



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Eva Patrícia Quintas Pereira

**Síntese e caracterização de nanopartículas
vetorizadas para células tumorais com
possível aplicação na entrega controlada
de fármacos**

Tese de Mestrado

Mestrado em Química Medicinal

Trabalho efetuado sob a orientação de

Professora Doutora Paula Margarida Vidigal Soares Teixeira Ferreira

Co-Orientadora:

Professora Doutora Maria de Fátima Malveiro Bento

DECLARAÇÃO

Eva Patrícia Quintas Pereira

Endereço eletrónico: pg23911@alunos.uminho.pt

Telemóvel: 916393442

Número do Bilhete de Identidade: 14178476

Título da dissertação:

Síntese e caracterização de nanopartículas vetorizadas para células tumorais com possível aplicação na entrega controlada de fármacos

Orientadora:

Professora Doutora Paula Margarida Vidigal Soares Teixeira Ferreira

Co-orientadora:

Professora Doutora Maria de Fátima Malveiro Bento

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado:

Mestrado em Química Medicinal

Departamento de Química

Escola de Ciências

Universidade do Minho

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, 23 de Dezembro de 2015.

Assinatura: _____

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Esta é mais uma etapa que finda e que com muito esforço, dedicação e trabalho foi ultrapassada com sucesso. Nem todos os dias foram fáceis, mas no fim todos os objetivos alcançados fazem-me sentir orgulho naquilo que foi realizado.

Os agradecimentos são muitos e representam todo o apoio que me foi dado ao longo do desenvolvimento da presente dissertação. Fazendo a análise retrospectiva de todo o trabalho desenvolvido, gostaria de manifestar a minha gratidão e agradecimento a todos aqueles que contribuíram para a sua realização.

Quero agradecer à minha orientadora Professora Doutora Paula Margarida Ferreira e co-orientadora Professora Doutora Maria de Fátima Bento, pelo empenho e atenção demonstrados em todos os momentos, e pela sua contribuição na minha evolução pessoal. Agradeço-lhes a confiança e o apoio depositados no meu trabalho.

Ao Departamento de Química da Universidade do Minho, pelas condições dadas à realização deste projeto, bem como aos seus funcionários, pelo apoio na preparação de amostras e pelas análises efetuadas. Agradeço também à Doutora Edith Ariza do Laboratório de Serviços de Caracterização de Materiais da Universidade do Minho (SEMAT/UM) por todo o cuidado e ajuda nos estudos de *SEM* realizados.

Um agradecimento especial destina-se à minha família, em particular aos meus pais, irmão e cunhada por todo o apoio e carinho que me deram nos momentos mais difíceis, mas também por toda a amizade e confiança que demonstraram ao longo da minha vida. Agradeço-lhes a motivação, o incentivo e a compreensão durante a elaboração desta dissertação.

Agradeço também aos meus colegas de mestrado pela ajuda e amizade que sempre mostraram, ficarão para sempre no meu coração e nunca esquecerei os momentos de convívio nas alturas menos boas mas também nas de maior alegria.

Por último e não menos importante, quero agradecer às amigas verdadeiras que sempre estiveram lá, aquelas que sempre acreditaram em mim e que nunca me deixaram desistir.

Resumo

A funcionalização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro (NPs OF@Au) e de nanopartículas de ouro (NPs Au) com péptidos cíclicos contendo a sequência Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD) permite a entrega seletiva dessas nanopartículas na superfície de células, nomeadamente células tumorais, que sobre-expressam a integrina $\alpha_v\beta_3$.

Neste trabalho é reportada a síntese de três novos péptidos lineares e de dois novos péptidos cíclicos com a sequência RGD. Estes compostos foram preparados utilizando uma combinação de síntese peptídica em fase sólida (SPPS) e em solução. A SPPS foi efetuada usando uma resina de cloreto de 2-clorotritilo, uma estratégia Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) e os grupos protetores benziloxicarbonilo (Z), *terc*-butilo (^tBu) e 2,2,4,6,7-pentametildi-hidrofurano-5-sulfonilo (Pbf) para as cadeias laterais da lisina, ácido aspártico e arginina, respetivamente. Um dos péptidos lineares foi ciclizado, após acoplamento com o ácido hexinóico e com a propargilamina, utilizando uma reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen e uma bis-azida aromática. O péptido GRGDfKG foi ciclizado através da formação de uma ligação amida entre o terminal amina e o terminal ácido carboxílico - ciclização *head-to-tail*.

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPs OF) foram preparadas por recurso ao método de co-precipitação de cloretos de ferro (II) e de ferro (III) em meio alcalino. O revestimento das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com ouro (NPs OF@Au) foi efetuado utilizando boro-hidreto de sódio como agente redutor e um sal de ouro. Prepararam-se ainda nanopartículas de ouro (NPs Au) aplicando dois métodos de preparação distintos envolvendo a redução de cloreto de sal de ouro. Algumas das nanopartículas preparadas neste trabalho foram caracterizadas por um conjunto de técnicas tais como a dispersão dinâmica de luz (DLS), a microscopia eletrónica de varrimento (SEM), a espectroscopia de energia dispersiva (EDS) e a espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis).

A funcionalização das nanopartículas com os péptidos contendo a sequência RGD utilizando tióis, bem como o estudo das nanopartículas como nanoelétrodos será objeto de trabalhos futuros.

Abstract

The functionalization of magnetic nanoparticles of iron oxide coated with gold (NPs OF@Au) and gold nanoparticles (NPs Au) with cyclic peptides containing the sequence Arginine-Glycine-Aspartic Acid (RGD) allows the selective delivery of these nanoparticles to cells which overexpress integrin $\alpha_v\beta_3$.

This work reports the synthesis of three new linear peptides and two new cyclic peptides containing the RGD sequence. These compounds were prepared by a combination of solid phase peptide synthesis (SPPS) and peptide synthesis in solution. The SPPS was performed using a resin of 2-chlorotrityl chloride, a Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) strategy and benzyloxycarbonyl (Z), *tert*-butyl (^tBu) and 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrofuran-5-sulfonyl (Pbf) as protecting groups for the side chains of lysine, aspartic acid and arginine, respectively. One of the linear peptides was cyclised after coupling with hexynoic acid and propargylamine using a 1,3-dipolar cycloaddition reaction of Huisgen with an aromatic bis-azide. The GRGDfKG peptide was cyclised by formation of an amide bond between the terminal amine function and the carboxylic acid terminus - head-to-tail cyclization.

The iron oxide magnetic nanoparticles (NPs OF) were prepared by a co-precipitation method using iron (II) and iron (III) salts in an alkaline medium. The coating of these magnetic nanoparticles with gold (NPs OF@Au) was carried out using sodium borohydride as reducing agent and a gold salt. In this work were also prepared gold nanoparticles (NPs Au) applying two different methods of synthesis involving the reduction of gold chloride salt. Some nanoparticles were characterized by several methods that include dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM), the energy dispersive spectroscopy (EDS) and ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis).

The functionalization of nanoparticles with peptides containing the RGD sequence using thiols and the study of these nanoparticles as nanoelectrodes will be the subject of future work.

Abreviaturas e Símbolos

Abreviatura	Nome completo
% w/v	Percentagem de peso por volume
aa	Aminoácido
Abs	Absorvância
Abs _{máx}	Absorvância máxima
AcOH	Ácido acético
aq.	Aquoso
Ar	Aromático
Arg/R	L-Arginina
Asn/N	L-Asparagina
Asp/D	L-Ácido aspártico
Boc	Grupo <i>tert</i> -butiloxicarbonilo
c	Ciclo
CDCl ₃ -d ₁	Clorofórmio deuterado
C _i	Carbono aromático na posição ipso
<i>COSY</i>	<i>Correlated Spectroscopy</i> (Técnica de espectroscopia de RMN)
<i>CTAB</i>	Brometo de <i>N</i> -cetil- <i>N,N,N</i> -tri-metilamónio-hexadecil
Cys/C	L-Cisteína
d.	Dias
DCM	Diclorometano

dd	Duplo duplete (na descrição dos espectros de RMN de ^1H)
DEPT-135	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> (Técnica de espectroscopia de RMN)
DIC	Di-isopropilcarbodiimida
DIPEA	<i>N,N</i> -di-isopropiletilamina
DLS	Dispersão dinâmica de luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO- d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
D-Phe/f	D-Fenilalanina
DVB	Divinilbenzeno
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva (<i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético (<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
eq.	Equivalente(s)
Fd	Fator de diluição
Fe_3O_4	Magnetite
Fmoc	Grupo 9-fluorenilmetoxycarbonilo
Fmoc-Cl	Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo
fr	Banda com intensidade fraca (na descrição dos espectros de IV)
Gly/G	L-Glicina

h.	Horas
HBTU	Hexafluorofosfato de <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilurónio
<i>HMBC</i>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Técnica de espectroscopia de RMN)
HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazole
HOBt	1-Hidroxibenzotriazole
<i>HRMS</i>	Espectrometria de massa de alta resolução (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
<i>HSQC</i>	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> (Técnica de espectroscopia de RMN)
Hz	Hertz
IV	Espectroscopia de infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento (expressa em Hz)
lit.	Literatura
Lys/K	L-lisina
M	Molar
m	Multiplete
me	Banda com intensidade média (na descrição dos espetros de IV)
Me	Grupo metilo
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
min.	Minutos

<i>MNPs</i>	Nanopartículas magnéticas (<i>Magnetic Nanoparticles</i>)
<i>MRI</i>	Imagem de ressonância magnética (<i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
NPs	Nanopartículas
NPs Au	Nanopartículas de ouro
NPs Fe ₃ O ₄ @Au	Nanopartículas magnéticas de magnetite revestidas com ouro
NPs OF	Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro
NPs OF@Au	Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro
NPs γ -Fe ₂ O ₃ @Au	Nanopartículas magnéticas de magmite revestidas com ouro
OF	Óxidos de ferro
Orn	Ornitina
P.F.	Ponto de fusão
Pbf	Grupo 2,2,4,6,7-pentametildi-hidrofurano-5-sulfonilo
<i>PDT</i>	Terapia fotodinâmica (<i>Photodynamic Therapy</i>)
ppm	Partes por milhão
<i>PTT</i>	Terapia fototérmica (<i>Photothermal Therapy</i>)
r	Tamanho das nanopartículas
<i>RES</i>	Sistema retículo-endotelial (<i>Reticuloendothelial System</i>)
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Protão

rpm	Rotações por minuto
s	Singlete (na descrição dos espectros de RMN de ^1H)
s.	Segundos
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento (<i>Scannig Electron Microscopy</i>)
Ser/S	L-Serina
sl	Singlete largo (na descrição dos espectros de RMN de ^1H)
SPPS	Síntese peptídica em fase sólida (<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>)
SPR	Ressonância plasmónica superficial (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
t	Tripleto (na descrição dos espectros de RMN de ^1H)
t.a.	Temperature ambiente
t.l.c	Cromatografia em camada fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
^tBu	Grupo <i>terc</i> -butilo
td	Tripleto de dupletos
TEM	Microscopia eletrónica de transmissão (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
Tf	Trifluormetanossulfonilo
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>Trifluoroacetic Acid</i>)
TFE	2,2,2-Trifluoretanol
TMAOH	Hidróxido de tetrametilamónio (<i>Tetramethylammonium Hydroxide</i>)

TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico
Tyr/y	D-Tirosina
UV-Vis	Espectroscopia de ultravioleta-visível
Val/V	L-Valina
Z	Grupo benziloxycarbonilo
$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Hematite
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Magmite
δ	Desvio químico (expresso em unidades ppm)
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda ao qual a absorvância é máxima
σ	Desvio padrão
ν	Frequência (em unidades de cm^{-1})
$\bar{\nu}$	Número de onda

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Abreviaturas e Símbolos	xi
Lista de Esquemas	xxi
Lista de Figuras	xxiii
Lista de Tabelas	xxix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Nanopartículas	3
1.2. Nanopartículas magnéticas	5
1.2.1. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	5
1.2.1.1. Aplicações	6
1.2.1.2. Métodos de preparação	12
1.3. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro	14
1.4. Nanopartículas de ouro	16
1.4.1. Aplicações	18
1.4.2. Métodos de preparação	18
1.5. Técnicas de caracterização de nanopartículas	21
1.5.1. Microscopia eletrônica	21
1.5.1.1. Microscopia eletrônica de varrimento (<i>SEM</i>)	22
1.5.2. Dispersão dinâmica de luz (<i>DLS</i>)	23
1.5.3. Espectroscopia de Ultravioleta-visível (<i>UV-Vis</i>)	25
1.6. Péptidos de RGD como agentes vetorizantes	26
1.6.1. Métodos de síntese peptídica	28
1.6.2. Ciclização de péptidos lineares	30

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
2.1. Síntese de péptidos cíclicos de RGD	35
2.1.1. Síntese de precursores	37
2.1.2. Síntese de péptidos lineares de RGD	38
2.1.3. Ciclização de péptidos lineares de RGD	55
2.2. Preparação e caracterização de nanopartículas	59
2.2.1. Preparação e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	60
2.2.2. Preparação e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro	68
2.2.3. Preparação e caracterização de nanopartículas de ouro	76
3. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	85
4. PARTE EXPERIMENTAL	89
4.1. Procedimentos gerais	91
4.2. Síntese de péptidos cíclicos de RGD	93
4.2.1. Síntese de precursores	93
4.2.1.1. Síntese de 1,4-diazidobenzeno ^{86,97} , 2	93
4.2.1.2. Síntese de Fmoc-D-Phe-OH ⁹⁸ , 4	93
4.2.2. Síntese de péptidos lineares de RGD	94
4.2.2.1. Procedimentos gerais de síntese em fase sólida	94
4.2.2.1.1. <i>Loading</i> da resina	94
4.2.2.1.2. Clivagem do grupo Fmoc	95
4.2.2.1.3. Acoplamento do aminoácido <i>N</i> -protegido com o grupo Fmoc	95
4.2.2.1.4. Clivagem do péptido da resina	96
4.2.2.2. Síntese do péptido 5	96
4.2.2.3. Síntese do péptido 6	97
4.2.2.4. Síntese do péptido 7	99
4.2.2.5. Síntese do péptido 8	100
4.2.3. Ciclização de péptidos lineares de RGD	101

4.2.3.1. Síntese do péptido 9	101
4.2.3.2. Síntese do péptido 10	103
4.3. Preparação de nanopartículas	104
4.3.1. Preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	104
4.3.1.1. Preparação da amostra 1	104
4.3.1.2. Preparação da amostra 2	105
4.3.1.3. Preparação da amostra 3	106
4.3.1.4. Preparação da amostra 4	106
4.3.2. Preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro	107
4.3.2.1. Preparação da amostra Fe@Au 1	107
4.3.2.2. Preparação da amostra Fe@Au 2	108
4.3.2.3. Preparação da amostra Fe@Au 3	108
4.3.3. Preparação de nanopartículas de ouro	108
4.3.3.1. Preparação de nanopartículas de ouro utilizando o método de Frens (preparação direta)	109
4.3.3.1.1. Preparação da amostra Au 1	109
4.3.3.2. Preparação de nanopartículas de ouro utilizando o método de <i>seeding growth</i>	109
4.3.3.2.1. Preparação da amostra Au 2	109
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

Lista de Esquemas

- Esquema 1:** Cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen de uma azida (dipolo-1,3) e um alquino (dipolarófilo). 31
- Esquema 2:** Catálise com Cu (I) da cicloadição de 1,2,3-triazoles-1,4-dissubstituídos. Adaptado de ⁹². 31
- Esquema 3:** Síntese do 1,4-diazidobenzeno **2** a partir do ácido 1,4-benzeno-bisborónico **1**. **a)** NaN₃ (2,5 eq.), CuSO₄·5H₂O (0,2 eq.), MeOH, t.a., 44 h.. 37
- Esquema 4:** Síntese da Fmoc-D-Phe-OH **4** a partir do aminoácido H-D-Phe-OH **3**. **a) i)** Na₂CO₃ (aq.) (2,5 eq.), dioxano, 0 °C, 4h.; **ii)** 18h., t.a.; **iii)** HCl. 38
- Esquema 5:** Reação do primeiro Fmoc-aminoácido com a resina de cloreto de 2-clorotritilo. 40
- Esquema 6:** Clivagem do grupo Fmoc com piperidina e formação de dibenzofluveno. 41
- Esquema 7:** Síntese dos péptidos **5**, **6** e **7** em fase sólida. **a) i)** DIPEA (4,0 eq.), DCM seco, t.a., 2 h.; **ii)** 20% de piperidina em DMF, t.a., 2 h.; **b) i)** Fmoc-aa-OH (2,5 eq.), HOBt (2,5 eq.), DIC (2,5 eq.), DMF, t.a., 18 h.; **ii)** 20% de piperidina em DMF, t.a., 2 h., repetição sucessiva de **i** e **ii**; **iii)** AcOH/TFE/DCM (4:4:12), t.a., 1 h.. 42
- Esquema 8:** Síntese do péptido **8**. **a)** HOBt (1,0 eq.), HBTU (1,0 eq.), propargilamina (1,5 eq.), DIPEA (2,0 eq.), DMF, t.a., 2,5 d.. 43
- Esquema 9:** Correlações observados no espectro de COSY, em DMSO-d₆, do péptido **8**. 44
- Esquema 10:** Síntese do péptido **9**. **a)** HBTU (1,0 eq.), DIPEA (1,0 eq.), DMF, t.a., 20 h.. 57
- Esquema 11:** Síntese do péptido **10**. **a)** 1,4-diazidobenzeno **2** (1,0 eq.), CuI (0,02 eq.), Et₃N (2,2 eq.), DMF, t.a., 5,5 d.. 58
- Esquema 12:** Processo de preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPs OF) na presença de oxigénio. 61
- Esquema 13:** Processo de preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPs OF) em atmosfera de nitrogénio. 62
- Esquema 14:** Processo de preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro (NPs OF@Au). 69
- Esquema 15:** Processo de preparação de nanopartículas de ouro (NPs Au) 77

Lista de Figuras

- Figura 1:** Aplicações das nanopartículas magnéticas (*MNPs*). Adaptado de ⁸. 7
- Figura 2:** Constituição de uma nanopartícula utilizada em *drug delivery*. A nanopartícula deverá conter uma molécula vetorizante e o agente terapêutico. Adaptado de ³. 9
- Figura 3:** Representação esquemática do uso de nanopartículas em terapia fototérmica (*PTT*). Adaptado de ³. 11
- Figura 4:** Nanopartícula com um núcleo de óxido de ferro (rosa) revestido com uma camada de ouro (amarelo) - NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ ou NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@Au$. 15
- Figura 5:** Espectros de absorção de nanopartículas de ouro com diferentes tamanhos. Influência do tamanho das nanopartículas nos espectros de absorção respectivos. Adaptado de ⁵⁸. 16
- Figura 6:** Espectros de absorção de nanopartículas de ouro com diferentes formas. Efeito da forma da nanopartícula de ouro no espectro de absorção da mesma. Nanopartículas de ouro de forma esférica (**A**) e nanopartículas de ouro com formas variadas (**B**). Adaptado de ⁵⁸. 17
- Figura 7:** Espectros de absorção de nanopartículas de ouro de 15 nm monodispersas (**A**) e agregadas (**B**). Adaptado de ⁵⁸. 18
- Figura 8:** Representação esquemática de uma nanopartícula de ouro (NPs Au). Núcleo metálico (rosa), agente estabilizante (cinzento), ligando (verde).⁶² 19
- Figura 9:** Representação esquemática dos tipos de radiação emitidos pela amostra quando submetida a um feixe de elétrons. 22
- Figura 10:** Representação esquemática dos componentes do microscópio eletrônico de varrimento. 23
- Figura 11:** Representação esquemática de um aparelho *Nano Zetasizer* para efetuar medições de *DLS*. Adaptado de ⁷⁵. 24
- Figura 12:** Representação esquemática de um espectrofotômetro de UV-Vis. 26
- Figura 13:** Sequência Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD). 26
- Figura 14:** Estrutura de três péptidos cíclicos com a sequência RGD. 28
- Figura 15:** Péptido cíclico com a sequência RGD ciclizado pelo método *head-to-tail*. 30

Figura 16: Representação esquemática das principais interações entre o Cilengitide e a integrina $\alpha_v\beta_3$. Adaptado de ⁸¹ .	36
Figura 17: Espectro de IV, em Nujol, da bis-azida 2 .	37
Figura 18: Estrutura dos péptidos lineares com a sequência RGD 5 , 6 e 7 preparados por síntese peptídica em fase sólida.	39
Figura 19: Espectro de RMN de ¹ H, em DMSO-d ₆ , do péptido 8 .	43
Figura 20: Espectro de COSY, em DMSO-d ₆ , do péptido 8 evidenciando a correlação entre os prótons do CH ₂ do grupo Z e os prótons aromáticos.	44
Figura 21: Espectro de COSY, em DMSO-d ₆ , do péptido 8 evidenciando a correlação entre os prótons NH dos grupos amida e os prótons dos grupos α -CH dos aminoácidos, assim como a correlação entre os prótons do CH ₂ do grupo propargílico e o próton do grupo amida.	45
Figura 22: Espectro de COSY, em DMSO-d ₆ , do péptido 8 mostrando a correlação entre os prótons do grupo CH ₂ intermédio do pentino (multiplete a 1,58-1,68 ppm) e os prótons dos restantes grupos CH ₂ (triplete de dupletos a 2,14 ppm e triplete a 2,20 ppm) do mesmo grupo.	46
Figura 23: Espectro de RMN de ¹³ C, em DMSO-d ₆ , do péptido 8 .	46
Figura 24: Espectro de HSQC, em DMSO-d ₆ , do péptido 8 nas zonas aromática (A) e dos α -CH dos aminoácidos (B).	47
Figura 25: Espectro de HSQC, em DMSO-d ₆ , do péptido 8 nas zonas da correlação entre os prótons do CH ₂ intermédio do grupo pentino (multiplete a 1,58-1,68 ppm) e o respetivo sinal do átomo de carbono (A), das correlações entre os prótons do CH ₂ do grupo pentino mais próximo da ligação tripla (triplete de dupletos a 2,14 ppm) e dos prótons do CH ₂ mais próximo da C=O (triplete a 2,20 ppm) e os respetivos sinais dos átomos de carbono (B), e ainda da correlação entre o multiplete a 2,73-2,81 ppm, correspondente ao grupo CH da ligação tripla do pentino, e o respetivo sinal de carbono (C).	48
Figura 26: Espectro de HSQC, em DMSO-d ₆ , do péptido 8 nas zonas da correlação entre o próton do CH do grupo propargílico (triplete a 3,06 ppm) e o respetivo sinal do átomo de carbono a 73,05 ppm (A) e da correlação entre os prótons do CH ₂ do grupo propargílico (multiplete a 3,84-3,87 ppm) e o respetivo sinal do átomo de carbono a 27,92 ppm (B).	49

- Figura 27:** Espectro de *HSQC*, em DMSO- d_6 , do péptido **8** na zona das correlações entre os prótons dos β -CH₂ dos aminoácidos que compõem o péptido (vermelho), os prótons dos grupos CH₃ do Pbf (azul) e os prótons dos grupos CH₃ do ^tBu (verde) e os respectivos sinais dos átomos de carbono (**A**) e da correlação entre os prótons do grupo CH₂ do Pbf e os respectivos sinais dos átomos de carbono (**B**). 50
- Figura 28:** Espectro de *HMBC*, em DMSO- d_6 , do péptido **8** na zona das correlações entre os prótons dos grupos CH₃ e do grupo CH₂ do Pbf e os respectivos carbonos quaternários (azul) e na zona da correlação entre os grupos CH₃ do ^tBu e o respectivo carbono quaternário (vermelho). 50
- Figura 29:** Espectro de *HMBC*, em DMSO- d_6 , do péptido **8** na zona aromática evidenciando as correlações entre os prótons do anel aromático do grupo Z e o respectivo carbono quaternário (azul) e entre os prótons do anel aromático da fenilalanina e o respectivo carbono quaternário (vermelho). 51
- Figura 30:** Espectro de *HMBC*, em DMSO- d_6 , do péptido **8** evidenciando as correlações entre os prótons do grupo δ -CH₂ da arginina e o átomo de carbono do grupo guanidino e entre os prótons do grupo ϵ -CH₂ da lisina e o átomo de carbono da C=O do grupo Z. 51
- Figura 31:** Espectro de *HMBC*, em DMSO- d_6 , do péptido **8** mostrando as correlações entre os prótons dos grupos α -CH dos aminoácidos e os respectivos sinais dos átomos de carbono carbonílicos (**A**) e entre os α -NH dos aminoácidos e os átomos de carbonos carbonílicos correspondentes (**B**). 52
- Figura 32:** Estrutura dos péptidos lineares com a sequência RGD **5** e **8**. 54
- Figura 33:** Estrutura dos péptidos cíclicos com a sequência RGD **9** e **10**. 56
- Figura 34:** Distribuição de tamanho por intensidade, obtida por *DLS*, das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro da amostra **4**. 64
- Figura 35:** Imagens de *SEM*, obtidas com o detetor *TLD* (*Through-Lens*) no modo SE, das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro da amostra **1** - 17,0 nm (**A**) e da amostra **2** - 16,0 nm (**B**). 66
- Figura 36:** Imagem de *SEM*, obtida com o detetor *TLD* (*Through-Lens*) no modo SE, das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro da amostra **4** - 13,0 nm. 66

- Figura 37:** Espectro de *EDS* das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro da amostra **4** com evidência dos sinais de ferro (Fe) e de oxigênio (O). O pico de carbono surge devido à utilização de fita de carbono na preparação da amostra para análise. 67
- Figura 38:** Espectro de UV-Vis da amostra **4** de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. 68
- Figura 39:** Evidência da magnetização das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ouro **Fe@Au 2**. Ausência de campo magnético externo (**A**) e presença de campo magnético externo (**B**). 70
- Figura 40:** Imagem de *SEM*, obtida com o detetor *TLD* (*Through-Lens*) no modo SE, das nanopartículas da amostra **Fe@Au 1** - 16,8 nm (**A**) e da amostra **Fe@Au 3** - 19,8 nm (**B**). 71
- Figura 41:** Imagem de *SEM* das nanopartículas da amostra **Fe@Au 2** - 16,0 nm - obtida com o detetor *TLD* (*Through-Lens*) no modo SE (**A**) e com o detetor *BSED* (*Backscattered Electron Detector*) no modo A+B (**B**). 72
- Figura 42:** Espectro de *EDS* das nanopartículas da amostra **Fe@Au 2** com evidência dos sinais de ferro (Fe) e de ouro (Au). O pico de carbono surge devido à utilização de fita de carbono na preparação da amostra para análise. 72
- Figura 43:** Espectros de UV-Vis das três amostras de nanopartículas **Fe@Au 1** (**A**), **Fe@Au 2** (**B**) e **Fe@Au 3** (**C**). $F_d = 1$ corresponde à amostra inicial; $F_d = 0,5$ corresponde à amostra inicial diluída para metade e $F_d = 0,25$ corresponde à amostra inicial diluída para um quarto. 74
- Figura 44:** Espectros de UV-Vis com os valores de absorvância normalizados das amostras de nanopartículas **Fe@Au 1**, **Fe@Au 2** e **Fe@Au 3**. 75
- Figura 45:** Espectros de UV-Vis das amostras de nanopartículas **Fe@Au 1**, **Fe@Au 2** e **Fe@Au 3** e da amostra das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro pré-revestimento **4** (**A**) e de amostras de nanopartículas de Fe_3O_4 e $Fe_3O_4@Au$ (**B** - Adaptado de ⁵²). 76
- Figura 46:** Distribuição de tamanho por intensidade, obtida por *DLS*, das nanopartículas de ouro da amostra **Au 1**. 78
- Figura 47:** Imagem de *SEM*, obtida com o detetor *TLD* (*Through-Lens*) no modo SE, das nanopartículas de ouro da amostra **Au 1** - 60,9 nm. 79

- Figura 48:** Espectro de *EDS* das nanopartículas de ouro da amostra **Au 1** com evidência do sinal de ouro (Au). O pico de carbono surge devido à utilização de fita de carbono na preparação das amostras para análise. 79
- Figura 49:** Imagem de *SEM*, obtida com o detetor *TLD (Through-Lens)* no modo SE, das nanopartículas de ouro da amostra **Au ss** - 12,2 nm. 80
- Figura 50:** Espectro de *EDS* das nanopartículas de ouro da amostra **Au ss** com evidência do sinal de ouro (Au). O pico de carbono surge devido à utilização de fita de carbono na preparação das amostras para análise. 81
- Figura 51:** Espectro de UV-Vis da amostra **Au ss**. 81
- Figura 52:** Imagens de *SEM*, obtidas com o detetor *TLD (Through-Lens)* no modo SE, das nanopartículas de ouro das amostras **Au 2.1** - 35,9 nm (**A**) e **Au 2.2** - 80,3 nm (**B**). 82
- Figura 53:** Espectros de *EDS* das nanopartículas de ouro das amostras **Au 2.1 (A)** e **Au 2.2 (B)** com evidência dos sinais de ouro (Au). O pico de carbono surge devido à utilizada de fita de carbono na preparação das amostras para análise. 83
- Figura 54:** Espectros de UV-Vis das amostras de nanopartículas de ouro **Au ss** e **Au 2.1 (A)** e os mesmos espectros com os valores de absorvância normalizados (**B**). 83

Lista de Tabelas

Tabela 1: Nanopartículas e as suas aplicações a nível biológico. Adaptado de ⁴ .	4
Tabela 2: Propriedades físicas e magnéticas dos óxidos de ferro. Adaptado de ¹⁶ .	6
Tabela 3: <i>Loading</i> da resina e rendimentos obtidos na síntese dos péptidos lineares 5, 6 e 7 .	41
Tabela 4: Valores de desvio químico, em DMSO-d ₆ , dos protões dos aminoácidos comuns aos péptidos lineares 5, 6, 7 e 8 .	53
Tabela 5: Valores de desvio químico em DMSO-d ₆ dos protões que constituem o grupo pentino comum aos péptidos lineares 5 e 8 .	55
Tabela 6: Valores de <i>HRMS</i> dos péptidos lineares 5, 6, 7 e 8 .	55
Tabela 7: Valores de desvio químico, em DMSO-d ₆ , dos sinais dos protões dos grupos propargílico e pentino antes da ciclização (péptido 8) e depois da ciclização (péptido 10).	59
Tabela 8: Valores de <i>HRMS</i> dos péptidos cíclicos 9 e 10 .	59
Tabela 9: Condições experimentais usadas na preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.	60
Tabela 10: Valores de tamanho (<i>r</i>) e respetivas percentagens, (<i>Z-average</i>) e índice de polidispersividade (<i>PdI</i>) das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.	63
Tabela 11: Valores de tamanho médio, obtidos por <i>SEM</i> , das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.	65
Tabela 12: Valores de tamanho médio, obtidos por <i>TEM</i> , de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro preparadas com uma razão molar de Fe(II)/Fe(III) de 0,5.	67
Tabela 13: Valores de tamanho médio, obtidos por <i>SEM</i> , das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro.	70
Tabela 14: Valores do comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) do máximo de absorção ($\text{Abs}_{\text{máx}}$) da banda <i>SPR</i> das amostras de nanopartículas Fe@Au 1, Fe@Au 2 e Fe@Au 3 , e tamanho das nanopartículas determinado por <i>SEM</i> .	74
Tabela 15: Condições experimentais usadas na preparação de nanopartículas de ouro.	77
Tabela 16: Valores de tamanho médio, obtidos por <i>SEM</i> , das nanopartículas de ouro das amostras Au ss, Au 2.1 e Au 2.2 .	82

Tabela 17: Valores do comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) do máximo de absorção ($\text{Abs}_{\text{máx}}$) da banda *SPR* de duas amostras de nanopartículas de ouro **Au ss** e **Au 2.1**, e tamanho das nanopartículas determinado por *SEM*. 84

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nanopartículas

As nanotecnologias podem ser definidas como a manipulação ou engenharia numa escala nano (10^{-9} m) e têm aplicações em diversas áreas, tais como a química, a física, as ciências de materiais e as ciências da saúde. As nanopartículas (NPs) são normalmente definidas como pequenos objetos cujo diâmetro varia entre 1 nm e 100 nm.¹

Atualmente as nanopartículas são alvo de intensa investigação na área biomédica.² A relação entre a área superficial e o volume das nanopartículas permite-lhes ligarem-se, adsorverem e transportarem outros compostos, tais como fármacos, ácido desoxirribonucleico (*DNA - Deoxyribonucleic Acid*), ácido ribonucleico (*RNA - Ribonucleic Acid*), proteínas, enzimas ou sondas. Por outro lado, a possibilidade de ajustar o seu tamanho, forma e características superficiais torna-as particularmente estáveis em grandes intervalos de temperatura e de pH, com elevada capacidade de transporte de substâncias hidrofílicas ou hidrofóbicas.³⁻⁶ Não obstante, todas as características físico-químicas das nanopartículas são determinadas pelo tamanho, forma e material das mesmas.³ Assim, existe uma variedade enorme de nanopartículas com diferentes tamanhos, formas e composições, tendo por isso distintas propriedades e funcionalidades (**Tabela 1**).^{4,7}

A interação das nanopartículas a nível biológico, bem como a classificação das mesmas é determinada pelos materiais que as constituem. Algumas nanopartículas são compostas por materiais de origem biológica, tais como fosfolípidos, lípidos, quitosano e dextrano. Outras nanopartículas são constituídas por outro tipo de materiais como carbono, sílica, metais ou óxidos e sulfetos metálicos.³

Algumas nanopartículas têm sido utilizadas como agentes de contraste em imagem de ressonância magnética (*MRI - Magnetic Resonance Imaging*) e como novos marcadores moleculares para efetuar deteções *in vitro*.^{3,7} A utilização de nanopartículas como veículos de transporte de fármacos e como agentes de diagnóstico tem vindo a aumentar nos últimos anos.^{3,4,7} As nanopartículas também têm sido usadas em terapia fotodinâmica (*PDT - Photodynamic Therapy*), no silenciamento de genes e em terapia fototérmica (*PTT - Photothermal Therapy*). Mais recentemente têm sido desenvolvidos esforços para criar nanopartículas que

1. Introdução

funcionem como agentes de diagnóstico e que por isso possibilitem simultaneamente o diagnóstico e a terapia.³

Tabela 1: Nanopartículas e as suas aplicações a nível biológico. Adaptado de ⁴.

Classe de Partículas	Material	Aplicações
Materiais naturais ou derivados	Quitosano	Entrega controlada de genes e de fármacos (<i>Gene/Drug delivery</i>)
	Dextrano	
	Alginatos	
	Lipossomas	
	Amido	
Dendrímeros	Polímeros ramificados	Entrega controlada de fármacos (<i>Drug delivery</i>)
Fulerenos	Transportadores baseados em carbono	Terapia Fotodinâmica (<i>PDT</i>)
		Entrega controlada de fármacos (<i>Drug delivery</i>)
Transportadores poliméricos	Ácido polilático	Entrega controlada de genes e de fármacos (<i>Gene/Drug delivery</i>)
	Poli(ciano) acrilatos	
	Poli(etilenimina)	
Ferrofluidos	<i>SPIONs</i> (NPs superparamagnéticas de óxido de ferro)	Imagem de ressonância magnética (<i>MRI</i>)
	<i>USPIONs</i> (NPs superparamagnéticas de óxido de ferro ultra-pequenas)	Entrega controlada de genes e de fármacos (<i>Gene/Drug delivery</i>)
Quantum dots	Selenetos de Cd/Zn	Imagem de ressonância magnética (<i>MRI</i>)
		Diagnóstico <i>in vitro</i>
Variadas	Sílica	Entrega controlada de genes (<i>Gene delivery</i>)

As aplicações biomédicas das nanopartículas referidas anteriormente requerem que estas sejam biocompatíveis, biodegradáveis, e sensíveis a variações de parâmetros físicos como pH, temperatura, magnetismo e carga elétrica.^{2,8} Adicionalmente é ainda necessária uma biodisponibilidade elevada e estabilidade em meios biológicos.²

1.2. Nanopartículas magnéticas

A utilização de nanopartículas magnéticas (MNPs) capazes de serem controladas remotamente com elevada precisão através da aplicação de campos magnéticos externos tem atraído o interesse de vários grupos de investigação para aplicações biomédicas, biológicas e industriais.⁹⁻¹²

As aplicações biomédicas e biotecnológicas de nanopartículas magnéticas requerem normalmente partículas muito pequenas com um núcleo metálico superparamagnético com um revestimento inorgânico ou polimérico que as torna biocompatíveis e estáveis.^{8,13} O superparamagnetismo surge devido à pequena coercitividade que decorre da pequena barreira energética que é necessária ultrapassar para a magnetização deste tipo de partículas.¹⁴ Como exemplo citamos as nanopartículas de magnetite que são superparamagnéticas a tamanhos inferiores a 25 nm.¹⁵

1.2.1. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

São conhecidos dezasseis óxidos de ferro (OF), dos quais os mais comuns são a magmrite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), a magnetite (Fe_3O_4) e a hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$).¹⁶ As principais propriedades destes três óxidos são resumidas na **Tabela 2**.

Os óxidos de metal são relativamente inertes e as propriedades magnéticas, das nanopartículas deste tipo, podem ser manipuladas pelo controlo do tamanho e da forma das mesmas durante a sua preparação.¹³

A magmrite em meio ácido ou básico é estável à temperatura ambiente durante anos, contrariamente a magnetite é sensível à presença de oxigénio sendo convertida em magmrite. Contudo, a exposição ao ar da magnetite não constitui a única via de transformação desta espécie de óxido de ferro em magmrite. Uma outra alternativa para a oxidação de magnetite em magmrite envolve a transferência de iões de ferro (Fe^{2+}) em condições ácidas e na ausência de oxigénio sendo um processo muito mais rápido do que a oxidação por contacto direto com o oxigénio à temperatura ambiente.^{5,17}

A estabilidade da magmite é mantida por interações eletrostáticas repulsivas entre os contra iões em solução e os iões hidroxilo (OH⁻) adsorvidos na superfície das nanopartículas durante a sua preparação.¹⁷

Tabela 2: Propriedades físicas e magnéticas dos óxidos de ferro. Adaptado de ¹⁶.

Propriedade	Óxido		
	Magmite	Magnetite	Hematite
Fórmula molecular	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Fe_3O_4	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Densidade (g/cm ³)	4,87	5,18	5,26
Ponto de fusão (°C)	*	1583-1587	1350
Dureza	5	5,5	6,5
Tipo de magnetismo	Ferrimagnético	Ferrimagnético	Ferromagnético fraco ou antiferromagnético
Cor			

* Não definido.

