

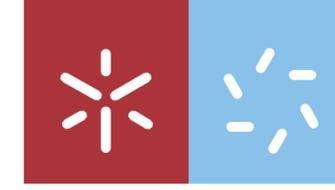


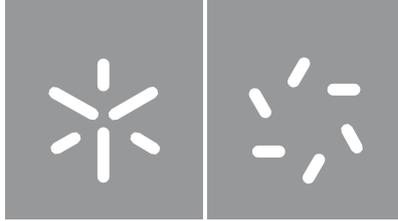
Ricardo Jorge Rodrigues Costa

Nanossistemas lipídicos contendo nanopartículas magnéticas/sulfureto de cobre para a terapia multimodal do cancro

Escola de Ciências

Universidade do Minho





Universidade do Minho

Escola de Ciências

Ricardo Jorge Rodrigues Costa

**Nanossistemas lipídicos contendo
nanopartículas magnéticas/sulfureto de cobre
para a terapia multimodal do cancro**

Tese de Mestrado

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho desenvolvido sob a orientação
de

Dr. Paulo Coutinho e

Dr. Ana Rita Oliveira Rodrigues

Outubro 2022

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais, irmãos, avós e amigos que desde sempre me motivaram para conseguir alcançar os meus objetivos pessoais e académicos. A vós o meu profundo e sincero obrigado.

Ao meu orientador Professor Dr. Paulo Coutinho por todo o conhecimento transmitido durante toda esta jornada e também por me ter aceitado na realização deste trabalho.

À minha orientadora Dr. Ana Rita Oliveira Rodrigues que me acompanhou durante toda a realização deste projeto. Agradeço a perseverança, resiliência, amizade e a enorme paciência que foram imprescindíveis para a realização deste projeto. Muito obrigado.

A todo o centro de física da Universidade do Minho e aos meus colegas de laboratório em especial aos meus colegas de mestrado Hugo, Mélanie, Ana Rita e Margarida.

“You miss 100 % of the shots you don’t take”

(Michael Scott)

Declaração de integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração da presente tese. Confirmando que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri à prática de plágio ou qualquer forma de falsificação de resultados.

Nanossistemas lipídicos contendo nanopartículas magnéticas/sulfureto de cobre para a terapia multimodal do cancro

Resumo

O desenvolvimento de bionanossistemas lipídicos para o encapsulamento de nanopartículas magnéticas, plasmónicas e fármacos antitumorais, tem-se revelado uma abordagem promissora para o tratamento do cancro.

A terapia oncológica mediada por nanopartículas (NPs) magnéticas é baseada em hipertermia, um tratamento térmico que pode ser desencadeado pela presença de campos magnéticos externos alternados. Sendo sensíveis a campos magnéticos externos, as NPs magnéticas podem ser direcionadas até à zona alvo (tumores) através de gradientes de campos magnéticos. De igual forma, as NPs plasmónicas podem atuar como agentes de fototermia quando sujeitas a irradiação com uma fonte de luz adequada.

No âmbito deste trabalho, foram sintetizadas e caracterizadas por DLS, XRD, TEM, espectroscopia de absorção e SQUID, nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês e nanopartículas plasmónicas de sulfureto de cobre. Os resultados de XRD revelaram a presença de uma fase cristalina ortorrômbica de ϵ -Fe₂O₃, para além da fase cristalina de MnFe₂O₄. O carácter superparamagnético das NPs magnéticas foi demonstrado pela técnica de SQUID, na qual se obteve uma magnetização de saturação (M_s) de 14,68 emu/g e um tamanho de 33 ± 13 nm pela técnica de TEM. Os resultados de XRD das NPs de CuS revelaram a presença predominante de uma fase cúbica de Cu₂S. A sua capacidade de geração de calor foi avaliada através de ensaios de irradiação nos quais se obteve um SAR máximo de 3764,5 W/g. O seu tamanho foi avaliado pelas técnicas de DLS, TEM e XRD no qual se obtiveram resultados inferiores a 10 nm.

De seguida foi realizado o acoplamento destas NPs obtendo-se NPs magneto-plasmónicas, sendo estas posteriormente encapsuladas em lipossomas de DPPC marcados com a sonda de *reichardt* (ET-30). Estes foram preparados pela técnica de injeção etanólica, originando magnetolipossomas plasmónicos aquosos com diâmetros de 172 nm. Por último foram realizados ensaios de aquecimento local destes bionanossistemas, nos quais se obteve um aquecimento local de 2,5°C ao fim de 2 minutos de irradiação laser (808 nm) com uma potência de 1 W/cm².

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas; nanopartículas plasmónicas; hipertermia magnética; fototermia

Lipidic nanosystems containing magnetic/copper sulfide nanoparticles for multimodal cancer therapy

Abstract

The development of lipid bionanosystems for the encapsulation of magnetic and plasmonic nanoparticles and antitumor drugs has proved to be a promising approach for the treatment of cancer.

Oncologic therapy mediated by magnetic nanoparticles (NPs) is based on hyperthermia, a thermal treatment that can be triggered by the presence of external alternating magnetic fields. Being sensitive to external magnetic fields, magnetic NPs can be directed to the target area (tumors) through magnetic field gradients. Likewise, plasmonic NPs can act as photothermal agents when subjected to irradiation with a suitable light source.

In the scope of this work, magnetic nanoparticles of manganese ferrite and plasmonic nanoparticles of copper sulfide were synthesized and characterized by DLS, XRD, TEM, absorption spectroscopy and SQUID. The XRD results revealed the presence of an orthorhombic crystalline phase of ϵ -Fe₂O₃, in addition to the crystalline phase of MnFe₂O₄. The superparamagnetic character of the magnetic NPs was demonstrated by the SQUID technique, in which a saturation magnetization (MS) of 14.68 emu/g and a size of 33 ± 13 nm were obtained by the TEM. The XRD results of the CuS NPs revealed the predominant presence of a cubic Cu₂S phase. The heat generation capacity of CuS NPs was evaluated through irradiation tests in which a maximum SAR of 3764.5 W/g was obtained. Its size was evaluated by DLS, TEM and XRD techniques, in which results smaller than 10 nm were obtained.

Next, the coupling of these NPs was performed, obtaining superparamagnetic magneto-plasmonic, which were later encapsulated in DPPC liposomes marked with the *reichardt* probe (ET-30). These were prepared using the ethanolic injection technique, originating aqueous plasmonic magnetoliposomes with diameters of 172 nm. Finally, tests of local heating of these bionanosystems were carried out, in which a local heating of 2.5 °C was obtained after 2 minutes of laser irradiation (808 nm) with a power of 1 W/cm².

Keywords: Magnetic nanoparticles; plasmonic nanoparticles; Magnetic Hyperthermia; Photothermal Therapy

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiii
Introdução.....	1
I. Nanotecnologia e Nanomedicina	2
I.1. Nanopartículas Magnéticas	3
I.1.1. Magnetismo	3
I.1.2. Nanomagnetismo.....	5
I.1.3. Métodos de Síntese.....	6
I.1.4. Aplicações biomédicas	6
I.2. Nanopartículas Plasmónicas	8
I.2.1. Tipos de NPs plasmónicas.....	9
I.2.2. Terapia fototérmica	11
I.3. Nanossistemas Lipídicos.....	12
I.3.1. Auto-Organização	12
I.3.2. Lipossomas	13
I.3.3. Aplicações biomédicas	15
I.3.4. Magnetolipossomas	16
II Materiais e métodos	18
II.1 Síntese das nanopartículas magnéticas de $MnFe_2O_4$	18
II.2 Síntese das nanopartículas plasmónicas de CuS	20
II.3 Síntese das NPs de $MnFe_2O_4/CuS$	21
II.4 Síntese dos lipossomas magneto/plasmónicos aquosos.....	22
II.5 Técnicas de caracterização fotofísica, estrutural e magnética.....	24
II.6 Ensaio de fototermia	25
II.7 Estudo do aquecimento local nos lipossomas magneto/plasmónicos	26
II.8 Sonda <i>Reichardt</i>	27

III	Resultados e Discussão	28
III.1	Caracterização das nanopartículas magnéticas.....	28
III.1.1	XRD	28
III.1.2	Espetroscopia de Absorção.....	29
III.1.3	DLS – Potencial Zeta, Tamanhos e Estabilidade	30
III.1.4	TEM.....	33
III.1.5	SQUID	34
III.1.6	Ensaio de hipertermia fototérmica	35
III.1.7	Estudo de hipertermia magnética.....	36
III.2	Caracterização das NPs plasmônicas.....	38
III.2.1	XRD	38
III.2.3	Espetroscopia de Absorção.....	39
III.2.2	DLS – Potencial Zeta, Tamanhos e Estabilidade	40
III.2.4	TEM.....	41
III.2.5	Ensaio de hipertermia fototérmica	42
III.3	Nanopartículas híbridas magneto-plasmônicas	44
III.3.2	Espetroscopia de Absorção.....	44
III.3.1	DLS – Potencial Zeta, Tamanhos e Estabilidade	45
III.3.2	SQUID	46
III.3.4	Irradiação.....	48
III.4	Caracterização dos lipossomas magneto/plasmônicos aquosos.....	50
III.4.1	Espetroscopia de Fluorescência	50
III.4.1	DLS – Potencial Zeta, Tamanhos e Estabilidade	51
III.4.3	Aquecimento local nos lipossomas magneto-plasmônicos	53
	Conclusão e perspectivas futuras.....	58
	Referências	59

Lista de Figuras

Figura 1 - Classificação da mortalidade por cancro em todo o mundo em idades < 70 anos, em 2019, pela OMS (Organização Mundial de Saúde). Adaptado [1].

Figura 2 - Representação esquemática da nanoescala e dos diferentes tipos de nanoestruturas. Adaptado [4].

Figura 3 - Representação da orientação magnética sentida pelos diferentes tipos de materiais, na ausência e presença de um campo magnético. Adaptado [7].

Figura 4 - Representação dos domínios de Weiss e paredes de Bloch em materiais ferromagnéticos. Adaptado [9, 10].

Figura 5 - Representação qualitativa da influência do tamanho nas propriedades magnéticas das nanopartículas. Adaptado [11].

Figura 6 - Efeito de Ressonância de Plasmão de Superfície (SPR). Adaptado de [19].

Figura 7 - Auto-organização de diferentes moléculas anfífilas com diferentes parâmetros de empacotamento. Adaptado [38].

Figura 8 - Classificação dos lipossomas, mediante o seu tamanho e número de bicamadas. Adaptado [38].

Figura 9 - Representação estrutural do lipossoma e dos seus compostos habitualmente encapsulados. Adaptado [45].

Figura 10 - Representação esquemática de AMLs (A) e SMLs (B).

Figura 11 - Esquematização do procedimento experimental da síntese das NPs $MnFe_2O_4$.

Figura 12 - Esquematização do procedimento experimental da síntese das NPs plasmónicas de CuS.

Figura 13 - Esquematização do processo de síntese das NPs $MnFe_2O_4$.

Figura 14 - Esquematização do procedimento experimental da síntese dos lipossomas e AMLs.

Figura 15 - Representação esquemática da montagem utilizada para a realização dos ensaios de irradiação e aquecimento.

Figura 16 - Estrutura molecular da sonda *Reichardt*.

Figura 17 - Difractograma NPs de magnéticas.

Figura 18 - Espectro de absorção das nanopartículas magnéticas.

Figura 19 - Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma (inserido) das NPs magnéticas, obtidos pela técnica de DLS.

Figura 20 – Transmitância da solução aquosa de NPs magnéticas (0,03 mg/mL) em função do tempo, determinado por DLS.

Figura 21 – Imagens de TEM, das nanopartículas magnéticas em diferentes ampliações: 1000 nm (A) e 500 nm (B). Histograma dos tamanhos ajustado a uma distribuição gaussiana (C).

Figura 22 – Ciclo de histerese das nanopartículas magnéticas. Inserido no quarto quadrante, uma ampliação da região de baixo campo.

Figura 23 – Curva de aquecimento 1 mg/mL com potência de irradiação de 1000 mW das NPs magnéticas (A); Ensaio de irradiação NPs magnéticas 1 mg/mL e 0,1 mg/mL (B)

Figura 24 – Resultados SAR NPs magnéticas. Aquecimento (A); Aquecimento/arrefecimento (B).

Figura 25 - Difractograma NPs de CuS.

Figura 26 – Espectro de absorção das NPs de CuS.

Figura 27 – Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma das NPs de sulfureto de cobre obtidos pela técnica de DLS.

Figura 28 – Transmitância da solução aquosa de NPs de CuS (0,03 mg/mL) em função do tempo, determinado por DLS.

Figura 29 – Imagens de TEM (A). NPs de sulfureto de cobre (escala: 200 nm). (B). NPs CuS (escala: 100 nm).

Figura 30 - Curva de aquecimento 1 mg/mL com potência de irradiação de 1000 mW das NPs de CuS (A); Ensaio de irradiação NPs CuS 1 mg/mL e 0,1 mg/mL (B)

Figura 31 – Espectros de absorção NPs magnéticas de ferrite de manganês, plasmónicas de sulfureto de cobre e magneto-plasmónicas.

Figura 32 – Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma das magneto-plasmónicas obtidos pela técnica de DLS.

Figura 33 – Ensaio de estabilidade, durante 1 hora, das NPs magneto-plasmónicas, determinado por DLS.

Figura 34 - Aplicação de um campo magnético à solução de NPs magneto-plasmónicas. A (t₀ min), B (t₂ min).

Figura 35 - Ciclo de histerese das nanopartículas magneto-plasmónicas. Ampliação da região de baixo campo (quarto quadrante).

Figura 36 - Curva de aquecimento 1 mg/mL com potência de irradiação de 1000 mW das NPs magneto-plasmónicas (A); Ensaio de irradiação NPs magneto-plasmónicas 1 mg/mL e 0,1 mg/mL (B)

Figura 37 - Espectros de Fluorescência dos Lipossomas e lipossomas magneto-plasmônicos, marcados com rodamina.

Figura 38 – Distribuição dos tamanhos e respectivos correlogramas dos magnetolipossomas plasmônicos (A) e lipossomas (B) obtidos pela técnica de DLS.

Figura 39 - Ensaio de estabilidade durante 1 hora dos magnetolipossomas plasmônicos (A) e lipossomas (B) determinado por DLS.

Figura 40 – Variação dos espectros de absorção (A) dos magnetolipossomas plasmônicos aquecidos com recurso ao banho-maria; (B) com recurso a irradiação laser.

Figura 41 - Variação dos espectros de absorção ajustados (A) dos magnetolipossomas plasmônicos aquecidos com recurso ao banho-maria; (B) com recurso a irradiação laser.

Figura 42 - Variação da temperatura ajustada dos magnetolipossomas plasmônicos com irradiação laser.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Propriedades do lipídio DPPC. Estrutura, carga e temperatura de transição.

Tabela 2 - Propriedades estruturais das NPs magnéticas determinadas pela técnica de XRD.

Tabela 3 - Tamanho, potencial zeta e polidispersividade das NPs magnéticas determinados por DLS

Tabela 4 - Campo coercivo (H), magnetização remanescente (M_R), magnetização de saturação (M_S) e razão entre M_R e M_S (M_R/M_S) das NPs $MnFe_2O_4$.

Tabela 5 - Ensaio de fototermia das nanopartículas magnéticas

Tabela 6 - Propriedades estruturais das NPs de CuS determinadas pela técnica de XRD.

Tabela 7 – Tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e polidispersividade das NPs de CuS determinados por DLS.

Tabela 8 – Ensaio de fototermia das NPs de CuS

Tabela 9 – Tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e polidispersividade das NPs magneto-plasmónicas determinados por DLS.

Tabela 10 – Campo coercivo (H), magnetização remanescente (M_R), magnetização de saturação (M_S) e razão entre M_R e M_S (M_R/M_S) das NPs magneto-plasmónicas

Tabela 11 – Ensaio de fototermia das NPs magneto-plasmónicas

Tabela 12 – Tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e polidispersividade dos magnetolipossomas plasmónicos e lipossomas determinados por DLS.

Lista de Abreviaturas

- AMLs** – Magnetolipossomas Aquosos (do inglês, Aqueous Magnetoliposomes)
- DLS** – Dispersão Dinâmica de Luz (do inglês, Dynamic Light Scattering)
- DPPC** – Dipalmitilfosfatidilcolina
- GUVs** – Vesículas Unilamelares Gigantes (do inglês, Giant Unilamellar Vesicles)
- LUVs** – Vesículas Unilamelares Grandes (do inglês, Large Unilamellar Vesicles)
- M_r** – Magnetização remanescente
- M_s** – Magnetização de saturação
- MLVs** – Vesículas Multilamelares (do inglês, Multilamellar Vesicles)
- MVVs** – Vesículas Multivesiculares (do inglês, Multivesicular Vesicles)
- NPs** – Nanopartículas
- PEG** – Polietilenoglicol
- Rh-DOPE** – Dioleoilfosfotidiletanolamina marcado com rodamina
- SAR** – Taxa de absorção específica (do inglês, Specific Absorption Rate)
- SERS** – Dispersão Raman de Superfície (do inglês, Surface-enhanced Raman scattering)
- SMLs** – Magnetolipossomas Sólidos (do inglês, Solid Magnetoliposomes)
- SPR** – Ressonância de plasmão de superfície (do inglês, Surface Plasmon Resonance)
- SQUID** – Dispositivo Supercondutor de Interferência Quântica (do inglês, Superconducting Quantum Interference Device)
- SUVs** – Vesículas Unilamelares Pequenas (do inglês, Small Unilamellar Vesicles)
- TEM** – Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês, Transmission Electron Microscopy)
- XRD** – Difração Raios X (do inglês, X-Ray Diffraction)

Introdução

A principal motivação deste trabalho surge da necessidade e urgência do desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento do cancro. Assim, pretende-se tirar partido da evolução da nanomedicina para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, para substituir metodologias convencionais que apresentam pouca especificidade e muitos efeitos secundários.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2019, o cancro foi considerado a primeira ou segunda causa de morte, em 112 dos 193 países do mundo, em pessoas com idades inferiores a 70 anos como se pode observar pela distribuição demográfica apresentada na figura 1. Segundo a Agência Internacional para o Estudo do Cancro IARC (do inglês, International Agency for Research on Cancer), em 2020, foram registados 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes por cancro, sendo o cancro da mama e do pulmão os mais comuns e responsáveis por mais de 20 % do total de casos registados [1].

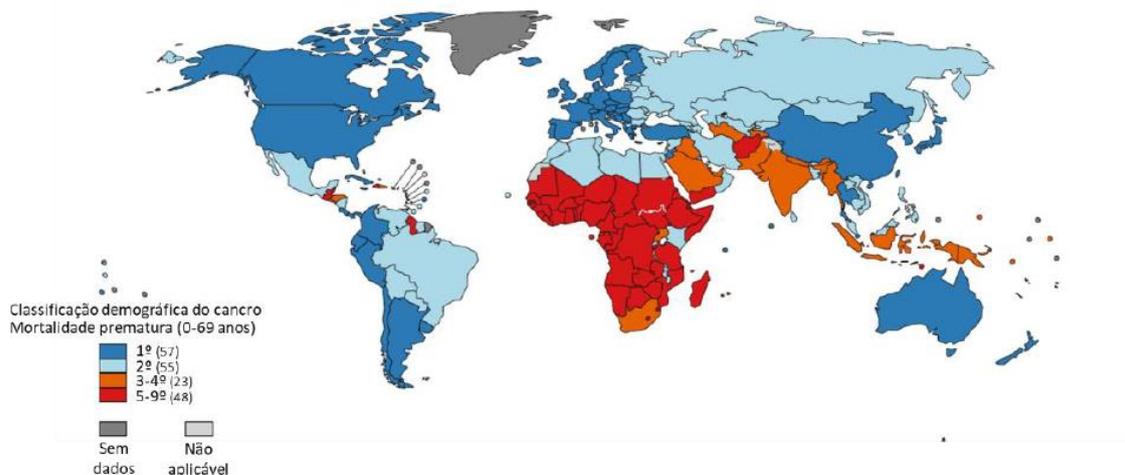


Figura 1 – Classificação da mortalidade por cancro em todo o mundo em idades < 70 anos, em 2019, pela OMS (Organização Mundial de Saúde). Adaptado de [1]

I. Nanotecnologia e Nanomedicina

Explorando as propriedades dos diferentes tipos de nanomateriais, a nanotecnologia é uma das áreas científicas mais promissoras do século XXI. Pode ser definida como a capacidade de manipulação de materiais à escala nanométrica (1-100 nm), tirando proveito dos efeitos emergentes da diminuição do tamanho dos materiais para desenvolver nanossistemas inteligentes, como por exemplo, NPs e lipossomas representados na figura 2, para as mais diversas aplicações. Mencionada pela primeira vez por Richard Feynman, em 1959, o interesse pela área propagou-se até aos dias de hoje onde continua o seu desenvolvimento [2].

A nanomedicina é uma área derivada da nanotecnologia aliada à medicina que tem como finalidade criar e melhorar terapias favorecendo a saúde da humanidade. É uma área altamente interdisciplinar que se rege pelos esforços conjuntos de físicos, biólogos, químicos e profissionais de saúde. Na última década, tem despertado a curiosidade de vários centros científicos para a investigação e desenvolvimento de novos tratamentos e métodos de diagnóstico, sendo o cancro uma das doenças mais abordados nesta temática [3].

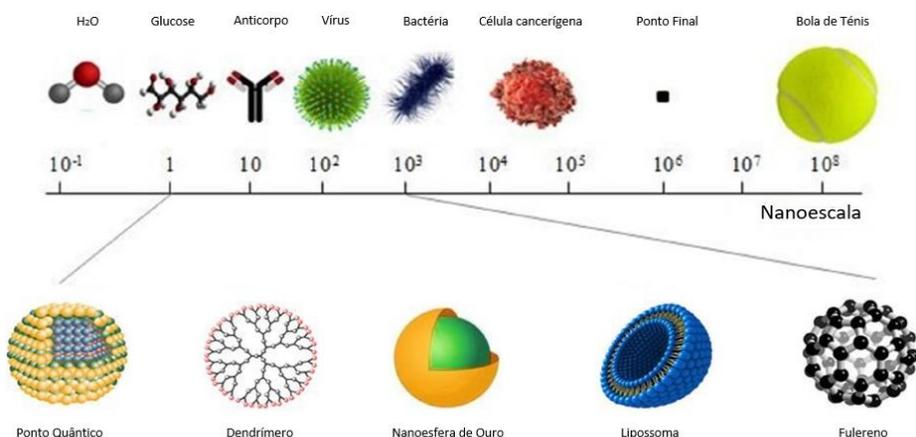


Figura 2 - Representação esquemática da nanoescala e dos diferentes tipos de nanoestruturas. Adaptado de [4].

I.1. Nanopartículas Magnéticas

As propriedades das NPs para a área da nanomedicina têm vindo a ser muito investigadas em virtude da diversidade de aplicações que possuem, como por exemplo, desenvolvimento de biossensores, imagiologia e entrega controlada de fármacos. A natureza das NPs magnéticas permite a manipulação da sua localização, utilizando gradientes de campos magnéticos externos, e geração de calor, sob ação de campos magnéticos alternados. Desta forma, este tipo de NPs alargam a possibilidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, nomeadamente para o tratamento do cancro [5].

A utilização destas NPs enquanto agentes de terapia requer o entendimento das consequências implicadas na diminuição do seu tamanho para a escala nanométrica, em relação ao “*bulk*” dos seus materiais, bem como da forma como são sintetizadas, uma vez que o seu tamanho afeta as suas propriedades [6].

