

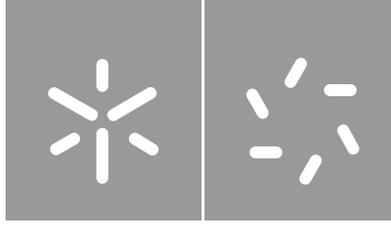


Hugo Macedo Rodrigues

Desenvolvimento de magnetolipossomas contendo nanovaras magnéticas para a terapia dual do cancro

Universidade do Minho
Escola de Ciências





Universidade do Minho

Escola de Ciências

Hugo Macedo Rodrigues

**Desenvolvimento de magnetolipossomas
contendo nanovaras magnéticas para a
terapia dual do cancro**

Dissertação de Mestrado
Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação do(a)

Doutor Paulo José Gomes Coutinho

Doutora Elisabete Maria Santos Castanheira Coutinho

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
CC BY**

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Agradecimentos

Após dois longos anos, aproximo-me do final de uma das etapas mais exigentes da minha vida. Foi um percurso tribulado, repleto de altos e baixos, que testou inúmeras vezes a minha perseverança. É com grande orgulho que inicio a minha dissertação de mestrado. Esta conquista deve-se ao esforço de inúmeras pessoas, às quais eu gostaria de deixar o meu sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, um agradecimento muito grande aos meus orientadores, a Professora Doutora Elisabete Maria dos Santos Castanheira Coutinho e o Professor Doutor Paulo José Gomes Coutinho, pela paciência, atenção e disponibilidade prestadas ao longo da realização deste trabalho. Agradeço por me terem aceitado como seu orientando e por todo o conhecimento que me foi transmitido.

Um especial agradecimento à Doutora Ana Rita Oliveira Rodrigues, que, apesar de não estar associada a este projeto, sempre esteve presente ao longo da sua realização. Não consigo agradecer o suficiente toda a ajuda, paciência, boa disposição e confiança que me prestou.

A todos os investigadores do centro de física da Universidade do Minho, pelo acolhimento, pela partilha de conhecimento e de histórias e por terem proporcionado um bom ambiente de trabalho no laboratório. Agradecer em particular os meus colegas de mestrado Ricardo, Ana Rita, Mélanie, Daniela e Fábio, não só pela ajuda, mas também pela amizade.

Por último, mas não menos importante, um enorme obrigado à minha família. Aos meus pais, irmão e amigos próximos, que nunca desistiram de mim e que sempre me levantaram quando estava em baixo. Aos meus amigos da música e do volei pelo apoio, encorajamento, confiança e motivação que me transmitiram. Apesar de não terem conhecimentos relativos ao presente trabalho, sempre me tentaram ajudar na sua realização e, mesmo não sendo de uma forma direta, foram imprescindíveis para a sua conclusão.

Embora não o diga frequentemente, estou-vos eternamente grato.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo

A entrega específica de agentes terapêuticos para células tumorais e a sua biodisponibilidade no local alvo são dos objetivos mais importantes e desafiantes na terapia do cancro. Existem diversos obstáculos no tratamento eficaz do cancro, como por exemplo, a distribuição inespecífica do fármaco no local alvo e a retenção dos nanossistemas de transporte por parte dos endossomas durante a circulação. Neste trabalho, será abordado o desenvolvimento de nanossistemas magnéticos que respondem a estímulos externos ou internos, permitindo controlar o direcionamento e a libertação de fármacos por hipertermia e ação mecânica através do uso de campos magnéticos alternados, combinando estratégias de direcionamento e acionamento da entrega do fármaco.

Os lipossomas são nanotransportadores promissores e têm sido amplamente investigados para aplicação na terapia do cancro, com algumas formulações já aprovadas para uso clínico. Neste trabalho, foram desenvolvidos magnetolipossomas aquosos compostos por dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) para aplicações na terapia dual do cancro. Para tal, foram sintetizadas nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês ($MnFe_2O_4$) a partir de dois métodos distintos, tendo-se obtido nanopartículas cúbicas e nanovaras, seguidas da sua caracterização por DLS, XRD, TEM, SQUID, espectroscopia de absorção e espectroscopia de fluorescência. Com base na caracterização estrutural, morfológica e magnética das nanopartículas, as ferrites com forma de nanovaras foram utilizadas como conteúdo magnético dos magnetolipossomas.