1.2.1.1. Aplicações

As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro podem ser classificadas de acordo com o seu diâmetro hidrodinâmico: nanopartículas supermagnéticas de óxido de ferro (*SPIONS - Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*) (50-180 nm), nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro ultra-pequenas (*ultrasmall*) (*USPIONS - Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*) (10-50 nm), e nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro muito pequenas (*very small*) (*VSPIONS - Very small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*) (< 10 nm).¹⁸

Os processos simples de preparação de nanopartículas de óxidos de ferro bem como o seu tamanho, a fácil funcionalização da superfície, a sua biocompatibilidade, a baixa citotoxicidade e o controlo da sua magnetização fazem com que estas nanopartículas sejam particularmente interessantes para aplicações biomédicas e biológicas.^{6,7,19}

A estabilidade, a bio-distribuição e o metabolismo das nanopartículas magnéticas estão relacionados com a química da superfície, o tamanho (volume hidrodinâmico e distribuição de tamanho), o núcleo magnético, a carga e as propriedades magnéticas das mesmas.²⁰ A química de superfície é um fator muito importante na preparação de nanopartículas magnéticas para aplicação *in vivo*, uma vez que pode evitar a sua captação pelas células fagocíticas mononucleares do sistema retículo-endotelial (*RES - Reticuloendothelial System*), e assim aumentar a sua biodisponibilidade. O revestimento destas nanopartículas com compostos hidrofílicos, neutros e biocompatíveis, como é o caso do poli(etilenoglicol) (PEG), de polissacarídeos (quitosano, dextrano) e disopsoninas (*HSA - Human Serum Albumin*) é uma das estratégias usadas para aumentar o tempo de circulação deste tipo de partículas no organismo.^{2,3,8} Alternativamente, e de forma a evitar a ação do *RES*, o tamanho da nanopartícula pode ser reduzido, no entanto a deteção pelo *RES* não é totalmente impossível e continua a existir a possibilidade das nanopartículas atingirem células, tecidos ou órgãos saudáveis.⁸

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com uma química de superfície apropriada podem ser usadas para numerosas aplicações *in vivo*, tais como agentes de contraste para *MRI*, reparação de tecidos, imunoenaios, desintoxicação de fluídos biológicos, hipertermia, *drug delivery* e separação de células (**Figura 1**).^{8,9,21–25}

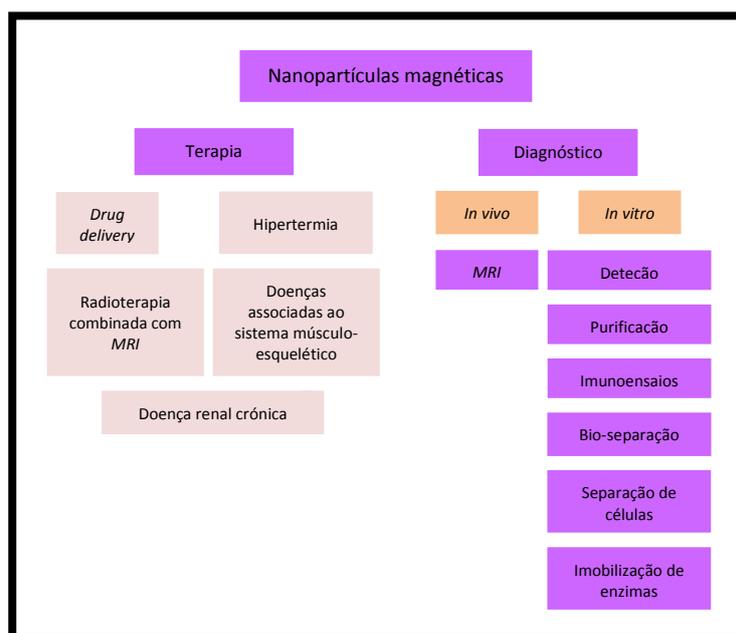


Figura 1: Aplicações das nanopartículas magnéticas (MNPs). Adaptado de ⁸.

Todas estas aplicações biomédicas requerem materiais com diferentes propriedades magnéticas, térmicas, químicas e morfológicas.²⁶ No entanto, em geral as nanopartículas deverão possuir elevados valores de magnetização, tamanhos inferiores a 100 nm e uma distribuição de tamanhos estreita para que as nanopartículas apresentem propriedades físicas e químicas uniformes. Adicionalmente é ainda necessário, como referido anteriormente, uma superfície de revestimento que deverá ser não tóxica e biocompatível (polímeros orgânicos, metais inorgânicos ou óxidos) para aumentar a estabilidade deste tipo de nanopartículas e permitir a funcionalização das mesmas com várias moléculas bioativas capazes de direcionarem a partícula para um determinado alvo.^{7,24,27} Estas nanopartículas magnéticas podem ligar-se a fármacos, proteínas, enzimas, anticorpos e nucleótidos e utilizando um campo magnético externo podem ser dirigidas especificamente para um órgão, um tecido ou um tumor.^{5,6}

Partículas inorgânicas magnéticas podem por vezes ter associados problemas de biodegradabilidade e de dissolução. As nanopartículas de óxido de ferro após o desempenho das funções a que são destinadas, são degradadas e originam ferro e moléculas de óxido de ferro que poderão ser metabolizados e armazenados nas células sob a forma de ferritina que poderá incorporar a hemoglobina.^{7,20}

Algumas nanopartículas de óxido de ferro revestidas com polímeros biocompatíveis foram já aprovados pela *Food and Drug Administration (FDA)* para uso clínico.^{8,20}

- **Entrega controlada de fármacos (*Drug delivery*)**

O cancro é atualmente uma das principais causas de morte. Estudos revelaram que em 2007 o cancro foi a causa de morte de 13% da população mundial e estima-se que em 2030 morram 12 milhões de pessoas com cancro.²⁸ Existe assim uma necessidade crescente de desenvolvimento de novas terapias anticancerígenas.

A quimioterapia combinada com a cirurgia e a radioterapia é atualmente a opção de tratamento mais comum em vários tipos de cancro.³ Com o conhecimento adquirido ao nível da bioquímica e fisiologia das células tumorais, ao longo dos anos, é possível começar a desenhar terapias com menores efeitos secundários para o paciente. A entrega controlada de fármacos é uma das estratégias utilizadas com este

objetivo. Esta abordagem permite a libertação seletiva do agente terapêutico nas células tumorais levando a um aumento da concentração do mesmo no alvo e à minimização do dano provocado nas células saudáveis.³ Deste modo, é possível diminuir a quantidade de fármaco administrada, e aumentar o intervalo de tempo entre cada administração. A conjugação destes fatores conduz a um aumento da eficácia terapêutica dos fármacos. Nanopartículas magnéticas conjugadas com diversos agentes terapêuticos têm sido utilizadas em *drug delivery*.^{3,4,7}

A formulação da nanopartícula constitui um fator importante na distribuição dos agentes terapêuticos e na interação do complexo nanopartícula-fármaco com as células tumorais (**Figura 2**). Assim sendo, existe uma variedade de materiais que poderão constituir as nanopartículas aplicadas em *drug delivery*, tais como materiais baseados em carbono e materiais de origem biológica ou inorgânica.³

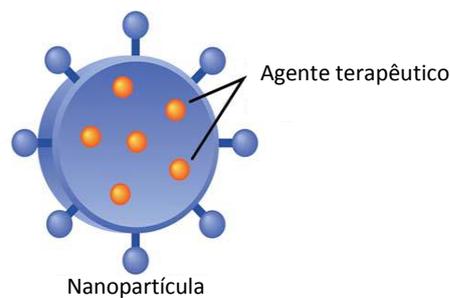


Figura 2: Constituição de uma nanopartícula utilizada em *drug delivery*. A nanopartícula deverá conter uma molécula vetorizante e o agente terapêutico. Adaptado de ³.

As nanopartículas inorgânicas incluem nanopartículas preparadas a partir de metais, óxidos de metais e sulfuretos de metais. Estas podem ser produzidas com uma variedade de formas e tamanhos com grande reprodutibilidade, sendo facilmente conjugadas com os ligandos adequados que permitem dirigir o complexo nanopartícula-fármaco para o alvo. Este tipo de nanopartículas é relativamente estável sob grandes variações de pH e de temperatura, contudo alguns tipos de nanopartículas inorgânicas apresentam desvantagens, tais como o facto de não serem biodegradáveis e de terem uma taxa de dissolução lenta.³ Estes dois fatores devem ser tomados em consideração quando se trata de utilizações em organismos vivos pois a sua degradação e eliminação do organismo fica comprometida. De forma a ultrapassar o problema associado a este tipo de nanopartículas é possível controlar a preparação

das mesmas para que seja possível dissociar a nanopartícula nos seus componentes que não são nocivos para o organismo, após a entrega do fármaco.^{3,7} Neste sentido, as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPs OF) são nanopartículas inorgânicas não tóxicas que suscitam um interesse crescente à comunidade científica.²⁹

A libertação do fármaco na célula tumoral pode ser feita simplesmente por difusão simples ou através de mecanismos que requerem atividade enzimática ou mudanças das condições fisiológicas, tais como pH, osmolaridade ou temperatura. Em determinadas situações é ainda possível que o agente terapêutico seja libertado por ativação magnética.⁸ Após a libertação do fármaco na célula tumoral, a nanopartícula transportadora deverá ser eliminada e degradada de forma segura.³

Freeman *et al.*³⁰ propuseram em 1960 que nanopartículas magnéticas podem ser transportadas através do sistema vascular até um local específico por aplicação de um campo magnético.

Em 1978 Senyei *et al.*³¹ descreveram a utilização de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro para a entrega controlada de fármacos em quimioterapia. A ideia consiste em conjugar biomoléculas sobre a superfície modificada de nanopartículas magnéticas, e depois por aplicação de um campo magnético externo dirigir o sistema nanopartícula-fármaco para o alvo específico dentro do organismo. A primeira aplicação *in vivo* deste tipo de nanopartículas, por aplicação de um campo magnético externo foi descrita por Widder *et al.*³² para administrar fármacos citotóxicos para o tratamento de sarcomas em ratos. Os resultados obtidos foram bastante bons tendo ocorrido a remissão total do tumor.

Existe atualmente um grande número de grupos de trabalho envolvidos no desenvolvimento de novos sistemas de nanopartículas para a entrega controlada de agentes de quimioterapia, proteínas, péptidos, DNA e siRNA (*small interfering RNA*).³³⁻³⁵

- **Imagem de ressonância magnética (MRI)**

A imagem de ressonância magnética (MRI - *Magnetic Resonance Imaging*) é uma técnica de imagiologia médica tridimensional (3D) não invasiva muito utilizada na medicina clínica para diagnóstico.³⁶ As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro modificam os tempos de relaxação dos prótons da água T1 e T2/T2*, o que

melhora o contraste de *MRI*.^{3,20} Assim, este tipo de nanopartículas é muitas vezes utilizado como agente de contraste. A primeira referência à utilização de nanopartículas superparamagnéticas como agentes de contraste remonta a 1992 onde células transplantadas foram marcadas com agentes de contraste constituídos por nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro.²⁵ Atualmente, existem em prática clínica duas nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro usadas como agentes de contraste em *MRI* do fígado, ferumóxidos (Feridex/Endorem: 120 - 180 nm) e ferucarbotran (Resovist: 60 nm).^{7,20,37}

▪ **Hipertermia**

A hipertermia refere-se a temperaturas entre os 40 °C e os 45 °C. Temperaturas acima dos 42 °C tornam as células cancerígenas suscetíveis a morte por apoptose, enquanto temperaturas acima dos 45 °C causam diretamente a morte celular.^{3,24}

O tratamento hipertérmico de tumores envolve o aquecimento dos mesmos usando radiofrequências (RF), micro-ondas, campos magnéticos ou ultrassons que causam danos celulares irreversíveis por perda de membranas e desnaturação de proteínas e que resultam na morte celular. Este efeito é mais seletivo para os tumores devido à sua reduzida tolerância ao calor, no entanto também tecidos saudáveis são afetados, pelo que esta terapia tem um uso limitado. Assim, e de forma a ultrapassar estes problemas têm vindo a ser utilizados agentes fototérmicos que permitem o aquecimento seletivo do tumor e a diminuição dos efeitos secundários provocados em tecidos saudáveis (**Figura 3**). Este tipo de agentes deverá ser capaz de absorver de forma eficaz a radiação.³

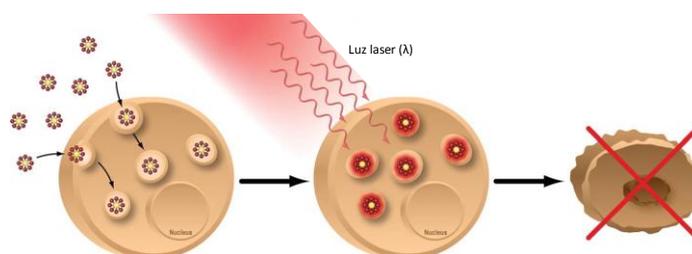


Figura 3: Representação esquemática do uso de nanopartículas em terapia fototérmica (PTT). Adaptado de ³.

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro em água têm sido utilizadas para injeção direta no tumor. Na presença de um campo magnético externo oscilante estas

nanopartículas geram calor o que deverá promover a destruição das células tumorais.³⁸ No entanto, a quantidade de calor gerado depende da natureza do material magnético, da força do campo magnético aplicado, da frequência da oscilação e da capacidade que o fluxo de sangue no tumor tem para diminuir a temperatura, contrariando o efeito provocado pela terapia.²⁴

Uma série de estudos em modelos de cancro da próstata e da mama e em gliomas malignos têm vindo a ser desenvolvidos e bons resultados têm sido obtidos.³⁹⁻⁴¹

1.2.1.2. Métodos de preparação

O interesse crescente na pesquisa de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro devido às variadas aplicações em processos biológicos, biomédicos e biotecnológicos torna necessário o controlo dos processos de preparação deste tipo de nanopartículas. Este controlo advém da necessidade de obter materiais monodispersos em relação ao tamanho, com uma forma controlada e altamente estáveis.⁴² A morfologia, o tamanho, a forma, e a superfície química das nanopartículas de óxido de ferro dependem do método de preparação escolhido. Assim, têm vindo a ser desenvolvidos uma série de processos de preparação de nanopartículas de modo a controlar os parâmetros referidos. Destacam-se os métodos de co-precipitação, decomposição e/ou redução térmica, preparação hidrotérmica, técnicas de pirólise a laser, métodos sol-gel, reações sonoquímicas, microemulsões e métodos eletroquímicos.^{5,42}

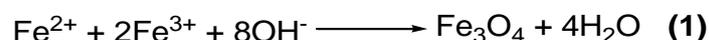
A preparação de nanopartículas magnéticas é um processo complexo devido à natureza coloidal das mesmas. Assim, dois desafios têm que ser ultrapassados. O primeiro prende-se com o facto de se tentar produzir nanopartículas monodispersas de tamanho adequado. O segundo ponto crítico é a necessidade de desenvolvimento de um processo que seja reprodutível e que possa ser industrializado sem nenhum procedimento de purificação complexo.⁵

Neste trabalho foi utilizado o método de co-precipitação para a preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.

▪ Co-precipitação

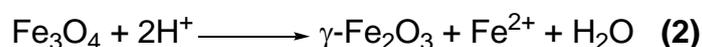
A co-precipitação é provavelmente o método de preparação de nanopartículas de óxido de ferro mais simples e eficaz. As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro podem ser preparadas por co-precipitação de sais de ferro (II) e de ferro (III) em meio alcalino (hidróxido de sódio ou amónia).^{17,26,29,43,44} Contudo, os sais de ferro utilizados (cloretos, sulfatos, nitratos, percloratos), a proporção dos iões ferroso (Fe^{2+}) e férrico (Fe^{3+}), o pH e a força iónica do meio afetam o tamanho, a forma e a composição destas nanopartículas magnéticas.⁴⁵

A reação química de preparação da magnetite pode ser descrita de acordo com a eq. 1.⁵



A precipitação completa deverá acontecer a um pH entre 8 e 14, com uma razão estequiométrica de 2:1 entre os iões Fe^{3+} e Fe^{2+} (razão molar Fe(II)/Fe(III) de 0,5) e na ausência de oxigénio.⁵

Como referido a magnetite é sensível à oxidação, e por isso na presença de oxigénio é transformada em magmrite de acordo com a eq. 2.⁵



A grande vantagem do processo de co-precipitação é o facto de poderem ser preparadas nanopartículas em grande quantidade. Contudo, existe a desvantagem de não ser possível controlar de forma eficaz a distribuição de tamanhos. Isto acontece porque as nanopartículas apresentam uma elevada razão entre a sua área superficial e o seu volume o que faz com que as mesmas tendam a agregar para reduzir a sua energia superficial.¹⁶

Durante a preparação de nanopartículas magnéticas, a adição de aniões orgânicos quelantes (carboxilatos ou α -hidroxicarboxilatos, tais como o ácido cítrico, o ácido oleico e o ácido glucónico) ou de complexos de superfície poliméricos (dextrano, carboxidextrano, amido ou álcool polivinílico) poderão ajudar a controlar o tamanho das nanopartículas e a impedir a agregação das mesmas.⁵

De forma a manter a razão molar Fe(II)/Fe(III) de 0,5 o processo de preparação deve ser realizado em ambiente ausente de oxigénio, devendo por isso utilizar-se um

gás inerte (nitrogênio, argônio, entre outros). Adicionalmente, esta condição de preparação permite ainda reduzir o tamanho das nanopartículas quando comparado com o tamanho de nanopartículas obtidas na presença de oxigênio.^{24,46}

A primeira preparação de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro usando um meio alcalino e cloreto de ferro (III) (FeCl_3) e cloreto de ferro (II) (FeCl_2) foi descrita por Massart⁴⁷ e permitiu obter nanopartículas majoritariamente esféricas e com um diâmetro médio de 8 nm.

Denizot *et al.*²² estudaram a importância da razão molar Fe(II)/Fe(III) e demonstraram que o tamanho médio das nanopartículas aumenta com o aumento da razão molar Fe(II)/Fe(III) , no entanto o rendimento da preparação diminui.

O tamanho médio das nanopartículas é fortemente dependente da acidez e da força iônica do meio de precipitação. A elevados valores de pH e de força iônica, as nanopartículas obtidas são mais pequenas e a distribuição de tamanhos é mais uniforme.⁵

Vários autores reportaram a preparação de nanopartículas de óxido de ferro recorrendo ao método de co-precipitação e obtendo nanopartículas com diâmetros variados. Williams *et al.*¹⁷, Gupta e Curtis²¹, Sim *et al.*²⁶, Pundir e Chauhan²⁹, Chung *et al.*⁴⁸ e Kang *et al.*⁴⁹ utilizaram o método de co-precipitação de cloretos de Fe(II)/Fe(III) em meio alcalino com uma razão molar Fe(II)/Fe(III) de 0,5. As nanopartículas preparadas foram caracterizadas por microscopia de transmissão eletrônica (*TEM*) e apresentaram tamanhos que variaram entre os 5 nm e os 20 nm.

1.3. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro (NPs OF@Au - NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ ou NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@Au}$) (**Figura 4**) podem ter várias aplicações nas áreas da biomedicina e da química analítica. O núcleo magnético que permite que as mesmas sejam controladas remotamente, aliado ao seu revestimento com uma fina camada de ouro são as chaves fundamentais para as suas possíveis aplicações. A superfície de ouro não tóxica melhora a estabilidade das nanopartículas em solução e permite uma fácil funcionalização deste tipo de nanopartículas.^{29,50}

Vários autores têm descrito a preparação de NPs OF@Au para várias aplicações, desde a formação de elétrodos para a determinação da acetilcolina²⁹, a imobilização de proteínas^{48,51}, separações biológicas²⁶ e em *drug delivery*⁵².

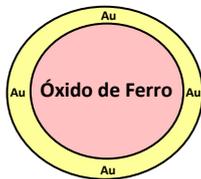


Figura 4: Nanopartícula com um núcleo de óxido de ferro (rosa) revestido com uma camada de ouro (amarelo) - NPs Fe_3O_4 @Au ou NPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @Au.

A preparação do núcleo magnético já foi discutida. O revestimento de ouro pode ser feito por vários métodos. De acordo com Natan *et al.*⁵³ usando citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) ou hidroxilamina (NH_2OH) é possível reduzir sais de ouro em solução e formar nanopartículas homogêneas pelo método de *seeding growth* (crescimento de partículas de pequenas dimensões).

Sim *et al.*²⁶ utilizaram unicamente citrato de sódio como agente redutor para obter NPs Fe_3O_4 @Au com tamanhos que variaram entre 15 nm e 40 nm.

A utilização de cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH.HCl}$) como agente redutor foi descrita por Williams *et al.*¹⁷, numa adaptação do método de Natan *et al.*⁵³, e os resultados mostraram que foram obtidas tanto NPs Fe_3O_4 @Au de aproximadamente 60 nm, bem como nanopartículas de ouro. Também Chung *et al.*⁴⁸ prepararam NPs OF@Au recorrendo ao cloridrato de hidroxilamina como agente redutor e obtiveram nanopartículas com uma média de tamanhos de 70 nm.

O boro-hidreto de sódio (NaBH_4) pode ser utilizado como agente redutor dos iões Au^{3+} para formar NPs OF@Au, no entanto nessas condições é necessário utilizar citrato de sódio como agente de estabilização.²⁶

A caracterização das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ouro pode ser efetuada através de várias técnicas, tais como espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis) ou técnicas de microscopia eletrônica entre outras.

1.4. Nanopartículas de ouro

Nanopartículas de ouro (NPs Au) são as nanopartículas metálicas mais estáveis e apresentam características que as tornam particularmente úteis para aplicações biológicas e químicas.⁵⁴

As NPs Au têm atualmente uma importância relevante na área da medicina devido à sua biocompatibilidade, não toxicidade e preparação simples que permite o controlo do tamanho, da composição e da forma das nanopartículas, assim como uma fácil modificação da química da superfície (ligação a grupos tiol e amina). Aliado a estes fatores, as propriedades físico-químicas deste tipo de nanopartículas permitem uma rápida e fácil caracterização das mesmas.⁵⁵⁻⁵⁷

A ressonância plasmónica superficial (*SPR - Surface Plasmon Resonance*) das nanopartículas de ouro resultante da oscilação coletiva dos eletrões livres conduz a uma banda de absorção larga na região do visível do espectro eletromagnético por volta dos 520 nm. Esta banda torna-se mais estreita e apresenta desvios ipsocrómicos (menor comprimento de onda) à medida que o diâmetro do núcleo da nanopartícula diminui (**Figura 5**).^{17,52,58} Nanopartículas de tamanho inferior a 2 nm não possuem banda *SPR*.⁵⁹ Contrariamente, partículas com tamanho superior a 100 nm possuem bandas largas *SPR* por volta dos 600 nm devido à presença de ressonâncias plasmónicas superficiais longitudinais e transversais.⁵⁸

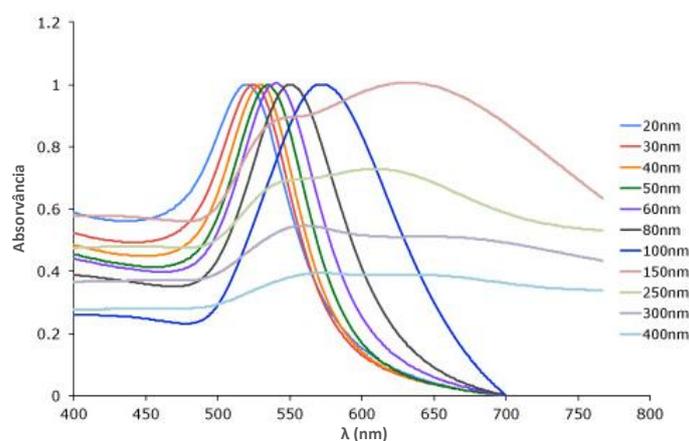


Figura 5: Espectros de absorção de nanopartículas de ouro com diferentes tamanhos. Influência do tamanho das nanopartículas nos espectros de absorção respetivos. Adaptado de ⁵⁸.

Adicionalmente, o máximo de absorção e a largura da banda são ainda influenciados pela forma e tamanho da nanopartícula e pela constante dielétrica, temperatura e índice de refração do solvente.^{54,56} No entanto, a influência da forma é maior do que a influência do tamanho da partícula nas propriedades óticas.⁶⁰ Assim, nanopartículas de forma esférica possuem o seu máximo de absorção entre os 515 nm e os 570 nm (**A**), enquanto nanopartículas com outras formas apresentam o seu máximo a comprimentos de onda superiores (desvio batocrômico - **B**) (**Figura 6**). Esta variação decorre de uma distribuição irregular dos elétrons da camada de superfície.⁵⁸

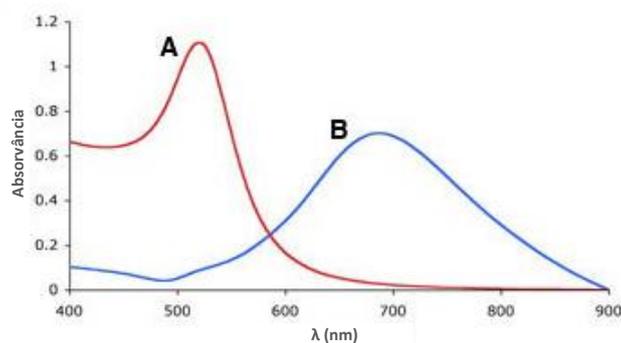


Figura 6: Espectros de absorção de nanopartículas de ouro com diferentes formas. Efeito da forma da nanopartícula de ouro no espectro de absorção da mesma. Nanopartículas de ouro de forma esférica (**A**) e nanopartículas de ouro com formas variadas (**B**). Adaptado de ⁵⁸.

A agregação de NPs Au tem também efeito na banda *SPR* observada (**Figura 7**). Nas amostras que possuem nanopartículas agregadas (**B**) observa-se um desvio batocrômico da banda *SPR*, contrariamente, nanopartículas monodispersas apresentam uma banda *SPR* típica entre os 515 nm e os 570 nm (**A**).⁵⁸ No caso de nanopartículas agregadas é ainda possível observar a existência de um pico secundário a menores comprimentos de onda e uma diminuição da intensidade da banda de absorção devido à redução do número de nanopartículas estáveis.⁶¹

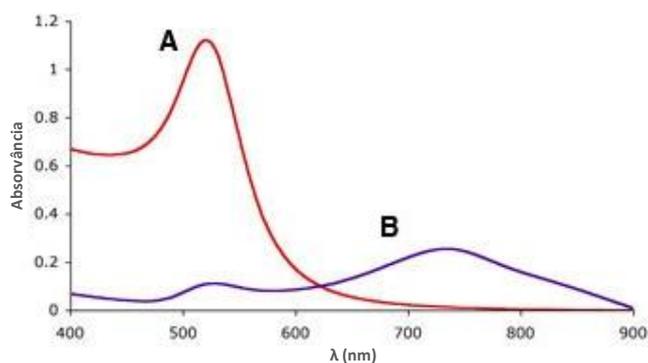


Figura 7: Espectros de absorção de nanopartículas de ouro de 15 nm monodispersas (A) e agregadas (B).

Adaptado de ⁵⁸.

1.4.1. Aplicações

Tal como as nanopartículas de óxido de ferro, as nanopartículas de ouro têm sido utilizadas para melhorar a eficácia do tratamento do cancro nomeadamente como biomarcadores, para a entrega controlada de fármacos (*drug delivery*), na hipertermia e como agentes de contraste.^{57,62} Encontram-se também descritas várias aplicações analíticas para este tipo de nanopartículas (biossensores, imunossensores e eletrocatalisadores).⁶³

1.4.2. Métodos de preparação

Uma variedade de métodos de preparação pode ser utilizado para preparar nanopartículas de ouro com diferentes formas.⁵⁴ No entanto, alguns problemas são colocados quando o objetivo é obter partículas de maiores dimensões.⁶⁰

Vários métodos físicos, químicos e biológicos podem ser utilizados para a preparação de nanopartículas de ouro.

A preparação de nanopartículas de ouro com vários tamanhos envolve a redução de um sal metálico e pode ser realizada em solução aquosa ou na presença de solventes orgânicos. Habitualmente é necessário um agente redutor e um agente de estabilização (surfactante) que evita a repulsão entre as nanopartículas e permite controlar o tamanho e a forma. Normalmente, nas preparações em solução aquosa o agente redutor funciona como agente estabilizante. Contrariamente, na presença de solventes orgânicos, o agente redutor é diferente do agente de estabilização.⁶²

Na **Figura 8** apresenta-se um esquema de uma nanopartícula de ouro vetorizada/funcionalizada.

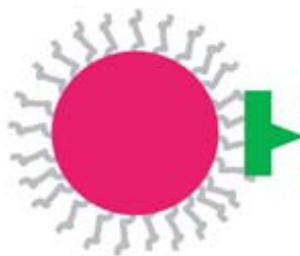


Figura 8: Representação esquemática de uma nanopartícula de ouro. Núcleo metálico (rosa), agente estabilizante (cinzento), ligando (verde).⁶²

O método convencional para a preparação de NPs Au por redução de sais de ouro (III) consiste na utilização de citrato de sódio (reductor fraco) e de uma solução aquosa de ácido cloroáurico (HAuCl_4) a temperaturas elevadas. Esta técnica foi introduzida em 1951 por Turkevitch e permitiu a síntese de NPs Au com cerca de 20 nm.⁶⁴ Este método permite a preparação de nanopartículas de ouro entre os 12 nm e os 100 nm, no entanto só é possível obter nanopartículas esféricas e monodispersas se estas tiverem tamanhos até 50 nm.⁶⁵ Em 1973 foi proposta uma variação deste método baseada no uso de diferentes razões entre os sais de ouro e o citrato de sódio que permitiu obter nanopartículas de ouro com tamanhos entre os 16 nm e os 147 nm.⁶⁶ Esta adaptação ficou conhecida como método de Frens. Utilizando este método vários autores descreveram a preparação de nanopartículas de ouro com vários tamanhos: 13 nm⁶⁷, 30-60 nm⁶⁸ e 35 nm⁵⁶.

Long *et al.*⁶⁸ demonstraram que a quantidade de citrato de sódio utilizado determina o tamanho das nanopartículas preparadas, e que por isso maiores quantidades de citrato de sódio resultam em nanopartículas mais pequenas. Este estudo revelou ainda que quanto mais rápido o citrato de sódio for adicionado mais pequenas são as nanopartículas formadas.

Para além do citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) podem ser usados outros agentes redutores, tais como o boro-hidreto de sódio (NaBH_4), o fósforo branco ou o ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$). Os dois primeiros permitem a preparação de nanopartículas de ouro com diâmetros inferiores a 10 nm. Enquanto o ácido ascórbico permite obter nanopartículas com tamanhos maiores do que 10 nm.⁵³

O método de Brust foi descrito em 1994 e consistiu na utilização de boro-hidreto de sódio como agente redutor (forte) e de um alcanotiol como agente de revestimento. Esta técnica permitiu a formação de nanopartículas com tamanhos que variaram entre 1 nm e 5 nm.⁶⁹

Os métodos de Frens e Brust são de preparação direta, e têm como desvantagem a difícil obtenção de nanopartículas de ouro de grandes dimensões com uma distribuição de tamanhos estreita.⁷⁰

O método de *seeding growth* permite controlar o tamanho e a morfologia das nanopartículas. Neste tipo de preparação são utilizados ácido ascórbico ou hidroxilamina (NH_2OH) como agentes redutores^{71,72} e brometo de *N*-cetil-*N,N,N*-tri-metilamónio-hexadecil (*CTAB*) como agente de estabilização^{72,73}. Um dos processos mais amplamente utilizados, seguindo o método de *seeding growth*, para preparar nanopartículas de ouro foi desenvolvido por Natan *et al.*⁵³ e utiliza hidroxilamina como agente redutor. Zhu *et al.*⁷⁰ propuseram o uso do ácido 2-mercaptosuccínico (*MSA* - *2-Mercaptosuccinic Acid*) como agente redutor e de revestimento.

Murphy *et al.*⁷³ descreveram a preparação de nanopartículas de ouro de tamanhos entre os 5 nm e os 40 nm utilizando o método de *seeding growth* e usando *CTAB* como agente de estabilização e NaBH_4 como redutor. Zhu *et al.*⁷⁰ obtiveram nanopartículas de ouro quase esféricas com tamanhos entre os 30 nm e os 150 nm recorrendo apenas a uma etapa de crescimento, e a partir de *seeds* de 15 nm preparados pelo método de Frens. Como agente redutor para o crescimento das nanopartículas foi utilizado *MSA*.

Vários autores^{60,65,70} têm descrito a síntese de nanopartículas de ouro através da utilização de uma *seeding solution* e de várias etapas de crescimento para produzir nanopartículas até 300 nm. Eychmüller *et al.*⁶⁰ aplicaram o método de *seeding growth* para a preparação de nanopartículas esféricas entre os 15 nm e os 300 nm usando citrato de sódio como agente de estabilização e ácido ascórbico como redutor. Esta estratégia permitiu a formação de nanopartículas com uma gama de tamanho variável e uma boa distribuição de tamanhos.

1.5. Técnicas de caracterização de nanopartículas

A determinação da microestrutura dos materiais sempre dependeu da disponibilidade e do aperfeiçoamento das técnicas experimentais. O conhecimento detalhado da microestrutura dos materiais permite o entendimento e, em muitos casos, permite também a previsão do comportamento e das propriedades dos mesmos. A caracterização das nanopartículas é fundamental para a determinação da sua estrutura cristalina, composição química, quantidade, forma, tamanho, magnetização e textura.

Existe uma variedade de técnicas que podem ser utilizadas na caracterização das nanopartículas: microscopia eletrônica de transmissão (*TEM - Transmission Electron Microscopy*), microscopia eletrônica de varrimento (*SEM - Scanning Electron Microscopy*), espectroscopia de energia dispersiva (*EDS - Energy Dispersive Spectroscopy*), difração de raios-X (*XRD - X-Ray Diffraction*), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), espectroscopia de absorção atômica (*AAS - Atomic Absorption Spectroscopy*), dispersão dinâmica de luz (*DLS - Dynamic Light Scattering*), Potencial Zeta (ζ) e espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis). Neste trabalho apenas quatro técnicas foram utilizadas e por isso somente essas serão descritas.

1.5.1. Microscopia eletrônica

A necessidade do conhecimento da microestrutura dos materiais tem levado a um contínuo desenvolvimento das técnicas experimentais, particularmente da microscopia. No estudo dos materiais são utilizados quatro tipos de microscopia: microscopia ótica, microscopia eletrônica de varrimento (*SEM*), microscopia eletrônica de transmissão (*TEM*) e microscopia de força atômica (*AFM - Atomic Force Microscopy*). Todas estas técnicas de microscopia são complementares e cada uma possui o seu campo de aplicação específico.

1.5.1.1. Microscopia eletrónica de varrimento (*SEM*)

A microscopia eletrónica de varrimento permite obter informação acerca da quantidade, topografia (textura da superfície), morfologia (tamanho e forma) e cristalografia da superfície da amostra a analisar.

Esta técnica utiliza um fino feixe de eletrões de alta energia, focado e monocromático, que é acelerado através de um campo elétrico positivo antes de incidir na amostra a analisar.⁷⁴ A interação dos eletrões com a amostra poderá resultar em eletrões secundários, retrodifundidos ou eletrões de Auger, assim como em raios-X característicos e fotões (**Figura 9**). Nesta técnica os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os eletrões secundários e os retrodifundidos. À medida que o feixe de eletrões primário vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os eletrões secundários fornecem a imagem da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retrodifundidos fornecem a imagem característica relacionada com a composição da amostra.

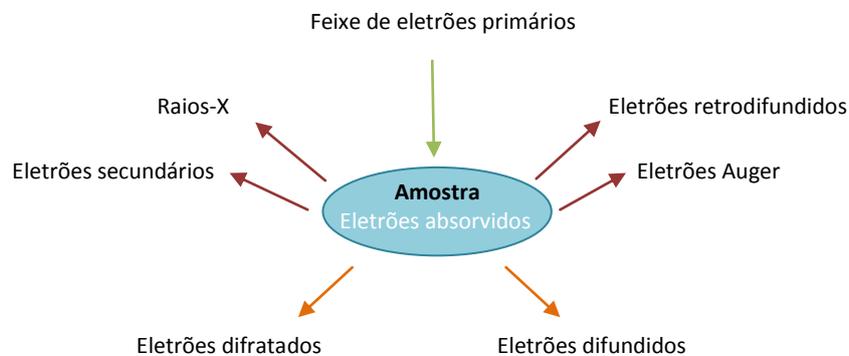


Figura 9: Representação esquemática dos tipos de radiação emitidos pela amostra quando submetida a um feixe de eletrões.

Em *SEM* é possível adaptar uma câmara de raios-X que permite a realização da análise química da amostra, numa técnica denominada espectroscopia de energia dispersiva. A maioria dos aparelhos atuais de *SEM* possui incorporado um sistema de microanálise por raios-X acoplado a um sistema de detecção e análise de padrões de difração de eletrões retrodifundidos (*EBSD - Electron Backscatter Diffraction*), que permite a determinação da composição química das partículas.

Um microscópio eletrônico de varrimento é constituído por uma coluna ótico-eletrónica, que é uma fonte monocromática de eletrões de elevada energia condensados por um sistema de lentes. Na constituição do aparelho estão ainda presentes condensadores e objetivas que permitem focar o feixe na amostra, e sistemas de vácuo e arrefecimento (**Figura 10**).⁷⁴ Além disso, este equipamento tem ainda associado um sistema de detetores e um sistema de visualização de imagens. A imagem obtida depende do número atómico dos elementos que constituem a amostra. Elementos mais pesados apresentam-se mais brilhantes do que os de menor número atómico.⁷⁴

As amostras a analisar por *SEM* devem ser secas e não conter solventes ou outros resíduos que possam ser evaporados no vácuo da câmara de amostra. O conteúdo a analisar deverá ainda possuir uma boa condutividade elétrica superficial.

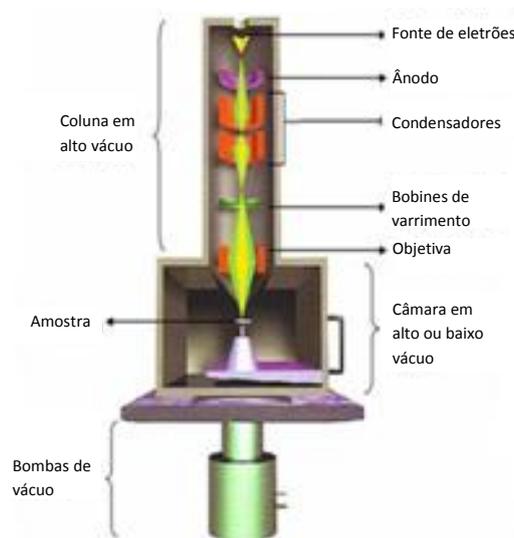


Figura 10: Representação esquemática dos componentes do microscópio eletrônico de varrimento.

1.5.2. Dispersão dinâmica de luz (DLS)

A dispersão dinâmica de luz é por vezes designada por espectroscopia de correlação de fótons (*PCS - Photon Correlation Spectroscopy*). Esta técnica permite, utilizando um aparelho Zetasiser Nano (**Figura 11**), a medição do tamanho de partículas, de acordo com o movimento Browniano das mesmas.⁷⁵

1. Introdução

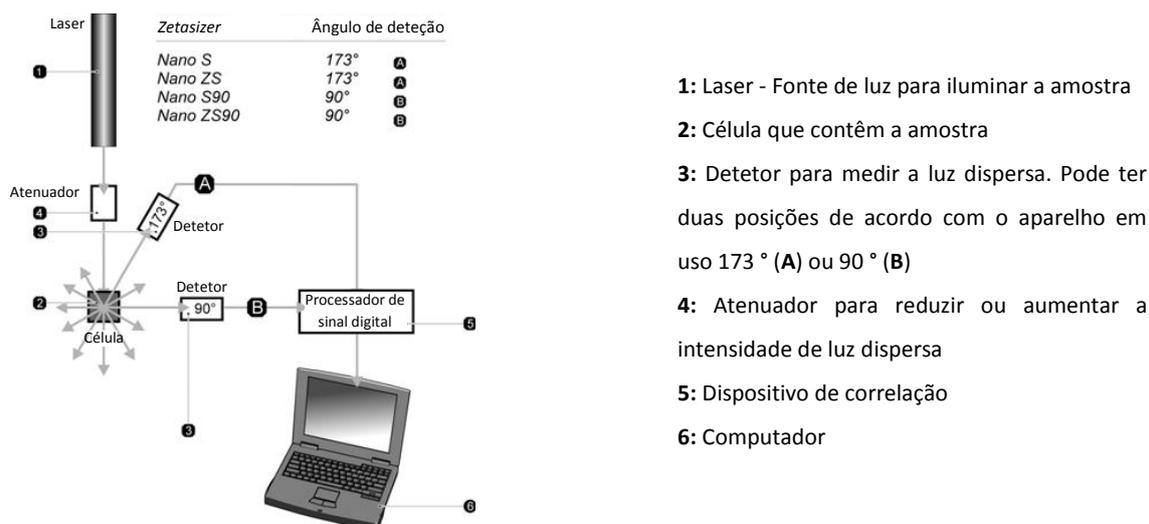


Figura 11: Representação esquemática de um aparelho *Nano Zetasizer* para efetuar medições de *DLS*. Adaptado de ⁷⁵.

