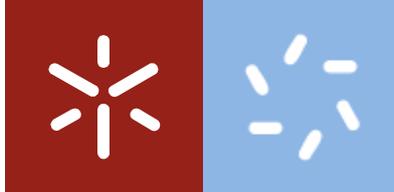


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Irina Soraia Rainho Rio

**Magnetolipossomas multifuncionais contendo nanopartículas magnéticas/plasmónicas para aplicação em terapia dual (fototerapia/quimioterapia)**





**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Irina Soraia Rainho Rio

**Magnetolipossomas multifuncionais contendo nanopartículas magnéticas/plasmónicas para aplicação em terapia dual (fototerapia/quimioterapia)**

Designação do Mestrado  
em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação do  
**Professor Doutor Paulo José Gomes Coutinho**  
**Professora Doutora Elisabete Maria dos Santos**  
**Castanheira Coutinho**



## DECLARAÇÃO

**Nome:** Irina Soraia Rainho Rio

**Endereço eletrónico:** irinasoraia2007@hotmail.com

**Telefone:** 934 418 658

**Título tese:**

Magnetolipossomas multifuncionais contendo nanopartículas magnéticas/plasmónicas para aplicação em terapia dual (fototerapia/quimioterapia)

**Orientadores:**

Professor Doutor Paulo José Gomes Coutinho

Professora Doutora Elisabete Maria dos Santos Castanheira Coutinho

**Designação do Mestrado:**

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

**Ano de Conclusão:**

2019

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Agradecimentos

Com o fim de mais uma etapa alcançada, começo esta dissertação por agradecer de forma individual a todas as pessoas que tornaram a finalização desta etapa possível.

Começo por agradecer ao Centro de Física da Universidade do Minho pela possibilidade que me concedeu de realizar, nesta instituição, a parte laboratorial da minha dissertação de mestrado.

Aos meus orientadores, Doutor Paulo Coutinho e Doutora Elisabete Castanheira Coutinho, por me terem dado a oportunidade da realização deste projeto, como também pela disponibilidade, dedicação e apoio demonstrados ao longo do mesmo.

À Professora Doutora Maria João Queiroz, do Centro de Química da Universidade do Minho, pelos compostos potencialmente antitumorais.

São também devidos agradecimentos à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), ao Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) e aos Programas COMPETE2020 e PORTUGAL 2020, através do Projeto PTDC/QUI-QFI/28020/2017 (POCI-01-0145-FEDER-028020).

Aos meus colegas de laboratório por todo o apoio, partilha de ideias e pelos momentos de descontração que ajudaram a relativizar vários dos problemas passados ao longo deste ano.

Aos meus pais por toda a educação que me deram e por todo o esforço que me permitiu chegar aqui. Às minhas irmãs, por todas as mensagens de apoio e confiança e, mesmo estando longe, estiveram sempre lá com as palavras certas no momento certo.

Por fim, e sem dúvida a pessoa que esteve sempre ao meu lado, ao meu namorado Carlos, pela paciência, encorajamento, amor e apoio incondicional, que foram cruciais nos momentos de maior trabalho e stress, e por acreditar sempre que iria conseguir chegar ao fim deste projeto; a ti o meu eterno Obrigada.



## Resumo

Atualmente, o cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial. Apesar das inúmeras investigações e descobertas conseguidas até aos dias de hoje, existem bastantes dificuldades num diagnóstico rápido, bem como em tratamentos direcionados de forma a diminuir os efeitos secundários. Assim, há uma urgência na descoberta de novos métodos de diagnóstico e tratamento.

A Nanotecnologia tem, cada vez mais, permitido o desenvolvimento de novas técnicas e estratégias para aplicação na terapia do cancro, como por exemplo, através do uso de hipertermia. As nanopartículas magnéticas (MNPs) mostram-se cada vez mais importantes neste sentido, devido às suas características únicas, tais como a capacidade de direcionamento para um local terapêutico alvo com recurso a gradientes de campo magnético externo. Por outro lado, o ouro, tem sido utilizado em diversos estudos e em diferentes aplicações, desde o revestimento de partículas para prevenir a aglomeração, até aos testes do potencial de nanopartículas de ouro no aquecimento local em terapia do cancro.

Neste trabalho, foram preparadas e posteriormente caracterizadas, nanopartículas com propriedades magnéticas e plasmónicas, nomeadamente nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês decoradas com nanopartículas de ouro; nanopartículas magnéticas de ferrite de níquel decoradas com nanopartículas de ouro; nanopartículas núcleo-coroa com núcleo de ferrite de manganês e coroa de ouro e nanopartículas núcleo-coroa com núcleo de ferrite de níquel e coroa de ouro. As nanopartículas sintetizadas foram utilizadas para a formação de magnetolipossomas sólidos (SMLs), sendo estes sistemas o nosso alvo de estudo. Estes nanossistemas foram avaliados quanto à capacidade de produção de aquecimento local por excitação na banda plasmónica do ouro, tendo-se medido a inibição da fluorescência do corante rodamina incorporado na camada lipídica dos SMLs. Os sistemas que apresentaram melhores resultados foram os SMLs contendo nanopartículas núcleo/coróa ferrite de manganês/Au e as decoradas de ferrite de níquel. Estes sistemas foram testados como nanotransportadores de novos potenciais fármacos antimorais, derivados de tienopiridina, tendo se revelado promissores para a terapia dual do cancro, combinando quimioterapia e fototerapia.



## Abstract

Currently, cancer is one of the leading causes of death worldwide. Despite the many investigations and discoveries to date, there are many difficulties in rapid diagnosis as well as in targeted treatments to reduce side effects. Thus, there is urgency in the discovery of new methods for diagnosis and treatment.

Nanotechnology has increasingly allowed the development of new techniques and strategies for application in cancer therapy, for example, using hyperthermia. Magnetic nanoparticles (MNPs) have been increasingly important in this regard, due to their unique characteristics, such as the ability to target a specific therapeutic site using external magnetic field gradients. On the other hand, gold has been used in several studies and different applications, from particle coating to preventing agglomeration, to tests of the potential of gold nanoparticles for local heating in cancer therapy.

In this work, nanoparticles with magnetic and plasmonic properties were prepared and characterized, including magnetic nanoparticles of manganese ferrite decorated with gold nanoparticles; magnetic nanoparticles of nickel ferrite decorated with gold nanoparticles; core-shell nanoparticles with manganese ferrite core and gold shell; and core-shell nanoparticles with nickel ferrite core and gold shell. The synthesized nanoparticles were used for the preparation of solid magnetoliposomes (SMLs), these systems being our target of study. These nanosystems were evaluated for the ability to cause local heating upon excitation in the gold plasmonic band. For that, the fluorescence quenching of rhodamine incorporated in SMLs lipid layer was measured. The systems exhibiting the best results were the SMLs containing core-shell nanoparticles with manganese ferrite core and gold shell and the SMLs containing magnetic nanoparticles of nickel ferrite decorated with gold nanoparticles. These systems were further tested as nanocarriers for novel potential antitumor drugs (thienopyridine derivatives), revealing to be promising for dual cancer therapy, combining chemo- and phototherapy.



# Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas .....	xvii
Lista de Abreviaturas .....	xix
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Contextualização e Relevância do tema .....	1
1.2. Objetivos.....	2
1.3. Estrutura da dissertação .....	2
CAPÍTULO II: Enquadramento Teórico .....	3
2.1. Nanotecnologia e a sua importância a nível biomédico.....	3
2.2. Nanopartículas magnéticas.....	3
2.2.1. Ferrites .....	5
2.2.2. Propriedades das nanopartículas magnéticas.....	6
2.2.3. Preparação de nanopartículas magnéticas para aplicações em biomedicina .....	8
2.3. Aplicações das nanopartículas magnéticas .....	8
2.3.1. Imagiologia por ressonância magnética .....	9
2.3.2. Hipertermia.....	10
2.4. Nanopartículas de ouro .....	11
2.4.1. Propriedades das nanopartículas de ouro (AuNPs).....	11
2.4.2. Terapias fototérmicas.....	12
2.5 Nanopartículas híbridas.....	14
2.5.1. Nanopartículas híbridas baseadas em ouro.....	15
2.6. Lipossomas.....	17
2.6.1. Auto-Organização.....	18
2.7. Magnetolipossomas .....	18
2.8. Compostos derivados de tienopiridinas.....	20
CAPÍTULO III: Técnicas de análise e caracterização.....	23
3.1. Espectroscopia de absorção UV-Visível [92] .....	23
3.1.1. Natureza da radiação eletromagnética.....	23
3.1.2. Lei de Lambert-Beer.....	23
3.2. Espectroscopia de Fluorescência [93] .....	24

3.2.1. Fenômeno de Fluorescência .....	24
3.2.2. Tempos de vida do estado excitado .....	26
3.2.3. Anisotropia de Fluorescência .....	27
3.2.4. Transferência de Energia Ressonante de Förster (FRET).....	29
3.3. Difração de Raios X (XRD) .....	30
3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão. ....	31
CAPÍTULO IV: Materiais e Métodos.....	32
4.1. Materiais.....	32
4.2. Síntese dos diferentes tipos de nanopartículas .....	33
4.2.1. Preparação das nanopartículas magnéticas .....	34
4.2.1.1. Preparação das nanopartículas de ferrite de manganês ( $MnFe_2O_4$ ) .....	34
4.2.1.2. Preparação das nanopartículas de ferrite de níquel.....	35
4.2.2. Preparação das nanopartículas de ouro ( <i>Brust Schiffrin Method</i> ) .....	36
4.3. Funcionalização das nanopartículas de $MnFe_2O_4$ e de $NiFe_2O_4$ .....	37
4.4. Acoplamento das ferrites funcionalizadas com as nanopartículas de ouro.....	38
4.5. Crescimento da camada de ouro com hidroxilamina e nanopartículas de ouro.....	39
4.6. Esquema de funcionalização dos diferentes tipos de nanopartículas .....	40
a) Nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês decoradas com nanopartículas plasmônicas de ouro .....	40
b) Nanopartículas magnéticas, núcleo/coroa, com núcleo de ferrite de manganês e coroa de ouro...	41
c) Nanopartículas magnéticas de ferrite de níquel decoradas com nanopartículas plasmônicas de ouro .....	42
d) Nanopartículas magnéticas, núcleo/coroa, com núcleo de ferrite de níquel e coroa de ouro .....	43
4.7. Confirmação do acoplamento das nanopartículas magnéticas com as nanopartículas de ouro .....	43
4.8. Caracterização das nanopartículas .....	43
4.8.1. Espectroscopia de absorção UV-Visível .....	44
4.8.2. Difração de Raios-X.....	44
4.8.3. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	45
4.9. Preparação dos Magnetolipossomas Sólidos .....	45
4.10. Ensaios fotofísicos dos SMLs .....	46
4.10.1. Ensaios de irradiação.....	47
4.10.2. Ensaios de Temperatura.....	48
4.11. Estudo fotofísico dos compostos estudados .....	48
4.11.1. Medidas de anisotropia de fluorescência.....	49
4.11.2. Ensaios de interação dos sistemas com modelos membranares .....	49

CAPÍTULO V: Resultados e Discussão.....	50
5.1. Caracterização das nanopartículas magnéticas .....	51
5.1.1. Análises de XRD das nanopartículas magnéticas .....	51
5.1.2. Espectros de Absorção UV-Visível.....	53
5.1.3. Propriedades magnéticas .....	56
5.2. Nanopartículas de ouro – Seleção do método de síntese.....	57
5.3. Caracterização das nanopartículas de ouro ( <i>Brust Shiffrin Method</i> ) .....	62
5.3.1. Espectros de absorção no UV-Visível .....	64
5.3.2. Monitorização do crescimento da camada de ouro com hidroxilamina e nanopartículas de ouro..	64
5.4. Ensaio de Irradiação e de Temperatura.....	66
5.5. Estudo fotofísico dos compostos em vários solventes.....	77
5.6. Caracterização dos magnetolipossomas sólidos .....	80
5.6.1. Prova da formação da bicamada lipídica.....	80
5.6.2. Caracterização dos SMLs por Difusão Dinâmica de Luz (DLS) .....	83
5.6.3. Caracterização dos magnetolipossomas sólidos através de TEM .....	84
5.6.4. Ensaio de interação dos SMLs com modelos de membranas .....	85
5.6.5. Estudos de anisotropia dos compostos em magnetolipossomas.....	86
CAPÍTULO VI – Conclusões e perspectivas futuras .....	88
Bibliografia.....	90



## Índice de Figuras

Figura 2.1- Representação esquemática da geometria de uma ferrite com estrutura em espinela invertida ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). .....	6
Figura.2.2. – Ilustração esquemática das relações de tamanho-coercividade de pequenas partículas .....	7
Figura. 2.3 - Comportamento de magnetização de nanopartículas ferromagnéticas e superparamagnéticas sob um campo magnético externo.....	8
Figura. 2.4 -Esquema do uso de nanopartículas magnéticas como estratégia terapêutica em simultâneo....	9
Figura 2.5 - Origem da ressonância plasmônica de superfície (SPR) devido à interação dos eletrões.....	12
Figura 2.6 – a - Representação de um lipossoma; b – estrutura de uma micela e c – estrutura de um bicamada lipídica.....	18
Figura 2.7 - Representação esquemática dos magnetolipossomas aquosos (AMLs) e dos magnetolipossomas sólidos (SMLs).....	20
Figura 2.8. - Estrutura dos compostos derivados de tienopiridinas utilizados neste estudo.....	21
Figura 3.1- Feixe de radiação eletromagnética a atravessar uma solução.....	24
Figura 3.2 - Configuração dos spins dos eletrões em estados singleto ( $M=1$ ) e tripleto ( $M=3$ ). .....	25
Figura 3.3 - Diagrama de <i>Jablonski</i> representando as transições de estados eletrônicos.....	26
Figura 3.4- Efeitos de excitação polarizada e difusão de rotação sobre a polarização e anisotropia de emissão. ....	27
Figura 3.5 - Ilustração da sobreposição espectral entre o espectro de emissão do doador e a absorção do aceitador.....	29
Figura. 4.1 - Processo de síntese de nanopartículas de ouro obtido em laboratório, pelo método de <i>Brust-Schiffrin</i> .....	36
Figura. 4.2 - Diagrama esquemático do arranjo proposto das espécies $\text{R}_4\text{N}^+$ e $\text{Br}^-$ adsorvidas na superfície das partículas de Au. ....	37
Figura 4.3 - a) Solução de nanopartículas de ouro; b) solução de nanopartículas de ouro após acoplamento com as nanopartículas de $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ; c) solução após centrifugação, onde se vê o sobrenadante transparente e um pellet de nanopartículas que responde a um campo magnético externo aplicado. ....	39

Figura 4.4 - Implementação pela hidroxilamina do método <i>seeding</i> para nanopartículas de Au coloidal. Adaptado de [100] .....	40
Figura 4.5 - Esquema da produção de nanopartículas magnéticas de $MnFe_2O_4$ decoradas com nanopartículas plasmônicas de Au .....	41
Figura 4.6 - Esquema de reação da hidroxilamina nas nanopartículas de Manganês decoradas com ouro, de forma a obter nanopartículas núcleo coroa $MnFe_2O_4/Au$ .....	42
Figura 4.7 - Esquema da produção de nanopartículas magnéticas de $NiFe_2O_4$ decoradas com nanopartículas plasmônicas de Au .....	43
Figura 4.8 - Esquema de reação da hidroxilamina nas nanopartículas de Níquel decoradas com ouro de forma a obter nanopartículas núcleo coroa $NiFe_2O_4/Au$ .....	43
Figura 4.9 - Representação da estrutura cristalina do Au. Estrutura cúbica de fases centradas, constituído por 8 átomos de Au nos vértices e 6 átomos da Au nas faces do cubo.....	45
Figura 4.10 – Esquema do sistema de montagem utilizado para a realização dos testes de irradiação....	47
Figura 4.11 - Estrutura molecular da lecitina de soja. ....	49
Figura 5.1 - Difractogramas de XRD obtidos para as ferrites de magnésio (10x) .....	52
Figura 5.2 - Difractogramas de XRD obtidos para as ferrites de magnésio (5x) .....	52
Figura 5.3 - Difractogramas de XRD obtidos para as ferrites de níquel .....	53
Figura 5.4. - Espectro de absorção das nanopartículas magnéticas de $MnFe_2O_4$ (5x, 10x) e de $NiFe_2O_4$ .....	55
Figura 5.5 - Gráfico de $Tauc$ para as nanopartículas de ferrite de manganês (5x). Inserido: espectro de absorção UV-Visível das nanopartículas dispersas em água.....	55
Figura 5.6 - Gráfico de $Tauc$ para as nanopartículas de ferrite de manganês (10x). Inserido: espectro de absorção UV-Visível das nanopartículas dispersas em água.....	55
Figura 5.7 - Gráfico de $Tauc$ para as nanopartículas de ferrite de níquel. Inserido: espectro de absorção UV-Visível das nanopartículas dispersas em água.....	56
Figura. 5.8 – Comportamento das nanopartículas na presença de um campo magnético a) $NiFe_2O_4$ , b) $MnFe_2O_4$ .....	57
Figura 5.9. - Nanopartículas de ferrite de manganês decoradas com nanopartículas de ouro (Martin Method) .....	59

Figura 5.10 - Processo de transferência de fase da solução aquosa de nanopartículas de ouro preparadas pelo método de Martin. a) Solução aquosa de ouro de cor rubi e solução de clorofórmio com Octadecilamina (ODA); b) Solução de ouro em clorofórmio de cor escura e água após transferência de fase.....	60
Figura. 5.11. Espectro de absorção de nanopartículas de ferrite de manganês decoradas com uma solução nanopartículas de ouro preparadas pelo método de Martin, após o processo de transferência de fase....	61
Figura 5.12 - Nanopartículas de Ferrite de Manganês decoradas com nanopartículas de ouro, com estas protegidas com GTMA.....	61
Figura 5.13 - Nanopartículas de ferrite de manganês decoradas com nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de <i>Brust Schiffrin</i> . ....	62
Figura 5.14 - Solução das nanopartículas de ouro preparadas pelo método de <i>Brust Schiffrin</i> . ....	63
Figura 5.15 - Espectro de absorção de soluções de nanopartículas de ouro, preparadas pelo método de <i>Brust Schiffrin</i> de diferentes concentrações. ....	63
Figura 5.16 – Espectros de absorção das nanopartículas decoradas com nanopartículas de ouro.....	65
Figura 5.17 - Monitorização do crescimento das nanopartículas de ouro em torno das nanopartículas magnéticas de $MnFe_2O_4$ decoradas com nanopartículas de ouro, por ação da hidroxilamina. ....	65
Figura. 5.18 - Monitorização do crescimento das nanopartículas de ouro em torno das nanopartículas magnéticas de $NiFe_2O_4$ decoradas com ouro por ação da hidroxilamina .....	66
Figura 5.19 – Espectros de absorção das nanopartículas núcleo/coroa.....	67
Figura 5.20 – Intensidade de fluorescência da rodamina dos diferentes sistemas preparados ao longo do tempo de irradiação. $\lambda_{em}=540$ nm.....	69
Figura 5.21 - Ensaio de Irradiação dos diferentes sistemas preparados. Percentagem da intensidade de fluorescência da rodamina em função do tempo de irradiação.....	70
Figura 5.22 – Intensidade de fluorescência da rodamina em função da temperatura dos SMLs – Controlo Positivo $\lambda_{exc}=540$ nm .....	72
Figura 5.23 –Logaritmo da razão entre a intensidade de fluorescência no tempo zero e a intensidade de fluorescência em diferentes tempos em função do inverso da temperatura. ....	74
Figura 5.24 – Intensidade de fluorescência da rodamina (%) em função do tempo de irradiação para os sistemas compostos por nanopartículas de ferrite de manganês e por nanopartículas de ferrite de níquel - Controlo negativo.....	75
Figura 5.25 – Intensidade de fluorescência da rodamina em função do tempo de irradiação para os sistemas compostos por nanopartículas de ferrite de níquel.....	75

Figura 5.26 – Intensidade de fluorescência da rodamina em função da temperatura dos sistemas, compostos apenas por lipossomas marcados com rodamina e respectiva representação do logaritmo da razão entre a intensidade de fluorescência no tempo zero e a intensidade de fluorescência em diferentes tempos em função do inverso da temperatura. ....	76
Figura 5.27 – Intensidade de fluorescência da rodamina em função do tempo de irradiação dos sistemas compostos apenas por lipossomas marcados com rodamina. ....	78
Figura 5.28 - Espectros de absorvância do composto 1 em solução ( $10^{-5}$ M) em vários solventes. ....	79
Figura 5.29 - Espectros de absorvância do composto 2 em solução ( $10^{-5}$ M) em vários solventes. ....	79
Figura 5.30- Espectros de fluorescência normalizados do composto 1 em solução ( $1 \times 10^{-6}$ M) em acetato de etilo, acetonitrilo, clorofórmio e etanol. ....	80
Figura 5.31 - Espectros de fluorescência normalizados do composto 2 em solução ( $1 \times 10^{-6}$ M) em acetato de etilo, acetonitrilo, clorofórmio e etanol. ....	80
Figura 5.32 - Sobreposição espectral entre a emissão da rodamina e a absorção do Nile Blue.....	81
Figura 5.33 – Estrutura química da sonda Nile Blue.....	81
Figura 5.34 – Espectros de fluorescência ( $\lambda_{exc}=540$ nm, excitação direta da Rodamina) dos SMLs marcados com Nile Blue e/ou Rh-DOPE, na primeira e segunda camada, respectivamente. ....	82
Figura 5.35 – Imagens de TEM de magnetolipossomas sólidos: a) contendo nanopartículas magnéticas decoradas com nanopartículas de ouro; b) contendo nanopartículas núcleo/coroa de $MnFe_2O_4/Au$ . ....	84
Figura 5.36 - Espectros de fluorescência dos magnetolipossomas sólidos baseados em DOPG antes e após a interação com os GUVs, baseados em lecitina de soja ( $1 \times 10^{-3}$ M). Para estes ensaios foram usadas as sondas NBD e rodamina como aceitadores e os compostos 1 e 2 como dadores respectivamente.....	86

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Variação de parâmetros para terapia fototérmica em três tipos nanopartículas de ouro.....	13
Tabela 2.2 - Resultados referentes aos valores de $GI_{50}$ dos compostos estudados.....	21
Tabela 4.1 – Condições de preparação das nanopartículas de $MnFe_2O_4$ .....	34
Tabela 4.2 – Condições de preparação das nanopartículas de $NiFe_2O_4$ .....	35
Tabela 4.3 - Condições de preparação das nanopartículas de ouro pelo método de <i>Brust Schiffrin</i> .....	37
Tabela 4.4 - Quantidade de nanopartículas usada e dos reagentes utilizados no processo de funcionalização .....	38
Tabela 4.5 - Estrutura e características físico-químicas dos fosfolípidos utilizados na preparação dos magnetolipossomas .....	46
Tabela 5.1 - Tabela-Resumo dos tamanhos de $MnFe_2O_4$ e $NiFe_2O_4$ , calculados através da equação de <i>Scherrer</i> . .....	54
Tabela 5.2 - Temperatura obtida nos diferentes sistemas sintetizados através dos ensaios de irradiação	73
Tabela 5.3 - Comprimentos de onda máximo de absorção ( $I_{abs}$ ) e emissão ( $I_{em}$ ), coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ) para os compostos 1 e 2 nos vários solventes. ....	80
Tabela 5.4 - Eficiência de FRET ( $\Phi_{FRET}$ ), Raio de Förster ( $R_0$ ) e distância doador-aceitador ( $r$ ) do ensaio de formação da dupla camada lipídica em magnetolipossomas sólidos (SMLs).....	83
Tabela 5.5 - Resultados de DLS obtidos para os dois tipos de magnetolipossomas sólidos compostos por nanopartículas de ferrite de manganês e ouro. ....	84
Tabela 5.6 - Valores de anisotropia de fluorescência ( $r$ ) dos compostos e valores de comprimentos de onda máximos dos compostos em SMLs a 25 °C. Valores de anisotropia de fluorescência dos fármacos em glicerol a 25 °C para comparação .....	86



## Lista de Abreviaturas

AMLs - Magnetolipossomas Aquosos

AuNps – Nanopartículas de Ouro

DMSO – Dimetilsulfóxido

DOPG – Dioleoilfosfatidilglicerol

DRX – Difração de Raios-X

EPR – Efeito de permeabilidade e retenção

FRET – Transferência de Energia por Ressonância de Förster

GUVs – Vesículas unilamelares gigantes

MNPs – Nanopartículas magnéticas

NPs – Nanopartículas

Rh – DOPE – lípido dioleoilfosfatidiletanolamina marcado com rodamina

SMLs – Magnetolipossomas Sólidos

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão

$T_m$  – Temperatura de transição de fase



# CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

## 1.1. Contextualização e Relevância do tema

Atualmente o cancro é uma das doenças com maior incidência na população mundial, com uma taxa de mortalidade bastante elevada. Uma grande parte dos fármacos usados em quimioterapia são tóxicos e causam efeitos secundários. Na área da Biomedicina, o potencial das nanopartículas magnéticas tem sido cada vez mais reconhecido, para aplicações biomédicas, estas nanopartículas devem apresentar um comportamento superparamagnético à temperatura ambiente, uma vez que exibem uma elevada magnetização apenas na presença de um campo magnético externo <sup>1</sup>.

O desenvolvimento de lipossomas contendo nanopartículas magnéticas (magnetolipossomas) permite uma utilização mais segura de fármacos antitumorais potentes na quimioterapia, uma vez que estes nanossistemas podem superar muitos dos problemas de farmacocinética e de toxicidade sistémica. Além disso, os magnetolipossomas podem ser guiados e localizados no local terapêutico de interesse, através de gradientes de campo magnético externo, e ainda ser utilizados no tratamento do cancro por hipertermia magnética.

Segundo o estudo da organização *Globocan*, cerca de 14,1 milhões de novos casos de cancro e 8,2 milhões de mortes ocorreram em 2012 em todo o mundo, sendo que 57% dos casos ocorreram nos países menos desenvolvidos <sup>2</sup>. Com base nestes números, há uma necessidade e interesse cada vez maior na investigação de novos tratamentos para esta doença, com o objetivo de criar terapias mais direcionadas e formas de diagnóstico na fase prematura do desenvolvimento da doença <sup>3</sup>.

A Agência Internacional de Investigação em Cancro prevê que, em 2030, a incidência global deverá atingir 21,7 milhões de novos casos e 13 milhões de mortes

Além disso, com base no estilo de vida não saudável cada vez mais comum (com má alimentação, consumo de tabaco e sedentarismo), estes números poderão vir a aumentar. Desta forma, sendo o cancro a segunda causa de morte em todo o mundo, é de grande interesse a nível mundial alcançar terapias eficazes para combater estes números <sup>4</sup>.

Com este trabalho, pretende desenvolver-se um bionanossistema, um magnetolipossoma composto por nanopartículas híbridas (nanopartículas magnéticas revestidas com nanopartículas de ouro), com aplicação terapêutica na área do cancro na tentativa de melhorar o seu tratamento. Estes bionanossistemas caracterizam-se pela capacidade de poderem ser guiados através de um

campo magnético externo até ao local alvo, o que permite uma diminuição dos efeitos secundários, bem como evitar a citotoxicidade. Trata-se de um sistema bastante promissor, pois combina vários efeitos, o que possibilita uma terapia tripla, combinando fototerapia, hipertermia (associada a um efeito térmico,) conjugadas com a capacidade de entrega controlada de fármacos.

## 1.2. Objetivos

Os principais objetivos desta investigação foram a otimização de magnetolipossomas sólidos baseados em nanopartículas com núcleo magnético e uma coroa de ouro ou decoradas com nanopartículas de ouro; a caracterização dos sistemas produzidos; a avaliação destes sistemas como transportadores de fármacos anti tumorais, sintetizados ou já estabelecidos; e, por fim, a avaliação da capacidade de fototerapia.

No final do projeto, esperamos obter um nanossistema magnético otimizado para terapia combinada, fototerapia, hipertermia e quimioterapia. Propõe-se que estes sistemas apresentem características como biocompatibilidade, propriedades magnéticas ideais para o direcionamento, propriedades de transporte e entrega de fármacos, bem como capacidade terapêutica fototérmica.

## 1.3. Estrutura da dissertação

Neste capítulo serão descritos brevemente os objetivos principais do trabalho desenvolvido. Ao longo do capítulo 2, serão explorados vários tópicos teóricos relevantes para a compreensão deste trabalho em que foram produzidas nanopartículas magnéticas pelo método de coprecipitação e a sua cobertura com nanopartículas de ouro de duas formas de diferentes, de forma a obter diferentes tipos de partículas para posterior comparação em aplicações biomédicas.

No capítulo 3 serão descritas em detalhe as técnicas de caracterização utilizadas. No capítulo 4 serão detalhados os materiais e métodos utilizados na síntese das nanopartículas magnéticas, a sua posterior funcionalização, a síntese das nanopartículas de ouro, e a caracterização das mesmas.

Seguidamente, no capítulo 5, serão expostos os resultados obtidos ao longo das várias fases do desenvolvimento da dissertação e respetiva discussão.

Por fim, no capítulo 6, serão apresentadas as principais conclusões, algumas considerações finais e serão propostas algumas tarefas a realizar para um possível seguimento do trabalho.

## CAPÍTULO II: Enquadramento Teórico

### 2.1. Nanotecnologia e a sua importância a nível biomédico

A nanotecnologia é o estudo das propriedades da matéria à nanoescala, concentrando-se nas propriedades únicas e dependentes do tamanho dos materiais de estado sólido. Com os desenvolvimentos e aplicações, novos métodos de síntese são necessários para a produção de materiais nesta escala. Igualmente importante é a implementação de novas abordagens de caracterização.

A definição nos dias de hoje consiste na capacidade de manipular um único objeto na escala nano. A nanotecnologia tornou-se possível com a chegada da manipulação de moléculas únicas, a partir dos anos 80. Esta é uma tecnologia que utiliza blocos de construção à nanoescala, mas que hoje em dia é usada de forma mais flexível. Um conjunto de objetos à nanoescala pode ainda ter propriedades únicas dependentes do tamanho, o que é dominado de nanotecnologia, embora seja melhor a designação de "tecnologia de nanomateriais"<sup>5</sup>.

Sendo a nanotecnologia uma área transversal a vários domínios, surge então o conceito de nanomedicina, a qual, como o nome sugere, baseia-se na manipulação e/ou construção de nanomateriais com aplicações médicas.

Atualmente, a nanomedicina é usada em todo o mundo com o intuito de melhorar a vida dos pacientes que sofrem de doenças como o cancro. No campo da nanomedicina, a nanotecnologia produziu avanços significativos, nomeadamente no diagnóstico e na terapia. A incorporação de ferramentas avançadas de nanotecnologia, tanto no diagnóstico como na terapia, demonstrou um elevado potencial para revolucionar os cuidados de saúde.

### 2.2. Nanopartículas magnéticas

A nanotecnologia é uma tecnologia atual com grande crescimento nos últimos anos e com uma importância crescente nas mais diversas áreas.

Atualmente, a nanotecnologia está a abrir a possibilidade de cientistas, engenheiros, químicos e médicos trabalharem a nível molecular e celular, de forma a gerar importantes avanços nas ciências da vida e da saúde. Devido às aplicações generalizadas das nanopartículas magnéticas (MNPs) em biotecnologia, biomedicina, ciência dos materiais, engenharia e áreas ambientais, tem sido dada muita atenção para a síntese de diferentes tipos.

As excelentes propriedades destes materiais, nomeadamente as suas propriedades magnéticas como o ferromagnetismo e o paramagnetismo, fornecem um futuro promissor para a sua utilização. As nanopartículas são partículas de dimensões na ordem de grandeza do nanómetro e a preparação deste tipo de partículas é muito importante uma vez que as propriedades destas dependem das suas dimensões <sup>6</sup>.