I.1.1. Magnetismo

A natureza magnética dos materiais pode ser classificada em três classes distintas, materiais ferromagnéticos, paramagnéticos e diamagnéticos. Os primeiros possuem uma grande quantidade de eletrões de valência desemparelhados, conferindo-lhes uma grande suscetibilidade magnética (grandeza adimensional que indica o grau de magnetização de um material em resposta à aplicação de um campo magnético externo), que decai com o aumento da temperatura. Estes materiais apresentam uma magnetização espontânea dividida em diferentes regiões denominadas por domínios magnéticos ou domínios de Weiss, na ausência de um campo magnético externo. Os domínios de Weiss são regiões num material magnético na qual os momentos magnéticos de todos os seus eletrões estão alinhados na mesma direção. A razão pela qual existe a formação destes domínios, ao invés do material possuir a mesma magnetização em toda a sua constituição, é porque esta conformação estrutural permite a minimização da sua energia magnetostática [7]. Dos objetos vulgarmente mais conhecidos compostos por materiais ferromagnéticos podemos destacar os ímanes. Tal como os materiais ferromagnéticos, os materiais paramagnéticos possuem eletrões desemparelhados, contudo em menor quantidade, conferindo-lhes uma suscetibilidade magnética positiva muito inferior. Estes materiais só apresentam magnetização na

presença de um campo magnético externo, caso contrário os seus dipolos magnéticos encontram-se desalinhados e o momento magnético total é nulo. Por último, os materiais diamagnéticos possuem todas as suas camadas eletrônicas completas, logo, o seu momento magnético total é zero dado que todos os elétrões estão emparelhados. Na presença de um campo magnético, estes materiais tendem a sentir uma força de repulsão fraca que resulta numa suscetibilidade magnética negativa, constante com o aumento da temperatura [8]. Na figura 3 podemos observar o efeito sentido, na presença e ausência de um campo magnético, pelos diferentes tipos de materiais.

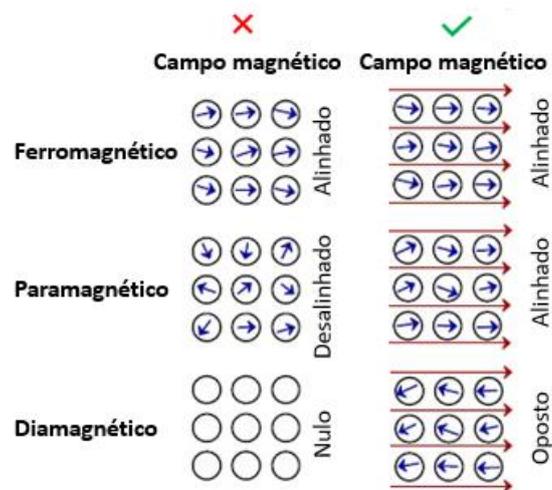


Figura 3 - Representação da orientação magnética sentida pelos diferentes tipos de materiais na ausência e presença de um campo magnético. Adaptado de [9].

O magnetismo dos materiais “*bulk*” é função de três tipos de energia diferentes: energia de troca, energia de anisotropia e a energia magnetostática. A energia de troca é responsável pelo comportamento ferromagnético, enquanto a energia de anisotropia é responsável pela limitação da largura das paredes de Bloch (região de interface que separa dois domínios magnéticos vizinhos). Por sua vez, a energia magnetostática é responsável pela formação de domínios de Weiss[10]. A figura 4 é uma representação da formação destes domínios com diferentes orientações magnéticas.

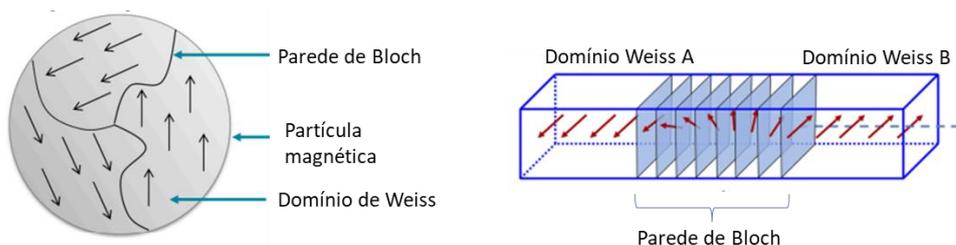


Figura 4 - Representação dos domínios de Weiss e paredes de Bloch em materiais ferromagnéticos. Adaptado de [11, 12]

I.1.2. Nanomagnetismo

O comportamento magnético dos materiais varia de acordo ao seu tamanho. Com a diminuição do tamanho, a partir de um certo valor denominado por diâmetro crítico, passa a ser energeticamente mais dispendioso formar uma parede de Bloch do que suportar a energia magnetostática de um sistema de domínio único. Assim, abaixo deste diâmetro crítico, a configuração de domínio único passa a ser mais favorável. A temperatura de bloqueio é um outro fator importante na formação destes domínios únicos sendo que acima desta, as NPs passam de um estado termicamente estável (bloqueado) para um regime superparamagnético. Abaixo do diâmetro crítico, e acima da temperatura de bloqueio, os materiais ferromagnéticos apresentam um comportamento superparamagnético na qual passam de uma configuração magnética de multi domínio para domínio único caracterizado pela ausência de histerese e baixa coercividade como mostra a figura 5 nos ciclos de histerese representados a verde e azul [10].

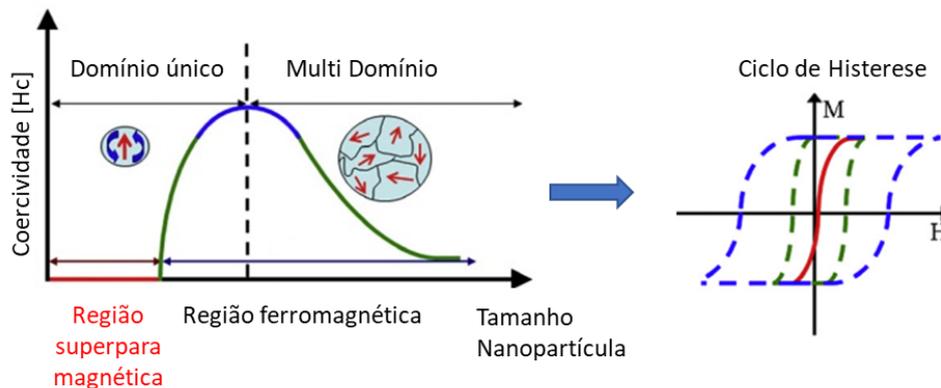


Figura 5 - Representação qualitativa da influência do tamanho nas propriedades magnéticas das nanopartículas. Adaptado de [13]

Este comportamento superparamagnético (à temperatura ambiente) é um dos principais atributos das NPs magnéticas que favorece o seu uso em aplicações biomédicas. Na presença de um campo magnético externo, a elevada magnetização de saturação destas NPs permite um transporte direcionado mais eficaz, e uma maior capacidade de geração de calor. Adicionalmente, na ausência do campo magnético as NPs não apresentam uma magnetização apreciável, ou seja, a sua remanescência é perto de zero. Assim, é de extrema relevância que as NPs utilizadas para o desenvolvimento dos magnetolipossomas apresentem um comportamento superparamagnético e que possuam uma boa magnetização de saturação [14].

I.1.3. Métodos de Síntese

De um modo geral, o tipo de materiais usados para a produção de NPs magnéticas abrangem o uso de elementos químicos como o Fe, Co, Mn e o Ni e ainda algumas ligas metálicas, como por exemplo, FeCo. Apesar da elevada magnetização deste tipo de NPs magnéticas, a toxicidade e carácter oxidativo associada a alguns destes elementos enviesam a sua utilização no âmbito do desenvolvimento de aplicações biológicas. Em ambiente clínico as soluções coloidais de NPs magnéticas de óxidos de ferro oferecem a opção mais biocompatível, quimicamente estável, menos tóxica e monetariamente mais acessível, além de boas propriedades magnéticas. O tipo de ferrites mais usadas para a produção de NPs magnéticas são a magnetite (Fe_3O_4) e a sua forma oxidada maguemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Neste trabalho foram sintetizadas NPs magnéticas de ferrite de manganês (MnFe_2O_4). A utilização deste tipo de partículas oferece vantagens para aplicações em tratamentos médicos, uma vez que as NPs magnéticas de ferrite de manganês apresentam uma elevada susceptibilidade magnética, comportamento superparamagnético (a temperatura ambiente) e boa biocompatibilidade [15].

Atualmente, existem vários métodos para sintetizar NPs magnéticas como a coprecipitação, microemulsão, decomposição térmica, deposição química em fase de vapor (CVD) entre outras. Um dos métodos mais vulgares, reprodutíveis e expeditos para a síntese de NPs é a coprecipitação e foi o escolhido para realizar a síntese das NPs magnéticas neste trabalho. A coprecipitação consiste na reação de uma solução contendo os precursores metálicos com um agente que promove a formação de óxidos, tipicamente uma base forte, à temperatura ambiente ou a temperaturas elevadas [16].

I.1.4. Aplicações biomédicas

A utilização de NPs magnéticas para fins biomédicos tem-se manifestado cada vez mais interessante, dado que este tipo de nanomaterial tem demonstrado ser promissor para o tratamento e diagnóstico do cancro. No que diz respeito ao diagnóstico, a aplicação mais conhecida do uso de NPs magnéticas é como agentes de contraste para imagem por ressonância magnética. É uma técnica de imagiologia não invasiva e não destrutiva, que se baseia na utilização das NPs como agentes de contraste através da diminuição dos tempos de relaxação dos prótons

da água presente nos tecidos do corpo humano [17]. Por outro lado, as NPs magnéticas também têm sido amplamente estudadas para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, como direcionamento magnético e entrega controlada de fármacos e enquanto agentes de hipertermia magnética.

A hipertermia é um método de terapia que se baseia na geração local de calor, tipicamente com um aumento da temperatura do tecido tumoral entre os 41- 46 °C, promovendo a apoptose das suas células sem danificar os tecidos saudáveis circundantes. O tratamento por hipertermia magnética pode ser mediado por NPs magnéticas que, na presença de um campo magnético externo alternado, têm a capacidade de converter a energia magnética em calor. Existem dois mecanismos pelos quais as NPs superparamagnéticas podem gerar calor:

- (i) os relaxamentos Brownianos, que estão associados à dissipação de energia rotacional entre as nanopartículas e o meio envolvente. Este mecanismo de relaxamento depende da viscosidade do fluido circundante e do volume das NPs pela relação: $\tau_B = \frac{3\eta V_H}{K_B T}$ Equação 1

τ_B – Tempo de relaxação Browniano

η - Viscosidade

V_H - Volume hidrodinâmico da partícula magnética

K_B – Constante de Boltzmann

T – Temperatura

- (ii) os relaxamentos de Néel, que envolvem a inversão do momento magnético das NPs e são exponencialmente dependentes da anisotropia e volume das NPs, conforme descrito pela relação: $\tau_N = \tau_0 \cdot e^{\frac{KV}{K_B T}}$ [18]. Equação 2

τ_N – Tempo de relaxação Néel

τ_0 - Frequência de inversão

V – Volume da nanopartícula

K - Constante de anisotropia

K_B – Constante de Boltzmann

T – Temperatura

A taxa de absorção específica (SAR, do inglês *specific absorption rate*) é um parâmetro fundamental que determina a capacidade de geração de calor local, medindo a quantidade de energia magnética convertida em calor por unidade tempo e massa.

Ao longo da última década, estudos *in vivo* têm demonstrado que o tratamento de tumores por hipertermia, mediada por NPs magnéticas, é eficaz na morte das células tumorais. Resultados de várias investigações demonstram que a ação terapêutica resulta não só do sobreaquecimento do tecido tumoral, mas do desencadear de respostas imunológicas, tornando esta abordagem terapêutica mais eficaz [19].

Em 2020 o autor Albarqi et al.,[18] demonstrou, em ensaios *in vivo*, que a utilização de uma formulação de *nanoclusters* baseados em NPs de óxidos de ferro dopadas com zinco e manganês (ZnMn-IONCs) promovia uma redução significativa do volume tumoral (1500 mm³) de uma linha celular de cancro da próstata (DU145). O estudo foi realizado em ratos portadores deste tipo de cancro aos quais foi administrada intravenosamente esta nanoformulação. Estes foram expostos a um campo magnético externo (420 kHz, 26.9 kA/m) que promoveu um aumento de temperatura intratumoral até 42°C (temperatura de hipertermia).

O tratamento do cancro por hipertermia magnética fornece uma alternativa mais localizada, menos invasiva e agressiva do que as terapias convencionais. Assim, o potencial desta terapia para o tratamento do cancro despertou o interesse para o desenvolvimento de novos nanossistemas baseados em NPs magnéticas para mitigar os efeitos nefastos provocados pela quimioterapia tradicional [20].

I.2. Nanopartículas Plasmónicas

Recentemente, o uso de NPs plasmónicas para o tratamento de tumores tem recebido especial atenção, uma vez que podem também ser utilizadas para promover o aquecimento da zona tumoral, quando sujeitas a irradiação. A ação combinada entre as NPs plasmónicas e NPs magnéticas produz um efeito sinérgico que potencia a geração de calor.

As NPs plasmónicas são capazes de produzir calor devido ao efeito SPR (do inglês, Surface Plasmon Resonance)[21]. Este, pode ser entendido como a oscilação coletiva dos eletrões de

superfície, resultantes da incidência de radiação eletromagnética de frequência igual a de oscilação natural dos elétrões. Este fenómeno é responsável por uma absorção intensa da radiação por parte das NPs, como pode ser observado na figura 6. O SPR depende de vários fatores, como por exemplo, do tipo de material (por exemplo: ouro e prata), forma e tamanho das NPs, e propriedades do meio onde estão inseridas [22].

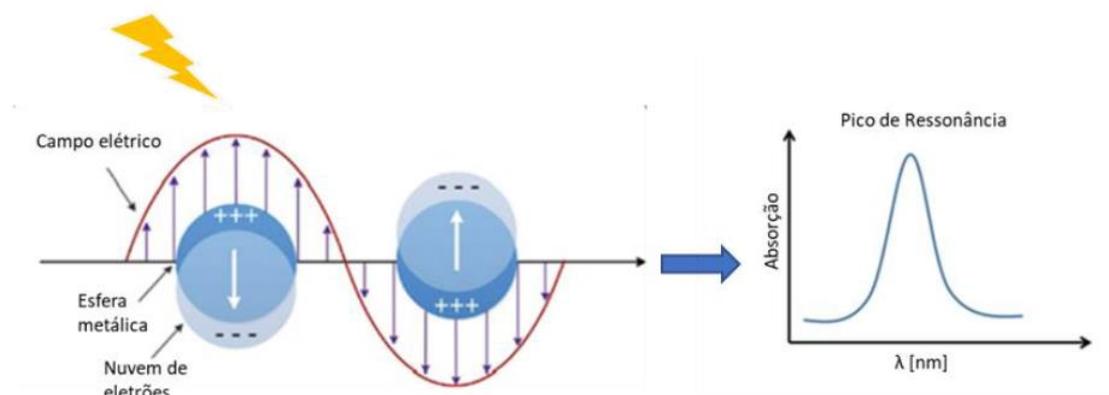


Figura 6 - Efeito de Ressonância de Plasmão de Superfície (SPR). Adaptado de [22]

As NPs plasmónicas, são caracterizadas pela capacidade de conversão de luz em calor, através do decaimento de energia por processos não radiativos. Assim, este tipo de materiais promovem um tratamento por hipertermia fototermica, na presença de irradiação de luz [23].

1.2.1. Tipos de NPs plasmónicas

O tipo de NPs plasmónicas mais estudadas atualmente são as de ouro (Au), devido à sua elevada biocompatibilidade, baixa toxicidade e fácil conjugação com moléculas biológicas que permitem a sua aplicação em imagiologia, entrega controlada de fármacos e teranóstico [23]. As NPs plasmónicas de prata (Ag) também tem recebido especial atenção, devido às suas propriedades óticas que permitem o desenvolvimento de biossensores podendo ainda ser usadas como substrato para espectroscopia raman (SERS) [24]. Mais recentemente, para além do ouro e da prata, também as NPs de sulfureto de cobre têm sido investigadas. O estudo deste tipo de NPs para aplicações de eletrónica e ótica foi já extensivamente descrita na literatura [25]. Todavia, apenas na última década têm emergido como uma alternativa a outros tipos de NPs plasmónicas para aplicações biológicas [26].

Apesar das boas características que as NPs de ouro apresentam, o uso de NPs de sulfureto de cobre (CuS) oferece alternativas que mitigam alguns dos problemas associados ao uso do ouro para a realização da terapia fototérmica, como por exemplo, sínteses demoradas, custo elevado, dependência do tamanho, forma e meio envolvente nas capacidades de absorção de radiação [27, 28]. Com tamanhos muito reduzidos, tipicamente entre os 10-15 nm, é possível obter uma funcionalização mais eficiente da sua superfície com fármacos antitumorais bem como uma maior internalização nas células cancerígenas [27, 29].

O sulfureto de cobre é um material semiconductor com boas propriedades óticas e elétricas que tem vindo a ser explorado para várias aplicações, desde a fotodegradação de poluentes, deteção de metabolitos (glucose) e biomoléculas (DNA), até ao uso para o tratamento do cancro onde as suas propriedades de geração de calor são utilizadas [30]. As NPs de CuS podem existir sob 5 formas químicas diferentes alterando a razão entre Cu/S. As formas mais usuais são: covelite (CuS), anilite ($\text{Cu}_{1.75}\text{S}$), digenite ($\text{Cu}_{1.8}\text{S}$), djurlite ($\text{Cu}_{1.95}\text{S}$) e calcocite (Cu_2S)[31].

Sendo o sulfureto de cobre um material semiconductor tipo p, o efeito plasmonico característico destas NPs resulta da grande mobilidade de lacunas presentes no material. As várias razões estequiométricas referidas exibem efeitos plasmónicos sendo a covelite (CuS) a que apresenta a maior concentração de lacunas na banda de valência que origina uma forte absorção de radiação. Como resultado, as NPs de CuS apresentam uma banda de absorção perto do infravermelho que não é afetada de forma significativa pela morfologia das NPs, facilitando o seu uso e manipulação. Desta forma, podem promover a geração de calor por decaimentos não radiativos, após serem irradiadas por uma fonte de laser com comprimento de onda perto do infravermelho [28, 31–33].

I.2.2. Terapia fototérmica

À semelhança da hipertermia magnética, a terapia fototérmica é uma forma de tratamento baseada no sobreaquecimento local de tecidos malignos, sendo uma alternativa inovadora e promissora para o tratamento do cancro. No entanto, enquanto na hipertermia magnética são usados campos magnéticos alternados para promover a geração de calor por parte das NPs magnéticas, a terapia fototérmica baseia-se na absorção de radiação perto do infravermelho (do inglês, *Near Infrared*, NIR). Assim, são usadas fontes de irradiação NIR de modo comprometer a viabilidade das células cancerígenas pela geração local de calor [34]. Este tipo de terapia oferece uma solução de baixo custo, minimamente invasiva, com boa especificidade e baixa toxicidade, relativamente a outros tipos de tratamento como a quimioterapia convencional [35].

A absorção de radiação pode, em condições de irradiação com energias elevadas, provocar a desintegração total das células cancerígenas, que por sua vez desencadeiam respostas inflamatórias, e podem prejudicar o tratamento. Atualmente, é possível controlar este processo de modo que ao invés de provocar a necrose das células cancerígenas, induzir a morte celular controlada (apoptose) prevenindo respostas inflamatórias [35].

Estudos *in vitro* foram já reportados utilizando NPs de CuS para o tratamento de tumores, em 2017 Hou et al [36], demonstrou a eficácia da utilização destas partículas como agentes de terapia fototérmica irradiando (808 nm, de 2 W.cm², 30 segundos) uma nanoformulação contendo NPs ocas de CuS de concentração 100 mg/kg que permitiu inibir em 74,8 % linhas celulares do cancro da mama MCF-7. Em 2018 Wang et al [37], obteve uma taxa de inibição de crescimento tumoral (TGI, do inglês Tumor Growth Inhibition) de 100 % de linhas celulares de melanoma B16-F10 através da irradiação (1064 nm, 1 W.cm², 10 minutos) de uma nanoformulação de NPs de CuS contendo doxorrobicina [37].

O uso combinado de hipertermia magnética e fototermia mediada por NPs magnéticas e plasmónicas, respetivamente, realça o efeito terapêutico exacerbando a citotoxicidade das células cancerígenas do qual resulta uma terapia mais eficaz do que o seu uso individual. O uso destes nanohíbridos tem sido também investigado para aplicações de teranóstico contudo o seu uso combinado é ainda uma área pouco explorada [38].

I.3 Nanossistemas Lipídicos

I.3.1. Auto-Organização

A auto-organização é um processo dinâmico e reversível, característico de moléculas anfífilas constituídas por uma parte hidrofílica e uma parte hidrofóbica. É responsável pela formação de agregados moleculares, e resulta do balanço energético entre as interações eletrostáticas, hidrofílicas/hidrofóbicas, de Van der Waals e ligações de hidrogénio, para minimizar a energia do sistema. As interações hidrofílicas/hidrofóbicas são um processo de solvatação que está associada às variações estruturais da água em torno das partes apolares da molécula (energeticamente desfavorável), e as atrações hidrofóbicas das partes polares da molécula (energeticamente favorável). Este tipo de interações são de longo alcance, entre moléculas de soluto induzidas pelo solvente, sendo energeticamente mais favorável a proximidade de moléculas hidrofóbicas do que a sua separação [39].

Em 1917 Langmuir descobriu que, em contacto com água, os lípidos formavam monocamadas. Mais tarde, em 1920, Mc Bain e Salmon propuseram a formação de micelas e, em 1925, Gorter e Grendel descobriram que os lípidos podiam formar vesículas [40]. Após estas descobertas, estudos sobre polimorfismo lipídico resultaram na descoberta de várias estruturas lipídicas. Diferentes estruturas podem ser obtidas através da variação de parâmetros como a estrutura e concentração dos lípidos, grau de hidratação, temperatura e fator de empacotamento[40]. O fator de empacotamento (p) é um parâmetro muito importante que determina o tipo e fase da estrutura lipídica final. Este fator pode ser calculado através da equação 3,

$$p = \frac{V}{L \cdot a} \quad \text{Equação 3}$$

onde V , L e a representam o volume, o comprimento da cauda do lípido e a área da secção transversal da cabeça do lípido, respetivamente. Tendo em conta a natureza dos lípidos, o fator de empacotamento pode tomar valores diferentes, alterando o tipo e a fase de estrutura que resultam do processo de auto-organização [41]. Lípidos com fatores de empacotamento $p < 1/3$ apresentam tendência de formação de estruturas esféricas, por exemplo micelas normais. Para valores de fator de empacotamento $1/3 < p < 1/2$, formam-se micelas cilíndricas. Entre valores

de $1/2 < p < 1$, formam-se estruturas do tipo lipossomas. Por sua vez, para fatores de empacotamento $p = 1$, são originadas bicamadas lamelares, enquanto para valores superiores a 1 se formam micelas invertidas [42]. Estas estruturas podem ser observadas na figura 7.

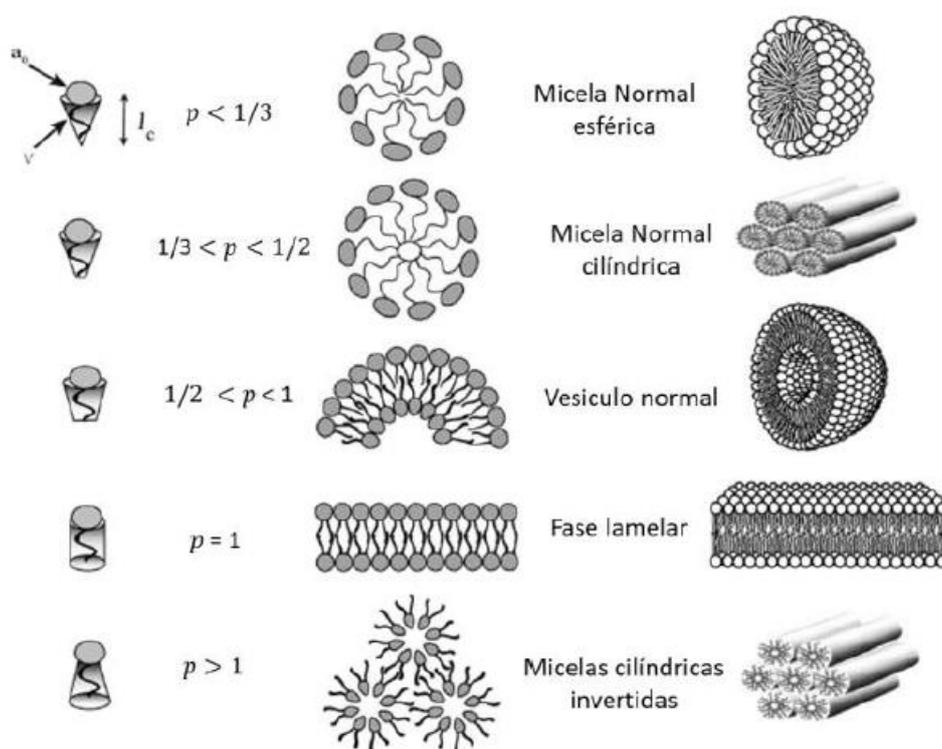


Figura 7 - Auto-organização de diferentes moléculas anfífilas com diferentes parâmetros de empacotamento. Adaptado de [42].