O movimento Browniano é o movimento aleatório das partículas devido ao bombardeamento das mesmas pelas moléculas do solvente que as rodeiam. Quanto maior for a partícula, mais lento será o movimento Browniano. Contrariamente, partículas mais pequenas movimentar-se-ão mais rapidamente. Assim, a partir de dois retratos da amostra retirados com um pequeno intervalo de tempo, é possível perceber se houve uma grande deslocação das partículas (partículas pequenas - pequena correlação) ou uma pequena deslocação das partículas (partículas grandes - grande correlação) e determinar assim o tamanho das mesmas.⁷⁵

Para efetuar medições de *DLS* é necessário manter a temperatura do solvente fixa e definida, pois a viscosidade do solvente e consequentemente o movimento Browniano das partículas dependem deste fator.⁷⁵

O tamanho médio da partícula medido por *DLS* (*Z-average*) é definido como diâmetro hidrodinâmico e está relacionado com a forma como uma partícula se difunde num meio líquido. O *DLS* também fornece uma estimativa da distribuição de tamanhos das partículas - índice de polidispersividade.⁷⁵

A velocidade do movimento Browniano é definida pelo coeficiente de difusão de translação (*D*). O tamanho de uma partícula é calculado a partir do coeficiente de difusão de translação usando a equação de *Stokes-Einstein* (eq. 3)⁷⁵:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (3)$$

Onde:

$d(H)$: diâmetro hidrodinâmico

D : coeficiente de difusão de translação

k : constante de Boltzman

T : temperatura absoluta

η : viscosidade do solvente

1.5.3. Espectroscopia de Ultravioleta-visível (UV-Vis)

A espectroscopia de ultravioleta-visível é uma técnica utilizada para quantificar a luz que é absorvida e dispersa por uma amostra entre os 100 nm e os 700 nm.

O princípio da técnica envolve a absorção de um fóton da região UV-Vis pela molécula da amostra, que resulta na captura da energia correspondente por um ou vários elétrons periféricos, e conseqüentemente em transições eletrônicas moleculares. Um espectro de UV-Vis é obtido varrendo uma gama de valores de comprimento de onda, sendo a intensidade da radiação absorvida ou transmitida registrada. A intensidade medida na referência (i_0) é subtraída ao valor medido na amostra (i). Os resultados podem ser apresentados na forma de transmitância ($T = i/i_0$) ou absorvância ($Abs = \log i_0/i$) e o comprimento de onda ao qual a absorvância é máxima (λ_{max}) é um valor característico da amostra. De acordo com a lei de Beer ($A = \epsilon \text{ conc } l$) a absorvância é diretamente proporcional à concentração da amostra (conc), ao percurso ótico (l) e ao valor do coeficiente de extinção molar (ϵ) que é específico para cada composto.⁷⁴

As nanopartículas metálicas têm propriedades óticas que são sensíveis ao tamanho, forma, concentração, estado de aglomeração, solvente e índice de refração próximo da superfície das nanopartículas, o que torna o UV-Vis uma ferramenta valiosa para a identificação, caracterização e estudo deste tipo de materiais.^{61,76}

O espectro de absorção de suspensões coloidais de nanopartículas metálicas, como é o caso de nanopartículas de ouro ou nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ouro é afetado por vários fatores. O tamanho e a forma das nanopartículas afetam a posição, a intensidade e a largura da banda de absorção.^{26,76,77}

O espectrofotômetro de UV-Vis é constituído por uma fonte de luz (lâmpada), um sistema de dispersão (monocromador), um divisor de feixe de luz, um compartimento de colocação da amostra e da referência, que pode ser colocado antes ou depois do sistema de dispersão, um espelho rotativo, um fotomultiplicador e um detector (**Figura 12**).

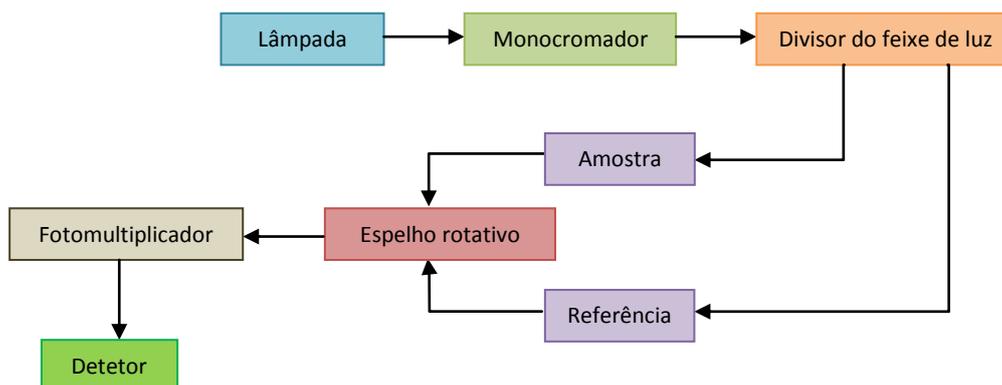


Figura 12: Representação esquemática de um espectrofotômetro de UV-Vis.

1.6. Péptidos de RGD como agentes vetorizantes

Péptidos com a sequência Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD) são muitas vezes utilizados como agentes de vetorização de nanopartículas.^{3,78-80}

A sequência RGD (**Figura 13**) é encontrada em várias proteínas da matriz extracelular, como é o caso da fibronectina, fibrinogénio, vitronectina, entre outras, e é responsável pela interação dessas proteínas com as integrinas.^{81,82}

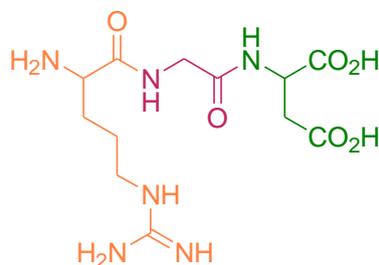


Figura 13: Sequência Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD).

As integrinas são um tipo de recetores heterodiméricos da superfície celular que medeiam a transmissão de sinal entre as células, estando assim envolvidas em

vários processos celulares, tais como a angiogénese, a apoptose ou a reabsorção óssea. Este tipo de recetores celulares possui uma subunidade α e uma subunidade β e é caracterizado por possuir um domínio *N*-terminal e um domínio *C*-terminal.^{81,82}

A integrina $\alpha_v\beta_3$ é um recetor de vitronectina que se liga a várias proteínas que contêm a sequência RGD, e que se encontra sobre-expressa na superfície de células tumorais, plaquetas e células endoteliais em proliferação.⁸¹

Este tipo de integrina está diretamente relacionada com a evolução e difusão de células tumorais e com a angiogénese.⁸² Assim sendo, potenciais ligandos das integrinas $\alpha_v\beta_3$ poderão funcionar como possíveis agentes no tratamento do cancro, osteoporose e artrite reumatóide. De acordo com estudos de modelação molecular, estes ligandos deverão possuir três regiões farmacofóricas: i) um grupo carboxilato; ii) um grupo guanidino e iii) um grupo hidrofóbico.⁸¹

Considerando o referido anteriormente, tem havido um interesse crescente na síntese de péptidos com a sequência RGD. Por outro lado, como a sequência RGD é bioativa, quando conjugada com possíveis agentes terapêuticos e de diagnóstico deverá aumentar a biocompatibilidade e a seletividade dos mesmos para determinados tipos de células.⁸³

Estudos revelaram que péptidos cíclicos demonstraram maior afinidade para os recetores do que o correspondente péptido linear.⁸⁴ Outro estudo revelou ainda, que os péptidos cíclicos contendo uma aminoácido hidrofóbico com a configuração *D* tinham uma afinidade aumentada para a integrina $\alpha_v\beta_3$.⁸⁵

Ferreira *et al.*⁸⁶ propuseram a síntese de dois novos péptidos cíclicos de RGD (**Figura 14-A e Figura 14-B**). Simulações de dinâmica molecular e estudos de *docking* mostraram que estes péptidos exibiam maior afinidade para a integrina $\alpha_v\beta_3$ do que o péptido cíclico Cilengtide [c(RGDf[N-Me]V, EMD 121974] (**Figura 14-C**), já em ensaios clínicos para vários tipos de cancros.^{85,86}

Tendo em conta os factos relatados péptidos contendo a sequência RGD podem ser usados para vetorizar nanopartículas para diagnóstico ou terapia.^{78,79}

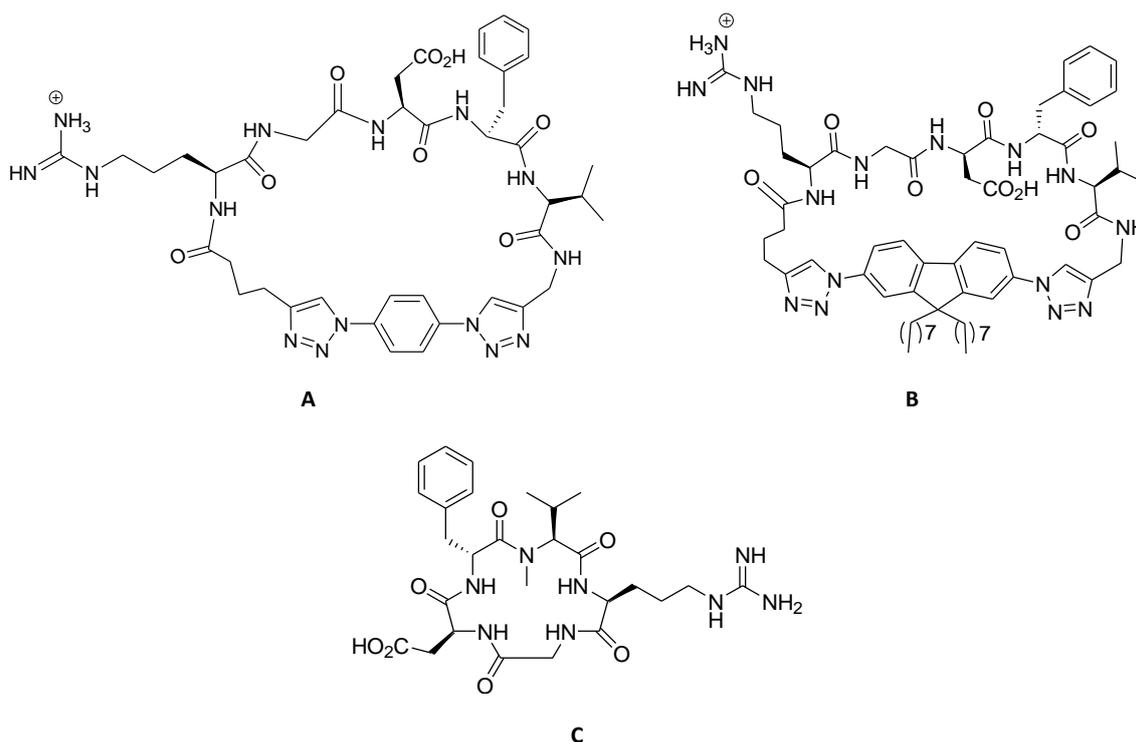


Figura 14: Estrutura de três péptidos cíclicos com a sequência RGD.

1.6.1. Métodos de síntese peptídica

O sucesso da aplicação de péptidos na química medicinal resultou numa variedade de sínteses peptídicas, quer em fase sólida, em solução ou numa mistura dos dois tipos de síntese.

A síntese peptídica em fase sólida (*SPPS - Solid Phase Peptide Synthesis*) consiste na utilização de uma resina polimérica à qual o péptido em formação está ligado e, envolve uma série de reações de acoplamento e desproteção. O péptido só é clivado da resina quando a síntese está completa. Esta estratégia é muito útil sobretudo na síntese de péptidos contendo um grande número de aminoácidos, uma vez que resolve muitos problemas associados à purificação e solubilidade de sequências peptídicas longas obtidas pelo método de síntese em solução.

Adicionalmente, este tipo de síntese garante ainda bons rendimentos devido à possibilidade de utilização de um excesso de reagentes, que podem ser removidos com a utilização de solventes adequados.⁸⁷ Por outro lado, tem a vantagem de poder ser automatizada e, atualmente existe uma grande variedade de sintetizadores automáticos de péptidos.

A *SPPS* utiliza um tipo restrito de grupos protetores, os grupos mais usados são o 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) e o *terc*-butiloxicarbonilo (Boc).⁸⁸ A remoção destes grupos protetores é feita em condições diferentes, e por isso quando se recorre a uma síntese em fase sólida escolhe-se uma estratégia de síntese utilizando todos os aminoácidos *N*-protegidos com somente um destes grupos protetores. O grupo Fmoc cliva em meio moderadamente básico (solução a 20% de piperidina ou com uma solução de morfolina num solvente orgânico). Contrariamente, o grupo Boc cliva na presença de ácidos, como é o caso do ácido sulfúrico (H₂SO₄), do ácido trifluoroacético (*TFA* - *Trifluoroacetic Acid*) e do ácido clorídrico (HCl).⁸⁹ A clivagem do péptido da resina também está dependente da estratégia que é utilizada. Numa estratégia Fmoc o péptido é clivado da resina em meio ácido (ácido acético - AcOH). Na presença de Boc a clivagem do péptido da resina é feita com ácido fluorídrico (HF) anidro ao mesmo tempo que são clivados os grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos *N*-protegidos.⁸⁸

A síntese peptídica em fase sólida envolve a ativação da função ácido carboxílico dos aminoácidos *N*-protegidos. Para tal, recorre-se à utilização de di-isopropilcarbodiimida (DIC), uma carbodiimida que funciona como agente de acoplamento, e que devido à solubilidade da ureia formada no solvente orgânico utilizado, permite que a mesma seja facilmente removida por filtração.⁸⁸ A reação entre a carbodiimida e o grupo ácido carboxílico do aminoácido leva à formação de uma *O*-acil-ureia muito reativa. Para evitar este problema, numa reação de acoplamento entre aminoácidos, habitualmente recorre-se ao uso de benzotriazoles [1-hidroxibenzotriazole (HOBt) ou 1-hidroxi-7-azabenzotriazole (HOAt)].⁸⁸ Estes compostos reagem com a *O*-acil-ureia originando um éster muito menos reativo mas mesmo assim capaz de reagir com a função amina do aminoácido livre. Alternativamente podem ser utilizados outros agentes de acoplamento, como é o caso de sais de urónio e os sais de fosfónio, dos quais são exemplo o hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio (HBTU) e o tetrafluorborato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio (TBTU).⁸⁸ Em síntese em fase sólida recorre-se frequentemente ao uso de DIC devido à solubilidade da ureia formada no solvente orgânico utilizado na reação, o que permite que a mesma seja facilmente removida por filtração.⁸⁸

1.6.2. Ciclização de péptidos lineares

A ciclização de péptidos lineares com a sequência RGD pode ser feita recorrendo a vários métodos.

Uma alternativa para a ciclização de péptidos lineares é a formação de uma ligação amida direta que envolve os grupos amina e ácido carboxílico presentes nas extremidades do péptido linear (ciclização *head-to-tail*). Esta ciclização é realizada recorrendo às condições típicas de formação da ligação amida.⁹⁰

Apesar de ser um método simples e rápido de obtenção de péptidos cíclicos, este tipo de ciclização apresenta algumas desvantagens, como é a possibilidade de ocorrer dimerização e epimerização.⁹⁰ A dimerização pode ser evitada usando concentrações muito baixas do péptido (10^{-3} a 10^{-4} M) durante a ciclização. A epimerização é normalmente acautelada com o uso de glicina na extremidade ácido carboxílico do péptido. No entanto, em determinadas situações, não é possível utilizar um resíduo de glicina na extremidade do péptido, e nessas situações recorre-se à utilização do reagente de acoplamento HOAt.⁹⁰

Zhang *et al.*⁹¹ procederam à ciclização de um péptido linear contendo a sequência RGD pelo método *head-to-tail*, entre resíduos de glicina e ácido aspártico, e utilizando HBTU e *N,N*-di-isopropiletilamina (DIPEA) (**Figura 15**).

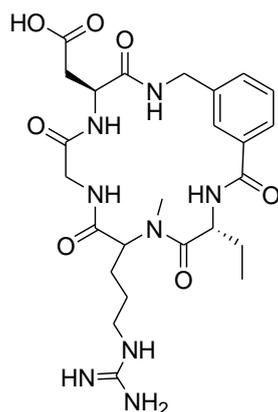
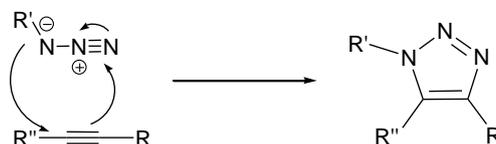


Figura 15: Péptido cíclico com a sequência RGD ciclizado pelo método *head-to-tail*.

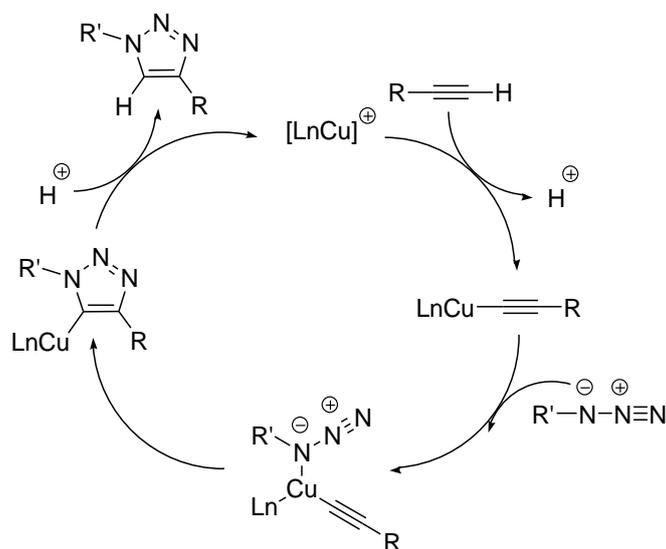
Uma outra alternativa para a síntese de péptidos cíclicos é a reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen, que consiste numa cicloadição concertada entre um dipolo-1,3 e um dipolarófilo. As espécies usadas para que a reação ocorra são

várias, e permitem obter produtos diferentes. Em situações em que o dipolo-1,3 é uma azida e o dipolarófilo é um alquino é possível a formação de um anel 1,2,3-triazole, que é isómero de uma ligação amida⁸⁶ (**Esquema 1**).



Esquema 1: Cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen de uma azida (dipolo-1,3) e um alquino (dipolarófilo).

Sharpless *et al.*⁹² recorreram à utilização de Cu (I) como catalisador para conseguir regioseletividade na cicloadição de 1,2,3-triazoles-1,4-dissubstituídos. No mecanismo proposto para a catálise com Cu (I) os autores afirmaram que o Cu (I) pode ser gerado *in situ* a partir de sulfato de cobre (II) penta-hidratado e ascorbato de sódio (agente redutor) ou pode ser usado diretamente um sal de cobre (I), tal como CuI, CuOTf.C₆H₆ ou [Cu(MeCN)₄][PF₆], em conjunto com um equivalente molar de uma base azotada. A nível químico, o que acontece é a ligação do alquino ao cobre seguida da reação desta espécie com a azida, o que favorece a formação do anel de triazole e a regeneração da espécie de cobre (I) inicial (**Esquema 2**).



Esquema 2: Catálise com Cu (I) da cicloadição de 1,2,3-triazoles-1,4-dissubstituídos. Adaptado de⁹².

O trabalho de Sharpless *et al.*⁹² inspirou novos grupos na pesquisa de outros catalisadores de cobre que fossem eficazes na cicloadição de

1,2,3-triazoles-1,4-dissubstituídos. Ferreira *et al.*⁸⁶ propuseram a síntese de dois novos péptidos cíclicos de RGD (**Figura 16-A e Figura 16-B**), recorrendo a uma reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen para a formação de 1,2,3-triazoles-1,4-dissubstituídos e utilizando uma bis-azida como dipolo-1,3 e dois alquinos como dipolarófilo. Em termos sintéticos foi empregado iodeto de cobre (CuI) e trietilamina (Et₃N).

O recurso à reação de Huisgen para a cicloadição de 1,2,3-triazoles-1,4-dissubstituídos apresenta diversas vantagens face a outros métodos de ciclização de péptidos lineares. Um fator importante na reação de Huisgen é a possibilidade de utilizar um meio aquoso⁹³ e não ser necessário trabalhar na ausência de oxigénio⁹⁴.

Os péptidos cíclicos de RGD obtidos podem ser ligados, em solução, a moléculas com um grupo tiol, para que seja possível a ligação à superfície de ouro que reveste as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e que está presente nas nanopartículas de ouro. Este facto é possível devido à fácil funcionalização da superfície de ouro através de ligações Au-SH.^{48,52} Assim, após esta vetorização poderá ser possível a entrega seletiva das nanopartículas em células que sobre-expressem a integrina $\alpha_v\beta_3$, que reconhece a sequência RGD.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O objetivo final deste trabalho era a vetorização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro e de nanopartículas de ouro com péptidos cíclicos contendo a sequência RGD. Estas nanopartículas seriam posteriormente avaliadas como agentes para a entrega controlada de fármacos. No entanto, até ao momento apenas se conseguiu preparar péptidos com a sequência RGD, nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro (NPs OF@Au) e nanopartículas de ouro (NPs Au).

2.1. Síntese de péptidos cíclicos de RGD

A sequência Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD) encontra-se em diversas proteínas da matrix extracelular tais como a fibronectina, a vitronectina ou o fibrinogénio. Péptidos contendo esta sequência são reconhecidos por uma série de recetores celulares conhecidos por integrinas, responsáveis por processos importantes tais como a regulação da proliferação celular ou a apoptose. Deste modo, péptidos com a sequência RGD são atualmente um alvo interessante no desenvolvimento de novas terapias para cancro, osteoperose e artrite reumatóide.⁸¹ Estes péptidos são também muito usados na funcionalização e vetorização de diversas moléculas biologicamente ativas tais como agentes para imagem médica⁹⁵ e de nanopartículas⁷⁸⁻⁸⁰.

Nos últimos anos foram efetuados vários estudos de relação estrutura-atividade entre péptidos com a sequência RGD e a integrina $\alpha_v\beta_3$, que conduziram ao desenvolvimento de vários compostos com elevada afinidade para este recetor, nomeadamente o Cilengitide [c(RGDf[N-Me]V), EMD 121974]. As interações principais entre o Cilengitide e a integrina $\alpha_v\beta_3$ encontram-se representadas na **Figura 16**.

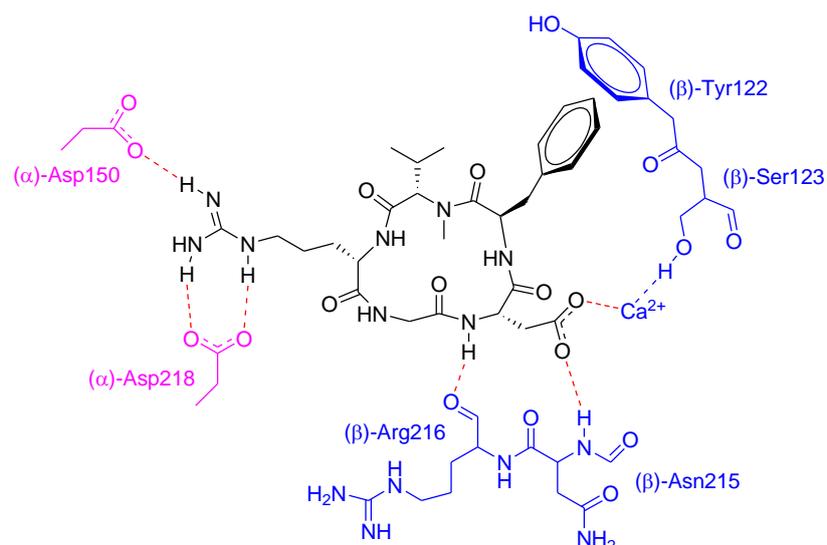


Figura 16: Representação esquemática das principais interações entre o Cilengitide e a integrina $\alpha_v\beta_3$. Adaptado de ⁸¹.

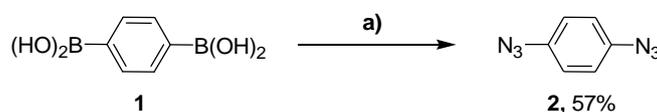
Nos nossos laboratórios foram preparados dois novos péptidos cíclicos com a sequência RGD usando uma combinação de síntese peptídica em fase sólida (*SPPS - Solid Phase Peptide Synthesis*), síntese peptídica em solução, ciclização *head-to-tail* e cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen. Simulações de dinâmica molecular e estudos de *docking* mostraram que estes péptidos exibiam uma maior afinidade para a integrina $\alpha_v\beta_3$ do que o Cilengitide, que se encontra na fase II de ensaios clínicos para vários tipos de tumores.⁸⁶

Neste trabalho foram preparados péptidos com a sequência RGD para a vetorização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro e de nanopartículas de ouro. Assim, sintetizaram-se três novos péptidos lineares utilizando uma combinação de síntese peptídica em fase sólida e síntese peptídica em solução. Dois destes compostos foram ciclizados utilizando a cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen ou a ciclização *head-to-tail*. Os péptidos preparados contêm um resíduo de D-fenilalanina, pois estudos de estrutura-atividade revelaram que a presença de um aminoácido hidrofóbico com a configuração D ligado ao ácido aspártico aumentava a afinidade deste tipo de compostos para a integrina $\alpha_v\beta_3$.⁹⁶ Os precursores necessários para a síntese destes compostos são o 1,4-diazidobenzeno **2** e a *N*-fluorenilmetoxycarbonil-D-fenilalanina (Fmoc-D-Phe-OH) **4**.

2.1.1. Síntese de precursores

▪ Síntese do 1,4-diazidobenzeno

O 1,4-diazidobenzeno **2** foi preparado seguindo o método de Liu *et al.*⁹⁷. Estes autores reportaram a síntese de diversas azidas aromáticas e vinílicas a partir dos respectivos ácidos borônicos. Deste modo, o ácido 1,4-benzeno-bis-borônico **1** foi tratado com azida de sódio (NaN_3) e sulfato de cobre (II) penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) tendo dado origem à bis-azida **2** com um rendimento de 57% (**Esquema 3**). A síntese deste composto já tinha sido descrita anteriormente com rendimentos de 67%⁸⁶ e 90%⁹⁷.



Esquema 3: Síntese do 1,4-diazidobenzeno **2** a partir do ácido 1,4-benzeno-bis-borônico **1**. a) NaN_3 (2,5 eq.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,2 eq.), MeOH, t.a., 44 h..

Tal como esperado o espectro de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) do composto **2** apresenta um único sinal, um singlete a 7,02 ppm correspondente aos prótons do anel aromático. O espectro de infravermelho da bis-azida **2** apresenta a banda característica dos grupos azida (N_3) a 2107 cm^{-1} (**Figura 17**).

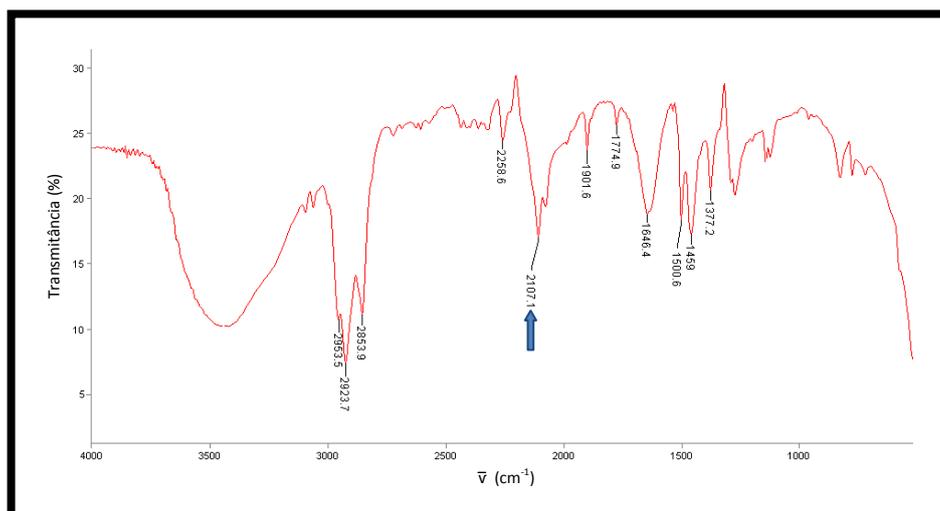
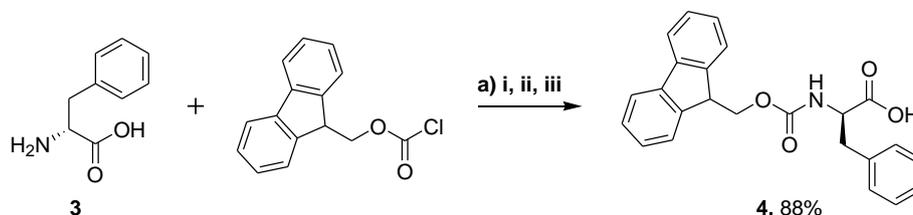


Figura 17: Espectro de IV, em Nujol, da bis-azida **2**.

A bis-azida **2** foi posteriormente usada, como dipolo-1,3, na ciclização de um péptido linear com a sequência RGD e duas ligações triplas terminais, através da cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen.

▪ **Síntese de Fmoc-D-Phe-OH**

A *N*-fluorenilmetoxicarbonil-D-fenilalanina (Fmoc-D-Phe-OH) **4** foi sintetizada de acordo com o método descrito por Carpino e Han⁹⁸. Este método consiste em tratar o aminoácido com o cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc-Cl) em presença de carbonato de sódio (Na₂CO₃). Por tratamento da mistura reacional com ácido é possível isolar o aminoácido protegido na função amina com bons rendimentos. Assim, a H-D-Phe-OH **3** foi tratada com cloroformiato de 9-fluorenilmetilo em meio básico (**Esquema 4**). O aminoácido *N*-protegido **4** foi isolado com um rendimento de 88%. No espectro de RMN de ¹H (DMSO-d₆) do composto **4** é possível observar a presença de dois duplos dupletos a 2,86 e 3,07 ppm correspondentes aos prótons do grupo β-CH₂ da fenilalanina, bem como um multiplete a 4,13-4,20 ppm que corresponde aos prótons dos grupos α-CH da fenilalanina, CH₂ e 9-CH do grupo Fmoc. O sinal do próton do grupo CO₂H surge como um singleto largo a 12,75 ppm.

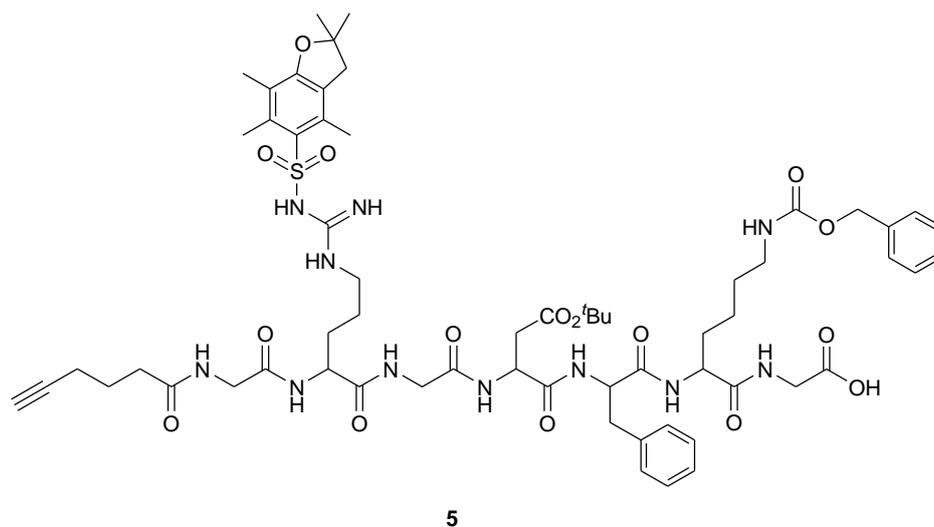


Esquema 4: Síntese da Fmoc-D-Phe-OH **4** a partir do aminoácido H-D-Phe-OH **3**. **a) i)** Na₂CO₃ (aq.) (2,5 eq.), dioxano, 0 °C, 4h.; **ii)** 18h., t.a.; **iii)** HCl.

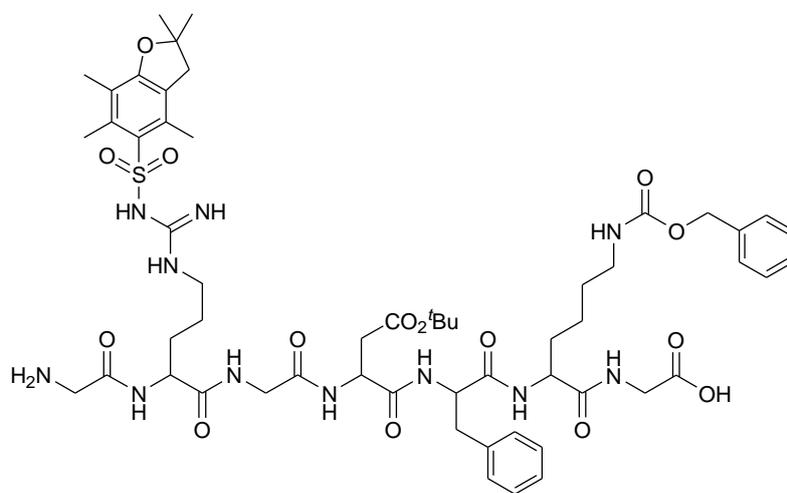
Este composto foi usado na síntese dos péptidos cíclicos e lineares contendo a sequência RGD.

2.1.2. Síntese de péptidos lineares de RGD

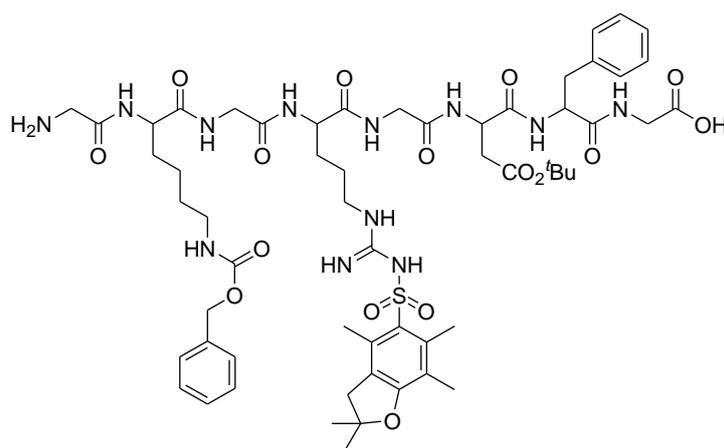
A **Figura 18** apresenta os três péptidos lineares com a sequência RGD **5**, **6** e **7** preparados, neste trabalho, por síntese peptídica em fase sólida.



5



6

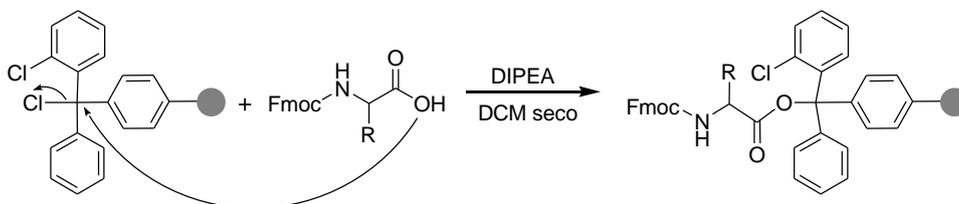


7

Figura 18: Estrutura dos péptidos lineares com a sequência RGD **5**, **6** e **7** preparados por síntese peptídica em fase sólida.

Na síntese peptídica em fase sólida foi utilizada uma resina de cloreto de 2-clorotritilo e uma estratégia envolvendo o grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc). Como grupos protetores das cadeias laterais da arginina, ácido aspártico e lisina foram escolhidos os grupos 2,2,4,6,7-pentametildi-hidrofurano-5-sulfonilo (Pbf), *tert*-butilo (^tBu) e benziloxicarbonilo (Z), respectivamente. A clivagem dos grupos Pbf e ^tBu é feita com ácido trifluoroacético (TFA) enquanto a remoção do grupo Z é efetuada por hidrogenação. A utilização de um resíduo de lisina protegido na cadeia lateral com o grupo Z, nos péptidos sintetizados, teve como objetivo possibilitar a ligação dos mesmos a uma molécula contendo um grupo tiol. A presença deste tipo de grupo funcional nos péptidos preparados permitirá a utilização destes como agentes de vetorização de nanopartículas de ouro e de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro. Isto acontece devido à conhecida afinidade de tióis para o ouro por formação de ligações Au-SH.^{48,52}

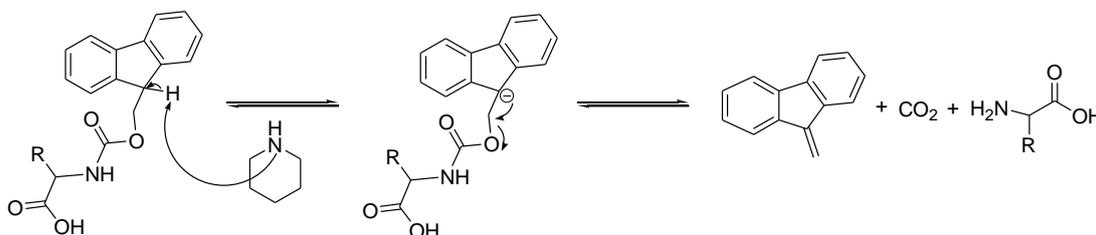
Na *SPPS*, o primeiro passo consiste na ligação do Fmoc-aminoácido à resina através de uma reação de substituição nucleófila utilizando um excesso de aminoácido *N*-protegido e uma base, normalmente a *N,N*-di-isopropiletilamina (DIPEA) (Esquema 5).



Esquema 5: Reação do primeiro Fmoc-aminoácido com a resina de cloreto de 2-clorotritilo.

Após o acoplamento do primeiro aminoácido à resina, esta foi lavada com uma mistura de diclorometano/metanol/*N,N*-di-isopropiletilamina (DCM/MeOH/DIPEA) (25,5:3:1,5) com o objetivo de converter os grupos clorotritilo que não reagiram em grupos metoxitritilo, impedindo assim que os primeiros reagissem com outros aminoácidos *N*-protegidos. Posteriormente, e para remover o excesso de Fmoc-aminoácido, a resina foi lavada com diclorometano (DCM) e *N,N*-dimetilformamida (DMF).

A quantificação do Fmoc-aminoácido ligado à resina (“loading da resina”) foi efetuada por espectroscopia de UV-Vis utilizando a quantificação do dibenzofulveno libertado na clivagem do grupo Fmoc em meio básico (solução a 20% de piperidina em DMF) (**Esquema 6**).



Esquema 6: Clivagem do grupo Fmoc com piperidina e formação de dibenzofulveno.

O *loading* da resina e os rendimentos globais da síntese em fase sólida dos péptidos lineares **5**, **6** e **7** encontram-se na **Tabela 3**.