Para aplicações biomédicas, são preferencialmente utilizadas nanopartículas com comportamento superparamagnético à temperatura ambiente. Esta característica permite que as nanopartículas exibam apenas um comportamento magnético na presença de um campo externo, útil em várias aplicações. Por outro lado, quando a aplicação pretendida é a terapia e o diagnóstico médico, são necessárias nanopartículas estáveis em água a um pH de 7 e num ambiente fisiológico. As nanopartículas devem ser sintetizadas a partir de um material não-tóxico, não-imunogénico e com tamanhos pequenos, para permanecer em circulação após a injeção. Devem também apresentar uma alta magnetização, de modo que o seu movimento no sangue possa ser controlado através de um gradiente magnético, de forma a serem imobilizadas perto do tecido alvo. Para aplicações *in vivo*, as nanopartículas magnéticas podem ser encapsuladas com um polímero biocompatível, para evitar a formação de grandes agregados e biodegradação quando expostas ao sistema biológico<sup>6</sup>.

Existem duas classes principais de nanopartículas magnéticas:

- Nanopartículas metálicas: aquelas compostas por metais, como cobalto (Co), ferro (Fe), manganês (Mn) e níquel (Ni) ou ligas metálicas, tais como nanopartículas de ferro-platina (FePt) ou ferro-cobalto (FeCo);
- Nanopartículas de óxidos de metal: as compostas de óxidos de ferro dopados com metais diamagnéticos como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  <sup>7</sup>.

Nanopartículas de óxido de ferro, como a magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou a sua forma oxidada, maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), são as nanopartículas mais utilizadas para aplicações biomédicas, para as quais a suscetibilidade é elevada [8,9].

A administração controlada de fármacos através de nanopartículas permite a redução do fármaco não utilizado, que por sua vez, vai originar uma diminuição dos efeitos secundários, bem como um fornecimento controlado de fármaco ao local alvo <sup>10</sup>. As nanopartículas magnéticas de óxidos de metal apresentam um desempenho superior em termos de estabilidade química e biocompatibilidade em comparação com as nanopartículas metálicas. Estes sistemas têm uma

elevada superfície que pode ser adequadamente modificada, permitindo a ligação de agentes biológicos.

É notório e importante salientar que o tratamento e/ou diagnóstico com este tipo de materiais não se têm mostrado prejudiciais. Além disso, o número de aplicações biológicas destes materiais tem aumentado ao longo do tempo, nomeadamente no direcionamento de fármacos para locais específicos, em hipertermia e como agentes de contraste de imagiologia por ressonância magnética (MRI)<sup>11</sup>.

### 2.2.1. Ferrites

Atualmente, existem vários tipos de nanopartículas magnéticas utilizadas na investigação. No entanto, as nanopartículas à base de óxidos de ferro são as mais utilizadas, devido a apresentarem propriedades vantajosas, nomeadamente superparamagnetismo, boa biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo de produção e não apresentam perigos para o meio ambiente <sup>12</sup>. Este tipo de nanopartículas são constituídas por ferro, oxigénio e/ou grupos OH. As formas de maior interesse biológico são a magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e a sua forma oxidada maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) <sup>13</sup>.

As ferrites podem apresentar três tipos de simetrias estruturais, a espinela, a hexagonal e a *Garnet*, consoante o tamanho e a carga dos iões metálicos (Figura 2.1).

No grupo das ferrites com estrutura em espinela temos as ferrites de manganês ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ). Este tipo de nanopartículas têm apresentado algum interesse tanto pelas suas propriedades como pelo elevado leque de possíveis aplicações. As NPs de ferrite de manganês apresentam propriedades magnéticas suaves, como a moderada magnetização de saturação, baixa coercividade, boa estabilidade química, dureza mecânica e anisotropia efetiva.

Este tipo específico de ferrite, a ferrite de manganês tem a magnetização mais forte entre o grupo das nanopartículas de ferrite, o que as torna excelentes agentes de contraste negativo (T2) em ressonância magnética, pois o seu forte efeito de contraste negativo vai prevenir o aumento do efeito de contraste positivo (T1).

Para além disso, as nanopartículas superparamagnéticas de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  mostraram ser úteis para a deteção de tumores, assim como para a definição de zonas danificadas em edemas locais ou mesmo hemorragias. As aplicações deste tipo de nanopartículas dependem das suas propriedades magnéticas, que se encontram fortemente correlacionadas com a sua estrutura de nível atómico [14, 15].

Outro tipo de ferrites com bastante interesse para os investigadores são as ferrites de níquel, trata se de um dos materiais multifacetados e tecnologicamente mais importantes na área das ferrites devido às suas propriedades ferrimagnéticas, baixa condutividade e alta estabilidade eletroquímica. A ferrite de níquel apresenta uma estrutura contrária à de espinela. A localização dos cátions divalentes ( $\text{Ni}^{2+}$ ) na estrutura cristalina é quase homóloga às propriedades magnéticas da ferrite de níquel.

No entanto, a ferrite de níquel apresenta uma natureza superparamagnética e tem diversas aplicações, como sensor de gás, fluidos magnéticos, catalisadores, sistemas de armazenamento magnético, materiais fotomagnéticos, liberação de medicamentos para locais específicos, ressonância magnética e dispositivos de micro-ondas <sup>16</sup>.

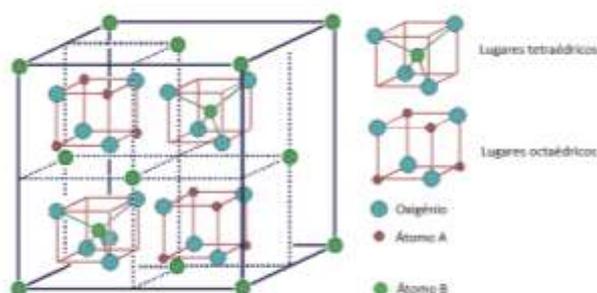


Figura 2.1- Representação esquemática a geometria de uma ferrite com estrutura em espinela invertida ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Adaptado de <sup>17</sup>

Neste trabalho, foram utilizadas nanopartículas de ferrite de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ) e nanopartículas de ferrite de manganês ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ), graças às suas excelentes propriedades em terapia e diagnóstico.

As nanopartículas de ferrite de níquel têm sido propostas como menos citotóxicas para as células *HeLa* quando comparadas com outros tipos de nanopartículas magnéticas do tipo ferrite (cobalto -  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  e zinco -  $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$ ), sendo assim mais utilizadas na área biomédica <sup>18</sup>. As nanopartículas de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  demonstraram uma boa biocompatibilidade e toxicidade ligeira contra células *HeLa* e apresentam uma suscetibilidade magnética mais elevada, em comparação com outros tipos de nanopartículas <sup>19</sup>.

### 2.2.2. Propriedades das nanopartículas magnéticas

Os efeitos magnéticos das nanopartículas são causados pelos movimentos de partículas carregadas (elétrões, lacunas, prótons e íons). Uma partícula com carga elétrica cria um dipolo magnético, chamado magneto. Em materiais ferromagnéticos, o magneto está associado em grupos. Um domínio magnético (também chamado de domínio Weiss) refere-se a um volume de

material ferromagnético, no qual todos os magnetos estão alinhados na mesma direção por forças. Este conceito de domínios distingue o ferromagnetismo do paramagnetismo<sup>20</sup>.

A estrutura do domínio de um material ferromagnético determina a dependência no tamanho do seu comportamento magnético. Quando o tamanho de um material ferromagnético é reduzido abaixo de um valor crítico, ele torna-se num domínio único <sup>20</sup>.

De acordo com a teoria do domínio magnético, o tamanho crítico do domínio único é afetado por vários fatores, incluindo o valor da saturação magnética, força de anisotropia cristalina e forças de troca, energia no domínio da superfície ou da parede e forma das partículas. A reação de materiais ferromagnéticos na presença de um campo magnético é descrita através de um ciclo de histerese, caracterizado por dois parâmetros principais: remanescência e coercividade. Este último está relacionado com a "espessura" da curva e é a propriedade de maior interesse, que depende fortemente do tamanho. Verificou-se que, à medida que o tamanho das partículas diminui, a coercividade aumenta até atingir o máximo diminuindo de seguida para zero (Figura 2.2).

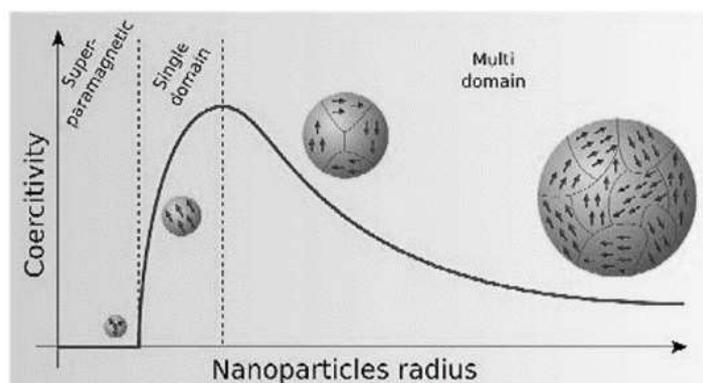


Figura.2.2. – Ilustração esquemática das relações de tamanho-coercividade de pequenas partículas

Quando o tamanho das partículas de domínio único diminui ainda mais abaixo de um diâmetro crítico, a coercividade torna-se zero e essas partículas tornam-se superparamagnéticas. O superparamagnetismo é causado por efeitos térmicos. Em partículas superparamagnéticas, as flutuações térmicas são fortes o suficiente para desmagnetizar espontaneamente uma montagem pré-saturada (Figura 2.3). Portanto, essas partículas possuem coercividade zero e não possuem histerese.

As nanopartículas tornam-se magnéticas na presença de um campo externo, mas revertem para um estado não magnético quando o íman é removido. Isso evita um comportamento "ativo" das partículas quando não há campo aplicado <sup>6</sup>. Quando estas características estão presentes, estamos perante um material superparamagnético.

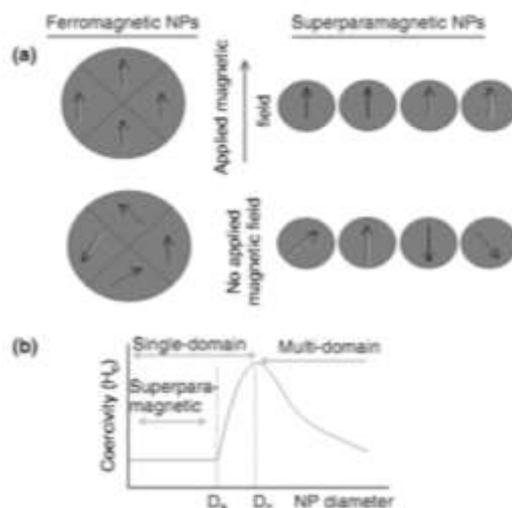


Figura. 2.3 - Comportamento de magnetização de nanopartículas ferromagnéticas e superparamagnéticas sob um campo magnético externo <sup>6</sup>.

### 2.2.3. Preparação de nanopartículas magnéticas para aplicações em biomedicina

Os métodos de síntese de nanopartículas de principal interesse são aqueles que permitem a formação de partículas de tamanho e forma uniformes. Este objetivo pode ser conseguido por precipitação a partir de uma solução homogênea sob condições controladas, ou controlando o crescimento das partículas num processo em que um precursor de aerossol ou vapor é decomposto. No caso de nanopartículas magnéticas para aplicações biomédicas, classificam-se os métodos de síntese naqueles que produzem nanopartículas magnéticas a partir de técnicas de solução ou de aerossóis / fases de vapor, e produzem-se compostos de nanopartículas magnéticas dispersas em matrizes orgânicas ou inorgânicas, que geralmente têm uma forma esférica <sup>21</sup>.

A coprecipitação é um método simples para sintetizar nanopartículas de óxido de ferro. As nanopartículas são preparadas pela reação de sais de Fe (II) e Fe (III) em meio aquoso alcalino em numa razão molar de 1: 2. As nanopartículas de óxido de ferro produzidas por este método são comumente usadas para aplicações biomédicas por razões tais como produção fácil e em larga escala, e dispersão direta em água sem tratamento adicional <sup>22</sup>.

## 2.3. Aplicações das nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas estão na vanguarda da investigação muito graças à sua diversidade em termos de aplicações (Figura 2.4). Entre as aplicações das nanopartículas magnéticas destacam-se as aplicações biomédicas; como exemplo salientam-se os agentes de

contraste de ressonância magnética, os agentes terapêuticos no tratamento de cancro por quimioterapia e hipertermia.

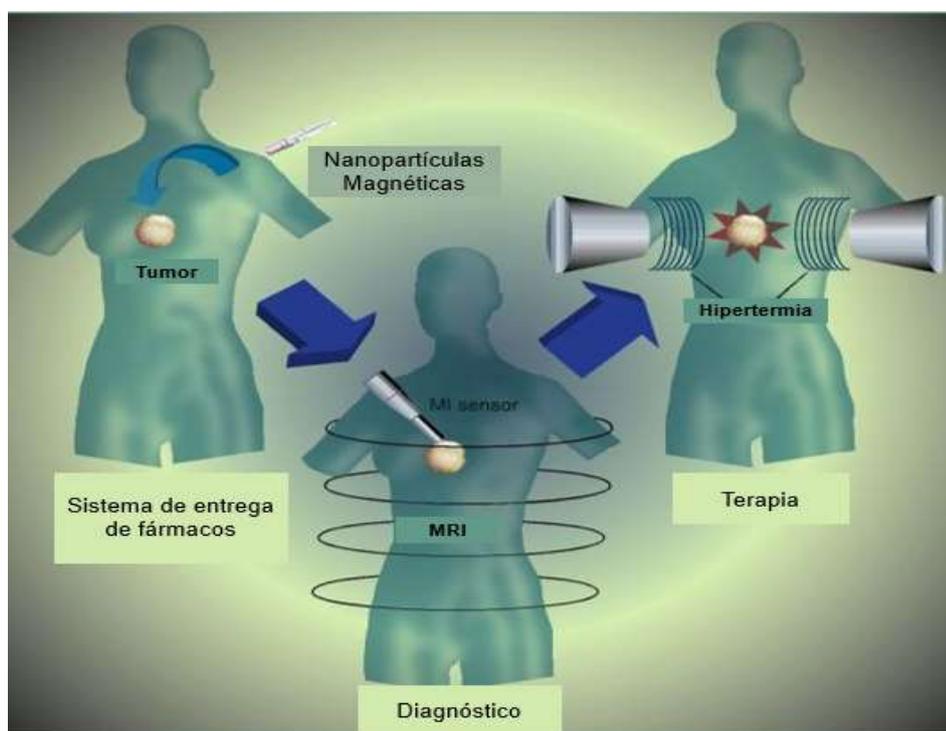


Figura. 2.4 -Esquema do uso de nanopartículas magnéticas como estratégia terapêutica em simultâneo.

Cada aplicação exige um tipo de nanopartículas específico, que apresentem características bem como propriedades diferentes consoante o tipo de aplicação. Para aplicações de entrega de fármacos de forma controlada, as nanopartículas devem ser funcionalizadas de forma a garantir especificidade ao local alvo de interesse onde o fármaco deverá ser libertado <sup>23</sup>.

Como já referido, na área biomédica, são de interesse nanopartículas que apresentem um comportamento superparamagnético à temperatura ambiente. Por outro lado, quando a aplicação pretendida é a terapia e diagnóstico médico, requerem-se nanopartículas magnéticas estáveis em água a um pH de 7 e num ambiente fisiológico.

### 2.3.1. Imagiologia por ressonância magnética

A imagiologia por ressonância magnética (MRI) constitui uma técnica de diagnóstico que permite a observação de tecidos através das imagens que esta técnica nos fornece. As imagens obtidas são de elevada resolução, o que permite um diagnóstico de qualidade; para além disso, é uma técnica segura e com uma aquisição rápida das imagens *in vivo*.

Os agentes de contraste utilizados para a realização desta técnica podem ser positivos no caso de clarear a imagem ou, por outro lado, negativos quando ocorre um escurecimento <sup>24</sup>.

O funcionamento desta técnica baseia-se na obtenção de um conjunto de imagens com vários tipos de contraste e diferentes orientações de corte, o que permite a obtenção de uma informação mais completa, tanto do local em análise bem como do tipo de lesões.

Este tipo de exames deve ser adequado a cada paciente, ao local (órgão) em estudo e ao tipo de doença que está a ser analisada. Após esta análise são escolhidos os parâmetros mais adequados para realizar cada exame <sup>25</sup>.

Nesta técnica, é importante salientar que existem três parâmetros sensíveis à temperatura, o tempo de relaxamento (T1), a mudança química e a constante de difusão.

É possível demonstrar-se, através de ensaios *in vivo* e *in vitro*, a existência de uma correlação linear entre o tempo de relaxamento T1 e a temperatura. No entanto, a inclinação utilizada para a obtenção das imagens varia entre os diferentes tecidos o que leva a uma determinação quantitativa da temperatura no tecido a ser analisado, baseada na medição do tempo de relaxação T1.

### 2.3.2. Hipertermia

A hipertermia é uma técnica de tratamento do cancro onde ocorre o aumento da temperatura de uma determinada região do corpo afetado por uma neoplasia, com o objetivo de causar a destruição das células cancerígenas. Este tratamento, para além de danificar este grupo de células, ativa também o sistema imunitário, o que permite um vazamento mais completo das nanopartículas magnéticas administradas.

O mecanismo de ação desta técnica tem como base o aumento da temperatura, e o facto de temperaturas entre os 41°C e os 44°C conseguirem destruir diretamente células tumorais, que possuem uma menor resistência a subidas repentinas de temperatura, quando comparadas as células saudáveis. Este aumento de temperatura local pode ser conseguido através da utilização de nanopartículas magnéticas, que são mais eficientes a responder a campos magnéticos externos

<sup>26</sup>.

A hipertermia está entre as cinco técnicas utilizadas na terapia do cancro, sendo as restantes a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia e a imunoterapia, sendo que o tratamento atual do cancro é uma combinação das várias técnicas, pois nenhuma tem a capacidade de destruir o tecido tumoral <sup>27</sup>.

A hipertermia faz parte da lista dos tratamentos convencionais aceites pela *American Cancer Society* e tem sido uma das terapêuticas mais poderosas, na medida em que melhora a evolução dos pacientes com cancro, devido também ao facto de melhorar a eficácia de outras terapias, como a quimioterapia e a radioterapia <sup>28</sup>.

## 2.4. Nanopartículas de ouro

O ouro já foi reportado na literatura como um “auxiliar” de saúde <sup>29</sup>. A cultura chinesa e indiana relatou o uso de compostos de ouro na forma de “*Swarna Bhasma*” para o tratamento de vários problemas de saúde, como aumentar o poder vital e curar a impotência masculina [30, 31]. As propriedades únicas do ouro, como a natureza inerte, não-tóxica em relação à célula e biocompatibilidade, tornam-no útil e um material atrativo para investigadores, visando aplicações biológicas e biomédicas.

As nanopartículas de ouro (AuNPs) têm a capacidade de absorver e difundir luz visível e no infravermelho próximo (NIR), após a excitação da oscilação plasmónica da superfície. As características plasmónicas das NPs de ouro têm sido utilizadas em biossensores, através da exploração das propriedades de difusão de luz dependentes da distância das nanopartículas de ouro. A banda de ressonância plasmónica do ouro pode ser modificada espectralmente numa ampla faixa. O resultado é que o sinal de difusão de luz é mais intenso, e comparativamente muito mais brilhante, do que o dos fluoróforos químicos. Esta propriedade pode ser útil em técnicas de imagiologia, isto é, podem conseguir-se imagens de uma molécula única.

Recentemente, houve uma explosão na investigação baseada em nanopartículas de ouro, com um rápido aumento nas publicações nas mais diversas áreas, incluindo imagiologia, bioengenharia e biologia molecular. Provavelmente, tal estará relacionado a um aumento similar no amplo campo da nanotecnologia, a uma maior consciencialização governamental e financiamento, e rápido progresso na síntese química e biologia molecular <sup>32</sup>.

### 2.4.1. Propriedades das nanopartículas de ouro (AuNPs)

As nanopartículas inorgânicas oferecem aos investigadores uma abordagem flexível para a sua utilização de acordo com as atividades e necessidades específicas dos mesmos. O ajuste de propriedades devido à forma e tamanho das nanopartículas inorgânicas torna-as diferentes das outras. As nanopartículas de ouro, graças à sua cor brilhante e propriedades únicas, são muito apropriadas para aplicações biomédicas. Possuem uma forte ressonância plasmónica de

superfície (SPR), que depende do tamanho das partículas, da forma e da rigidez dielétrica do metal e do meio circundante <sup>33</sup>.

Os elétrons livres no metal percorrerão uma distância média (livre percurso médio) de 50 nm; portanto, numa partícula menor que 50 nm, a interação ocorrerá na superfície, o que ajudará na difusão da luz. Assim, quando o comprimento de onda da luz é maior que o tamanho da partícula, ele alterna a carga e resulta em ressonância (Figura 2.5) <sup>33</sup>.

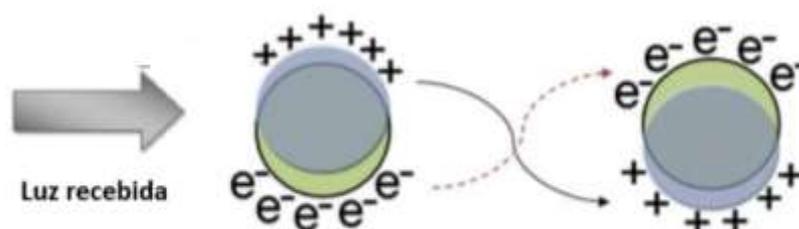


Figura 2.5 - Origem da ressonância plasmônica de superfície (SPR) devido à interação dos elétrons. .Adaptado de <sup>34</sup>

A luz, em ressonância com o plasmão de superfície, leva os elétrons das nanopartículas de ouro a oscilarem. Este fenômeno é chamado de ressonância plasmônica de superfície, uma vez que ocorre apenas na superfície das partículas. *Jain* e colaboradores relataram que a proporção entre difusão de luz e absorção era dependente do diâmetro das partículas. Verificou-se que o vermelho escuro das nanopartículas de ouro de 20 nm tem uma forte banda de absorção visível a 520 nm, que sofrerá uma mudança na posição da banda espectral para um maior comprimento de onda (desvio batocrômico) com o aumento do tamanho de partícula <sup>34</sup>.

#### 2.4.2. Terapias fototérmicas

A terapia fototérmica é uma técnica que se baseia na conversão da energia da luz em calor, seja através da transferência de energia de ressonância plasmônica ou de uma transferência de energia vibracional de átomos em nanopartículas para átomos no meio ou tecido circundante. Embora o tecido irradiado com luz laser sem a presença de nanopartículas cause aquecimento do mesmo, a capacidade de transferir calor de forma eficiente numa área localizada é exclusiva da terapia fototérmica de nanopartículas. A especificidade do aquecimento das nanopartículas é limitada à área que rodeia diretamente a partícula, limitando assim os danos ao tecido saudável envolvente.<sup>35</sup>

As nanopartículas para uso na terapia fototérmica variam amplamente. As partículas mais comuns são as de ouro, incluído nanobastões de ouro, nanoesferas de ouro e núcleo de sílica, partículas de coroa de ouro, entre outras. Também é utilizada uma grande variedade de outros

metais, incluindo partículas de prata, partículas com óxido de ferro e partículas com cobre. Sistemas de polímeros foram também explorados recentemente como partículas potencialmente biodegradáveis para terapia fototérmica. Estes sistemas apresentam vantagens pois são de custos menos elevados e não apresentam a retenção tecidual associada às nanopartículas metálicas. A tabela 2.1 mostra os parâmetros do laser para três tipos principais de partículas de ouro que são altamente variáveis <sup>36</sup>.

As nanopartículas podem sofrer modificações na sua superfície com a adição de PEG ou de moléculas para terapia alvo de forma a aumentar a biocompatibilidade e o tempo de circulação e também tratar seletivamente os tumores.

Para mover efetivamente a terapia fototérmica baseada em nanopartículas do laboratório para a clínica, muitas dessas variáveis devem ser controladas e os padrões da indústria estabelecidos <sup>37</sup>.

Tabela 2.1 - Variação de parâmetros para terapia fototérmica em três tipos nanopartículas de ouro

<b>Variação de parâmetros para terapia fototérmica com nanopartículas de ouro</b>					
<b>Tipo de partícula</b>	<b>Comprimento de onda do laser (nm)</b>	<b>Concentração de nanopartículas</b>	<b>Duração do laser</b>	<b>Irradiância do laser (W/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Ref</b>
<b>Nanobastões de ouro</b>	671	400 g/mL	10 minutos	Não reportado	<sup>38</sup>
	780	Não reportado	178.5 segundos	26.4, 41.5	<sup>29</sup>
	800	Não reportado	0.19–5.70 milisegundos	41.7, 27.8, 19.4, 13.9, 5.6	<sup>39</sup>
	808	35 mg/kg	5 minutos	0.6, 2	<sup>40</sup>
<b>Nanopartículas de núcleo de sílica e coroa de ouro</b>	800	1.7×10 <sup>11</sup> partículas/mL	3 minutos	4	<sup>41</sup>
	808	Variável	5 minutos	2	<sup>42</sup>
	820	2.4×10 <sup>11</sup> nanocoroas/mL	3 minutos	4	<sup>43</sup>
<b>Nanoesferas de ouro</b>	514	0.2 nM	4 minutos	76, 57, 25, 19	<sup>44</sup>
	530	0.13 nM	5 minutos	4, 7, 14	<sup>45</sup>
	660	60 nM	10 minutos	5, 6.5, 8, 10	<sup>46</sup>
	800	4 nM	2 minutos	0.14, 0.28, 0.56, 1.41, 2.82, 5.65, 8.95, 17.8	<sup>47</sup>

## 2.5 Nanopartículas híbridas

A nanotecnologia é conhecida por ser um campo transversal com uma grande variedade de aplicações; no entanto pode afirmar-se que, em nenhum campo da medicina, os objetivos da nanotecnologia são mais seguidos do que no campo da oncologia.

Terapias tradicionais, como a quimioterapia e a radioterapia, tiveram um sucesso limitado no combate desta doença, o que abre caminho para novos desenvolvimentos para um diagnóstico precoce, bem como para novas metodologias de tratamento.

A administração de fármacos com recurso a nanopartículas representa uma tecnologia disruptiva que aumenta a eficácia terapêutica e apresenta capacidade na redução dos efeitos secundários, melhorando a farmacocinética e a deposição tumoral das cargas úteis através do efeito de permeabilidade e retenção (EPR)<sup>48</sup>. O efeito de permeabilidade e retenção é um conceito controverso<sup>49</sup> pela qual as moléculas de determinados tamanhos (tipicamente, lipossomas, nanopartículas, e drogas macromoleculares) tendem a acumular-se no tecido tumoral muito mais do que em tecidos normais<sup>50</sup>.

As propriedades óticas ou magnéticas de algumas dessas partículas abrem caminho para obtenção de imagens dos tumores ainda em estágios iniciais.

Visto que existe uma grande variedade de nanopartículas com diferentes propriedades é possível a conjugação de diferentes tipos, num único nanossistema, o que resultará num tratamento mais eficaz.

As terapias combinadas fornecem uma solução potencial para abordar a heterogeneidade tumoral e questões de resistência a fármacos, aproveitando mecanismos distintos de ação das múltiplas terapias para atingir múltiplos alvos<sup>51</sup>. Após uma série de contratempos com monoterapias, vários ensaios clínicos atualmente propostos baseiam-se na combinação de vários tratamentos [52, 53]. Para otimizar os efeitos terapêuticos sinérgicos das várias terapias, as combinações dos tratamentos precisam de ser projetadas de forma racional. Atualmente já existem vários nanossistemas direcionados para oncologia que incorporam múltiplos nanocomponentes e nanoestruturas num único nanossistema<sup>54</sup>.

Enquanto as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas melhoram o contraste das imagens de ressonância magnética, a fluorescência de pontos quânticos pode ser vista a olho nu. Um nanossistema de direcionamento para um tumor possuindo ambos os tipos de nanopartículas oferece a possibilidade de identificar primeiro um tecido maligno de forma não invasiva por ressonância magnética, bem como a visualização das margens do tumor numa

resolução mais alta pela imagem fluorescente dos pontos quânticos. Os sistemas óticos fluorescentes podem fornecer informações subcelulares detalhadas, que podem auxiliar no diagnóstico [55,56]. Esses sistemas seguem o conceito de dispositivo “teranóstico”, no qual tanto as funções de diagnóstico como de tratamento são administradas numa dose única.

Uma das vantagens de um dispositivo “teranóstico” é que a biodistribuição dos materiais pode ser monitorizada *in vivo*, reduzindo o potencial de efeitos secundários não intencionais da toxicidade do fármaco, ou um dano induzido por hipertermia em tecidos saudáveis. Além da utilidade de rastrear o destino deste tipo de terapias *in vivo* imediatamente após a administração, o uso de tais nanopartículas híbridas permite que a equipa médica guie o progresso e a eficácia de uma terapia durante o tratamento.

#### 2.5.1. Nanopartículas híbridas baseadas em ouro

As nanopartículas de ouro exibem propriedades óticas únicas, originárias dos plasmões - oscilações coletivas de eletrões altamente móveis residentes no metal em frequências óticas. Uma das propriedades mais importantes dos sistemas plasmónicos é a sua grande secção transversal de absorção relativa à molécula ou absorvedores baseados em semicondutores. Isso permite o acoplamento eficiente de campos óticos externos em efeitos fotoemissivos, térmicos ou químicos.

Nanossistemas plasmónicos baseados em ouro têm sido muito utilizados para o diagnóstico e terapia no cancro <sup>57</sup>. Além disso, as nanopartículas baseadas em ouro como *nanorods*, *nanocages* e *nanoshells* têm sido de grande interesse para a terapia fototérmica, devido à sua forte absorção linear, na região infravermelho próximo (do inglês *Near Infrared* - NIR) onde a penetração do tecido pode ser maximizada. [39, 40, 59].

As nanopartículas utilizadas ao longo deste estudo foram as nanopartículas de óxido de ferro e de níquel. Este tipo de nanopartículas, tem sido o foco de uma vasta investigação na última década [60, 61].

As nanopartículas baseadas em óxidos apresentam propriedades magnéticas inerentes que são desejáveis para uma ampla gama de aplicações biomédicas, desde administração direcionada de fármacos <sup>62</sup>, engenharia de tecidos <sup>63</sup> e, mais comumente, como agentes de contraste de ressonância magnética [MRI]. Na década de 90 vários agentes de contraste foram aprovados clinicamente como o *Feridex* <sup>64</sup> e o *Resovist* <sup>65</sup>. No entanto, devido à toxicidade a longo prazo dessas partículas *in vivo* estas foram retiradas do uso em seres humanos.

A degradação do óxido de ferro em íons de ferro em ambientes fisiológicos <sup>66</sup> tem sido relatada como causa do aumento da produção de radicais livres nas células, dando origem a danos que podem levar à morte celular [67,68].

De forma a contrariar esta toxicidade, esta família de nanopartículas pode ser coberta com macromoléculas orgânicas como poli(ácido acrílico) – PAA, polietilenoimina – PEI, polietilenoglicol - PEG ou revestimentos inorgânicos como sílica, carbono ou metais nobres (por exemplo, ouro ou prata)<sup>69</sup>. O ouro é quimicamente estável e biocompatível <sup>70</sup>. As nanopartículas de ouro têm sido amplamente reconhecidas, uma vez que apresentam propriedades óticas únicas <sup>71</sup>. Quando nanopartículas de ouro, com um tamanho entre 10 e 100 nm, são expostas à radiação ótica, os elétrons dentro das nanopartículas de ouro entram em ressonância, fazendo com que absorvam e dispersem a luz <sup>72</sup>. Este fenómeno é conhecido como ressonância plasmónica de superfície, onde o comprimento de onda de ressonância ideal é determinado por vários fatores das nanopartículas, como tamanho, forma, área de superfície e revestimento de superfície <sup>72</sup>. Quando as nanopartículas são irradiadas, a absorção das nanopartículas de ouro pela ressonância plasmónica de superfície é seguida pela rápida conversão de luz em calor <sup>71</sup>.

Na biomedicina, esta propriedade única pode ser explorada para aplicações como a extração fototérmica e a entrega de medicamentos com sensibilidade térmica. Clinicamente, os comprimentos de onda ótimos para irradiação das nanopartículas de ouro estão dentro da região do infravermelho (750-1400 nm) <sup>73</sup>. A radiação a laser dentro da gama é capaz de penetrar profundamente nos tecidos; devido à alta transmissão de água e hemoglobina dentro desses comprimentos de onda isso pode ser explorado para terapia não invasiva ou minimamente invasiva.