1.3.2. Lipossomas

Descobertos pela primeira vez na década de 60 pelo biofísico Alec Bangham, os lipossomas tornaram-se num dos bionanossistemas mais promissores para entrega controlada de fármacos [43]. São constituídos por bicamadas lipídicas concêntricas com um interior aquoso, e podem ser classificados de acordo com o seu tamanho, número de bicamadas e carga superficial.

Em relação ao tamanho, os lipossomas podem ser classificados como:

- (i) Vesículas unilamelares pequenas (SUVs, do inglês Small Unilamellar Vesicles), com tamanhos inferiores a 200 nm;
- (ii) Vesículas unilamelares grandes (LUVs, do inglês Large Unilamellar Vesicles), com tamanhos entre os 200 e 1000 nm;

- (iii) Vesículas unilamelares gigantes (GUVs, do inglês Giant Unilamellar Vesicles), com tamanhos superiores a 1000 nm.

Relativamente ao número de bicamadas, além de unilamelares, os lipossomas podem ser classificados em vesículas multilamelares (MLVs, do inglês Multilamellar Vesicles) e vesículas multivesiculares (MVVs, do inglês Multivesicular Vesicles), ambas com tamanhos superiores a 1000 nm [42]. A classificação dos lipossomas de acordo com o tamanho e número de camadas está representada na figura 8.

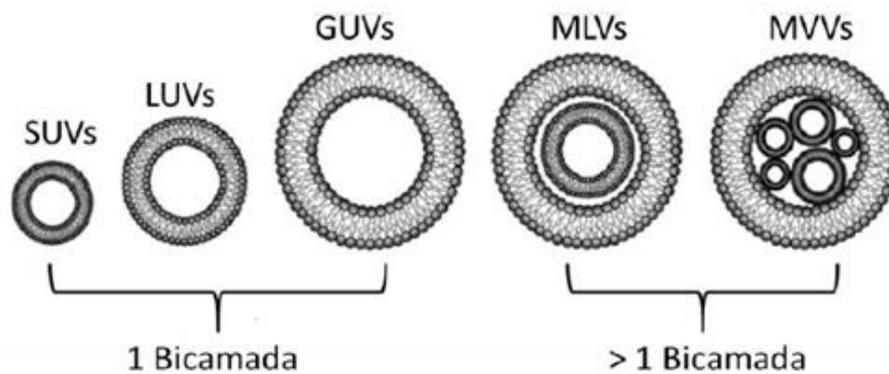
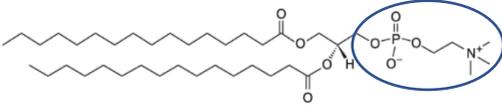


Figura 8 - Classificação dos lipossomas, mediante o seu tamanho e número de bicamadas. Adaptado de [42].

Além do tamanho e número de bicamadas, os lipossomas podem também ser classificados de acordo com a carga dos seus grupos fosfato em catiónicos, aniónicos e neutros ou zwitteriónicos. Os lípidos catiónicos possuem carga positiva e têm um papel relevante na terapia genética como vetor de transfeção [43]. Os lípidos aniónicos apresentam carga negativa e apesar de constituírem apenas 20 % da monocamada interna das células eucariotas tem o papel de manterem o seu potencial eletrostático[44]. Ambos os lípidos neutros e zwitteriónicos têm uma carga total de zero, contudo existem diferenças estruturais nos seus grupos fosfatos que os distinguem. Em lípidos neutros os grupos fosfato possuem carga neutra ao contrário dos zwitteriónicos que possuem na sua composição grupos catiónicos e aniónicos em proporções semelhantes que lhes conferem um carácter neutro [45]. O DPPC (1,2-dipalmitol-sn-glicero-3-fosfatidilcolina) foi o lípido utilizado neste trabalho para a síntese dos magnetolipossomas aquosos (AMLs), e é um exemplo de um lípido zwitteriónico como pode ser consultado na tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades do lipídio DPPC. Estrutura, carga e temperatura de transição

Estrutura	Carga	Temperatura de Transição
 <p data-bbox="276 510 558 584">dipalmitilfosfatidilcolina (DPPC)</p>	Zwiteriônico	42°C [46]

1.3.3. Aplicações biomédicas

A capacidade para encapsular fármacos hidrofílicos ou lipofílicos, NPs e material genético aliada à boa biocompatibilidade e facilidade de fusão celular, conferem aos lipossomas características de excelência para o seu uso como “veículo” de entrega de fármacos [47]. O encapsulamento de fármacos e NPs nos lipossomas previne que estes sejam degradados por fenômenos enzimáticos e imunológicos, evitando a sua destruição e consequente redução do efeito terapêutico. Contudo, continua a ser necessário desenvolver estratégias que dificultem o reconhecimento destas estruturas pelo sistema imunitário. Assim, o desenvolvimento de estratégias que previnam a identificação e eliminação precoce dos lipossomas da corrente sanguínea é fundamental. A funcionalização da superfície destes sistemas com materiais poliméricos, como o polietilenoglicol (PEG), constitui uma abordagem comum usada para evitar a sua degradação antes de atingirem os seus alvos [48]. A imagem da figura 9 representa a morfologia do lipossoma bem como os componentes que esta estrutura é capaz de transportar.

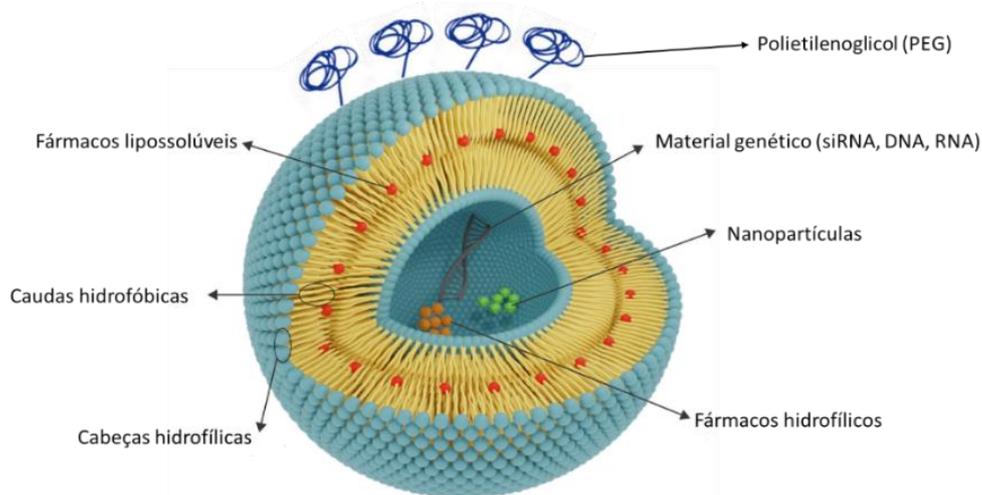


Figura 9 - Representação estrutural do lipossoma e dos seus compostos habitualmente encapsulados. Adaptado de [49]

Recentemente o autor Zhang et al [50], reportou o uso de uma nanoformulação lipossomal funcionalizada com polietilenoglicol contendo os fármacos antitumorais doxorrubicina e lactoferrina (Lf-liposome-dox) para o tratamento do cancro pela redução do efeito de hipoxia característico de tumores sólidos. Através de microscopia confocal e citometria de fluxo comprovou-se a elevada acumulação celular desta nanoformulação essencial para o produzir efeito terapêutico desejado. A injeção intravenosa desta nanoformulação, avaliada por imagiologia fotoacústica *in vivo*, demonstrou que a lactoferrina presente nos lipossomas era capaz de catalisar a conversão de H_2O_2 para oxigénio reduzindo a hipoxia do microambiente tumoral em células tumorais do cancro da mama da linha celular 4t1 [50].

1.3.4. Magnetolipossomas

Existem dois tipos distintos de magnetolipossomas: os magnetolipossomas aquosos (AMLs) e os magnetolipossomas sólidos (SMLs). Os AMLs possuem um interior aquoso que possibilita o transporte de fármacos e NPs com propriedades hidrofílicas, podendo também realizar o transporte de compostos de natureza lipofílica na membrana do lipossoma. Contudo, as suas propriedades magnéticas como a magnetização de saturação (M_s) tem tendência a ter valores inferiores comparativamente aos SMLs, o que dificulta a sua manipulação por campos magnéticos

externos. Os SMLs possuem um interior sólido preenchido com nanopartículas magnéticas, conferindo-lhes melhores propriedades magnéticas. No entanto, devido à sua configuração estrutural, apenas poderão fazer o transporte de compostos lipofílicos no interior da membrana dos lipossomas dada a ausência de água no seu interior. A figura 10 representa os dois tipos de magnetolipossomas [51–53].

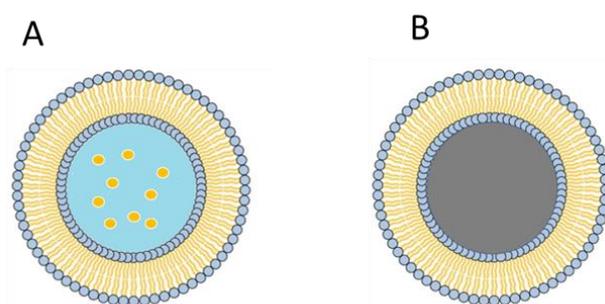


Figura 10 – Representação esquemática de AMLs (A) e SMLs (B)

Os magnetolipossomas plasmônicos constituem um sistema promissor que conjuga lipossomas com NPs magnéticas e plasmônicas. Este tipo de sistemas têm vindo a ser explorados recentemente para aplicações biomédicas, nomeadamente no tratamento do cancro por hipertermia magnética/fototerapia e entrega controlada de fármacos (*drug delivery*). Aplicando gradientes de campos magnéticos externos e irradiação laser, é possível fazer o transporte dos magnetolipossomas até às zonas alvo e realizar o tratamento combinado de hipertermia (magnética e fototérmica) bem como a entrega localizada de fármacos maximizando assim o efeito terapêutico [54]. Apesar dos escassos estudos *in vivo* que reportam o uso destes nanohíbridos a sua síntese e caracterização já é realizada por diversos grupos científicos [55].

Recentemente o autor Irina S. R. Rio et al [56], demonstrou o uso de magnetolipossomas plasmônicos compostos por NPs de ferrite de manganês decoradas com NPs de ouro e em formato core-shell, encapsulando lactonas tricíclicas como potencial novo fármaco antitumoral para a terapia combinada do cancro.

II Materiais e métodos

Neste capítulo, serão apresentados os processos de síntese das diferentes nanopartículas, do seu encapsulamento em lipossomas, e apresentadas as técnicas de caracterização utilizadas. Neste trabalho, foram sintetizados dois tipos distintos de nanopartículas:

- i. Nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês (MnFe_2O_4)
- ii. Nanopartículas plasmónicas de sulfureto de cobre (CuS).

Após a preparação das nanopartículas magnéticas e plasmónicas, foi promovido o acoplamento entre ambas para a formação de nanoestruturas híbridas magneto-plasmónicas de $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{CuS}$. Por fim, estas foram incorporadas em lipossomas para o desenvolvimento de magnetolipossomas plasmónicos. Ao longo de todo o trabalho experimental, desde a síntese das nanopartículas até ao seu encapsulamento nos lipossomas, foram realizadas, de forma iterativa, caracterizações estruturais, fotofísicas e magnéticas. Desta forma, foi possível otimizar os processos de síntese dos diferentes nanossistemas, com vista ao sucesso e aplicabilidade dos lipossomas baseados em nanopartículas de $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{CuS}$ para a terapia multimodal do cancro.

II.1 Síntese das nanopartículas magnéticas de MnFe_2O_4

Materiais

Os materiais utilizados para a síntese das NPs magnéticas de ferrite de manganês foram: citrato de sódio dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de ferro II heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato de mangânes II monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), etanol (99,9%) e água ultrapura.

Procedimento experimental

O procedimento utilizado para preparação das nanopartículas magnéticas foi adaptado a partir do método descrito pelo autor Veloso et al [57]., 2020. Inicialmente, foi preparada uma solução

contendo 19 mL de água ultrapura, 294,1 mg de citrato de trissódio dihidratado e 500 uL de uma solução de hidróxido de sódio (18,9 M). Esta solução foi mantida a 100 °C, sob agitação magnética. De seguida, procedeu-se à preparação da mistura dos precursores metálicos, para isso, pesaram-se 370,8 mg e 111,6 mg de sulfato de ferro II heptahidratado e sulfato de manganês II monohidratado, respetivamente. Após a pesagem, procedeu-se à adição de 2 mL de água ultrapura e a solução foi bem dispersa, recorrendo ao auxílio do sonicador e do vortéx. De seguida, esta solução foi injetada, gota-a-gota, na solução preparada inicialmente contendo o citrato de sódio e o hidróxido de sódio. Ao fim de 2 horas de reação, obtiveram-se as NPs de ferrite de manganês. Estas foram lavadas cinco vezes com uma mistura de água e etanol 1:1, por decantação magnética. Por fim, a solução de NPs foi colocada na estufa a 100 °C, de modo a promover a evaporação do solvente. No final, obteve-se uma massa de 145 mg de NPs de ferrite de manganês [57]. A esquematização do procedimento experimental pode ser consultada na figura 11.

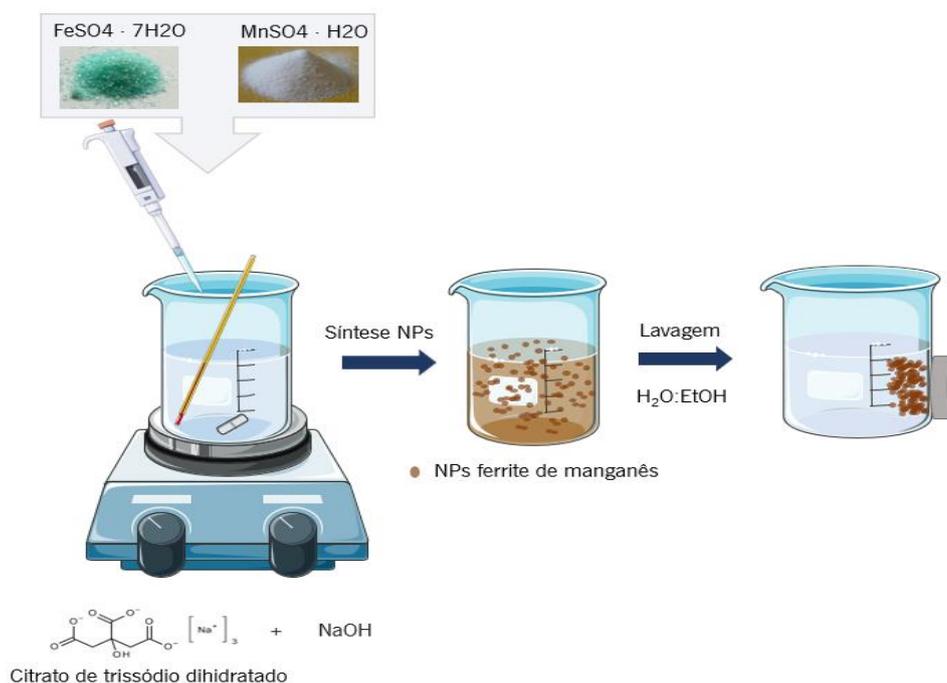


Figura 11 - Esquematização do procedimento experimental da síntese das NPs MnFe_2O_4 .

II.2 Síntese das nanopartículas plasmónicas de CuS

Materiais

Os materiais utilizados para a síntese das NPs plasmónicas de sulfureto de cobre foram: citrato de sódio dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$), cloreto de cobre II dihidratado ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$), sulfureto de sódio ($Na_2S \cdot xH_2O$), cloreto de magnésio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), DL-cisteína ($C_3H_7NO_2S$), etanol (99,9%) e água ultrapura.

Procedimento experimental

O procedimento utilizado para a preparação das nanopartículas plasmónicas baseou-se no método descrito pelo autor Gao et al [58]., 2018. Para a síntese das NPs de CuS, foram inicialmente preparadas duas soluções aquosas de 10 mL cada contendo 10,7 mg de cloreto de cobre II dihidratado) e 10 mg de citrato de trissódio dihidratado. De seguida, estas soluções foram diluídas para um volume final de 50 mL, permanecendo sob agitação magnética, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Após este período, foram dispersos 20,4 mg de sulfureto de sódio em 50 μ L de água ultrapura e adicionados à mistura reacional que foi mantida sob agitação, durante 5 minutos. De seguida, a mistura foi transferida para um banho de óleo, previamente aquecido a 90 °C, onde permaneceu sob agitação magnética. Após 15 minutos, as NPs de CuS foram formadas [58].

Posteriormente, procedeu-se à substituição do ligando de superfície que é o citrato pela cisteína. Esta substituição foi realizada de modo a impedir a oxidação e consequente perda das propriedades de absorção das NPs, observada em sínteses anteriores e também para a realização do acoplamento entre as NPs magnéticas e plasmónicas.

Para tal, à solução de NPs de CuS obtida foram adicionadas 46,77 mg de cisteína (numa proporção molar de 10 x em relação ao citrato), e esta foi mantida sob agitação, durante 15 minutos. De seguida, procedeu-se à lavagem das NPs para remover impurezas resultantes da síntese. Para tal, foram primeiro adicionados 5 mL de uma solução aquosa de 1 M de $MgCl_2$, de forma a promover a precipitação das NPs, e as NPs foram sujeitas a 3 centrifugações de 10 minutos, a 7500 RPM. Neste processo, o *pellet* de NPs de CuS foi recolhido e lavado três vezes com uma mistura de água e etanol 1:1. De seguida, as NPs foram dispersas em 6 mL de água

ultrapura e armazenadas a 4°C. A esquematização do procedimento experimental pode ser consultada na figura 12.

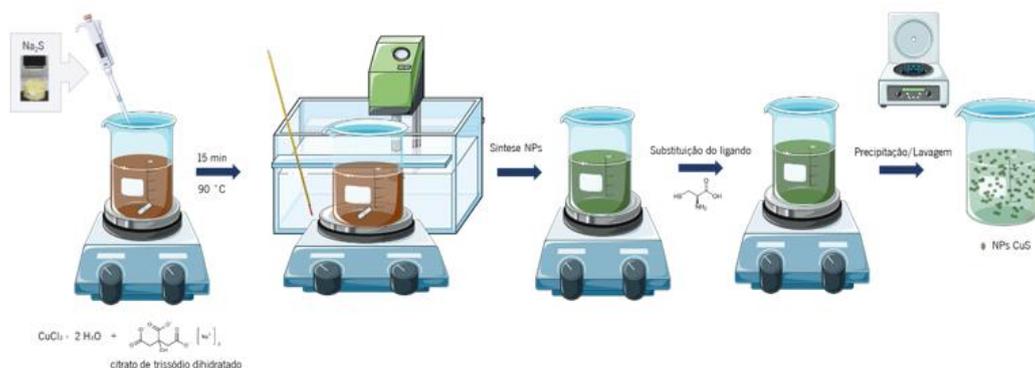


Figura 12 - Esquematização do procedimento experimental da síntese das NPs plasmônicas de CuS

II.3 Síntese das NPs de MnFe₂O₄/CuS

Materiais

Os materiais utilizados para a realização do acoplamento das NPs magnéticas com as plasmônicas foram: NPs de sulfureto de cobre funcionalizadas com cisteína, NPs de ferrite de manganês, dimetilsulfóxido ((CH₃)₂SO) 99,9 %, acetato de sódio anidro (CH₃COONa), 1,1'-Carbonildiimidazole (C₇H₆N₄O), etanol 99,9% e água ultrapura.

Procedimento experimental

Para promover a ligação entre as NPs magnéticas e as NPs plasmônicas, foi realizado um protocolo de ativação dos grupos hidróxilo da superfície das NPs de MnFe₂O₄, utilizando o 1,1'- carbonildiimidazole (CDI). Para tal, foi preparada uma solução de 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (previamente seco com acetato de sódio anidro), contendo 1 mg de NPs de MnFe₂O₄. Esta solução foi dispersa no sonicador, durante 15 minutos, e, de seguida, foram adicionadas 3,5 mg de CDI (correspondente a excedente molar de 5 x em relação ao MnFe₂O₄). A solução foi deixada no sonicador, durante 1h, a 60 °C. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de uma solução aquosa de 1 mg/mL de NPs de CuS, a 3 mL da solução de NPs de MnFe₂O₄ funcionalizadas com

CDI. A solução resultante foi colocada no sonicador, durante 1h, a 60°. Este acoplamento foi possível através da ligação entre o grupo amina da cisteína presente na superfície das NPs de CuS e os grupos OH (ativados pelo CDI) presentes na superfície das NPs magnéticas. Desta ligação resulta um carbamato (composto orgânico) que faz a ligação entre as NPs magnéticas e plasmónicas.

Finalmente, as NPs acopladas de $MnFe_2O_4/CuS$ foram sujeitas a 3 lavagens por centrifugação, com uma mistura de água e etanol 1:1, de modo a remover o imidazole que resulta do processo de acoplamento. O procedimento experimental pode ser consultado na figura 13.

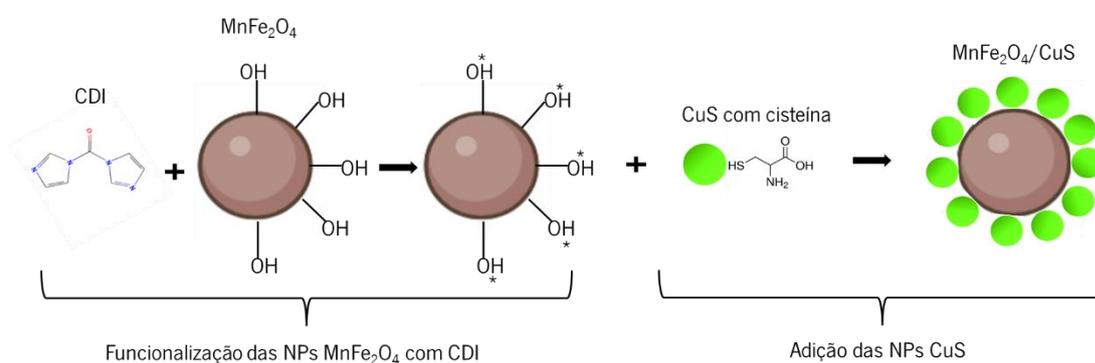


Figura 13 - Esquemática do processo de síntese das NPs $MnFe_2O_4$

II.4 Síntese dos lipossomas magneto/plasmónicos aquosos

Materiais

Os materiais utilizados para a síntese dos AMLs marcados com rodamina foram: NPs de $MnFe_2O_4/CuS$, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-(rodamina B), 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-1-piridinio) fenolato (sonda *reichardt*) Clorofórmio ($CHCl_3$) 99,9 %, etanol 99,9%, corrente de azoto e água ultrapura.

