”, in *Fundamentos de Dermatologia*, 1^a, vol. 2, M. R. e Silva e M. C. R. de Castro, Orgs. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008, p. 1761–1774.
- [130] R. D. Issels *et al.*, “Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study”, *Lancet Oncol.*, vol. 11, n° 6, p. 561–570, jun. 2010.
- [131] A. Lopes, “Passado, presente e futuro dos Sarcomas das Partes Moles - A.C. Camargo Cancer Center”. [Online]. Disponível em: <http://www.accamargo.org.br/oncologia-no-dia-a-dia/passado-presente-e-futuro-dos-sarcomas-das-partes-moles/540/>. [Acessado: 22-mar-2017].
- [132] S. Fruehauf *et al.*, “Gene Therapy for Sarcoma”, *Cells Tissues Organs*, vol. 172, n° 2, p. 133–144, nov. 2002.
- [133] A. Milano *et al.*, “New emerging drugs in soft tissue sarcoma”, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 59, n° 1, p. 74–84, jul. 2006.
- [134] Instituto Nacional de Câncer (Brazil) e Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica, Orgs., *Câncer na criança e no adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade*. Rio de Janeiro, RJ: Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer - INCA : Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica - SOBOPE, 2008.
- [135] J. Little, *Epidemiology of childhood cancer*. Lyon, France : Oxford: International Agency for Research on Cancer ; Distributed by Oxford University Press, 1999.
- [136] “Rabdomiossarcomas - A.C. Camargo Cancer Center.” [Online]. Disponível em: <http://www.accamargo.org.br/tudo-sobre-o-cancer/rabdomiossarcoma/35/>. [Acessado: 23-mar-2017].
- [137] R. D. Dodd, J. K. Mito, e D. G. Kirsch, “Animal models of soft-tissue sarcoma”, *Dis. Model. Mech.*, vol. 3, n° 9–10, p. 557–566, set. 2010.

- [138] V. B. Sampson, D. F. Kamara, e E. A. Kolb, “Xenograft and genetically engineered mouse model systems of osteosarcoma and Ewing’s sarcoma: tumor models for cancer drug discovery”, *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 8, n° 10, p. 1181–1189, out. 2013.
- [139] B. Hildebrandt, “The cellular and molecular basis of hyperthermia”, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 43, n° 1, p. 33–56, jul. 2002.
- [140] B. D. Cullity e C. D. Graham, *Introduction to magnetic materials*, 2nd ed. Hoboken, N.J: IEEE/Wiley, 2009.
- [141] A. P. Guimarães, *Principles of Nanomagnetism*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- [142] A. F. Bakuzis, L. C. Branquinho, L. Luiz e Castro, M. T. de Amaral e Eloi, e R. Miotto, “Chain formation and aging process in biocompatible polydisperse ferrofluids: Experimental investigation and Monte Carlo simulations”, *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 191–192, p. 1–21, maio 2013.
- [143] R. E. Rosensweig, *Ferrohydrodynamics*, Dover edition. Mineola, New York: Dover Publications, Inc, 2014.
- [144] L. C. Branquinho, “Efeito da interação dipolar magnética na eficiência de aquecimento de nanopartículas: Implicações para magnetohipertermia.”, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2014.
- [145] C. S. R. Menezes *et al.*, “Analysis in vivo of antitumor activity, Cytotoxicity and Interaction between plasmid DNA and the cis-dichlorotetraammineruthenium(III) chloride”, *Chem. Biol. Interact.*, vol. 167, n° 2, p. 116–124, abr. 2007.
- [146] W. F. Enneking, S. S. Spanier, e M. M. Malawer, “The effect of the Anatomic setting on the results of surgical procedures for soft parts sarcoma of the thigh”, *Cancer*, vol. 47, n° 5, p. 1005–1022, mar. 1981.
- [147] G. G. Steel, *Growth kinetics of tumours: cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer*. Oxford [Eng.]: Clarendon Press, 1977.
- [148] A. Jordan *et al.*, “Effects of magnetic fluid hyperthermia (MFH) on C3H mammary carcinoma in vivo”, *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group*, vol. 13, n° 6, p. 587–605, dez. 1997.
- [149] I. Hilger, R. Hergt, e W. A. Kaiser, “Use of magnetic nanoparticle heating in the treatment of breast cancer”, *IEE Proc. Nanobiotechnol.*, vol. 152, n° 1, p. 33–39, fev. 2005.