Quando o ouro é usado para revestir as nanopartículas baseadas em óxidos, o revestimento externo de ouro atua como uma barreira que evita a oxidação do núcleo e a degradação enzimática <sup>74</sup>. A hibridização destas nanopartículas com ouro resulta numa plataforma multifuncional que apresenta os benefícios das propriedades únicas de ambos os materiais <sup>75</sup> ; <sup>76</sup>. A estrutura exterior em ouro também fornece um local para uma possível funcionalização.

Durante o desenvolvimento de um nanossistema com aplicações biológicas, é necessário ter em consideração vários fatores, sendo, provavelmente a biocompatibilidade do sistema produzido um dos fatores mais importantes para uma posterior aplicação *in vivo*. O termo biocompatibilidade tem muitos significados. Em alguns casos, a mera demonstração de solubilidade em água é citada como evidência de biocompatibilidade. Neste contexto, o termo

biocompatível significa que a nanopartícula deve exibir uma toxicidade limitada ao organismo na sua dose efetiva, deve ser capaz de desempenhar a sua função sem a interferência dos mecanismos saudáveis do organismo, e deve ser capaz de circular por um tempo suficientemente longo para realizar a tarefa pretendida. A forma, o tamanho e a carga são fatores que determinam por quanto tempo uma dada partícula circulará, antes de ser eliminada pelo fígado, pelos rins ou pelo baço. Um requisito fundamental neste tipo de terapia, quando administrada por via intravenosa é que elas têm a capacidade de circular na corrente sanguínea por mais de duas horas; se for filtrado pelo fígado ou pelos rins, não pode chegar ao tumor <sup>77</sup>.

## 2.6. Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas compostas por partículas desde 30 nm a vários micrómetros, são biologicamente inertes e pouco imunogênicos. Podem ser formadas a partir de fosfolípidos naturais não tóxicos e colesterol. Estas estruturas (Figura 2.6) são compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas em torno de unidades aquosas, onde os grupos de cabeças polares são orientados para as fases aquosas interna e externa <sup>78</sup>.

Devido ao tamanho e ao caráter dual das moléculas que estes sistemas podem carregar, os lipossomas são atualmente sistemas promissores no transporte de fármacos. A composição lipídica, a carga superficial, o tamanho e o método de preparação dos lipossomas influenciam as suas propriedades. Por outro lado, a escolha dos constituintes da bicamada determinará a rigidez ou fluidez e carga da bicamada <sup>79</sup>.

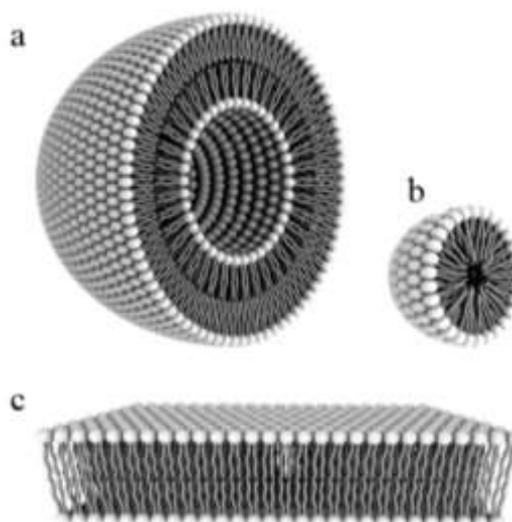


Figura 2.6 – a - Representação de um lipossoma; b – estrutura de uma micela e c – estrutura de um bicamada lipídica. Adaptado de <sup>80</sup>.

Características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, aptidão para aprisionar fármacos hidrofílicos e lipofílicos <sup>81</sup> a libertação de fármacos em locais específicos <sup>82</sup>, fizeram dos lipossomas um sistema promissor o que fez aumentar a sua investigação como um sistema de entrega de fármacos (*Drug delivery*). Muitos estudos foram conduzidos em lipossomas com o objetivo de diminuir a toxicidade do fármaco e / ou direcionar fármacos para células específicas <sup>1</sup>. Os lipossomas têm sido descritos como sistemas ideais de libertação de fármacos que podem superar muitos dos problemas associados a outros nanossistemas, como os que envolvem solubilidade, farmacocinética, estabilidade in vivo e toxicidade.

Para a transmissão de fármacos que atuam como promotores curativos, os investigadores médicos utilizam a técnica do encapsulamento lipossómico (LET - *Liposomal encapsulation technique*). Os lipossomas formam uma barreira em torno de seu conteúdo, que é resistente a enzimas na boca e no estômago, soluções alcalinas, sucos digestivos, sais biliares e flora intestinal que são gerados no corpo humano, bem como os radicais livres. O conteúdo dos lipossomas é, portanto, protegido da oxidação e degradação. Este escudo ou barreira fosfolipídica protetora permanece intacto até que o conteúdo do lipossoma seja entregue à glândula, órgão ou sistema alvo exato onde o conteúdo será utilizado <sup>83</sup>.

### 2.6.1. Auto-Organização

A formação dos lipossomas ocorre através do fenómeno de auto-organização que os fosfolípidos realizam quando se encontram em soluções aquosas. Este processo de organização ocorre uma vez que em meios aquosos os fosfolípidos são obrigados a organizarem-se devido às interações hidrofílicas / hidrofóbicas, interações eletrostáticas e interações de *van der Waals*.

Ao adicionar as moléculas de fosfolípido à solução aquosa o sistema encontra-se desordenado. Posteriormente o sistema reorganiza-se formando estruturas organizadas de forma a evitar o contato entre as partes não polares e as moléculas de água, energeticamente desfavoráveis, enquanto mantém as moléculas de água em contato com a parte polar dos fosfolípidos <sup>84</sup>.

## 2.7. Magnetolipossomas

Os magnetolipossomas (MLs) resultam da encapsulação de nanopartículas magnéticas em lipossomas e foram descritos pela primeira vez por *De Cuyper e Joniau* em 1988<sup>85</sup>.

Os magnetolipossomas têm sido propostos como sistemas promissores na entrega de fármacos, combinando as propriedades físicas surpreendentes deste tipo de partículas, e preservando também as propriedades magnéticas das nanopartículas<sup>20</sup>.

Como já foi referido, os lipossomas são, até à data, os sistemas de encapsulação mais utilizados para administração de fármacos e as nanopartículas magnéticas são adequadas para aplicações terapêuticas, tirando partido das orientações magnéticas e das propriedades de aquecimento indutivo. No entanto, cada sistema tem as suas próprias limitações. Os lipossomas apresentam algumas limitações *in vivo*, nomeadamente o seu reconhecimento e captura pelo sistema imunitário e a localização em locais terapêuticos para a libertação de fármacos. Por outro lado, as nanopartículas magnéticas têm tendência a aglomerar e formar sedimentos<sup>86</sup>. De forma a combater estes entraves e tirar partido das vantagens de ambos os sistemas, têm sido cada vez mais estudados, lipossomas com nanopartículas magnéticas na sua composição<sup>87</sup>.

A combinação de lipossomas e nanopartículas magnéticas permite a concentração do nanossistema na área de tratamento do paciente por campos magnéticos, muitas vezes aumentadas por aglomeração magnética, e evita a acumulação das nanopartículas *in vivo*, garantindo a biocompatibilidade. Portanto, é notória um conjunto de limitações singulares de lipossomas e nanopartículas magnéticas, e os magnetolipossomas resultantes unem as propriedades ótimas de ambos num único nanossistema. Trata-se de um sistema versátil, uma vez que pode ser aplicado tanto a nível terapêutico como a nível de diagnóstico

Os MLs podem ser divididos em Magnetolipossomas Aquosos (AMLs), nos quais as nanopartículas magnéticas são encapsuladas na fase aquosa interna e em Magnetolipossomas Sólidos (SMLs), (Figura 2.7), em que não há núcleo aquoso e existe um aglomerado de nanopartículas magnéticas rodeadas por uma camada lipídica<sup>88</sup>.

Estes sistemas têm uma ampla variedade de aplicações biomédicas tais como diagnóstico, libertação de fármacos e ressonância magnética. Considerando a terapia, as aplicações mais promissoras dos magnetolipossomas são a administração de fármacos guiada magneticamente e a hipertermia<sup>89</sup>.



Figura 2.7 - Representação esquemática dos magnetolipossomas aquosos (AMLs) e dos magnetolipossomas sólidos (SMLs).

## 2.8. Compostos derivados de tienopiridinas

Todos os dias surgem novos potenciais fármacos promissores para o tratamento de diferentes doenças. Essas moléculas biologicamente ativas promovem novos tratamentos e, conseqüentemente, avanços na área da saúde. Os compostos utilizados no decorrer deste projeto são novos compostos potencialmente antitumorais, sintetizados no Centro de Química da Universidade do Minho (CQUM), tendo a vantagem de serem fluorescentes. Estes apresentam atividade antitumoral promissora em várias linhas celulares tumorais humanas, com baixos valores de concentração inibitória do crescimento de 50% de células ( $GI_{50}$ ), especialmente para o adenocarcinoma colorretal (linha celular HCT-15) e o cancro do pulmão de células não pequenas (NCI-H460) (tabela seguinte). Na figura 2.8 estão representadas as estruturas dos compostos utilizados neste estudo.

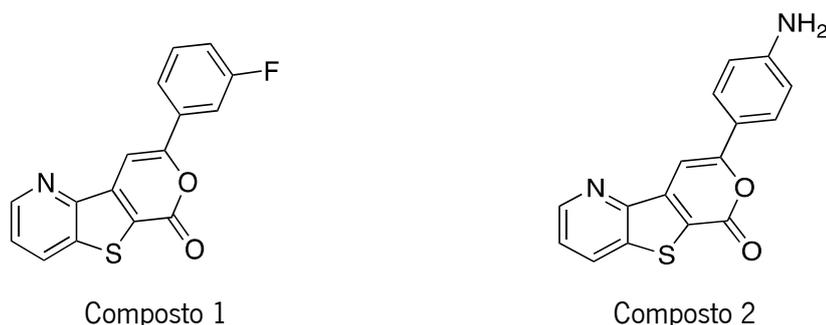
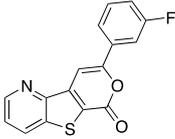
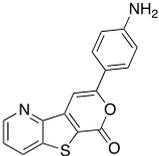


Figura 2.8. - Estrutura dos compostos derivados de tienopiridinas utilizados neste estudo.

Compostos derivados de tienopiridinas são de grande interesse na química orgânica, devido à sua ampla gama de atividades biológicas. Segundo estudos anteriores o esqueleto base de tienopiridina apresenta atividades biológicas promissoras, nomeadamente antitumorais e/ou

antiangiogénicas <sup>90</sup>. Esta atividade dual permite o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do cancro <sup>91</sup>.

Tabela 2.2 - Resultados referentes aos valores de GI<sub>50</sub> dos compostos estudados

	GI <sub>50</sub> (μM)	
	HCT-15	NCI-H460
	7,4 ± 1,1	<b>7,3 ± 0,1</b>
	<b>12,6 ± 2,9</b>	<b>11,4 ± 0,9</b>

Os compostos baseados em tienopiridinas foram inicialmente testados de forma a concluir quanto à sua atividade antitumoral. As concentrações de GI<sub>50</sub> representadas na Tabela 2.2 correspondem à média ± desvio padrão de, pelo menos, três experiências independentes (exceto quando os compostos precipitavam abaixo da concentração de GI<sub>50</sub>, caso em que apenas uma experiência foi realizada). A doxorubicina foi utilizada como controlo positivo (com valores de GI<sub>50</sub> de 353,3 ± 24,2 nM em células HCT-15 e 25 ± 0,8 nM em células NCI-H460).



## CAPÍTULO III: Técnicas de análise e caracterização

Ao longo do desenvolvimento deste projeto foram utilizadas várias técnicas experimentais. Neste capítulo será exposto o funcionamento de cada técnica utilizada.

### 3.1. Espectroscopia de absorção UV-Visível <sup>92</sup>

#### 3.1.1. Natureza da radiação eletromagnética

A radiação eletromagnética resulta da oscilação de um campo elétrico e de um campo magnético que se propagam pelo espaço com natureza ondulatória. Como este tipo de radiação se comporta como uma onda, a esta está associado um comprimento de onda ( $\lambda$ ) e uma frequência ( $\nu$ ) que se relacionam de acordo com a equação 1:

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad \text{equação 1}$$

onde  $\nu$  é a frequência em Hertz,  $c$  é a velocidade da luz no vácuo ( $3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$ ) e  $\lambda$  é o comprimento de onda (m), embora em espectroscopia UV-visível, o comprimento de onda é geralmente expresso em nanómetros ( $10^9 \text{ m}$ ).

Toda a radiação eletromagnética tem uma energia associada definida pela equação 2:

$$E = h\nu \quad \text{equação 2}$$

onde  $E$  é a energia,  $h$  é a constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-34} \text{ Js}$ ) e  $\nu$  é a frequência. Assim, de acordo com as equações apresentadas, a energia e o comprimento de onda variam de forma inversa, sendo que radiação com maior comprimento de onda é menos energética do que radiação com maior comprimento de onda.

#### 3.1.2. Lei de Lambert-Beer

Quando se faz incidir um feixe de luz monocromática numa solução que contém uma espécie absorvente a esse comprimento de onda, vai ocorrer a absorção de uma parte da luz e a transmissão da outra parte. A luz que é transmitida pode ser calculada através da relação entre a intensidade de incidência ( $I_0$ ) e a intensidade transmitida ( $I$ ). Este valor, chamado de transmitância ( $T$ ), permite depois determinar o valor da absorvância segundo as equações 3 e 4.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{equação 3}$$

$$T = 10^{-\epsilon bc}$$

$$A = -\log_{10} T \quad \text{equação 4}$$

A Lei de *Lambert-Beer*, relaciona o grau de absorvância da amostra com a concentração (equação 5).

$$A = \epsilon bc \quad \text{equação 5}$$

em que  $A$  representa a absorvância,  $\epsilon$  o coeficiente de absorção molar ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $b$  é a largura da célula (cm) onde se encontra a amostra e  $c$  corresponde à concentração da amostra (M). (Figura 3.1.).

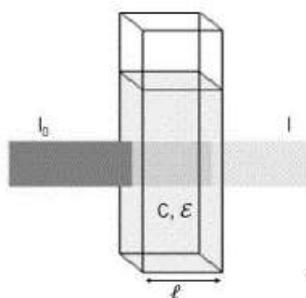


Figura 3.1- Feixe de radiação eletromagnética a atravessar uma solução.

## 3.2. Espectroscopia de Fluorescência <sup>93</sup>

### 3.2.1. Fenómeno de Fluorescência

As moléculas encontram-se por norma no estado fundamental (estado de menor energia  $-S_0$ ). Quando ocorre a absorção de um fóton a um dado comprimento de onda, a molécula passa para um estado de energia superior (estado excitado). Uma molécula no estado excitado pode ocupar um estado singleto ( $S_n$ ) ou tripleto ( $T_n$ ), sendo que a diferença entre estes está nos números quânticos de spin dos elétrons na molécula. De acordo com o princípio de exclusão de Pauli, dois elétrons numa mesma orbital não podem ter os quatro números quânticos iguais e, por isso, estes diferem no número quântico de spin. Assim, numa mesma orbital, um elétron possui número quântico de spin  $-1/2$  e o outro  $+1/2$ , ou seja, spins opostos. Quando um elétron passa para uma

orbital de maior energia, este pode assumir um número quântico de spin positivo ou negativo. Para quantificar o spin dos elétrons em cada estado eletrônico, é usado um parâmetro designado por multiplicidade ( $M$ ), definido por  $M = |2S + 1|$ , sendo  $S$  a soma dos números quânticos de spin. Quando os elétrons estão emparelhados, o número quântico de spin total é 0,  $S=0$ , e a multiplicidade é 1,  $M=1$ . Neste caso, a molécula encontra-se num estado singlete. Quando os elétrons estão desemparelhados, o número quântico de spin total é 1 ou -1,  $S=1$  ou  $S=-1$ , e a multiplicidade é 3,  $M=3$ . Neste caso, a molécula encontra-se num estado tripleto. A figura 3.2. representa a configuração dos spins dos elétrons nos estados singlete e tripleto.

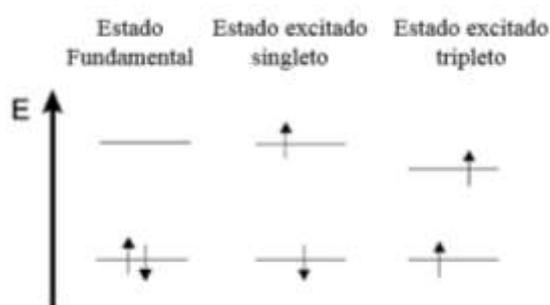


Figura 3.2 - Configuração dos spins dos elétrons em estados singlete ( $M=1$ ) e tripleto ( $M=3$ ).

Após a absorção do fóton de luz, os elétrons na molécula passam do seu nível eletrônico de menor energia ( $S_0$ ) para um nível eletrônico de maior energia ( $S_n$ ,  $n>1$ ).

A partir deste estado excitado de maior energia, a molécula regressa ao seu estado fundamental de menor energia ( $S_0$ ) por vários processos radiativos e não radiativos: Inicialmente a molécula num estado excitado  $S_n$  passa ao estado excitado de menor energia  $S_1$  dissipando a energia para o ambiente envolvente, processo geralmente designado por conversão interna. A partir do estado  $S_1$ , a molécula passa para o seu estado fundamental  $S_0$  por um dos seguintes processos:

- Emissão de um fóton (fluorescência).
- Dissipação da energia para o meio em forma de calor.
- Dissipação da energia para moléculas vizinhas, por um processo designado de *quenching*.
- Cruzamento intersistemas (passagem do estado  $S_1$  para um estado tripleto  $T_1$ )
- Fosforescência.

Os processos descritos acima são geralmente esquematizados pelo diagrama de Jablonski (Figura 3.3).

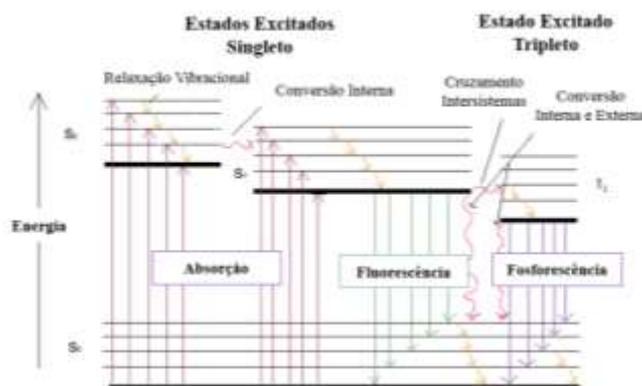


Figura 3.3 - Diagrama de *Jablonski* representando as transições de estados eletrônicos.

No diagrama de *Jablonski*, as linhas horizontais representam os níveis eletrônicos ( $S_n$ ) e vibracionais, sendo que para cada nível eletrônico existem vários níveis vibracionais ( $V_n$ ). As setas verticais representam os processos radiativos de absorção, fluorescência (emissão de um fóton a partir do nível eletrônico  $S_1$ ) e fosforescência (emissão de um fóton a partir do nível eletrônico  $T_1$ ). As setas onduladas representam os processos de transferência de energia não radiativos, onde IC diz respeito aos processos de conversão interna e ICS diz respeito aos processos de cruzamento intersistemas. Os processos de conversão interna ocorrem entre estados eletrônicos com igual multiplicidade, onde a energia é dissipada para o meio sob a forma de calor ou para moléculas vizinhas (*quenching*). Os cruzamentos intersistemas ocorrem entre estados vibracionais de estados eletrônicos com diferente multiplicidade, por exemplo,  $S_1 = T_1$ . Para além disso existem ainda os processos de relaxamento vibracional que ocorrem na passagem de um nível vibracional de maior energia ( $V_n$ ) para o nível vibracional de menor energia ( $V_0$ ), dentro do mesmo estado eletrônico.

### 3.2.2. Tempos de vida do estado excitado

As moléculas depois de serem excitadas mantêm-se num estado excitado durante um pequeno intervalo de tempo, antes de voltarem ao seu estado fundamental. Esse tempo corresponde ao tempo de vida do estado excitado e trata-se de um parâmetro cinético. Esse intervalo de tempo pode variar entre grandezas de nanossegundos ( $10^{-9}$  s) ou picossegundos ( $10^{-12}$  s), tempos relativamente longos quando comparados com outros eventos moleculares. O tempo de vida do estado excitado ( $\tau_f$ ) pode ser definido pela equação 6:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad \text{equação 6}$$

Durante o tempo que uma molécula se encontra excitada, esta pode sofrer várias transformações, desde redistribuição eletrônica ou alteração na sua geometria, esta alteração promove a reorganização das moléculas em causa.

### 3.2.3. Anisotropia de Fluorescência

As medidas de anisotropia de fluorescência proporcionam informações sobre o tamanho, forma de proteínas e rigidez de diferentes ambientes moleculares. As medições de anisotropia têm sido usadas para medir associações proteína-proteína, fluidez de membranas, e para imunoenaios de numerosas substâncias<sup>93</sup>. As medidas de anisotropia de fluorescência são baseadas no princípio de excitação fotosselativa de fluoróforos por luz polarizada.

Os fluoróforos absorvem preferencialmente fótons cujos vetores elétricos estão alinhados paralelamente ao momento da transição do fluoróforo. Numa solução isotrópica, os fluoróforos são orientados aleatoriamente. Após a excitação com luz polarizada, são excitadas seletivamente as moléculas de fluoróforo cuja absorção é paralela ao vetor elétrico da excitação (Figura 3.4.)<sup>93</sup>

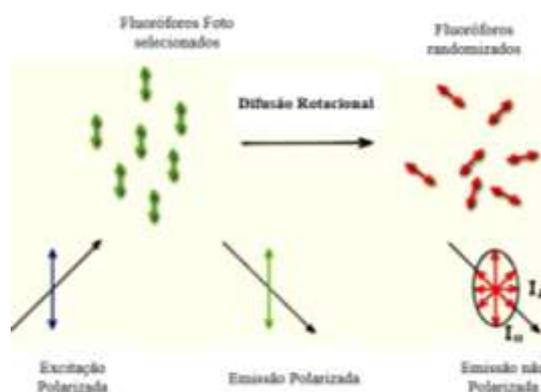


Figura 3.4- Efeitos de excitação polarizada e difusão de rotação sobre a polarização e anisotropia de emissão.

A emissão pode tornar-se despolarizada através de vários processos, dependendo da amostra em estudo, (Figura 3.4) Todos os cromóforos têm momentos de transição que ocorrem ao longo de uma direção específica no eixo molecular. A difusão de rotação muda a direção dos momentos de transição e é uma causa comum de despolarização.

As medições de anisotropia revelam a média do deslocamento angular do fluoróforo que ocorre entre a absorção e posterior emissão de um fóton. Este deslocamento angular é dependente da taxa e da extensão da difusão de rotação durante o tempo de vida do estado de excitação. A taxa de difusão de rotacional depende da viscosidade do solvente, do tamanho e forma de rotação da molécula.

Uma alteração na viscosidade do solvente vai resultar numa alteração na anisotropia de fluorescência. Para pequenos fluoróforos em soluções de baixa viscosidade, a taxa de difusão de rotação é tipicamente mais rápida do que a taxa de emissão. Sob estas condições, a emissão é despolarizada e a anisotropia perto de zero.

A dependência da anisotropia de fluorescência nos movimentos do fluoróforo resultou em inúmeras aplicações desta técnica em bioquímica. Isto porque a escala de tempo de difusão de rotação de biomoléculas é comparável com o tempo de decaimento de diversos fluoróforos. Consequentemente, fatores que alteram o tempo de correlação rotacional também alteraram a anisotropia.

Nesta técnica de fluorescência, a amostra é excitada com luz polarizada na vertical, e a emissão é observada através de um monocromador. O monocromador normalmente terá uma diferente eficiência de transmissão para luz polarizada na vertical e na horizontal. Por conseguinte, a rotação da emissão do polarizador altera as intensidades medidas, mesmo se a amostra emitir luz não polarizada.

Numa solução de um fluido a maioria dos fluoróforos rodam extensivamente de 50 a 100 ps. Assim, as moléculas podem rodar várias vezes durante os 1-10 ns de tempo de vida do estado excitado, e a orientação da emissão polarizada é, desta forma, aleatória. Por esta razão, fluoróforos em soluções não viscosas apresentam anisotropias próximas de zero. A transferência de excitação entre fluoróforos também resulta na diminuição de anisotropia. Os efeitos de difusão de rotação podem ser diminuídos se o fluoróforo estiver ligado a uma macromolécula.

Os valores de anisotropia são calculados a partir da equação 7.

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad \text{equação 7}$$

onde  $I_w$  e  $I_{vh}$  são as intensidades de fluorescência obtidas da excitação com luz polarizada na vertical (V), com deteção paralela (VV) ou perpendicular (VH).

Para se obter o valor real da anisotropia é necessário adicionar um valor referente ao fator de correção instrumental (G), sendo este dado pelo quociente entre a intensidade de fluorescência

medida pela excitação com luz polarizada na horizontal (H), sendo posteriormente detetada perpendicularmente (HV) e paralelamente (HH). O fator G é assim determinado pela equação 8.

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad \text{equação 8}$$

Como referido, a medição da anisotropia de fluorescência tem inúmeras utilidades, sendo que, neste caso de estudo, foi utilizada para obter informação sobre o meio onde os fármacos em estudo se encontravam nos vários ensaios realizados.

#### 3.2.4. Transferência de Energia Ressonante de Förster (FRET)

O processo de FRET permite estudar interações moleculares e baseia-se na transferência de energia de excitação eletrônica, não radiativa, entre dois fluoróforos. De modo a ocorrer FRET é necessário que o doador tenha um tempo de vida longo o suficiente, que as moléculas doadoras e aceitantes estejam a uma distância entre 1 e 10 nm e que o espectro de absorção do aceitante se sobreponha (pelo menos parcialmente) ao espectro de emissão de fluorescência do doador (Figura 3.5) <sup>94</sup>.



Figura 3.5 - Ilustração da sobreposição espectral entre o espectro de emissão do doador e a absorção do aceitador

É importante compreender que este fenómeno não envolve a emissão de luz pelo doador. O FRET não é o resultado de emissão do doador a ser absorvida pelo aceitador. Estes processos de reabsorção são dependentes da concentração global do aceitador, e de fatores não moleculares tais como tamanho da amostra, e, portanto, são de menor interesse. Este processo permite a determinação da distância do doador e do aceitador de energia.

A eficiência da transferência de energia de ressonância ( $\Phi_{FRET}$ ) é definida como a proporção de moléculas doadoras de energia que transferiram esta em excesso para moléculas

aceitadoras. Esta eficiência é calculada através da diferença das intensidades de fluorescência do dador aquando da presença do aceitador ( $F_{DA}$ ) e na ausência do aceitador ( $F_D$ ), equação 9.

$$\Phi_{FRET} = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad \text{equação 9}$$

A distância entre as moléculas dadoras e aceitadoras pode ser determinada através da eficiência de FRET, através da equação 10).

$$r = R_0 \left[ \frac{1 - \Phi_{FRET}}{\Phi_{FRET}} \right]^{\frac{1}{6}} \quad \text{equação 10}$$

onde  $R_0$  é o raio de Förster (distância crítica), que pode ser obtida pela sobreposição espectral,  $J(\lambda)$ , entre a emissão do dador e a absorção do aceitador, de acordo com as equações 11 e 12.

$$R_0 = 0.2108 [k^2 \Phi_D^0 n^{-4} J(\lambda)]^{\frac{1}{6}} \quad \text{equação 11}$$

$$J(\lambda) = \int_0^\infty I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad \text{equação 12}$$

onde  $k^2 = 2/3$  é o fator orientacional assumindo uma orientação aleatória das moléculas,  $\Phi_D^0$  é o rendimento quântico de fluorescência do doador na ausência de transferência de energia,  $n$  é o índice de refração do meio,  $I_D(\lambda)$  é o espectro de fluorescência do doador normalizado de forma que  $\int_0^\infty I_D(\lambda) d\lambda = 1$ , e  $\varepsilon_A(\lambda)$  é o coeficiente de absorção molar do aceitador.

As distâncias de Förster são comparáveis ao tamanho de moléculas biológicas, 30-60 Å. Desta forma, este é um método bastante utilizado em estudos de interação com membranas biológicas.

### 3.3. Difração de Raios X (XRD)

A técnica de difração de raios X (XRD) descoberta em 1895 permitiu um avanço nas mais variadas áreas científicas. A radiação Raio X (eletromagnética) apresenta um comprimento de onda entre 0.1 e 1 Å, o que permite a interação com a matéria através de três mecanismos diferentes: efeito fotoelétrico, dispersão de Compton e dispersão de Thompson <sup>95</sup>.

Trata-se de uma técnica muito utilizada, visto que não é destrutiva e permite a caracterização de materiais. O seu mecanismo de ação baseia-se no seguinte processo: quando

ocorre a incidência de um feixe de raios-X sobre uma amostra cristalina com um arranjo atômico periódico, a amostra difrata o mesmo feixes em diferentes direções <sup>95</sup>.

A intensidade dos raios-X difratados depende do arranjo atômico do cristal e da espécie atômica. Quando se trata da difração de raios-X de um cristal, são necessárias informações relacionadas com a capacidade de dispersão por átomo. Uma vez que o núcleo de um átomo é mais pesado em comparação com um fóton, este não vai ter interferência na dispersão do mesmo, assim a capacidade de difratar raios-X depende apenas dos elétrons do átomo.

Para uma radiação incidente monocromática de comprimento de onda conhecido, a difração da mesma ocorre quando a lei de *Bragg* é verificada. Esta lei interpreta a difração da radiação incidente por átomos presentes num cristal e é descrita pela equação 13 :

$$2d \sin\theta = \lambda \quad \text{equação 13}$$

onde d representa a distância entre planos atômicos e  $\theta$  representa o ângulo de incidência.

A partir dos picos obtidos por XRD é possível determinar o tamanho dos cristais com recurso à equação de *Scherrer* (equação 14).

$$t = \frac{ky}{B \cos \theta} \quad \text{equação 14}$$

onde t é o tamanho do cristal, B é a largura a meia altura, k é a função da forma geométrica da partícula (geralmente assume-se o valor 0,9) e  $\theta$  representa o ângulo de incidência.

### 3.4. Microscopia Eletrónica de Transmissão.

A microscopia eletrónica de transmissão, é uma técnica utilizada na caracterização de nanomateriais (fibras, filmes finos e nanopartículas) pois permite a visualização da estrutura atômica da amostra analisada <sup>96</sup>.

Os componentes que compõem um microscópio eletrónico de transmissão são uma fonte de elétrons, lentes que permitem o foco do feixe de elétrons antes e depois da passagem pelo substrato analisado, e um sistema de deteção dos elétrons transmitidos. Trata-se de uma técnica poderosa para determinar o tamanho e a morfologia das partículas, reportando o tamanho total da mesma e fornecendo detalhes acerca da sua distribuição de tamanho, forma e também estrutura interna.

## CAPÍTULO IV: Materiais e Métodos

### 4.1. Materiais

Neste trabalho foi utilizado sulfato de manganês hidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), Hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ), Cloreto de ferro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Cloreto de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ), 1,1'-Carbonildiimidazole (CDI), Dimetilsulfóxido (DMSO), 1,4 - Dioxano, Cisteamina, Ácido cítrico

monoidratado, Etanol absoluto 99,9%, Ácido cloroáurico trihidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), Borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), Brometo de tetrabutilamónio (TOAB), Dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), água desionizada, lecitina de soja, clorofórmio, corrente de azoto, lípido dioleoilfosfatidiletanolamina marcado com rodamina (RO-DOPE), lípido fosfatidilcolina marcado com nitrobenzoxadiazole (NBD), corante *nile blue* (NB), clorofórmio 99,9%, acetonitrilo 99,8% e acetato de etilo 99,8%.

## 4.2. Síntese dos diferentes tipos de nanopartículas

Ao longo deste capítulo, serão descritos os vários métodos utilizados para a produção das nanopartículas, da funcionalização que estas sofreram bem como da preparação dos sistemas propostos. Serão também descritos os estudos realizados com o objetivo de avaliar a aplicabilidade dos diferentes sistemas produzidos.