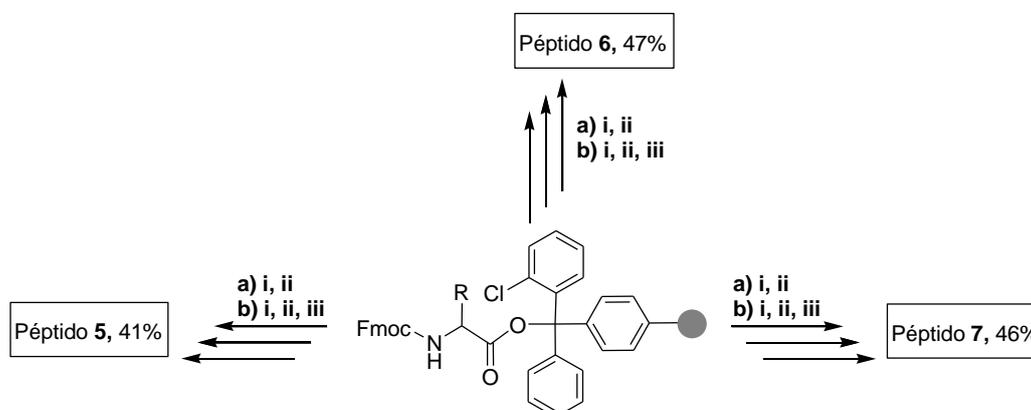
Tabela 3: *Loading* da resina e rendimentos obtidos na síntese dos péptidos lineares **5**, **6** e **7**.

Péptido	<i>Loading</i> (mmol/g)	Rendimento (%)
5	0,25	41
6	0,20	47
7	0,20	46

Após a ligação do primeiro aminoácido, seguiram-se ciclos de remoção do grupo Fmoc com soluções a 20% de piperidina em DMF e acoplamento de novos Fmoc-aminoácidos. Os acoplamentos foram efetuados por tratamento com di-isopropilcarbodiimida (DIC) e 1-hidroxibenzotriazole (HOBt). A eficácia dos processos de acoplamento e de clivagem foi testada utilizando o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS). Neste teste, se existirem aminas primárias livres ligadas à resina, esta adquire uma coloração laranja.

O acoplamento do último aminoácido do péptido linear e respetiva desproteção do grupo Fmoc foi seguido de remoção do péptido da resina por tratamento da mesma com uma mistura de ácido acético/2,2,2-trifluoroetanol/diclorometano (AcOH/TFE/DCM) (4:4:12).

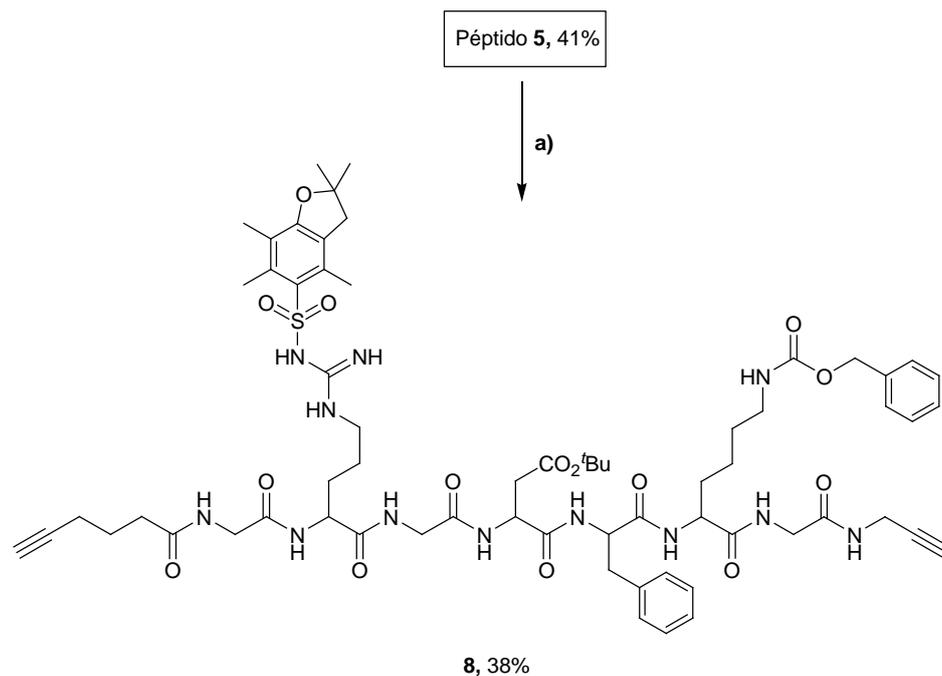
O **Esquema 7** descreve de uma forma geral a síntese peptídica em fase sólida dos péptidos **5**, **6** e **7** obtidos como sólidos brancos com rendimentos de 41%, 47% e 46%, respectivamente.



Esquema 7: Síntese dos péptidos **5**, **6** e **7** em fase sólida. **a) i)** DIPEA (4,0 eq.), DCM seco, t.a., 2 h.; **ii)** 20% de piperidina em DMF, t.a., 2 h.; **b) i)** Fmoc-aa-OH (2,5 eq.), HOBT (2,5 eq.), DIC (2,5 eq.), DMF, t.a., 18 h.; **ii)** 20% de piperidina em DMF, t.a., 2 h., repetição sucessiva de **i** e **ii**; **iii)** AcOH/TFE/DCM (4:4:12), t.a., 1 h..

Os péptidos foram caracterizados por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . As técnicas de *DEPT-135*, *COSY*, *HMBC* e *HSQC* foram usadas para atribuição dos respectivos sinais de próton e carbono.

O péptido **8**, com dois grupos alquilino, foi preparado a partir do péptido **5** por acoplamento com propargilamina, em presença de hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurônio (HBTU) e 1-hidroxibenzotriazole (HOBT) (**Esquema 8**).



Esquema 8: Síntese do péptido **8**. a) HOBT (1,0 eq.), HBTU (1,0 eq.), propargilamina (1,5 eq.), DIPEA (2,0 eq.), DMF, t.a., 2,5 d..

A atribuição do sinal dos prótons aromáticos do péptido **8** foi feita por recurso ao espectro de RMN de ^1H (**Figura 19**) e de *COSY* (**Esquema 9**).

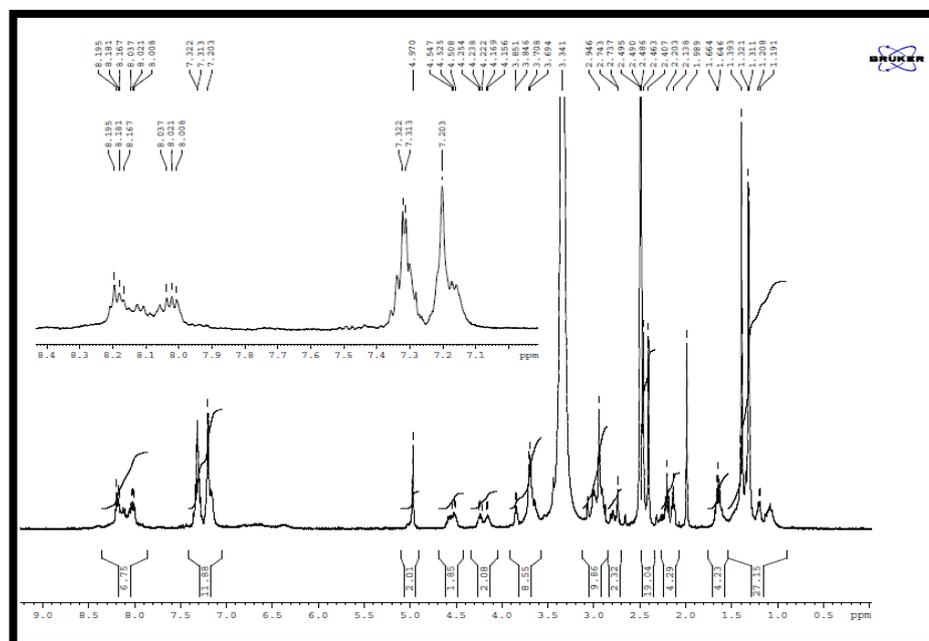
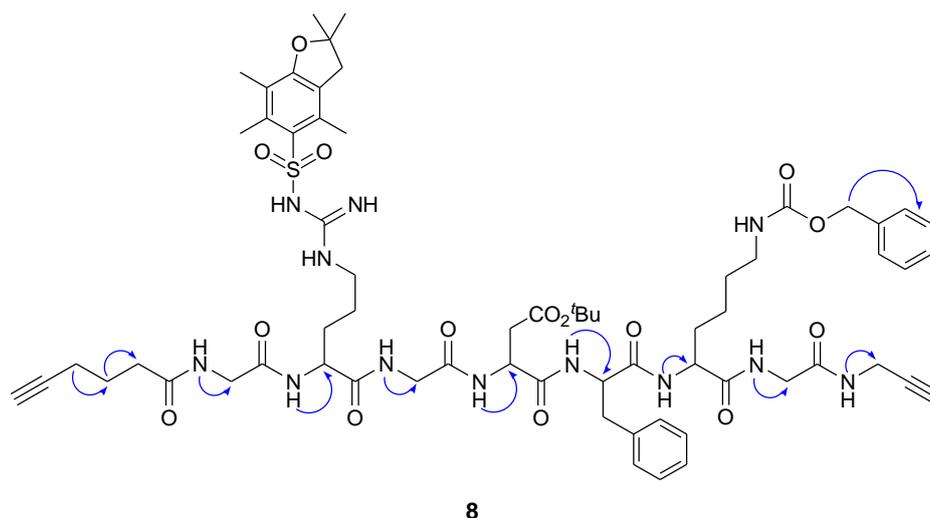


Figura 19: Espectro de RMN de ^1H , em DMSO-d_6 , do péptido **8**.



Esquema 9: Correlações observados no espectro de COSY, em DMSO- d_6 , do péptido **8**.

No espectro de COSY é possível observar a correlação entre o sinal a 4,97 ppm, correspondente aos prótons CH_2 do grupo Z, e o multiplete a 7,28-7,34 ppm. O multiplete a 7,17-7,20 ppm corresponde aos prótons aromáticos do anel da fenilalanina (**Figura 20**).

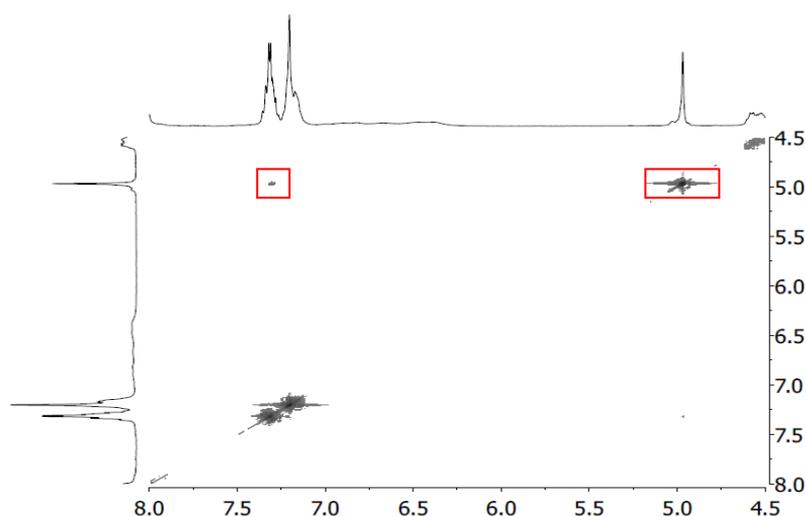


Figura 20: Espectro de COSY, em DMSO- d_6 , do péptido **8** evidenciando a correlação entre os prótons do CH_2 do grupo Z e os prótons aromáticos.

A identificação e atribuição dos prótons dos grupos α -CH dos aminoácidos arginina, lisina, fenilalanina e ácido aspártico, bem como dos prótons dos grupos α - CH_2 dos resíduos de glicina foi efetuada através das correlações observadas entre estes prótons e os prótons dos grupos amida (NHCO). A correlação entre o multiplete a 3,84-3,87 ppm, correspondente aos prótons do grupo CH_2 propargílico, e um próton de

um grupo NH permitiu identificar este último (**Figura 21**). No espectro de RMN de ^1H , o próton do CH propargílico surge como um tripleto com uma constante de acoplamento igual a 2,4 Hz.

No espectro de *COSY* foi igualmente possível observar a correlação entre os prótons dos grupos $\alpha\text{-CH}$ e $\beta\text{-CH}_2$ dos aminoácidos do péptido **8**.

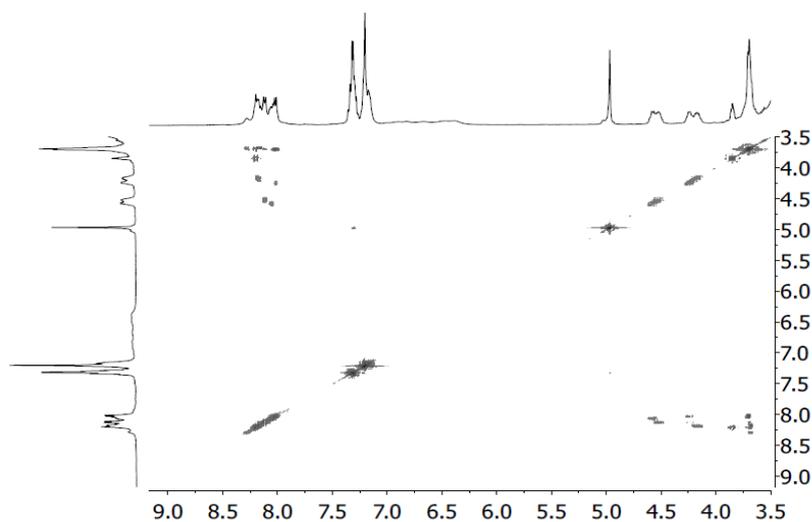


Figura 21: Espectro de *COSY*, em DMSO-d_6 , do péptido **8** evidenciando a correlação entre os prótons NH dos grupos amida e os prótons dos grupos $\alpha\text{-CH}$ dos aminoácidos, assim como a correlação entre os prótons do CH_2 do grupo propargílico e o próton do grupo amida.

A identificação dos prótons do grupo pentino foi feita por observação dos espectros de RMN de ^1H e de *COSY*. Assim, o tripleto de dupletos a 2,14 ppm foi atribuído aos prótons do grupo CH_2 mais próximo da ligação tripla, uma vez que as constantes de acoplamento são de 2,4 Hz e 7,2 Hz. No espectro de *COSY* foram consideradas as correlações do tripleto de dupletos a 2,14 ppm e do tripleto a 2,20 ppm com o multipletos a 1,58-1,68 ppm, sendo este último atribuído ao grupo CH_2 intermédio, e o tripleto a 2,20 ppm ao grupo CH_2 mais próximo da C=O (**Figura 22**).

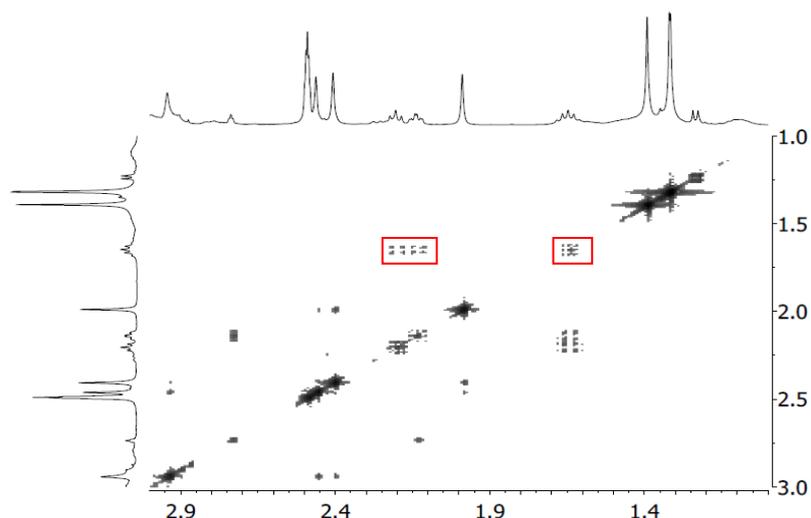


Figura 22: Espectro de COSY, em DMSO- d_6 , do péptido **8** mostrando a correlação entre os prótons do grupo CH_2 intermédio do pentino (multiplete a 1,58-1,68 ppm) e os prótons dos restantes grupos CH_2 (triplete de dupletos a 2,14 ppm e triplete a 2,20 ppm) do mesmo grupo.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 23**) juntamente com as técnicas de *HSQC* e *HMBC* permitiu atribuição dos sinais correspondentes aos átomos de carbono.

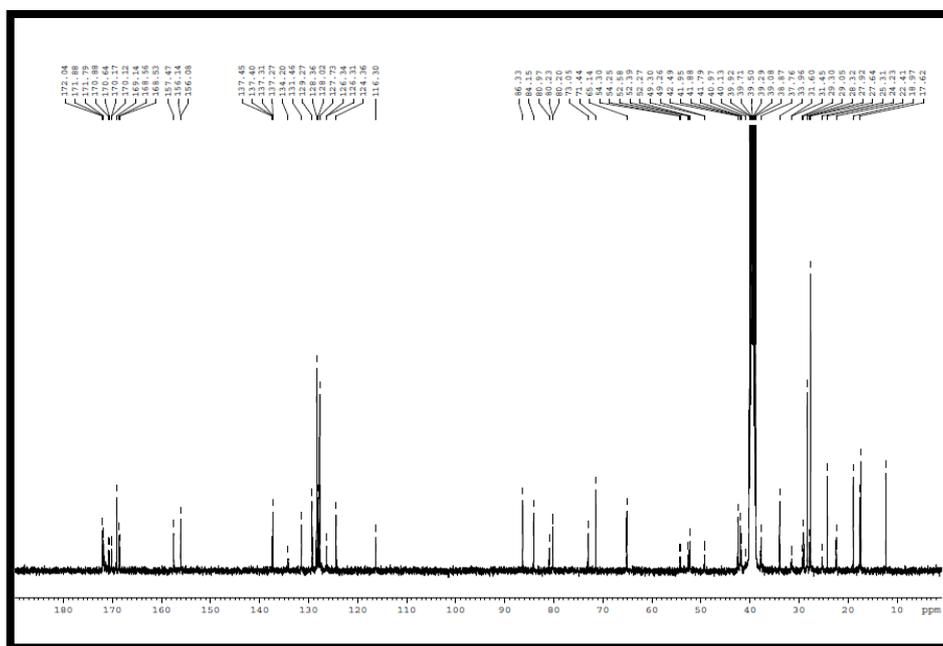


Figura 23: Espectro de RMN de ^{13}C , em DMSO- d_6 , do péptido **8**.

O espectro de *HSQC* permitiu a atribuição de uma grande parte dos sinais correspondentes aos átomos de carbono do composto **8**. Os sinais dos prótons aromáticos do anel de fenilalanina apresentam correlações com os respetivos sinais

dos átomos de carbono aromáticos a 126,33; 128,02 e 129,27 ppm. (**Figura 24-A**). O espectro de *HSQC* possibilitou ainda a identificação dos sinais dos átomos de carbono correspondentes aos grupos α -CH₂ das glicinas e aos grupos α -CH da arginina, lisina, fenilalanina e ácido aspártico que surgem entre 41,87 e os 54,30 ppm (**Figura 24-B**).

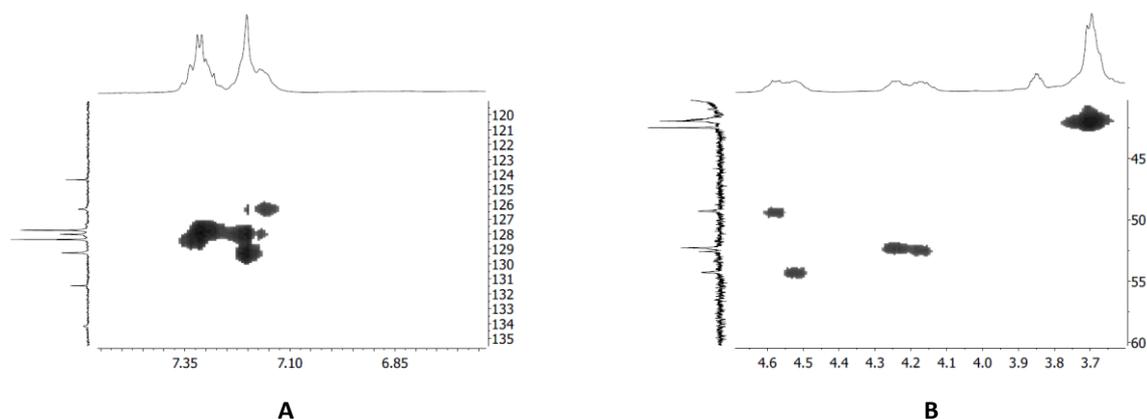


Figura 24: Espectro de *HSQC*, em DMSO-d₆, do péptido **8** nas zonas aromática (**A**) e dos α -CH dos aminoácidos (**B**).

A correlação por *HSQC* do multiplete a 1,58-1,68 ppm com o sinal a 24,23 ppm permitiu atribuir este último ao carbono do CH₂ intermédio do grupo pentino (**Figura 25-A**). O tripleto a 2,14 ppm correspondente ao CH₂ mais próximo da ligação tripla do grupo pentino correlaciona com o sinal a 17,36 ppm. O tripleto a 2,20 ppm, respeitante aos protões do CH₂ mais próximo da C=O, apresenta uma correlação com o sinal a 33,96 ppm (**Figura 25-B**). O multiplete a 2,73-2,81 ppm, do protão CH da ligação tripla do pentino, correlaciona com o sinal a 71,44 ppm (**Figura 25-C**).

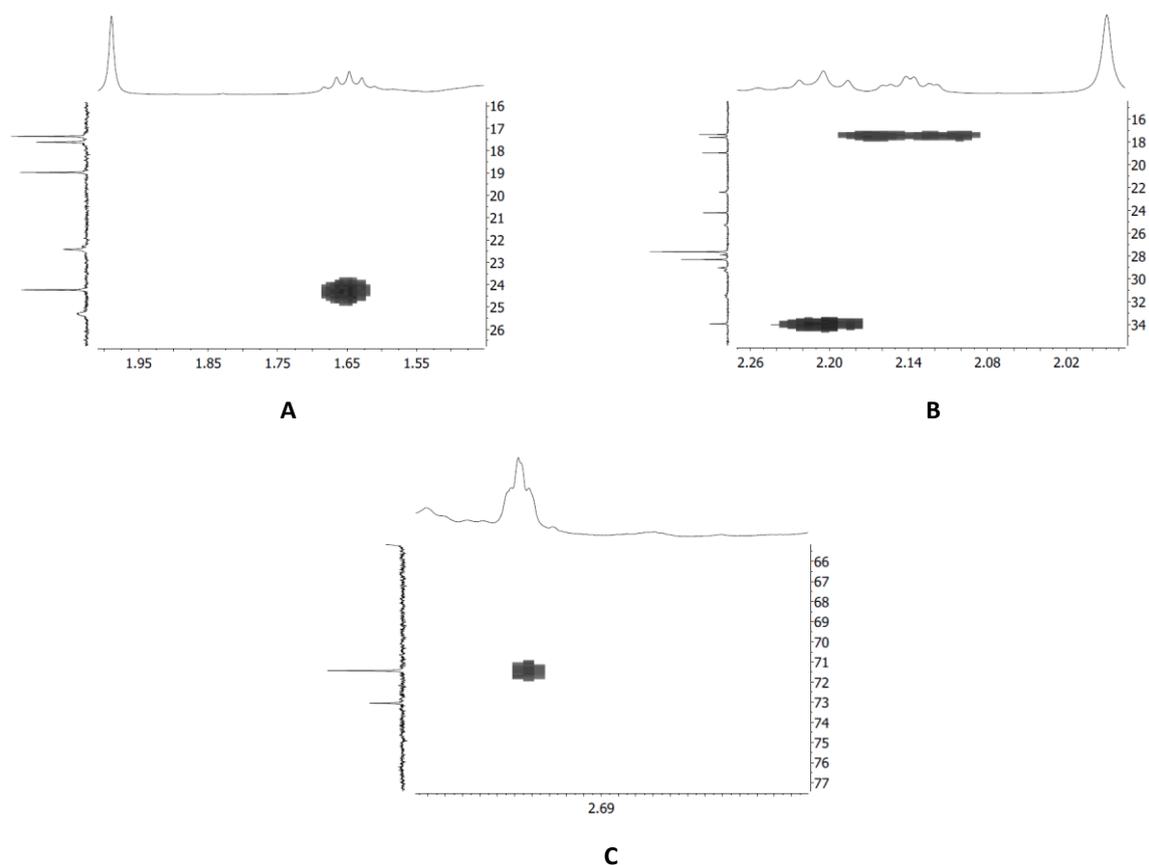


Figura 25: Espectro de *HSQC*, em DMSO-d_6 , do péptido **8** nas zonas da correlação entre os prótons do CH_2 intermédio do grupo pentino (multiplete a 1,58-1,68 ppm) e o respetivo sinal do átomo de carbono (**A**), das correlações entre os prótons do CH_2 do grupo pentino mais próximo da ligação tripla (tripleto de dupletos a 2,14 ppm) e dos prótons do CH_2 mais próximo da C=O (tripleto a 2,20 ppm) e os respetivos sinais dos átomos de carbono (**B**), e ainda da correlação entre o multiplete a 2,73-2,81 ppm, correspondente ao grupo CH da ligação tripla do pentino, e o respetivo sinal de carbono (**C**).

Os átomos de carbonos dos CH e CH_2 do grupo propargílico foram também atribuídos por recurso ao espectro de *HSQC*. Deste modo, o tripleto a 3,06 ppm, correspondente ao grupo CH apresenta uma correlação com o sinal a 73,05 ppm (**Figura 26-A**). De forma análoga o CH_2 que se apresenta como um multiplete a 3,84-3,87 ppm correlaciona com o sinal a 27,92 ppm (**Figura 26-B**).

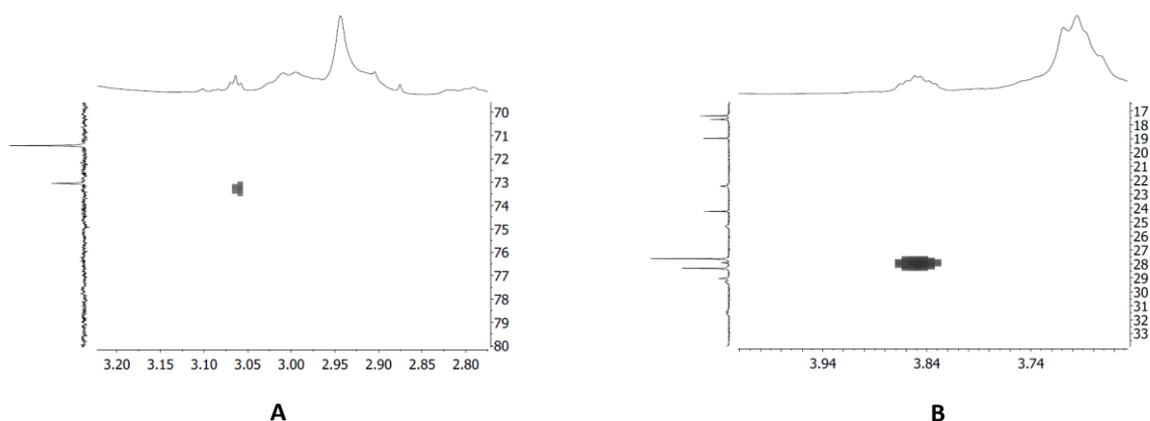


Figura 26: Espectro de *HSQC*, em DMSO-*d*₆, do péptido **8** nas zonas da correlação entre o próton do CH do grupo propargílico (triplete a 3,06 ppm) e o respetivo sinal do átomo de carbono a 73,05 ppm (**A**) e da correlação entre os prótons do CH₂ do grupo propargílico (multiplete a 3,84-3,87 ppm) e o respetivo sinal do átomo de carbono a 27,92 ppm (**B**).

No espectro de *HSQC* é também observável a correlação entre os sinais dos prótons dos grupos β-CH₂ da arginina, lisina, fenilalanina e ácido aspártico e os sinais correspondentes aos átomos de carbono que surgem a 29,05; 31,45 e 37,76 ppm, respetivamente (**Figura 27-A**).

O espectro de RMN de ¹H em DMSO-*d*₆ do composto **8** apresenta os sinais característicos dos grupos metilo do Pbf, que surgem como singletos a 1,39; 1,99; 2,41 e 2,46 ppm. Os sinais dos átomos de carbono correspondentes a estes grupos foram atribuídos através da observação de correlações no espectro de *HSQC* e correspondem aos sinais que surgem a 12,30; 17,62; 18,97 e 28,32 ppm. (**Figura 27-A**). Os prótons do grupo CH₂ do Pbf surgem como um singlete a 2,94 ppm que correlaciona no espectro de *HSQC* com o sinal a 42,49 ppm (**Figura 27-B**). Na **Figura 27-A** é também mostrada a correlação entre o singlete a 1,32 ppm, correspondente aos prótons do grupo ^tBu, e o sinal correspondente aos respetivos átomos de carbono a 27,64 ppm.

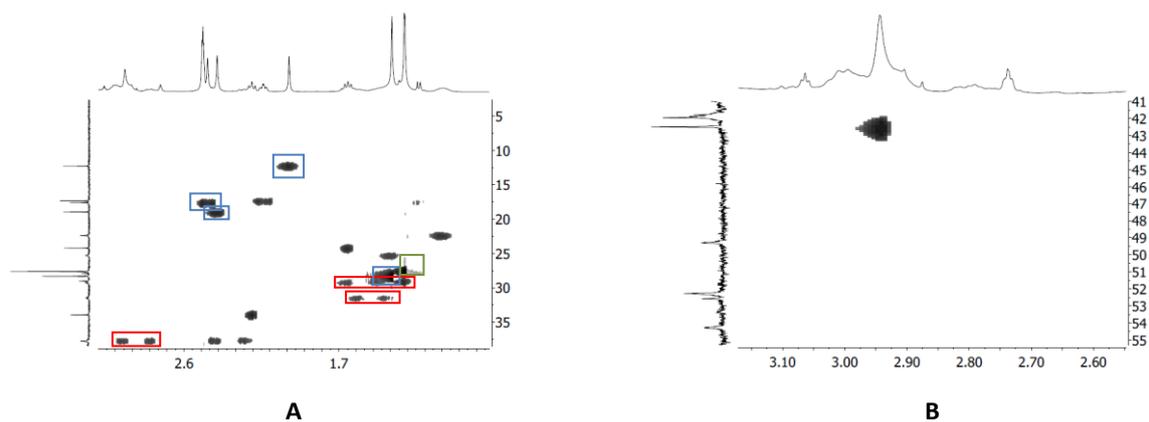


Figura 27: Espectro de *HSQC*, em DMSO-d_6 , do péptido **8** na zona das correlações entre os prótons dos $\beta\text{-CH}_2$ dos aminoácidos que compõem o péptido (vermelho), os prótons dos grupos CH_3 do Pbf (azul) e os prótons dos grupos CH_3 do ^tBu (verde) e os respectivos sinais dos átomos de carbono (**A**) e da correlação entre os prótons do grupo CH_2 do Pbf e os respectivos sinais dos átomos de carbono (**B**).

Por *HMBC* foi possível atribuir o sinal a 80,20 ppm ao carbono quaternário do grupo ^tBu . O espectro de *HMBC* permitiu ainda a atribuição dos sinais a 86,33; 116,30; 124,36; 131,46; 134,20; 137,40 e 157,47 ppm aos átomos de carbono quaternários do grupo Pbf (**Figura 28**).

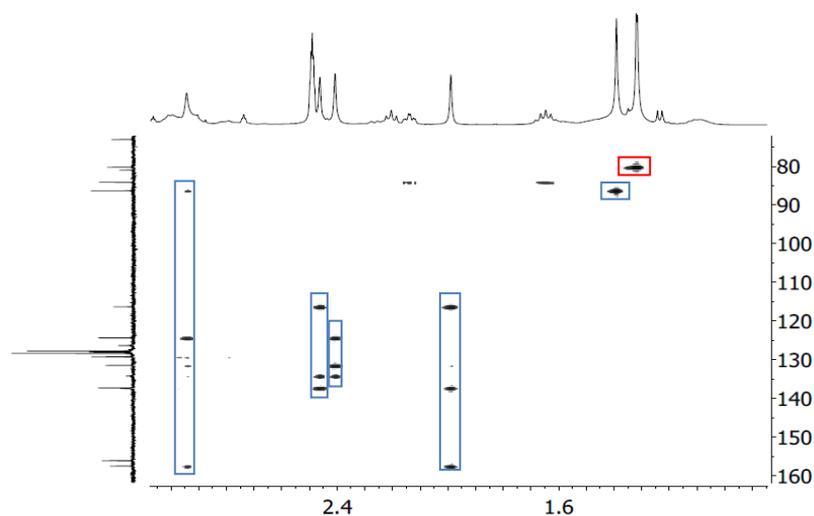


Figura 28: Espectro de *HMBC*, em DMSO-d_6 , do péptido **8** na zona das correlações entre os prótons dos grupos CH_3 e do grupo CH_2 do Pbf e os respectivos carbonos quaternários (azul) e na zona da correlação entre os grupos CH_3 do ^tBu e o respectivo carbono quaternário (vermelho).

A análise do espectro de *HMBC* do péptido **8** possibilitou ainda a atribuição dos sinais dos carbonos quaternários do anel aromático do grupo Z (137,27 ppm) e do anel aromático da fenilalanina (137,45 ppm) (**Figura 29**).

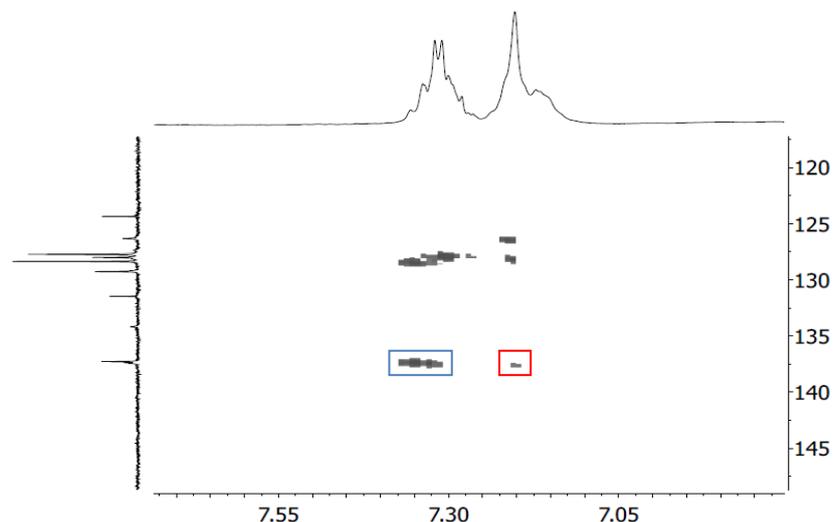


Figura 29: Espectro de *HMBC*, em DMSO- d_6 , do péptido **8** na zona aromática evidenciando as correlações entre os prótons do anel aromático do grupo Z e o respectivo carbono quaternário (azul) e entre os prótons do anel aromático da fenilalanina e o respectivo carbono quaternário (vermelho).

A atribuição dos sinais correspondentes aos átomos de carbono quaternários do grupo guanidino e do carbonilo do grupo Z a 156,08 ppm e 156,14 ppm foi também efetuada pela análise do espectro de *HMBC*, no entanto não foi possível definir qual o sinal correspondente a cada um dos átomos de carbonos quaternários (**Figura 30**).

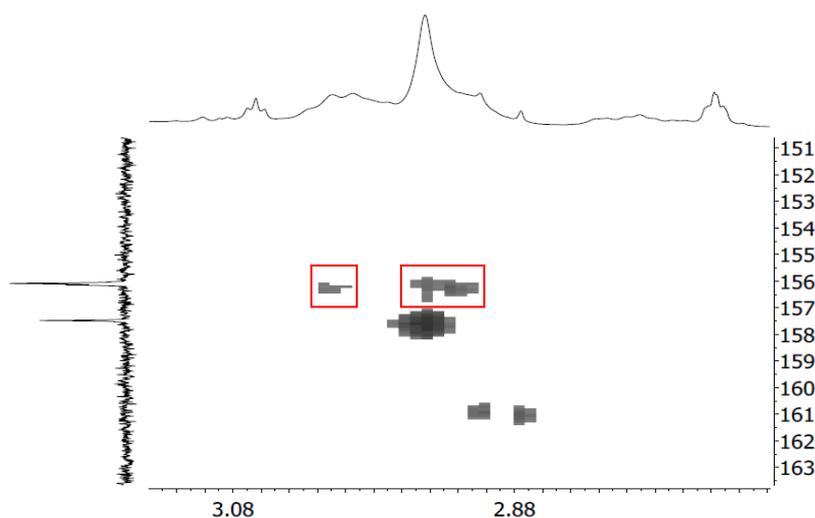


Figura 30: Espectro de *HMBC*, em DMSO- d_6 , do péptido **8** evidenciando as correlações entre os prótons do grupo δ -CH₂ da arginina e o átomo de carbono do grupo guanidino e entre os prótons do grupo ϵ -CH₂ da lisina e o átomo de carbono da C=O do grupo Z.

O espectro de *HMBC* permitiu ainda atribuir os sinais correspondentes aos átomos de carbono dos grupos carbonilo das três glicinas, da arginina, lisina, fenilalanina e ácido aspártico. Esta atribuição foi possível devido às correlações observadas entre os prótons dos grupos α -CH dos aminoácidos com os respectivos sinais dos átomos de carbono carbonílicos (**Figura 31-A**). A atribuição dos sinais correspondentes aos prótons dos grupos α -NH foi também possível por *HMBC* por observação das correlações entre os átomos de carbonos carbonílicos dos aminoácidos e os sinais dos prótons dos grupos α -NH (**Figura 31-B**). Foi igualmente evidente a correlação entre o grupo CH_2 propargílico e o respectivo grupo NH.

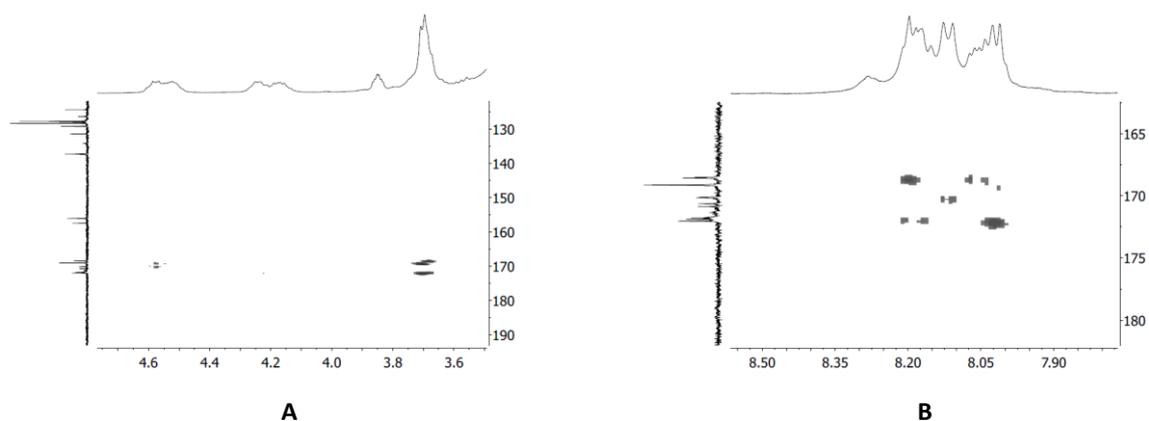


Figura 31: Espectro de *HMBC*, em DMSO-d_6 , do péptido **8** mostrando as correlações entre os prótons dos grupos α -CH dos aminoácidos e os respectivos sinais dos átomos de carbono carbonílicos (**A**) e entre os α -NH dos aminoácidos e os átomos de carbonos carbonílicos correspondentes (**B**).