- [150] A. Ito, H. Honda, e T. Kobayashi, “Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of ‘heat-controlled

- necrosis' with heat shock protein expression", *Cancer Immunol. Immunother. CII*, vol. 55, n° 3, p. 320–328, mar. 2006.
- [151] D. E. Bordelon *et al.*, "Modified Solenoid Coil That Efficiently Produces High Amplitude AC Magnetic Fields With Enhanced Uniformity for Biomedical Applications", *IEEE Trans. Magn.*, vol. 48, n° 1, p. 47–52, jan. 2012.
- [152] R. K. Gilchrist, R. Medal, W. D. Shorey, R. C. Hanselman, J. C. Parrott, e C. B. Taylor, "Selective inductive heating of lymph nodes", *Ann. Surg.*, vol. 146, n° 4, p. 596–606, out. 1957.
- [153] FLIR Systems, AB., *The Ultimate Infrared Handbook for R&D Professionals*. .
- [154] D J Watmough and Patricia W Fowler and R Oliver, "The thermal scanning of a curved isothermal surface: implications for clinical thermography", *Phys. Med. Biol.*, vol. 15, n° 1, p. 1, 1970.
- [155] D. E. Bordelon, C. Cornejo, C. Grüttner, F. Westphal, T. L. DeWeese, e R. Ivkov, "Magnetic nanoparticle heating efficiency reveals magneto-structural differences when characterized with wide ranging and high amplitude alternating magnetic fields", *J. Appl. Phys.*, vol. 109, n° 12, p. 124904, 2011.
- [156] E. Natividad, M. Castro, e A. Mediano, "Accurate measurement of the specific absorption rate using a suitable adiabatic magnetothermal setup", *Appl. Phys. Lett.*, vol. 92, n° 9, p. 093116, mar. 2008.
- [157] E. Natividad, M. Castro, e A. Mediano, "Adiabatic vs. non-adiabatic determination of specific absorption rate of ferrofluids", *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 321, n° 10, p. 1497–1500, maio 2009.
- [158] J. Carrey, B. Mehdaoui, e M. Respaud, "Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization", *J. Appl. Phys.*, vol. 109, n° 8, p. 083921, 2011.
- [159] "Dielectric Properties of Body Tissues: Home page". [Online]. Disponível em: <http://niremf.ifac.cnr.it/tissprop/>. [Acessado: 07-mar-2017].
- [160] D. Y. O. Sato *et al.*, "Histopathological and immunophenotyping studies on normal and sarcoma 180-bearing mice treated with a complex homeopathic medication", *Homeopathy*, vol. 94, n° 1, p. 26–32, jan. 2005.
- [161] T. L. Bergman e F. P. Incropera, Orgs., *Fundamentals of heat and mass transfer*, 7th ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2011.
- [162] H. H. Pennes, "Analysis of tissue and arterial blood temperatures in the resting human forearm", *J. Appl. Physiol.*, vol. 1, n° 2, p. 93–122, ago. 1948.

- [163] E. H. Wissler, “Pennes’ 1948 paper revisited”, *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985, vol. 85, n° 1, p. 35–41, jul. 1998.
- [164] H. F. Rodrigues, F. M. Mello, L. C. Branquinho, N. Zufelato, E. P. Silveira-Lacerda, e A. F. Bakuzis, “Real-time infrared thermography detection of magnetic nanoparticle hyperthermia in a murine model under a non-uniform field configuration”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 29, n° 8, p. 752–767, dez. 2013.
- [165] I. M. Gescheit, A. Dayan, M. Ben-David, e I. Gannot, “Minimal-invasive thermal imaging of a malignant tumor: A simple model and algorithm”, *Med. Phys.*, vol. 37, n° 1, p. 211, 2010.
- [166] Janet W Draper and J W Boag, “The calculation of skin temperature distributions in thermography”, *Phys. Med. Biol.*, vol. 16, n° 2, p. 201, 1971.
- [167] J. W. Draper e J. W. Boag, “Skin temperature distributions over veins and tumours”, *Phys. Med. Biol.*, vol. 16, n° 4, p. 645–654, out. 1971.