Procedimento experimental

Após a síntese das NPs, seguiu-se a sua incorporação em bicamadas lipídicas de forma a obter lipossomas magneto/plasmónicos aquosos. A técnica utilizada para a formação dos

lipossomas foi a injeção etanólica, sendo que o lípido utilizado foi o DPPC. Assim, num eppendorf adicionou-se 150 μL de solução de 20 mM de DPPC em clorofórmio e procedeu-se à evaporação do solvente, utilizando corrente de azoto. Resultou um filme lipídico de DPPC ao qual foi adicionado um volume 150 μL de etanol. De seguida, foi realizada a injeção desta solução etanólica, gota a gota e sob vortex, numa solução aquosa de 3 mL contendo 1 mg/mL de NPs de $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{CuS}$. De modo a assegurar o sucesso do processo de auto-organização das bicamadas lipídicas e consequente formação de lipossomas aquosos, a solução aquosa foi previamente aquecida a 55 $^\circ\text{C}$, acima da temperatura de transição do DPPC. Para a realização de alguns ensaios ao longo do trabalho, os lipossomas foram marcados com as sondas rodamina ou *reichardt*. Para tal, estes reagentes foram adicionados juntamente com o DPPC antes do processo de evaporação, num volume de 4 μL com concentração de $7,68 \times 10^{-4}$ M de lípido marcado com rodamina ou 600 μL com concentração de 2×10^{-5} M de sonda *reichardt*, respetivamente. Após evaporação do solvente sob corrente de azoto, foi adicionado um volume de 150 μL de etanol, para posterior co-injeção do DPPC e da sonda na solução aquosa. Para comparação, foram também sintetizados lipossomas. Neste caso, a injeção etanólica foi realizada numa solução aquosa de 3 mL sem NPs. A figura 14 ilustra o procedimento experimental da síntese dos lipossomas magneto-plasmónicas aquosos.

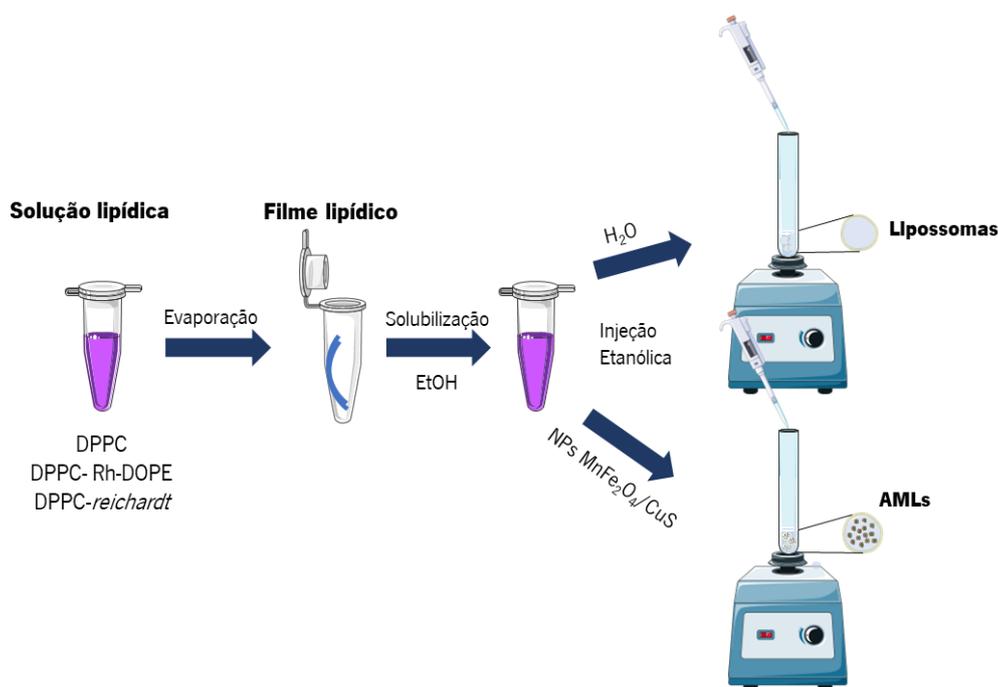


Figura 14 - Esquemática do procedimento experimental da síntese dos lipossomas e AMLs

II.5 Técnicas de caracterização fotofísica, estrutural e magnética

A espectroscopia de absorção UV-Visível é uma técnica não invasiva que estuda a interação da luz com a matéria e permite caracterizar sistemas biológicos. Esta técnica permite medir propriedades óticas de materiais, como absorção e transmitância. Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para medir a absorção das diferentes NPs sintetizadas, avaliar o plasmão de superfície e estudar o acoplamento entre as nanopartículas magnéticas e plasmónicas. Os espectros de absorção foram realizados num espectrofotómetro Shimadzu UV-3600 Plus UV-Vis-NIR (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), equipado com um suporte de cuvettes com controlo de temperatura. As concentrações de todas as amostras utilizadas para a realização destas medições foram as mesmas.

A técnica de espectroscopia de fluorescência estuda também a interação da luz com a matéria e, neste trabalho, foi utilizada para avaliar a síntese dos magnetolipossomas através da medição da inibição de fluorescência (quenching) dos magnetolipossomas plasmónicos marcados com a sonda rodamina em comparação com os lipossomas apenas marcados com a sonda. Os espectros de fluorescência foram medidos num espectralfluorímetro Fluorolog 3, equipado com monocromadores duplos na excitação e emissão.

A técnica de difração de raios X (XRD), permite obter informação sobre a estrutura cristalográfica dos materiais através da medição dos ângulos e das intensidades dos feixes difratados pela amostra. Esta técnica permite determinar a pureza das nanopartículas sintetizadas, através da análise e interpretação dos difratogramas [59]. Neste trabalho, foi utilizada para comprovar a síntese das NPs de MnFe_2O_4 e de CuS , assim como avaliar a pureza destes materiais. O equipamento utilizado para as análises de difração de raios X foi o PAN'alytical X'Pert PRO difractómetro (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK), a operar com radiação $\text{CuK}\alpha$, em configuração Bragg-Brentano, da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Os dados foram processados recorrendo ao software *Match!*, onde se procedeu à identificação das estruturas cristalinas presentes no difractograma e se realizou um ajuste de Rietveld.

A técnica de dispersão dinâmica da luz (DLS) é comumente usada para a determinação do tamanho hidrodinâmico de bionanossistemas. Além de permitir esta análise, permite também

determinar os índices de polidispersividade, potencial zeta e estabilidade de amostras em solução, de forma não destrutiva. Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para avaliar o tamanho hidrodinâmico, distribuição de tamanhos e potencial zeta das NPs e dos magnetolipossomas sintetizados. O modelo do DLS utilizado foi um Anton Paar Litesizer 500, operando no ângulo de detecção backscatter (175°). As concentrações de todas as amostras utilizadas para a realização destas medições foram as mesmas.

A microscopia eletrônica de transmissão é frequentemente empregue para visualização da forma e tamanhos de NPs. Neste trabalho, foi utilizada para obter imagens das NPs de MnFe_2O_4 e CuS . O equipamento utilizado para a realização desta análise foi o Microscópio eletrônico de transmissão (TEM), modelo JEM1010, a operar a 100 kV, do Centro de Investigações Biomédicas (CINBIO), da Universidade de Vigo.

O dispositivo supercondutor de interferência quântica (SQUID do inglês, Superconducting Quantum Interference Device) é, atualmente, o magnetômetro mais sensível, permitindo detetar campos magnéticos com uma resolução até 10^{-17} T [60]. Este aparelho permite medir a magnetização em função de um campo aplicado, através de medidas dos ciclos de histerese. No âmbito deste trabalho, esta técnica permitiu fazer a caracterização magnética das NPs de MnFe_2O_4 e das NPs acopladas, através da determinação de propriedades como a magnetização de saturação, magnetização remanescente e o campo de coercividade. O equipamento utilizado para a realização desta análise foi o Quantum Design's MPMS 3, do Instituto de Física dos Materiais da Universidade do Porto.

II.6 Ensaios de fototermia

A capacidade fototérmica das NPs preparadas foi estudada num *setup* experimental montado no Laboratório, constituído por um porta-amostras, uma fonte de luz laser com um comprimento de onda de 808 nm e uma potência de 1,6 W, um filtro de densidade ótica e um termopar do tipo T ligado a um multímetro digital (Agilent U1242A) para medição da temperatura. Os materiais utilizados para a realização dos ensaios de irradiação das NPs foram: NPs de MnFe_2O_4 , NPs de CuS , NPs de $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{CuS}$ e água ultrapura.

De modo a testar a capacidade fototérmica das NPs, foram realizados ensaios de irradiação em soluções aquosas de NPs a diferentes condições. Assim, foram preparadas soluções de concentrações distintas de NPs (1 mg/mL e 0,1 mg/mL para as NPs de MnFe_2O_4 , NPs de CuS , e $\text{MnFe}_2\text{O}_4/\text{CuS}$), e testadas 3 potências de laser diferentes (200 mW, 500 mW e 1000 mW) usando um filtro de densidade neutra variável. Para a medição, 3 mL de solução foram colocadas em cuvettes de quartzo, de percurso ótico de 1 cm. Para comparação, foi realizado um ensaio de irradiação em 3 mL de água ultrapura. Cada ensaio consistiu em 30 minutos de aquecimento (laser ligado), seguido por 30 minutos de arrefecimento (laser desligado), tendo sido registada a temperatura ao longo do tempo.

II.7 Estudo do aquecimento local nos lipossomas magneto/plasmónicos

A avaliação do aquecimento local dos lipossomas magneto/plasmónicos, foi realizada na montagem caseira anteriormente usada nos ensaios de fototermia, tendo sido utilizado o laser com a potência de 1 W. Para a aquisição dos espectros de absorção foi acoplado à montagem um espectrofotómetro de fibra ótica CCD compacto (CCS100 Thorlabs Inc., Newton, NJ, EUA), com um modo de operação num intervalo de comprimentos de onda entre os 350 e os 750 nm e fendas de 20 μm , usando uma lâmpada de halogénio de 75 W. As medidas foram realizadas no software Thorlabs SPLICCO, versão 4.0, com um tempo de aquisição de 60 ms e média de 150 aquisições, tendo sido usada água como referência. A montagem experimental pode ser consultada na figura 15.

Com o objetivo de estudar o aquecimento local, foram realizados ensaios de irradiação em duas soluções: lipossomas magneto/plasmónicos e lipossomas, ambos marcados com sonda *reichardt*. Para comparação, foram realizados ensaios de aquecimento dos dois nanossistemas marcados com a sonda de *reichardt* em banho-maria (na ausência de irradiação). Ao longo do tempo, foram obtidos os espectros de absorção da sonda de *reichardt* encapsulada nos diferentes nanossistemas. Os espectros foram processados pela equação apresentada de modo a remover o branco (água ultrapura) de cada medida. Para cada sistema, a fim de modelar as variações locais de temperatura, os espectros de absorção foram globalmente ajustados com uma soma de oito funções gaussianas, restritas a uma sequência de zonas espectrais [56].

$$abs = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

Equação 4

abs = absorvância

I = Intensidade de absorção AMLs marcados com sonda *reichardt*

I₀ = Intensidade de absorção controlo (água ultrapura)

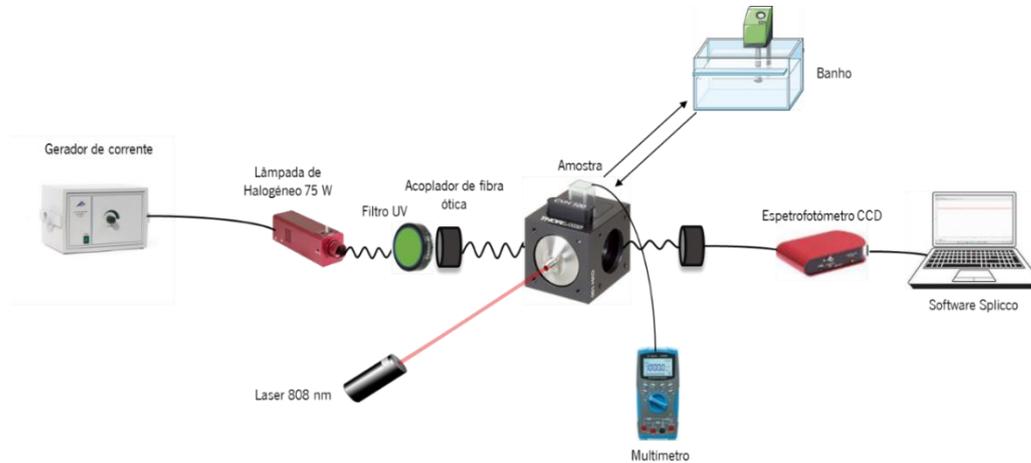


Figura 15 - Representação esquemática da montagem utilizada para a realização dos ensaios de irradiação e aquecimento

II.8 Sonda *Reichardt*

A utilização da sonda *reichardt* para a realização deste estudo baseia-se na sua natureza termocrômica. Os materiais termocrômicos possuem a capacidade de alterar a forma do seu espectro de absorção em resposta a uma mudança de temperatura, isto reflete-se na cor destes compostos e nas suas propriedades de absorção que podem ser modeladas com a finalidade da criação de sensores térmicos sensíveis [61, 62].

Através da modelação das mudanças espectrais da sonda *reichardt* provenientes do aumento de temperatura local gerada pelo efeito fototérmico das NPs de CuS é possível tornar esta sonda num nanotermómetro e descobrir qual a temperatura na vizinhança nos magnetolipossomas plasmónicos. A estrutura química da sonda *reichardt* pode ser consultada na figura 16.

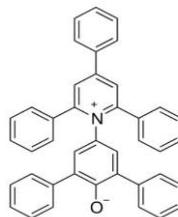


Figura 16 - Estrutura molecular da sonda *reichardt*

III Resultados e Discussão

III.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas

III.1.1 XRD

As propriedades estruturais das ferrites de manganês foram analisadas pela técnica de XRD, através da qual se recolheu o difractograma experimental representado a cor azul na figura 17. A estes dados, foram indexados os difractogramas de uma fase cristalina de MnFe_2O_4 , representado a cor vermelha, e de Fe_2O_3 , representado a cor verde, presentes na base de dados do software Match! e correspondentes aos ficheiros cif nr. 96-230-0619 e nr. 96-400-2384, respetivamente. Através da realização de um ajuste Rietveld das fases selecionadas à amostra experimental, foi possível estimar parâmetros estruturais como a composição e pureza, representados na tabela 2.

Através dos resultados obtidos, verificou-se que, além dos picos correspondentes à fase cristalina cúbica de MnFe_2O_4 foram obtidos picos adicionais, os quais foram indexados com uma fase ortorrômbica de óxido de ferro ($\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Assim, concluiu-se que a amostra das nanopartículas magnéticas não corresponde a uma amostra de ferrite de manganês pura. Esta contaminação poderá ter origem no processo de síntese, no qual não houve controlo da atmosfera da reação. Os dados obtidos, presentes na tabela 2 mostram que foi obtida uma amostra com composição de 71,6 % de MnFe_2O_4 e 28,4 % de $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$. A fase $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ corresponde a uma das quatro polimorfos do óxido de ferro Fe_2O_3 , e é caracterizada por apresentar baixa magnetização e elevada coercividade [13]. Relativamente aos tamanhos não foi possível obter a sua estimativa, devido ao fundo amorfo presente na amostra que impossibilitou a sua análise.

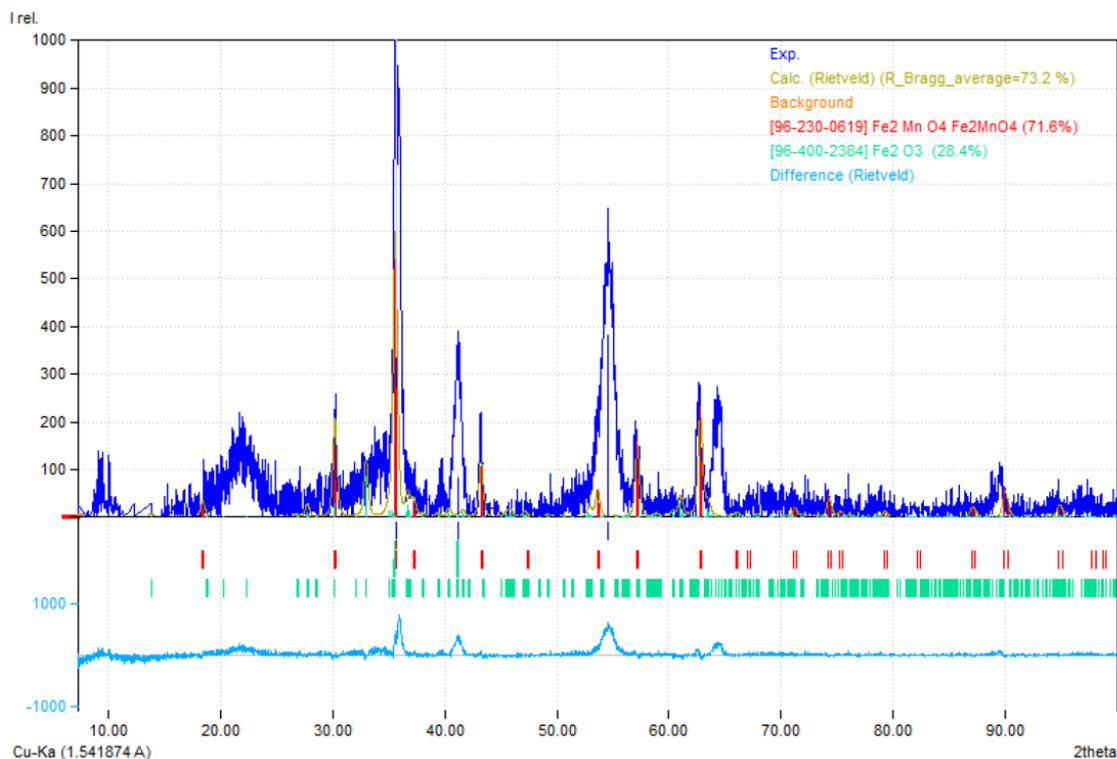


Figura 17 - Difractograma das nanopartículas magnéticas.

Tabela 2 - Propriedades estruturais das nanopartículas magnéticas, determinadas pela técnica de XRD.

Fase	Estrutura cristalina	Composição elementar	Pureza	Célula unitária (Å)
MnFe ₂ O ₄	Cúbica	Fe (54,5 %) O (28,4 %) Mn (17,1 %)	71,6 %	a = 8,3711 Å
Fe ₂ O ₃	Ortorrômbica	Fe (78,4 %) O (21,6 %)	28,4 %	a = 5,0850 Å b = 8,7740 Å c = 9,4680 Å

III.1.2 Espectroscopia de Absorção

A técnica de espectroscopia UV-Vis foi utilizada para medir o espectro de absorção da dispersão aquosa das nanopartículas magnéticas sintetizadas, entre os 250 nm e os 850 nm. O gráfico obtido da absorvância em função do comprimento de onda encontra-se representado na figura 18. A partir desta figura, é possível observar que as nanopartículas magnéticas apresentam uma larga banda de absorção entre os 250 aos 850 nm, com um máximo próximo dos 400 nm.

Esta banda, característica dos óxidos metálicos, permitiu confirmar a síntese das nanopartículas magnéticas preparadas [51, 53, 57]. É importante ainda referir que estas NPs apresentam absorção aos 808 nm, o que permitiu a avaliação dos seus efeitos fototérmicos, por ensaios de irradiação com uma fonte de luz de comprimento de onda 808 nm.

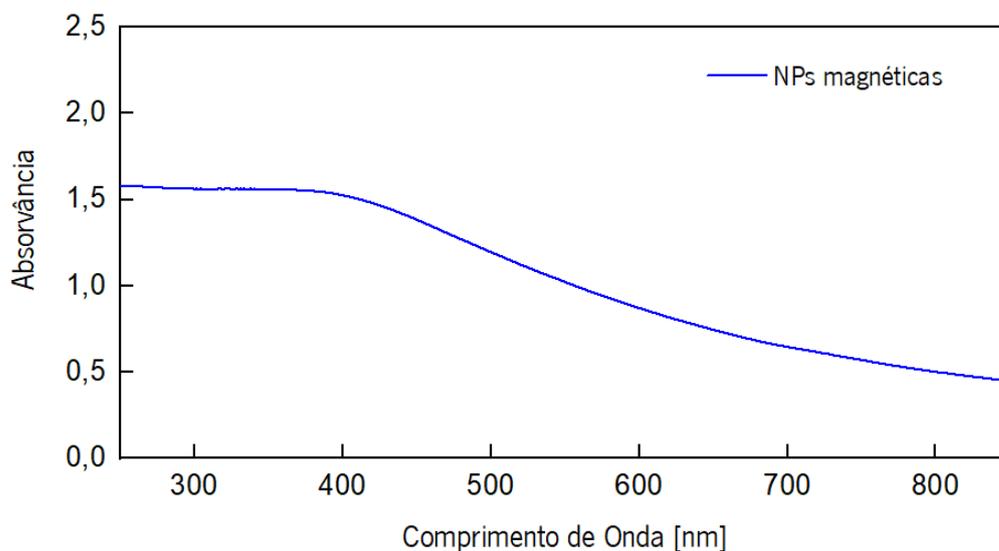


Figura 18 - Espectro de absorção das nanopartículas magnéticas.

III.1.3 DLS – Potencial Zeta, Tamanhos e Estabilidade

As nanopartículas magnéticas foram também caracterizadas recorrendo ao DLS, no qual se aferiu sobre o seu tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e estabilidade das soluções. Os parâmetros obtidos, sujeitos a três medições, estão apresentados na tabela 3, e o gráfico da distribuição dos tamanhos bem como o seu correlograma na figura 19.

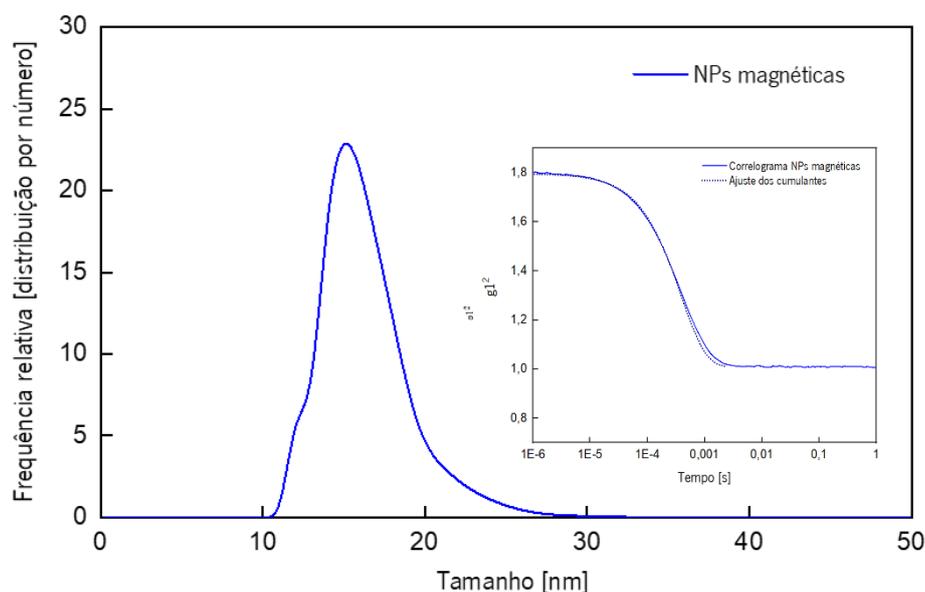


Figura 19 - Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma e ajuste dos cumulantes (inserido) das NPs magnéticas, obtidos pela técnica de DLS.

Tabela 3 – Tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersividade das NPs magnéticas, determinados por DLS.

	Tamanho hidrodinâmico [nm]	Índice de polidispersividade	Potencial Zeta [mV]
NPs magnéticas	$15,9 \pm 0,7$	$0,21 \pm 0,02$	$-26,7 \pm 1,2$

O tamanho das NPs magnéticas, estimado por DLS, foi de $15,9 \pm 0,7$ nm (obtido da distribuição por número). O seu potencial zeta tem um valor de $-26,7 \pm 1,2$ mV e o seu índice de polidispersão foi de $0,21 \pm 0,02$. Os tamanhos das NPs foram medidos através do método de distribuição por número que compensa a influência do forte aumento da eficiência da dispersão de luz com o tamanho da partícula, de modo a ter uma distribuição de tamanhos mais aproximado do tamanho real medido por outras técnicas de caracterização, como por exemplo, TEM. Tendo em conta o método de preparação utilizado para a síntese das NPs magnéticas, podemos concluir que o tamanho está de acordo com o reportado na literatura [63].