A atribuição dos sinais correspondentes aos outros péptidos lineares sintetizados foi efetuada utilizando uma metodologia semelhante (**Tabela 4**).

Tabela 4: Valores de desvio químico, em DMSO-d₆, dos prótons dos aminoácidos comuns aos peptídeos lineares **5**, **6**, **7** e **8**.

Sinais	Peptídeo (Valores de δ em ppm)			
	5	6	7	8
α -CH Arg	4,16-4,26	4,25-4,45	4,24-4,33	4,13-4,25
α -CH ₂ Gly	3,62-3,75	3,53-3,58 e 3,80-3,86	3,52-3,65 e 3,76-3,80	3,56-3,71
α -CH Asp	4,50-4,60	4,46-4,54	4,36-4,48	4,49-4,61
α -CH Lys	4,16-4,26	4,04-4,10	4,24-4,33	4,13-4,25
α -CH Phe	4,50-4,60	4,46-4,54	4,36-4,48	4,49-4,61
β -CH ₂ Arg	1,59-1,68	1,46-1,55 e 1,62-1,73	1,49-1,52 e 1,68-1,73	1,58-1,68
β -CH ₂ Asp	2,24-2,28 e 2,72-2,74	2,28-2,34 e 2,77-2,82	2,24-2,30 e 2,88-2,90	2,26-2,28
β -CH ₂ Lys	1,42-1,53	1,46-1,55 e 1,62-1,73	1,49-1,52 e 1,68-1,73	1,58-1,68
β -CH ₂ Phe	2,76-2,81 e 2,91-3,00	2,72-2,76 e 2,88-3,05	3,13	2,73-2,81 e 2,88-3,01
γ -CH ₂ Arg	1,34-1,36	1,46-1,55 e 1,62-1,73	1,43-1,45	1,34-1,35
γ -CH ₂ Lys	1,11-1,16	1,22-1,27	1,22-1,27	1,11-1,13
δ -CH ₂ Arg	2,91-3,00	2,88-3,05	2,92-3,02	2,88-3,01
δ -CH ₂ Lys	1,34-1,36	*	1,43-1,45	1,34-1,35
ϵ -CH ₂ Lys	2,91-3,00	2,88-3,05	2,92-3,02	2,88-3,01
CH ₃ Pbf	1,39; 1,99; 2,41 e 2,46	1,39; 1,99; 2,41 e 2,47	1,39; 1,99; 2,41 e 2,47	1,39; 1,99; 2,41 e 2,46
CH ₂ Pbf	2,94	2,95	2,95	2,94
CH ₃ ^t Bu	1,32	1,30	1,29	1,32
CH ₂ Z	4,98	4,98	4,99	4,97
ArH Phe	7,15-7,24	7,16-7,22	7,15-7,22	7,17-7,20
ArH Z	7,26-7,36	7,28-7,34	7,29-7,37	7,28-7,34

* Não definido.

Os péptidos lineares **5** e **8** têm em comum a sequência peptídica H-Gly-Arg (Pbf)-Gly-Asp(O^tBu)-D-Phe-Lys(Z)-Gly-OH. Ambos estão ligados no terminal amina ao ácido hexinóico, no entanto no caso do composto **8** o terminal ácido carboxílico encontra-se ligado à propargilamina (**Figura 32**). Assim sendo, não são evidentes grandes diferenças ao nível dos valores de desvio químico dos sinais dos prótons dos aminoácidos que constituem os péptidos, verificando-se apenas a existência dos sinais correspondentes ao grupo propargílico no péptido **8** (**Tabela 5**).

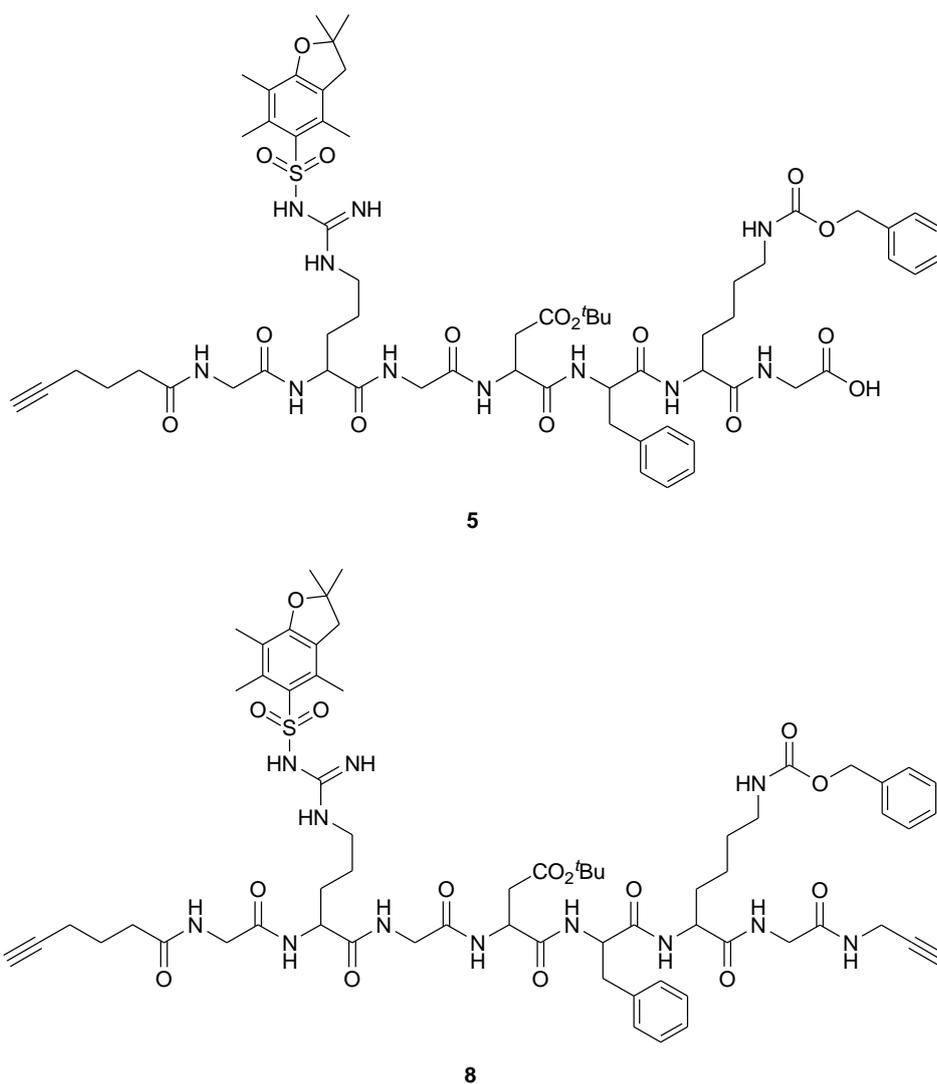


Figura 32: Estrutura dos péptidos lineares com a sequência RGD **5** e **8**.

Tabela 5: Valores de desvio químico em DMSO-d₆ dos prótons que constituem o grupo pentino comum aos péptidos lineares **5** e **8**.

Péptido	Sinais (Valores de δ em ppm)			
	CH≡CCH ₂ CH ₂ CH ₂ CO			
	CH	CH ₂	CH ₂	CH ₂ CO
5	2,74	2,14	1,59-1,68	2,20
8	2,73-2,81	2,14	1,58-1,68	2,20

Todos os péptidos lineares foram ainda caracterizados por espectrometria de massa de alta resolução (*HRMS - High Resolution Mass Spectrometry*) de forma a confirmar a formação dos mesmos (**Tabela 6**).

Tabela 6: Valores de *HRMS* dos péptidos lineares **5**, **6**, **7** e **8**.

Péptido	Fórmula molecular	Valor de <i>HRMS</i> calculado [M+H]	Valor de <i>HRMS</i> obtido [M+H]
5	C ₆₂ H ₈₆ N ₁₁ O ₁₆ S	1272,5997	1272,5969
6	C ₅₆ H ₈₀ N ₁₁ O ₁₅ S	1178,5578	1178,5551
7	C ₅₈ H ₈₃ N ₁₂ O ₁₆ S	1235,5793	1235,5765
8	C ₆₅ H ₈₉ N ₁₂ O ₁₅ S	1309,6313	1309,6286

2.1.3. Ciclização de péptidos lineares de RGD

Estudos revelaram que os péptidos cíclicos demonstraram maior afinidade para a integrina $\alpha_v\beta_3$ do que os péptidos lineares.⁸⁴ Assim, os péptidos lineares **6** e **8** foram utilizados como precursores dos péptidos cíclicos **9** e **10**, respetivamente (**Figura 33**).

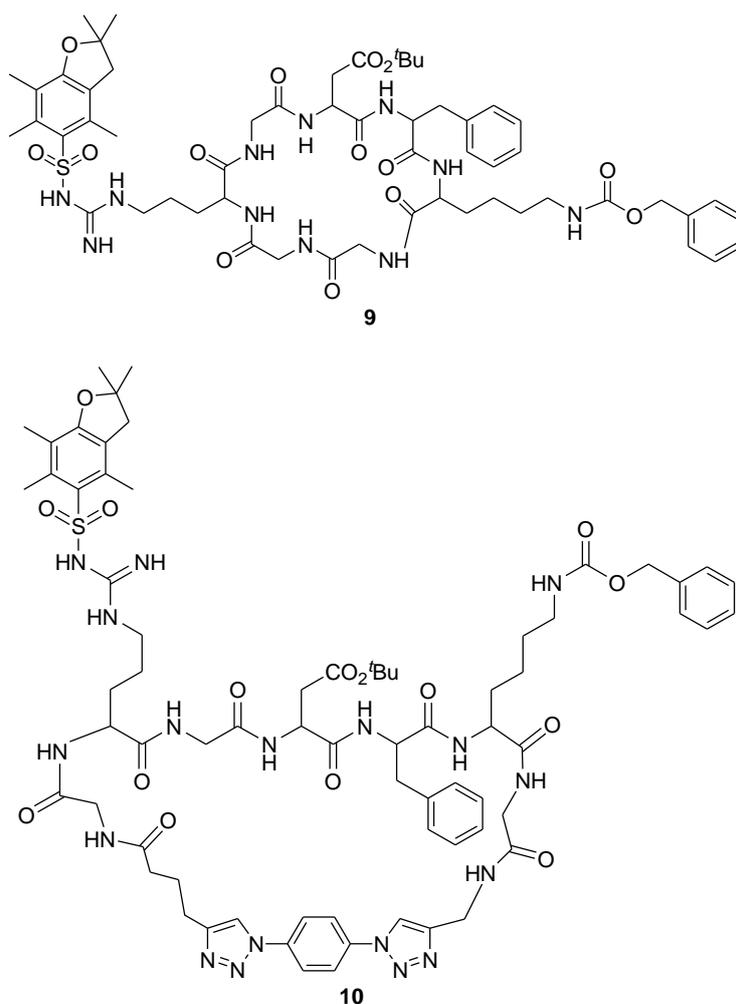
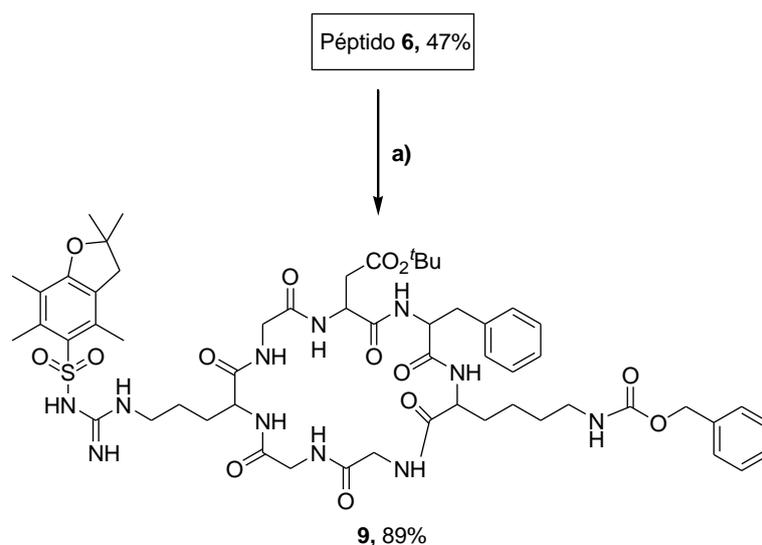


Figura 33: Estrutura dos péptidos cíclicos com a sequência RGD **9** e **10**.

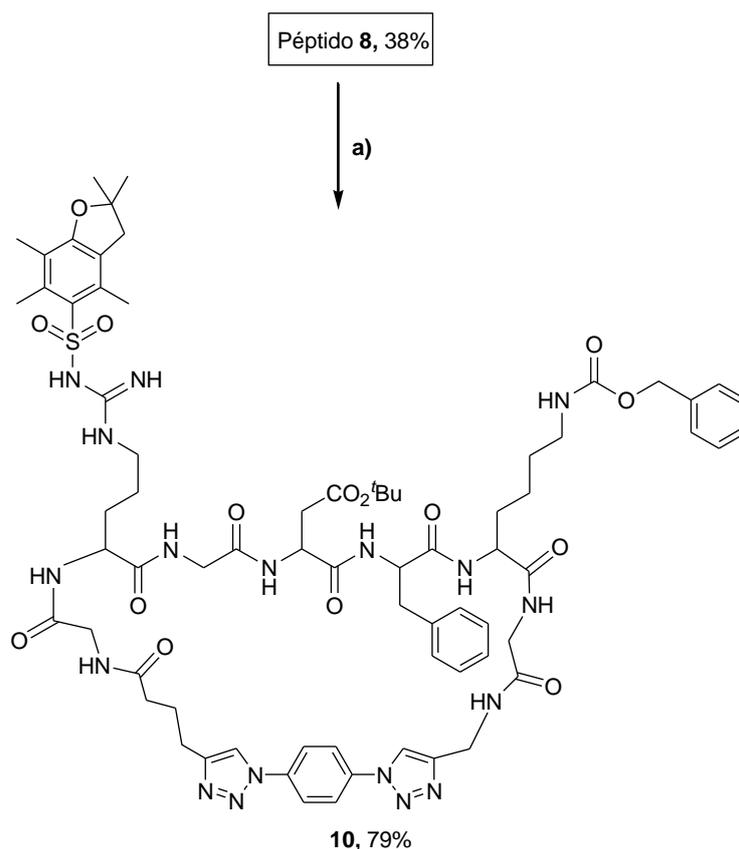
O péptido **6** foi sintetizado em fase sólida e isolado com um rendimento de 47%. Posteriormente foi ciclizado em solução por formação de uma ligação amida entre os resíduos de glicina (ciclização *head-to-tail*) na presença de DIPEA como base, e de HBTU e HOBt como agentes de acoplamento. Este último passo permitiu formar o péptido **9** com um rendimento de 89% (**Esquema 10**).



Esquema 10: Síntese do péptido **9**. a) HBTU (1,0 eq.), DIPEA (1,0 eq.), DMF, t.a., 20 h..

Os espetros de RMN de ^1H em DMSO-d_6 dos péptidos linear **6** e do correspondente cíclico **9** não evidenciam grandes diferenças. A identificação e caracterização dos dois péptidos foi efetuada por *HRMS*. O composto **6** apresenta um valor de $[\text{M}+\text{H}]$ igual a 1178,5551 ($\text{C}_{56}\text{H}_{80}\text{N}_{11}\text{O}_{15}\text{S}$) e o péptido **9**, um valor de $[\text{M}+\text{H}]$ de 1160,5445 ($\text{C}_{56}\text{H}_{78}\text{N}_{11}\text{O}_{14}\text{S}$). Os resultados obtidos confirmam a formação do péptido cíclico **9** a partir do péptido linear **6** por perda de uma molécula de água para a formação da ligação amida.

O péptido **8** foi ciclizado através de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen com o 1,4-diazidobenzeno **2**, dando origem ao péptido **10** com um rendimento de 79% (**Esquema 11**). O péptido cíclico **10** caracteriza-se pela presença de dois anéis de 1,2,3-triazole, que são isósteros da ligação amida.



Esquema 11: Síntese do péptido **10**. a) 1,4-diazidobenzeno **2** (1,0 eq.), CuI (0,02 eq.), Et₃N (2,2 eq.), DMF, t.a., 5,5 d..

Os espectros de RMN de ¹H em DMSO-d₆ do péptido linear **8** e do péptido cíclico **10** são comparados na **Tabela 7**. As diferenças mais notórias são identificadas no valor de desvio químico dos prótons do grupo CH₂ propargílico que registam um aumento significativo de 3,84-3,87 ppm no péptido linear **8** para 4,41 ppm no péptido cíclico **10**. Analogamente, também os sinais dos prótons do pentino mostram alterações para maiores valores de desvio químico no péptido cíclico **10**. Todos estes aumentos nos valores de desvio químico dos sinais correspondentes aos grupos propargílico e pentino são explicados pela formação de dois anéis de 1,2,3-triazole pela cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen.

Tabela 7: Valores de desvio químico, em DMSO- d_6 , dos sinais dos prótons dos grupos propargílico e pentino antes da ciclização (péptido **8**) e depois da ciclização (péptido **10**).

Péptido	Sinais (Valores de δ em ppm)					
	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO			CH ₂ NH		CH Triazole
	CH ₂	CH ₂	CH ₂ CO	CH ₂	NH	
8	2,14	1,58-1,68	2,20	3,84-3,87	8,01-8,20	*
10	2,72-2,81	1,89-2,06	2,23-2,37	4,41	8,55-8,65	7,94 e 8,08

* Não possui.

Os péptidos cíclicos **9** e **10** foram ainda caracterizados por *HRMS* com o objetivo de confirmar a formação dos mesmos (**Tabela 8**).

Tabela 8: Valores de *HRMS* dos péptidos cíclicos **9** e **10**.

Péptido	Fórmula Molecular	Valor de <i>HRMS</i> calculado [M+H]	Valor de <i>HRMS</i> obtido [M+H]
9	C ₅₆ H ₇₈ N ₁₁ O ₁₄ S	1160,5472	1160,5445
10	C ₇₁ H ₉₃ N ₁₈ O ₁₅ S	1469,6810	1469,6783

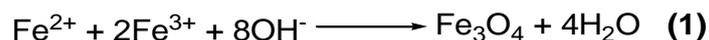
2.2. Preparação e caracterização de nanopartículas

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro (NPs OF@Au) e as nanopartículas de ouro (NPs Au) têm várias aplicações em diversas áreas, tais como a biomedicina ou a química analítica.^{29,50,54,55} Este grupo de nanopartículas poderá ser facilmente vetorizado utilizando diferentes tipos de agentes funcionalizados com grupos tiol.^{48,52} Péptidos com a sequência RGD são muitas vezes utilizados para este fim.^{3,78-80}

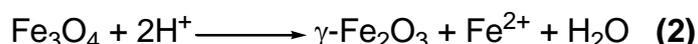
Algumas das nanopartículas preparadas foram caracterizadas por dispersão dinâmica de luz (*DLS - Dinamic Light Scattering*), microscopia eletrônica de varrimento (*SEM - Scannig Electron Microscopy*), espectroscopia de energia dispersiva (*EDS - Energy Dispersive Spectroscopy*) e espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-Vis).

2.2.1. Preparação e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

Neste trabalho as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPs OF) foram preparadas por co-precipitação de sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio alcalino (NaOH) segundo a **eq. 1**.⁵



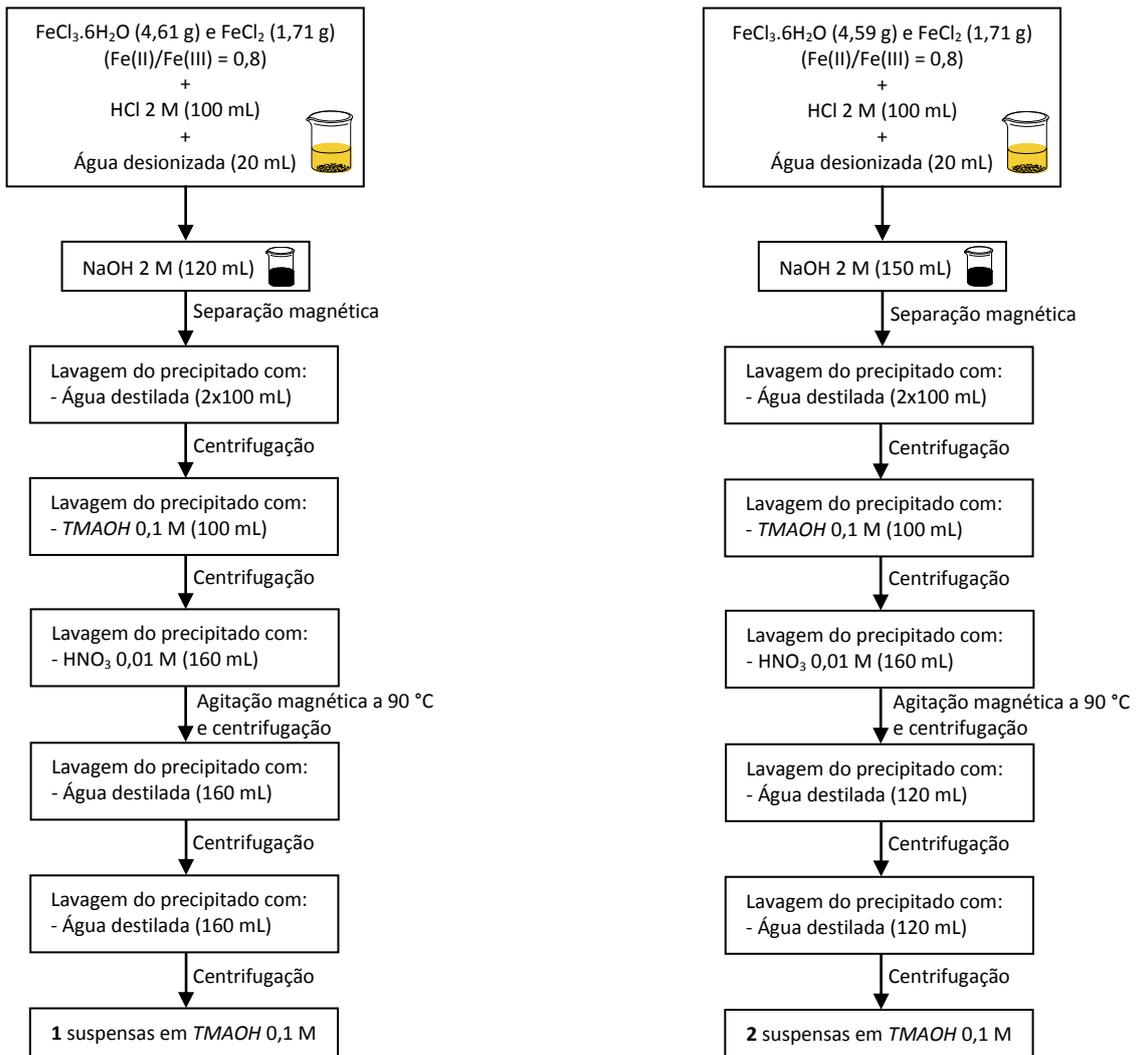
A magnetite (Fe_3O_4 , cor preta) sofre oxidação na presença de oxigénio sendo transformada em magmrite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, cor castanho escuro) de acordo com a **eq. 2**.⁵



Na preparação de nanopartículas de óxido de ferro (NPs OF) foram utilizadas duas razões molares Fe(II)/Fe(III) (0,8 e 0,5) e dois agentes de estabilização [solução aquosa de hidróxido de tetrametilamónio 0,1 M (*TMAOH* 0,1 M) e solução aquosa de ácido clorídrico 0,01 M (*HCl* 0,01 M)]. Esta preparação foi igualmente testada na presença e na ausência de oxigénio. As condições de preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro encontram-se sumariadas na **Tabela 9** e no **Esquema 12** e **Esquema 13**.

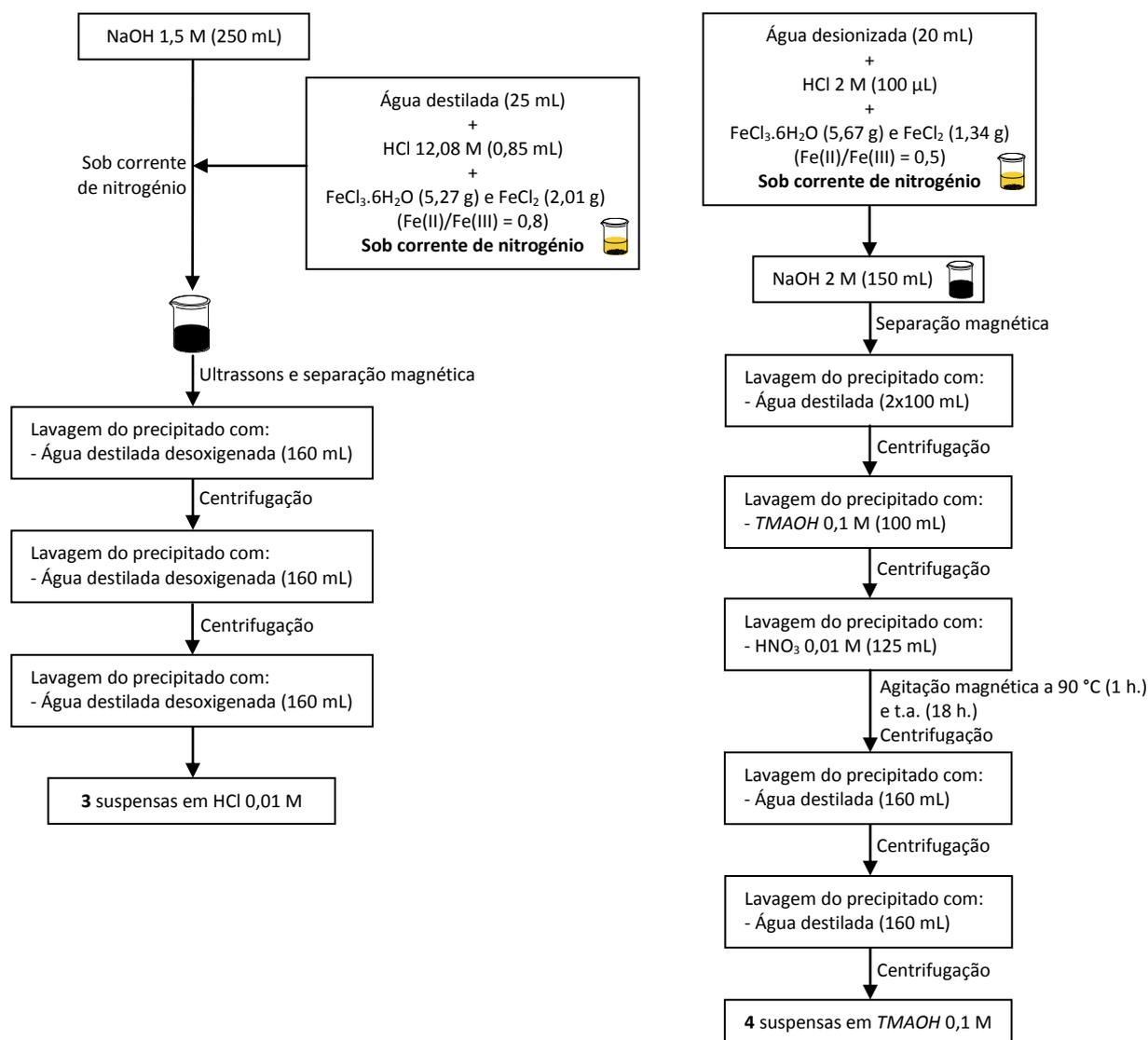
Tabela 9: Condições experimentais usadas na preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.

Amostra	Razão molar Fe(II)/Fe(III)	Sais de ferro utilizados	Ambiente de preparação	Agente de precipitação	Agente de estabilização
1	0,8	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e FeCl_2	Presença de oxigénio	NaOH 2 M (120 mL)	<i>TMAOH</i> 0,1 M
2	0,8	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e FeCl_2	Presença de oxigénio	NaOH 2 M (150 mL)	<i>TMAOH</i> 0,1 M
3	0,8	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e FeCl_2	Atmosfera de nitrogénio	NaOH 1,5 M (250 mL)	<i>HCl</i> 0,01 M
4	0,5	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e FeCl_2	Atmosfera de nitrogénio	NaOH 2 M (150 mL)	<i>TMAOH</i> 0,1 M



Esquema 12: Processo de preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPs OF) na presença de oxigênio.

2. Resultados e Discussão



Esquema 13: Processo de preparação das amostras de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPs OF) em atmosfera de nitrogénio.

Os resultados obtidos por *DLS* para as nanopartículas preparadas, nomeadamente os valores do diâmetro hidrodinâmico (*Z-average*) e os índices de polidispersividade (PDI), encontram-se na **Tabela 10**.

Tabela 10: Valores de tamanho (r) e respetivas percentagens, (Z -average) e índice de polidispersividade (Pdl) das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.

Amostra	Tamanho		Z -average (nm) $\pm \sigma$	Pdl $\pm \sigma$
	r (nm)	%		
1	228,4	83,1	237,6 \pm 84,24	0,516 \pm 0,196
2	271,6	97,3	215,9 \pm 40,47	0,263 \pm 0,221
3	365,4	100	416,0 \pm 10,78	0,314 \pm 0,0235
4	184,1	100	137,6 \pm 7,447	0,262 \pm 0,0195

De acordo com Denizot *et al.*²² a razão entre os sais de ferro influencia o tamanho médio das nanopartículas preparadas. Estes autores concluíram que o tamanho médio das NPs OF aumenta com o aumento da razão molar Fe(II)/Fe(III). Com efeito, verificou-se que as amostras **1**, **2** e **3** preparadas com uma razão molar Fe(II)/Fe(III) de 0,8 apresentam um tamanho médio maior quando comparadas com as nanopartículas da amostra **4** preparada com uma razão molar Fe(II)/Fe(III) 0,5 (**Tabela 10**).

Outro dos fatores descritos capaz de influenciar o tamanho das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro é a sua preparação na presença ou ausência de oxigénio.^{24,46} As amostras **1** e **2** foram preparadas na presença de oxigénio enquanto a amostra **4** foi preparada sob atmosfera de nitrogénio. No caso da amostra **3** o agente de estabilização é diferente e por isso não é possível comparar os resultados obtidos. De acordo com o descrito anteriormente por outros autores^{24,46} a preparação de nanopartículas de óxido de ferro na presença de oxigénio conduzia a partículas de tamanho maior e ainda a fenómenos de oxidação. Os resultados apresentados na **Tabela 10** evidenciam, tal como esperado, que as amostras **1** e **2** são constituídas por nanopartículas de maiores dimensões quando comparadas com as da amostra **4**.

Para além dos fatores já referidos, também a acidez e a força iónica do meio de precipitação influenciam o tamanho das nanopartículas de óxido de ferro. Verificou-se que valores elevados de pH e de força iónica conduzem à obtenção de nanopartículas mais pequenas e com uma distribuição de tamanhos mais estreita.⁵ Neste trabalho, as nanopartículas magnéticas preparadas usando como agente de estabilização a solução

aquosa de HCl 0,01 M (**3**) são consideravelmente maiores e apresentam maior índice de polidispersividade quando comparadas com as nanopartículas das amostras **1**, **2** e **4**. Estas últimas foram estabilizadas com uma solução aquosa de TMAOH 0,1 M, pH 10-12. Esta alteração do tamanho das nanopartículas com o valor de pH foi atribuída ao facto de a pH básico as interações entre os contra-íões $N(CH_3)_4^+$ e os íões OH^- adsorvidos na superfície das nanopartículas impedirem a agregação das mesmas e a consequente formação de aglomerados, não levando por isso, à determinação por *DLS* de nanopartículas de grandes dimensões. A pH ácido a formação de agregados é mais favorável.¹⁷ Considerando que estes possuem um coeficiente de difusão menor do que uma partícula isolada, o diâmetro da esfera medido por *DLS* é maior do que o tamanho elementar da partícula.^{46,75}

Como exemplo, na **Figura 34** apresenta-se a distribuição de tamanho por intensidade da amostra **4**, obtida por *DLS*. Esta figura mostra a presença de um pico largo a 184,1 nm (100%).

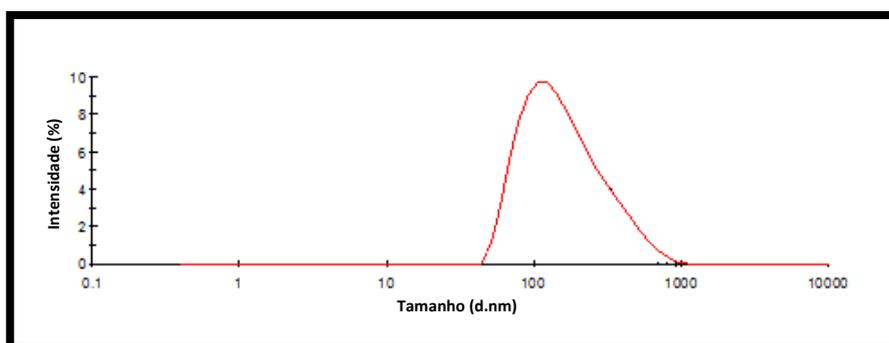


Figura 34: Distribuição de tamanho por intensidade, obtida por *DLS*, das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro da amostra **4**.

Os resultados obtidos por *DLS* devem ser analisados considerando as limitações da técnica. O valor do tamanho das nanopartículas mais preciso é dado pelo *Z-average*, no entanto este valor é obtido através da intensidade de luz dispersa, o que faz com que aglomerados de nanopartículas aumentem consideravelmente as distribuições por volume e por intensidade. É igualmente necessário, ter em conta neste tipo de análise, as possíveis interações entre partículas e a existência de artefactos.

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro preparadas (**1-4**) foram analisadas por *SEM*. Na **Tabela 11** apresentam-se os valores em nanómetros do tamanho médio das nanopartículas magnéticas.

Tabela 11: Valores de tamanho médio, obtidos por *SEM*, das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.

Amostra	Tamanho médio $\pm \sigma$ (nm)
1	17,0 \pm 2,36
2	16,0 \pm 0,751
3	*
4	13,0 \pm 0,794

* Não foi possível obter uma imagem de *SEM* de qualidade razoável.

Os tamanhos médios das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro obtidos por *DLS* são consideravelmente superiores aos obtidos por *SEM*. Este facto, observado por diversos autores^{46,99}, pode ser explicado através do estabelecimento de interações magneto-estáticas entre as nanopartículas que conduzem à formação de agregados. Chantrell *et al.*¹⁰⁰ observaram experimentalmente e confirmaram, utilizando simulações de Monte Carlo, a formação de anéis e *loops* de nanopartículas que possuem um coeficiente de difusão menor. Por outro lado, o tamanho das nanopartículas obtido por *DLS* pode também ser aumentado devido ao estabelecimento de uma camada estruturada de água em torno da superfície hidrofílica das nanopartículas.

Tudo o que foi referido sobre a relação entre as condições utilizadas na preparação de nanopartículas e o tamanho destas é verificado nos resultados obtidos por *SEM*. Na **Figura 35-A** e **35-B** apresentam-se as imagens de *SEM* das amostras **1 (A)** e **2 (B)**. O tamanho médio das nanopartículas varia entre os 17,0 nm e os 16,0 nm, respetivamente.

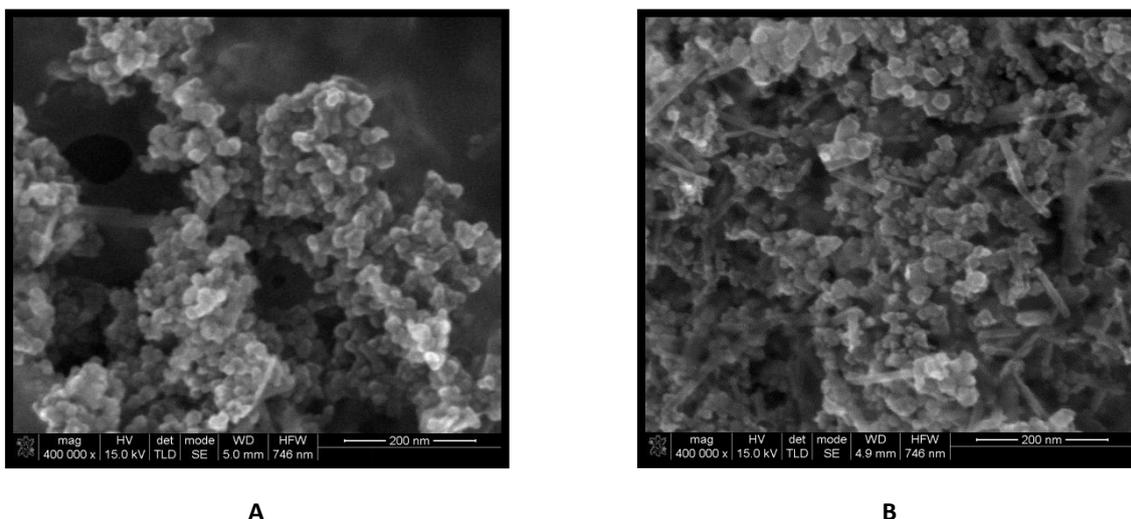


Figura 35: Imagens de SEM, obtidas com o detetor TLD (*Through-Lens*) no modo SE, das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro da amostra **1** - 17,0 nm (**A**) e da amostra **2** - 16,0 nm (**B**).

Na amostra **4** em que a razão molar Fe(II)/Fe(III) é de 0,5 o tamanho médio das nanopartículas varia entre 12,4 nm e 13,9 nm (**Figura 3**). Este resultado está de acordo com o descrito por vários autores^{17,21,49} em que foi utilizado o método de co-precipitação com a razão molar de sais de ferro igual a 0,5 (**Tabela 12**).

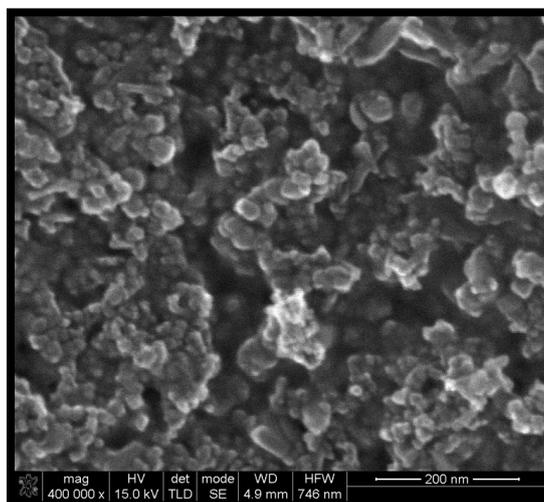


Figura 36: Imagem de SEM, obtida com o detetor TLD (*Through-Lens*) no modo SE, das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro da amostra **4** - 13,0 nm.

Tabela 12: Valores de tamanho médio, obtidos por *TEM*, de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro preparadas com uma razão molar Fe(II)/Fe(III) de 0,5.

Tamanho médio _{lit.} $\pm \sigma$ (nm)
$9,0 \pm 3,0^{17}$
$13,6 \pm 0,78^{21}$
$8,5 \pm 1,3^{49}$

É importante referir que também a microscopia eletrónica de varrimento (*SEM*) apresenta algumas limitações. A mais evidente está relacionada com o facto de a área analisada da amostra não ser representativa e corresponder apenas a uma fração da amostra total.

Juntamente com *SEM* também é possível determinar a composição química das nanopartículas por espectroscopia de energia dispersiva (*EDS*). Esta técnica baseia-se na deteção dos raios-X emitidos pela amostra cuja energia é característica dos átomos que a constituem.