- [168] J. H. Awbery, “CXXIX. Heat flow when the boundary condition is Newtons’s law”, *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.*, vol. 7, n° 47, p. 1143–1153, jun. 1929.
- [169] “Numerical Integration - Maple Programming Help”. [Online]. Disponível em: <http://www.maplesoft.com/support/help/Maple/view.aspx?path=evalf/Int>. [Acessado: 23-jan-2017].
- [170] H. S. Carslaw e J. C. Jaeger, *Conduction of heat in solids*, 2nd ed. Oxford [Oxfordshire] : New York: Clarendon Press ; Oxford University Press, 1986.
- [171] W. Andrä, C. . d’Ambly, R. Hergt, I. Hilger, e W. . Kaiser, “Temperature distribution as function of time around a small spherical heat source of local magnetic hyperthermia”, *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 194, n° 1–3, p. 197–203, abr. 1999.
- [172] T. Hoare *et al.*, “A Magnetically Triggered Composite Membrane for On-Demand Drug Delivery”, *Nano Lett.*, vol. 9, n° 10, p. 3651–3657, out. 2009.
- [173] S. Toraya-Brown e S. Fiering, “Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 30, n° 8, p. 531–539, dez. 2014.
- [174] K. Maier-Hauff *et al.*, “Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme”, *J. Neurooncol.*, vol. 103, n° 2, p. 317–324, jun. 2011.
- [175] I. Hilger e W. A. Kaiser, “Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia”, *Nanomed.*, vol. 7, n° 9, p. 1443–1459, set. 2012.

- [176] M. Ma *et al.*, “Au capped magnetic core/mesoporous silica shell nanoparticles for combined photothermo-/chemo-therapy and multimodal imaging”, *Biomaterials*, vol. 33, n° 3, p. 989–998, jan. 2012.
- [177] R. Di Corato *et al.*, “Combining Magnetic Hyperthermia and Photodynamic Therapy for Tumor Ablation with Photoresponsive Magnetic Liposomes”, *ACS Nano*, vol. 9, n° 3, p. 2904–2916, mar. 2015.
- [178] A. Espinosa, R. Di Corato, J. Kolosnjaj-Tabi, P. Flaud, T. Pellegrino, e C. Wilhelm, “Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment”, *ACS Nano*, vol. 10, n° 2, p. 2436–2446, fev. 2016.
- [179] B. Kateb, V. Yamamoto, C. Yu, W. Grundfest, e J. P. Gruen, “Infrared thermal imaging: A review of the literature and case report”, *NeuroImage*, vol. 47, p. T154–T162, ago. 2009.
- [180] M. Ueda, T. Sakurai, K. Kasai, Y. Ushikubo, e H. Sainejima, “Localisation of sensory motor cortex during surgery by changes of cortical surface temperature after median nerve stimulation”, *The Lancet*, vol. 350, n° 9077, p. 561, ago. 1997.
- [181] A. M. Gorbach *et al.*, “Assessment of Critical Renal Ischemia With Real-Time Infrared Imaging”, *J. Surg. Res.*, vol. 149, n° 2, p. 310–318, out. 2008.
- [182] K. Nishikawa *et al.*, “Intraoperative Thermal Imaging in Esophageal Replacement: Its Use in the Assessment of Gastric Tube Viability”, *Surg. Today*, vol. 36, n° 9, p. 802–806, set. 2006.
- [183] J. A. Clark, “Effects of surface emissivity and viewing angle errors in thermography”, *Acta Thermogr.*, vol. 1, n° 3, p. 138–141, 1976.
- [184] T.-Y. Cheng, D. Deng, e C. Herman, “Curvature Effect Quantification for In-Vivo IR Thermography”, 2012, p. 127.
- [185] V. Rieke e K. Butts Pauly, “MR thermometry”, *J. Magn. Reson. Imaging*, vol. 27, n° 2, p. 376–390, fev. 2008.
- [186] U. Rocha *et al.*, “Nd³⁺ doped LaF₃ nanoparticles as self-monitored photo-thermal agents”, *Appl. Phys. Lett.*, vol. 104, n° 5, p. 053703, fev. 2014.
- [187] J. Zhong, W. Liu, L. Kong, e P. C. Morais, “A new approach for highly accurate, remote temperature probing using magnetic nanoparticles”, *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 6338, out. 2014.