Devido à sua notável atividade antitumoral, a curcumina foi utilizada como fármaco modelo, sendo incorporada nos magnetolipossomas aquosos com elevada eficiência de encapsulamento. De forma a avaliar a interação não específica entre estes nanossistemas e vesículas unilamelares gigantes (GUVs), foram realizados estudos fotofísicos. Através da técnica de transferência de energia de ressonância (FRET), provou-se a capacidade de fusão dos magnetolipossomas com modelos de membranas celulares.

Com base nos resultados obtidos, pode inferir-se que os magnetolipossomas contendo nanovaras são promissores para aplicação futura em terapia dual do cancro (hipertermia magnética e quimioterapia).

Palavras-chave: Hipertermia magnética; magnetolipossomas; nanopartículas magnéticas; nanovaras.

Abstract

The specific delivery of therapeutic agents to tumor cells and their bioavailability in the target site are among the most important and challenging goals in cancer therapy. The effective cancer treatment encounters several obstacles, such as the non-specific drug distribution at the target site and retention of the nanocarriers by endosomes during circulation. This work addresses the development of magnetic nanosystems that respond to external or internal stimuli, allowing for the control of drug targeting and release through hyperthermia and mechanical action using alternating magnetic fields, combining targeting and triggering strategies.

Liposomes are promising nanocarriers and have been extensively investigated for application in cancer therapy, with some formulations already approved for clinical use. In this work, aqueous magnetoliposomes composed of dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) were developed for dual cancer therapy applications. For this purpose, magnetic nanoparticles of manganese ferrite (MnFe_2O_4) were synthesized using two distinct methods, resulting in cubic and nanorod-shaped nanoparticles, followed by their characterization through DLS, XRD, TEM, SQUID, absorption spectroscopy, and fluorescence spectroscopy. Based on the structural, morphological, and magnetic characterization of the nanoparticles, nanorod-shaped ferrites were used as the magnetic content of magnetoliposomes.

Due to its notable antitumoral activity, curcumin was employed as a model drug, being incorporated into aqueous magnetoliposomes with high encapsulation efficiency. Photophysical studies were conducted to assess the nonspecific interaction between these nanosystems and giant unilamellar vesicles (GUVs). Through the resonance energy transfer technique (FRET), the fusion capacity of magnetoliposomes with cellular membrane models was demonstrated.

Based on the obtained results, it can be inferred that magnetoliposomes containing nanorods hold promise for future applications in dual cancer therapy (magnetic hyperthermia and chemotherapy).

Keywords: Magnetic hyperthermia; magnetic nanoparticles; magnetoliposomes; nanorods.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Lista de abreviaturas e siglas	ix
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiii
1. Introdução	1
1.1. Terapia do cancro	1
1.2. Entrega controlada de fármacos	1
1.3. Lipossomas	3
1.4. Nanopartículas magnéticas	4
1.5. Magnetolipossomas	5
1.6. Hipertermia	7
1.7. Contextualização e objetivos	7
2. Procedimento experimental	8
2.1. Síntese de nanopartículas de MnFe₂O₄	8
2.2. Preparação de magnetolipossomas aquosos (AMLs)	10
2.3. Síntese de vesículas unilamelares gigantes (GUVs)	11
2.3.1. Ensaios de encapsulamento e libertação de fármacos	12
3. Técnicas de caracterização	13
4. Resultados e discussão	14
4.1. Caracterização das nanovaras de ferrite de manganês (MnFe₂O₄)	14
4.1.1. Difração de raios-X	14
4.1.2. Espectroscopia de Absorção	16
4.1.3. Medidas de Difusão Dinâmica de Luz - Potencial Zeta, Tamanho e Estabilidade	17
4.1.4. Microscopia eletrónica de transmissão	20
4.1.5. SQUID	22
4.1.6. Hipertermia magnética	24
4.2. Caracterização dos magnetolipossomas	25
4.2.1. Magnetolipossomas contendo sonda fluorescente Rodamina	25
4.2.1.1. Espectroscopia de fluorescência	25
4.2.1.2. Medidas de Difusão Dinâmica de Luz - Potencial Zeta, Tamanho e Estabilidade	26