O potencial zeta é uma medida importante que permite determinar se as soluções coloidais são ou não estáveis, pela medição da sua carga superficial. De um modo geral, soluções com valores de potencial zeta acima de ± 30 mV são consideráveis estáveis, consequência da elevada carga de superfície negativa ou positiva que aumenta a repulsão eletrostática entre as partículas. À medida que este valor se aproxima de 0 as soluções agregam devido a forças de Van Der Waals e à baixa repulsão eletrostática. Apesar do valor do potencial zeta medido para as NPs magnéticas ser ligeiramente inferior ao desejado, podemos considerar que estas apresentam uma estabilidade coloidal razoável [64]. A polidispersividade é também um fator importante que permite perceber se existem populações de NPs com diferentes tamanhos. Usualmente, valores de polidispersividade inferiores a 0,3 indicam populações relativamente homogêneas, o que se verifica para a amostra em estudo [65, 66].

Adicionalmente, foi realizado um estudo de estabilidade na qual se mediu a transmitância de uma solução de NPs durante uma hora (figura 20). Como pode ser observado, não se verificaram mudanças significativas na transmitância da solução durante todo o período de medida, sendo que o valor inicial e final foram 68,01 e 68,52 %, respetivamente, o que ratifica os resultados obtidos nas medidas de potencial zeta [67].

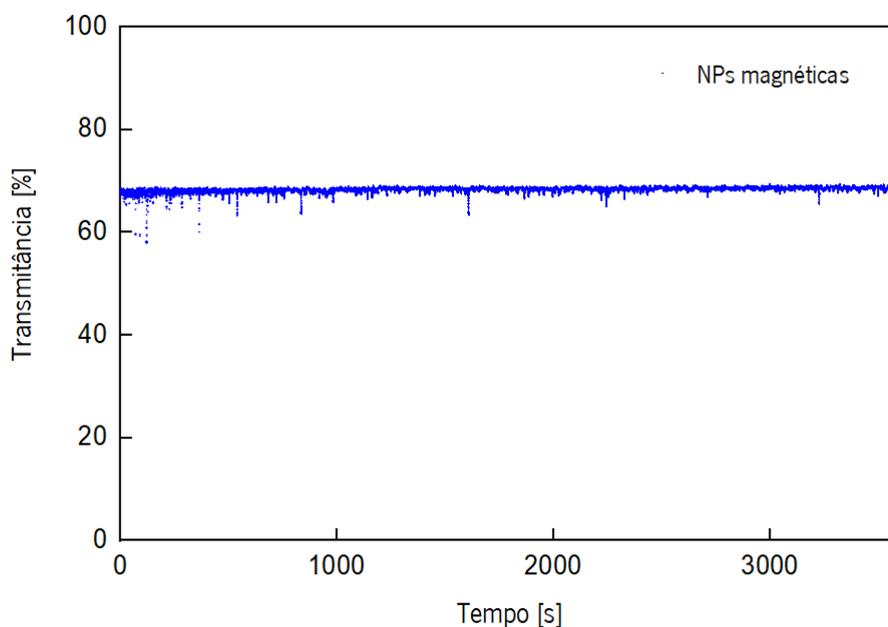


Figura 20 – Transmitância da solução aquosa de NPs magnéticas (0,03 mg/mL) em função do tempo, determinado por DLS.

III.1.4 TEM

Na figura 21 estão apresentadas as imagens das nanopartículas magnéticas, obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. A imagem de maior ampliação (figura 21 (B)) foi processada no software *ImageJ*, para uma contagem manual de 86 nanopartículas e posterior conversão das áreas obtidas em diâmetros, o que permitiu estimar a média e o desvio padrão do tamanho das nanopartículas. O histograma resultante dos tamanhos obtidos foi ajustado a uma distribuição Gaussiana (figura 21 (C)).

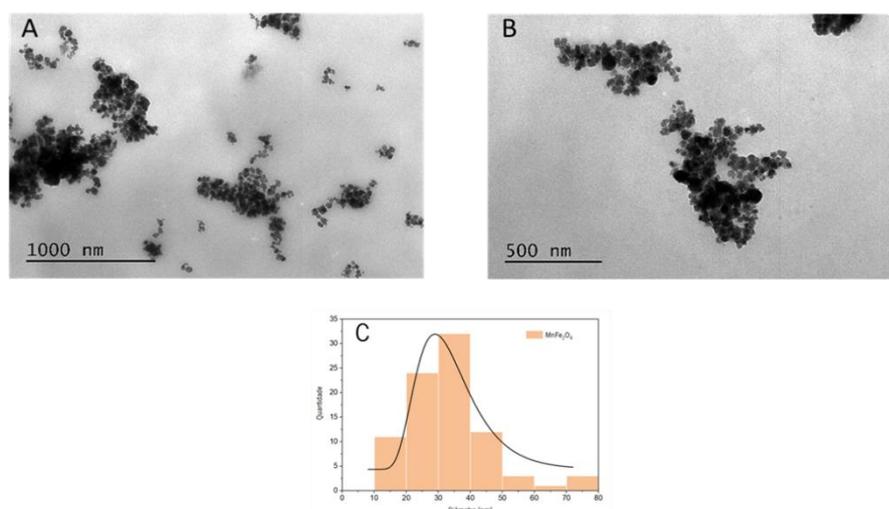


Figura 21 - Imagens de TEM, das nanopartículas magnéticas em diferentes ampliações: 1000 nm (A) e 500 nm (B). Histograma dos tamanhos (500 nm) ajustado a uma distribuição gaussiana (C).

Através das imagens obtidas, é possível verificar que as NPs são muito pequenas e que apresentam forma esférica. Apesar de se observar alguma agregação, o que poderá estar relacionada com o método de preparação das amostras para a análise de microscopia, é possível observar que as NPs apresentam uma distribuição de tamanhos mais ou menos uniforme. Representados no histograma da imagem C, conclui-se que o tamanho médio medido foi de 33 ± 13 nm. Não obstante ao tamanho ligeiramente sobrestimado em relação ao descrito na literatura (15-25 nm) para NPs obtidas em condições de preparação semelhantes, podemos concluir que os mesmos são adequados para aplicações biomédicas [51, 57].

III.1.5 SQUID

De modo a aferir sobre as propriedades magnéticas, o ciclo de histerese das NPs preparadas foi medido num SQUID, à temperatura ambiente. A curva obtida está apresentada na figura 22. Os valores de coercividade, magnetização remanescente, magnetização de saturação, obtidos a partir da curva de histerese, estão resumidos na tabela 4.

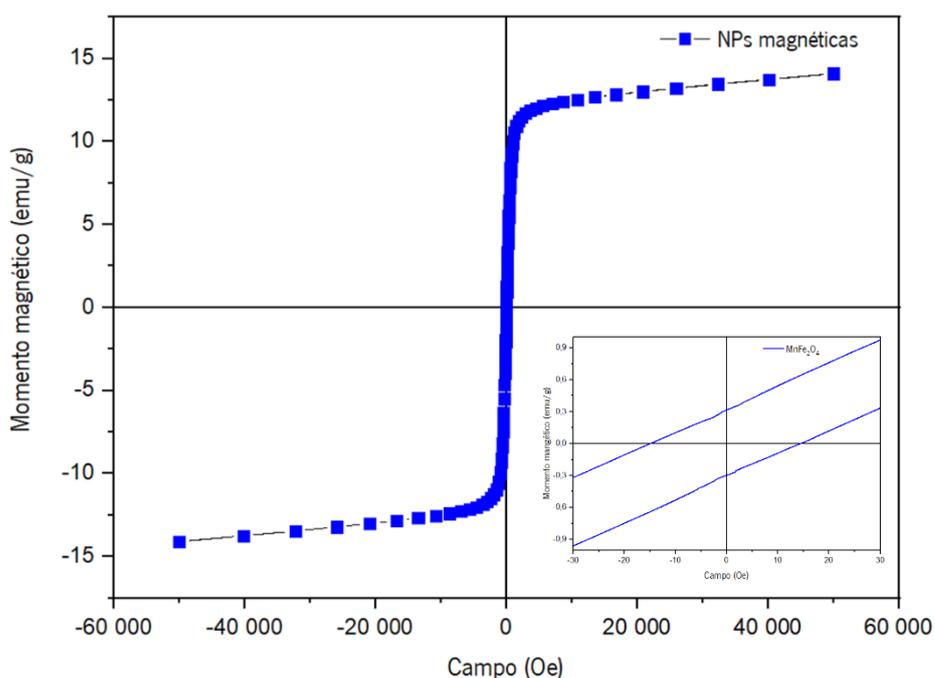


Figura 22 - Ciclo de histerese das nanopartículas magnéticas. Inserido no quarto quadrante, uma ampliação da região de baixo campo.

Tabela 4 - Campo coercivo (H), magnetização remanescente (M_r), magnetização de saturação (M_s) e razão entre M_r e M_s (M_r/M_s) das NPs magnéticas

	H (Oe)	M_r (emu/g)	M_s (emu/g)	M_r/M_s
NPs magnéticas	14,80	0,32	14,68	0,022

A partir da análise dos resultados obtidos, é possível observar ausência de histerese, com uma curva fechada e valores residuais de campo de coercividade de 14,80 Oe e magnetização remanescente de apenas 0,32 emu/g. No que diz respeito à magnetização máxima, foi medida uma magnetização de saturação razoável no valor de 14,68 emu/g. No entanto, devido à elevada

susceptibilidade magnética do manganês, e de acordo com o reportado na literatura, era esperado que este valor fosse mais elevado [51, 52]. Assim, a presença de uma fase ortorrômbica de hematite, indicada pelo XRD pode justificar esta baixa magnetização [51, 68]. Apesar da magnetização de saturação inferior, as NPs apresentaram um comportamento superparamagnético, com uma razão entre a magnetização remanescente e a magnetização de saturação inferior a 0,1. De acordo com a literatura, para valores de M_r/M_s inferiores a 0,1, mais de 90 % da magnetização da amostra é perdida com a remoção do campo magnético externo, indicando um comportamento superparamagnético [51].

III.1.6 Ensaios de hipertermia fototérmica

As nanopartículas magnéticas têm sido descritas na literatura como uma nova classe de nanopartículas fototérmicas [69]. Assim, a capacidade de geração de calor destas NPs na presença de irradiação foi avaliada, em diferentes condições representadas na imagem B da figura 23. A título de exemplo, na imagem A da mesma figura está representada a curva de aquecimento e arrefecimento de uma solução aquosa de NPs magnéticas de concentração 1 mg/mL, sujeita a irradiação NIR com potência de 1000 mW.

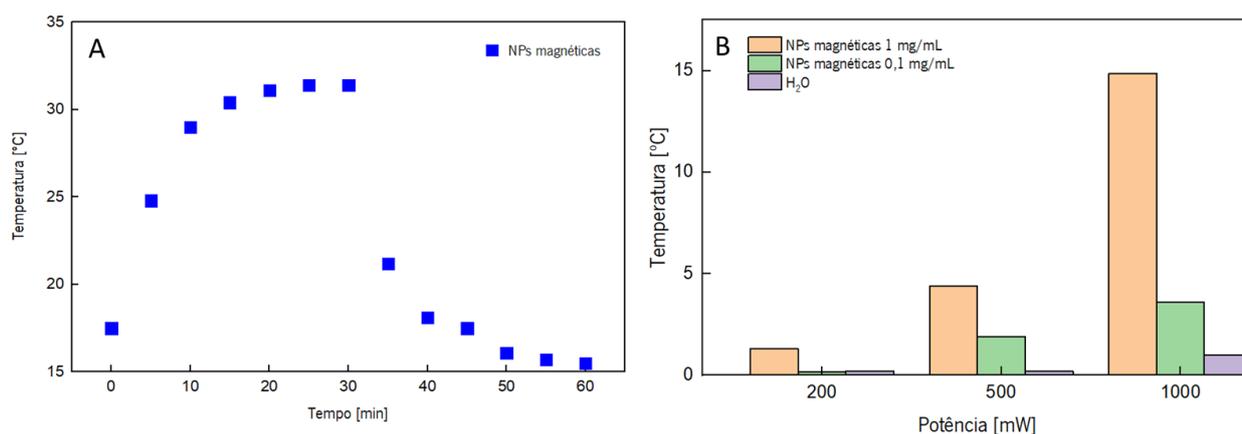


Figura 23 – Ensaio de irradiação NPs magnéticas 1 mg/mL e 0,1 mg/mL (A); curva de aquecimento 1 mg/mL com potência de irradiação de 1000 mW.

Os resultados da irradiação laser das NPs magnéticas revelaram que estas apresentam uma boa capacidade de geração de calor, na presença de irradiação NIR. De modo a avaliar este

efeito, foram calculados os valores de SAR das NPs para as concentrações e potências de laser representada na tabela 5. Para calcular o SAR, usou-se a equação 2 considerando a parte inicial da variação de temperatura com o tempo de irradiação.

$$SAR = \frac{m(\text{água}) \times c(\text{água})}{m(\text{composto})} \times \frac{dT}{dt} \quad \text{Equação 5}$$

m (água) = massa de água (g)

c (água) = calor específico da água J.g⁻¹.C⁻¹

m (composto) = massa do composto (g)

dT/dt = declive inicial da rampa de aquecimento (5 minutos)

Tal como esperado, o valor do SAR aumenta para concentrações de NPs maiores e com o aumento da potência do laser. Para a solução com concentração 1 mg/mL, irradiada com uma potência de 1000 mW foi obtido um valor de SAR máximo de 4263,3 Wg⁻¹. Tendo em conta a temperatura fisiológica de 37°C, o aquecimento obtido para as NPs magnéticas revela-se promissor para a realização de terapia fototermica uma vez que estas registaram um aquecimento máximo de 13,9°C.

Tabela 4 - Ensaio de fototerapia das nanopartículas magnéticas

	Concentração	P _{Laser} (mW)	ΔT _{max} (°C)	Declive	SAR (Wg ⁻¹)
NPs magnéticas	0,1 mg/mL	200	0,15	0	0
		500	1,9	0,14	585,2
		1000	3,6	0,14	585,2
	1 mg/mL	200	1,3	0,14	585,2
		500	4,4	0,2	836
		1000	13,9	1,02	4263,6

III.1.7 Estudo de hipertermia magnética

A capacidade de produção de calor das nanopartículas magnéticas, na presença de um campo magnético alternado (AMF), foi também avaliada. Neste ensaio, uma solução aquosa de nanopartículas de concentração 35 mg/mL, foi sujeita a um campo magnético de frequência de 155 kHz e intensidade de campo de 8,5 kA/m, durante 30 minutos. O gráfico A da figura 23

mostra o ciclo completo de 30 minutos de exposição ao campo magnético e o arrefecimento, após a sua remoção. O gráfico B da figura 24 mostra a variação da temperatura da solução em função do tempo, em minutos, sob a aplicação do campo magnético descrito.

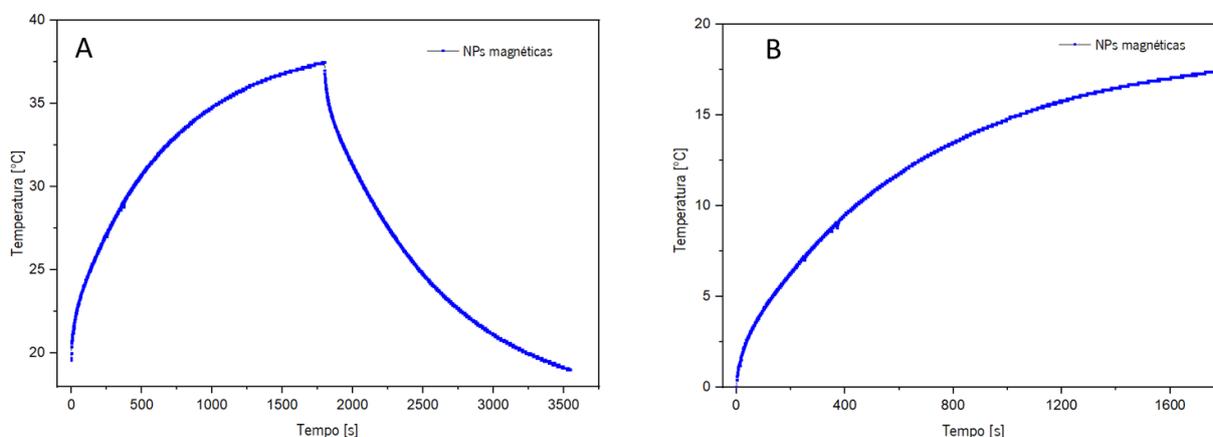


Figura 23 – Ciclo Aquecimento/arrefecimento (A); Aquecimento (B)

Para o cálculo do SAR, foram utilizados os métodos IAM (do inglês Incremental Analysis Method) e o modelo Lucas-Box. Foram estimados valores de $5,26 \pm 0,93$ W/g e $3,9$ W/g, respetivamente. O ILP, que representa a perda de potência intrínseca, foi também calculado, tendo sido obtido um valor de $0,47 \pm 0,083$ nHm²/K.

Os valores de SAR obtidos demonstram a boa capacidade de geração de calor, apesar da M_s ser relativamente baixa. As NPs registaram um aquecimento máximo de $17,5^\circ\text{C}$ que revela, à semelhança dos ensaios fototérmicos, um efeito de hipertermia magnética suficiente para a sua aplicação para fins terapêuticos. Apesar dos bons resultados, estes podem ainda ser melhorados ajustando parâmetros como: concentração da solução, a frequência e intensidade do campo magnético utilizado[70]. A título de exemplo, o autor Doaga et al [71], obteve um valor de SAR de aproximadamente 70 Wg⁻¹ ao qual correspondeu um aquecimento de quase 50°C para uma formulação de NPs de MnFe_2O_4 preparadas pelo método de coprecipitação com uma concentração de 10 mg/mL, M_s de $68,8$ emu/g, aplicando um campo magnético com intensidade de $2,3$ kA/m e uma frequência de $1,95$ MHz.

III.2 Caracterização das NPs plasmónicas

III.2.1 XRD

Os resultados de XRD das nanopartículas plasmónicas confirmaram a síntese de nanopartículas cristalinas, e o respetivo gráfico está apresentado na figura 25. O difractograma experimental das NPs plasmónicas está representado a azul. Através da análise efetuada no software *Match!* foi possível identificar duas fases cristalinas distintas, uma de CuS representada a vermelho (cif nr. 96-900-9724), e uma segunda fase de Cu₂S representada a verde (cif nr. 96-153-0509).

Após análise Rietveld, foi possível determinar a percentagem de cada fase constituinte da amostra, assim como os seus parâmetros estruturais. Estes dados encontram-se resumidos na tabela 6. Os dados obtidos indicam uma amostra composta por 21,8 % de uma fase hexagonal de CuS, e os restantes 78,2 % correspondem a uma fase cristalina cúbica de Cu₂S. Os tamanhos das NPs foram calculados através da equação de Scherrer, recolhendo a largura dos picos a meia altura de maior intensidade e os respetivos ângulos de difração para cada fase cristalina. Os tamanhos estimados foram de 1,69 nm e 2,13 nm para as fases de CuS e Cu₂S, respetivamente. Os tamanhos obtidos diferem para tipos de síntese diferentes, contudo, de um modo geral para o método de preparação utilizado é expectável obter tamanhos inferiores a 5 nm para este tipo de NPs [72].

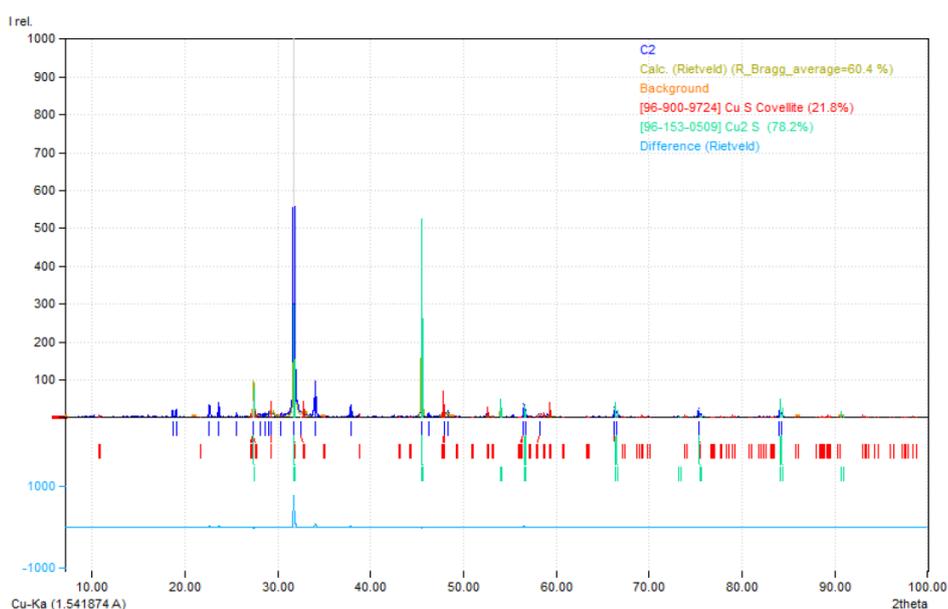


Figura 25 - Difractograma NPs de CuS

Tabela 5 -Propriedades estruturais das NPs CuS determinadas pela técnica de Xrd

Fase	Composição elementar	Pureza	Estrutura cristalina	Célula unitária (Å)
CuS	Cu (76,9 %)	CuS (21,5 %)	Hexagonal	a= 3.7960 Å; c= 16.3820 Å
Cu ₂ S	S (23,1 %)	Cu ₂ S (78,5%)	Cúbica	a= 5.6286 Å

III.2.3 Espectroscopia de Absorção

A figura 26 mostra o espectro de absorção de uma dispersão aquosa das nanopartículas de sulfureto de cobre na região UV-Vis e NIR, entre os 300 e os 1300 nm, permitindo confirmar a sua síntese.

Através da análise do espectro é possível evidenciar de forma inequívoca uma banda de absorção bem definida perto do infravermelho, dos 800 aos 1200 nm com um máximo de absorção aos 1100 nm. Esta banda é característica deste tipo de NPs e resulta das transições energéticas entre as orbitais d de iões de Cu²⁺ presentes no material, sendo responsável pela capacidade de geração de calor deste material [73, 74]. Na região de baixo comprimento de onda é possível observar que a partir dos 575 nm o espectro volta a subir. Em comparação com o *bulk* do mesmo material há um desvio hipsocrómico significativo, na sua energia de gap, que demonstra o efeito de confinamento quântico característico da redução de tamanho das NPs [26, 75].

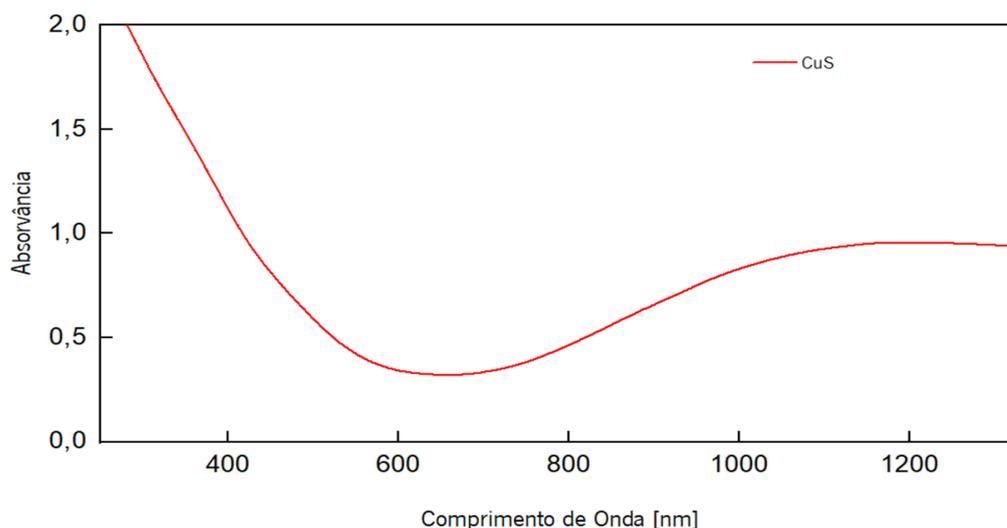


Figura 26 - Espectro de absorção das NPs plasmónicas de sulfureto de cobre.