- [188] I. M. Perreard, D. B. Reeves, X. Zhang, E. Kuehlert, E. R. Forauer, e J. B. Weaver, “Temperature of the magnetic nanoparticle microenvironment: estimation from relaxation times”, *Phys. Med. Biol.*, vol. 59, n° 5, p. 1109–1119, mar. 2014.
- [189] T. Togawa, “Non-contact skin emissivity: measurement from reflectance using step change in ambient radiation temperature”, *Clin. Phys. Physiol. Meas. Off. J. Hosp. Phys. Assoc. Dtsch. Ges. Med. Phys. Eur. Fed. Organ. Med. Phys.*, vol. 10, n° 1, p. 39–48, fev. 1989.
- [190] V. Bernard, E. Staffa, V. Mornstein, e A. Bourek, “Infrared camera assessment of skin surface temperature – Effect of emissivity”, *Phys. Med.*, vol. 29, n° 6, p. 583–591, nov. 2013.
- [191] H.-P. Berlien e G. J. Müller, *Applied laser medicine*. Berlin: Springer, 2003.
- [192] S. Robert e J. R. Howell, *Thermal Radiation Heat Transfer*, 3rd ed. USA: Hemisphere Publishing Corporation, 1992.
- [193] G. M. Hale e M. R. Querry, “Optical Constants of Water in the 200-nm to 200- μ m Wavelength Region”, *Appl. Opt.*, vol. 12, n° 3, p. 555, mar. 1973.
- [194] E. Salomatina e A. N. Yaroslavsky, “Evaluation of the in vivo and ex vivo optical properties in a mouse ear model”, *Phys. Med. Biol.*, vol. 53, n° 11, p. 2797–2807, jun. 2008.
- [195] A. Chanmugam, R. Hatwar, e C. Herman, “Thermal analysis of cancerous breast model”, *Int. Mech. Eng. Congr. Expo. Proc. Int. Mech. Eng. Congr. Expo. Int. Mech. Eng. Congr. Expo.*, vol. 2012, p. 134–143, 2012.
- [196] INMETRO, CICMA, e SEPIN, *Avaliação de dados de medição: Guia para a expressão de incerteza de medição – GUM 2008*, 1ª Edição Brasileira da 1ª Edição do BIPM de 2008. Duque de Caxias, RJ, 2012.
- [197] P. S. Yarmolenko *et al.*, “Thresholds for thermal damage to normal tissues: An update”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 27, n° 4, p. 320–343, jun. 2011.
- [198] M. P. Law, P. G. Coultas, e S. B. Field, “Induced thermal resistance in the mouse ear”, *Br. J. Radiol.*, vol. 52, n° 616, p. 308–314, abr. 1979.
- [199] M. U. Werner, B. Lassen, J. L. Pedersen, e H. Kehlet, “Local cooling does not prevent hyperalgesia following burn injury in humans”:, *Pain*, vol. 98, n° 3, p. 297–303, ago. 2002.
- [200] D. G. Greenhalgh, M. B. Lawless, B. B. Chew, W. A. Crone, M. E. Fein, e T. L. Palmieri, “Temperature threshold for burn injury: an oximeter safety study”, *J. Burn Care Rehabil.*, vol. 25, n° 5, p. 411–415, out. 2004.

- [201] H. D. Suit, “Hyperthermic Effects on Animal Tissues”, *Radiology*, vol. 123, n° 2, p. 483–487, maio 1977.
- [202] Janet W Draper and J W Boag, “The calculation of skin temperature distributions in thermography”, *Phys. Med. Biol.*, vol. 16, n° 2, p. 201, 1971.
- [203] G. C. van Rhoon, T. Samaras, P. S. Yarmolenko, M. W. Dewhirst, E. Neufeld, e N. Kuster, “CEM43°C thermal dose thresholds: a potential guide for magnetic resonance radiofrequency exposure levels?”, *Eur. Radiol.*, vol. 23, n° 8, p. 2215–2227, ago. 2013.
- [204] P. Mertyna, M. W. Dewhirst, E. Halpern, W. Goldberg, e S. Nahum Goldberg, “Radiofrequency ablation: The effect of distance and baseline temperature on thermal dose required for coagulation”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 24, n° 7, p. 550–559, jan. 2008.