4.2.2. Magnetolipossomas contendo o fármaco modelo curcumina	28
4.2.2.1. Eficiência de encapsulamento da curcumina	28
4.2.2.2. Medidas de Difusão Dinâmica de Luz - Potencial Zeta, Tamanho e Estabilidade	29
4.2.3. Ensaio de liberação do fármaco	30
4.3. Modelos de biomembranas (GUVs)	33
4.3.1. Medidas de Difusão Dinâmica de Luz - Potencial Zeta, Tamanho e Estabilidade	33
4.4. Estudo de fusão dos magnetolipossomas com modelos de membrana	34
4.4.1. Espectroscopia de fluorescência	34
4.4.2. Medidas de Difusão Dinâmica de Luz - Potencial Zeta, Tamanho e Estabilidade	35
5. Conclusão e perspectivas futuras	37
6. Referências bibliográficas	39

Lista de abreviaturas e siglas

AMF – campo magnético alternado (do inglês, *alternating magnetic field*)

AMLs – magnetolipossomas aquosos (do inglês, *aqueous magnetoliposomes*)

DLS – dispersão dinâmica de luz (do inglês, *dynamic light scattering*)

DMPG – dimiristoilfosfatidilglicerol

DNA – ácido desoxirribonucleico

EE (%) – eficiência de encapsulamento

Egg-PC – fosfatidilcolina do ovo ou lecitina do ovo

EPR – efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (do inglês, *enhanced permeability and retention effect*)

FRET – transferência de energia de ressonância (do inglês, *Förster resonance energy transfer*)

GUVs – vesículas unilamelares gigantes (do inglês, *giant unilamellar vesicles*)

H – coercividade

ILP – perda de potência intrínseca (do inglês, *intrinsic loss power*)

LUVs – vesículas unilamelares grandes (do inglês, *large unilamellar vesicles*)

M – grau de magnetização

MLs – magnetolipossomas

MLVs – vesículas multilamelares (do inglês, *multilamellar vesicles*)

MRI – imagem de ressonância magnética (do inglês, *magnetic resonance imaging*)

MVVs – vesículas multivesiculares (do inglês, *multivesicular vesicles*)

M_r – magnetização remanescente

M_s – magnetização de saturação

NPs – nanopartículas

PEG – polietilenoglicol

PEI – polietilenamina

Rh-DOPE – lípido marcado com rodamina-dioleoilfosfatidiletanolamina

SAR – Taxa de absorção específica (do inglês, *Specific Absorption Rate*)

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*)

UV-VIS – ultravioleta-visível

XRD – difração raios-X (do inglês, *X-ray diffraction*)

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática da comparação entre a quimioterapia convencional e da quimioterapia controlada magneticamente. Adaptado de ²³	2
Figura 2. Representação esquemática da bicamada lipídica e de um lipossoma.	3
Figura 3. Estrutura química do lípido DMPG. Adaptado do website (https://www.avantilipids.com).	3
Figura 4. Representação esquemática das principais estruturas de magnetolipossomas. Magnetolipossomas sólidos (SMLs) (A) , magnetolipossomas aquosos (AMLs) (B) , magnetolipossomas com nanopartículas inseridas na membrana (C) e magnetolipossomas com nanopartículas conjugadas na superfície (D) . Adaptado de ²³	6
Figura 5. Esquematização do procedimento experimental da síntese das nanopartículas de $MnFe_2O_4$ revestidas por oleilamina. Adaptado de ³²	9
Figura 6. Difratoograma de raios-X das nanopartículas A-OLA e correspondente análise de Rietveld com os índices de Miller.....	15
Figura 7. Difratoograma de raios-X das nanopartículas B e correspondente análise de Rietveld com os índices de Miller.....	15
Figura 8. Espectro de absorção UV-VIS, na gama de 240 nm a 900 nm, das nanopartículas A-OLA (a vermelho), A-TSC (a azul)) e B (a verde).	17
Figura 9. Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma das nanopartículas A-OLA (A) , A-TSC (B) e B (C)	18
Figura 10. Transmitância das nanopartículas A-OLA (A) , A-TSC (B) e B (C) em função do tempo.	20
Figura 11. Imagens TEM e histogramas de tamanho (nm) ajustados segundo uma distribuição gaussiana, das nanopartículas A-OLA (A-C) , em diferentes ampliações.....	21
Figura 12. Imagens TEM e histogramas de tamanho (nm) ajustados segundo uma distribuição gaussiana, das nanopartículas B (A-C) , em diferentes ampliações.....	22
Figura 13. Ciclo de histerese de magnetização das nanopartículas A-OLA (A) e B (B) . Inserido no quadrante, uma ampliação da região de baixo campo.....	23
Figura 14. Perfis do ciclo de aquecimento e arrefecimento (A) e da curva de aquecimento (B) de soluções aquosas de nanopartículas A-OLA após exposição a um campo magnético alternado.....	25
Figura 15. Espectros de emissão de fluorescência dos magnetolipossomas (marcados com rodamina B) contendo nanopartículas A-OLA (a vermelho), magnetolipossomas contendo nanopartículas A-TSC (a azul) e lipossomas simples (a verde).	26
Figura 16. Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma dos magnetolipossomas contendo nanopartículas A-OLA (A) e A-TSC (B) marcadas pela sonda fluorescente rodamina B.	27