Pretendia-se a preparação de nanopartículas híbridas de quatro tipos diferentes:

- Nanopartículas magnéticas de **ferrite de manganês decoradas** com nanopartículas plasmónicas de ouro;
- Nanopartículas magnéticas, **núcleo/coroa**, com núcleo de **ferrite de manganês** e coroa de ouro;
- Nanopartículas magnéticas de **ferrite de níquel decoradas** com nanopartículas plasmónicas de ouro;
- Nanopartículas magnéticas, **núcleo/coroa**, com núcleo de **ferrite de níquel** e coroa de ouro.

Para esse efeito, seguiu-se com as várias etapas de execução até obter as nanopartículas pretendidas. Inicialmente foram preparadas as nanopartículas magnéticas de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  e de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ , posteriormente foram preparadas as nanopartículas de ouro. Preparados os dois tipos de nanopartículas magnéticas bem como as de ouro, seguiu-se com o processo de funcionalização de ambas, de forma a obter as nanopartículas denominadas de híbridas. Após a síntese as nanopartículas foram caracterizadas por variadas técnicas.

A etapa seguinte passou pela incorporação destes sistemas em lipossomas de forma a originar 4 tipos diferentes de magnetolipossomas. Seguiu-se com a realização de testes (irradiação e temperatura) de forma a verificar o comportamento dos diferentes sistemas preparados, bem como a aplicabilidade dos mesmos. Estes sistemas foram também testados como nanotransportadores de dois compostos antitumorais desenvolvidos pelo Centro de Química de Universidade do Minho.

É importante referir que todos os espectros de absorção foram registados num espectrofotómetro UV-vis-NIR Shimadzu UV-3101PC, enquanto as medidas de fluorescência foram realizadas utilizando um espectrofluorímetro SPEX 320 Fluorolog<sup>®</sup>2, equipado com monocromadores duplos de excitação e de emissão. Os espectros de fluorescência foram corrigidos para a resposta instrumental do sistema.

#### 4.2.1. Preparação das nanopartículas magnéticas

A preparação das nanopartículas foi realizada com recurso ao método de coprecipitação, descrito na literatura <sup>97</sup>.

A coprecipitação é um método simples que permite a síntese de nanopartículas de óxido de ferro. As nanopartículas são preparadas pela reação de sais de Fe(II) e Fe(III) em meio aquoso alcalino numa razão molar de 1:2. As nanopartículas de óxido de ferro produzidas por este método têm bastante aplicabilidade na área biomédica devido à facilidade na execução do processo bem como na quantidade elevada de nanopartículas que é possível produzir. Este método permite a dispersão das nanopartículas em água o que facilita a funcionalização destas, caso necessário <sup>22</sup>.

##### 4.2.1.1. Preparação das nanopartículas de ferrite de manganês (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)

Inicialmente, uma solução aquosa contendo 612 µL de NaOH 50% foi aquecida a uma temperatura de 90°C. De seguida, uma mistura contendo 500 µL de uma solução aquosa de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.5M e 500 µL de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 1M foi adicionada gota a gota à solução de NaOH previamente aquecida; esta adição foi feita sob agitação. As nanopartículas de ferrite de manganês formaram-se após duas horas a 90 ° C. No final, as nanopartículas foram lavadas várias vezes com etanol absoluto, através de sucessivas centrifugações (10000 rpm, 10 minutos) e por decantação magnética, de forma a eliminar resíduos de reagentes. Finalizadas as lavagens, as nanopartículas foram colocadas na estufa, de forma a eliminar o excesso de água presente.

Na tabela 4.1 encontram-se as condições de preparação destas nanopartículas.

Tabela 4.1 – Condições de preparação das nanopartículas de MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

<b>Concentração inicial (M)</b>	<b>Concentração final (M)</b>	<b>Volume inicial (µL)</b>
---------------------------------	-------------------------------	----------------------------

<b>NaOH</b>	18,94	2,32	612
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	1	0,10	500
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	0,5	0,05	500
<b>H<sub>2</sub>O</b>	—————	—————	3388
<b>Total</b>	—————	—————	5000

#### 4.2.1.2. Preparação das nanopartículas de ferrite de níquel

As nanopartículas de ferrite de níquel foram de igual modo preparadas com recurso ao método de coprecipitação. Numa solução aquosa de 5 mL fez se reagir 1 mL de NiCl<sub>2</sub> (1 M) e 2 mL de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (1 M) com 1,818 mL de hidróxido de sódio (18,94 M).

Após 40 minutos a 80 °C, sob agitação magnética as nanopartículas de ferrite de níquel formaram-se. Em seguida, estas sofreram um processo de lavagem, de forma a eliminar possíveis restos de reagentes. Após a lavagem, as nanopartículas foram colocadas na estufa, para remover o excesso de água presente. Após a secagem, seguiu-se com o processo de calcinação, com o objetivo de aumentar as propriedades magnéticas. Este processo foi feito a uma temperatura de 800°C durante 2h. Após a calcinação, com o propósito de remover partículas não magnéticas e possíveis impurezas, realizou-se um novo processo de lavagem, através de sucessivas centrifugações e decantações magnéticas.

As condições de preparação deste tipo de nanopartículas encontram-se na tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Condições de preparação das nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

	<b>Concentração inicial (M)</b>	<b>Concentração final (M)</b>	<b>Volume inicial (µL)</b>
<b>NaOH</b>	18,94	6,89	1818
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	1	0,40	2000
<b>Ni</b>	1	0,20	1000
<b>H<sub>2</sub>O</b>	—————	—————	182
<b>Total</b>	—————	—————	5000

#### 4.2.2. Preparação das nanopartículas de ouro (*Brust-Schiffrin Method*)

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas através do método similar ao de *Brust-Schiffrin*.<sup>98</sup> Neste método 1,5 mL de uma solução aquosa de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) de concentração 30 mM foi misturada a 4 mL de uma solução de brometo de tetraoctilamônio (TOAB) em tolueno de concentração 50 mM. A mistura de duas fases foi vigorosamente agitada até que todo o ácido cloroáurico fosse transferido para a fase orgânica, onde se tornou laranja escuro, ao mesmo tempo que a fase aquosa se tornava incolor. Continuou-se a agitar a solução e adicionou-se lentamente 1,25 mL de borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) aquoso de concentração 0,4 M preparado pouco antes da adição (Tabela 4.3.). Com esta adição, imediatamente se verificou a mudança de cor da solução orgânica de laranja escuro para vermelho rubi (Figura 4.1). Após agitação por mais 20 minutos, a fase orgânica foi extraída e lavada cinco vezes com água destilada, estando estas partículas prontas para utilização.

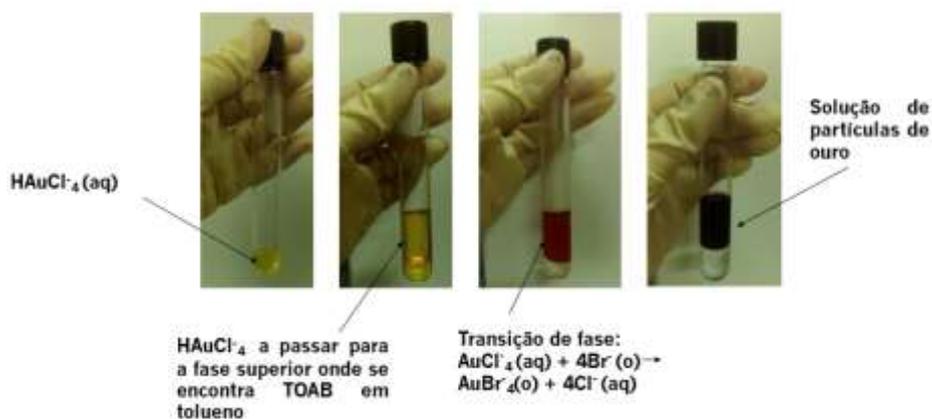


Figura. 4.1 - Processo de síntese de nanopartículas de ouro obtido em laboratório, pelo método de *Brust-Schiffrin*

Importante referir que no método de *Brust-Schiffrin* é utilizado o dodecanotiol (DDT), no entanto no método adaptado não se utilizou. Por analogia com propostas anteriores pensa-se que a estabilização das nanopartículas de ouro é devida à presença do sal de amónio quaternário utilizado como reagente de transferência de fase na preparação do colóide (Figura 4.2).

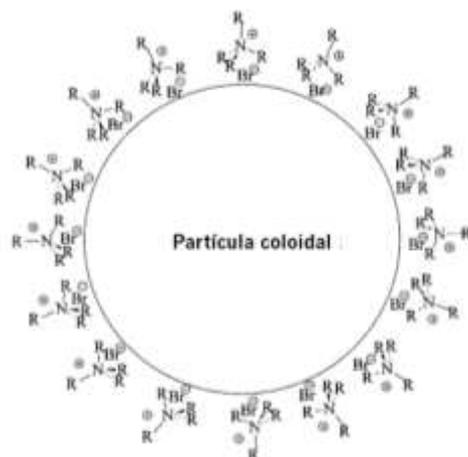


Figura. 4.2 - Diagrama esquemático do arranjo proposto das espécies  $R_4N^+$  e  $Br^-$  adsorvidas na superfície das partículas de Au.

Estas preparações coloidais são importantes, uma vez que é mais provável que a estabilização das partículas em solução não envolva a formação de ligações de metal-ligante fortes, como é o caso os tióis, mas resulta de interações eletrostáticas envolvendo as cadeias do catião amónio quaternário no solvente orgânico. Assim, embora esses colóides permaneçam em solução por longos períodos sem deterioração, eles são reativos o suficiente para que possam ser usados na construção de novas estruturas.

Tabela 4.3 - Condições de preparação das nanopartículas de ouro pelo método de *Brust Schiffrin*

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração (mM)</b>	<b>Volume inicial (mL)</b>	<b>Solvente</b>
<b>HAuCl<sub>4</sub></b>	30	1.5	H <sub>2</sub> O
<b>TOAB</b>	50	4	Tolueno/Xileno
<b>NaBH<sub>4</sub></b>	4x10 <sup>-4</sup>	1,25	H <sub>2</sub> O

### 4.3. Funcionalização das nanopartículas de $MnFe_2O_4$ e de $NiFe_2O_4$

O procedimento utilizado para revestir as nanopartículas de  $MnFe_2O_4$  com ouro foi modificado ao longo de várias tentativas. Após várias semanas de trabalho, chegou-se a um

método onde os resultados obtidos foram satisfatórios e reprodutíveis, tanto para as ferrites de manganês como para as ferrites de níquel. Assim, 1 mg de nanopartículas magnéticas foram dispersas em 5 mL de dioxano previamente seco (com sulfato de sódio anidro), de forma a remover toda a água presente no solvente. A esta suspensão foi adicionado 1,1- carbonildiimidazole (CDI), correspondente a um excesso de 5 vezes em relação ao número de moles de metais. Esta suspensão foi aquecida e mantida a 60 °C com a tampa fechada durante 2 horas no sonificador. As nanopartículas foram, de seguida, lavadas com etanol absoluto com recurso a sucessivas centrifugações a 3500 rpm durante 5 minutos, de modo a remover o excesso de CDI não ligado.

Seguidamente, foi adicionada cisteamina aos tubos, numa massa correspondente também a um excesso de 5 vezes em relação ao número de moles de metais (Tabela 4.4.). Os tubos foram mantidos a 60°C durante uma hora. Por fim, as nanopartículas foram lavadas também com etanol, por sucessivas centrifugações a 3500 rpm durante 5 minutos. Estas foram secas na estufa, estando assim prontas para acoplamento com as nanopartículas de ouro.

Tabela 4.4 - Quantidade de nanopartículas usada e dos reagentes utilizados no processo de funcionalização

<b>Nanopartículas</b>	<b>Massa de nanopartículas (mg)</b>	<b>Massa de CDI (mg)</b>	<b>Massa de Cisteamina (mg)</b>
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	1	3.52	1.67
<b>NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	1	3.46	1.64

É de realçar apenas uma pequena diferença no processo de funcionalização dos dois tipos de ferrites. Para o caso das ferrites de níquel, estas sofreram um tratamento inicial antes do processo de funcionalização acabado de descrever. Estas nanopartículas foram tratadas com ácido cítrico numa razão 1:1, com o objetivo de aumentar a monodispersividade, bem como prevenir a agregação. Após este tratamento inicial, procedeu-se ao processo acima explicado <sup>99</sup>.

#### 4.4. Acoplamento das ferrites funcionalizadas com as nanopartículas de ouro

O processo de acoplamento das nanopartículas de ouro às ferrites funcionalizadas é bastante simples. Após preparadas as nanopartículas de ouro pelo método descrito na secção 4.2.2, estas foram adicionadas às nanopartículas magnéticas funcionalizadas sob agitação. As nanopartículas magnéticas, após funcionalizadas foram secas e redispersas em tolueno de forma

a garantir uma maior interação entre estas e as nanopartículas de ouro. Esta agitação permite uma maior capacidade de interação entre as nanopartículas de ouro e as nanopartículas magnéticas. Para além disso, ao serem adicionadas as nanopartículas de ouro às ferrites, garante-se que o ouro fica em excesso o que permite que estas se liguem ao redor das nanopartículas magnéticas. Após a junção observa-se uma mudança imediata de cor da solução das nanopartículas de ouro, indicativo que estas sofreram interação com as nanopartículas magnéticas (Figura 4.3). Esta solução é então centrifugada a 8500 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação observa-se que o sobrenadante perdeu parte da sua cor e que as nanopartículas apresentam comportamento magnético quando aplicado um campo magnético externo, indicando que ocorreu acoplamento dos dois tipos de nanopartículas.

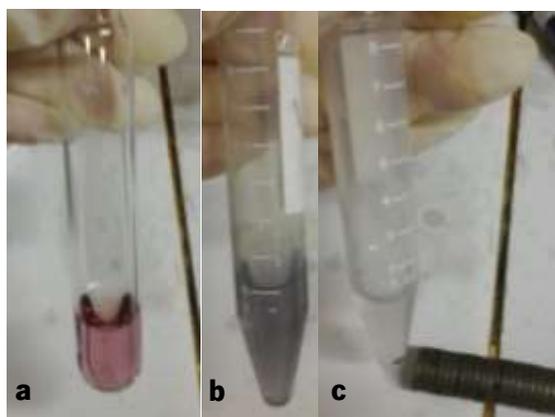


Figura 4.3 - a) Solução de nanopartículas de ouro em tolueno; b) solução de nanopartículas de ouro após acoplamento com as nanopartículas de  $MnFe_2O_4$ ; c) solução após centrifugação, onde se vê o sobrenadante transparente e um *pellet* de nanopartículas que responde a um campo magnético externo aplicado.

#### 4.5. Crescimento da camada de ouro com hidroxilamina e nanopartículas de ouro

O processo de acoplamento descrito na secção 4.4. refere-se ao processo de deposição de partículas de ouro sobre as nanopartículas magnéticas, conhecidas como partículas decoradas. Para além desse tipo de nanopartículas, foi do nosso interesse a preparação de nanopartículas magnéticas revestidas com uma camada de ouro uniforme, partículas conhecidas como nanopartículas com núcleo de ferrite e coroa de ouro.

Nesta secção é descrito um método para o crescimento das nanopartículas de ouro coloidal (conhecido com “*seeding*”), com base na redução catiónica do  $Au^{3+}$  catalisada pela

hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ). Enquanto a hidroxilamina é termodinamicamente capaz de reduzir o catião  $\text{Au}^{3+}$  na sua forma *bulk*, esta reação é acelerada pela presença de superfícies de ouro (Figura 4.4). É de salientar que nenhuma nova nucleação de partículas ocorre em solução, e que todo o  $\text{Au}^{3+}$  adicionado dá origem a partículas maiores <sup>100</sup>.

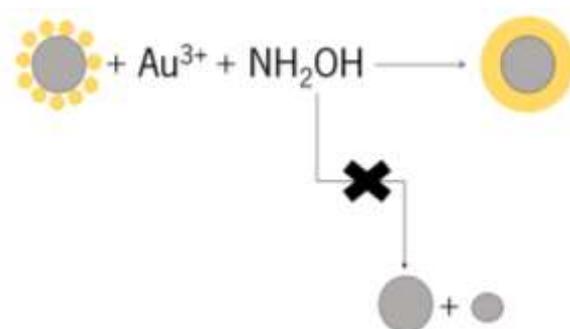


Figura 4.4 - Implementação pela hidroxilamina do método *seeding* para nanopartículas de Au coloidal. Adaptado de <sup>100</sup>

O crescimento das nanopartículas de Au coloidal promovido por misturas de  $\text{NH}_2\text{OH}/\text{Au}^{3+}$  pode ser facilmente monitorizado por espectroscopia de absorção UV-vis. As partículas funcionalizadas foram adicionadas, a uma mistura de  $\text{HAuCl}_4/\text{NH}_2\text{OH}$  em água e o espectro de absorção desta mistura é medido ao longo do tempo (de 10 em 10 segundos). É de esperar, segundo a literatura <sup>100</sup>, um crescimento da banda plasmónica de superfície referente ao ouro. Após aproximadamente 2 minutos, é atingido um patamar nos espectros de absorção e é então adicionado 0.100 mL do sal  $\text{HAuCl}_4$  1% e novamente foram traçados espectros de 30 em 30 s.

De forma a obter um termo de comparação, preparou-se outra solução aquosa similar apenas com  $\text{HAuCl}_4/\text{NH}_2\text{OH}$  e os espectros desta mistura foram medidos inicialmente e após 30 min.

#### 4.6. Esquema de funcionalização dos diferentes tipos de nanopartículas

De forma a ser mais perceptível o trabalho desenvolvido, serão aqui expostos os esquemas de reação dos 4 tipos de nanopartículas sintetizados.

- a) Nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês decoradas com nanopartículas plasmónicas de ouro

Este tipo de nanopartículas foi preparado usando o 1,1'-Carbonildiimidazole (CDI) como agente de acoplamento, neste primeiro processo foi utilizado para ativar os grupos -OH da

superfície das nanopartículas de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ , segundo a reação representada na Figura 4.5. Após a ativação com CDI, estas sofreram uma segunda reação com a cisteamina de forma a preparar a superfície destas para posterior ligação com as nanopartículas de ouro, através do SH da cisteamina. que se liga ao ouro deslocando o TOAB da superfície destas. O grupo amina serviu para ligar aos grupos OH da ferrite dando origem a um carbamato.

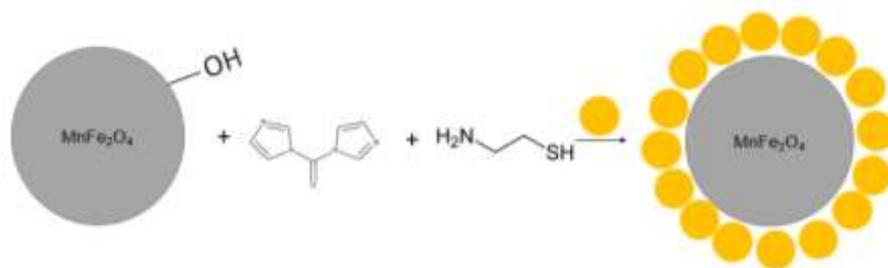


Figura 4.5 - Esquema da produção de nanopartículas magnéticas de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  decoradas com nanopartículas plasmônicas de Au.

Após a síntese das nanopartículas, foi utilizado um magneto (campo magnético externo), para verificar se estas possuíam magnetismo, sendo que todas as nanopartículas preparadas demonstraram ser magnéticas, ao reagirem de forma rápida ao campo magnético aplicado.

Uma vez que as nanopartículas de ouro apresentam como característica o plasmão na zona dos 520 nm, foi a partir dessa mesma característica que se verificou/estimou a ligação do ouro às nanopartículas magnéticas.

- b) Nanopartículas magnéticas, núcleo/coroa, com núcleo de ferrite de manganês e coroa de ouro

Estas foram obtidas através da reação das nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês decoradas com ouro pela deposição de íons de ouro por ação da hidroxilamina (Figura 4.6.).

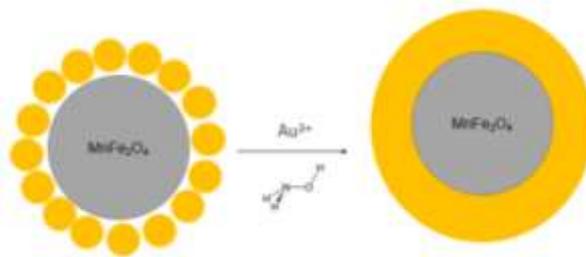


Figura 4.6 - Esquema de reação da hidroxilamina nas nanopartículas de Manganês decoradas com ouro, de forma a obter nanopartículas núcleo coroa MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/Au.

O processo de crescimento do ouro nas nanopartículas de ferrite de manganês por ação da hidroxilamina foi monitorizado por espectroscopia UV-Visível. Esta monitorização permitiu observar o aumento da banda plasmônica relativo ao ouro ao longo do tempo, após a adição de hidroxilamina e H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> às nanopartículas magnéticas decoradas com nanopartículas de Au.

c) Nanopartículas magnéticas de ferrite de níquel decoradas com nanopartículas plasmônicas de ouro

As nanopartículas deste tipo foram, de igual modo funcionalizadas com CDI, agente de acoplamento, para ativar os grupos -OH da superfície das nanopartículas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, segundo a reação representada na Figura 4.7. Após a ativação com CDI, estas sofreram uma segunda reação com a cisteamina de forma a preparar a superfície destas para posterior ligação com as nanopartículas de ouro, através do grupo SH da cisteamina que liga ao Au deslocando o TOAB da superfície do Au. O grupo amina serviu para ligar aos grupos OH da ferrite fazendo um carbamato amina.

As nanopartículas de ferrite de níquel são ligeiramente mais densas e apresentam uma maior dificuldade no processo de dispersão. De forma a contrariar esta característica, estas nanopartículas foram, num passo inicial, tratadas com uma solução de ácido cítrico numa razão de 1:1. Este tratamento permitiu o seguimento dos passos seguintes à funcionalização.

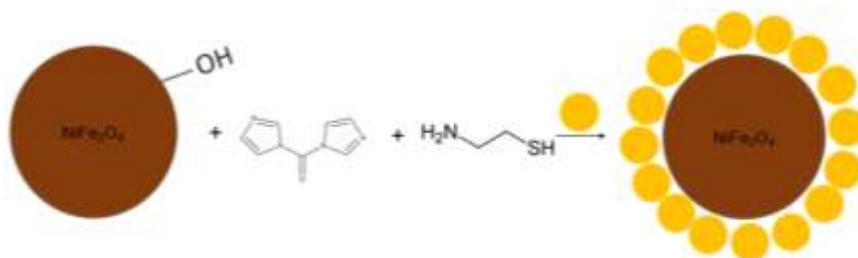


Figura 4.7 - Esquema da produção de nanopartículas magnéticas de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> decoradas com nanopartículas plasmônicas de Au.

d) Nanopartículas magnéticas, núcleo/coroa, com núcleo de ferrite de níquel e coroa de ouro

Estas, tais como as de ferrite de manganês, foram obtidas através da reação das nanopartículas magnéticas de ferrite de níquel decoradas com ouro pela deposição de íons de ouro por ação da hidroxilamina (Figura 4.8.).

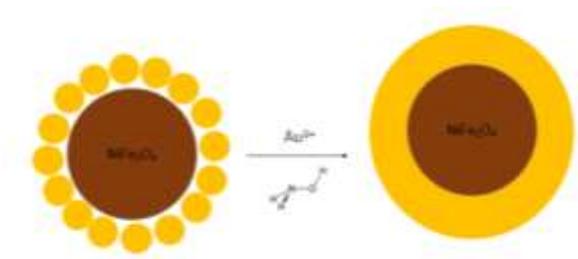


Figura 4.8 - Esquema de reação da hidroxilamina nas nanopartículas de Níquel decoradas com ouro de forma a obter nanopartículas núcleo coroa NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/Au

Para este tipo de nanopartículas, o processo do crescimento do ouro nas nanopartículas de níquel por ação da hidroxilamina foi, tal como para as nanopartículas de ferrite de manganês, monitorizado por espectroscopia UV-Visível. Esta monitorização permitiu, da mesma forma observar o aumento da banda plasmónica relativa ao ouro ou longo do tempo, após a adição de hidroxilamina, ouro e nanopartículas revestidas com ouro.

#### 4.7. Confirmação do acoplamento das nanopartículas magnéticas com as nanopartículas de ouro

Para confirmar o acoplamento das nanopartículas magnéticas com as nanopartículas de ouro em solução, recorreu-se à espectroscopia UV-Vis. Mediram-se os espectros das ferrites de manganês e das ferrites de níquel, antes e depois do acoplamento. Mediu-se também o espectro das nanopartículas de ouro sem qualquer tratamento. As nanopartículas de ouro apresentam um espectro de absorção bastante característico (com a banda plasmónica). Desta forma, o aparecimento desta banda plasmónica no espectro de absorção da solução, e sendo estas nanopartículas magnéticas, é indicativo da presença de ouro à sua superfície.

#### 4.8. Caracterização das nanopartículas

Para a caracterização das nanopartículas magnéticas e de ouro foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de absorção UV-VIS (Ultravioleta-visível), XRD e TEM.

#### 4.8.1. Espectroscopia de absorção UV-Visível

Esta técnica permite estimar o tamanho, a concentração, a forma e o nível de agregação das nanopartículas de ouro (AuNPs), uma vez que a presença do seu plasmão de ressonância, característico nestas nanopartículas, depende destes parâmetros <sup>101</sup>.

Foi medido o espectro das nanopartículas de ouro entre os comprimentos de onda de 350 nm a 750 nm. É de esperar, segundo a literatura, que a solução destas nanopartículas apresente cor vermelha e que o seu pico de absorção se encontre próximo dos 520 nm estas nanopartículas apresentam um diâmetro entre os 2 e os 6 nm <sup>98</sup>.

#### 4.8.2. Difração de Raios-X

A técnica de difração de raios X é uma técnica muito usual na análise estrutural de materiais. É uma técnica que dá informação sobre a estrutura cristalina, fase, orientação preferida de cristal (textura) e também outros parâmetros estruturais, tais como o tamanho médio do grão, cristalinidade e possíveis defeitos ou deformações do cristal em análise.

Trata-se de uma técnica não invasiva e, logo, muito utilizada, visto que não danifica as amostras. Além disso, para este tipo de análises, não é necessária qualquer preparação específica <sup>95, 102</sup>.

Neste tipo de análises, as amostras são submetidas a radiações eletromagnéticas na gama dos raios-X, com energias da ordem dos 6.92 keV.

Quando os átomos de um material depositado se encontram num estado não organizado, denomina-se de material amorfo. No entanto, quando estes, por outro lado, se encontram organizados segundo uma dada fase cristalina, estes assumem uma estrutura característica. O ouro, material utilizado neste estudo, apresenta uma estrutura cúbica de fases centradas (do inglês *face centered cubic*, fcc) (Figura 4.9.). Neste caso a estrutura base do ouro trata-se de um cubo com átomos de ouro nos vértices, há também um átomo de ouro no centro de cada uma das faces do cubo <sup>103</sup>.

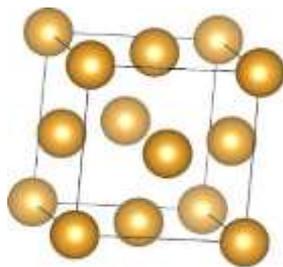


Figura 4.9 - Representação da estrutura cristalina do Au. Estrutura cúbica de faces centradas, constituído por 8 átomos de Au nos vértices e 6 átomos da Au nas faces do cubo.

Quanto aos difratogramas de XRD das nanopartículas magnéticas, estas foram submetidas a análises com recurso ao software *Match!* Este software permite a identificação das diferentes fases presentes na amostra em estudo, através de comparações com padrões presentes na base de dados que acompanha o *software*. Esta análise permite concluir quanto à presença de ferrites, de contaminações presentes e permite também a obtenção de dados a nível estrutural, nomeadamente o tamanho médio, através da aplicação da **equação 14**.

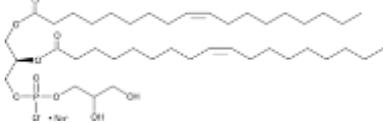
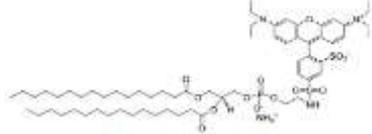
#### 4.8.3. Microscopia eletrónica de transmissão (TEM)

Imagens de TEM das nanopartículas baseadas em ferrites, bem como dos SMLs, foram registadas através de um Microscópio Eletrónico JEOL JEM 2010F a 200 kV acoplado a um analisador espectroscópico de dispersão de eletrões (EDS) no Centro de Apoio Científico e Tecnológico à Investigação (CACTI), Universidade de Vigo, Espanha. O processamento de imagens de TEM foi realizado com recurso ao *software ImageJ*. Este permitiu melhorar o contraste local, seguido por *Automatic Local Threshold* e análise das partículas.

### 4.9. Preparação dos Magnetolipossomas Sólidos

Depois de preparadas e funcionalizadas as diferentes nanopartículas, seguiu-se com a incorporação destas em lipossomas, de forma a obter magnetolipossomas sólidos. Para esta preparação recorreu-se ao método do filme lipídico e foram utilizados os lípidos DOPG (1,2-dioleoilfosfatidilglicerol) e DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina) marcado com rodamina (Rh-DOPE). A estrutura e a temperatura de transição dos lípidos utilizados encontram-se na tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Estrutura e características físico-químicas dos fosfolípidos utilizados na preparação dos magnetolipossomas

Estrutura	Temperatura de transição
<b>DOPG</b> 	-18° C <sup>104</sup>
<b>Rh-DOPE</b> 	-16° C <sup>104</sup>

Para os quatro tipos de nanopartículas, o método de preparação dos magnetolipossomas foi o mesmo. Assim, preparou-se uma solução de nanopartículas funcionalizadas (com CDI, cisteamina e ouro - secção 4.5.) em etanol absoluto (1,5 mL). De seguida e sob agitação, foi adicionada às nanopartículas octadecialmina (ODA), em excesso 5x, e colocou-se esta solução sob agitação durante 1 hora. A presença de ODA, numa primeira fase, irá facilitar a cobertura com os lípidos posteriormente adicionados, através de interações hidrofóbicas. Após a 1h a solução foi lavada com sucessivas centrifugações e decantações magnéticas de modo a remover o excesso de ODA não ligado.

Após esta etapa preparou-se uma mistura de lipídica, em etanol, com lípido marcado (Rodamina-DOPE) e com lípido não marcado (DOPG) numa razão de 1:4. (Rh-DOPE –  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$  e o DOPG com uma concentração de  $4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ). Essa mistura lipídica, foi adicionada à solução de nanopartículas inicialmente funcionalizada com ODA. Após a mistura, seguiu-se com a evaporação do solvente onde se obteve um filme lipídico, a esse filme foi adicionada água sob agitação de forma a promover o rearranjo dos lípidos e a formação do magnetolipossoma sólido. Fizeram-se, de seguida, duas lavagens por decantação magnética, de forma a remover o excesso de lípido não ligado e que se encontra na forma de vesículas mono ou multilamelares. Estes poderão também conter nanopartículas mas, o magneto utilizado não tem força suficiente para os arrastar.

#### 4.10. Ensaio fotofísicos dos SMLs

Neste subcapítulo, serão explicados os ensaios fotofísicos realizados aos sistemas sintetizados, de forma a tirar conclusões sobre a potencialidade destes sistemas para terapia

fototérmica. Numa fase inicial, será detalhado o processo de irradiação e, de seguida, os ensaios de temperatura.

#### 4.10.1. Ensaio de irradiação

Com o objetivo de avaliar a aplicabilidade dos vários sistemas preparados, realizaram-se ensaios de irradiação. Neste tipo de ensaios, os magnetolipossomas preparados (marcados com rodamina-DOPE), foram colocados num sistema montado especificamente para este fim. Foi utilizada uma lâmpada (halogéneo de 75W) para a rodamina do lípido marcado absorver luz que, posteriormente, iria emitir, e uma segunda lâmpada para a irradiação (arco de Xe a 200W). Ambas estavam ligadas através de fibras óticas ao porta-amostras. Este sistema de irradiação tinha também na montagem um filtro de luz UV, na primeira lâmpada e um filtro de corte, na segunda lâmpada, que apenas deixa passar luz de comprimento de onda superior a 600 nm (Figura 4.10). Com recurso a um espectrofotómetro portátil ligado a um computador, foi possível a monitorização do espectro de emissão da rodamina ao longo do tempo de irradiação.