III.2.2 DLS – Potencial Zeta, Tamanhos e Estabilidade

Recorrendo à técnica de DLS, obteve-se o diâmetro hidrodinâmico, distribuição de tamanhos, potencial zeta e estabilidade coloidal das nanopartículas plasmônicas de sulfureto de cobre. Os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 7, e a título de exemplo é apresentada na figura 27 a distribuição de tamanhos obtida pela distribuição de número com o respetivo correlograma inserido.

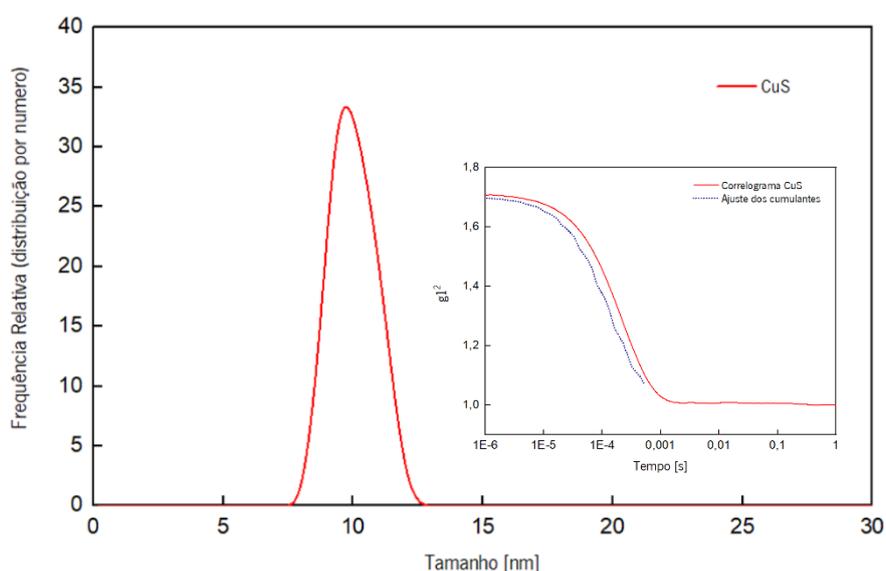


Figura 27 - Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma e ajuste dos cumulantes das NPs de sulfureto de cobre obtidos pela técnica de DLS

Tabela 6 – Tamanho, índice de polidispersividade e potencial zeta das NPs de sulfureto de cobre, determinados por DLS.

	Tamanho (distribuição por número) [nm]	Potencial Zeta [mV]	Polidispersividade
CuS	$10,7 \pm 0,78$	$-28,1 \pm 5,9$	$0,21 \pm 0,02$

O tamanho estimado pelo DLS das NPs de sulfureto de cobre foi de $10,7 \pm 0,78$ nm (obtido da distribuição por número). O seu potencial zeta tem um valor de $-28,1 \pm 5,9$ mV e o seu índice de polidispersão foi de $0,21 \pm 0,02$. O tamanho obtido nas medições de DLS está de acordo com o esperado tendo em conta o método de preparação usado para a sua síntese [76]. O valor de potencial zeta obtido indica que a dispersão coloidal é estável e a polidispersividade revela a presença de uma população de NPs com tamanhos homogêneos [66]. Tendo em conta a

importância da estabilidade coloidal das NPs enquanto agentes de aquecimento, foi também avaliada a estabilidade destas NPs em solução. Para tal, foi preparada uma solução aquosa de NPs de sulfureto de cobre, de concentração 0,03 mg/mL, e a sua transmitância foi medida ao longo do tempo (figura 28).

Ao longo do tempo de medida desta experiência observou-se que o valor de transmitância se manteve mais ou menos estável, com uma transmitância inicial e final de 78 e 80 %, respetivamente. Assim, foi possível concluir que as nanopartículas de sulfureto de cobre apresentam estabilidade coloidal ao longo do tempo.

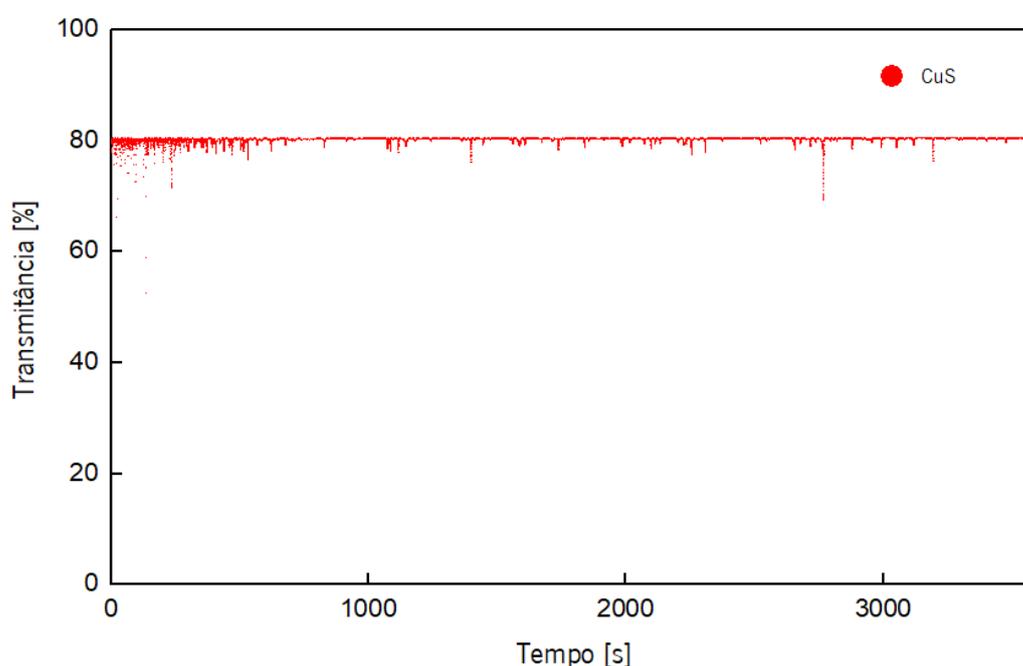


Figura 28 - Transmitância da solução aquosa de NPs de CuS (0,03 mg/mL) em função do tempo, determinado por DLS.

III.2.4 TEM

Na figura 29 estão apresentadas as imagens das nanopartículas de CuS, obtidas por microscopia eletrónica de transmissão. Tendo em conta o tamanho reduzido destas NPs (10 nm) e a sua agregação nas micrografias, não foi possível realizar uma análise fidedigna e representativa dos tamanhos da amostra. Apesar disto, foi possível observar alguns tamanhos inferiores a 10 nm representados nas imagens A e B da figura 29 que estão de acordo com o medido pela técnica de DLS e também de acordo com o descrito na literatura [72].

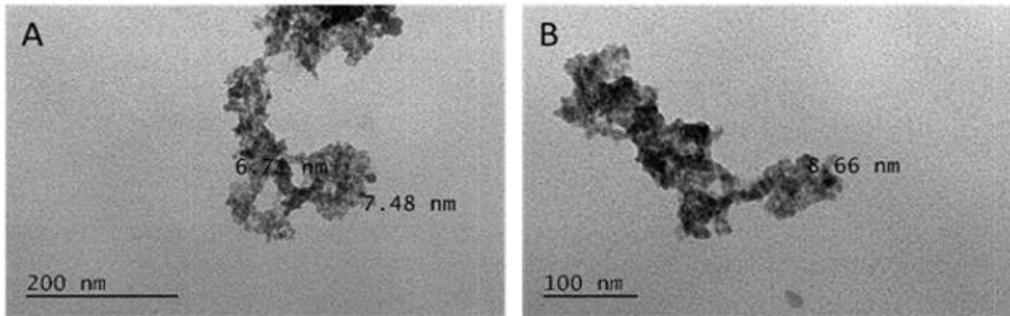


Figura 29 – Imagens de TEM **A.** NPs de sulfureto de cobre (escala: 200 nm). **B.** NPs CuS (escala: 100 nm)

III.2.5 Ensaios de hipertermia fototérmica

Tendo em conta o potencial das nanopartículas de sulfureto de cobre enquanto agentes de hipertermia fototérmica, foram realizados ensaios de fototermia destas NPs em diferentes condições experimentais. As curvas de aquecimento foram obtidas durante meia hora, tendo sido testadas duas concentrações de NPs (0,1 e 1 mg/mL) e várias potências de laser (200, 500 e 1000 mW). Os resultados obtidos, estão apresentados abaixo na figura 30 e na tabela 8.

Os resultados da irradiação das NPs de sulfureto de cobre demonstram uma boa capacidade de geração de calor, que está dependente da sua concentração em solução e da potência de irradiação [77, 78]. Como se pode constatar pela tabela 8, o aquecimento mais pronunciado, de 25,1 °C, obteve-se para as NPs com maior concentração quando irradiadas com uma potência de laser de 1000 mW. Para comparação, foi realizado um ensaio com água ultrapura (branco) para excluir qualquer efeito que pudesse enviesar os resultados obtidos. Deste ensaio concluiu-se que não existe um aquecimento considerável da água, o que comprova que a geração de calor das NPs de CuS deve-se unicamente à sua capacidade de conversão de energia em calor [78].

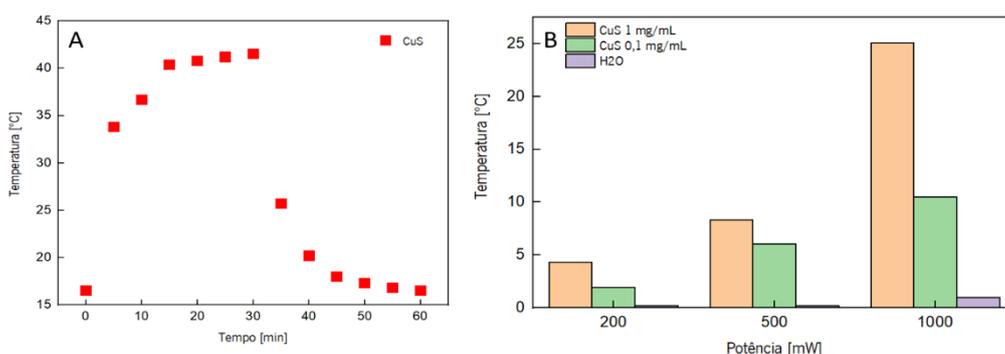


Figura 30 - Curva de aquecimento 1 mg/mL com potência de irradiação de 1000 mW das NP de CuS (A); Ensaio de irradiação NPs (B)

Adicionalmente foram calculados os valores de SAR para todas as condições descritas. Através da interpretação destes valores, descritos na tabela 8, podemos observar uma tendência de subida à medida que a concentração da solução e potência do laser aumentam, tal como acontece para as NPs magnéticas nos ensaios de irradiação fototérmica. Em comparação com os ensaios de hipertermia magnética, os valores de SAR apresentam uma disparidade elevada. Nestes ensaios, o aumento da concentração da solução provoca uma diminuição do valor de SAR. Uma possível explicação, é o aumento do momento dipolar das NPs causado pelo aumento da sua concentração que por consequência afeta o tempo de relaxação de Néel [70]. Uma vez que as NPs de CuS não são magnéticas e o seu mecanismo de geração de calor é diferente e dependente, de forma positiva, da sua concentração e potência de irradiação, o seu SAR não é afetado por este fator.

Como esperado, o maior valor de SAR obteve-se para a solução de maior concentração quando irradiada com a potência de 1000 mW e foi de 3764,5 Wg⁻¹. O seu aquecimento máximo foi de 25,1 °C e a temperatura final da solução, após 30 minutos de irradiação, atingiu o máximo de 42°C. É de notar que, apesar destas NPs apresentarem uma maior capacidade de geração de calor que as NPs magnéticas, estas registaram o maior valor de SAR de todos os ensaios fototérmicos apesar de este valor não traduzir o maior aquecimento. Uma possível razão para explicar estes resultados é a rapidez do aquecimento inicial (rampa de aquecimento). Sendo este o parâmetro determinante para o cálculo do SAR, através da equação 2, conclui-se que as NPs magnéticas foram as que registaram o aquecimento mais rápido nos primeiros 5 minutos apesar de não ter sido o aquecimento mais pronunciado.

Tabela 7 - Ensaio de fototermia NPs de CuS

	Concentração	P_{Laser} (mW)	ΔT_{MAX} (°C)	Declive	SAR (Wg⁻¹)
CuS	0,1 mg/mL	200	1,9	0,04	185,6
		500	6,1	0,1	418
		1000	10,5	0,56	2355
	1 mg/mL	200	4,3	0,41	1700,4
		500	8,4	0,54	2257,2
		1000	25,1	0,9	3764,5

III.3 Nanopartículas híbridas magneto-plasmónicas

III.3.2 Espectroscopia de Absorção

O acoplamento das nanopartículas de ferrite de manganês com as nanopartículas de sulfureto de cobre foi realizado tendo em vista o desenvolvimento de agentes de hipertermia com elevada capacidade de geração de calor. O acoplamento das nanopartículas magnéticas às plasmónicas foi confirmado pela técnica de espectroscopia de absorção (figura 31).

Através da observação e comparação dos espectros da figura 31, é possível concluir o acoplamento das nanopartículas de sulfureto de cobre à superfície das nanopartículas magnéticas. O espectro de absorção das nanopartículas de sulfureto de cobre apresenta duas bandas largas de elevada intensidade, a primeira entre os 200 nm e os 600 nm e a segunda entre os 800 nm e os 1300 nm. Por outro lado, as nanopartículas de ferrite de manganês são caracterizadas por um largo espectro de absorção em toda a região UV-Vis, mas de intensidade mais reduzidas. Assim, a presença das duas bandas de absorção bem definidas no espectro das nanopartículas magneto-plasmónicas, confirma o sucesso do seu acoplamento e a formação das nanoestruturas híbridas.

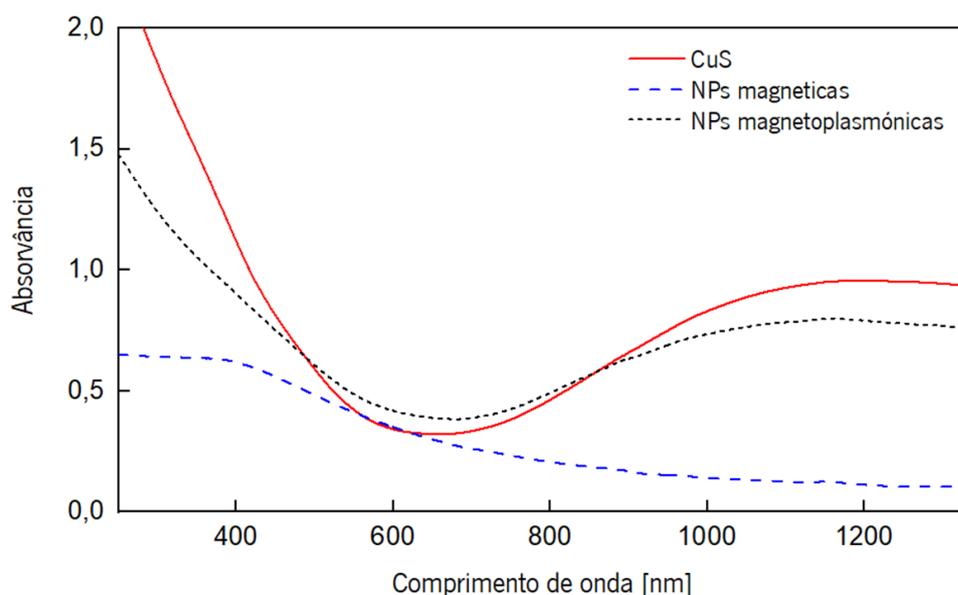


Figura 31 - Espectros de absorção NPs magnéticas de ferrite de manganês, plasmónicas de sulfureto de cobre e magneto-plasmónicas.

III.3.1 DLS – Potencial Zeta, Tamanhos e Estabilidade

A caracterização estrutural das nanoestruturas híbridas foi efetuada pela técnica de DLS. O tamanho estimado pelo DLS destes híbridos foi de $46,8 \pm 6,3$ nm (obtido da distribuição por número). O seu potencial zeta tem um valor de $-23,4 \pm 1,6$ mV e o seu índice de polidispersividade foi de $0,24 \pm 0,02$. A distribuição de tamanhos pode ser observada na figura 32 e os seus valores na tabela 9.

O desenvolvimento de nanoestruturas híbridas é comumente usado para a realização de terapias combinadas. Tal como esperado, o tamanho das NPs híbridas magneto-plasmónicas é maior, uma vez que possuem agora na sua composição NPs magnéticas e plasmónicas. Contudo, estes tamanhos mantêm-se adequados para o uso em aplicações biológicas [79]. O valor do seu potencial zeta diminuiu em comparação ao medido às nanopartículas individualizadas, ao qual acarreta uma ligeira perda de estabilidade em solução. A polidispersividade aumentou e, apesar de ser inferior a 0,3, sugere agora a presença de alguns agregados ou nanopartículas híbridas com tamanhos superiores.

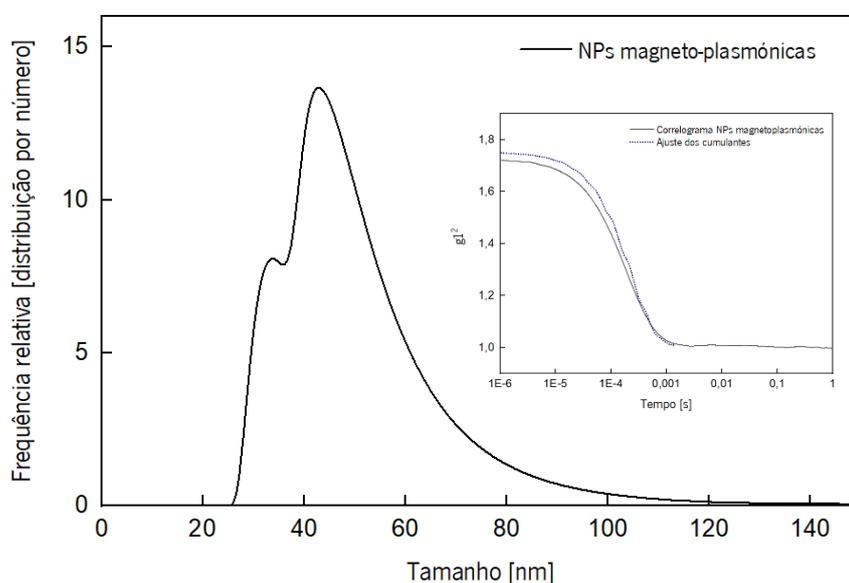


Figura 32 - Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma e ajuste dos cumulantes a das magneto-plasmónicas obtidos pela técnica de DLS

Tabela 9 - Tamanho, potencial zeta e polidispersividade das NPs de CuS determinados por DLS

	Tamanho [nm]	Potencial Zeta [mV]	Polidispersividade
NPs magneto-plasmônicas	46,8 ± 6,3	-23,4 ± 1,6	0,24 ± 0,02

De igual maneira foi estudada a estabilidade coloidal das nanopartículas híbridas, através da medição da sua transmitância ao longo do tempo (figura 33).

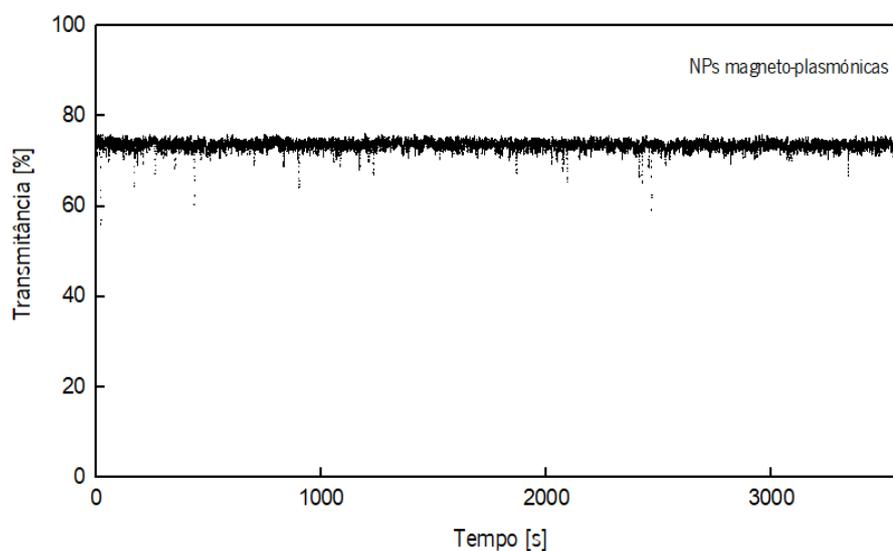


Figura 33 - Ensaio de estabilidade, durante 1 hora, das NPs magneto-plasmônicas, determinado por DLS.

Ao longo de toda a medida, a solução manteve-se estável sendo que o valor inicial e final foram de 74,9 % e 73 %, respetivamente, dos quais podemos concluir a boa estabilidade da solução.

III.3.2 SQUID

A avaliação do comportamento magnético das nanopartículas magneto-plasmônicas de ferrite de manganês e sulfureto de cobre foi primeiramente efetuada de forma rudimentar no laboratório, com recurso a um magneto (figura 34). Neste ensaio preliminar foi possível observar que as nanoestruturas híbridas apresentaram resposta ao campo aplicado. Na imagem B, é

possível observar que quando expostas a um campo magnético, as NPs híbridas se orientam na direção do campo, deixando o resto da solução incolor. Desta forma, é possível corroborar o sucesso do acoplamento, caso contrário apenas as NPs magnéticas reagiriam ao campo e a cor da solução manter-se-ia verde-escura (cor das NPs de sulfureto de cobre). Assim, é possível antecipar um comportamento magnético para as nanopartículas magneto-plasmônicas.

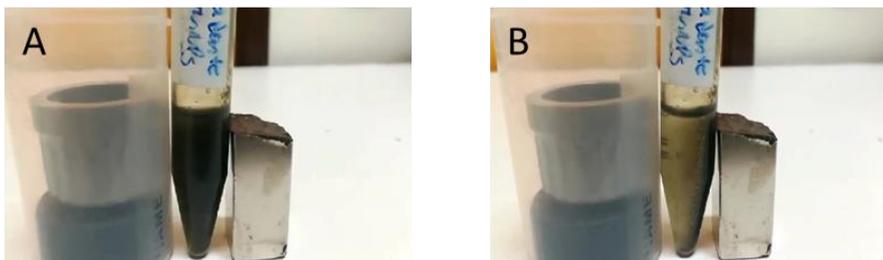


Figura 34 - Aplicação de um campo magnético à solução de NPs magneto-plasmônicas. **A** (t0 min), **B** (t2 min)

Assim, a caracterização magnética destas NPs foi efetuada por SQUID, através da medição da magnetização em função do campo aplicado, à temperatura ambiente. O ciclo de histerese e as propriedades magnéticas podem ser consultados na figura 35 e na tabela 11, respetivamente.