Figura 17. Transmitância dos magnetolipossomas contendo nanopartículas A-OLA (A) e A-TSC (B) marcadas pela sonda fluorescente rodamina B em função do tempo.	28
Figura 18. Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma dos magnetolipossomas contendo nanovaras A-OLA carregados com curcumina.....	29
Figura 19. Perfil de libertação cumulativa da curcumina (%) ao longo do tempo (h) encapsulada em AMLs.	30
Figura 20. Perfil de libertação cumulativa da curcumina (%) ao longo do tempo (h) encapsulada em AMLs, ajustado ao modelo de Weibull.....	32
Figura 21. Perfil de libertação cumulativa da curcumina (%) ao longo do tempo (h) encapsulada em AMLs, ajustado à cinética de primeira ordem.	32
Figura 22. Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma dos GUVs.	33
Figura 23. Espectros de emissão de fluorescência dos magnetolipossomas (marcados com rodamina B) contendo nanopartículas A-OLA (a verde), dos GUVs (a vermelho) e da sua interação (a azul).	34
Figura 24. Espectros de emissão de fluorescência dos magnetolipossomas (marcados com rodamina B) contendo nanopartículas A-TSC (a verde), dos GUVs (a vermelho) e da sua interação (a azul).	34
Figura 25. Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma da fusão dos GUVs com magnetolipossomas contendo nanopartículas A-OLA (A) e A-TSC (B)	36

Lista de tabelas

Tabela 1. Tamanhos, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas A-OLA, A-TSC e B.	17
Tabela 2. Valores de coercividade (H), magnetização de saturação (M_s) e remanescente (M_r) e da razão entre as magnetizações de saturação e remanescente (M_r/M_s) das nanopartículas A-OLA e B.	24
Tabela 3. Tamanhos, índice de polidispersividade e potencial zeta dos magnetolipossomas contendo nanopartículas A-OLA e A-TSC marcadas pela sonda fluorescente rodamina B.	27
Tabela 4. Tamanhos, índice de polidispersividade e potencial zeta dos magnetolipossomas contendo nanoparvas A-OLA carregados com curcumina.	29
Tabela 5. Parâmetros obtidos através dos ajustes dos modelos matemáticos aplicados à cinética de liberação da curcumina encapsulada em AMLs (Weibull e primeira ordem) e respectivos coeficientes de determinação (R^2).....	31
Tabela 6. Tamanhos, índice de polidispersividade e potencial zeta dos GUVs.....	33
Tabela 7. Tamanhos, índice de polidispersividade e potencial zeta dos AMLs resultantes da fusão dos GUVs com magnetolipossomas contendo nanopartículas A-OLA e A-TSC.....	35

1. Introdução

1.1. Terapia do cancro

O cancro é uma das doenças mais recorrentes no quotidiano que causa a morte de inúmeras pessoas todos os anos. As terapias atuais do cancro baseiam-se em técnicas de radioterapia, quimioterapia e cirurgia, sendo a quimioterapia a estratégia mais comumente utilizada devido à sua conveniência e simplicidade.

Contudo, o tratamento por quimioterapia tradicional ainda apresenta algumas limitações no tratamento do cancro, nomeadamente a distribuição inespecífica de fármacos no corpo. A entrega não direcionada de fármacos resulta em concentrações inadequadas de agentes terapêuticos que chegam às células cancerígenas, tornando-os pouco eficazes na eliminação de células tumorais multirresistentes (MDR) e na inibição do crescimento tumoral e da sua recorrência. A elevada diversidade de processos de carcinogénese e os diversos subtipos de células cancerígenas que constituem estes tumores, acoplados com a limitada capacidade de monitorização das respostas terapêuticas originam também um grande obstáculo para a terapia do cancro. Estes problemas representam uma barreira farmacocinética que pode ser superada através da nanotecnologia^{1,2}.