Importante referir que, para a realização deste ensaio, era necessário o escurecimento total do laboratório onde se encontrava esta montagem, de forma a evitar possíveis sinais de luz provenientes de outras fontes de iluminação.

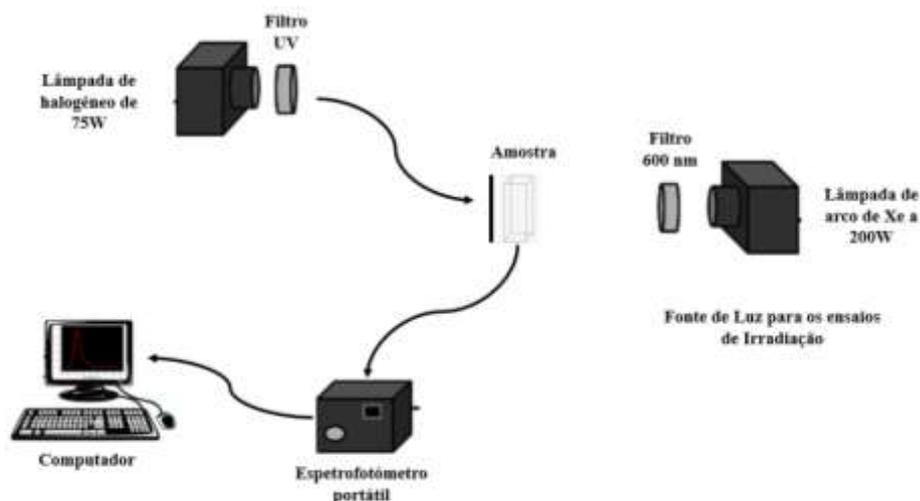


Figura 4.10 – Esquema do sistema de montagem utilizado para a realização dos testes de irradiação.

Assim, nestes ensaios, foram recolhidos os espectros de fluorescência dos magnetolipossomas sólidos marcados com rodamina ao longo do tempo de irradiação. Os ensaios de irradiação foram realizados nos seguintes sistemas:

- a) Sistemas completos (nanopartículas híbridas incorporadas nos lipossomas marcados);

- b) Sistemas na ausência de ouro (nanopartículas magnéticas incorporadas nos lipossomas marcados);
- c) Sistemas na ausência de nanopartículas (apenas os lipossomas marcados).

#### 4.10.2. Ensaio de Temperatura

De forma a tirar conclusões relativamente aos sistemas produzidos, foram realizados ensaios onde se avaliou o comportamento dos diferentes sistemas em função da temperatura. Esta monitorização foi realizada com recurso ao espectrofluorímetro SPEX 320 Fluorolog® 2.

Para isso, foram realizados vários testes nos diferentes sistemas, nomeadamente:

- a) Sistemas completos (nanopartículas híbridas incorporadas nos lipossomas marcados);
- b) Sistemas na ausência de nanopartículas (apenas os lipossomas marcados).

Nestes ensaios foram medidos os espectros de fluorescência da rodamina, em função do aumento de temperatura. Estes foram realizados com o objetivo de compreender o comportamento dos sistemas quando há um aumento gradual de temperatura, e comparar estes resultados com os ensaios de irradiação (secção 4.10.1), bem como perceber as diferenças na presença e na ausência de nanopartículas magnéticas, bem como qual o efeito plasmónico de fototermia que o ouro oferece a estes sistemas. Estes resultados serão discutidos na secção de Resultados e Discussão.

#### 4.11. Estudo fotofísico dos compostos estudados

Os novos compostos antitumorais estudados foram, como já referido, sintetizados pelo Centro de Química da Universidade do Minho. As estruturas moleculares destes encontram-se na secção 2.8. As massas molares dos compostos são 297.30 g.mol<sup>-1</sup> (para o composto 1) e 294.34 g.mol<sup>-1</sup> (para o composto 2). As soluções-mãe dos compostos foram preparadas em etanol, com uma concentração final de cerca de 1x10<sup>-4</sup> M.

As propriedades fotofísicas dos compostos foram avaliadas em vários solventes, através de medidas de absorção e de fluorescência. Os estudos foram efetuados com concentrações finais de 1x10<sup>-5</sup> M, para as medidas de absorção e concentrações de 1x10<sup>-6</sup> M para as análises de fluorescência. Os solventes utilizados foram: acetato de etilo, acetonitrilo, clorofórmio e etanol, de forma a variar a polaridade do meio.

#### 4.11.1. Medidas de anisotropia de fluorescência

De forma a retirar conclusões sobre a localização dos fármacos nos magnetolipossomas em estudo, recorreu-se a medidas de anisotropia de fluorescência, visto que os valores de anisotropia dependem da microviscosidade do meio que rodeia o fluoróforo.

De modo a comprovar o encapsulamento de ambos os compostos nos sistemas produzidos (SMLs), compararam-se os valores de anisotropia dos compostos incorporados nos magnetolipossomas com os valores de anisotropia dos mesmos em glicerol, solvente muito viscoso comumente usado como comparação. Dado que o lípido que constitui os SMLs se encontra na fase líquido-cristalina à temperatura ambiente (25 °C), foram realizadas medições de anisotropia de fluorescência dos compostos 1 e 2 a essa temperatura, com recurso à excitação das amostras com luz polarizada. Os valores de anisotropia foram posteriormente calculados.

#### 4.11.2. Ensaio de interação dos sistemas com modelos membranares

Para avaliar a potencial interação por fusão dos sistemas produzidos com as membranas celulares, foram realizados ensaios de interação dos sistemas com modelos membranares. Esta interação foi avaliada com recurso ao processo de FRET, de modo a concluir quanto ao comportamento dos sistemas quando se encontram em contacto com células. Para este estudo foram utilizados GUVs (*Giant Unilamellar Vesicles*) de lecitina de soja com uma concentração de  $10^{-3}$  M. A lecitina de soja apresenta uma massa molar média de  $776 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e a estrutura molecular do seu componente principal, está representada na figura 4.11.

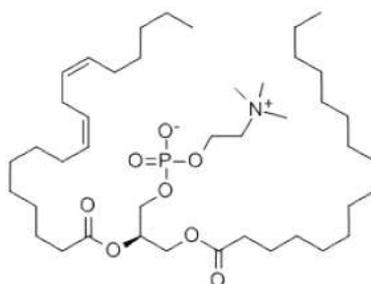


Figura 4.11 - Estrutura molecular da lecitina de soja

A preparação destas vesículas é realizada a partir da evaporação, com corrente de azoto, da quantidade adequada de solução de lecitina de soja preparada em THF (20 mM) e posterior hidratação com 40  $\mu\text{L}$  de água, formando-se um filme lipídico. O filme lipídico foi incubado durante 30 minutos a cerca de 45 °C. Passados os 30 minutos, adicionou-se 5 mL solução de glucose a

0,1 M e a solução resultante foi novamente incubada a 37 °C durante 2 horas. Passadas as 2h, a solução foi centrifugada durante 30 minutos a 12000 rotações por minuto, de modo a eliminar agregados moleculares de pequenas dimensões <sup>105</sup>, <sup>106</sup>.

## CAPÍTULO V: Resultados e Discussão

Ao longo deste capítulo serão apresentados os vários resultados obtidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Estes resultados serão acompanhados da respetiva discussão. Serão aqui apresentados os resultados referente à caracterização realizada das nanopartículas, bem como dos ensaios realizados de forma a verificar as propriedades e potencialidade dos sistemas produzidos. Serão também aqui apresentados e discutidos os resultados referentes aos compostos antitumorais utilizados, bem como da incorporação destes nos nanossistemas e a interação destes últimos com GUVs.

## 5.1. Caracterização das nanopartículas magnéticas

Como já referido, no presente estudo foram preparadas nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) e ferrite de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ).

### 5.1.1. Análises de XRD das nanopartículas magnéticas

As análises de XRD permitiram a confirmação da síntese das nanopartículas de ferrite de manganês e de ferrite de níquel, sendo, para estas últimas, o processo de calcinação necessário à obtenção de nanopartículas numa fase cristalina. Nas figuras 5.1, 5.2 e 5.3, estão expostos os difratogramas das várias nanopartículas preparadas, com o correspondente ajuste pelo programa *Match!*, onde é possível verificar a presença de todos os picos característicos de uma fase cristalina pura de ferrite de manganês e de ferrite de níquel de estrutura em espinela, marcados pelos seus índices de Miller. Os difratogramas, para além dos picos característicos, apresentam alguns picos um pouco mais alargados, podendo estes estar associados a fatores instrumentais <sup>107</sup>.

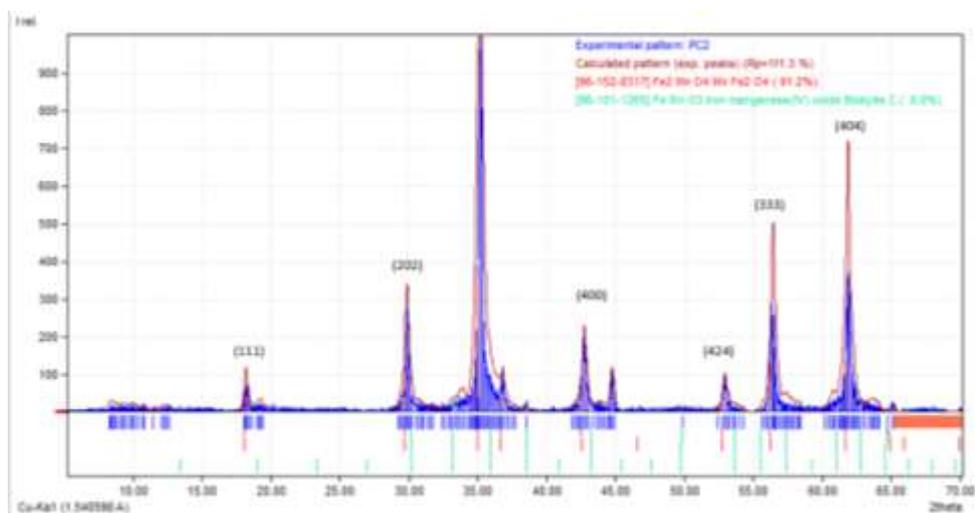


Figura 5.1 - Difratogramas de XRD obtidos para as ferrites de manganês. (10x)

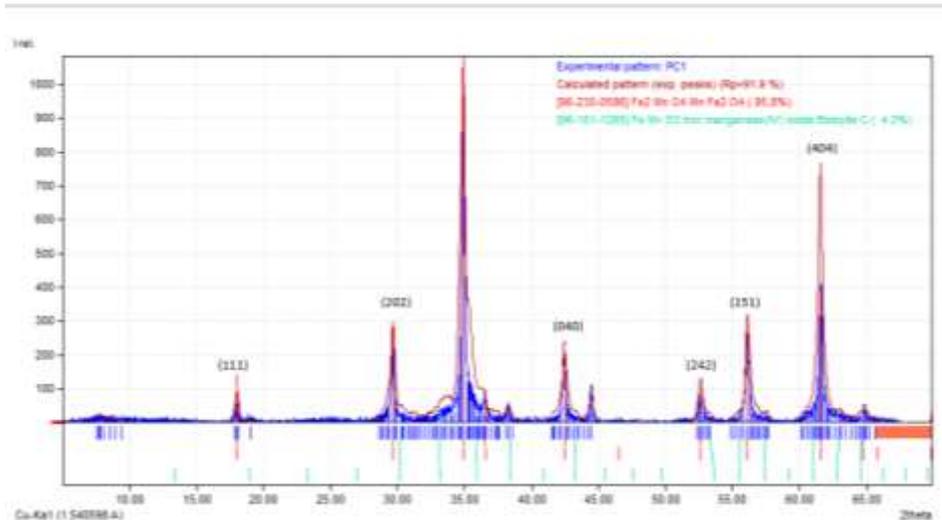


Figura 5.2 - Difractogramas de XRD obtidos para as ferrites de manganês (5x).

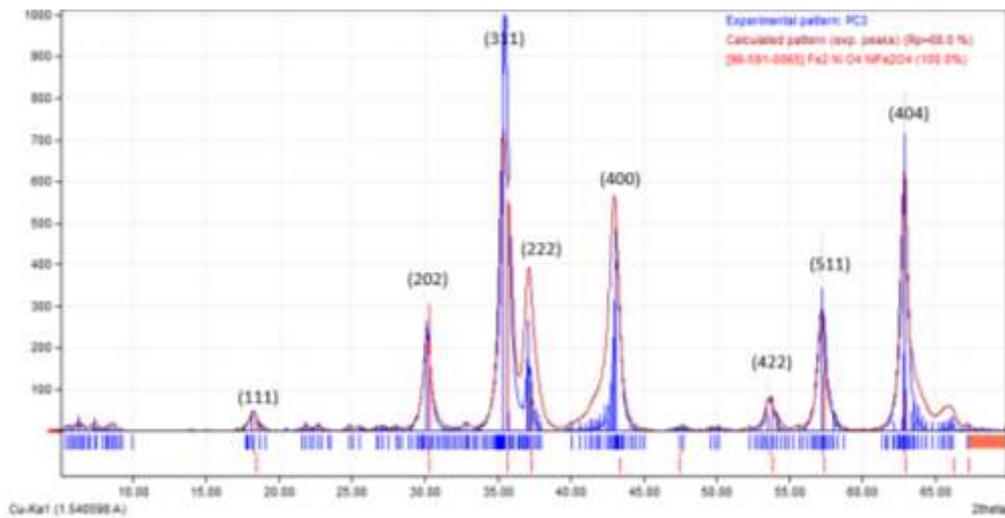


Figura 5.3 - Difractogramas de XRD obtidos para as ferrites de níquel.

Através das medições de XRD e posterior análise com o programa adequado, foi também possível proceder-se à determinação da quantidade de  $MnFe_2O_4$  e  $NiFe_2O_4$  em percentagem.

Os tamanhos das cristalites foram calculados através da equação de *Scherrer* e encontram-se resumidos na tabela 5.1. Importante referir que esta equação, apesar de ser cada vez mais comum na literatura para a determinação dos tamanhos, apresenta algumas limitações, pois esta depende de uma série de parâmetros de controlo difícil, tais como a morfologia do cristal e homogeneidade da amostra. Desta forma, esta análise deve ser acompanhada de análises complementares.

Uma vez que houve uma pequena alteração do processo de síntese original, tendo havido um *scale up* de 5 vezes (designadas “5x”) e 10 vezes “10x” para as nanopartículas de ferrite de manganês, foi relevante comparar estes resultados com resultados obtidos pelo método original já publicado.<sup>97</sup>

Os difratogramas representados nas figuras 2.1., 2.2. e 2.3., referentes às nanopartículas de ferrites de manganês 10x, 5x e ferrites de níquel apresentam picos idênticos, sendo que estes se encontram a 18°, 30°, 35°, 43°, 53°, 56° e 62°. Estes valores são já conhecidos da literatura<sup>108</sup>, e pode-se verificar que, neste caso, o processo de *scale-up* não altera a localização dos picos, tanto para as de 5x como para as de 10x.

Tabela 5.1 - Tabela-Resumo dos tamanhos de  $MnFe_2O_4$  e  $NiFe_2O_4$ , calculados através da equação de *Scherrer*.

<b>Ferrites</b>	<b>2θ</b>	<b>Diâmetro (nm)</b>
<b>NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	35,21	7,6
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (5x)</b>	35,11	27,8
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (10x)</b>	35,2	34,7

De forma a corroborar estes resultados, seria necessária uma análise complementar; comumente utiliza-se a microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Devido a alguns problemas laboratoriais, não foi possível a realização desta análise durante o decorrer do trabalho desenvolvido. No entanto, esta análise já tinha sido anteriormente realizada no contexto de outro projeto de investigação<sup>108, 99</sup>. Nesse trabalho, foram obtidas nanopartículas de ferrite de manganês com tamanhos na ordem das dezenas de nanômetros, com uma distribuição de tamanho de 26±7 nm. Estes resultados corroboram os tamanhos obtidos através da análise de XRD neste trabalho, de 27 e 35 nm.

Quanto às nanopartículas de ferrite de níquel, estas apresentam diâmetros na ordem de uma dezena de nanômetros, com uma distribuição de tamanhos de 11±5 nm. Este resultado está aproximadamente de acordo com o valor estimado por XRD neste trabalho, que foi de 7,57 nm.

#### 5.1.2. Espectros de Absorção UV-Visível

As nanopartículas foram também caracterizadas através de espectroscopia UV-Visível. A Figura 5.4. mostra o espectro de absorção UV-visível das nanopartículas de ferrite de manganês (5x e 10 x) e de ferrites de níquel sintetizadas. A importância da absorção em relação à difusão de

luz depende não apenas do tamanho das NPs, mas também da sua forma, composição e meio em que se encontram.

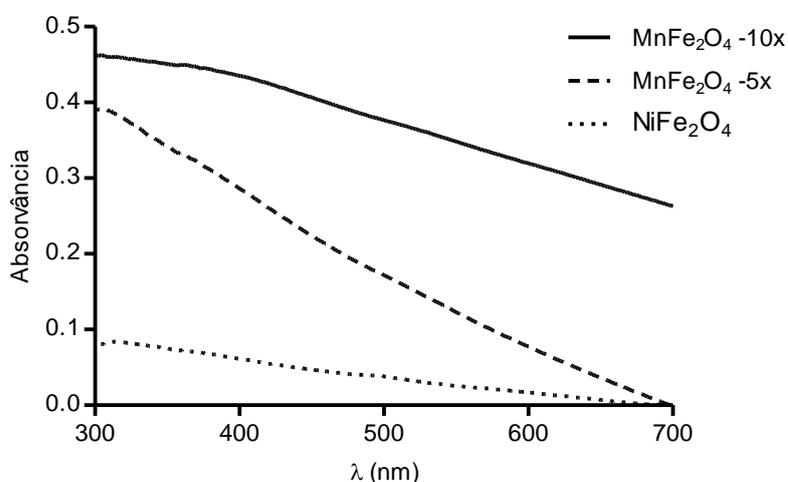


Figura 5.4. - Espectro de absorção das nanopartículas magnéticas de MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (5x, 10x) e de NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

Os espectros de absorção no UV-Visível das ferrites sintetizadas permitiram a determinação do hiato de energia através da construção de um gráfico de tipo *Tauc plot*, correspondente à equação 14.

$$(ah\nu)^n \propto (h\nu - E_g) \quad \text{equação 14}$$

onde  $a$  corresponde ao coeficiente de absorção que é proporcional à absorvância,  $n$  é um expoente dependente da natureza da transição, sendo que  $n=2$  para um material semiconductor direto e  $n=1/2$  para um semiconductor indireto. O valor de  $E_g$  é o hiato de energia.

Para o caso das nanopartículas de ferrite de manganês (5x e 10x), apenas foi possível obter uma relação linear quando  $n=1/2$  (Figura 5.5 e 5.6), sendo que este tipo de ferrites apresentam um comportamento de um semiconductor indireto. Isso já foi relatado por Rafique e colaboradores<sup>109</sup>, que reportaram um *bandgap* de 0,98 eV, um valor similar aos calculados neste trabalho, de 0,78 eV (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>- 5x) e 0,93 eV (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-10x).

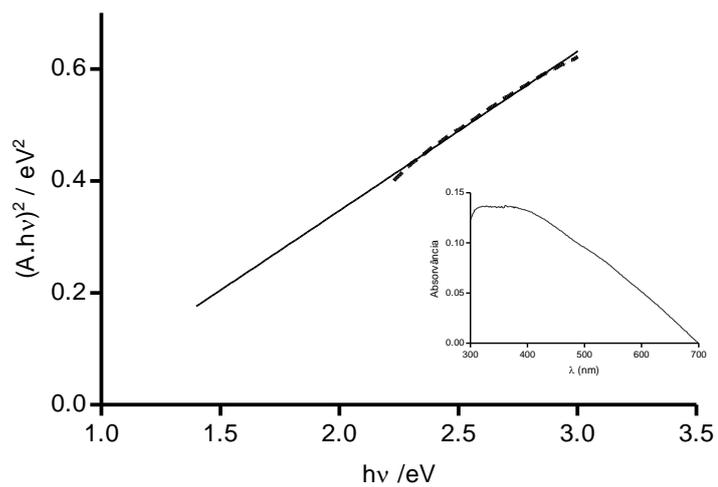


Figura 5.5 - Gráfico de  $Tauc$  para as nanopartículas de ferrite de manganês (5x). Inseto: espectro de absorção UV-Visível das nanopartículas dispersas em água.

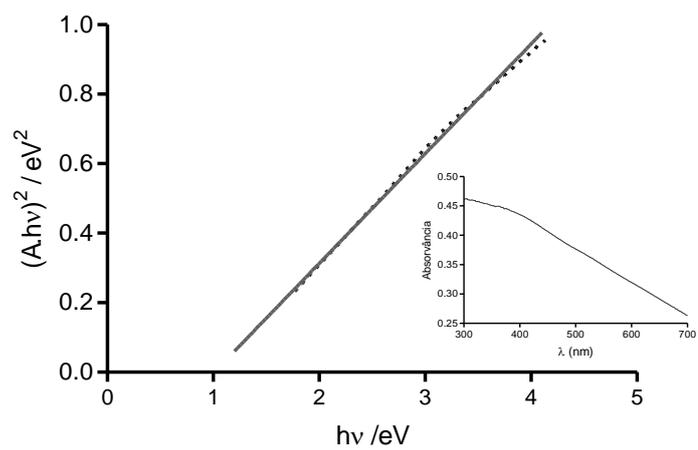


Figura 5.6 - Gráfico de  $Tauc$  para as nanopartículas de ferrite de manganês (10x). Inseto: espectro de absorção UV-Visível das nanopartículas dispersas em água.

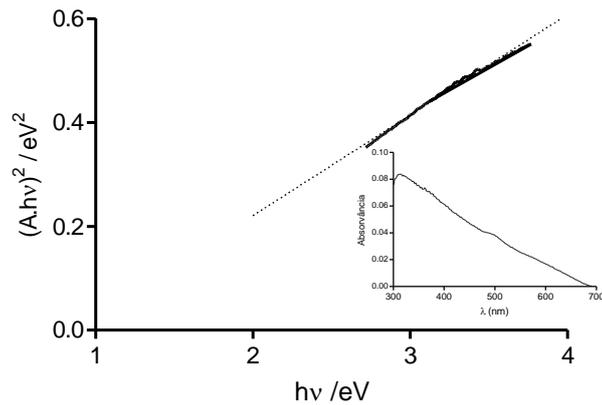


Figura 5.7 - Gráfico de  $Tauc$  para as nanopartículas de ferrite de níquel. Inserido: espectro de absorção UV-Visível das nanopartículas dispersas em água

Para o caso das nanopartículas de ferrite de níquel, também foi possível obter uma relação linear apenas para  $n=1/2$  (Figura 5.7), sendo que este tipo de ferrites apresentam um comportamento de um semiconductor indireto. Este resultado já foi anteriormente relatado por *Markus Meinert* e colaboradores, que reportaram um *bandgap* de 1,53 eV, um valor semelhante ao calculado neste trabalho, de 1,09 eV <sup>110</sup>.

### 5.1.3. Propriedades magnéticas

As nanopartículas produzidas são de interesse por apresentarem um comportamento superparamagnético, conforme descrito em <sup>111, 108</sup>. Assim, verificou-se uma resposta rápida dos dois tipos de nanopartículas quando colocadas na presença de um magneto, como se pode ver na Figura 5.8 (“campo magnético externo”).

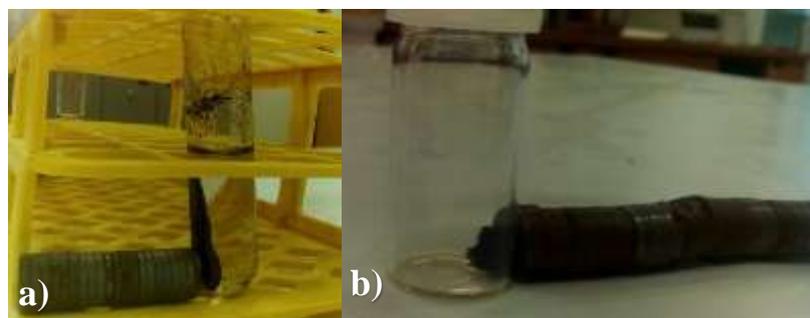


Figura. 5.8 – Comportamento das nanopartículas na presença de um campo magnético a)  $NiFe_2O_4$ , b)  $MnFe_2O_4$

Observando as dimensões das nanopartículas (tabela 5.1), podemos dizer que estas se encontram abaixo do diâmetro crítico necessário para apresentarem um comportamento superparamagnético (50nm). Dado alguns problemas externos durante o período de desenvolvimento laboratorial deste projeto, não foi possível a realização destes ensaios, o que não permitiu concluir com total certeza quanto às propriedades magnéticas das nanopartículas. No entanto, através de resultados anteriores já publicados da literatura, é possível afirmar que estas apresentam comportamento superparamagnético [111,108].

## 5.2. Nanopartículas de ouro – Seleção do método de síntese

Preparados os dois tipos de ferrites, seguiu-se com a preparação das nanopartículas de ouro para posterior funcionalização, de modo a obter as nanopartículas híbridas.

Inicialmente, foi proposta a síntese de nanopartículas de ouro pelo método de Martin <sup>112</sup>, dado este ser um método de síntese rápida e de se obter uma solução aquosa de nanopartículas de ouro com a superfície livre de ligandos apenas electrostaticamente pela adsorção de iões. Preparadas estas nanopartículas, procedeu-se ao processo de funcionalização, onde se juntou as nanopartículas magnéticas funcionalizadas com CDI e cisteamina, diretamente com as de nanopartículas de ouro pelo método de *Martin*.

Finalizado o processo de funcionalização, procedeu-se à análise das nanopartículas obtidas através de espectroscopia UV-Visível, onde era esperado obter nanopartículas com uma resposta magnética e que apresentassem uma banda plasmónica referente às nanopartículas de ouro. Este resultado encontra-se representado na Figura 5.9.

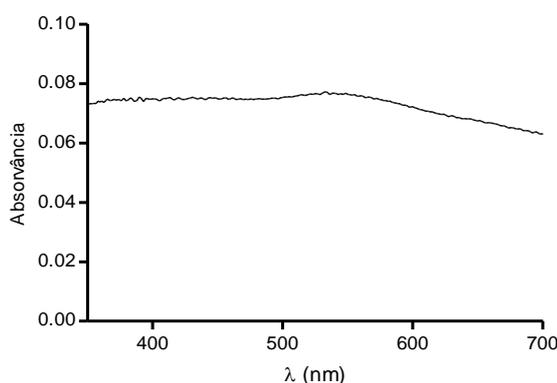


Figura 5.9 - Nanopartículas de ferrite de manganês decoradas com nanopartículas de ouro (*Martin Method*)

Observando a figura 5.9, é possível ver uma ligeira banda na zona característica das nanopartículas de ouro (520-580nm), um pouco alargada e pouco definida. Este resultado mostrou-se pouco satisfatório, uma vez que a banda não está muito bem formada e apresenta uma absorvância muito baixa, para além de que não foi satisfatória a resposta magnética das nanopartículas obtidas nesta tentativa inicial. Este procedimento foi também excluído visto o processo realizado não ser reprodutível, sendo que esta falta de reprodutibilidade pode ser justificada pelo facto de as nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de Martin apresentarem alguma instabilidade.

Numa tentativa de melhorar este processo, e jogar um pouco com a instabilidade deste tipo de nanopartículas, tentou-se adicionar cloreto de sódio (NaCl) com o objetivo de precipitar as nanopartículas de ouro em solução, e verificar se algumas delas apresentavam resposta a um campo magnético externo aplicado, sendo esse resultado indicativo de um possível acoplamento. Tal não aconteceu, o que levou a uma nova alteração no processo de síntese das nanopartículas de ouro.

Essa alteração baseou-se na realização de um processo de transferência de fase descrito na literatura. A estabilidade de partículas carregadas em soluções aquosas é um dos parâmetros mais estudado para este tipo de nanopartículas, pois uma boa estabilidade garante uma maior aplicabilidade. Este fator depende do equilíbrio das forças atrativas e de repulsão eletrostática e de *van der Waals* entre as partículas carregadas <sup>113</sup>. Assim, torna-se óbvio que a adição de iões pode diminuir a repulsão eletrostática e provocar a agregação de nanopartículas. No entanto, em meios orgânicos, normalmente são as repulsões estereoquímicas entre as moléculas orgânicas que protegem a superfície do ouro e que assim impedem a agregação das nanopartículas e é geralmente assumido que essas dispersões são estáveis contra o fenómeno de agregação <sup>114</sup>.

Foi o que se tentou realizar, procedendo-se a uma transferência de fase, em que as nanopartículas de ouro que estavam em fase aquosa passaram para clorofórmio. Esta transferência encontra-se representada na figura 5.10. O método encontra-se descrito em <sup>115</sup>.

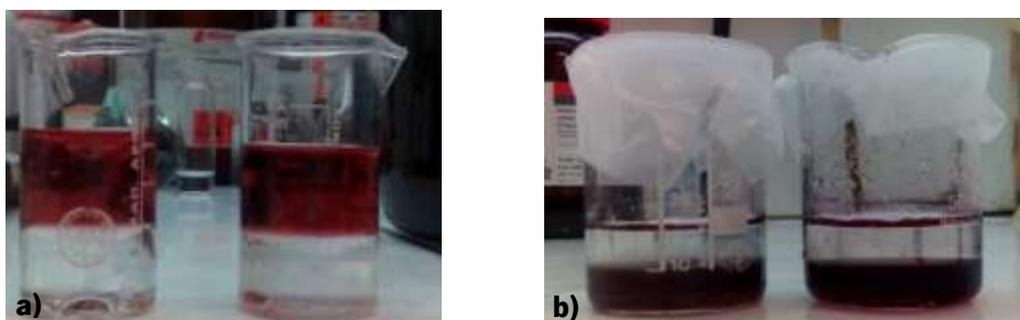


Figura 5.10 - Processo de transferência de fase da solução aquosa de nanopartículas de ouro preparadas pelo método de *Martin*. a) Solução aquosa de ouro de cor rubi e solução de clorofórmio com Octadecilamina (ODA); b) Solução de ouro em clorofórmio de cor escura e água após transferência de fase.

Esta nova solução de nanopartículas, agora em clorofórmio, foi então utilizada e realizou-se uma nova funcionalização. Neste caso, após a separação das nanopartículas para clorofórmio com ODA evaporou-se o clorofórmio e adicionou-se etanol, observou-se que a solução de ouro, após adição de etanol ficou ligeiramente mais clara e um pouco turva. Esta solução de ouro foi adicionada às nanopartículas magnéticas previamente funcionalizadas com CDI e cisteamina, também em etanol. Finalizado o acoplamento procedeu-se ao isolamento das nanopartículas híbridas da solução, onde se fez sucessivas centrifugações na tentativa de sedimentar as mesmas, de forma a facilitar a decantação magnética. Observou-se que, após algumas centrifugações as nanopartículas não respondiam ao campo magnético aplicado (magneto). Este resultado pode ser justificado por uma possível elevada associação de nanopartículas de ouro que levou à perda de magnetização das nanopartículas. Não deixou de ser um resultado interessante possível de explorar, no entanto, como era de interesse manter as propriedades magnéticas procedeu-se com outra tentativa. O resultado obtido para este processo encontra-se representado na figura 5.11.

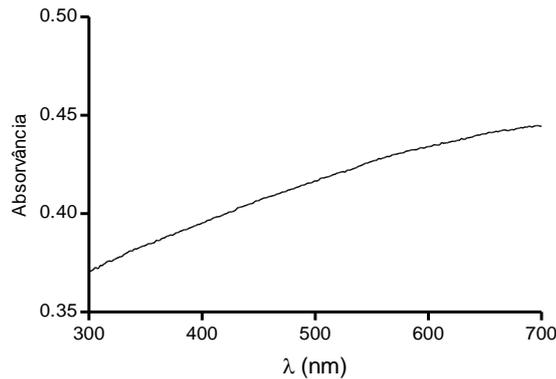


Figura. 5.11. Espectro de absorção de nanopartículas de ferrite de manganês decoradas com uma solução nanopartículas de ouro preparadas pelo método de Martin, após o processo de transferência de fase.