Os espectros de *EDS* das quatro amostras, determinados em zonas de área igual, confirmam a presença de ferro e oxigénio nas nanopartículas preparadas. O espectro de *EDS* da amostra **4** é mostrado na **Figura 37**.

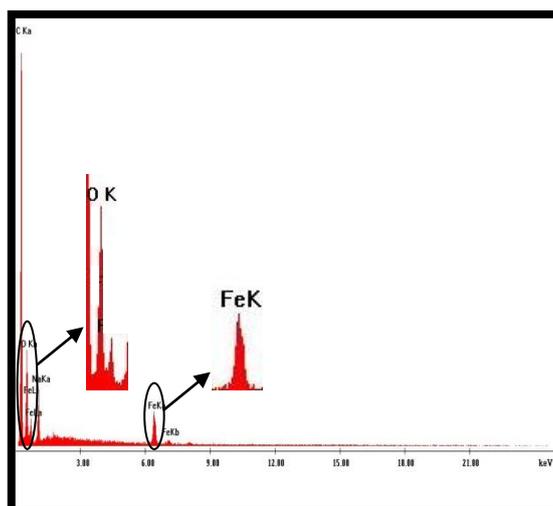


Figura 37: Espectro de *EDS* das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro da amostra **4** com evidência dos sinais de ferro (Fe) e de oxigénio (O). O pico de carbono (C) surge devido à utilização de fita de carbono na preparação da amostra para análise.

A caracterização das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro da amostra **4** foi também efetuada por espectroscopia de UV-Vis. As propriedades óticas das nanopartículas metálicas dependem do tamanho, forma, concentração, estado de aglomeração, solvente e índice de refração das nanopartículas.^{61,76}

A **Figura 38** mostra o espectro de UV-Vis das nanopartículas da amostra **4**. O espectro obtido é muito idêntico ao descrito por vários autores^{17,26} para nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com um tamanho médio de 10 nm.

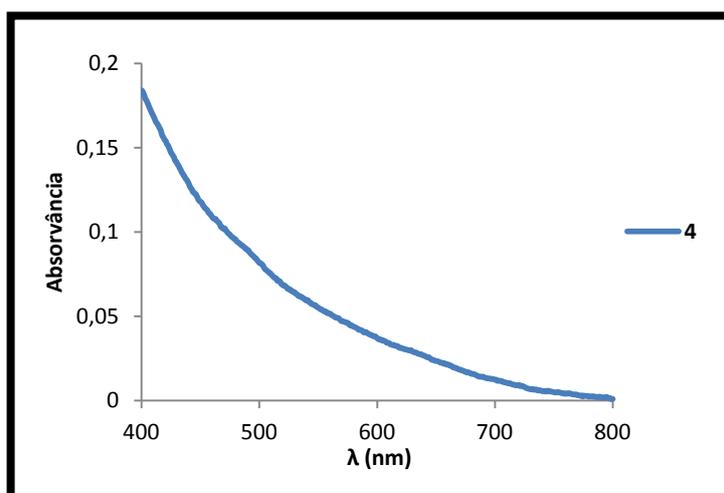


Figura 38: Espectro de UV-Vis da amostra **4** de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.

Tendo em consideração os resultados obtidos em termos de tamanho das nanopartículas e índices de polidispersividade foi decidido utilizar a amostra **4** na preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro.

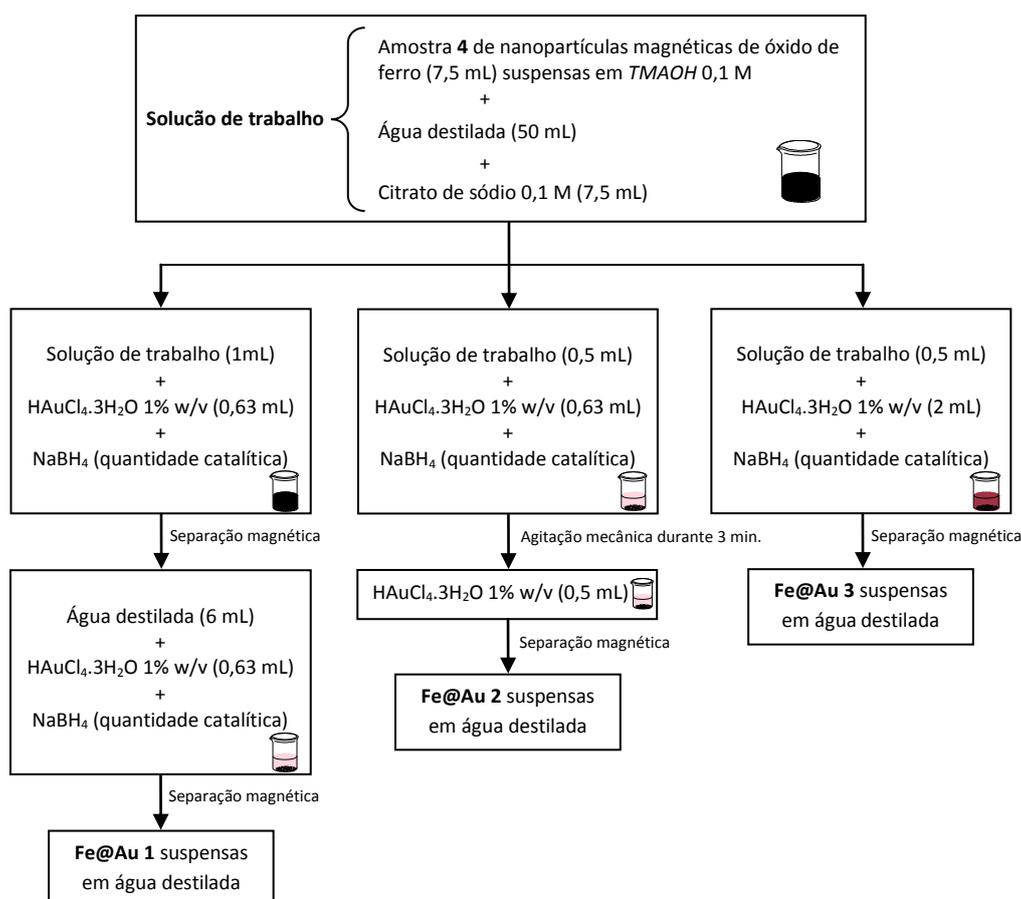
2.2.2. Preparação e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro

Na preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro (NPs OF@Au) foram feitos diferentes ensaios utilizando o boro-hidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor. A solução de trabalho foi preparada de acordo com o descrito por Williams *et al.*¹⁷, ou seja à amostra **4** de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro em *TMAOH* 0,1 M foi adicionado citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) como agente de estabilização. Esta solução foi posteriormente tratada com cloreto de ouro (III) tri-hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e NaBH_4 . A redução dos iões Au^{3+} resulta tanto na

formação nanopartículas magnéticas de óxido ferro revestidas com ouro como na formação de nanopartículas de ouro. A separação das nanopartículas de ouro foi feita utilizando um magnete.²⁶

Sim *et al.*²⁶ referiram que a utilização de boro-hidreto de sódio como agente redutor único não permite a preparação de NPs OF@Au sem haver troca dos iões de hidróxido de tetrametilamónio com os iões citrato, o que é indicativo do papel fundamental que os iões citrato desempenham na redução dos iões Au³⁺ na superfície do óxido de ferro.

Neste trabalho três amostras de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro foram preparadas usando boro-hidreto de sódio, **Fe@Au 1**, **Fe@Au 2** e **Fe@Au 3**. As condições experimentais utilizadas na preparação das referidas amostras são apresentadas no **Esquema 14**.



Esquema 14: Processo de preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro (NPs OF@Au).

A diferença na preparação das três amostras resulta das diferentes quantidades de solução aquosa de $\text{HauCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1% w/v utilizadas. Em todas as preparações foram efetuadas separações magnéticas que permitiram o isolamento das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro (**Figura 39**).

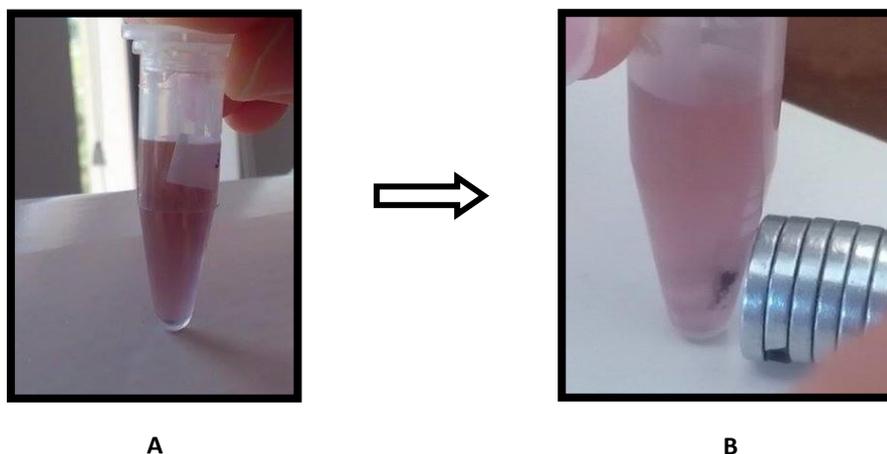


Figura 39: Evidência da magnetização das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ouro **Fe@Au 2**. Ausência de campo magnético (**A**) e presença de campo magnético (**B**).

As três amostras obtidas foram analisadas por *SEM*. Os tamanhos médios das nanopartículas encontram-se na **Tabela 13**.

Tabela 13: Valores de tamanho médio, obtidos por *SEM*, das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro.

Amostra	Tamanho médio $\pm \sigma$ (nm)
Fe@Au 1	16,8 \pm 1,91
Fe@Au 2	16,0 \pm 3,20
Fe@Au 3	19,8 \pm 2,80

De acordo com os resultados apresentados as três amostras preparadas apresentam tamanhos médios semelhantes entre si, e superiores aos observados para as nanopartículas de óxido de ferro da amostra **4** (13,0 nm).

A imagem de *SEM* da amostra **Fe@Au 1** (**Figura 40-A**) mostra nanopartículas com tamanhos entre os 14,6 nm e os 18,2 nm. Esta imagem evidencia igualmente a presença de nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento (nanopartículas mais

escuras) e de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ouro (nanopartículas mais claras). As nanopartículas da amostra **Fe@Au 3** apresentam uma forma circular e um tamanho que varia entre 17,0 nm e 22,6 nm (**Figura 40-B**). Estes resultados são confirmados nas imagens de *SEM* recolhidas com o detetor *BSED* (*Backscattered Electron Detector*) no modo A+B.

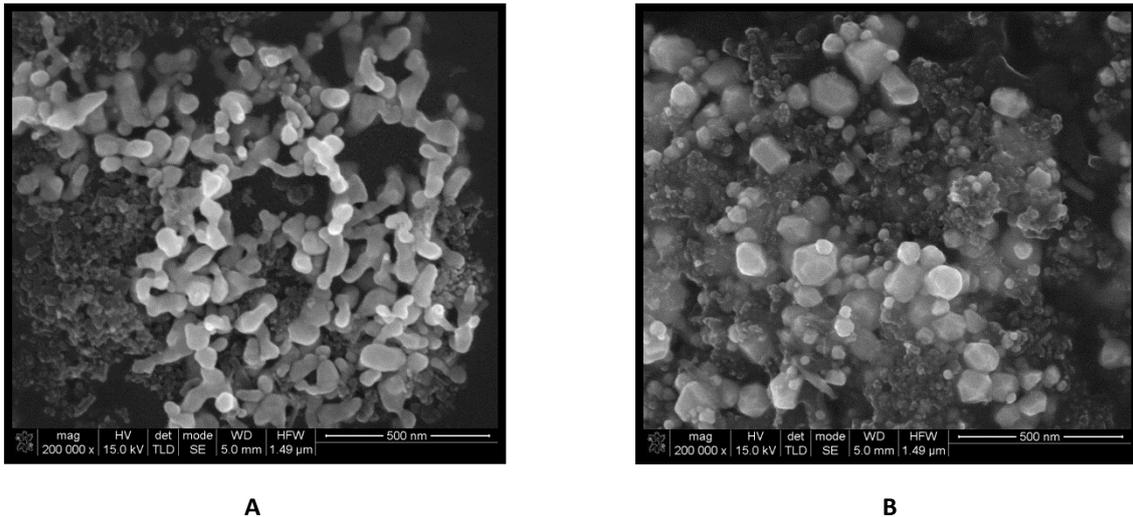


Figura 40: Imagem de *SEM*, obtida com o detetor *TLD* (*Through-Lens*) no modo SE, das nanopartículas da amostra **Fe@Au 1** - 16,8 nm (**A**) e da amostra **Fe@Au 3** - 19,8 nm (**B**).

Os resultados de *SEM* demonstram que o tamanho das nanopartículas da amostra **Fe@Au 2** varia entre 13,8 nm e 19,7 nm (**Figura 41-A**) e que as mesmas apresentam formas circulares. A utilização do detetor *BSED* (*Backscattered Electron Detector*) no modo A+B evidenciou as nanopartículas revestidas com ouro (**Figura 41-B**).

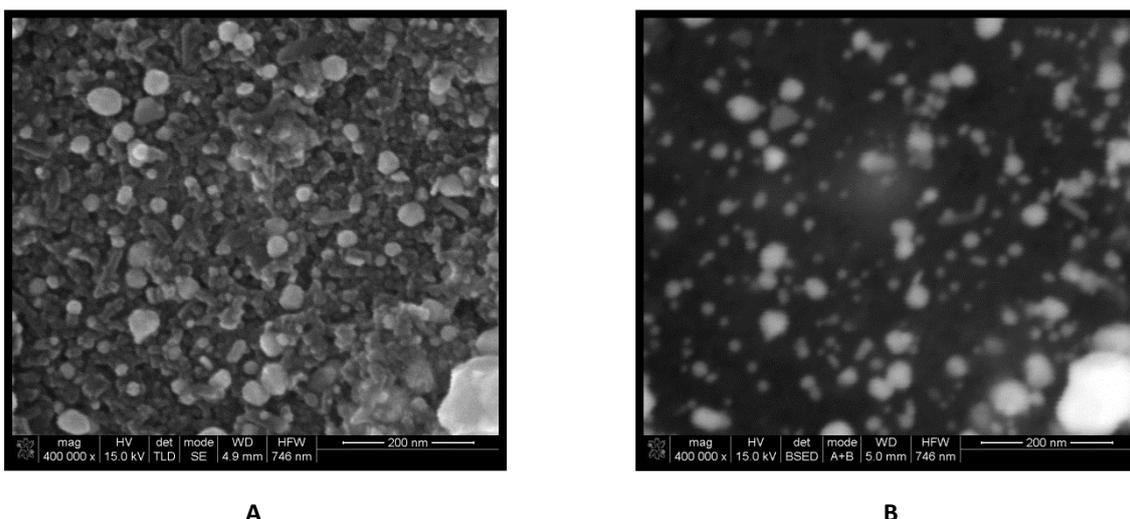


Figura 41: Imagem de SEM das nanopartículas da amostra **Fe@Au 2** - 16,0 nm - obtida com o detector TLD (*Through-Lens*) no modo SE (**A**) e com o detector BSED (*Backscattered Electron Detector*) no modo A+B (**B**).

A análise de EDS confirma a presença de ouro e de ferro nas três amostras de NPs OF@Au preparadas, no entanto não comprova a estrutura constituída por um núcleo de ferro com uma coroa de ouro. O espectro de EDS da amostra **Fe@Au 2** é exposto na **Figura 42**.

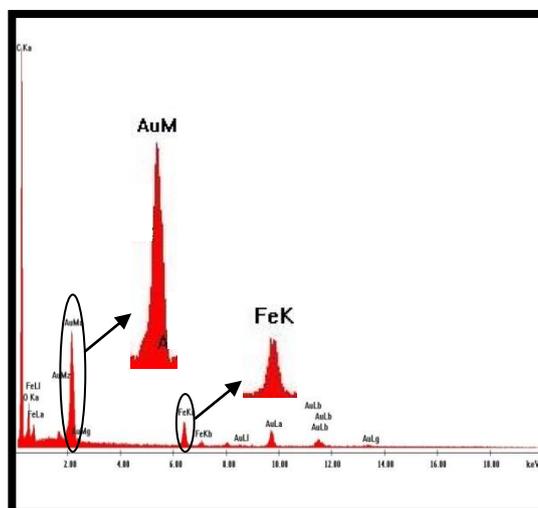


Figura 42: Espectro de EDS das nanopartículas da amostra **Fe@Au 2** com evidência dos sinais de ferro (Fe) e de ouro (Au). O pico de carbono (C) surge devido à utilização de fita de carbono na preparação da amostra para análise.

As nanopartículas de ouro possuem uma oscilação coletiva dos elétrons livres que é responsável por uma banda de absorção na região do visível do espectro eletromagnético. Esta é denominada como ressonância plasmônica superficial (*SPR - Surface Plasmon Resonance*).^{17,52,58} Em particular, tem sido referido que

nanopartículas de ouro estabilizadas em citrato exibem o pico da banda *SPR* a 520 nm.^{17,26} No entanto, o tamanho e a forma das nanopartículas de ouro têm um papel determinante nas propriedades óticas das mesmas^{52,54,56}, apesar de a forma ser considerada mais importante do que o tamanho das nanopartículas⁶⁰. Convém ainda referir que a constante dielétrica, a temperatura e o índice de refração do solvente também afetam a posição, a largura e a intensidade da banda *SPR*.^{54,56} A agregação das nanopartículas de ouro tem um efeito similar na banda *SPR* observada. Em amostras que possuem nanopartículas agregadas observa-se a existência de um pico secundário a menores comprimentos de onda e um desvio batocrômico (desvio para maiores comprimentos de onda) da banda *SPR* associado a uma diminuição da intensidade de absorção devido à depleção de nanopartículas estáveis.⁶¹ Contrariamente, nanopartículas monodispersas apresentam uma banda *SPR* típica.⁵⁸

Os espectros de UV-Vis das três amostras **Fe@Au 1**, **Fe@Au 2**, e **Fe@Au 3** utilizando várias diluições das amostras de nanopartículas são apresentados nas **Figuras 43-A, 43-B e 43-C**, respetivamente.

As três amostras possuem uma banda *SPR* indicadora da formação da coroa de ouro sobre o núcleo de ferro e/ou da formação de nanopartículas de ouro (NPs Au).

Os resultados obtidos permitem observar uma diminuição da intensidade das bandas de absorção proporcional à diminuição da concentração das amostras. As três amostras mostram possuir o seu máximo de absorção da banda *SPR* a diferentes valores de comprimento de onda. O máximo de absorção da amostra **Fe@Au 1** é de 531 nm, enquanto nas amostras **Fe@Au 2** e **Fe@Au 3** estes valores são de 557 nm e 555 nm, respetivamente (**Tabela 14, Figura 44**). Estas últimas amostras apresentam os seus valores de máximo de absorção das bandas *SPR* muito próximos, o que poderá significar nanopartículas de formas idênticas entre si e distintas da amostra **Fe@Au 1**.

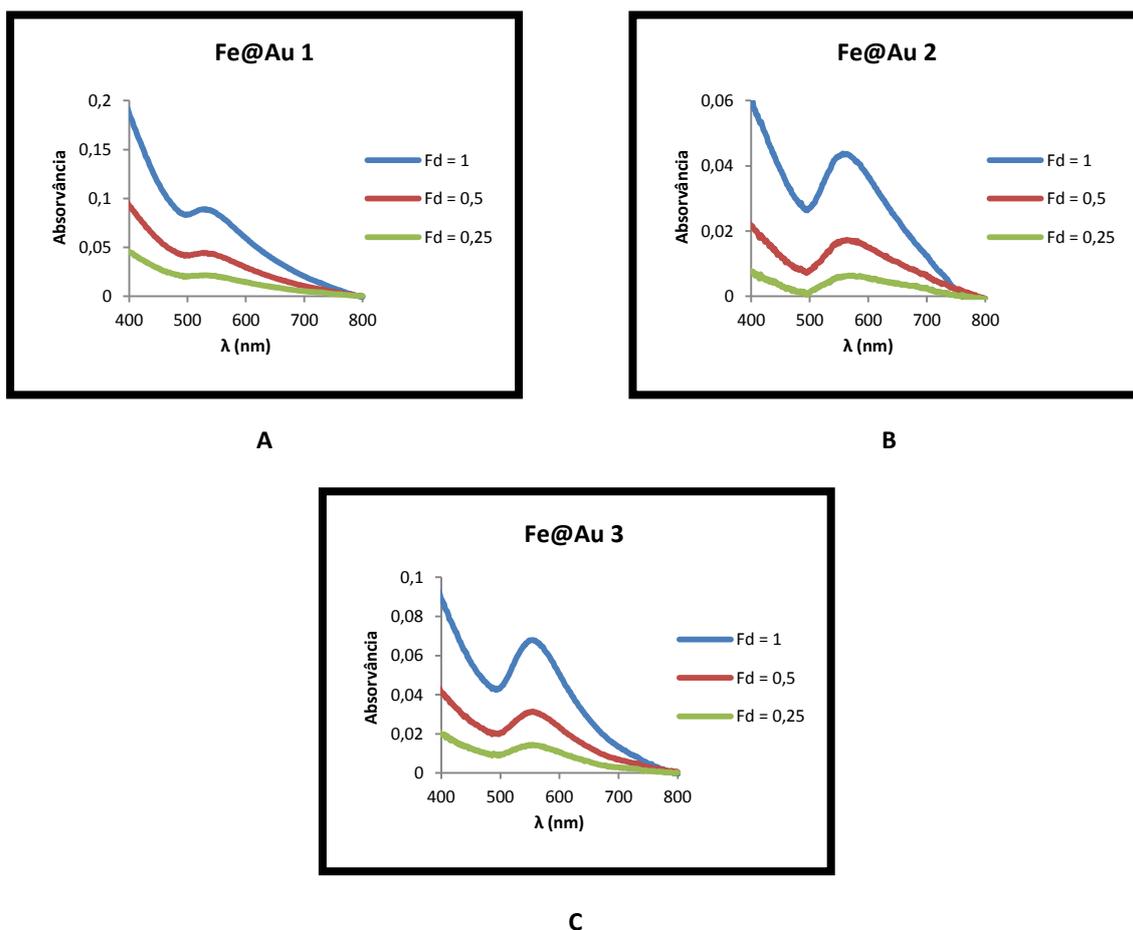


Figura 43: Espectros de UV-Vis das três amostras de nanopartículas **Fe@Au 1 (A)**, **Fe@Au 2 (B)** e **Fe@Au 3 (C)**. Fd = 1 corresponde à amostra inicial; Fd = 0,5 corresponde à amostra inicial diluída para metade e Fd = 0,25 corresponde à amostra inicial diluída para um quarto.

Tabela 14: Valores do comprimento de onda ($\lambda_{m\acute{a}x}$) do máximo de absorção ($Abs_{m\acute{a}x}$) da banda *SPR* das amostras de nanopartículas **Fe@Au 1**, **Fe@Au 2** e **Fe@Au 3**, e tamanho das nanopartículas determinado por *SEM*.

Amostra	Tamanho médio $\pm \sigma$ (nm)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	$Abs_{m\acute{a}x}$ (Fd= 1)
Fe@Au 1	16,8 \pm 1,91	531	0,0893
Fe@Au 2	16,0 \pm 3,20	557	0,0438
Fe@Au 3	19,8 \pm 2,80	555	0,0680

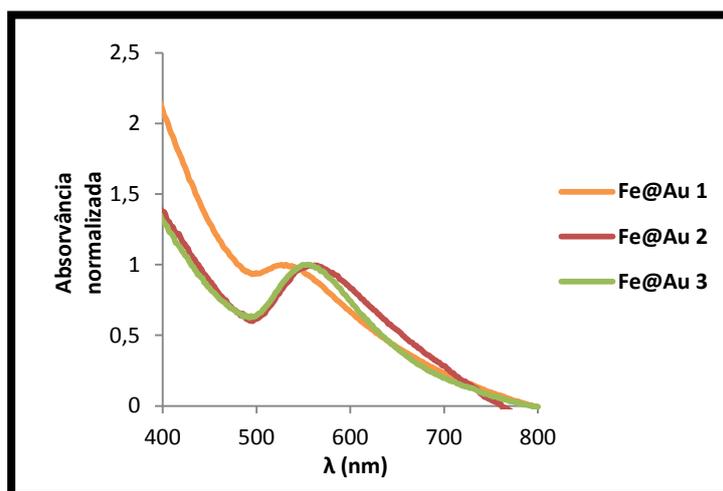


Figura 44: Espectros de UV-Vis com os valores de absorvância normalizados das amostras de nanopartículas Fe@Au 1, Fe@Au 2 e Fe@Au 3.

Nanopartículas com tamanho superior a 100 nm apresentam bandas largas de SPR na gama dos 600 nm devido à presença de ressonâncias plasmônicas superficiais longitudinais e transversais.^{58,70} Os dados de UV-Vis obtidos para as três amostras preparadas neste trabalho indicam, tal como verificado por SEM, que estas são constituídas por nanopartículas com tamanho inferior a 100 nm. De igual modo, como já foi referido, a forma das nanopartículas também influencia a posição e a forma da banda SPR.^{54,56} Assim, nanopartículas de forma esférica dão origem a máximos de absorção entre os 515 nm e os 570 nm, enquanto nanopartículas com outras formas apresentam o seu máximo a comprimentos de onda superiores (desvio batocrómico).⁵⁸ Considerando os resultados obtidos é provável que as nanopartículas das três amostras em estudo sejam maioritariamente de forma esférica.

Na **Figura 45-A** são apresentados os espectros de UV-Vis da amostra **4** de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e das três amostras de NPs OF@Au. Estes resultados demonstram que as amostras NPs OF@Au possuem nanopartículas com grande caráter de óxido de ferro. Apesar dos espectros de UV-Vis das amostras **Fe@Au 1**, **Fe@Au 2** e **Fe@Au 3** mostrarem a existência de uma banda SPR característica da presença de ouro nas nanopartículas, não confirmam a estrutura formada por um núcleo de ferro com uma coroa de ouro. No entanto, estes resultados são semelhantes aos descritos por outros autores^{17,26,48,52} para este tipo de nanopartículas (**Figura 45-B**).

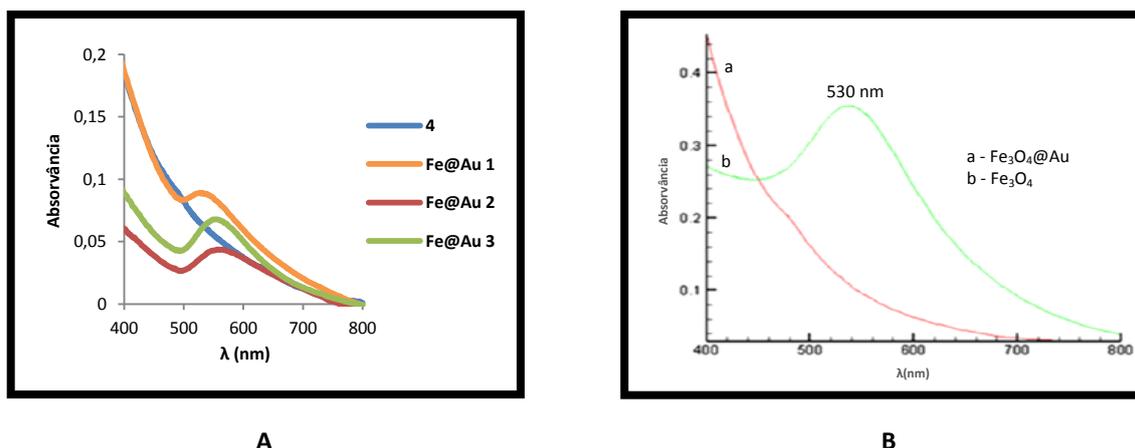


Figura 45: Espectros de UV-Vis das amostras de nanopartículas **Fe@Au 1**, **Fe@Au 2** e **Fe@Au 3** e da amostra das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro pré-revestimento (**4**) (**A**) e de amostras de nanopartículas de Fe₃O₄ e Fe₃O₄@Au (**B** - Adaptado de ⁵²).

A concentração das nanopartículas nas três amostras não foi determinada, uma vez que o valor de coeficiente de extinção molar (ϵ) é variável de amostra para amostra e dependente do tamanho das nanopartículas e dos agentes de estabilização utilizados.¹⁰¹

Todas as informações recolhidas por UV-Vis foram de encontro aos resultados determinados por *SEM*.

2.2.3. Preparação e caracterização de nanopartículas de ouro

Nanopartículas de ouro (NPs Au) multifuncionais e biocompatíveis têm sido muito usadas no diagnóstico e na terapia do cancro.⁵⁵ No entanto, podem ter outras aplicações, entre as quais podemos destacar a sua utilização como sensores de produtos biológicos e na oxidação de determinadas espécies como metanol e monóxido de carbono.⁵⁴

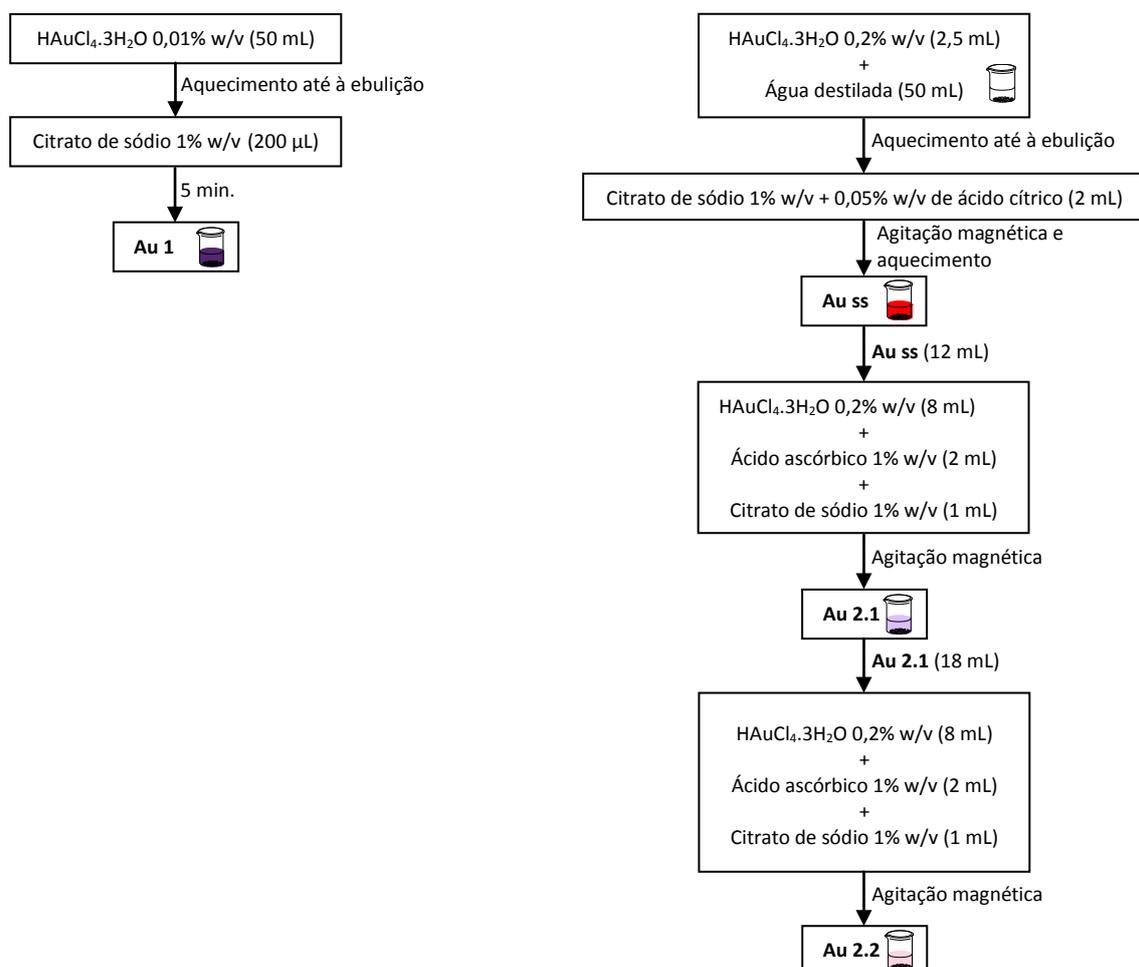
Existem vários métodos descritos para a preparação de nanopartículas de ouro com diferentes formas.⁵⁴ Contudo, alguns problemas são colocados quando o objetivo é obter nanopartículas de maiores dimensões.⁶⁰

Neste trabalho pretendeu-se preparar nanopartículas de ouro com dimensões superiores a 100 nm para aplicação na entrega controlada de fármacos. Estas foram preparadas recorrendo a dois procedimentos distintos que envolvem a redução dos iões Au³⁺, na presença de um agente redutor e de um agente estabilizante

(surfactante). Este último é adsorvido ou quimicamente ligado à superfície das nanopartículas de forma a evitar a repulsão das mesmas, permitindo também o controlo do tamanho e da forma da nanopartícula. Como agentes redutores foram utilizados o citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) e o ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$). Um dos métodos é descrito como sendo uma preparação direta seguindo o método de Frens (**Au 1**), enquanto o outro consiste no método de *seeding growth* (**Au 2**) (**Tabela 15** e **Esquema 15**).

Tabela 15: Condições experimentais usadas na preparação de nanopartículas de ouro.

Amostra	Método de preparação	Sal de ouro utilizado	Agente redutor	Agente de estabilização
Au 1	Preparação direta Método de Frens	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,01% w/v	Citrato de sódio 1% w/v	Citrato de sódio 1% w/v
Au 2	<i>Seeding growth</i>	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,2% w/v	Ácido ascórbico 1% w/v	Citrato de sódio 1% w/v



Esquema 15: Processo de preparação de nanopartículas de ouro (NPs Au).

Na preparação da amostra de nanopartículas **Au 1**, o citrato de sódio foi utilizado como agente redutor e de estabilização, seguindo o método de Frens adaptado por Long *et al.*⁶⁸.

As nanopartículas da amostra **Au 1**, retirada após 5 min. da adição da solução de citrato de sódio 1% w/v, foram caracterizadas por *DLS*. As nanopartículas apresentam um valor de diâmetro hidrodinâmico (*Z-average*) de 60,0 nm e um valor de Pdl de 0,414, bastante acima do valor recomendado ($\cong 0,1$) o que poderá significar que pelo método descrito não foi possível a obtenção de nanopartículas com uma polidispersividade aceitável. Na **Figura 46** apresenta-se a distribuição de tamanho por intensidade da amostra **Au 1**. Esta figura mostra a presença de um pico largo a 102,4 nm (91,5%) e outro mais estreito a 13,82 nm (8,5%).

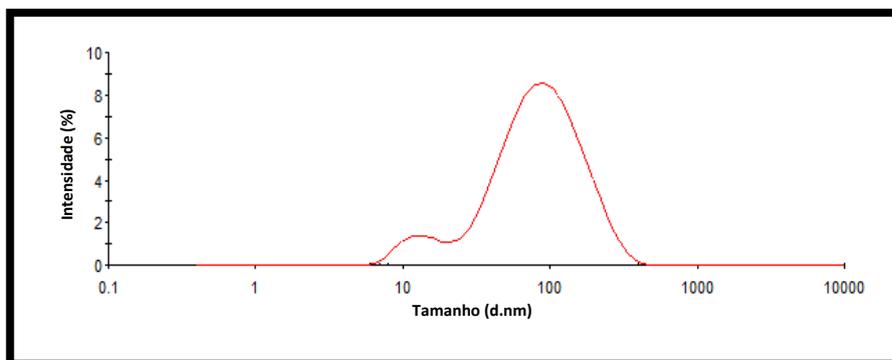


Figura 46: Distribuição de tamanho por intensidade, obtida por *DLS*, das nanopartículas de ouro da amostra **Au 1**.

As nanopartículas de ouro da amostra **Au 1** foram caracterizadas por *SEM*. Os resultados obtidos indicam que as nanopartículas da amostra **Au 1** (**Figura 47**) apresentam forma circular e tamanhos que variam entre 45,7 nm e 73,0 nm, com um tamanho médio de 60,9 nm.

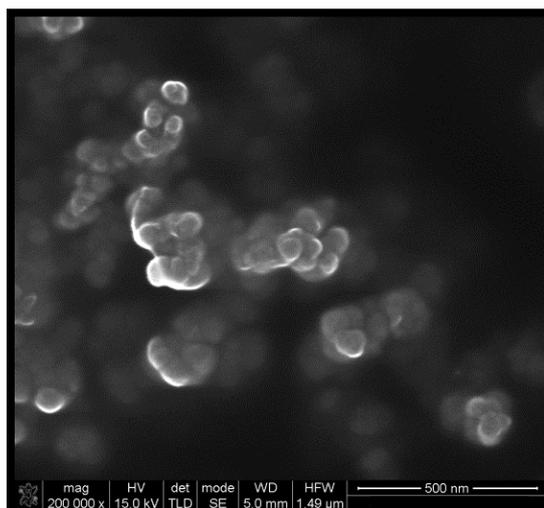


Figura 47: Imagem de SEM, obtida com o detetor TLD (*Through-Lens*) no modo SE, das nanopartículas de ouro da amostra **Au 1** - 60,9 nm.

O espectro relativo à análise por EDS das nanopartículas **Au 1** confirma que a amostra é constituída somente por partículas de ouro (**Figura 48**).

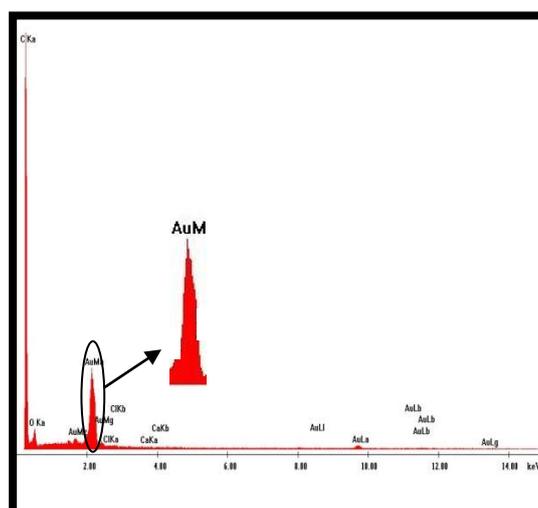


Figura 48: Espectro de EDS das nanopartículas de ouro da amostra **Au 1** com evidência do sinal de ouro (Au). O pico de carbono (C) surge devido à utilização de fita de carbono na preparação das amostras para análise.

O máximo de absorção da banda *SPR* da amostra **Au 1** surge a 597 nm. Este resultado afasta-se do obtido por Long *et al.*⁶⁸, que descreveram valores de máximo de absorção da banda *SPR* de 540 nm para nanopartículas de ouro de 60 nm. Esta diferença poderá ser atribuída a nanopartículas com formas diferentes na amostra em estudo.

Com o objetivo de preparar nanopartículas de ouro de maior tamanho, testou-se um método de preparação alternativo envolvendo o ácido ascórbico como agente redutor e o citrato de sódio como agente de estabilização. Este método é baseado no trabalho de Eychmüller *et al.*⁶⁰ e é um método de *seeding growth*. Esta estratégia permite a síntese de nanopartículas de vários tamanhos, uma boa distribuição de tamanhos e utiliza agentes estabilizadores e redutores não tóxicos, não necessitando de etapas de purificação.⁶⁰ Para além disto, o método de *seeding growth* permite ainda um melhor controlo do tamanho e morfologia das nanopartículas, e a preparação pode ser concluída numa única etapa, como pode possuir várias etapas de revestimento de forma a obter nanopartículas maiores.⁷³

Assim, utilizando este método de *seeding growth*, inicialmente foi preparada a *seeding solution* (**Au ss**) utilizada como solução de trabalho, e a partir da qual se efetuaram as duas etapas de revestimento (**Au 2.1** e **Au 2.2**). A *seeding solution* foi preparada utilizando o método de Frens com citrato de sódio como agente redutor, o que permitiu a preparação de nanopartículas de ouro de pequenas dimensões. A cor da *seeding solution* passou de incolor a vermelho vivo alguns minutos após a adição da solução aquosa de citrato de sódio 1% w/v + 0,05% w/v de ácido cítrico. Esta mudança de cor é indicativa da formação de nanopartículas de ouro.⁷⁰

A análise de *SEM* da *seeding solution* (**Au ss**) indica a presença de nanopartículas circulares com tamanhos entre os 11,7 nm e os 13,1 nm (**Figura 49**). Estes resultados estão de acordo com os referidos por diversos autores^{60,70}.