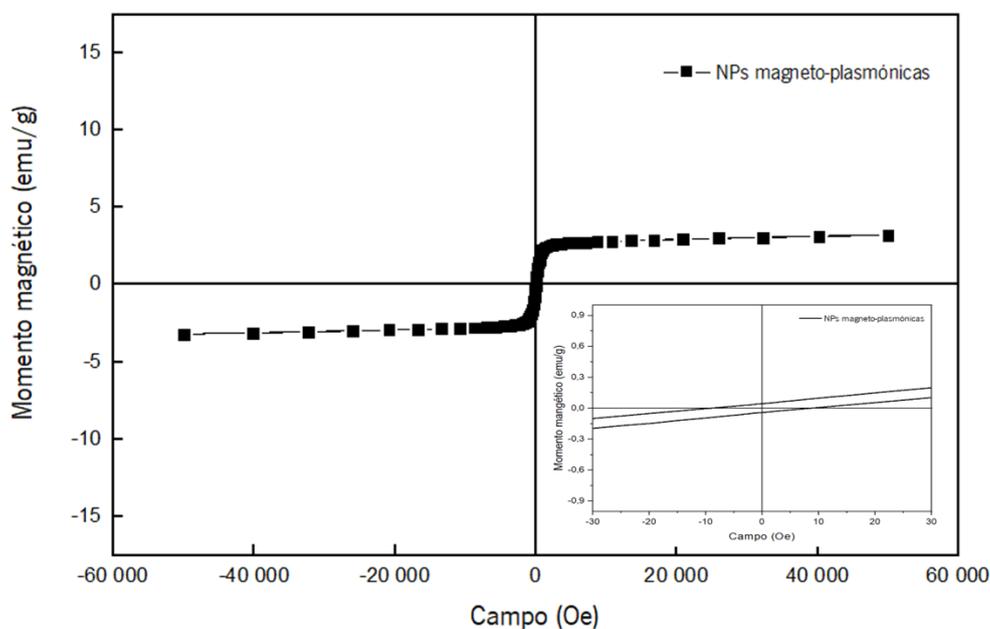


Figura 35 - Ciclo de histerese das nanopartículas magneto-plasmônicas. Ampliação da região de baixo campo (quarto quadrante)

Tabela 10 - Campo coercivo (H), magnetização remanescente (M_r), magnetização de saturação (M_s) e razão entre M_r e M_s (M_r/M_s) das NPs acopladas

	H (Oe)	M_r (emu/g)	M_s (emu/g)	M_r/M_s
NPs magneto-plasmónicas	9,11	0,044	3,28	0,013

À semelhança das NPs magnéticas, a curva de magnetização em função do campo aplicado das nanopartículas acopladas revelou uma histerese pequena, com um valor de campo coercivo de 9,11 Oe e uma magnetização de remanescência de 3,28 emu/g. No entanto, a magnetização de saturação registou uma diminuição acentuada de 14,68 emu/g, correspondente às nanopartículas magnéticas, para 3,28 emu/g nas nanopartículas híbridas. Esta redução de magnetização está de acordo ao esperado, uma vez que as NPs de sulfureto de cobre apresentam um comportamento diamagnético [80]. Assim, a contribuição diamagnética das nanopartículas plasmónicas leva a uma redução da magnetização total da amostra [81]. Apesar da perda significativa de magnetização, as nanoestruturas híbridas apresentaram também um comportamento superparamagnético, com um valor de razão entre a magnetização remanescente e de saturação de 0,044 emu/g, menor do que 0,1.

III.3.4 Irradiação

De igual modo foram realizados ensaios de irradiação para as NPs magneto-plasmónicas. A curva de aquecimento, a título de exemplo, bem como os resultados da irradiação estão representadas nas imagens A e B da figura 36.

Através da interpretação destes gráficos é possível concluir que as NPs magneto-plasmónicas mantêm a capacidade de geração de calor após o acoplamento.

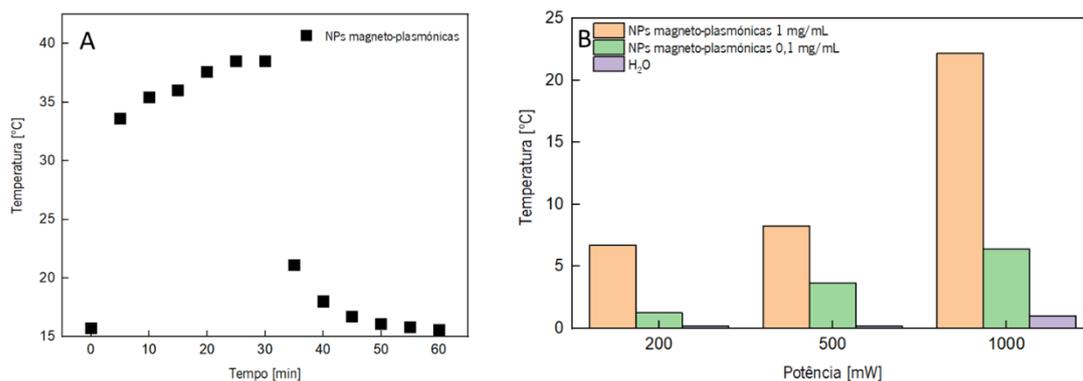


Figura 36 - Curva de aquecimento 1 mg/mL com potência de irradiação de 1000 mW das NPs magneto-plasmónicas (A); Ensaio de irradiação NPs magneto-plasmónicas (B)

Os valores de SAR foram também calculados para as NPs magneto-plasmónicas. O máximo registou-se, à semelhança das NPs magnéticas e de CuS, para a concentração de 1 mg/mL e potencial de laser de 1000 mW e foi de 1504,8 Wg^{-1} . Apesar deste valor ser inferior ao medido para as NPs magnéticas e de CuS, a temperatura final correspondente a este ensaio atingiu o valor de 38,5 °C, perto da temperatura atingida para as NPs de CuS, com um aquecimento máximo de 22,2 °C, relevante para aplicações biomédicas. Uma possível razão para a redução do SAR é a deposição das NPs observada nos ensaios. Com o acoplamento das NPs de CuS na superfície das NPs magnéticas e o consequente aumento do potencial zeta foi observada alguma deposição das NPs magneto-plasmónicas ao longo dos ensaios de irradiação que poderá ser a causa da diminuição dos valores de SAR medidos.

Tabela 11 - Ensaio de fototerapia das NPs magneto-plasmónicas

	Concentração	P_{Laser} (mW)	ΔT_{MAX} (°C)	Declive	SAR (Wg^{-1})
NPs magneto-plasmónicas	0,1 mg/mL	200	1,25	0,04	167,2
		500	3,65	0,14	585,2
		1000	6,4	0,24	1003,2
	1 mg/mL	200	6,7	0,18	752,4
		500	8,25	0,22	919,6
		1000	22,2	0,36	1504,8

III.4 Caracterização dos lipossomas magneto/plasmônicos aquosos

III.4.1 Espectroscopia de Fluorescência

A síntese de lipossomas magneto-plasmônicos contendo nanopartículas de ferrite de manganês acopladas às nanopartículas de sulfureto de cobre, foi confirmada pela técnica de espectroscopia de fluorescência. Para tal, foram preparados lipossomas e magnetolipossomas plasmônicos, ambos marcados com a sonda fluorescente rodamina. Os espectros das duas formulações de lipossomas foram traçados com comprimento de onda de excitação nos 545 nm (figura 37).

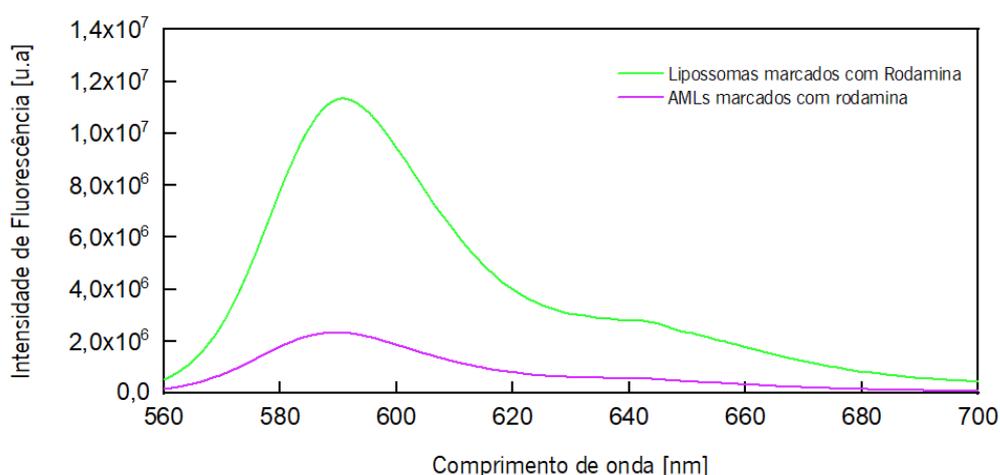


Figura 37 - Espectros de Fluorescência dos lipossomas e lipossomas magneto-plasmônicos, marcados com rodamina

Como era expectável, em ambos os espectros é possível observar a banda de emissão típica da rodamina, com um máximo de intensidade de fluorescência perto dos 590 nm. Para os lipossomas contendo NPs magneto-plasmônicas verifica-se uma clara redução da fluorescência da rodamina. Este fenómeno de *quenching* é atribuído à presença das nanopartículas magneto-plasmônicas perto da membrana lipídica dos lipossomas que resulta numa redução da fluorescência da rodamina por efeito de átmo pesado ou transferência eletrónica fotoinduzida [82, 83]. Desta forma, o efeito de *quenching* permite confirmar a formação dos magnetolipossomas plasmônicos.

III.4.1 DLS – Potencial Zeta, Tamanhos e Estabilidade

Nesta fase do trabalho, recorreu-se novamente à técnica de DLS para fazer a caracterização estrutural dos lipossomas contendo as nanopartículas magneto-plasmónicas. Os valores de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade e potencial zeta obtidos estão resumidos na tabela 13. Para comparação são também apresentados os valores obtidos para lipossomas sem nanopartículas. A título de exemplo, na figura 38 são mostrados os gráficos de distribuição de tamanho com os respetivos correlogramas inseridos.

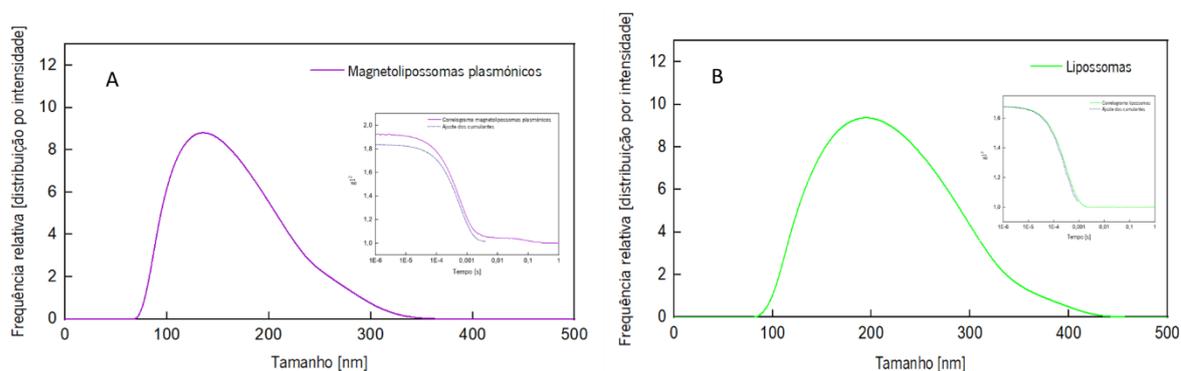


Figura 38 - Distribuição dos tamanhos e respetivos correlogramas e ajustes dos cumulantes dos magnetolipossomas plasmónicos **(A)** e lipossomas **(B)** obtidos pela técnica de DLS.

Os diâmetros hidrodinâmicos estimados por DLS (obtidos da distribuição por intensidade) para os magnetolipossomas plasmónicos e lipossomas foram de $172,0 \pm 4,4$ nm e $200,0 \pm 10,5$ nm, respetivamente. O seus potenciais zeta têm um valor de $-11,8 \pm 0,3$ mV e $-10,5 \pm 0,5$ mV, e os seus índices de polidispersividade foram de $0,21 \pm 0,03$ e $0,16 \pm 0,02$, respetivamente. Destes resultados podemos afirmar que a presença das NPs híbridas magneto-plasmónicas no interior dos lipossomas não têm influência apreciável nos resultados dos diâmetros hidrodinâmicos obtidos sendo estes, inclusive, inferiores aos dos lipossomas sem NPs. É importante ainda referir que tamanhos inferiores a 200 nm favorecem a utilização destes bionanossistemas em aplicações biomédicas porque permite a sua difusão através dos poros dos vasos sanguíneos que favorece o seu alcance em regiões tumorais de difícil acesso [84, 85]. O potencial zeta medido sugere alguma perda de estabilidade em solução uma vez que é substancialmente superior ao medido para as NPs acopladas isto poderá dever-se à contribuição de carga zwitteriónica do lípido utilizado para a

síntese dos magnetolipossomas plasmônicos. A polidispersividade medida revela a presença de distribuição única de diâmetros hidrodinâmicos existentes na solução, tal como é representado na imagem A da figura 38.

Tabela 12 - Tamanho, potencial zeta e polidispersividade dos magnetolipossomas plasmônicos e lipossomas determinados por DLS

	Diâmetro Hidrodinâmico [nm]	Potencial Zeta [mV]	Polidispersividade
Magnetolipossomas plasmônicos	172,0 ± 4,4	-11,8 ± 0,3	0,21 ± 0,03
Lipossomas	200,0 ± 10,5	-10,5 ± 0,5	0,16 ± 0,02

Os estudos de estabilidade dos magnetolipossomas plasmônicos e lipossomas foram realizados nas mesmas condições previamente descritas na qual se mediram as suas transmitâncias ao longo de 1 hora (figura 39). Os valores iniciais e finais das transmitâncias para os magnetolipossomas plasmônicos e lipossomas foram de 80,2 e 79,5 %, e 81,7 e 81,1 %, respectivamente. Apesar dos valores medidos do potencial zeta que previam uma perda de estabilidade, ambas as soluções se mantiveram estáveis durante todo o período da medida de transmitância.

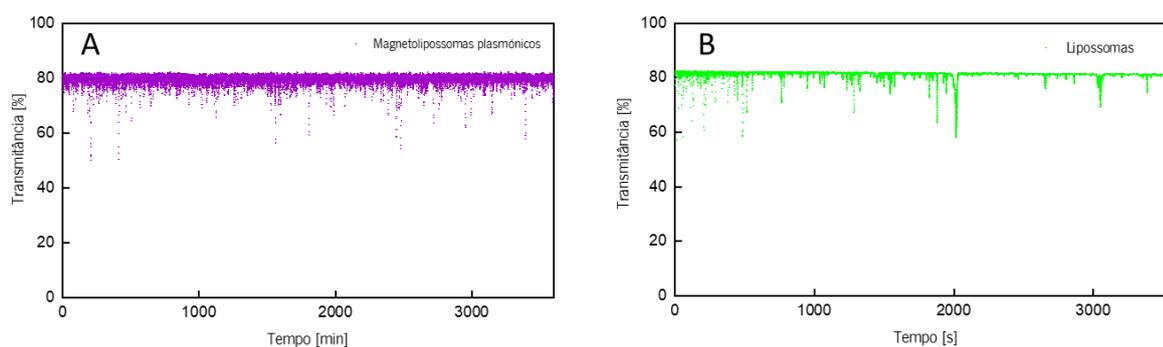


Figura 39 - Ensaio de estabilidade durante 1 hora dos magnetolipossomas plasmônicos **(A)** e lipossomas **(B)** determinado por DLS

III.4.3 Aquecimento local nos lipossomas magneto-plasmônicos

Após toda a caracterização estrutural e magnética das NPs, a capacidade do aquecimento local dos magnetolipossomas plasmônicos marcados com sonda *reichardt* foi avaliada. Para isso foram realizados ensaios de irradiação nos quais se adquiriram os espectros de absorção de uma solução de volume de 3 mL de magnetolipossomas plasmônicos marcados com sonda *reichardt*. A montagem dos ensaios pode ser consultada na figura 15. Foram monitorizados, os espectros de absorção dos nanossistemas marcados com a sonda *reichardt* em dois ensaios distintos. Um ensaio na qual se mediram os espectros de absorção aquecendo uma solução de magnetolipossomas plasmônicos marcados com a sonda com recurso a um banho-maria, que serviu para modelar as alterações sofridas pela sonda termocrômica com a variação da temperatura. Um segundo ensaio realizado nas mesmas condições, mas com irradiação laser com uma potência de 1000 mW em vez do banho-maria. Cada ensaio teve a duração de 1 hora.

Os gráficos A e B representados na figura 40 correspondem aos espectros de absorção recolhidos nos ensaios dos magnetolipossomas plasmônicos realizados com recurso ao banho-

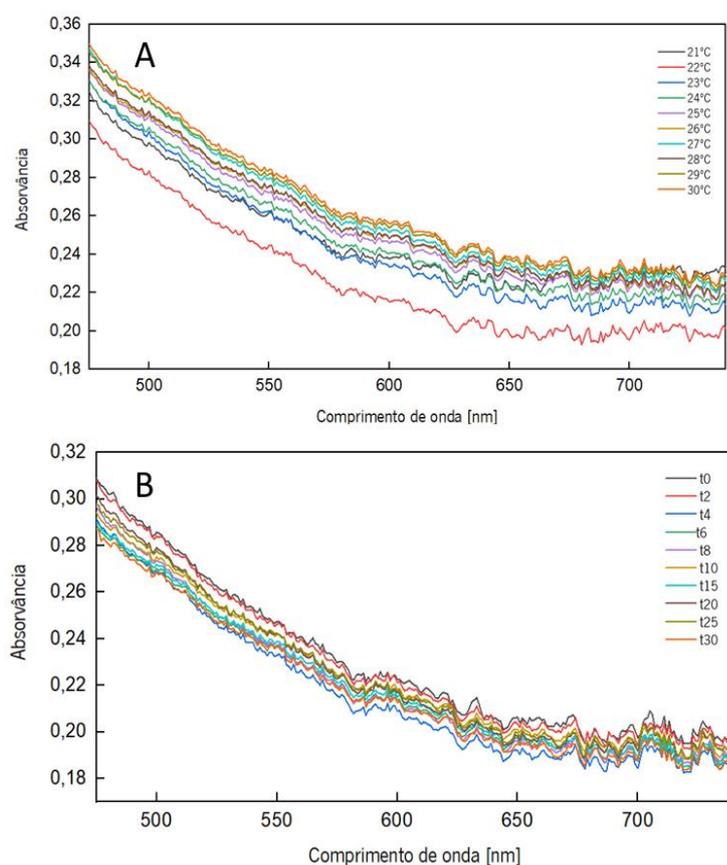


Figura 40 - Variação dos espectros de absorção (A) dos magnetolipossomas plasmônicos aquecidos com recurso ao banho-maria; (B) com recurso a irradiação laser

maria e ao laser, respetivamente. Através da sua interpretação, podemos notar que as variações de absorção presentes nos dois ensaios. Estas variações espectrais permitiram modelar e prever o aquecimento local gerado pelos magnetolipossomas plasmónicos.

Para cada sistema, de modo a modelar as variações, os espectros de absorção foram globalmente ajustados através de um modelo, previamente desenvolvido pelo centro de física da universidade do Minho, que consiste numa soma de oito funções gaussianas, restritas a uma sequência de zonas espectrais. As equações utilizadas foram as seguintes:

$$g_j(\lambda) = \frac{1}{\sigma_j \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\lambda - \lambda_{max,i}}{\sigma_j} \right)^2} \quad \text{Equação 6}$$

$$Abs(\lambda, T_i) = A_{disp}(\lambda, T_i) + A(T_i) \sum_{j=1}^8 f_j g_j(\lambda) \quad \text{Equação 7}$$

$$A_{disp}(\lambda, T_i) = A_{offset}(T_i) + \frac{A_d(T_i)}{(\lambda/100)^4} \quad \text{Equação 8}$$

$$f_1(T_i) = \sin^2 \left(a_1 + b_1 \times \left(\frac{T_i - T_0}{T_0} \right) + c_1 \times \left(\frac{T_i - T_0}{T_0} \right)^2 \right); T_0 = 21^\circ C \quad \text{Equação 9}$$

$$f_j(T_i) = \left(1 - \sum_{k=1}^{j-1} f_k \right) \sin^2 \left(a_j + b_j \times \left(\frac{T_i - T_0}{T_0} \right) + c_j \times \left(\frac{T_i - T_0}{T_0} \right)^2 \right) \quad \text{Equação 10}$$

$j = 2, 3, \dots, 7$

$$f_8(T_i) = \left(1 - \sum_{k=1}^{j-1} f_k \right) \quad \text{Equação 11}$$

A fim de controlar o procedimento de ajuste, os parâmetros das funções gaussianas foram restringidos da seguinte forma:

$$\lambda_{max,j} = (\lambda_{max,j})_{min} + [(\lambda_{max,j})_{max} - (\lambda_{max,j})_{min}] \sin^2(m_j) \quad \text{Equação 12}$$

$$\sigma_j = (\sigma_j)_{min} + [(\sigma_j)_{max} - (\sigma_j)_{min}] \sin^2(s_j) \quad \text{Equação 13}$$

O comprimento de onda máximo e meia largura de cada função gaussiana são parâmetros globais do ajuste, que são os mesmos para todas as temperaturas. O peso de cada função gaussiana foi permitido variar com a temperatura, com os três parâmetros que definem tal variação também sendo parâmetros globais para todas as temperaturas. Além disso, uma contribuição de dispersão com comportamento tipo Rayleigh foi considerada para cada espectro. Um conjunto de parâmetros globais foi então usado para ajustar os espectros de absorção que resultaram da irradiação de cada amostra. O procedimento de ajuste global para cada conjunto de espectros de absorção com temperatura variável consiste em minimizar a soma do seguinte erro quadrático:

$$ErrorSum = \sum_{i=1}^{n_T} \sum_{l=1}^{n_\lambda} w_l \left(Abs(\lambda_l, T_i) - Abs_{experimental}(\lambda_l, T_i) \right)^2 \quad \text{Equação 14}$$

Os gráficos resultantes do ajuste estão representados na figura 41. A temperatura em cada tempo de irradiação é agora um parâmetro local do procedimento de adaptação global.