O resultado representado na figura 5.11. é indicativo de uma possível agregação das nanopartículas de ouro, visto que se obtém uma banda crescente com o aumento de comprimento de onda e não é notória qualquer banda na zona característica do plasmão de ouro. É possível que a utilização de ODA em excesso, tenha originado possíveis alterações do meio, nomeadamente pH o que terá originado uma possível agregação.

Dado este resultado, e de acordo com o reportado na literatura <sup>112</sup>, inferiu-se que, uma vez tendo nanopartículas de ouro em clorofórmio, e sendo estas mais estáveis que em água, seria de manter este processo de transferência de fase. No entanto, seria pertinente tentar proteger estas nanopartículas, de forma a garantir uma maior estabilidade. Assim, realizou-se um revestimento com GTMA (sal de tetrametilamónio de glutatona). O processo baseou-se numa 'troca do agente de revestimento' das nanopartículas, e envolveu a substituição do ODA por agentes bifuncionais (GTMA), que possuem uma porção de ancoragem à superfície para se ligar à superfície inorgânica das nanopartículas de ouro em clorofórmio, e um grupo final hidrofílico oposto (por exemplo, carboxilato para alcançar a solubilidade em água).

A transferência direta de nanopartículas de ouro estabilizadas com ODA em clorofórmio para água (ao misturar estas com uma solução aquosa de GTMA), não foi bem sucedida. As partículas sofreram agregação na interface entre o clorofórmio e a água, em vez de se transferirem para a fase aquosa. Como a troca entre ODA e GTMA só poderia ocorrer na interface entre o clorofórmio e a água, pensou-se que a falha poderia ter sido causada devido a um possível mau contato entre as duas fases, devido à falta de solubilidade mútua, resultado esse também obtido por *Yifeng Wei* e colaboradores em <sup>116</sup>.

Assim, optou-se por usar o mesmo método utilizado por estes investigadores, onde se utilizou uma solução de GTMA em metanol em vez de água, pois o metanol e o clorofórmio são solventes miscíveis. A adição gota a gota de GTMA em metanol levou à precipitação das nanopartículas de ouro, o que é indicativo de que o ODA sofreu uma deslocação pelo GTMA. Uma adição em excesso de GTMA em metanol leva a um aumento de polaridade, o que permite que a troca de agentes seja completa.

Realizada esta “proteção”, foi feita uma nova funcionalização, onde se obteve o espetro representado na figura 5.12. A funcionalização, para este caso começou pelo isolamento das nanopartículas de ouro que precipitaram, foi removido o solvente e estas nanopartículas de ouro foram secas na estufa para posterior utilização. As nanopartículas magnéticas foram funcionalizadas com CDI e cisteamina em metanol. Realizada esta funcionalização procedeu-se ao acoplamento onde a solução seca de nanopartículas de ouro foi dispersa em metanol e adicionada às nanopartículas magnéticas funcionalizadas com CDI e cisteamina.

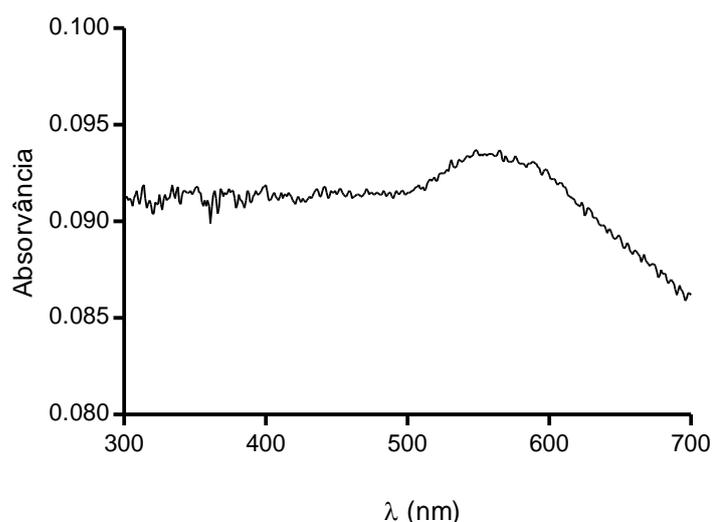


Figura 5.12 - Nanopartículas de Ferrite de Manganês decoradas com nanopartículas de ouro, com estas protegidas com GTMA.

Analisando o espetro representado na figura 5.12, é notória a banda plasmónica característica das nanopartículas de ouro (520-580nm). Este resultado também se mostrou satisfatório, pois quando comparado com o resultado representado na figura 5.11, observa-se uma banda plasmónica mais bem definida. Este resultado, contudo, apresenta de igual modo uma absorvância baixa, indicativa de baixa concentração de ouro. Através deste resultado e com recurso à literatura, surgiu-se outro método de síntese de nanopartículas de ouro, o método de *Brust*

*Schiffrin*.<sup>98</sup> Neste método, as nanopartículas de ouro sintetizadas encontram-se em tolueno e apresentam uma camada protetora de grupos (*tetraoctylammonium bromide*). Este método mostrou-se interessante, uma vez que as nanopartículas de ouro obtidas apresentam mais estabilidade devido aos grupos presentes, o que permite um maior manuseamento destes, pois são mais resistentes a mudanças externas (pH, temperatura, meio envolvente). O método de síntese encontra-se descrito na secção 4.2. Sintetizadas as nanopartículas de ouro com recurso a este método, procedeu-se ao acoplamento destas com as nanopartículas magnéticas de modo análogo ao utilizados para as nanopartículas de Au estabilizadas por ODA em clorofórmio, tendo-se obtido o espectro representado na figura 5.13.

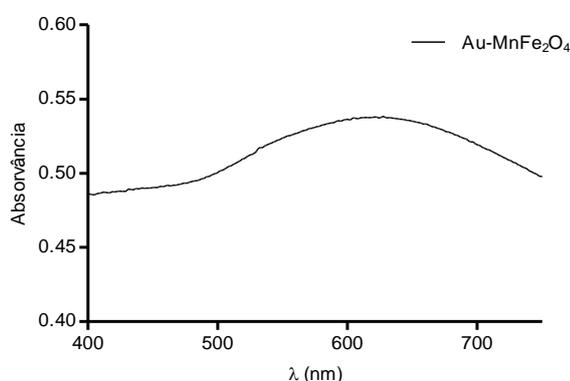


Figura 5.13 - Nanopartículas de ferrite de manganês decoradas com nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de *Brust Schiffrin*.

Dado o tempo despendido na procura do melhor método de síntese das nanopartículas de ouro e com base na qualidade dos resultados obtidos, bem como na reprodutibilidade dos mesmos, optou-se por seleccionar o método de *Brust Schiffrin* para a síntese de nanopartículas de ouro. Após esta seleção, seguiu-se com o acoplamento das nanopartículas de ouro às nanopartículas de ferrite de níquel, resultado esse apresentado na secção 5.3.1.

### 5.3. Caracterização das nanopartículas de ouro (*Brust Shiffrin Method*)

Após se ter seleccionado o método de síntese de nanopartículas de ouro (Figura 5.14), estas foram também caracterizadas por espectroscopia de absorção UV-Visível. Na figura 5.15, apresentam-se os espectros de absorção das nanopartículas de ouro com diferentes concentrações.

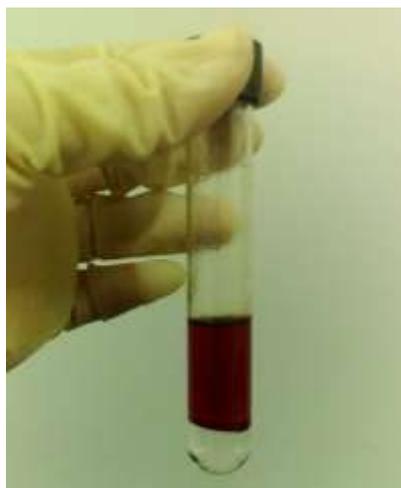


Figura 5.14 - Solução das nanopartículas de ouro preparadas pelo método de *Brust Schiffrin*.

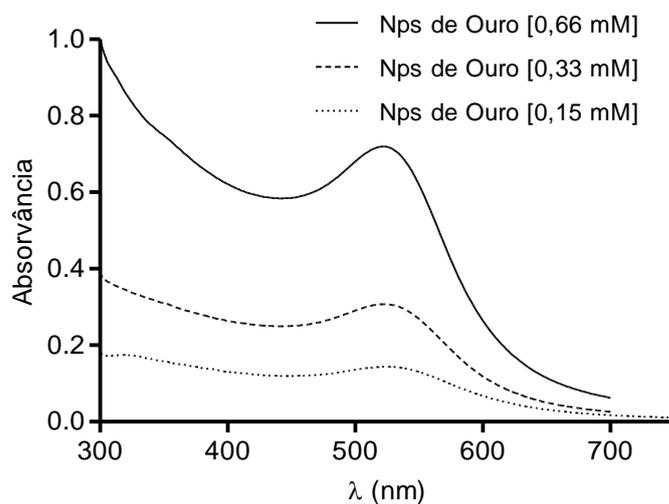


Figura 5.15 - Espectro de absorção de soluções de nanopartículas de ouro, preparadas pelo método de *Brust Schiffrin* de diferentes concentrações.

Pelos espectros das nanopartículas de ouro, representados na figura 5.15, observa-se que estas nanopartículas apresentam uma banda plasmônica onde é visível a presença das bandas características das nanopartículas de ouro esféricas (520-540 nm). Assim, conclui-se que as nanopartículas apresentam forma esférica e diâmetro entre os 2 e os 6 nm <sup>117</sup>. É também visível que a intensidade da banda do plasmão é proporcional à sua concentração. É importante salientar que estas nanopartículas, em diferentes meios, podem sofrer processos de agregação. O processo de agregação pode também ser observado através dos espectros de absorção, visto que uma

agregação origina um alargamento da banda plasmónica para a zona do vermelho (*red shift*), que pode, em alguns casos, desaparecer.

### 5.3.1. Espectros de absorção no UV-Visível

De forma a verificar a ligação das nanopartículas de ouro às nanopartículas magnéticas, recorreu-se à técnica de espectroscopia de absorção UV-Visível. Na figura 5.16 apresentam-se os espectros de absorção das várias nanopartículas decoradas com nanopartículas de ouro.

A figura 5.16 mostra os espectros das nanopartículas de  $MnFe_2O_4$ , e de  $NiFe_2O_4$  após o processo de funcionalização e acoplamento com ouro.

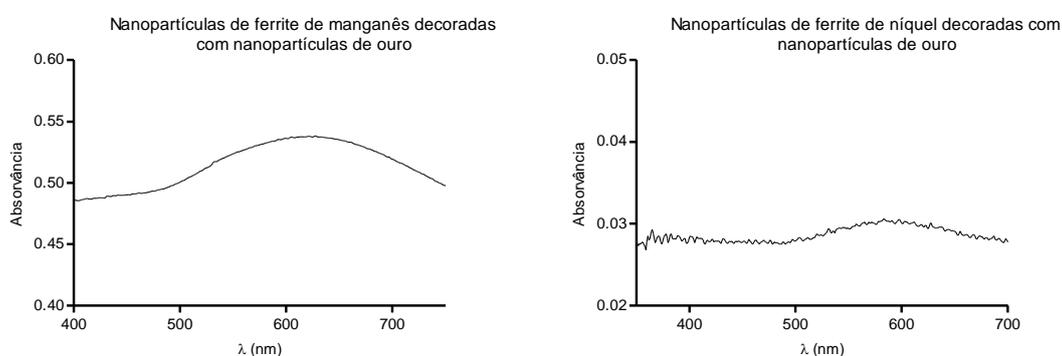


Figura 5.16 – Espectros de absorção das nanopartículas decoradas com nanopartículas de ouro.

Para este tipo de nanopartículas preparadas, é notório um desvio do plasmão característico do ouro para comprimentos de onda superiores (580-600 nm). Este comportamento pode significar uma maior aproximação entre as partículas de ouro, uma possível agregação ou uma camada de ouro espessa [118, 119].

### 5.3.2. Monitorização do crescimento da camada de ouro com hidroxilamina e nanopartículas de ouro

Como já foi referido na secção 4.5, o processo de crescimento do ouro nas nanopartículas de ferrite de manganês decoradas com nanopartículas de ouro e nas nanopartículas de ferrite de níquel decoradas com nanopartículas de ouro, por ação da hidroxilamina, foi monitorizado através de espectroscopia UV-Visível. Esta monitorização permitiu observar o aumento da banda plasmónica relativa ao ouro ao longo do tempo, após a adição de hidroxilamina, iões de ouro e nanopartículas magnéticas decoradas com nanopartículas de ouro.

Os gráficos representados nas figuras 5.17 e 5.18 mostram esse crescimento, bem como um controlo onde apenas está presente ouro e hidroxilamina, e em que não se observa o aumento do plasmão referente ao ouro, para as nanopartículas de ferrite de manganês decoradas com nanopartículas de ouro e nanopartículas de ferrite de níquel decoradas com nanopartículas de ouro, respetivamente.

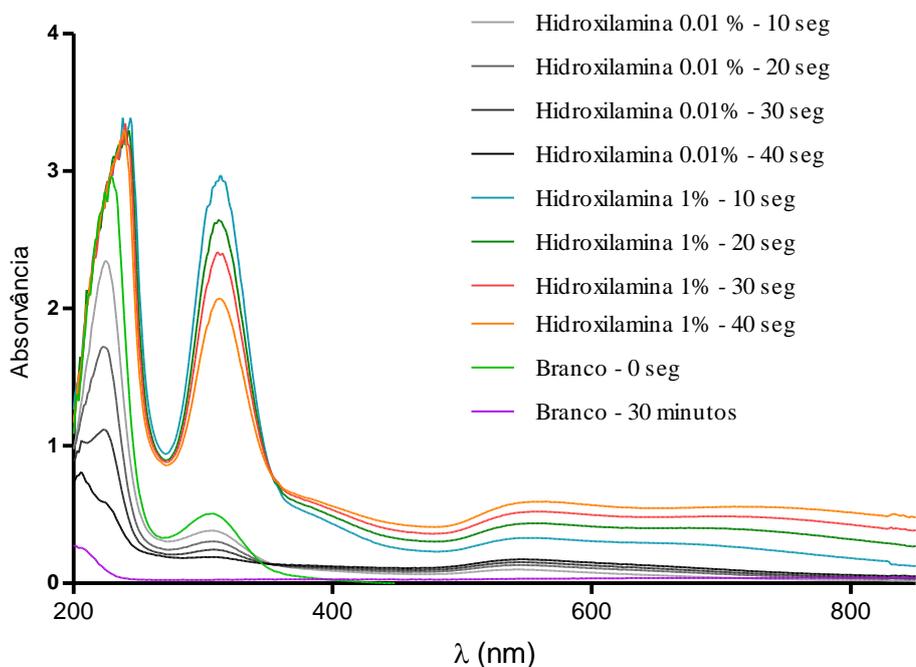


Figura 5.17 - Monitorização do crescimento das nanopartículas de ouro em torno das nanopartículas magnéticas de  $MnFe_2O_4$  decoradas com nanopartículas de ouro, por ação da hidroxilamina.

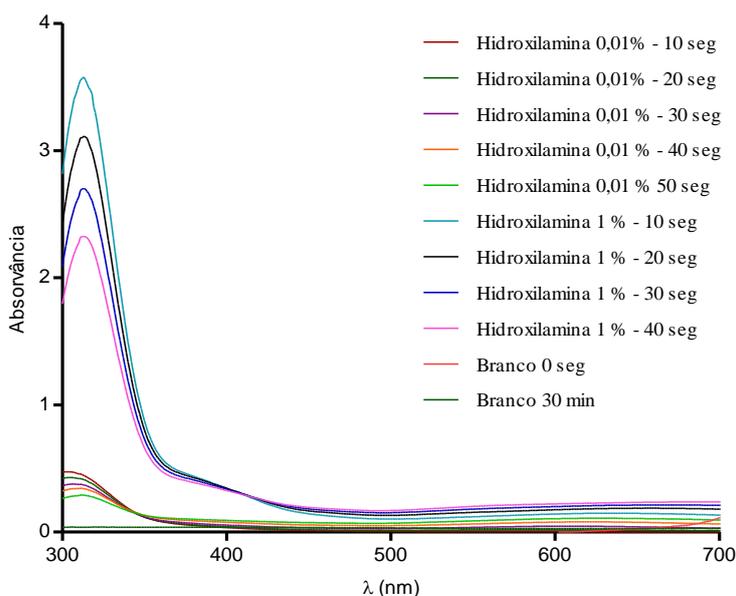


Figura. 5.18 - Monitorização do crescimento das nanopartículas de ouro em torno das nanopartículas magnéticas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  decoradas com ouro por ação da hidroxilamina

Realizado este crescimento, as nanopartículas obtidas foram também caracterizadas por espectroscopia de absorção UV-Visível. Os espectros obtidos encontram-se na figura 5.19.

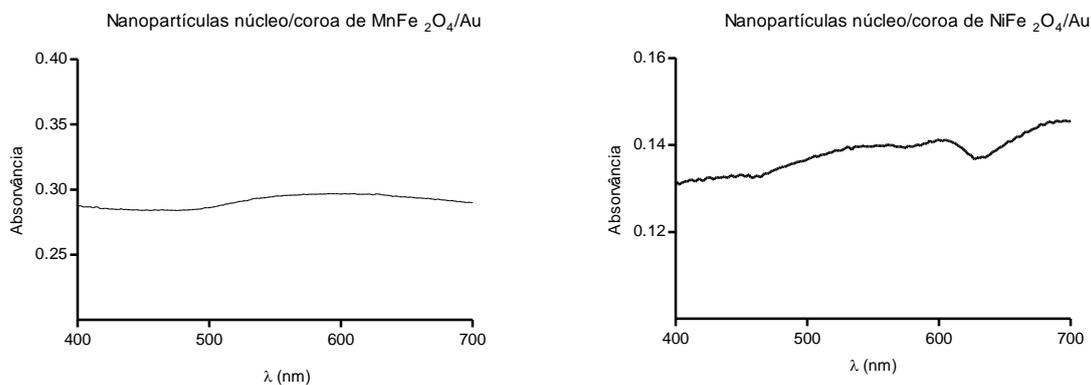


Figura 5.19 – Espectros de absorção das nanopartículas núcleo/corça.

Comparando estes resultados com os resultados obtidos para as nanopartículas decoradas, observa-se um alargamento de ambas as bandas plasmónicas referentes ao ouro. Este alargamento poderá dever-se ao facto de, neste tipo de nanopartículas (*core-shell*), as nanopartículas de ouro estarem em forma de corça. Este desvio da banda plasmónica do ouro foi de igual modo observado por *Umut* e colaboradores para nanopartículas de núcleo de ferrite e corça de ouro.<sup>120</sup>

#### 5.4. Ensaio de Irradiação e de Temperatura

De forma a tirar conclusões quanto ao comportamento dos sistemas produzidos em relação a variações de tempo de irradiação, foram realizados ensaios em que se avaliou o comportamento dos diferentes sistemas em função da temperatura e também ensaios de irradiação, onde o sistema completo foi irradiado com luz durante um determinado tempo. Esta monitorização foi realizada com recurso ao espectralfluorímetro SPEX 320 Fluorolog® 2.

Para isso, foram realizados 5 testes diferentes:

- a) Sistemas completos (magnetolipossomas compostos por **nanopartículas híbridas**) – Ensaio de irradiação
- b) Sistemas completos (magnetolipossomas compostos por **nanopartículas híbridas**) – Ensaio de temperatura

- c) Sistemas na ausência de ouro (magnetolipossomas compostos por **nanopartículas magnéticas**) – Ensaio de irradiação.
- d) Sistemas na ausência de nanopartículas (**apenas os lipossomas, marcados com rodamina**) – Ensaio de Temperatura
- e) Sistemas na ausência de nanopartículas (**apenas os lipossomas marcados**) – Ensaio de irradiação.

Nos ensaios a); c) e e) foram medidos os espectros de fluorescência da rodamina em função do tempo de irradiação, enquanto nos ensaios b) e d), foram medidos os espectros de fluorescência em função do aumento de temperatura. Estes foram realizados com o objetivo de compreender o comportamento dos sistemas quando há um aumento gradual de temperatura e comparar estes resultados com os ensaios de irradiação, bem como perceber as diferenças na presença e na ausência de nanopartículas magnéticas, e ainda compreender qual o efeito plasmônico que o ouro oferece a estes sistemas.

a) Sistemas completos (magnetolipossomas compostos por **nanopartículas híbridas**) –  
Ensaio de irradiação

As várias nanopartículas sintetizadas foram cobertas por uma camada de DOPE marcado com rodamina e uma camada de DOPG numa razão de 1:4. Após esta preparação, todos os sistemas foram submetidos a ensaios de irradiação. Nas condições do ensaio, já expostas na secção 4.10.1., foi registada a intensidade de fluorescência da rodamina ao longo do tempo de irradiação. Foi também registada a o aumento da temperatura da solução ao longo do tempo de irradiação, sendo que a temperatura das soluções variou em média 3 graus.

O ouro, ao sofrer excitação, pode levar a alguns comportamentos característicos deste tipo de materiais:

- Um aquecimento local induzido pelo ouro, que se propagará ao longo da solução por difusão de calor e que, por sua vez, irá originar uma inibição da fluorescência da rodamina através do aumento da eficácia dos processos não radiativos de desexcitação;
- Um aumento do rendimento quântico de fluorescência da rodamina por efeito plasmónico, correspondente ao aumento do campo elétrico na vizinhança das partículas de ouro;
- Existir a possibilidade de ocorrer a inibição da fluorescência da rodamina por transferência de energia eletrónica ou transferência de eletrão a partir da rodamina excitada, caso esteja perto da superfície de ouro (a menos de 10 nm), não implicando este processo a excitação do ouro.

Na figura 5.20 estão presentes os gráficos referentes aos espectros de fluorescência da rodamina presente nos quatro tipos de magnetolipossomas para os diferentes determinados tempos de irradiação. É notório que nos quatro tipos de SMLs há uma diminuição da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de irradiação. De forma a ser mais perceptível esta análise, a partir destes espectros de fluorescência tirou-se o máximo de intensidade de fluorescência para cada espectro e converteu-se estes valores em percentagem da intensidade de fluorescência da rodamina em função do tempo, quando irradiados com luz de comprimento de onda superior a 600 nm. Obtiveram se assim os gráficos representados na figura 5.21.

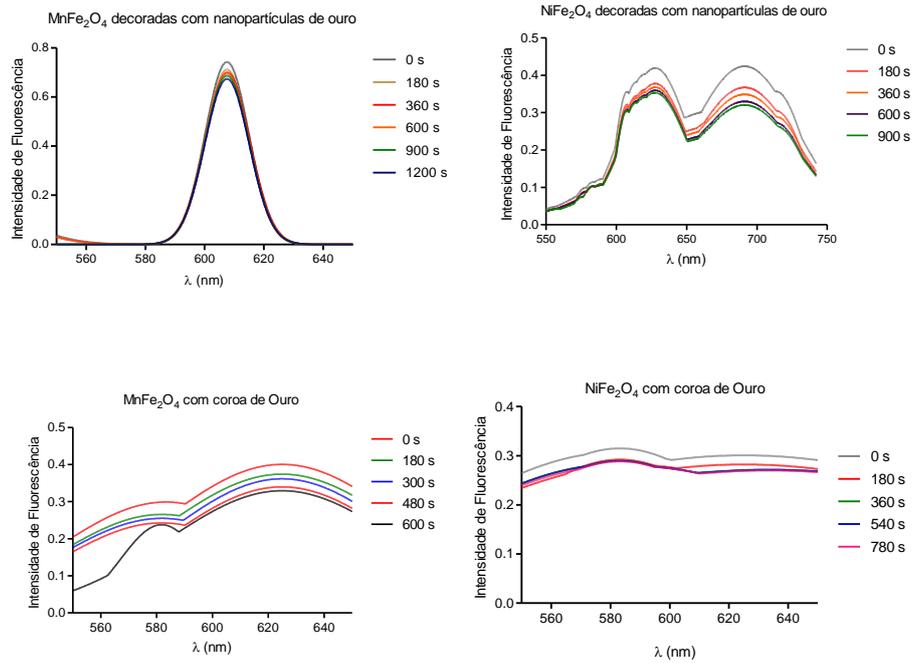


Figura 5.20 – Intensidade de fluorescência da rodamina dos diferentes sistemas preparados ao longo do tempo de irradiação.  $\lambda_{em}=540$  nm

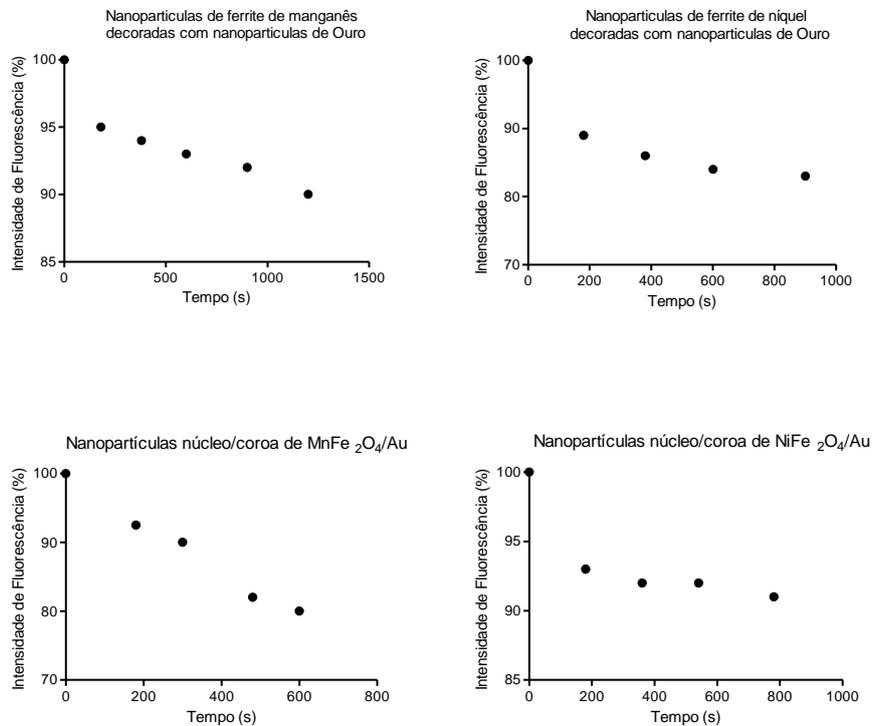


Figura 5.21 - Ensaio de Irradiação dos diferentes sistemas preparados. Percentagem da intensidade de fluorescência da rodamina em função do tempo de irradiação.

Observa-se que, em todos os tipos de nanopartículas, se verifica uma diminuição da percentagem da intensidade de fluorescência da rodamina ao longo do tempo de irradiação, sendo esta diminuição mais visível nas nanopartículas núcleo/coroa de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{Au}$ . Por esse motivo, como forma de comparação, foram escolhidos os dois sistemas compostos pelas nanopartículas de ferrite de manganês para posteriores ensaios com a incorporação de potenciais fármacos.

b) Sistemas completos (Magnetolipossomas compostos por **nanopartículas híbridas**) –  
Ensaio de temperatura

De forma a verificar o efeito da irradiação nos sistemas sintetizados (SMLs), estes foram submetidos a ensaios onde apenas se alterou a temperatura ao longo do tempo. Pretendia-se observar o comportamento dos SMLs quando aplicadas temperaturas crescentes. Verificou-se, pelos gráficos da figura 5.22, que, com o aumento da temperatura, há uma diminuição do espectro de fluorescência da rodamina em todos os sistemas, o que era de esperar, pois há um aumento dos processos não radiativos colisionais. Este ensaio serviu para verificar que, com o efeito da temperatura, ocorre uma diminuição da intensidade de fluorescência da rodamina e, quando comparado com os ensaios de irradiação, o comportamento é idêntico. Isto indica que, com a irradiação, há um aumento de temperatura local, que leva a uma diminuição no espectro de fluorescência. Este ensaio pode assim dizer-se que funcionou como **controlo positivo**.

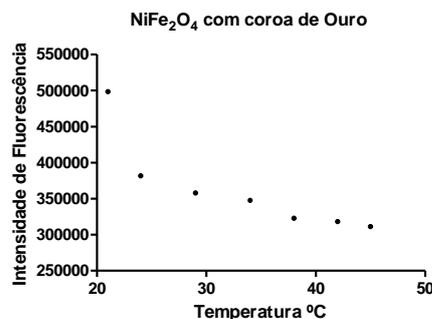
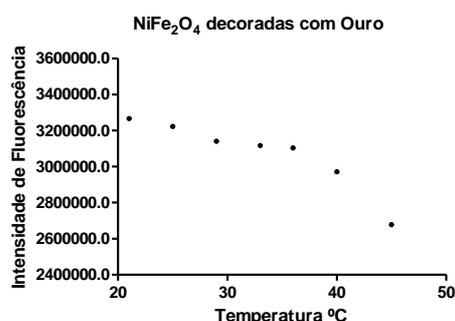
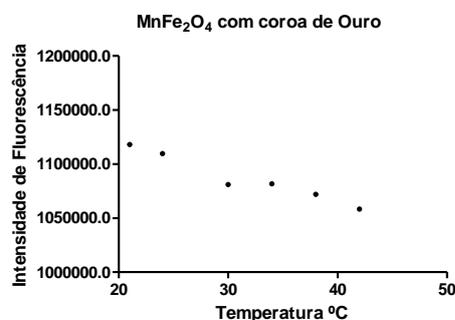
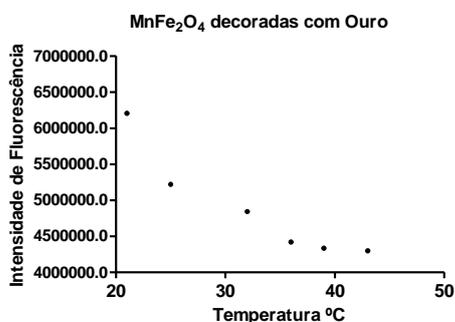


Figura 5.22 – Intensidade de fluorescência da rodamina em função da temperatura dos SMLs – Controlo Positivo  
 $\lambda_{exc}=540$  nm

Como referido, verifica-se que, em todos os sistemas, ocorre uma diminuição da intensidade de fluorescência referente à rodamina ao longo do aumento da temperatura. Desta forma, quando se comparam estes resultados com os ensaios de irradiação (onde se verifica essa mesma diminuição apenas com a incidência de luz), obtém-se a indicação de que o ouro é responsável pelo aumento da temperatura local, que é confirmado através da diminuição da intensidade de fluorescência.

A partir deste gráfico, e através da equação de *Arrhenius*, é possível determinar a temperatura obtida através de cada ensaio de irradiação.

$$k_{nr} = k_o e^{\frac{E_a}{RT}} \quad \text{equação 15}$$

$$k = A e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \text{equação 16}$$

Onde  $k_{nr}$  é constante de velocidade dos processos não radiativos;  $k_o$  é constante pré-exponencial;  $E_a$  é a Energia de ativação, R é a constante dos gases perfeitos e T é a temperatura em K.

Uma vez que:

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} \Rightarrow \frac{1}{\phi_F} - 1 = \frac{k_{nr}}{k_F} \quad \text{equação 17}$$

e usando como referência o rendimento quântico de fluorescência à temperatura ambiente tem se :

$$\frac{\phi_F^0}{\phi_F} - \phi_F^0 = \phi_F^0 \frac{k_{nr}}{k_F} \quad \text{equação 18}$$

ou seja:

$$\frac{I_F^0}{I_F} - \phi_F^0 = \phi_F^0 \frac{k_{nr}}{k_F} \quad \text{equação 19}$$

em que  $I_F$  representa a intensidade de fluorescência a um dado comprimento de onda.

Assim, chega-se a que:

$$\frac{I_F^0}{I_F} - \phi_F^0 = \phi_F^0 \frac{k_o}{k_F} e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \text{equação 20}$$

Considerando, como primeira aproximação, que o rendimento quântico de fluorescência da rodamina junto à superfície do ouro é pequeno será:

$$\frac{I_F^0}{I_F} \approx \phi_F^0 \frac{k_o}{k_F} e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \text{equação 19}$$

assim, a representação de  $\text{Ln} \frac{I_F^0}{I_F}$  em função de  $\frac{1}{T}$  deverá ser linear.