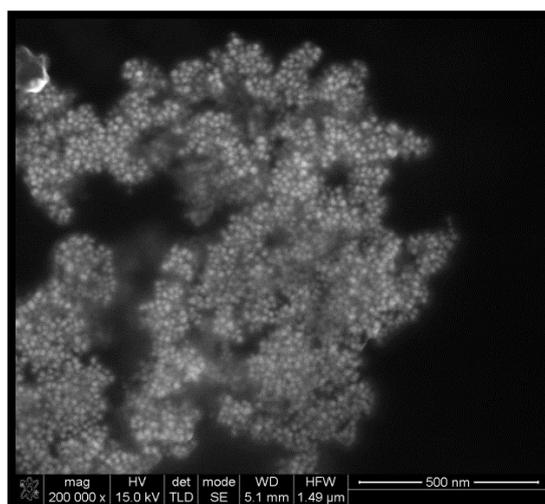


Figura 49: Imagem de *SEM*, obtida com o detetor *TLD* (*Through-Lens*) no modo *SE*, das nanopartículas de ouro da amostra **Au ss** - 12,2 nm.

A amostra **Au ss** foi submetida a análise de *EDS* e o resultado mostra a existência de partículas de ouro (**Figura 50**).

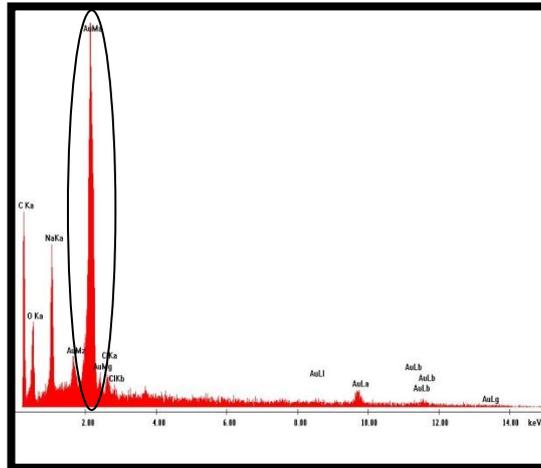


Figura 50: Espectro de *EDS* das nanopartículas de ouro da amostra **Au ss** com evidência do sinal de ouro (Au). O pico de carbono (C) surge devido à utilização de fita de carbono na preparação das amostras para análise.

Na **Figura 51** apresenta-se o espectro de UV-Vis das nanopartículas da *seeding solution* (**Au ss**). O máximo de absorção da banda *SPR* surge a 519 nm. Este valor está muito próximo do descrito por Dong *et al.*¹⁰² que afirmaram que nanopartículas de aproximadamente 13,0 nm possuem a banda *SPR* a 521 nm.

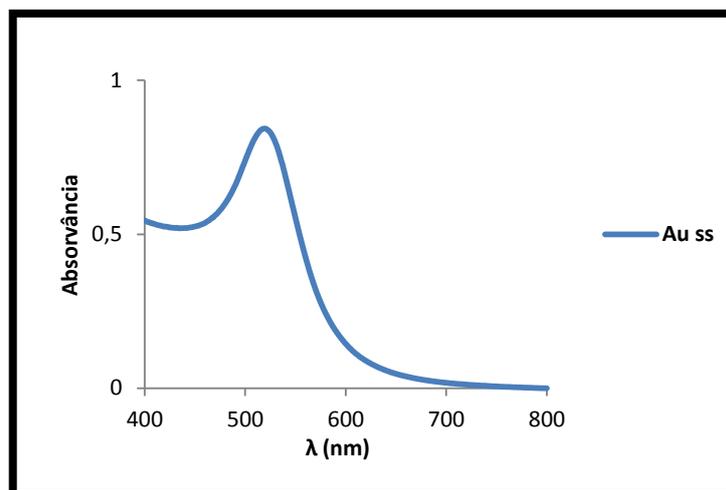


Figura 51: Espectro de UV-Vis da amostra **Au ss**.

As amostras **Au 2.1** e **Au 2.2** resultantes de uma e duas etapas de revestimento, respetivamente, foram analisadas por *SEM* (**Figura 52-A** e **Figura 52-B**). Assim, tal como esperado, verifica-se um aumento do tamanho das nanopartículas de ouro

desde a *seeding solution* (tamanho médio 12,2 nm) até à primeira etapa de crescimento **Au 2.1** (tamanho médio 35,9 nm), mantendo-se a forma circular das mesmas. Analogamente, a segunda etapa de revestimento leva a um aumento do tamanho das nanopartículas em relação à primeira etapa. As nanopartículas pertencentes à amostra **Au 2.2** possuem uma média de tamanhos de 80,3 nm e mantêm a forma circular. Os valores de tamanho médio das nanopartículas encontram-se na **Tabela 16**. Estes resultados estão de acordo com os descritos por outros autores^{60,65,70}. Eychmüller *et al.*⁶⁰ afirmaram que com uma única etapa de revestimento é possível obter nanopartículas de ouro com 30 nm, enquanto nanopartículas com 69 nm e 118 nm são obtidas com uma segunda etapa de revestimento.

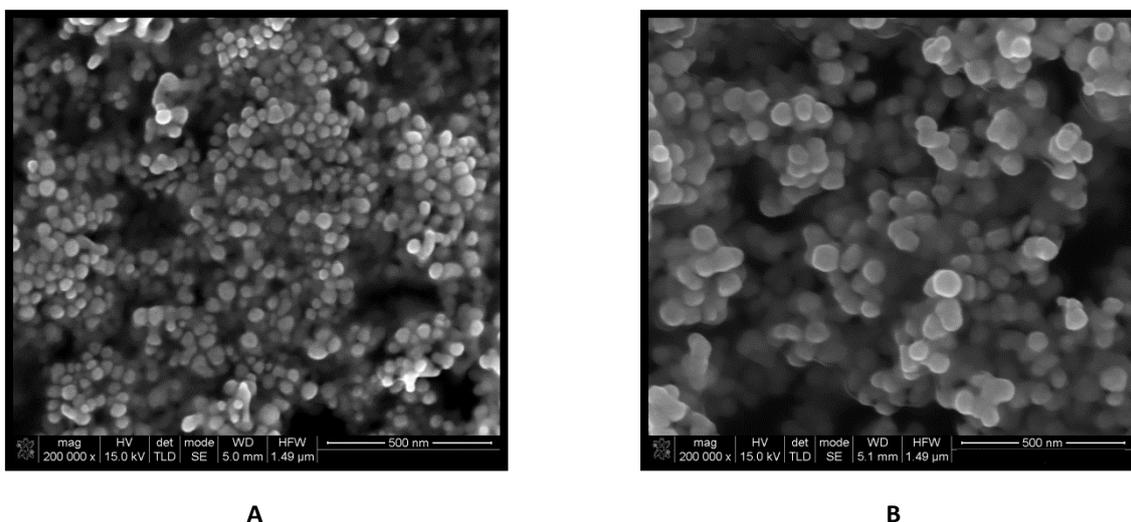


Figura 52: Imagens de SEM, obtidas com o detetor TLD (*Through-Lens*) no modo SE, das nanopartículas de ouro das amostras **Au 2.1** - 35,9 nm (**A**) e **Au 2.2** - 80,3 nm (**B**).

Tabela 16: Valores de tamanho médio, obtidos por SEM, das nanopartículas de ouro das amostras **Au ss**, **Au 2.1** e **Au 2.2**.

Amostra	Tamanho médio $\pm \sigma$ (nm)
Au ss	12,2 \pm 0,808
Au 2.1	35,9 \pm 2,84
Au 2.2	80,3 \pm 5,55

A análise de *EDS*, numa zona de análise de área igual nas duas amostras (**Au 2.1** e **Au 2.2**) mostra a presença exclusiva de partículas de ouro (**Figura 53-A** e **Figura 53-B**).

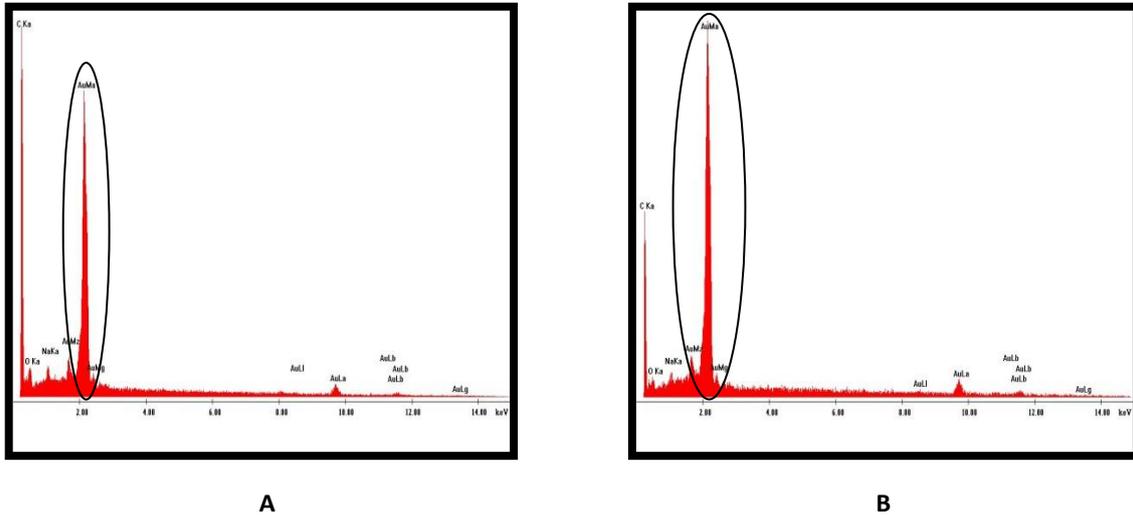


Figura 53: Espectros de *EDS* das nanopartículas de ouro das amostras **Au 2.1** (**A**) e **Au 2.2** (**B**) com evidência dos sinais de ouro (Au). O pico de carbono (C) surge devido à utilizada de fita de carbono na preparação das amostras para análise.

A análise por UV-Vis da amostra **Au 2.1** evidencia uma banda *SPR* com um máximo de absorção muito semelhante ao correspondente à amostra **Au ss** (**Figura 54-A**). A comparação da forma e da largura das bandas foi facilmente efetuada após normalização (**Figura 54-B**). Os valores de máximo de absorção das bandas *SPR* das duas amostras (**Au ss** e **Au 2.1**) encontram-se na **Tabela 17**.

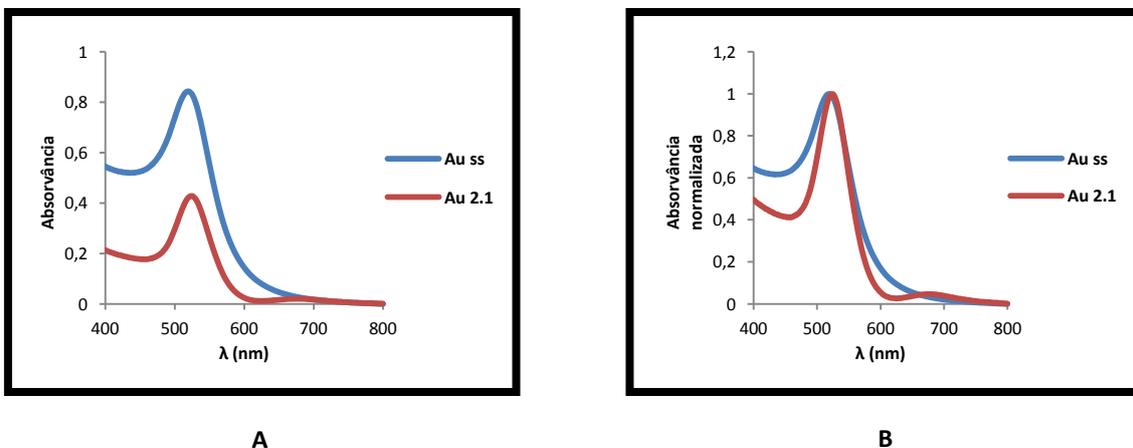


Figura 54: Espectros de UV-Vis das amostras de nanopartículas de ouro **Au ss** e **Au 2.1** (**A**) e os mesmos espectros com os valores de absorvância normalizados (**B**).

Tabela 17: Valores do comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) do máximo de absorção ($\text{Abs}_{\text{máx}}$) da banda *SPR* de duas amostras de nanopartículas de ouro **Au ss** e **Au 2.1**, e tamanho das nanopartículas determinado por *SEM*.

Amostra	Tamanho médio $\pm \sigma$ (nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\text{Abs}_{\text{máx}}$
Au ss	12,2 \pm 0,808	519	0,843
Au 2.1	35,9 \pm 2,84	524	0,428

As nanopartículas de ouro com forma esférica possuem uma banda *SPR* característica na zona visível do espectro eletromagnético.⁵⁸ Considerando que a banda *SPR* sofre uma diminuição de largura e um desvio ipsocrômico (desvio para menores comprimentos de onda) à medida que o diâmetro do núcleo da nanopartícula diminui^{53,60,70,102}, é compreensível que as nanopartículas da *seeding solution* (**Au ss**) possuam um máximo de absorção (519 nm) a menor comprimento de onda do que as nanopartículas da amostra **Au 2.1** (524 nm). Ao contrário dos resultados de UV-Vis obtidos para as nanopartículas preparadas via método de Frens, as nanopartículas obtidas pelo método de *seeding growth* apresentam valores de máximo de absorção da banda *SPR* concordantes com o descrito na literatura. Long *et al.*⁶⁸ relataram que nanopartículas de ouro com 30 nm apresentam o máximo de absorção da banda *SPR* a 521 nm. Também Zhu *et al.*⁷⁰ afirmaram que nanopartículas de 28 nm possuem o seu máximo de absorção a 525 nm.

Assumindo que no presente trabalho seguindo o método *seeding growth*, as duas etapas de revestimento permitiram obter nanopartículas de ouro com um tamanho médio de 80,3 nm e de forma esférica, é possível afirmar que os resultados são bastante animadores e confiáveis, pelo que o procedimento adotado se assume uma boa opção para o desenvolvimento de nanopartículas de ouro com cerca de 80 nm.

É provável que utilizando o método de *seeding growth* e efetuando mais etapas de revestimento seja possível obter nanopartículas de ouro de tamanho superior a 100 nm.⁶⁰

Tal como já foi referido, as nanopartículas de ouro e as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro, preparadas neste trabalho, serão posteriormente testadas como agentes para a entrega controlada de fármacos.

3. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Neste trabalho foram sintetizados oito compostos com bons rendimentos entre reagentes de partida e produtos finais. Todos os compostos foram caracterizados utilizando técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C) e espectrometria de massa de alta resolução (HRMS). O trabalho envolveu ainda, a preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPs OF) seguida do revestimento das mesmas com ouro (NPs OF@Au), e a síntese de nanopartículas de ouro (NPs Au).

Três novos péptidos lineares com a sequência Arg-Gly-Asp (RGD) foram sintetizados utilizando a síntese peptídica em fase sólida (SPPS). A partir destes foram preparados dois novos péptidos cíclicos. A ciclização foi conseguida através da aplicação de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen ou por uma ciclização *head-to-tail*. Os péptidos cíclicos com a sequência RGD deverão, em etapas de investigação seguintes, ser utilizados como agentes de vetorização de nanopartículas magnéticas revestidas com ouro ou de nanopartículas de ouro. Este facto decorre da afinidade da sequência RGD para a integrina $\alpha_v\beta_3$ sobre-expressa em determinados tipos de células. Para tal, será necessária a ligação de uma molécula com um grupo tiol aos respetivos péptidos de modo a ser possível a vetorização das nanopartículas com os péptidos de RGD.

A preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro por co-precipitação de cloretos de ferro numa razão molar Fe(II)/Fe(III) de 0,5 em meio básico permitiu a obtenção de nanopartículas de menor tamanho do que as nanopartículas preparadas com uma razão molar Fe(II)/Fe(III) de 0,8. Verificou-se igualmente que nanopartículas preparadas na ausência de oxigénio são mais pequenas do que nanopartículas preparadas na presença de oxigénio. A influência do agente de estabilização utilizado na preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro no tamanho das nanopartículas foi também estudada. As nanopartículas estabilizadas a elevados valores de pH conduzem à obtenção de nanopartículas mais pequenas.

O revestimento com ouro das nanopartículas magnéticas foi efetuado utilizando boro-hidreto de sódio como agente redutor e permitiu obter, como esperado, nanopartículas de maior diâmetro quando comparadas com as nanopartículas pré-revestimento.

Nanopartículas de ouro com um tamanho médio de 60 nm foram preparadas utilizando o método de Frens (preparação direta) e citrato de sódio como agente

reductor e de estabilização. A preparação de nanopartículas de ouro por recurso ao método de *seeding growth* usando ácido ascórbico como agente reductor e citrato de sódio como agente de estabilização permitiu obter nanopartículas maiores através de etapas de crescimento sucessivas.

As nanopartículas foram caracterizadas utilizando técnicas de microscopia (*SEM*), *DLS* e métodos espectroscópicos (*UV-Vis* e *EDS*).

Como já foi referido, em trabalhos posteriores pretende-se ligar uma molécula com um grupo tiol aos péptidos cíclicos sintetizados e, posteriormente os mesmos serão utilizados na vetorização de nanopartículas de ouro (NPs Au) ou de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro (NPs OF@Au) para a entrega controlada de fármacos. As NPs Au e as NPs OF@Au poderão ainda funcionar como elétrodos bipolares permitindo a realização de eletrólises.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Procedimentos gerais

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram realizados num espectrofotómetro Bruker Avance III (400 MHz e 100 MHz) usando o pico do solvente como referência interna. Como solventes utilizaram-se o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) e o clorofórmio deuterado ($\text{CDCl}_3\text{-d}_1$). As constantes de acoplamento (J) foram obtidas em Hertz (Hz) e os deslocamentos químicos (δ) em partes por milhão (ppm). A atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C foi feita com o auxílio de espectros de *DEPT-135*, e de técnicas bidimensionais *COSY*, *HSQC* e *HMBC*.

Os espectros de infravermelhos foram efetuados num espectrofotómetro FT/IR 2000, ABB, e a preparação das amostras foi feita com Nujol em células de cloreto de sódio (NaCl).

A determinação do ponto de fusão (P.F.) foi efetuada no aparelho Gallenkamp e os valores não foram corrigidos.

As cromatografias em camada fina (*t.l.c.*) foram realizadas em placas Sílica gel 60 F_{254} , Merck-Millipore. As placas de *t.l.c.* foram reveladas no ultravioleta ($\nu = 254 \text{ nm}$) numa câmara CN-6 de luz ultravioleta e, por vezes, usada a revelação com iodo.

Os espectros de massa de alta resolução (*HRMS - High Resolution Mass Spectrometry*) utilizando o método de ionização *Electrospray Ionization* (ESI) foram efetuados pelo Serviço de Espectrometria de Massa da Universidade de Vigo, Espanha.

Na síntese peptídica em fase sólida (*SPPS - Solid Phase Peptide Synthesis*) foi usada a resina de cloreto de 2-clorotritilo (100-200 mesh) 1% DVB, com uma capacidade de 1,4 mmol/g.

A análise por dispersão dinâmica de luz (*DLS - Dynamic Light Scattering*) foi realizada no Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, usando um laser He-Ne (comprimento de onda de 633 nm) e um ângulo de deteção de 173° (*backscatter detection*). As análises foram efetuadas numa *cuvette* de poliestireno a 25°C . Para cada amostra foram feitas três medições. O *software* usado para a avaliação dos dados foi o Zetasizer 7.10, Malvern Instruments.

Nas análises por microscopia eletrónica de varrimento (*SEM - Scanning Electron Microscopy*) foi utilizado o microscópio eletrónico de varrimento de emissão de campo NOVA 200 NanoSEM (FEG/SEM), FEI Company, com uma voltagem de 15 Kv.

As análises químicas das amostras de nanopartículas foram feitas por espectroscopia de energia dispersiva (*EDS - Energy Dispersive Spectroscopy*) usando um detetor Si(Li) Pegasus X4M, EDAX, com uma voltagem de aceleração de 25 Kv. As amostras foram preparadas por deposição de uma gota de suspensão de nanopartículas numa fita de carbono sobre uma placa de alumínio deixando secar durante alguns minutos. Todas estas análises foram realizadas no Laboratório de Serviços de Caracterização de Materiais da Universidade do Minho (SEMAT/UM).

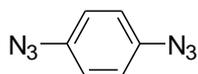
Os espetros de ultravioleta-visível (UV-Vis) foram feitos num espectrofotómetro UV-2501PC, Shimadzu.

Os reagentes e solventes utilizados foram maioritariamente usados na forma como foram adquiridos comercialmente. O diclorometano (DCM) foi pontualmente utilizado como solvente seco. Nessas situações, o mesmo foi seco com cloreto de cálcio (CaCl_2) e hidreto de cálcio (CaH_2) e, posteriormente destilado e armazenado em *molecular sieves*.

4.2. Síntese de péptidos cíclicos de RGD

4.2.1. Síntese de precursores

4.2.1.1. Síntese de 1,4-diazidobenzeno^{86,97}, **2**



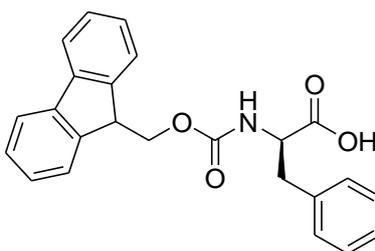
Num balão de reação dissolveu-se NaN_3 (5,00 mmol; 0,33 g) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (II) (0,40 mmol; 0,10 g) em metanol (5 mL). Em seguida juntou-se o ácido 1,4-benzeno-bis-borónico **1** (2,00 mmol; 0,33 g) e deixou-se em agitação magnética e à t.a.. A reação foi seguida por *t.l.c.* (eluente: éter etílico). Após 44 h., evaporou-se o solvente e extraiu-se a bis-azida com éter de petróleo. Evaporou-se o solvente a pressão reduzida tendo-se obtido composto **2** (1,13 mmol; 0,18 g; 57%) na forma de cristais de cor rosa.

RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$): 7,02 (4H, s, CH) ppm.

IV (Nujol): 2107 me (N_3), 2854 f (C-H), 2924 me (C-H), 2954 f (C-H) cm^{-1}

P.F. = 73,0-76,0 °C (**P.F.**_{lit.} = 79,0-82,0 °C⁸⁶).

4.2.1.2. Síntese de Fmoc-D-Phe-OH⁹⁸, **4**



Dissolveu-se o aminoácido H-D-Phe-OH **3** (6,06 mmol; 1,00 g) numa solução aquosa de Na_2CO_3 10% (2,5 eq.; 15,15 mmol; 16,06 mL) e adicionou-se dioxano (13 mL). Colocou-se a mistura sob agitação magnética em banho de gelo e adicionou-se lentamente o cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc-Cl) (6,06 mmol; 1,57 g). Deixou-se a mistura reacional sob agitação magnética em banho de gelo durante 4 h.. Após este período colocou-se o balão sob agitação magnética à t.a. durante 18 h.. Adicionaram-se 300 mL de água destilada à mistura reacional e

formou-se um sólido branco, que após filtração foi identificado como sendo o composto **4** (1,30 mmol; 0,50 g). A fase aquosa foi extraída com éter etílico (70 mL) e o pH levado a 2-3 mediante a adição de HCl concentrado. Em seguida, a fase aquosa foi novamente extraída com acetato de etilo (2x100 mL). As fases orgânicas foram secas com sulfato de magnésio anidro e o solvente removido a pressão reduzida. Obteve-se o composto **4** (4,04 mmol; 1,57 g) como um sólido branco. No total o composto **4** foi isolado com um rendimento de 88% (5,34 mmol; 2,07 g; 88%).

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 2,86 (1H, dd, $J_1 = 10,4$ e $J_2 = 13,6$ Hz, β -CH₂ Phe); 3,07 (1H, dd, $J_1 = 4,4$ e $J_2 = 13,6$ Hz, β -CH₂ Phe); 4,13-4,20 (4H, m, α -CH Phe, CH₂ Fmoc e 9-CH Fmoc); 7,20-7,32 (6H, m, NH e ArH Phe); 7,38-7,42 (2 H, m, 2-CH e 7-CH Fmoc); 7,63 (2H, t; $J = 7,6$ Hz, 3-CH e 6-CH Fmoc); 7,69 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, 1-CH e 8-CH Fmoc); 7,87 (2H, d, $J = 7,6$ Hz, 4-CH e 5-CH Fmoc); 12,75 (1H, sl, CO₂H) ppm.

P.F. = 169,0-172,0 °C (**P.F.**_{lit.} = 183,0-185,0 °C⁹⁸).

4.2.2. Síntese de péptidos lineares de RGD

4.2.2.1. Procedimentos gerais de síntese em fase sólida

4.2.2.1.1. *Loading* da resina

Colocou-se a resina de cloreto de 2-clorotritilo (100-200 mesh) 1% DVB, com uma capacidade de 1,4 mmol/g, o aminoácido *N*-protegido com o grupo Fmoc e o balão de reação a usar no exsiccador durante a noite. Dissolveu-se o aminoácido *N*-protegido com o grupo Fmoc (1,2 eq. relativamente à resina) em DCM seco (10 mL) e adicionou-se DIPEA (4,0 eq. relativamente ao aminoácido). Adicionou-se a resina e deixou-se em agitação à t.a., em condições anidras, durante 2 h.. Adicionaram-se umas gotas de DMF de modo a dissolver o aminoácido *N*-protegido com o grupo Fmoc (quantidade variável de acordo com o aminoácido a utilizar). Filtrou-se o solvente e lavou-se a resina com uma mistura de DCM/MeOH/DIPEA (25,5:3:1,5; 3x10 mL), DCM (3x10 mL), DMF (3x10 mL) e DCM (3x10 mL), agitando cerca de 2 min. em cada lavagem. Colocou-se a resina a secar no exsiccador durante a noite.

Preparou-se uma solução a 20% de piperidina em DMF e a uma pequena fração de resina (\cong 4 mg) adicionou-se a mesma solução (\cong 10 mL). Mediu-se a absorvância da solução com a resina a 290 nm, usando como branco a solução de piperidina em DMF.

Para calcular o *loading* da resina utilizou-se a seguinte expressão:

$$Fmoc\ loading\ (mmol/g) = \frac{Abs\ lida}{1,65 \times mg\ resina\ na\ cuvette}$$

4.2.2.1.2. Clivagem do grupo Fmoc

Lavou-se a resina com DMF (2x10 mL) agitando durante 2 min. em cada lavagem. Adicionou-se uma solução a 20% de piperidina em DMF (10 mL) e deixou-se em agitação durante 2 h.. Filtrou-se a resina e lavou-se com DMF (2x10 mL), 2-propanol (2x10 mL), DMF (2x10 mL) e 2-propanol (2x10 mL), agitando durante 2 min. em cada lavagem.

Utilizou-se o teste do ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) para verificar a eficiência da clivagem do grupo Fmoc.

Teste de TNBS: Retirou-se uma amostra da resina para um tubo de amostras. Lavou-se a resina três vezes com DMF. Adicionaram-se seis gotas de DMF e duas gotas de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico. Esperou-se 2 min. e observou-se o resultado do teste. Quando a resina adquiriu uma cor laranja foi indicativo da presença de grupos NH₂ livres.

4.2.2.1.3. Acoplamento do aminoácido N-protetido com o grupo Fmoc

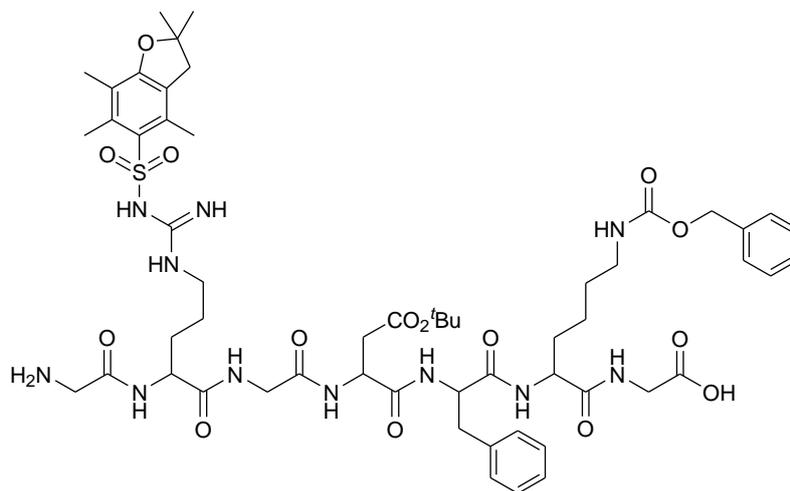
Num balão de reação, sob agitação magnética à t.a., dissolveu-se o aminoácido N-protetido com o grupo Fmoc (2,5 eq. em relação à resina) em DMF (10 mL) e adicionou-se HOBt (2,5 eq. em relação à resina) e DIC (2,5 eq. em relação à resina). Transferiu-se a mistura reacional para ampola que continha a resina e deixou-se em agitação à t.a. durante 18 h.. Filtrou-se o solvente e lavou-se a resina com DMF (3x10 mL) e DCM (3x10 mL), agitando durante 2 min. em cada lavagem. Para verificar a eficácia do acoplamento recorreu-se ao teste do TNBS.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 12,29 (CH_3 Pbf); 17,36 ($\text{CH}=\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 17,62 (CH_3 Pbf); 18,97 (CH_3 Pbf); 22,41 ($\gamma\text{-CH}_2$ Lys); 24,22 ($\text{CH}\equiv\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 25,24 ($\gamma\text{-CH}_2$ Arg); 27,63 ($3\times\text{CH}_3$ ^tBu); 28,32 (CH_3 Pbf); 29,04 ($\beta\text{-CH}_2$ Arg); 29,27 ($\delta\text{-CH}_2$ Lys); 30,80 (CH_3 Pbf); 31,58 ($\beta\text{-CH}_2$ Lys); 33,95 ($\text{CH}\equiv\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 37,74 ($\beta\text{-CH}_2$ Asp e $\beta\text{-CH}_2$ Phe); 40,15 ($\delta\text{-CH}_2$ Arg); 40,21 ($\epsilon\text{-CH}_2$ Lys); 41,10 ($2\times\alpha\text{-CH}_2$ Gly); 41,95 ($\alpha\text{-CH}_2$ Gly); 42,49 (CH_2 Z); 49,26 ($\alpha\text{-CH}$ Asp); 52,28 ($\alpha\text{-CH}$ Arg e $\alpha\text{-CH}$ Lys); 54,25 ($\alpha\text{-CH}$ Phe); 65,12 (CH_2 Z); 71,43 ($\text{CH}\equiv\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 80,19 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ^tBu); 84,14 ($\text{CH}\equiv\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 86,32 (C Pbf); 116,29 (C Pbf); 124,34 (C Pbf); 126,30 (CH Ar Phe); 127,73 (CH Ar Z); 128,00 (CH Ar Phe); 128,35 (CH Ar Z); 129,24 (CH Ar Phe); 131,45 (C Pbf); 134,22 (C Pbf); 137,27 (C_i Ar Z); 137,45 (C_i Ar Phe); 156,07 (CNH Pbf/NHCO Z); 156,15 (CNH Pbf/NHCO Z); 157,46 (C Pbf); 162,35 (C Pbf); 168,59 (CO); 169,13 (CO); 170,11 (CO); 170,63 (CO); 171,11 (CO); 171,69 (CO); 171,90 (CO); 172,01 ($\text{CH}\equiv\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 172,06 (CO) ppm.

HRMS [M+H]: 1272,5969; calculado para $\text{C}_{62}\text{H}_{86}\text{N}_{11}\text{O}_{16}\text{S}$ 1272,5997.

P.F. = 137,0-140,0 °C.

4.2.2.3. Síntese do péptido 6



Seguiram-se os procedimentos gerais de síntese em fase sólida descritos anteriormente. Utilizou-se 1,00 g de resina e obteve-se um *loading* da resina de 0,20 mmol/g. O péptido **6** foi obtido na forma de um sólido branco (0,09 mmol; 0,11 g; 47%).

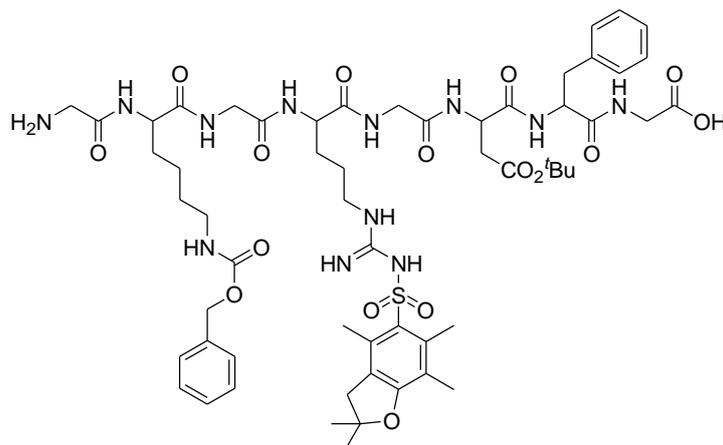
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,22-1,27 (2H, m, γ - CH_2 Lys); 1,30 (9H, s, $3\times\text{CH}_3$ ^tBu); 1,39 (6H, s, $2\times\text{CH}_3$ Pbf); 1,46-1,55 (3H, m, β - CH_2 Arg, β - CH_2 Lys e γ - CH_2 Arg); 1,62-1,73 (3H, m, β - CH_2 Arg, β - CH_2 Lys e γ - CH_2 Arg); 1,99 (3H, s, CH_3 Pbf); 2,28-2,34 (1H, m, β - CH_2 Asp); 2,41 (3H, s, CH_3 Pbf); 2,47 (3H, s, CH_3 Pbf); 2,72-2,76 (1H, m, β - CH_2 Phe); 2,77-2,82 (1H, m, β - CH_2 Asp); 2,88-3,05 (5H, m, δ - CH_2 Arg, β - CH_2 Phe e ϵ - CH_2 Lys); 2,95 (2H,s, CH_2 Pbf); 3,53-3,58 (2H, m, α - CH_2 Gly); 3,80-3,86 (4H, m, $2\times\alpha$ - CH_2 Gly); 4,04-4,10 (1H, m, α -CH Lys); 4,25-4,45 (1H, m, α -CH Arg); 4,46-4,54 (2H, m, α -CH Asp e α -CH Phe); 4,98 (2H, s, CH_2 Z); 6,84 (1H, sl, NH); 7,16-7,22 (5H, m, ArH Phe); 7,28-7,34 (5H, m, ArH Z); 7,53 (1H, sl, NH); 7,59-7,61 (1H, m, NH); 7,94 (1H, s, NH); 8,09-8,15 (2H, m, $2\times\text{NH}$); 8,30 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, NH); 8,79 (2H, sl, $2\times\text{NH}$); 9,25 (1H, sl, NH) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 12,29 (CH_3 Pbf); 17,62 (CH_3 Pbf); 18,97 (CH_3 Pbf); 25,17 (γ - CH_2 Arg); 27,61 ($3\times\text{CH}_3$ ^tBu); 28,32 (CH_3 Pbf); 28,93 (γ - CH_2 Lys); 29,05 (β - CH_2 Arg e δ - CH_2 Lys); 30,78 (CH_3 Pbf); 30,87 (β - CH_2 Lys); 37,02 (β - CH_2 Asp e β - CH_2 Phe) 40,13 (δ - CH_2 Arg); 42,31 ($3\times\alpha$ - CH_2 Gly); 42,49 (CH_2 Pbf); 49,20 (α -CH Asp); 52,58 (α -CH Arg); 52,70 (α -CH Lys); 54,40 (α -CH Phe); 65,10 (CH_2 Z); 80,15 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ^tBu); 86,28 (C Pbf); 116,26 (C Pbf); 124,30 (C Pbf); 126,28 (CH Ar Phe); 127,71 (CH Ar Z); 128,05 (CH Ar Phe); 128,34 (CH Ar Z); 129,09 (CH Ar Phe); 131,39 (C Pbf); 134,26 (C Pbf); 137,28 (C_i Ar Z); 137,53 (C_i Ar Phe); 156,05 (CNH Pbf/NHCO Z); 156,38 (CNH Pbf/NHCO Z); 157,41 (C Pbf); 162,33 (C Pbf); 167,38 (CO); 169,17 (CO); 170,03 (CO); 170,74 (CO); 170,82 (CO); 171,84 (CO); 172,09 (CO); 172,80 (CO) ppm.

HRMS [M+H]: 1178,5551; calculado para $\text{C}_{56}\text{H}_{80}\text{N}_{11}\text{O}_{15}\text{S}$ 1178,5578.

P.F. = 171,0-174,0 °C.

4.2.2.4. Síntese do péptido 7



Seguiram-se os procedimentos gerais de síntese em fase sólida descritos anteriormente. Utilizou-se 1,00 g de resina e obteve-se um *loading* da resina de 0,20 mmol/g. O péptido **7** foi obtido na forma de um sólido branco (0,09 mmol; 0,11 g; 46%).

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,22-1,27 (2H, m, γ -CH $_2$ Lys); 1,29 (9H, s, 3xCH $_3$ t Bu); 1,39 (6H, s, 2xCH $_3$ Pbf); 1,43-1,45 (4H, m, γ -CH $_2$ Arg e δ -CH $_2$ Lys); 1,49-1,52 (2H, m, β -CH $_2$ Arg e β -CH $_2$ Lys); 1,68-1,73 (2H, m, β -CH $_2$ Arg e β -CH $_2$ Lys); 1,99 (3H, s, CH $_3$ Pbf); 2,24-2,30 (1H, m, β -CH $_2$ Asp); 2,41 (3H, s, CH $_3$ Pbf); 2,47 (3H, s, CH $_3$ Pbf); 2,88-2,90 (1H, m, β -CH $_2$ Asp); 2,92-3,02 (4H, m, ϵ -CH $_2$ Lys e δ -CH $_2$ Arg); 2,95 (2H, s, CH $_2$ Pbf); 3,13 (2H, dd, $J_1 = 3,6$ Hz e $J_2 = 10,4$ Hz, β -CH $_2$ Phe); 3,52-3,65 (4H, m, 2x α -CH $_2$ Gly); 3,76-3,80 (4H, m, 2x α -CH $_2$ Gly); 4,24-4,33 (2H, m, α -CH Arg e α -CH Lys); 4,36-4,48 (2H, m, α -CH Asp e α -CH Phe); 4,99 (2H, s, CH $_2$ Z); 6,85 (1H, sl, NH); 7,15-7,22 (5H, m, ArH Phe); 7,29-7,37 (5H, m, ArH Z); 7,47 (1H, sl, NH); 7,59 (1H, sl, NH); 7,94 (1H, s, NH); 8,16 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, NH); 8,25 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, NH); 8,32 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, NH); 8,47-8,49 (4H, m, 4xNH); 8,60-8,62 (1H, m, NH) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 12,28 (CH $_3$ Pbf); 17,61 (CH $_3$ Pbf); 18,96 (CH $_3$ Pbf); 22,61 (γ -CH $_2$ Lys); 25,29 (γ -CH $_2$ Arg); 27,58 (3xCH $_3$ t Bu); 28,31 (CH $_3$ Pbf); 29,07 (β -CH $_2$ Arg e δ -CH $_2$ Lys); 30,77 (CH $_3$ Pbf); 31,54 (β -CH $_2$ Lys); 36,98 (β -CH $_2$ Phe e β -CH $_2$ Asp); 40,12 (δ -CH $_2$ Arg); 40,90 (ϵ -CH $_2$ Lys); 42,27 (2x α -CH $_2$ Gly); 42,48 (CH $_2$ Pbf); 43,24 (α -CH $_2$ Gly); 49,33 (α -CH Asp); 52,55 (α -CH Arg); 52,82 (α -CH Lys); 54,72 (α -CH Phe); 65,11 (CH $_2$ Z); 80,14 (C(CH $_3$) $_3$ t Bu); 86,26 (C Pbf); 116,26 (C Pbf); 124,29 (C Pbf); 126,17 (CH Ar Phe); 127,72 (CH Ar Z); 128,05 (CH Ar Phe); 128,34 (CH Ar Z);

Num balão de reação adicionou-se HBTU (1,0 eq.; 0,17 mmol; 0,06 g) a DMF (1,40 mL). Sob agitação magnética, e à t.a., juntou-se gota a gota uma solução do péptido **6** (0,17 mmol; 0,20 g) e DIPEA (1,0 eq.; 0,17 mmol; 29,20 μ l) em DMF (4,45 mL). Deixou-se a mistura reacional em agitação à t.a. e controlou-se a reação por *t.l.c.* (eluente: clorofórmio/metanol, 1:1). Ao fim de 20 h. evaporou-se a DMF a pressão reduzida, precipitou-se o composto com éter etílico e colocou-se o mesmo no congelador. Filtrou-se o sólido branco formado que foi identificado como sendo o composto **9** (0,15 mmol; 0,17 g; 89%).