- [205] “IntegriSense 750-NEV10873”, *PerkinElmer*. [Online]. Disponível em: <http://www.perkinelmer.com/product/integrisense-750-nev10873>. [Acessado: 12-mar-2017].
- [206] H. A. Sturges, “The Choice of a Class Interval”, *J. Am. Stat. Assoc.*, vol. 21, n° 153, p. 65–66, 1926.
- [207] M. W. Dewhirst, D. A. Sim, S. Sapareto, e W. G. Connor, “Importance of minimum tumor temperature in determining early and long-term responses of spontaneous canine and feline tumors to heat and radiation”, *Cancer Res.*, vol. 44, n° 1, p. 43–50, jan. 1984.
- [208] Dewey, W.C. *et al.*, “Cell biology of hyperthermia and radiation.”, in *Radiation Biology in Cancer Research*, New York: Raven Press, 1980, p. 589–621.
- [209] H. Lyngt, O. R. Monge, P. J. Böhler, e E. K. Rofstad, “Relationships between thermal dose and heat-induced tissue and vascular damage after thermoradiotherapy of locally advanced breast carcinoma”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 7, n° 3, p. 403–415, jan. 1991.
- [210] I. M. Gescheit, A. Dayan, M. Ben-David, e I. Gannot, “Minimal-invasive thermal imaging of a malignant tumor: A simple model and algorithm”, *Med. Phys.*, vol. 37, n° 1, p. 211, 2010.
- [211] P. Mertyna, M. W. Dewhirst, E. Halpern, W. Goldberg, e S. Nahum Goldberg, “Radiofrequency ablation: The effect of distance and baseline temperature on thermal dose required for coagulation”, *Int. J. Hyperthermia*, vol. 24, n° 7, p. 550–559, jan. 2008.
- [212] Arrhenius Svante, *Quantitative laws in biological chemistry / by Svante Arrhenius*. London :G. Bell, 1915.
- [213] K. Huang, *Statistical mechanics*, 2nd ed. New York: Wiley, 1987.
- [214] A. P. Guimarães, *Magnetism and magnetic resonance in solids*. New York: Wiley, 1998.

- [215] A. P. Guimarães, “Propriedades magnéticas de sistemas granulares”, *Rev. Bras. Ensino Física*, vol. 22, p. 382–386, setembro 2000.
- [216] W. Brown, “Thermal Fluctuations of a Single-Domain Particle”, *Phys. Rev.*, vol. 130, n° 5, p. 1677–1686, jun. 1963.
- [217] W. T. Coffey e Y. P. Kalmykov, “Thermal fluctuations of magnetic nanoparticles: Fifty years after Brown”, *J. Appl. Phys.*, vol. 112, n° 12, p. 121301, 2012.
- [218] E. R. Cintra *et al.*, “Nanoparticle agglomerates in magnetoliposomes”, *Nanotechnology*, vol. 20, n° 4, p. 045103, jan. 2009.
- [219] D. J. Griffiths, *Introduction to electrodynamics*, Fourth edition. Boston: Pearson, 2013.
- [220] W. Schütt, U. Thomanek, G. Grümmer, S.-K. Kraeft, F. Reinholz, e U. W. Cornell, “New Methods for the Investigation of Blood-Biomaterial Interaction”, *Artif. Organs*, vol. 19, n° 8, p. 847–851, ago. 1995.
- [221] J. D. Jackson, *Classical electrodynamics*, 3rd ed. New York: Wiley, 1999.
- [222] R. Hergt *et al.*, “Physical limits of hyperthermia using magnetite fine particles”, *IEEE Trans. Magn.*, vol. 34, n° 5, p. 3745–3754, set. 1998.
- [223] R. E. Rosensweig, “Heating magnetic fluid with alternating magnetic field”, *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 252, p. 370–374, nov. 2002.
- [224] Debye, P.J.W., *Polar Molecules*. New York: Dover Publications, Inc, 1945.
- [225] A. Tomitaka, K. Ueda, T. Yamada, e Y. Takemura, “Heat dissipation and magnetic properties of surface-coated Fe₃O₄ nanoparticles for biomedical applications”, *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 324, n° 21, p. 3437–3442, out. 2012.
- [226] M. G. Dreyfus, “Spectral Variation of Blackbody Radiation”, *Appl. Opt.*, vol. 2, n° 11, p. 1113, nov. 1963.