Os gráficos da razão de intensidades de fluorescência em função da temperatura foram convertidos em gráficos do inverso da temperatura em função de  $\text{Ln} \left( \frac{I_F^0}{I_F} \right)$ . Os resultados para os quatro tipos de nanopartículas estão resumidos na figura 5.23 onde está representado  $\text{Ln} \left( \frac{I_F^0}{I_F} \right)$  em função de  $1/T$ . Os resultados representados na figura 5.21 foram convertidos na temperatura local obtida, estes resultados encontram-se sintetizados na tabela 5.2.

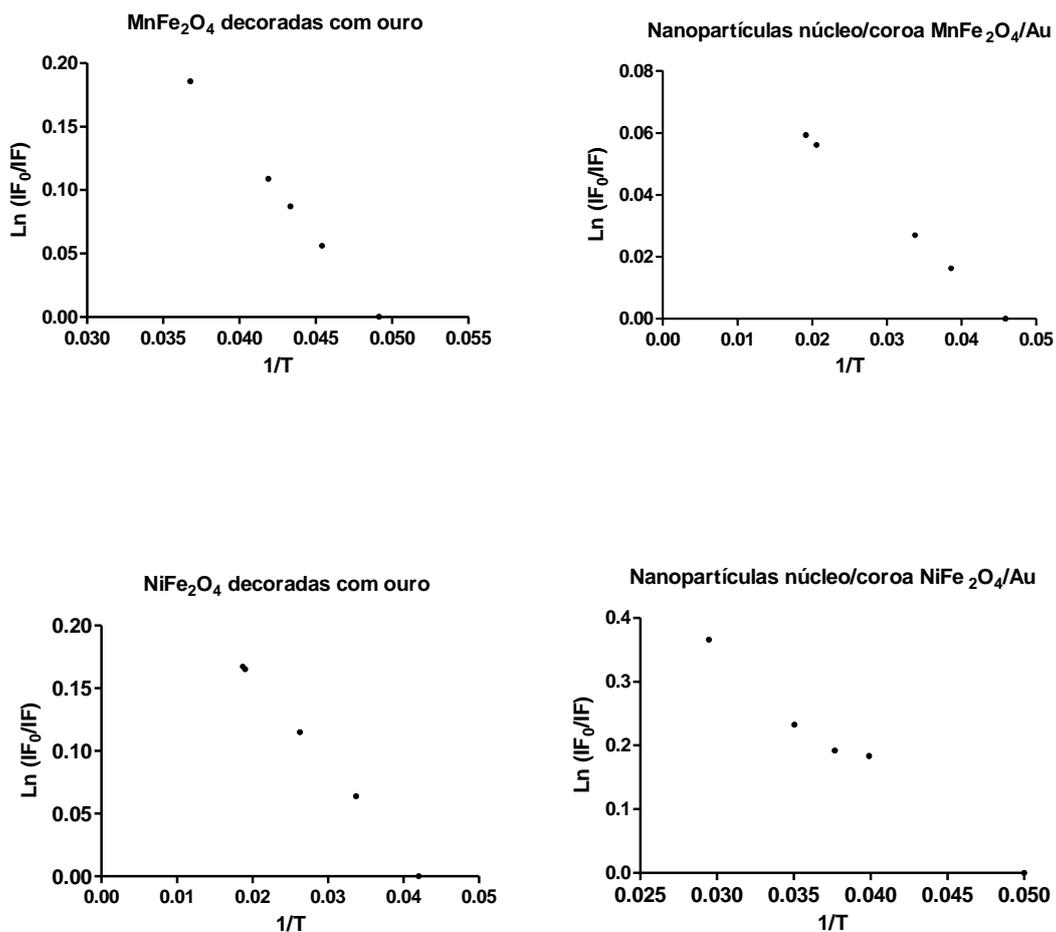


Figura 5.23 –Logaritmo da razão entre a intensidade de fluorescência no tempo zero e a intensidade de fluorescência em diferentes tempos em função do inverso da temperatura.

Tabela 5.2 - Temperatura obtida nos diferentes sistemas sintetizados através dos ensaios de irradiação

<b>Au-MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b> <b>Decoradas</b>	<b>Au-MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b> <b>Núcleo/coroa</b>	<b>Au-NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b> <b>Decoradas</b>	<b>Au-NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b> <b>Núcleo/coroa</b>
Temperatura (°C)			
20,3	21,7	23,2	19,8
22,03	25,9	29,63	25,0
23,09	29,52	37,9	26,5
23,90	48,52	52,36	28,5
27,21	52,15	53,26	33,9

Analisando a tabela 5.2, observa-se que em todos os sistemas ocorre um aumento de temperatura bastante significativo, sendo este mais acentuado nos sistemas compostos por nanopartículas núcleo/coroa de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{Au}$  e nanopartículas decoradas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4\text{-Au}$ .

- c) Sistemas na ausência de ouro (nanopartículas magnéticas incorporadas nos lipossomas)  
– Ensaio de Irradiação

Como já referido, o ouro apresenta um efeito plasmônico <sup>121</sup> e tem sido ultimamente investigado em ensaios de fototerapia. Desta forma, e com o objetivo de concluir quando ao efeito do ouro, o comportamento dos sistemas preparados foi avaliado na ausência de ouro. Na figura 5.24 está exposto o comportamento dos SMLs compostos por nanopartículas de ferrite de manganês e dos SMLs compostos por ferrites de níquel, ambos na ausência de ouro, quando sofrem irradiação.

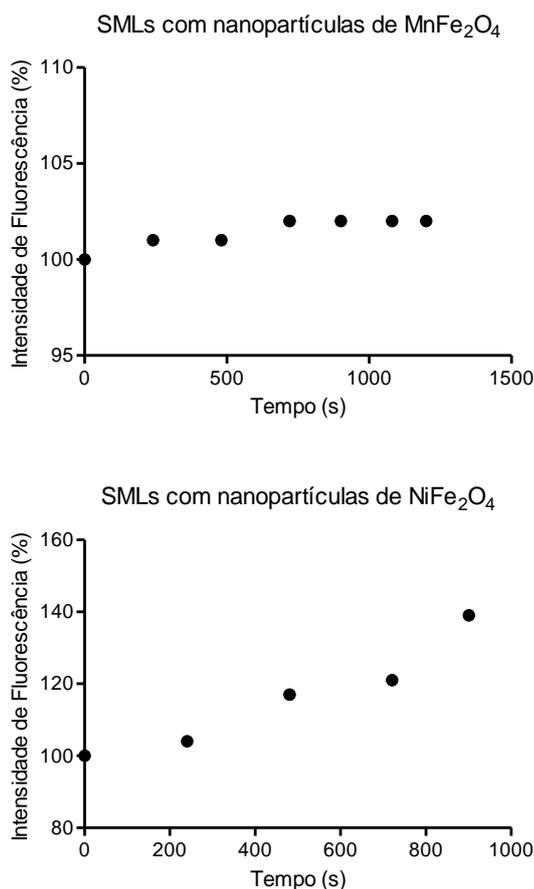


Figura 5.24 – Intensidade de fluorescência da rodamina (%) em função do tempo de irradiação para os sistemas compostos por nanopartículas de ferrite de manganês e por nanopartículas de ferrite de níquel - **Controlo negativo**

Observa-se que, no caso dos SMLs baseados em nanopartículas de ferrite de manganês, a intensidade de fluorescência da rodamina mantém-se praticamente constante, o que prova (quando se compara o mesmo ensaio na presença do ouro) que o efeito plasmônico do ouro provoca o aumento da temperatura do sistema, visível através da diminuição da intensidade de fluorescência da rodamina. Quanto aos sistemas compostos por nanopartículas de níquel, observa-se um aumento ao longo do tempo. Este resultado é inesperado e, uma vez que não ocorrem variações da forma do espectro (figura 5.25), poder-se-á dever a um afastamento da rodamina (Rh) da superfície das partículas de  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  com um conseqüente aumento do seu rendimento quântico de fluorescência. Isto poderá ocorrer por um enfraquecimento fotoinduzido da possível interação do grupo NH existente na sonda Rh-DOPE (ver estrutura na tabela 4.5) e os átomos de Ni da ferrite.

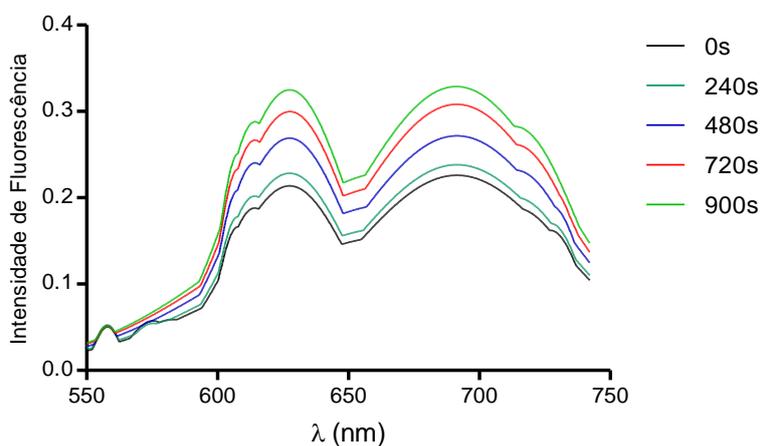


Figura 5.25 – Intensidade de fluorescência da rodamina em função do tempo de irradiação para os sistemas compostos por nanopartículas de ferrite de níquel

- d) Sistemas na ausência de nanopartículas (apenas os lipossomas marcados com rodamina)  
– Ensaio de Temperatura

Por fim, prepararam-se também lipossomas (marcados com rodamina) na ausência de nanopartículas, de forma a concluir quanto ao efeito das nanopartículas, nomeadamente a nível de irradiação. Na figura 5.26, estão representados os resultados relativos aos ensaios de temperatura realizados apenas com os lipossomas marcados com rodamina.

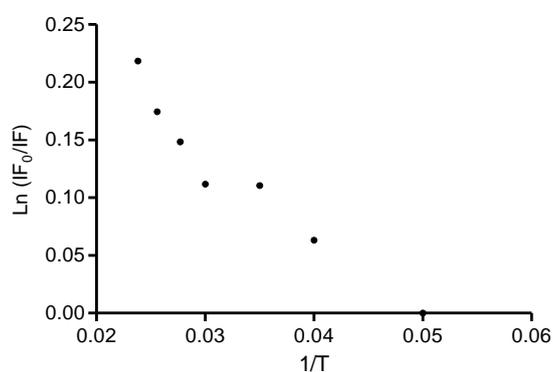
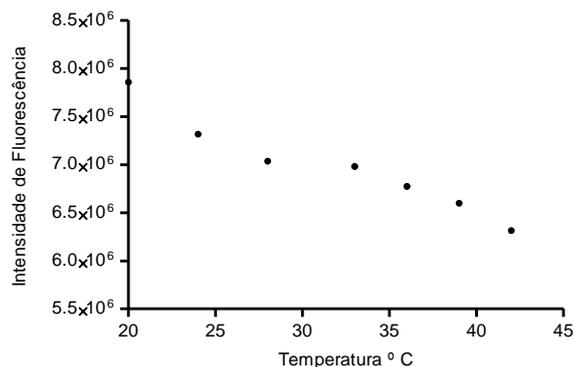


Figura 5.26 – Intensidade de fluorescência da rodamina em função da temperatura dos sistemas, compostos apenas por lipossomas marcados com rodamina e respetiva representação do logaritmo da razão entre a intensidade de fluorescência no tempo zero e a intensidade de fluorescência em diferentes tempos em função do inverso da temperatura.

Observa-se que, com o aumento da temperatura, a intensidade de fluorescência da rodamina diminui, o que é justificado pelo aumento da eficiência dos processos não radiativos. Sendo a curva semelhante ao obtido para os SMLs. Conclui-se que, na gama de temperaturas em estudo, não ocorrem variações significativas da camada lipídica que afetem a emissão de fluorescência do Rh-DOPE.

e) Sistemas na ausência de nanopartículas (apenas os lipossomas marcados com rodamina)

– Ensaio de Irradiação

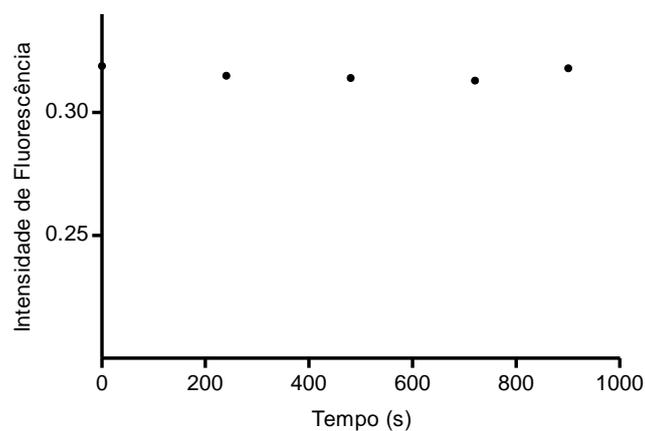


Figura 5.27 – Intensidade de fluorescência da rodamina em função do tempo de irradiação dos sistemas compostos apenas por lipossomas marcados com rodamina.

Nestes ensaios (figura 5.27), verifica-se que a irradiação, por si só, não tem qualquer efeito na intensidade de fluorescência da rodamina, o que corrobora os resultados obtidos nos ensaios de irradiação na presença das nanopartículas híbridas, pois as alterações espectrais observadas nesses estudos são devido à presença destas.

## 5.5. Estudo fotofísico dos compostos em vários solventes

O estudo fotofísico dos compostos antitumorais em diferentes solventes é de extrema importância, pois permite determinar a afinidade dos compostos para meios polares e apolares, por exemplo. Deste modo, numa fase inicial, as propriedades de absorção e fluorescência dos compostos estudados foram avaliadas em vários solventes com diferentes características. As figuras 5.28 e 5.29 mostram os espectros de absorção dos compostos estudados em vários solventes.

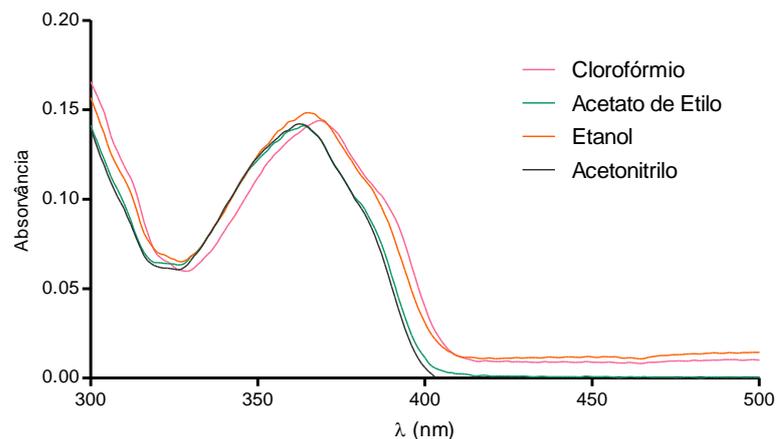


Figura 5.28 - Espectros de absorvância do composto 1 em solução ( $10^{-5}$  M) em vários solventes.

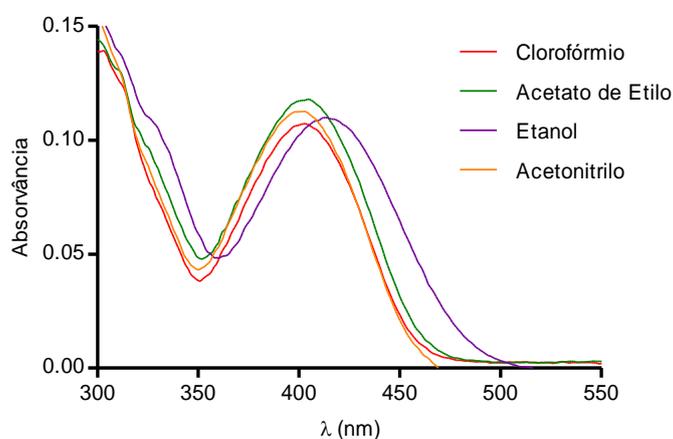


Figura 5.29 - Espectros de absorvância do composto 2 em solução ( $10^{-5}$  M) em vários solventes.

A partir dos espectros de absorção dos compostos em diferentes solventes, é possível verificar que os compostos apresentam um comportamento semelhante em termos de absorção nos vários solventes. Observa-se que o composto 1 absorve entre os 320 e os 400 nm, sendo o comprimento de onda máximo a cerca de 370 nm, enquanto o composto 2 absorve entre os 320 e os 450 nm onde o comprimento de onda máximo se encontra na zona dos 420 nm. Para os ensaios de fluorescência, os estudos foram realizados utilizando estes comprimentos de onda para a excitação dos compostos.

Nas figuras 5.30 e 5.31 estão representados os espectros de fluorescência dos compostos 1 e 2 respetivamente.

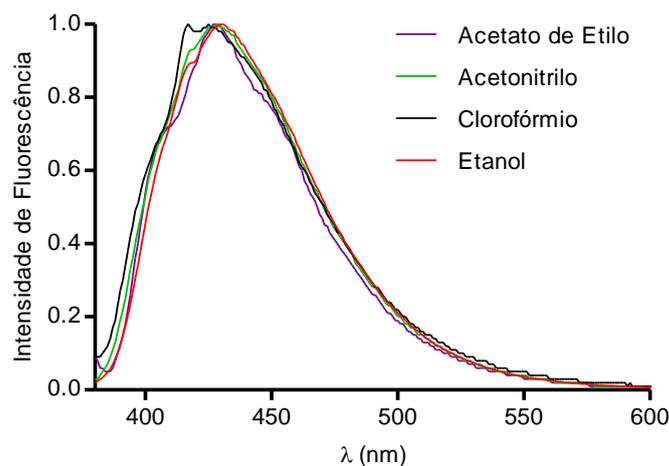


Figura 5.30- Espectros de fluorescência normalizados do composto 1 em solução ( $1 \times 10^{-6}$  M) em acetato de etilo, acetonitrilo, clorofórmio e etanol.

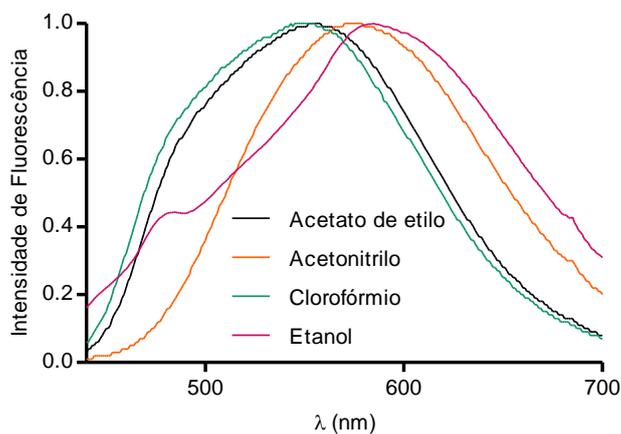


Figura 5.31 - Espectros de fluorescência normalizados do composto 2 em solução ( $1 \times 10^{-6}$  M) em acetato de etilo, acetonitrilo, clorofórmio e etanol.

Tabela 5.3 - Comprimentos de onda máximo de absorção ( $\lambda_{abs}$ ) e emissão ( $\lambda_{em}$ ), coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ) para os compostos 1 e 2 nos vários solventes.

Solvente	$\lambda_{abs}$ /nm ( $(\epsilon/ M^{-1}cm^{-1})$ )		$\lambda_{em}$ (nm)	
	Composto 1	Composto 2	Composto 1	Composto 2
<b>Clorofórmio</b>	369 ( $1,44 \times 10^5$ )	403 ( $1,70 \times 10^5$ )	425	523
<b>Acetato de Etilo</b>	364 ( $1,41 \times 10^5$ )	405 ( $1,18 \times 10^5$ )	427	532
<b>Etanol</b>	365 ( $1,48 \times 10^5$ )	404 ( $1,06 \times 10^5$ )	430	581
<b>Acetonitrilo</b>	363 ( $1,42 \times 10^5$ )	403 ( $1,13 \times 10^5$ )	428	568

Analisando os espectros de fluorescência dos compostos, é possível verificar, pela análise das figuras, que ambos apresentam emissão de fluorescência significativa, independentemente da sua polaridade e da sua capacidade, ou não, de estabelecer ligações de hidrogénio. No entanto, nenhum dos compostos apresenta emissão de fluorescência em água, apresentando ainda muito baixa solubilidade neste solvente. Um comportamento semelhante em água já foi reportado em estudos fotofísicos de outros derivados de tienopiridinas <sup>122</sup>.

## 5.6. Caracterização dos magnetolipossomas sólidos

Ao longo deste subcapítulo serão discutidos os resultados obtidos referente à prova de síntese dos magnetolipossomas sólidos, a caracterização destes através de TEM e a interação dos sistemas produzidos com modelos de membranas biológicas (GUVs).

### 5.6.1. Prova da formação da bicamada lipídica

Para provar a formação da dupla camada lipídica nos magnetolipossomas sólidos, recorreu-se à técnica de FRET. Para este ensaio, os magnetolipossomas sólidos foram preparados com o lípido DOPG e nanopartículas de ferrite de manganês decoradas com nanopartículas de ouro. De forma a conseguir provar a formação da bicamada, cada camada lipídica foi marcada com sondas fluorescentes, sendo estas a rodamina do lípido marcado Rh-DOPE, funcionando como doador de energia, e o corante *Nile Blue* como aceitador de energia. Na figura 5.32 é possível verificar uma sobreposição espectral significativa entre a emissão da rodamina e a absorção do *Nile Blue*, sendo espectável um eficiente processo de FRET entre as duas moléculas.

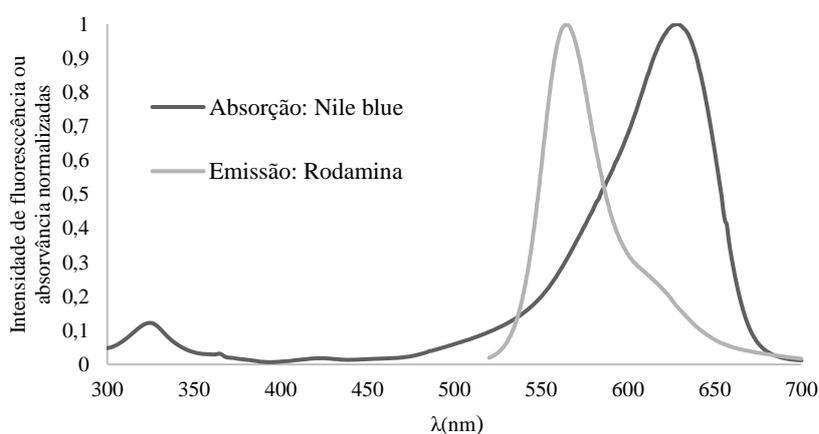


Figura 5.32 - Sobreposição espectral entre a emissão da rodamina e a absorção do *Nile Blue*.

De forma a conseguir comparar os espetros de fluorescência, os SMLs foram preparados contendo só a sonda *Nile Blue* (Figura 5.33), só com a sonda Rh-DOPE e com ambas as sondas, sendo que o *Nile Blue* irá marcar a primeira camada e a Rh-DOPE irá marcar a segunda camada (Figura 5.34). Uma vez que o *Nile blue* é solúvel em água é importante salientar a forma de preparação dos diferentes sistemas para a realização deste estudo. O sistema marcado apenas com rodamina foi realizado como já explicado anteriormente, após preparadas as nanopartículas híbridas estas foram inicialmente funcionalizadas com ODA em etanol, posteriormente fez se uma mistura lipídica com Rh-DOPE e DOPG (4:1) em etanol, onde de seguida se misturou as duas soluções. Feita a mistura procedeu-se com a evaporação do solvente (formação de um filme lipídico) e posterior adição de água, sob agitação e forma a promover a organização das moléculas dos lípidos.

Para o caso do sistema apenas marcado com *Nile blue* o procedimento a seguir foi o seguinte, preparadas as nanopartículas híbridas fez se de igual modo a funcionalização inicial destas com ODA, neste primeiro passo foi adicionado em simultâneo *Nile blue*, em etanol. O grupo NH<sub>2</sub> presente nesta sonda permitirá a adsorção química desta na superfície de ouro, o que vai permitir a marcação do ODA. Feita esta adição inicial procedeu-se à adição de DOPG também em etanol. Procedeu-se à evaporação do solvente e posterior adição de água, sob agitação, de modo a dar se a formação do SML marcado com *Nile Blue*.

Por fim, para o sistema composto pelas duas sondas o procedimento foi uma mistura de ambos os processos anteriormente expostos. Fez se primeiro a adição às nanopartículas híbridas do ODA e *Nile blue* em etanol, onde de seguida, foi adicionada uma mistura lipídica de Rh-DOPE e DOPG, também em etanol. A esta mistura, como para as anteriores, fez se a evaporação do solvente e posterior adição de água.

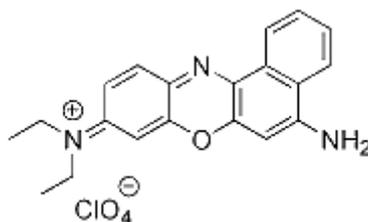


Figura 5.33 – Estrutura química da sonda *Nile Blue*

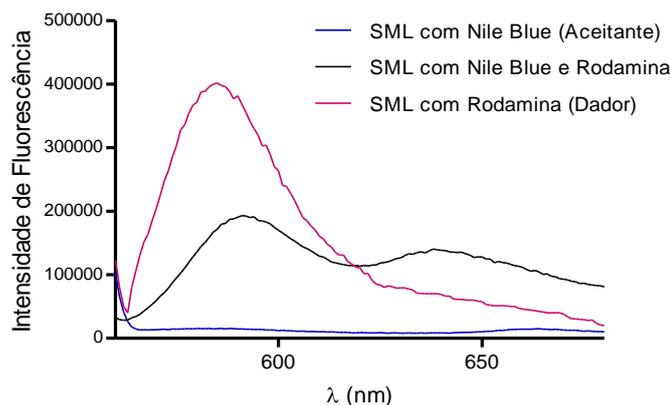


Figura 5.34 – Espectros de fluorescência ( $\lambda_{exc}=540$  nm, excitação direta da Rodamina) dos SMLs marcados com *Nile Blue* e/ou Rh-DOPE, na primeira e segunda camada, respetivamente.

No caso de ocorrer a formação dos SMLs, quando excitamos apenas a molécula doadora (Rodamina) ocorre transferência de energia entre a rodamina e o *Nile Blue*, devido à proximidade de ambos. Como se verifica pela Figura 5.34, os SMLs marcados só com Rodamina apresentam a banda típica da emissão de fluorescência desta, enquanto os que contêm apenas a sonda *Nile Blue* apresentam emissão desprezável, dado se estar a excitar num comprimento de onda onde o *Nile Blue* praticamente não absorve. Contudo, é possível observar, para os SMLs marcados com ambas as sondas, uma diminuição acentuada da banda de emissão da Rodamina e o aparecimento da banda de emissão do *Nile Blue*, próximo dos 630 nm, sendo isto resultado da transferência de energia das moléculas doadoras excitadas para as moléculas aceitadoras<sup>123</sup>. Desta forma, é possível afirmar a existência de FRET, confirmando-se a formação da dupla camada lipídica nos magnetolipossomas.

Confirmada a ocorrência do processo de FRET, procedeu-se ao cálculo da distância entre as duas moléculas dadoras e aceitadoras (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Eficiência de FRET ( $\Phi_{FRET}$ ), Raio de Förster ( $R_0$ ) e distância doador-aceitador ( $r$ ) do ensaio de formação da dupla camada lipídica em magnetolipossomas sólidos (SMLs).

	$\Phi_{FRET}$	$R_0$ (nm)	$r$ (nm)
<b>SMLs com NPs de MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, decoradas com NPs de Au</b>	0,68	3,16	2,10

Diferentes autores referem, para a membrana celular, espessuras que podem variar entre os 7 e os 9 nm <sup>124</sup> para o caso de bicamadas moleculares. Assim, pode concluir-se que as moléculas doadoras e aceitadoras utilizadas encontram-se, respetivamente, na primeira e na segunda camada lipídica, envolvendo as diferentes nanopartículas sintetizadas. É, assim, possível confirmar a formação da dupla camada lipídica, para os SMLs contendo nanopartículas de  $MnFe_2O_4$  decoradas com nanopartículas de ouro.

A distância obtida foi bem mais pequena que as valores esperados/conhecidos para a espessura da dupla camada. Este valor pode ser justificado pelas cargas apresentadas pela sonda *Nile Blue* e pela rodamina, pois poderá ter ocorrido uma atração electrostática entre estas que poderá ter aproximado as duas sondas, dando assim origem a um valor pequeno. Para além disso, este resultado poderá também ser explicado com base no método de preparação dos sistemas, uma vez que o rearranjo dos lípidos quando é adicionada água na fase final do processo de preparação não é possível de controlar.

#### 5.6.2. Caraterização dos SMLs por Difusão Dinâmica de Luz (DLS)

Os magnetolipossomas sólidos foram também caracterizados com recurso à técnica de DLS. Foram feitas análises aos sistemas compostos por nanopartículas de ferrite de manganês decoradas com nanopartículas de ouro, bem como sistemas compostos por nanopartículas magnéticas núcleo/coroa de  $MnFe_2O_4/Au$ . Os valores obtidos encontram-se resumidos na tabela 5.5. Estes resultados estão em concordância com valores comumente obtidos para sistemas deste tipo. No entanto, os valores de polidispersividade (PDI) encontram-se um pouco elevados, o que limita a confiança nos tamanhos obtidos por esta técnica. Estes valores elevados de PDI podem ser indicativos da presença de alguns agregados de nanopartículas ou de algumas poeiras em solução.

Tabela 5.5 - Resultados de DLS obtidos para os dois tipos de magnetolipossomas sólidos compostos por nanopartículas de ferrite de manganês e ouro.

	Diâmetro médio $\pm$ DP (nm)	PDI
<b>Nanopartículas de MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> decoradas com nanopartículas de ouro</b>	117,5 $\pm$ 0,3	0,36
<b>Nanopartículas núcleo/coroa de MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/Au</b>	303,6 $\pm$ 0,3	0,598

### 5.6.3. Caracterização dos magnetolipossomas sólidos através de TEM

Na figura 5.35 estão representadas imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos magnetolipossomas baseados em nanopartículas de ferrite de manganês decoradas com nanopartículas de ouro e magnetolipossomas sólidos compostos por nanopartículas núcleo/coroa (núcleo de MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e coroa de ouro). Através da análise das mesmas, é possível verificar o tamanho reduzido dos nanossistemas produzidos, inferior a 200 nm, sendo assim adequados para aplicações biomédicas.

Não se pode concluir quanto ao tamanho das partículas pois estas medidas são todas de SMLs e não das nanopartículas isoladas.

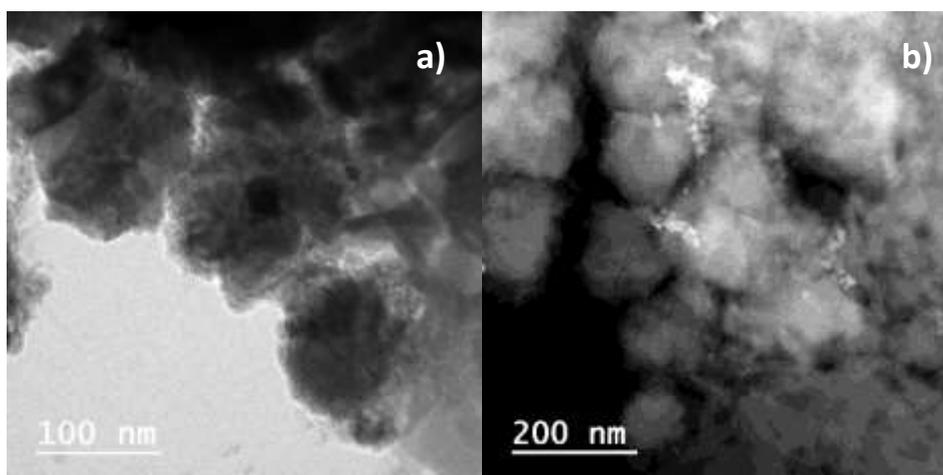


Figura 5.35 – Imagens de TEM de magnetolipossomas sólidos: a) contendo nanopartículas magnéticas decoradas com nanopartículas de ouro; b) contendo nanopartículas núcleo/coroa de MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/Au.