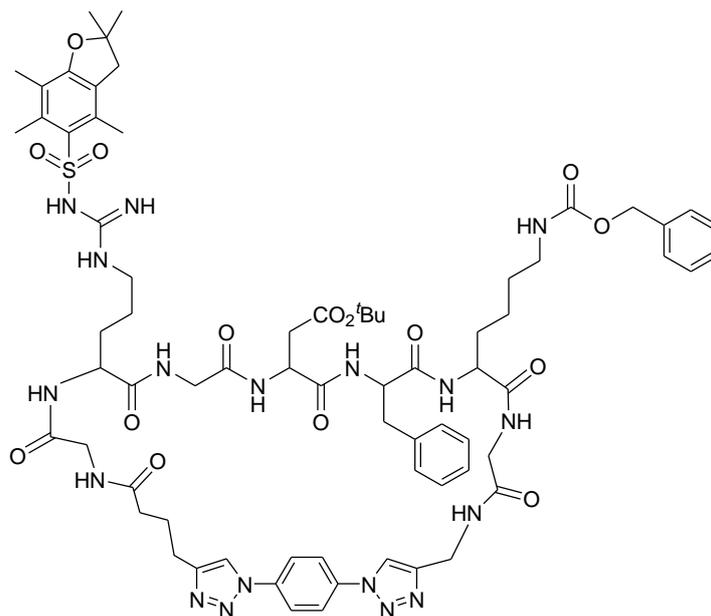
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): 1,22-1,27 (2H, m, γ -CH₂ Lys); 1,33 (9H, s, 3xCH₃ ^tBu); 1,40 (6H, s, 2xCH₃ Pbf); 1,36-1,37 (1H, m, γ -CH₂ Arg); 1,55-1,65 (5H, m, β -CH₂ Arg, β -CH₂ Lys, e γ -CH₂ Arg); 1,83-1,96 (2H, m, δ -CH₂ Lys); 2,00 (3H, s, CH₃ Pbf); 2,15-2,25 (2H, m, β -CH₂ Asp); 2,41 (3H, s, CH₃ Pbf); 2,47 (3H, s, CH₃ Pbf); 2,72-2,85 (1H, m, β -CH₂ Phe); 2,88-2,94 (1H, m, β -CH₂ Phe); 2,95 (2H, s, CH₂ Pbf); 3,02-3,25 (4H, m, δ -CH₂ Arg e ϵ -CH₂ Lys); 3,57-3,65 (2H, m, α -CH₂ Gly); 3,69-3,76 (4H, m, 2x α -CH₂ Gly); 4,21-4,22 (1H, m, α -CH Lys); 4,39-4,41 (1H, m, α -CH Arg); 4,54-4,64 (2H, m, α -CH Asp e α -CH Phe); 4,97 (2H, s, CH₂ Z); 6,38 (1H, sl, NH); 6,66 (1H, sl, NH); 6,82 (1H, sl, NH); 7,17-7,21 (5H, m, ArH Phe); 7,28-7,34 (5H, m, ArH Z); 7,69-7,23 (1H, m, NH); 7,83 (1H, d, J = 8,4 Hz, NH); 7,93-7,98 (1H, m, NH); 8,03-8,05 (2H, m, 2xNH); 8,11 (1H, d, J = 8,4 Hz, NH); 8,15-8,41 (1H, m, NH); 8,54 (1H, d, J = 8,0 Hz, NH) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 12,27 (CH₃ Pbf); 17,60 (CH₃ Pbf); 18,95 (CH₃ Pbf); 25,32 (γ -CH₂ Arg); 27,64 (3xCH₃ ^tBu); 28,29 (CH₃ Pbf); 29,05 (β -CH₂ Arg e δ -CH₂ Lys); 30,76 (CH₃ Pbf); 31,80 (β -CH₂ Lys); 37,94 (β -CH₂ Asp); 40,13 (δ -CH₂ Arg); 40,60 (ϵ -CH₂ Lys); 41,48 (3x α -CH₂ Gly); 41,76 (CH₂ Pbf); 49,22 (α -CH Asp); 52,14 (α -CH Arg e α -CH Lys); 54,04 (α -CH Phe); 65,10 (CH₂ Z); 80,17 (C(CH₃)₃ ^tBu); 86,33 (C Pbf); 116,27 (C Pbf); 124,33 (C Pbf); 126,31 (CH Ar Phe); 127,71 (CH Ar Z); 127,95 (CH Ar Phe); 128,15 (CH Ar Z); 128,33 (CH Ar Z); 129,28 (CH Ar Phe); 131,44 (C Pbf); 133,30 (C Pbf); 134,12 (C Pbf); 137,27 (C_i Ar Z); 137,37 (C_i Ar Phe); 150,02 (CNH Pbf/NHCO Z); 156,04 (CNH Pbf/NHCO); 157,47 (Pbf); 168,23 (CO); 169,07 (CO); 169,25 (CO); 169,66 (C); 170,06 (CO); 171,09 (CO); 171,93 (CO); 172,36 (CO) ppm.

HRMS [M+H]: 1160,5445; calculado para C₅₆H₇₈N₁₁O₁₄S 1160,5472.

P.F. = 152,0-155,0 °C.

4.2.3.2. Síntese do péptido 10



Num balão de reação dissolveu-se o péptido **8** (0,06 mmol; 0,08 g) em DMF (2 mL). Sob agitação magnética, e à t.a., adicionou-se o 1,4-diazidobenzeno **2** (1,0 eq.; 0,06 mmol; 9,90 mg), CuI (0,02 eq.; 1,24 μ mol; 0,24 mg) e Et₃N (2,2 eq.; 0,14 mmol; 0,02 mL). Deixou-se a mistura reacional em agitação à t.a. e controlou-se a reação por *t.l.c.* (eluente: clorofórmio/metanol, 9:1). Após 5,5 d. evaporou-se a DMF a pressão reduzida e precipitou-se o composto com éter etílico. Filtrou-se um sólido bege escuro que foi lavado com uma solução de EDTA 0,1 M (60 mL). O sólido obtido foi identificado como sendo o composto **10** (0,05 mmol; 0,07 g; 79%).

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆): 1,11-1,13 (2H, m, γ -CH₂ Lys); 1,30 (9H, s, 3xCH₃ ^tBu); 1,34-1,35 (2H, m, β -CH₂ Arg); 1,38 (6H, s, 2xCH₃ Pbf); 1,60-1,68 (6H, m, δ -CH₂ Lys, β -CH₂ Lys e γ -CH₂ Arg); 1,89-2,06 (2H, m, Triazole-CH₂CH₂CH₂CO); 1,98 (3H, s, CH₃ Pbf); 2,23-2,37 (4H, m, β -CH₂ Asp e Triazole-CH₂CH₂CH₂CO); 2,40 (3H, s, CH₃ Pbf); 2,46 (4H, s, CH₃ Pbf); 2,72-2,81 (2H, m, Triazole-CH₂CH₂CH₂CO); 2,79-3,00 (4H, m, δ -CH₂ Arg e ϵ -CH₂ Lys); 2,87-2,96 (2H, m, β -CH₂ Phe) 2,93 (2H, s, CH₂ Pbf); 3,74-4,02 (6H, m, 3 α -CH₂ Gly); 4,17-4,25 (2H, m, α -CH Arg e α -CH Lys); 4,41 (1H, sl, Triazole-CH₂NH); 4,52-4,57 (2H, m, α -CH Asp e α -CH Phe); 4,97 (2H, s, CH₂ Z); 6,42 (2H, sl, NH); 6,66 (1H, sl, NH); 6,81 (1H, sl, NH); 7,20-7,31 (10H, m, ArH Phe e ArH Z); 7,86-7,94 (3H, m, 3xNH); 7,94 (1H, s, CH Triazole); 8,01-8,35 (4H, m, 4xNH); 8,08 (1H, s, CH Triazole); 8,55-8,65 (1H, m, Triazole-CH₂NH) ppm.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 12,28 (CH_3 Pbf); 17,61 (CH_3 Pbf); 18,96 (CH_3 Pbf); 22,44 ($\gamma\text{-CH}_2$ Lys); 24,50 (Triazole- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$); 25,27 ($\gamma\text{-CH}_2$ Arg); 27,61 ($3\times\text{CH}_3$ ^tBu); 28,30 (CH_3 Pbf); 29,02 ($\beta\text{-CH}_2$ Arg e $\delta\text{-CH}_2$ Lys); 30,80 (CH_3 Pbf); 31,43 ($\beta\text{-CH}_2$ Lys); 34,44 (Triazole- CH_2NH); 37,73 ($\beta\text{-CH}_2$ Phe e $\beta\text{-CH}_2$ Asp); 40,18 ($\delta\text{-CH}_2$ Arg), 41,97 ($3\times\alpha\text{-CH}_2$ Gly); 42,47 (CH_2 Pbf); 49,29 ($\alpha\text{-CH}$ Asp); 52,35 ($\alpha\text{-CH}$ Arg); 52,66 ($\alpha\text{-CH}$ Lys); 54,30 ($\alpha\text{-CH}$ Phe); 65,12 (CH_2 Z); 80,18 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ^tBu); 86,30 (C Pbf); 116,29 (C Pbf); 120,44 (CH Ar Z); 121,00 (CH Triazole); 121,41 (CH Triazole); 124,33 (C Pbf); 126,30 (CH Ar Phe); 127,72 (CH Ar Z); 128,01 (CH Ar Phe); 128,34 (CH Ar Z); 129,21 (CH Ar Phe); 131,45 (C Pbf); 133,76 (C Pbf); 134,19 (C Pbf); 137,27 (C_i Ar Z); 137,47 (C_i Ar Phe); 156,07 (CNH Pbf/NHCO Z); 156,21 (CNH Pbf/NHCO Z); 157,46 (C Pbf); 159,23 (CO); 168,89 (CO); 169,14 (CO); 170,12 (CO); 170,68 (CO); 170,92 (CO); 171,85 (CO), 171,96 (CO); 172,28 (CO) ppm.

HRMS [M+H]: 1469,6783; calculado para $\text{C}_{71}\text{H}_{93}\text{N}_{18}\text{O}_{15}\text{S}$ 1469,6810.

P.F. = 217,0-220,0 °C.

4.3. Preparação de nanopartículas

4.3.1. Preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPs OF) foram preparadas pela co-precipitação de cloretos de Fe(II) e Fe(III) em meio alcalino usando o método de Kang *et al.*⁴⁹ com algumas modificações. Utilizaram-se o cloreto de ferro (III) hexa-hidratado ($\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e o cloreto de ferro (II) (FeCl_2). O hidróxido de sódio (NaOH) foi utilizado como agente de precipitação.

Foram preparadas quatro amostras de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, de forma a avaliar a influência de vários parâmetros na formação deste tipo de nanopartículas.

4.3.1.1. Preparação da amostra 1

Inicialmente dissolveram-se $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (17,0 mmol; 4,6 g) e FeCl_2 (13,51 mmol; 1,71 g) (razão Fe(II)/Fe(III) de 0,8) em 20 mL de água desionizada e 100 mL de uma

solução aquosa de HCl 2 M. Colocou-se a mistura sob agitação magnética, de forma a dissolver o sal de ferro, formando-se uma solução de cor amarelada. Imediatamente, sob agitação, adicionou-se gota a gota uma solução aquosa de NaOH 2 M (120 mL) formando-se uma suspensão de cor preta. Guardou-se a mistura no frigorífico. Ao fim de 5 d. verificou-se a presença de um precipitado preto e recolheu-se a fase aquosa. O precipitado foi lavado duas vezes com água destilada (2x100 mL) e uma vez com uma solução aquosa de *TMAOH* 0,1 M (100 mL). Separaram-se as nanopartículas por centrifugação. Lavou-se o precipitado com uma solução aquosa de HNO₃ 0,01 M (160 mL) e aqueceu-se a mistura a 90 °C. Ao fim de 2 h. deixou-se a mistura à t.a. tendo-se separado as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro por centrifugação. Posteriormente lavou-se o precipitado duas vezes com água destilada (2x160 mL), centrifugando entre cada lavagem. Suspenderam-se as nanopartículas em *TMAOH* 0,1 M a pH 10-12. As nanopartículas obtidas foram denominadas como amostra **1**.

4.3.1.2. Preparação da amostra 2

Dissolveram-se FeCl₃.6H₂O (17,0 mmol; 4,59 g) e FeCl₂ (13,5 mmol; 1,71 g) (razão Fe(II)/Fe(III) de 0,8) em 20 mL de água desionizada e 100 mL de uma solução aquosa de HCl 2 M. Colocou-se a mistura sob agitação magnética, de forma a dissolver o sal de ferro, formando-se uma solução de cor amarelada. Imediatamente, sob agitação, adicionou-se gota a gota uma solução aquosa de NaOH 2 M (150 mL) formando-se uma suspensão de cor preta. Após alguns minutos verificou-se a presença de um precipitado negro. Recolheu-se a fase aquosa e lavou-se o precipitado duas vezes com água destilada (2x100 mL) e uma vez com uma solução aquosa de *TMAOH* 0,1 M (100 mL). Separaram-se as nanopartículas por centrifugação a 5000 rpm durante 10 min. Lavou-se o precipitado com uma solução aquosa de HNO₃ 0,01 M (160 mL) e aqueceu-se a mistura a 90 °C. Ao fim de 2 h. retirou-se a mistura de agitação e deixou-se à t.a.. Separaram-se as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro por centrifugação durante 10 min. a 5000 rpm. Posteriormente o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada (2x120 mL), centrifugando entre cada lavagem (5000 rpm durante 10 min.). Suspenderam-se as nanopartículas em *TMAOH* 0,1 M a pH 10-12. As nanopartículas obtidas foram denominadas como amostra **2**.

4.3.1.3. Preparação da amostra 3

Num balão de três tubuladuras, sob corrente de nitrogénio, colocou-se água destilada (25 mL). Após 30 min. adicionou-se uma solução aquosa de HCl 12,1 M (0,85 mL) e, sob agitação magnética, juntaram-se $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (19,5 mmol; 5,27 g) e FeCl_2 (15,8 mmol; 2,01 g) (razão Fe(II)/Fe(III) de 0,8) formando-se uma solução de cor amarelada, que foi recolhida para um funil de extração.

Colocou-se uma solução aquosa de NaOH 1,5 M (250 mL) num novo balão de três tubuladuras e, sob corrente de nitrogénio, adicionou-se gota a gota a solução de cor amarelada. A suspensão final de cor preta foi colocada no ultrassons durante 2 h. ao fim das quais, a mesma foi decantada por separação magnética. As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foram lavadas três vezes com água destilada desoxigenada (3x160 mL) e centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min. em cada lavagem. Adicionou-se ao precipitado uma solução aquosa de HCl 0,01 M (500 mL) e colocou-se em agitação durante 18 h.. As nanopartículas obtidas foram denominadas como amostra 3.

4.3.1.4. Preparação da amostra 4

Num balão de três tubuladuras, sob corrente de nitrogénio, colocou-se água desionizada (20 mL) e adicionou-se HCl 2 M (100 μL). Após 30 min. adicionaram-se $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (21,0 mmol; 5,67 g) e FeCl_2 (10,6 mmol; 1,34 g) (razão Fe(II)/Fe(III) de 0,5) e colocou-se a mistura sob agitação magnética formando-se uma solução de cor amarelada. Adicionou-se uma solução aquosa de NaOH 2 M (150 mL) formando-se uma suspensão de cor preta. Após alguns minutos verificou-se a formação de um precipitado negro e recolheu-se a fase aquosa. Lavou-se o precipitado duas vezes com água destilada (2x100 mL) e depois com uma solução aquosa de TMAOH 0,1 M (100 mL) centrifugando-se de seguida a 5000 rpm durante 10 min.. Posteriormente adicionou-se ao precipitado uma solução aquosa de HNO_3 0,01 M (125 mL) e colocou-se a mistura sob agitação e refluxo a 90 °C durante 1 h.. A mistura foi deixada sob agitação à t.a. durante 18 h.. Centrifugou-se a mistura a 5000 rpm durante 10 min. e removeu-se o sobrenadante, lavando-se o precipitado duas vezes com água destilada

(2x160 mL) e centrifugando a 5000 rpm durante 10 min. entre cada lavagem. Suspenderam-se as nanopartículas em *TMAOH* 0,1 M a pH 10-12. As nanopartículas obtidas foram denominadas como amostra **4**.

4.3.2. Preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com ouro

O revestimento das nanopartículas de óxido de ferro com ouro (NPs OF@Au) foi efetuado utilizando o cloreto de ouro (III) tri-hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), e o boro-hidreto de sódio (NaBH_4) como agente redutor.

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro utilizadas para revestimento foram as da amostra **4**. Foram realizados três ensaios para o revestimento com ouro deste tipo de nanopartículas.

Preparação da solução de trabalho

A solução de trabalho foi preparada por adaptação do método descrito por Williams *et al.*¹⁷. Assim, adicionou-se água destilada (50 mL) e uma solução aquosa de citrato de sódio 0,1 M (7,5 mL) a 7,5 mL de nanopartículas da amostra **4** suspensas em *TMAOH* 0,1 M. Agitou-se a mistura durante 10 min. e obteve-se a solução de trabalho de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.

4.3.2.1. Preaparação da amostra Fe@Au 1

A 1 mL da solução de trabalho das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro adicionaram-se água destilada (6 mL), uma solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1% w/v (0,63 mL) e uma quantidade catalítica de NaBH_4 formando-se uma suspensão de cor preta. Recorrendo a uma separação magnética, separaram-se as nanopartículas magnéticas das nanopartículas de ouro.

Às nanopartículas magnéticas adicionou-se água destilada (6 mL), uma solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1% w/v (0,63 mL) e uma quantidade catalítica de NaBH_4 formando-se uma suspensão de cor rosa. Separaram-se magneticamente as nanopartículas magnéticas das nanopartículas de ouro e lavaram-se as primeiras com água destilada (3 mL). Suspenderam-se as nanopartículas magnéticas em água destilada. As nanopartículas obtidas foram denominadas como amostra **Fe@Au 1**.

4.3.2.2. Preparação da amostra Fe@Au 2

A 0,5 mL da solução de trabalho das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro adicionaram-se água destilada (9,5 mL), uma solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1% w/v (0,63 mL) e uma quantidade catalítica de NaBH_4 formando-se uma suspensão de cor rosa. Agitou-se a mistura mecanicamente durante 3 min. Após esse período adicionou-se uma solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1% w/v (0,5 mL) e a suspensão manteve a mesma cor. Recorrendo a uma separação magnética, separaram-se as nanopartículas magnéticas das nanopartículas de ouro e lavaram-se as primeiras com água destilada (3 mL). Suspenderam-se as nanopartículas magnéticas em água destilada. As nanopartículas obtidas foram denominadas como amostra **Fe@Au 2**.

4.3.2.3. Preparação da amostra Fe@Au 3

A 2 mL da solução de trabalho das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro adicionaram-se água destilada (8 mL), uma solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1% w/v (2 mL) e uma quantidade catalítica de NaBH_4 formando-se uma suspensão de cor carmim. Separaram-se magneticamente as nanopartículas magnéticas das nanopartículas de ouro e lavaram-se as primeiras com água destilada (3 mL). Suspenderam-se as nanopartículas magnéticas em água destilada. As nanopartículas obtidas foram denominadas como amostra **Fe@Au 3**.

4.3.3. Preparação de nanopartículas de ouro

Os processos utilizados de preparação de nanopartículas de ouro (NPs Au) baseiam-se na redução dos iões Au^{3+} provenientes do cloreto de ouro (III) tri-hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). Como agentes redutores foram utilizados o citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) e o ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), dependendo do procedimento utilizado.

Um dos procedimentos utilizados é descrito como preparação direta seguindo o método de Frens (**Au 1**), enquanto o outro consiste no método de *seeding growth* (**Au 2**).

4.3.3.1. Preparação de nanopartículas de ouro utilizando o método de Frens (preparação direta)

Neste procedimento de preparação de nanopartículas de ouro, o citrato de sódio foi utilizado como agente redutor e de estabilização. O método descrito é uma adaptação do referido por Long *et al.*⁶⁸.

4.3.3.1.1. Preparação da amostra Au 1

Uma solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,01% w/v (50 mL) em água destilada foi aquecida à ebulição. Sob agitação, adicionou-se uma solução aquosa de citrato de sódio 1% w/v (200 μL) e deixou-se em ebulição durante 5 min.. A mistura reacional apresentou uma coloração roxa após arrefecimento. As nanopartículas obtidas foram denominadas como amostra **Au 1**.

4.3.3.2. Preparação de nanopartículas de ouro utilizando o método de *seeding growth*

Neste procedimento de preparação de nanopartículas de ouro, o ácido ascórbico foi utilizado como agente redutor e o citrato de sódio como agente de estabilização. O método descrito seguiu uma adaptação do trabalho desenvolvido por Eychmüller *et al.*⁶⁰.

4.3.3.2.1. Preparação da amostra Au 2

▪ Preparação da *seeding solution* Au ss

Adicionou-se água destilada (50 mL) a uma solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,2% w/v (2,5 mL) formando-se uma solução incolor. Aqueceu-se a solução até à temperatura de ebulição e adicionou-se imediatamente, de forma rápida sob agitação, uma solução aquosa de citrato de sódio 1% w/v + 0,05% w/v de ácido cítrico (2 mL). Deixou-se a mistura em ebulição e sob agitação durante 5 min. verificando-se uma mudança gradual de cor, de incolor para vermelha. Após esse período retirou-se a

mistura de agitação e deixou-se arrefecer à t.a.. As nanopartículas obtidas foram denominadas como amostra **Au ss** (*seeding solution*).

▪ **Preparação de nanopartículas ouro de 80 a 100 nm**

A preparação deste tipo de nanopartículas foi feita por recurso a duas etapas de revestimento.

▪ **Primeira etapa de revestimento Au 2.1**

Num balão de três tubuladuras colocou-se a *seeding solution* de nanopartículas de ouro **Au ss** (12 mL) e adicionou-se uma solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,2% w/v (8 mL) colocando-se imediatamente a solução sob agitação vigorosa. Ao mesmo tempo, e gota a gota, adicionou-se uma solução aquosa de ácido ascórbico 1% w/v (2 mL) e uma solução aquosa de citrato de sódio 1% w/v (1 mL). Após as respetivas adições deixou-se a mistura reacional em agitação durante 5 min.. A solução apresentou um aspeto roxo claro. As nanopartículas obtidas foram denominadas como amostra **Au 2.1**.

▪ **Segunda etapa de revestimento Au 2.2**

Num balão de três tubuladuras colocou-se a amostra **Au 2.1** (18 mL) e adicionou-se uma solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,2% w/v (8 mL) colocando-se imediatamente a solução sob agitação vigorosa. Ao mesmo tempo, e gota a gota, adicionou-se uma solução aquosa de ácido ascórbico 1% w/v (2 mL) e uma solução aquosa de citrato de sódio 1% w/v (1 mL). Após as respetivas adições deixou-se a mistura reacional em agitação durante 5 min. e a mesma adquiriu uma tonalidade rosa. As nanopartículas obtidas foram denominadas como amostra **Au 2.2**.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Williams, D. *Biomaterials* **2008**, *29*, 1737–1738.
- (2) Fang, C.; Bhattarai, N.; Sun, C.; Zhang, M. *Small* **2009**, *5*, 1637–1641.
- (3) Thakor, A. S.; Gambhir, S. S. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2013**, *63*, 395–418.
- (4) De Jong, W. H.; Borm, P. J. *International Journal of Nanomedicine* **2008**, *3*, 133–149.
- (5) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Elst, L. V.; Muller, R. N. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 2064–2110.
- (6) Chastellain, M.; Petri, A.; Gupta, A.; Rao, K. V.; Hofmann, H. *Advanced Engineering Materials* **2004**, *6*, 235–241.
- (7) Wang, E. C.; Wang, A. Z. *Integrative Biology* **2014**, *6*, 9–26.
- (8) Arruebo, M.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, M. R.; Santamaría, J. *Nano Today* **2007**, *2*, 22–32.
- (9) Berry, C. C.; Wells, S.; Charles, S.; Curtis, A. S. G. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4551–4557.
- (10) Zhang, Y.; Sun, C.; Kohler, N.; Zhang, M. *Biomedical Microdevices* **2004**, *6*, 33–40.
- (11) Cheng, Z.; Tan, A. L. K.; Tao, Y.; Shan, D.; Ting, K. E.; Yin, X. J. *International Journal of Photoenergy* **2012**, *2012*, 1–5.
- (12) Chen, D.-W.; Liao, M.-H. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, *16*, 283–291.
- (13) Lian, S.; Wang, E.; Kang, Z.; Bai, Y.; Gao, L.; Jiang, M.; Hu, C.; Xu, L. *Solid State Communications* **2004**, *129*, 485–490.
- (14) Lian, S.; Kang, Z.; Wang, E.; Jiang, M.; Hu, C.; Xu, L. *Solid State Communications* **2003**, *127*, 605–608.
- (15) Lee, J.; Isobe, T.; Senna, M. *Journal of Colloid and Interface Science* **1996**, *177*, 490–494.

- (16) Teja, A. S.; Koh, P.-Y. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* **2009**, *55*, 22–45.
- (17) Lyon, J. L.; Fleming, D. A.; Stone, M. B.; Schiffer, P.; Williams, M. E. *Nano Letters* **2004**, *4*, 719–723.
- (18) Unsoy, G.; Yalcin, S.; Khodadust, R.; Gunduz, G.; Gunduz, U. *Journal of Nanoparticle Research* **2012**, *14*, 964–977.
- (19) Xu, Z. P.; Zeng, Q. H.; Lu, G. Q.; Yu, A. B. *Chemical Engineering Science* **2006**, *61*, 1027–1040.
- (20) Wang, Y.-X. J.; Hussain, S. M.; Krestin, G. P. *European Radiology* **2001**, *11*, 2319–2331.
- (21) Gupta, A. K.; Curtis, A. S. G. *Biomaterials* **2004**, *25*, 3029–3040.
- (22) Babes, L.; Denizot, B.; Tanguy, G.; Le Jeune J.J.; Jallet, P. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, *212*, 474–482.
- (23) Momtazi, L.; Bagherifam, S.; Singh, G.; Hofgaard, A.; Hakkarainen, M.; Glomm, W. R.; Roos, N.; Mælandsmo, G. M.; Griffiths, G.; Nyström, B. *Journal of Colloid and Interface Science* **2014**, *433*, 76–85.
- (24) Gupta, A. K.; Gupta, M. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021.
- (25) Horák, D.; Babic, M.; Jendelová, P.; Herynek, V.; Trchová, M.; Pientka, Z.; Pollert, M.; Hájek, M.; Syková, E. *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *18*, 635–644.
- (26) Pham, T. T. H.; Cao, C.; Sim, S. J. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2008**, *320*, 2049–2055.
- (27) Zhang, Y.; Kohler, N.; Zhang, M. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1553–1561.
- (28) Liu, Y.; Zhu, L.; Kong, J.; Yang, P.; Liu, B. *Electrochemistry Communications* **2013**, *33*, 59–62.
- (29) Chauhan, N.; Pundir, C. S. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *61*, 1–8.
- (30) Freeman, M. W.; Arrott, A.; Watson, J. H. L. *Journal of Applied Physics* **1960**, *31*, 404S–405S.

-
- (31) Senyei, A.; Widder, K.; Czerlinski, G. *Journal of Applied Physics* **1978**, *49*, 3578–3583.
- (32) Widder, K. J.; Morris, R. M.; Poore, G. A.; Howard, D. P.; Senyei, A. E. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* **1983**, *19*, 135–139.
- (33) Yang, J.; Lee, H.; Hyung, W.; Park, S.-B.; Haam, S. *Journal of Microencapsulation* **2006**, *23*, 203–212.
- (34) Medarova, Z.; Pham, W.; Farrar, C.; Petkova, V.; Moore, A. *Nature Medicine* **2007**, *13*, 372–377.
- (35) Huh, Y.-M.; Jun, Y.; Song, H.-T.; Kim, S.; Choi, J.; Lee, J.-H.; Yoon, S.; Kim, K.-S.; Shin, J.-S.; Suh, J.-S.; Cheon, J. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12387–12391.
- (36) Chen, K.-J.; Wolahan, S. M.; Wang, H.; Hsu, C.-H.; Chang, H.-W.; Durazo, A.; Hwang, L.-P.; Garcia, M. A.; Jiang, Z. K.; Wu, L.; Lin, Y.-Y.; Tseng, H.-R. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2160–2165.
- (37) Wang, Y.-X. *J. Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* **2011**, *1*, 35–40.
- (38) Johannsen, M.; Gneveckow, U.; Thiesen, B.; Taymoorian, K.; Cho, C. H.; Waldöfner, N.; Scholz, R.; Jordan, A.; Loening, S. A.; Wust, P. *European Urology* **2007**, *52*, 1653–1662.
- (39) Johannsen, M.; Jordan, A.; Scholz, R.; Koch, M.; Lein, M.; Deger, S.; Roigas, J.; Jung, K.; Loening, S. *Journal of Endourology* **2004**, *18*, 495–500.
- (40) Jordan, A.; Scholz, R.; Maier-Hauff, K.; van Landeghem, F. K. H.; Waldöfner, N.; Teichgraber, U.; Pinkernelle, J.; Bruhn, H.; Neumann, F.; Thiesen, B.; von Deimling, A.; Felix, R. *Journal of Neuro-Oncology* **2006**, *78*, 7–14.
- (41) Jordan, A.; Scholz, R.; Wust, P.; Föhling, H.; Krause, J.; Wlodarczyk, W.; Sander, B.; Vogl, T.; Felix, R. *International Journal of Hyperthermia* **1997**, *13*, 587–605.
- (42) Lu, A.-H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. *Angewandte Chemie - International Edition* **2007**, *46*, 1222–1244.
- (43) Campelj, S.; Makovec, D.; Drogenik, M. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2008**, *20*, 1–5.
-

- (44) Shen, Y.; Zhao, L.; Qi, L.; Qiao, J.; Mao, L.; Chen, Y. *Chemistry - A European Journal* **2012**, *18*, 13755–13761.
- (45) Martins, P. M. A. Produção e caracterização de nanopartículas magnéticas para aplicação biotecnológica, Universidade do Minho, 2011.
- (46) Maity, D.; Agrawal, D. C. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, *308*, 46–55.
- (47) Massart, R. *IEEE Transactions on Magnetics* **1981**, *17*, 1247–1248.
- (48) Jeong, J.; Ha, T. H.; Chung, B. H. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *569*, 203–209.
- (49) Kang, Y. S.; Risbud, S.; Rabolt, J. F.; Stroeve, P. *Chemistry of Materials* **1996**, *8*, 2209–2211.
- (50) Goon, I. Y.; Lai, L. M. H.; Wang, X.; Lim, M.; Leech, D.; Amal, R.; Gooding, J. J. *In ICONN 2010 - International Conference On Nanoscience and Nanotechnology*; Sydney, 2010; pp 45–48.
- (51) Park, H.-Y.; Schadt, M. J.; Wang, L.; Lim, I.-I. S.; Njoki, P. N.; Kim, S. H.; Jang, M.-Y.; Luo, J.; Zhong, C.-J. *Langmuir* **2007**, *23*, 9050–9056.
- (52) Karamipour, S.; Sadjadi, M. S.; Farhadyar, N. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, *148*, 146–155.
- (53) Brown, K. R.; Walter, D. G.; Natan, M. J. *Chemistry of Materials* **2000**, *12*, 306–313.
- (54) Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 293–346.
- (55) Jain, S.; Hirst, D. G.; O’Sullivan, J. M. *The British Journal of Radiology* **2012**, *85*, 101–113.
- (56) El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M. A. *Nano Letters* **2005**, *5*, 829–834.
- (57) Patra, C. R.; Bhattacharya, R.; Mukhopadhyay, D.; Mukherjee, P. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62*, 346–361.

-
- (58) Cytodiagnostics - Gold Nanoparticle Properties <http://www.cytodiagnostics.com/store/pc/Gold-Nanoparticle-Properties-d2.htm> (acedido a 1 de Julho 2015).
- (59) Hassannejad, Z.; Khosroshahi, M. E. *Optical Materials* **2013**, *35*, 644–651.
- (60) Ziegler, C.; Eychmüller, A. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 4502–4506.
- (61) nanoComposix. *UV/Vis/IR Spectroscopy Analysis of Nanoparticles*; San Diego, 2012.
- (62) Sperling, R. A.; Gil, P. R.; Zhang, F.; Zanella, M.; Parak, W. J. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 1896–1908.
- (63) Guo, S.; Wang, E. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *598*, 181–192.
- (64) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11*, 55–75.
- (65) Perrault, S. D.; Chan, W. C. W. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 17042–17043.
- (66) Frens, G. *Nature Physical Science* **1973**, *241*, 20–22.
- (67) Karataş, Ö. F.; Sezgin, E.; Aydin, Ö.; Çulha, M. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, *71*, 315–318.
- (68) Long, N. N.; Vu, L. V.; Kiem, C. D.; Doanh, S. C.; Nguyet, C. T.; Hang, P. T.; Thien, N. D.; Quynh, L. M. *Journal of Physics: Conference Series* **2009**, *187*, 1–8.
- (69) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, *7*, 801–802.
- (70) Niu, J.; Zhu, T.; Liu, Z. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 1-7.
- (71) Brown, K. R.; Natan, M. J. *Langmuir* **1998**, *14*, 726–728.
- (72) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. *Advanced Materials* **2001**, *13*, 1389–1393.

- (73) Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J. *Langmuir* **2001**, *17*, 6782–6786.
- (74) Ferreira, V. C. T. Polímeros Condutores e Monocamadas Auto-montadas na Concepção de Novas Arquitecturas contendo Nanopartículas Metálicas: Preparação, Caracterização e Desempenho para Electrocatálise e Biosensores, Universidade de Lisboa, 2011.
- (75) Malvern Instruments. *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*; United Kingdom, 2015.
- (76) Philip, D. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2008**, *71*, 80–85.
- (77) Lim, J.; Eggeman, A.; Lanni, F.; Tilton, R. D.; Majetich, S. A. *Advanced Materials* **2008**, *20*, 1721–1726.
- (78) Zhang, C.; Jugold, M.; Woenne, E. C.; Lammers, T.; Morgenstern, B.; Mueller, M. M.; Zentgraf, H.; Bock, M.; Eisenhut, M.; Semmler, W.; Kiessling, F. *Cancer Research* **2007**, *67*, 1555–1562.
- (79) Tsiapa, I.; Efthimiadou, E. K.; Fragogeorgi, E.; Loudos, G.; Varvarigou, A. D.; Bouziotis, P.; Kordas, G. C.; Mihailidis, D.; Nikiforidis, G. C.; Xanthopoulos, S.; Psimadas, D.; Paravatou-Petsotas, M.; Palamaris, L.; Hazle, J. D.; Kagadis, G. C. *Journal of Colloid and Interface Science* **2014**, *433*, 163–175.
- (80) Fang, C.; Veiseh, O.; Kievit, F.; Bhattarai, N.; Wang, F.; Stephen, Z.; Li, C.; Lee, D.; Ellenbogen, R. G.; Zhang, M. *Nanomedicine* **2010**, *5*, 1357–1369.
- (81) Marinelli, L.; Lavecchia, A.; Gottschalk, K.-E.; Novellino, E.; Kessler, H. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 4393–4404.
- (82) Dayam, R.; Aiello, F.; Deng, J.; Wu, Y.; Garofalo, A.; Chen, X.; Neamati, N. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 4526–4534.
- (83) Xun, W.; Wu, D.-Q.; Li, Z.-Y.; Wang, H.-Y.; Huang, F.-W.; Cheng, S.-X.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X. *Macromolecular Bioscience* **2009**, *9*, 1219–1226.
- (84) Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. *The Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 17294–17298.

- (85) Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Mathä, B.; Lohof, E.; Hölzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 3033–3040.
- (86) Vilaça, H.; Ferreira, P. M. T.; Micaelo, N. M. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5420–5427.
- (87) Merrifield, R. B. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149–2154.
- (88) Benoiton, N. L. *Chemistry of Peptide Synthesis*; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2006.
- (89) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 2455–2504.
- (90) Malesevic, M.; Strijowski, U.; Bächle, D.; Sewald, N. *Journal of Biotechnology* **2004**, *112*, 73–77.
- (91) Zhang, L.; Pesti, J. A.; Costello, T. D.; Sheeran, P. J.; Uyeda, R.; Ma, P.; Kauffman, G. S.; Ward, R.; McMillan, J. L. *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 5180–5185.
- (92) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie - International Edition* **2002**, *41*, 2596–2599.
- (93) Li, P.; Wang, L. *Letters in Organic Chemistry* **2007**, *4*, 23–26.
- (94) Marik, J.; Sutcliffe, J. L. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 6681–6684.
- (95) Haubner, R.; Wester, H.-J. *Current Pharmaceutical Design* **2004**, *10*, 1439–1455.
- (96) Gurrath, M.; Müller, G.; Kessler, H.; Aumailley, M.; Timpl, R. *European Journal of Biochemistry* **1992**, *210*, 911–921.
- (97) Tao, C.-Z.; Cui, X.; Li, J.; Liu, A.-X.; Liu, L.; Guo, Q.-X. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48*, 3525–3529.
- (98) Carpino, L. A.; Han, G. Y. *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37*, 3404–3409.
- (99) Aqil, A.; Vasseur, S.; Duguet, E.; Passirani, C.; Benoît, J. P.; Roch, A.; Müller, R.; Jérôme, R.; Jérôme, C. *European Polymer Journal* **2008**, *44*, 3191–3199.

- (100) Chantrell, R. W.; Bradbury, A.; Popplewell, J.; Charles, S. W. *Journal of Applied Physics* **1982**, *53*, 2742–2744.
- (101) Liu, X.; Atwater, M.; Wang, J.; Huo, Q. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, *58*, 3–7.
- (102) Zou, X.; Ying, E.; Dong, S. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 4758–4764.