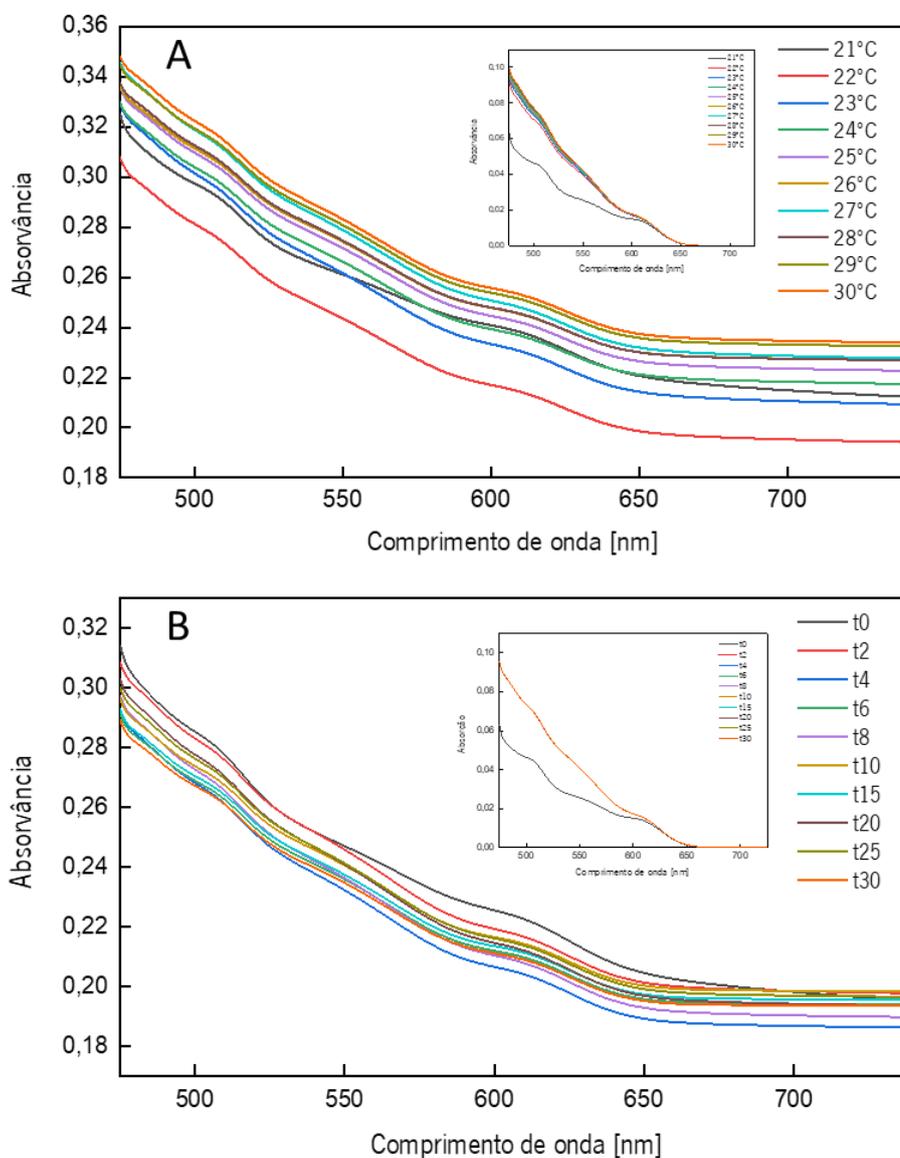


Figura 41 - Variação dos espectros de absorção ajustados (A) dos magnetolipossomas plasmônicos aquecidos com recurso ao banho-maria; (B) com recurso a irradiação laser

Feito o ajuste para os gráficos da figura 41, podemos observar uma vez mais as variações de absorção ao longo do período de irradiação. Estas variações devem-se maioritariamente ao fundo dispersivo. O fundo dispersivo refere-se à luz que é dispersa pela amostra e pode variar ao longo dos ensaios porque os magnetolipossomas plasmônicos podem depositar, o sinal medido e a

própria resposta do detetor podem variar assim como o set up experimental que não é o ideal. O Offset e a curva de dispersão são parâmetros que corrigem estas variações que têm de ser descontadas para relevar as variações espectrais reais da sonda, representadas pelos insets presentes na figura 41. Descontada esta contribuição do fundo dispersivo, através da equação 9 é possível descobrir os três coeficientes a_1 , b_1 e c_1 , pela sua aplicação no ensaio do aquecimento com recurso a banho-maria onde as temperaturas são conhecidas. Uma vez descobertos estes coeficientes, que são comuns aos dois ensaios, a mesma equação é aplicada com o objetivo de determinar a temperatura local dos magnetolipossomas plasmônicos.

Nos primeiros 2 minutos de irradiação laser, ocorreu a maior variação espectral (grafico B da figura 41) que correspondeu a um aquecimento de cerca de $2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, representado no gráfico da figura 42. Este aquecimento não foi linear sendo que em alguns momentos o espectro de absorção era recuperado. Estas variações podem ter origem na baixa área de superfície de irradiação laser, o que provocam arrefecimento local que se traduz na recuperação da absorção da amostra, e por consequência o seu arrefecimento.

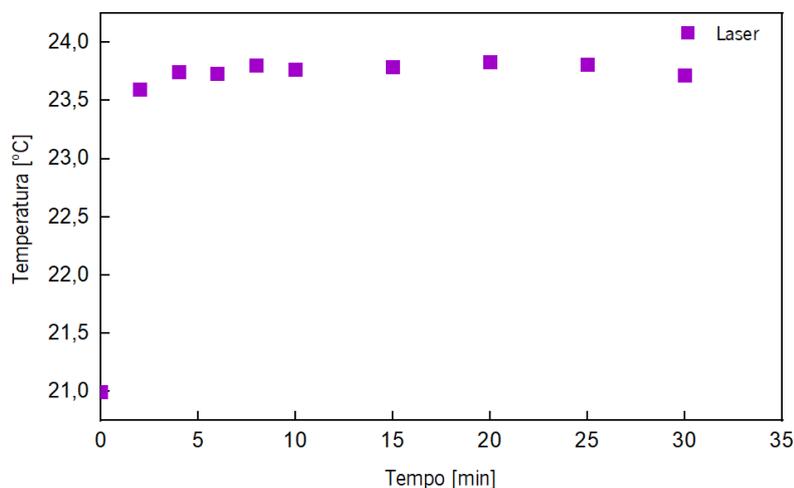


Figura 42 - Variação da temperatura ajustada dos magnetolipossomas plasmônicos com irradiação laser

O instante no qual o aquecimento foi mais pronunciado ocorreu aos 20 minutos, tendo-se registado um aquecimento local de $2,8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um aumento de temperatura local desta magnitude e em breves instantes é relevante, na medida que poderá ser suficiente para induzir uma transição de fase de lipossomas termosensíveis, o que permitirá a libertação dos seus componentes terapêuticos. Podemos então concluir que os magnetolipossomas plasmônicos sintetizados são promissores para fototerapia e para libertação controlada.

Conclusão e perspectivas futuras

Neste trabalho, foram sintetizados nanossistemas lipídicos contendo nanopartículas magneto-plasmónicas para a terapia multimodal do cancro, através de hipertermia magnética e fototérmica. As NPs magnéticas, nanopartículas plasmónicas e os magnetolipossomas plasmónicos foram caracterizados e revelaram-se promissores para a terapia do cancro. Os resultados de SAR obtidos dos ensaios de fototermia de 4263, 3764 e 1504 Wg^{-1} para as NPs magnéticas, CuS e magneto-plasmónicas, respetivamente para uma concentração de 1 mg/ml e uma potência de irradiação de 1 W/cm^2 , revelam a boa capacidade de geração de calor. Os tamanhos medidos por DLS dos magnetolipossomas plasmónicos foram de 172 nm, ideais para aplicações biomédicas.

Foi obtido um aquecimento local dos magnetolipossomas plasmónicos de 2,5°C, em 2 minutos de irradiação laser. Contudo, é necessário realizar análises complementares e estudos com relevância biomédica de modo a assegurar o potencial desta formulação.

Como perspectivas futuras, numa primeira instância, será relevante melhorar os processos de síntese com o objetivo de evitar contaminações nas amostras de modo a obter análises mais fidedignas e consistentes, como por exemplo, XRD, TEM e SQUID. Estas análises são de extrema relevância uma vez que definem os parâmetros mais fundamentais tais como: tamanhos, a pureza das amostras e as suas propriedades magnéticas, para a aplicabilidade destas NPs. Resolvidos estes problemas experimentais, sugiro a realização de uma análise de Cryo-TEM para os magnetolipossomas plasmónicos de modo a aferir sobre a internalização das NPs no seu interior aquoso e determinar os seus tamanhos com maior rigor. Por último, sugere-se ainda a incorporação de um fármaco antitumoral nesta formulação, o estudo de encapsulamento e libertação e a realização de ensaios *in vitro* com células tumorais testando o efeito sinérgico da hipertermia magnética e fototérmica aliados à quimioterapia.

Referências

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71:209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, et al (2019) The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* 25:112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
3. Freitas RA (2005) What is nanomedicine? *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 1:2–9. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2004.11.003>
4. Al-Hakkani MF (2020) Biogenic copper nanoparticles and their applications: A review. *SN Appl Sci* 2:505. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2279-1>
5. Krishnan KM (2016) Magnetic Materials in Medicine and Biology. In: *Fundamentals and Applications of Magnetic Materials*. Oxford University Press, pp 519–654
6. Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S (2012) Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett* 7:144. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-144>
7. Abenojar EC, Wickramasinghe S, Bas-Concepcion J, Samia ACS (2016) Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. *Prog Nat Sci Mater Int* 26:440–448. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2016.09.004>
8. Bertotti G (1998) Magnetic Domains and Domain Walls. In: *Hysteresis in Magnetism*. Elsevier, pp 189–221
9. Tenforde TS (2005) Magnetically induced electric fields and currents in the circulatory system. *Prog Biophys Mol Biol* 87:279–288. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.08.003>
10. Binns C (2014) Tutorial Section on Nanomagnetism. In: *Frontiers of Nanoscience*, 1st ed. Elsevier Ltd., pp 1–32
11. Wallyn J, Anton N, Vandamme TF (2019) Synthesis, principles, and properties of magnetite nanoparticles for in vivo imaging applications—A review. *Pharmaceutics* 11:1–29. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110601>
12. Bhatia E, Barber ZH, Maasilta IJ, Senapati K (2019) Domain wall induced modulation of low field H-T phase diagram in patterned superconductor-ferromagnet stripes. *AIP Adv* 9:045107. <https://doi.org/10.1063/1.5087925>
13. Mehrmohammadi M, Yoon KY, Qu M, et al (2011) Enhanced pulsed magneto-motive ultrasound imaging using superparamagnetic nanoclusters. *Nanotechnology* 22:.. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/4/045502>
14. Wu K, Su D, Liu J, et al (2019) Magnetic nanoparticles in nanomedicine: A review of recent advances. *Nanotechnology* 30:.. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab4241>
15. Majidi S, Sehrig FZ, Farkhani SM, et al (2016) Current methods for synthesis of magnetic

- nanoparticles. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol* 44:722–734. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.982802>
16. Felton C, Karmakar A, Gartia Y, et al (2014) Magnetic nanoparticles as contrast agents in biomedical imaging: Recent advances in iron- and manganese-based magnetic nanoparticles. *Drug Metab Rev* 46:142–154. <https://doi.org/10.3109/03602532.2013.876429>
 17. Sharma SK, Shrivastava N, Rossi F, et al (2019) Nanoparticles-based magnetic and photo induced hyperthermia for cancer treatment. *Nano Today* 29:100795. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.100795>
 18. Albarqi HA, Demessie AA, Sabei FY, et al (2020) Systemically delivered magnetic hyperthermia for prostate cancer treatment. *Pharmaceutics* 12:1–14. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111020>
 19. Beola L, Gutiérrez L, Grazú V, Asín L (2019) A Roadmap to the Standardization of In Vivo Magnetic Hyperthermia. In: *Nanomaterials for Magnetic and Optical Hyperthermia Applications*. Elsevier, pp 317–337
 20. Cazares-Cortes E, Cabana S, Boitard C, et al (2019) Recent insights in magnetic hyperthermia: From the “hot-spot” effect for local delivery to combined magneto-photo-thermia using magneto-plasmonic hybrids. *Adv Drug Deliv Rev* 138:233–246. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.016>
 21. Vilches C, Quidant R (2020) *Targeted hyperthermia with plasmonic nanoparticles*, 1st ed. Elsevier Ltd.
 22. Lu Sun PC and LL (2015) Enhanced Molecular Spectroscopy via Localized Surface Plasmon Resonance, Chapter 18, pp. 384-404
 23. Khlebtsov NG, Dykman LA (2010) Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *J Quant Spectrosc Radiat Transf* 111:1–35. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2009.07.012>
 24. González AL, Noguez C, Beránek J, Barnard AS (2014) Size, shape, stability, and color of plasmonic silver nanoparticles. *J Phys Chem C* 118:9128–9136. <https://doi.org/10.1021/jp5018168>
 25. Huang X, El-Sayed MA (2011) Plasmonic photo-thermal therapy (PPTT). *Alexandria J Med* 47:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2011.01.001>
 26. Li Y, Lu W, Huang Q, et al (2010) Copper sulfide nanoparticles for photothermal ablation of tumor cells. *Nanomedicine* 5:1161–1171. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.85>
 27. Goel S, Chen F, Cai W (2014) Synthesis and biomedical applications of copper sulfide nanoparticles: From sensors to theranostics. *Small* 10:631–645. <https://doi.org/10.1002/smll.201301174>
 28. Kwon YT, Lim GD, Kim S, et al (2019) Effect of localized surface plasmon resonance on dispersion stability of copper sulfide nanoparticles. *Appl Surf Sci* 477:204–210. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.11.006>
 29. Curcio A, De Walle A Van, Benassai E, et al (2021) Massive Intracellular Remodeling of CuS

- Nanomaterials Produces Nontoxic Bioengineered Structures with Preserved Photothermal Potential. *ACS Nano* 15:9782–9795. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c00567>
30. Solomane N, Ajibade PA (2021) Synthesis and crystal structure of bis(thiomorpholinyl)dithiocarbamate Cu(II) complex and its use as precursor for CuS nanoparticles photocatalyst for the degradation of organic dyes. *J Sulfur Chem* 42:167–179. <https://doi.org/10.1080/17415993.2020.1822838>
 31. Dong K, Liu Z, Li Z, et al (2013) Hydrophobic anticancer drug delivery by a 980 nm laser-driven photothermal vehicle for efficient synergistic therapy of cancer cells in vivo. *Adv Mater* 25:4452–4458. <https://doi.org/10.1002/adma.201301232>
 32. Xiao Z (2014) CuS nanoparticles: clinically favorable materials for photothermal applications? *Nanomedicine* 9:373–375. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.2>
 33. Zou L, Wang H, He B, et al (2016) Current approaches of photothermal therapy in treating cancer metastasis with nanotherapeutics. *Theranostics* 6:762–772. <https://doi.org/10.7150/thno.14988>
 34. Liu S, Pan X, Liu H (2020) Two-Dimensional Nanomaterials for Photothermal Therapy. *Angew Chemie - Int Ed* 132:5890–5900. <https://doi.org/10.1002/anie.201911477>
 35. Melamed JR, Edelstein RS, Day ES (2015) Elucidating the Fundamental Mechanisms of Cell Death Triggered by Photothermal Therapy. *ACS Nano* 9:6–11. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b00021>
 36. Hou L, Shan X, Hao L, et al (2017) Copper sulfide nanoparticle-based localized drug delivery system as an effective cancer synergistic treatment and theranostic platform
 37. Wang D, Dong H, Li M, et al (2018) Erythrocyte-Cancer Hybrid Membrane Camouflaged Hollow Copper Sulfide Nanoparticles for Prolonged Circulation Life and Homotypic-Targeting Photothermal/Chemotherapy of Melanoma. *ACS Nano* 12:5241–5252. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08355>
 38. Das R, Rinaldi-Montes N, Alonso J, et al (2016) Boosted Hyperthermia Therapy by Combined AC Magnetic and Photothermal Exposures in Ag/Fe₃O₄ Nanoflowers. *ACS Appl Mater Interfaces* 8:25162–25169. <https://doi.org/10.1021/acsaami.6b09942>
 39. Southall NT, Dill KA, Haymet ADJ (2002) A view of the hydrophobic effect. *J Phys Chem B* 106:521–533. <https://doi.org/10.1021/jp015514e>
 40. Epand RM (2007) Membrane Lipid Polymorphism. 400:15–26. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-519-0_2
 41. Nagarajan R (2002) Molecular packing parameter and surfactant self-assembly: The neglected role of the surfactant tail. *Langmuir* 18:31–38. <https://doi.org/10.1021/la010831y>
 42. Milcovich G, Lettieri S, Antunes FE, et al (2017) Recent advances in smart biotechnology: Hydrogels and nanocarriers for tailored bioactive molecules depot. *Adv Colloid Interface Sci* 249:163–180. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.009>
 43. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 13:238–252.

[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)

44. Tranchant I, Thompson B, Nicolazzi C, et al (2004) Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids. *J Gene Med* 6:24–35. <https://doi.org/10.1002/jgm.509>
45. Platre MP, Jaillais Y (2017) Anionic lipids and the maintenance of membrane electrostatics in eukaryotes. *Plant Signal Behav* 12:e1282022. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1282022>
46. Stillwell W (2016) Lipid Membrane Properties. In: *An Introduction to Biological Membranes*. Elsevier, pp 181–220
47. Bozzuto G, Molinari A (2015) Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine* 975. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>
48. Xing H, Hwang K, Lu Y (2016) Recent developments of liposomes as nanocarriers for theranostic applications. *Theranostics* 6:1336–1352. <https://doi.org/10.7150/thno.15464>
49. Rommasi F, Esfandiari N (2021) Liposomal Nanomedicine: Applications for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Nanoscale Res Lett* 16:. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03553-8>
50. Zhang Z, Yang J, Min Q, et al (2019) Holo-Lactoferrin Modified Liposome for Relieving Tumor Hypoxia and Enhancing Radiochemotherapy of Cancer. *Small* 15:1–9. <https://doi.org/10.1002/smll.201803703>
51. Rodrigues ARO, Ramos JMF, Gomes IT, et al (2016) Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs. *RSC Adv* 6:17302–17313. <https://doi.org/10.1039/c5ra27058h>
52. Rodrigues ARO, Almeida BG, Rodrigues JM, et al (2017) Magnetoliposomes as carriers for promising antitumor thieno[3,2-b]pyridin-7-arylamines: photophysical and biological studies. *RSC Adv* 7:15352–15361. <https://doi.org/10.1039/c7ra00447h>
53. Rodrigues ARO, Matos JOG, Nova Dias AM, et al (2019) Development of multifunctional liposomes containing magnetic/plasmonic MnFe₂O₄/Au core/shell nanoparticles. *Pharmaceutics* 11:. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11010010>
54. Rio ISR, Rodrigues ARO, Rodrigues AP, et al (2020) Development of novel magnetoliposomes containing nickel ferrite nanoparticles covered with gold for applications in thermotherapy. *Materials (Basel)* 13:. <https://doi.org/10.3390/ma13040815>
55. Espinosa A, Bugnet M, Radtke G, et al (2015) Can magneto-plasmonic nanohybrids efficiently combine photothermia with magnetic hyperthermia? *Nanoscale* 7:18872–18877. <https://doi.org/10.1039/C5NR06168G>
56. Rio I, Rodrigues A, Rodrigues J, et al (2021) Magnetoliposomes Based on Magnetic/Plasmonic Nanoparticles Loaded with Tricyclic Lactones for Combined Cancer Therapy. *Pharmaceutics* 13:1905. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111905>
57. Veloso SRS, Silva JFG, Hilliou L, et al (2021) Impact of citrate and lipid-functionalized magnetic nanoparticles in dehydropeptide supramolecular magnetogels: Properties, design

- and drug release. *Nanomaterials* 11:1–21. <https://doi.org/10.3390/nano11010016>
58. Gao W, Sun Y, Cai M, et al (2018) Copper sulfide nanoparticles as a photothermal switch for TRPV1 signaling to attenuate atherosclerosis. *Nat Commun* 9:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02657-z>
 59. Epp J (2016) X-Ray Diffraction (XRD) Techniques for Materials Characterization. Elsevier Ltd
 60. Fagaly RL (2006) Superconducting quantum interference device instruments and applications. *Rev Sci Instrum* 77:. <https://doi.org/10.1063/1.2354545>
 61. Kumar RS, Jeong J, Mergu N, et al (2017) Solvent effect on the thermochromism of new betaine dyes. *Dye Pigment* 136:458–466. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.08.034>
 62. Burt MC, Dave BC (2005) An optical temperature sensing system based on encapsulation of a dye molecule in organosilica sol-gels. *Sensors Actuators, B Chem* 107:552–556. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.11.015>
 63. Taavoni-Gilan A (2019) Chemical synthesis of MnFe₂O₄/chitosan nanocomposites for controlled release of ofloxacin drug. *J Chinese Chem Soc* 66:600–607. <https://doi.org/10.1002/jccs.201800402>
 64. Islam K, Haque M, Kumar A, et al (2020) Manganese ferrite nanoparticles (MnFe₂O₄): Size dependence for hyperthermia and negative/positive contrast enhancement in MRI. *Nanomaterials* 10:1–23. <https://doi.org/10.3390/nano10112297>
 65. Mahto TK, Roy A, Sahoo B, Sahu SK (2015) Citric acid fuctionalized magnetic ferrite nanoparticles for photocatalytic degradation of azo dye. *J Nanosci Nanotechnol* 15:273–280. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9223>
 66. Pereira RB, Pinto NFS, Fernandes MJG, et al (2021) Amino Alcohols from Eugenol as Potential Semisynthetic Insecticides: Chemical, Biological, and Computational Insights. *Molecules* 26:6616. <https://doi.org/10.3390/molecules26216616>
 67. Vikesland PJ, Rebodos RL, Bottero JY, et al (2016) Aggregation and sedimentation of magnetite nanoparticle clusters. *Environ Sci Nano* 3:567–577. <https://doi.org/10.1039/c5en00155b>
 68. Ma Y, Xu X, Lu L, et al (2021) Facile synthesis of ultrasml MnFe₂O₄ nanoparticles with high saturation magnetization for magnetic resonance imaging. *Ceram Int* 47:34005–34011. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.08.308>
 69. Wang S, Hou Y (2021) Photothermal therapy based on magnetic nanoparticles in cancer. *J Appl Phys* 130:070902. <https://doi.org/10.1063/5.0057671>
 70. Akhlaghi N, Najafpour-Darzi G (2021) Manganese ferrite (MnFe₂O₄) Nanoparticles: From synthesis to application -A review. *J Ind Eng Chem* 103:292–304. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.07.043>
 71. Doaga A, Cojocariu AM, Amin W, et al (2013) Synthesis and characterizations of manganese ferrites for hyperthermia applications. *Mater Chem Phys* 143:305–310. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2013.08.066>
 72. Pal M, Mathews NR, Sanchez-Mora E, et al (2015) Synthesis of CuS nanoparticles by a wet

- chemical route and their photocatalytic activity. *J Nanoparticle Res* 17:.
<https://doi.org/10.1007/s11051-015-3103-5>
73. Dai X, Zhao Y, Yu Y, et al (2017) Single Continuous Near-Infrared Laser-Triggered Photodynamic and Photothermal Ablation of Antibiotic-Resistant Bacteria Using Effective Targeted Copper Sulfide Nanoclusters. *ACS Appl Mater Interfaces* 9:30470–30479. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b09638>
 74. Liu R, Jing L, Peng D, et al (2015) Manganese (II) chelate functionalized copper sulfide nanoparticles for efficient magnetic resonance/ photoacoustic dual-modal imaging guided photothermal therapy. *Theranostics* 5:1144–1153. <https://doi.org/10.7150/thno.11754>
 75. Zhang L, Li Y, Jin Z, et al (2015) An NIR-triggered and thermally responsive drug delivery platform through DNA/copper sulfide gates. *Nanoscale* 7:12614–12624. <https://doi.org/10.1039/c5nr02767e>
 76. Li B, Jiang Z, Xie D, et al (2018) Cetuximab-modified CuS nanoparticles integrating near-infrared-II-responsive photothermal therapy and anti-vessel treatment. *Int J Nanomedicine* 13:7289–7302. <https://doi.org/10.2147/IJN.S175334>
 77. Swaidan A, Ghayyem S, Barras A, et al (2021) Enhanced Antibacterial Activity of CuS-BSA/Lysozyme under Near Infrared Light Irradiation. *Nanomaterials* 11:2156. <https://doi.org/10.3390/nano11092156>
 78. Arshad M, Wang Z, Nasir JA, et al (2021) Single source precursor synthesized CuS nanoparticles for NIR phototherapy of cancer and photodegradation of organic carcinogen. *J Photochem Photobiol B Biol* 214:112084. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112084>
 79. Dolai J, Mandal K, Jana NR (2021) Nanoparticle Size Effects in Biomedical Applications. *ACS Appl Nano Mater* 4:6471–6496. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c00987>
 80. Heiba ZK, Mohamed MB (2018) Changes in structural, optical and magnetic properties of nano-CuS upon doping with Mn and Fe: a comparative study. *Appl Phys A Mater Sci Process* 124:0. <https://doi.org/10.1007/s00339-018-1864-2>
 81. Zhu X, Huang H, Zhang Y, et al (2017) Cit/CuS@Fe₃O₄-based and enzyme-responsive magnetic nanoparticles for tumor chemotherapy, photothermal, and photodynamic therapy. *J Biomater Appl* 31:1010–1025. <https://doi.org/10.1177/0885328216676159>
 82. Acikgoz S, Ulusu Y, Akin S, et al (2014) Photoinduced electron transfer mechanism between green fluorescent protein molecules and metal oxide nanoparticles. *Ceram Int* 40:2943–2951. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.10.017>
 83. Berberan-Santos MN (2000) External heavy-atom effect on fluorescence kinetics. *PhysChemComm* 3:. <https://doi.org/10.1039/b002307h>
 84. Sawant RR, Torchilin VP (2012) Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *AAPS J* 14:303–315. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9330-0>
 85. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, et al (1995) Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res* 55:3752–6