#### 5.6.4. Ensaios de interação dos SMLs com modelos de membranas

De forma a verificar a possibilidade de interação dos SMLs com as membranas celulares, foram realizados diversos ensaios envolvendo os magnetolipossomas sólidos (SMLs) contendo as diferentes nanopartículas sintetizadas e modelos de membranas biológicas (GUVs - vesículas unilamelares gigantes).

Para estes estudos, foram inicialmente realizados ensaios de FRET, em que se pretendia ver se, após fusão com os GUVs, a eficiência de FRET diminuiu por aumento da distância média entre aceitante e doador. Mas verificou-se que, após adição dos GUVs, ocorria um aumento de fluorescência de ambas as sondas (doadores os compostos 1 e 2 e aceitadores a sonda NBD e Rodamina respectivamente), não permitindo confirmar a fusão dos SMLs com os GUVs existência. Este aumento da intensidade de emissão, que ocorre após a fusão com os modelos membranares, pode ser explicado um efeito de *unquenching* (diminuição do efeito de inibição de fluorescência inicialmente causada pelo cluster de nanopartículas dos SMLs) <sup>108</sup>. Isto porque, após a fusão com os modelos de membrana, a distância entre o cluster de nanopartículas e as sondas fluorescentes irá ser maior, levando a um aumento da intensidade de fluorescência destas (Figura 5.36).

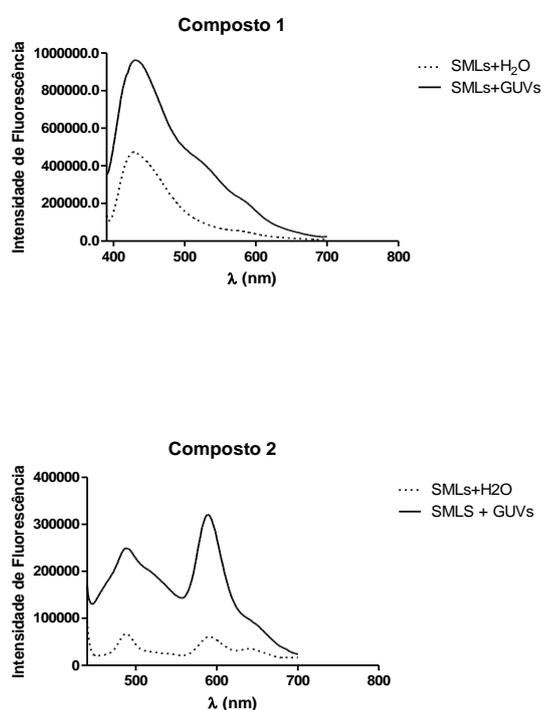


Figura 5.36 - Espectros de fluorescência dos magnetolipossomas sólidos baseados em DOPG antes e após a interação com os GUVs, baseados em lecitina de soja ( $1 \times 10^{-3}$  M). Para estes ensaios foram usadas as sondas NBD e rodamina como aceitadores e os compostos 1 e 2 como doadores respectivamente.

### 5.6.5. Estudos de anisotropia dos compostos em magnetolipossomas

Uma vez que a anisotropia de fluorescência é dependente da microviscosidade do meio em que a molécula fluorescente está inserida, a localização dos compostos antitumorais nos magnetolipossomas foi estudada por anisotropia de fluorescência em estado estacionário ( $r$ ).

Estas medidas foram adquiridas através da obtenção de espectros de fluorescência com recurso a polarizadores. As medidas foram obtidas à temperatura ambiente, em que o lípido DOPG, constituinte dos SMLs, já se encontra na fase líquido-cristalina (fase fluida). Valores de anisotropia num solvente muito viscoso (glicerol) foram obtidos para comparação. Os valores de anisotropia dos compostos em magnetolipossomas encontram-se na tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Valores de anisotropia de fluorescência ( $r$ ) dos compostos e valores de comprimentos de onda máximos dos compostos em SMLs a 25 °C. Valores de anisotropia de fluorescência dos fármacos em glicerol a 25 °C para comparação

	<b>Composto 1</b>			<b>Composto 2</b>		
	T° (C)	R	$\lambda_{em}$	T° (C)	R	$\lambda_{em}$
<b>SMLs</b>	25	0,071	431	25	0,115	489
<b>Glicerol</b>	25	0,301	440	25	0,284	567

O glicerol é um líquido que apresenta uma viscosidade de 993.4 cP a 25 °C, enquanto as membranas lipídicas apresentam uma viscosidade inferior, entre 100 a 200 cP<sup>125, 126</sup>. Com base nestes valores de viscosidade, é de esperar que os valores de anisotropia em SMLs dos compostos 1 e 2 sejam inferiores aos obtidos em glicerol, o que se verifica. O valor de anisotropia mais elevado do composto 2 em SMLs pode indicar que este composto se localiza mais próximo das cabeças polares dos lípidos, pois a microviscosidade da membrana lipídica diminui desde a região mais exterior (onde é menos fluida) para o interior da mesma (região mais fluida). No geral, os resultados obtidos indicam que os fármacos se localizam maioritariamente na bicamada lipídica dos SMLs.



## CAPÍTULO VI – Conclusões e perspectivas futuras

Ao longo do desenvolvimento deste projeto, foi possível sintetizar e caracterizar quatro tipos de nanopartículas magnéticas contendo ferrite de manganês ou ferrite de níquel e ouro:

Nanopartículas magnéticas de **ferrite de manganês decoradas** com nanopartículas plasmônicas de ouro;

Nanopartículas magnéticas, **núcleo/coroa**, com núcleo de **ferrite de manganês** e coroa de ouro;

Nanopartículas magnéticas de **ferrite de níquel decoradas** com nanopartículas plasmônicas de ouro;

Nanopartículas magnéticas, **núcleo/coroa**, com núcleo de **ferrite de níquel** e coroa de ouro.

Procedeu-se depois à incorporação destes quatro tipos de nanopartículas em lipossomas sólidos, por cobertura das partículas com bicamadas lipídicas. Estes magnetolipossomas sofreram ensaios de irradiação, tendo se concluído que os sistemas compostos por nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês (núcleo/coroa) foram os que apresentaram melhores resultados de aquecimento local (maior aumento de temperatura ao longo do tempo de irradiação, sendo estes sistemas utilizados para incorporação de dois novos potenciais fármacos antitumorais, derivados de tienopiridina. Os estudos fotofísico realizados permitiram concluir que ocorre a formação da bicamada lipídica nos magnetolipossomas sólidos (ensaios de FRET), bem como a incorporação dos compostos antitumorais nos SMLs (medidas de fluorescência). Ensaios de FRET não se revelaram conclusivos pois a prova da fusão ocorreu através de um efeito combinado de uma diminuição da eficiência de FRET com “unquenching” das nanopartículas.

Desenvolvimentos futuros do trabalho apresentado nesta dissertação poderão envolver:

- Estudos de interação dos restantes magnetolipossomas sólidos com modelos de membrana (GUVs), assim como a incorporação dos compostos antitumorais nos mesmos;
- Avaliação por SQUID das propriedades magnéticas das nanopartículas e dos magnetolipossomas produzidos;
- Teste da atividade dos magnetolipossomas com compostos antitumorais encapsulados em linhas celulares tumorais humanas, com e sem recurso a um campo magnético alternado;
- Caracterização estrutural das nanopartículas produzidas por TEM ou, preferencialmente,

HR-TEM;

- Caracterização por Cryo-TEM ou Cryo-SEM e DLS dos magnetolipossomas produzidos;
- Funcionalização dos diferentes magnetolipossomas, com recurso à PEG-ilação e uso de marcadores específicos (por exemplo, folato ou transferrina), para direcionamento específico a células tumorais;
- Avaliação da citotoxicidade das diferentes nanopartículas produzidas e dos magnetolipossomas.

## Bibliografia

1. Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S: Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett*, **7** 144 (2012).
2. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., Bray, F., Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *International journal of cancer*, **5**, 59-86, (2015).
3. Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. Cancer Statistics , 2012. *CA Cancer J Clin* **62**, 10–29 (2012).
4. Jemal, A., Bray, F. & Ferlay, J. Global Cancer Statistics, *A Cancer Journal for Clinicals*, **61**, 69–90 (2011).
5. Feynman, A., Taniguchi, N., Faraday, M. & Mie, G. Nanoscience vs Nanotechnology—Defining the Field, *ACS Nano* **9**, 2215–2217 (2015).
6. Faraji M, Yamini Y, Rezaee M., Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization and applications. *J Iran Chem Soc*, **7**, 1-37, (2010).
7. Chen, X. Nanoplatfor Based Molecular Imaging, Wiley, Canada (2011).
8. Barrow, M., Taylor, A., Fuentes-Caparrós, A.M., Sharkey, J., Daniels, L.M., Mandal, P., Park B.K., Murray, P., Rosseinsky, M.J., Adams, D.J., SPIONs for cell labelling and tracking using MRI: magnetite or maghemite?, *Biomaterials Science*, **19**, 101–106 (2018).
9. Shinkai, M., Functional Magnetic Particles for Medical Application, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **94**, 606-613 (2002).
10. Æ, E. S. & Kilic, M. A. Magic ferritin : A novel chemotherapeutic encapsulation bullet, *Journal of Magnetism and magnetic Materials*, **293**, 509–513 (2005).
11. Mornet, S., Vasseur, S., Grasset, F. & Duguet, E. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *J. Mater. Chem.* **14**, 2161–2175 (2004).
12. Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S. & Sen, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles ( SPIONs ): Development , surface modi fi cation and applications in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 24–46 (2011).
13. Gargaud, M. & Irvine, W. M. *Encyclopedia of Astrobiology*. (2011) Springer, Loric.
14. Naseri, M. G., Saion, E. Bin, Ahangar, H. A., Hashim, M. & Shaari, A. H. Synthesis and characterization of manganese ferrite nanoparticles by thermal treatment method. *J. Magn. Magn. Mater.* **323**, 1745–1749 (2011).

15. Li, Z., Wang, S.X., Sun, Q., Zhao, H.L., Lei, H., Lan, M.B., Cheng, Z.X., Wang, X.L., Dou, S.X., Lu, G.Q., Ultrasmall Manganese Ferrite Nanoparticles as Positive Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging, *Advanced Healthcare Materials*, **2**, 958–964 (2013).
16. Sagadevan, S., Chowdhury, Z. Z., Rafique, R. F. & Brunswick, N. Preparation and Characterization of Nickel ferrite Nanoparticles via Co-precipitation Method, *Materials Research*, **21**, 21–25 (2018).
17. Issa, B., Obaidat, I. M., Albiss, B. A. & Haik, Y. Magnetic nanoparticles: Surface effects and properties related to biomedicine applications. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 21266–21305 (2013).
18. Tomitaka, A., Hirukawa, A., Yamada, T., Morishita, S. & Takemura, Y. Journal of Magnetism and Magnetic Materials Biocompatibility of various ferrite nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using HeLa cells, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **321**, 1482–1484 (2009).
19. Cabrera, L. L., Somoza, Á., Marco, J. F., Serna, C. J. & Morales, M. P. Synthesis and surface modification of uniform  $MFe_2O_4$  (  $M=Fe$  ,  $Mn$  , and  $Co$  ) nanoparticles with tunable sizes and functionalities, *Journal of Nanoparticles Research*, **14**, 1-14 (2012).
20. Nahar Kamrun, Absar Shahriar, Patel, Brijeshkumar, A. F. Starch-coated magnetic liposomes as an inhalable carrier for accumulation of fasudil in the pulmonary vasculature. *Int J Pharm* , **22**, 185–195 (2014)
21. Tartaj, P., Morales, M. D. D., Veintemillas-Verdaguer, S., Gonzalez-Carreño, T. & Serna, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D Appl Phys* , **36**, 182-197 (2003).
22. Ling, D. & Hyeon, T. Chemical design of biocompatible iron oxide nanoparticles for medical applications. *Small* **9**, 1450–1466 (2013).
23. Mohammed, L., Gomaa, H. G., Ragab, D. & Zhu, J. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology* **30**, 1–14 (2017).
24. Lu, J; , Ma, S., Sun, J., Xia, C., Liu, C., Wang, Z., Zhao, X., Gao, F., Gong, Q., Song, B., Shuai, X., Ai, H., Gu, Z., Biomaterials Manganese ferrite nanoparticle micellar nanocomposites as MRI contrast agent for liver imaging. *Biomaterials* , **30**, 2919–2928 (2009).
25. Brian M. Dale, Mark A. Brown, R. C. S. *MRI: Basic Principles and Applications*, Wiley-Blackwell, New Jersey, (2015).

26. Liang, Z., Li, X., Xie, Y. & Liu, S. ' Smart ' gold nanoshells for combined cancer chemotherapy and hyperthermia, *Biomedical Materials*, **9** 1-11 (2014)
27. Modalities of Cancer Therapy. Available at: <http://www.merck.com/mmpe/sec11/ch149/ch149b>.
28. Overgaard, J. The current and potential role of hyperthermia in radiotherapy, *National Institutes of Health*, **16**, 535-49(1989).
29. Kang, H; Jia, B; Li, J; Morrish, D; Gu, M; Enhanced photothermal therapy assisted with gold nanorods using a radially polarized beam Enhanced photothermal therapy assisted with gold nanorods using a radially polarized beam, *Applied Physics Letters*, **96**, 1–4 (2014).
30. Mahdihassan S. Cinnabar-gold as the best alchemical drug of longevity, called Makaradhwaja in India. *Am. J. Chin. Med.* **13**, 93–108 (1985).
31. Daniel, M. & Astruc, D. Gold Nanoparticles : Assembly , Supramolecular Chemistry , Quantum-Size-Related Properties , and Applications toward Biology , Catalysis , and Nanotechnology, *Chemical Reviews*, **104** 293-346 (2004).
32. Yguerabide, J. & Yguerabide, E. E. Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and Their Use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications, *Analytical Biochemistry*, **156**, 137–156 (1998).
33. Rosi, N. L. & Mirkin, C. A. Nanostructures in Biodiagnostics, *Chemical Reviews*, **4**, 1547-1562 (2005).
34. Khan, M. S., Vishakante, G. D. & Siddaramaiah, H. Gold nanoparticles : A paradigm shift in biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **199–200**, 44–58 (2013).
35. Jain, P. K., Huang, X., El-sayed, I. H. & El-sayed, M. A. Noble Metals on the Nanoscale : Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging , Sensing , Biology , and Medicine, *Accounts of Chemical research*, **41**, 7–9 (2008).
36. Wu, L; Cai, X; Nelson,K; Xing, W; Xia,J; Zhang, R; Stacy, A.J; Pan,J; A green synthesis of carbon nanoparticles from honey and their use in real-time photoacoustic imaging, *Nano Research*, **6**, 312–325 (2013).
37. Pekkanen, A. M., DeWitt, M. R. & Rylander, M. N. Nanoparticle enhanced optical imaging and phototherapy of cancer. *J. Biomed. Nanotechnol.* **10**, 1677–1712 (2014).
38. Yi, D. K; Sun, I.C; Ryu,J.H; Koo,H; Park,C.W;Youn,I.C;Kwon,K.I; Kim,K; Ahn,C.H, Matrix Metalloproteinase Sensitive Gold Nanorod for Simultaneous Bioimaging and Photothermal

- Therapy of Cancer, *Bioconjugate Chemistry*, **21**, 2173–2177 (2010).
39. Jing, B., Li, L., Day, D. & Gu, M. Ultra-Low Energy Threshold for Cancer Photothermal Therapy Using Transferrin-Conjugated Gold Nanorods, *Advanced Materials*, **20**, 3866–3871 (2008).
  40. Robinson, J. T; Welscher, K; Tabakman, S.M; Sherlock, S.P; Wang, H; Luong, R; Dai, H. High Performance In Vivo Near-IR ( $> 1 \mu\text{m}$ ) Imaging and Photothermal Cancer Therapy with Carbon Nanotubes, *National Institutes of Health*, **3**, 779–793 (2010).
  41. Day, E. S., Thompson, P. A., Zhang, L., Blaney, S. M. & West, J. L. Nanoshell-mediated photothermal therapy improves survival in a murine glioma model, *Journal of Neuro-Oncology*, **104**, 55–63 (2011).
  42. Pattani, V. P. & Tunnell, J. W. Nanoparticle-Mediated Photothermal Therapy : A Comparative Study of Heating for Different Particle Types, *Lasers in Surgery and Medicine*, **44** 675-684 (2012).
  43. Neal, D. P. O., Hirsch, L. R., Halas, N. J., Payne, J. D. & West, J. L. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles, *Cancer Letters*, **209**, 171–176 (2004).
  44. El-sayed, I. H., Huang, X. & El-sayed, M. A. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles, *Cancer Letters*, **239**, 129–135 (2006).
  45. Li, J.L; Wang, L; Liu, X.Y; Zhang, Z.P. Guo, H.C; Liu, W.M; Tang, S.H, In vitro cancer cell imaging and therapy using transferrin-conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.* **274**, 319–326 (2009).
  46. Nam, J., Won, N., Jin, H., Chung, H. & Kim, S. pH-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy, *J. Am. Chem. Soc.*, **38**, 13639–13645 (2009).
  47. Huang, X., Qian, W., El-sayed, I. H. & El-sayed, M. A. The Potential Use of the Enhanced Nonlinear Properties of Gold Nanospheres in Photothermal Cancer Therapy, *Lasers in Surgery and Medicine*, **753**, 747–753 (2007).
  48. Davis, M. E., Chen, Z. G. & Shin, D. M. Nanoparticle therapeutics : an emerging treatment modality for cancer, *Nature Reviews Drug Discovery*, **7**, 771–782 (2008).
  49. Nichols, J. W. & Han, Y. EPR : Evidence and fallacy. *J. Control. Release*, **190**, 451-464 (2014).

50. Matsumura, Y. & Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy : Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs, *Cancer Research* **46**, 6387–6392 (1986).
51. Gottesman, M. M. Mechanism of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* **53**, 615-627 (2002).
52. Cabral, H. & Kataoka, K. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. *J. Control. Release* **190**, 465-476 (2014).
53. Dipetrillo.T, Milas. L, Evans. D, Akerman P, Ng T, Miner T, Cruff D, Chauhan B, Iannitti D, Harrington D, Safran H. Paclitaxel Poliglumex (PPX-Xyotax) and Concurrent Radiation for Esophageal and Gastric Cancer: A Phase I Study, *American Journal of Clinical Oncology* **29**, 376–379 (2006).
54. Piao, B. Y., Burns, A., Kim, J., Wiesner, U. & Hyeon, T. Designed Fabrication of Silica-Based Nanostructured Particle Systems for Nanomedicine Applications, *Advanced Functional Materials*, **18**, 3745–3758 (2008).
55. Kim, J; Park,S; Lee,J.E; Yang, I; Kim,J.S; Kim,K.S. Designed Fabrication of Multifunctional Magnetic Gold Nanoshells and Their Application to Magnetic Resonance Imaging and Photothermal Therapy, *A Journal of the German Chemical Society*, **45**, 7754–7758 (2006).
56. Park, B. J; Maltzanh,G.V; Centrone, O.A; Hatton, T.A; Sailor, M.J, Cooperative Nanoparticles for Tumor Detection and Photothermally Triggered Drug Delivery, *Advanced Materials*, **22**, 880–885 (2010).
57. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine* **2**, 681–693 (2007).
58. West, J. L. Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance, *National academy of Sciences of the United States of America* **100**, 13549-54 (2003).
59. Loo, C., Lowery, A., Halas, N., West, J. & Drezek, R. Immunotargeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy, *Nano Letters*, **5**, 2–4 (2005).
60. Wang, Y. J. & Krestin, G. P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents : physicochemical characteristics and applications in MR imaging, *European Radiology*, **11**, 2319–2331 (2001).

61. Neuberger, T., Scho, B., Hofmann, M. & Rechenberg, B. Von. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications : Possibilities and limitations of a new drug delivery system, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **293**, 483–496 (2005).
62. Misra, R. D. K. Magnetic nanoparticle carrier for targeted drug delivery : perspective , outlook and design, *Molecular Imaging*, **24**, 1011–1019 (2008).
63. Kagami, H., Ueda, M. & Kobayashi, T. Tissue Engineering Using Magnetite Nanoparticles and Endothelial Cells, *Tissue Engineering*, **10**, 1–8 (2004).
64. Ke, Y., Hu, C., Jiang, X., Yang, Z. & Zhang, H. In vivo magnetic resonance tracking of Feridex-labeled bone marrow-derived neural stem cells after autologous transplantation in rhesus monkey, *Journal of Neuroscience Methods*, **179**, 45–50 (2009).
65. Reimer, P. Ferucarbotran ( Resovist ): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver : properties , clinical development , and applications, *European Radiology*, **13**, 1266–1276 (2003).
66. Shubayev, V. I., Pisanic, T. R. & Jin, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 467–477 (2009).
67. Minotti, G. & Auste, S. D. The Requirement for Iron(II) in the Initiation of Lipid Peroxidation by Iron(II) and Hydrogen Peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, **262**, 1098–1104 (1987).
68. Hoskins, C., Cuschieri, A. & Wang, L. The cytotoxicity of polycationic iron oxide nanoparticles : Common endpoint assays and alternative approaches for improved understanding of cellular response mechanism, *Journal of Nanobiotechnology*, **10**, 1–11 (2012).
69. Mandal, M., Kundu, S., Kumar, S., Panigrahi, S. & Sau, T. K. Magnetite nanoparticles with tunable gold or silver shell, *Journal of Colloid and Interface Science*, **286**, 187–194 (2005).
70. Goon, I. Y; Lai, L.M.H; Lim, M; Munroe,P; Gooding, J.J; Amal, R. Fabrication and Dispersion of Gold-Shell-Protected Magnetite Nanoparticles : Systematic Control Using Polyethyleneimine, *Chemistry of Materials*, **9**, 673–681 (2009).
71. Lindquist, N. C., Nagpal, P. & Mcpeak, K. M. Single metal nanoparticles : optical detection , spectroscopy and applications, *Nano Convergence*, **3**, 3-13 (2011)
72. Pissuwan, D., Valenzuela, S. M. & Cortie, M. B. Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles, *Trends in Biotechnology*, **24**, 62-67 (2007).

73. Huang, C., Jiang, J., Muangphat, C., Sun, X. & Hao, Y. Trapping Iron Oxide into Hollow Gold Nanoparticles, *Nanoscale Res Lett*, **6**, 2–6 (2011)
74. Wang, L. Y., Luo, J., Fan, Q., Suzuki, M. & Suzuki, I. S. Monodispersed core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanoparticles. *J Phys Chem B* **109**, 1918–1923 (2005).
75. Yavuz, M. S. Cheng Y, Chen J, CM Cobley, Zhang Q, M Rycenga, Xie J, Kim C, Canção KH, Schwartz AG, Wang LV, Y Xia. Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light. *Nat. Mater.* **8**, 935–939 (2009).
76. Sun, Y.B, Mayers, B; Xia, Y, Metal Nanoshells, *Advanced Materials*, **34**, 15–22 (2006).
77. Sailor, M. J. & Park, J.-H. Hybrid Nanoparticles for Detection and Treatment of Cancer. *Adv. Mater.* **24**, 3779–3802 (2012).
78. Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W. & Zarghami, N. Liposome : classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* **8**, 1 (2013).
79. Gabizon, A., Goren, D., Cohen, R. & Barenholz, Y. Development of liposomal anthracyclines : from basics to clinical, *Journal of Controlled Release*, **53**, 275–279 (1998).
80. Sahoo, S. K. & Labhasetwar, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov. Today* **8**, 1112–1120 (2003).
81. Chrai, S. S., Murari, R. & Ahmad, I. Liposomes : A Review Part I : Manufacturing Issues, *Pharmaceutical Technology*, **14**, 10-14 (2002).
82. Johnston, M. J. W. Semple, S.C, Ansell, S. Maourer, N. Cullis, P.R, Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrosphingomyelin, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1768**, 1121–1127 (2007).
83. Karami, N., Moghimipour, E. & Salimi, A. Liposomes as a Novel Drug Delivery, *Asian Journal of Pharmaceutics*, **2018**, 31–41 (2018).
84. Oisson, U., Wiirz, J. U. & Streyt, R. Cylinders and Bilayers in a Ternary Nonionic Surfactant System, *J. Phys. Chem* **20**, 4535–4539 (1993).
85. Cuyper, M. De & Joniau, M. Magnetoliposomes Formation and structural characterization, *European Biophysics Journal*, **15**, 311–319 (1988).
86. Medeiros, S. F., Santos, A. M., Fessi, H. & Elaissari, A. Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. *Int. J. Pharm.* **403**, 139–161 (2011).
87. Monnier, C. A., Burnand, D., Rothen-rutishauser, B. & Lattuada, M. Magnetoliposomes : opportunities and challenges, *Eur. J. Nanomed*, **6**, 201–215 (2014).

88. "Tese de Mestrado, Universidade do Minho", Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em nanopartículas de níquel com coroa de sílica para aplicações na entrega de fármacos antitumorais Rodrigues, A. R. O. 27–47 (2012).
89. Meledandri, C. J., Ninjbadgar, T. & Brougham, D. F. Size-controlled magnetoliposomes with tunable magnetic resonance relaxation enhancements. *J. Mater. Chem.* **21**, 214–222 (2011).
90. Queiroz, M.J., Peixoto, D., Calhella, R.C., Soares, P., Dos Santos, T., Lima, R.T., Campos, J.F., Abreu, R.M., Ferreira, I.C., Vasconcelos, M.H., New di ( hetero ) arylethers and di ( hetero ) arylamines in the thieno [ 3 , 2- b ] pyridine series : Synthesis , growth inhibitory activity on human tumor cell lines and non-tumor cells , effects on cell cycle and on programmed cell death. *Eur. J. Med. Chem.* **69**, 855–862 (2013).
91. Machado, V. A., Peixoto, D., Jo, M. & Soares, R. Antiangiogenic 1-Aryl-3-[3-(thieno[3,2-b]pyridin-7-ylthio) phenyl]ureas Inhibit MCF-7 and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Lines Through PI3K/Akt and MAPK/Erk Pathways, *Journal of Cellular Biochemistry.* **9**, 1–9 (2016).
92. Boyer Rodney. *Biochemistry laboratory : modern theory and techniques*, Prentice Hall, New Jersey (2012).
93. J. R. Lakowicz. Introduction to fluorescence, in Principles of Fluorescence Spectroscopy, in (ed. Springer US) 1–26, New York. (2006).
94. Valeur, B. *Molecular Fluorescence - Principles and Applications*. Wiley, New York (2001).
95. Hauptman, H. A. History of X-Ray Crystallography. *Science of Crystal Structures*, **6**, 19–23 (2016).
96. Stefanaki, E. Electron Microscopy : The Basics, *Physics of Advanced Materials Winter School*, **4**, 1–11 (2008).
97. Pradhan, P., Giri, J., Banerjee, R., Bellare, J. & Bahadur, D. Preparation and characterization of manganese ferrite-based magnetic liposomes for hyperthermia treatment of cancer, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **311**, 208-215 (2007).
98. Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. & Whyman, R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system, *Chemical Communications*, **7**, 801–802 (1994).
99. Rodrigues, A. R. O; Gomes. I. T; Almeida, Bernardo. G; Araújo J. P; Castanheira, Elisabete M.

- S; Coutinho, Paulo. J.G , Magnetic liposomes based on nickel ferrite nanoparticles for biomedical applications. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 18011–21 (2015).
100. Brown, K. R. & Natan, M. J. Hydroxylamine Seeding of Colloidal Au Nanoparticles in Solution and on Surfaces, *American Chemical Society* **4**, 726–728 (1998).
  101. Amendola, V. & Meneghetti, M. Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV - vis Spectroscopy, *J. Phys. Chem*, **113**, 4277–4285, (2009).
  102. Waseda, Matsubara, Shinoda, Yoshio, Eiichiro, K. *X-Ray Diffraction Crystallography*, Springer, New York, (2011).
  103. Charles Kittel. *Introduction to Solid State Physics*, Wiley India Pvt (2004).
  104. Dr. John R. Silvius, Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins, John Wiley & Sons, Inc., New York, (1982)
  105. Tamba, Y., Terashima, H. & Yamazaki, M. A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles. *Chem. Phys. Lipids* **164**, 351–358 (2011).
  106. Tanaka, T., Tamba, Y., Masum, S. & Yamashita, Y. La<sup>3+</sup> and Gd<sup>3+</sup> induce shape change of giant unilamellar vesicles of phosphatidylcholine, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1564**, 173–182 (2002).
  107. Hargreaves, J. S. J. Some considerations related to the use of the Scherrer equation in powder X-ray diffraction as applied to heterogeneous catalysts Some considerations related to the use of the Scherrer equation in powder X-ray diffraction as applied to heterogeneous catalysts. *Catal. Struct. React.* **2**, 1–5 (2016).
  108. Rodrigues, A. R. O; Ramos, F; Gomes, I.T; Almeida, B. Araújo, J. Queiroz, M.J, Castanheira, E.M.S; Coutinho, J.P.G. Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs. *RSC Adv.* **6**, 17302–17313 (2016).
  109. Rafique, M. Y., Li-qing, P., Javed, Q. & Iqbal, M. Z. Growth of monodisperse nanospheres of MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> with enhanced magnetic and optical properties, *Chinese Physics B*, **22**, 107101-7 (2013).
  110. Meinert, M. & Reiss, G. Electronic structure and optical band gap determination of NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. *J. Phys. Condens. Matter* **26** 19-26 (2014).
  111. Rodrigues, A.R.O., Gomes, I. Almeida, B. Araújo, J. Castanheira, E. Coutinho, P. Magnetoliposomes based on nickel / silica core / shell nanoparticles : Synthesis and characterization. *Mater. Chem. Phys.* **148**, 978–987 (2014).
  112. Martin, M. N., Basham, J. I., Chando, P. & Eah, S. Charged Gold Nanoparticles in Non-

- Polar Solvents : 10-min Synthesis and 2D Self-Assembly , *Langmuir* **26**, 7410–7417 (2010).
113. Verwey, J, E; Overbeek, J. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. Elsevier, New York (1948).
  114. Rao, C. N. R. & Mu, A. *The Chemistry of Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*, Wiley, (2004).
  115. Singh, S., Pasricha, R., Bhatta, U. M., Satyam, P. V & Prasad, B. L. V. Effect of halogen addition to monolayer protected gold nanoparticles, *Journal of Materials Chemistry*, **16**, 1614–1619 (2007).
  116. Wei, Y., Yang, J. & Ying, J. Y. Reversible phase transfer of quantum dots and metal nanoparticles, *Chemical Communications*, **18**, 3179–3181 (2010).
  117. Fink, J., Kiely, C. J., Bethell, D. & Schiffrin, D. J. Self-Organization of Nanosized Gold Particles, *Chemical Reviews*, **104**, 922–926 (1998).
  118. Ghosh, S. K. & Pal, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles : From Theory to Applications, *Chemistry of Materials*, **10** 922-926 (2007).
  119. Salado, J. Insausti, M. Lezama, L. Moros, M. Pelaz, B. Grazu, V. Rojo, T, Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @Au superparamagnetic nanoparticles: *in vitro* bioactivity. *Nanotechnology* **23**, 315102- 9 (2012).
  120. Umut, E. Pineider, F. Arosio, P. Corti, M. Journal of Magnetism and Magnetic Materials Magnetic , optical and relaxometric properties of organically coated gold – magnetite ( Au – Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) hybrid nanoparticles for potential use in biomedical applications. *J. Magn. Magn. Mater.* **324**, 2373–2379 (2012).
  121. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med. Sci.* **23**, 217–228 (2008).
  122. M.-J. R. P. Queiroz, S. Dias, D. Peixoto, A. R. O. Rodrigues, A. D. S. Oliveira, P. J. G. Coutinho, L. A. Vale-Silva, E. Pinto and E. M. S. Castanheira, New potential antitumoral di(hetero)arylether derivatives in the thieno[3,2-b]pyridine series: Synthesis and fluorescence studies in solution and in nanoliposomes, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **238**, 71-80 (2012).
  123. The Molecular Probes Handbook . A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. 2979-85 (2011).

124. Hine, R. *The Facts On File DICTIONARY of BIOLOGY*. Facts on File, New York (2005).
125. Care, E. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, London (2004).
126. Kell, D. B. & Harris, C. M. On the dielectrically observable consequences of the diffusional motions of lipids and proteins in membranes, *European Biophysics Journal*, **13** 181–197 (1985).