De modo a ultrapassar estas limitações, é necessário aumentar o direcionamento e a eficiência de entrega dos agentes terapêuticos. A nanotecnologia oferece soluções para inúmeros problemas presentes nas técnicas atuais de terapia do cancro, através da construção de sistemas à nanoescala. O desenvolvimento de nanossistemas incide nas áreas da engenharia, física, química e medicina e tem como objetivo conseguir nanotransportadores capazes de demonstrar direcionamento passivo ou ativo e permeação em células cancerígenas². Estes nanossistemas devem apresentar ainda uma elevada razão superfície/volume, e devem ser capazes de transportar fármacos para diversos locais no corpo humano¹.

1.2. Entrega controlada de fármacos

Os tumores são caracterizados por células endoteliais defeituosas, hipervascularização e drenagem linfática desregulada. Isto resulta numa maior permeabilidade e retenção das nanopartículas em células tumorais, também denominado de efeito EPR (do inglês *enhanced permeability and retention*) que, por sua vez, resulta na concentração destas mesmas no local do

tumor^{3,4}. Para além do efeito EPR, os sistemas de entrega de fármacos têm de apresentar um longo tempo de circulação, tamanho reduzido (inferior a 200 nm) e propriedades físico-químicas adequadas como a forma, carga de superfície, composição e hidrofobicidade^{5,6}.

De modo a ultrapassar os problemas manifestados pela quimioterapia tradicional, estão a ser desenvolvidos nanotransportadores capazes de responder a estímulos externos (como ultrassons, campos magnéticos induzidos e luz) ou estímulos internos (como pH e temperatura) (figura 1). Graças a isto, é possível direcionar e controlar a libertação dos fármacos, uma vez que a libertação do conteúdo terapêutico ocorre apenas em resposta a um estímulo⁷⁻⁹.

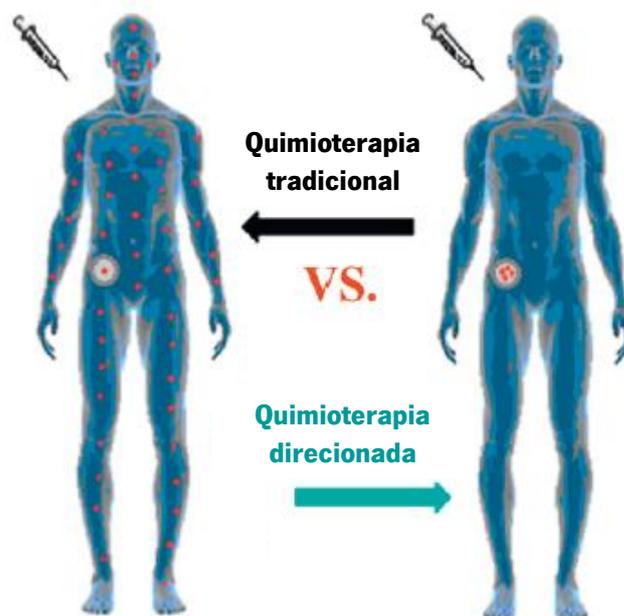


Figura 1. Representação esquemática da comparação entre a quimioterapia convencional e da quimioterapia controlada magneticamente. Adaptado de²³.

Existem atualmente vários tipos de nanotransportadores a serem desenvolvidos, entre os quais se destacam os lipossomas, nanopartículas inorgânicas, nanopartículas poliméricas, micelas, dendrímeros, nanoconjugados de fármaco-polímero e nanossistemas híbridos ou compósitos. Os lipossomas destacam-se positivamente pela sua capacidade de reter e transportar fármacos e pela sua capacidade de fundir com a membrana celular de células cancerígenas e, desta forma, facilitar a libertação dos agentes terapêuticos^{1,2}.

1.3. Lipossomas

Os lipossomas são estruturas coloidais fechadas e aproximadamente esféricas frequentemente utilizadas para a entrega controlada de fármacos no tratamento do cancro. Estas estruturas são compostas por fosfolípidos, podendo ainda conter colesterol, esfingolípidos, gliceróis, etc. Em meio aquoso, estas moléculas auto-organizam-se em bicamadas, formando vesículas que podem ser utilizadas para o transporte de agentes terapêuticos (figura 2).

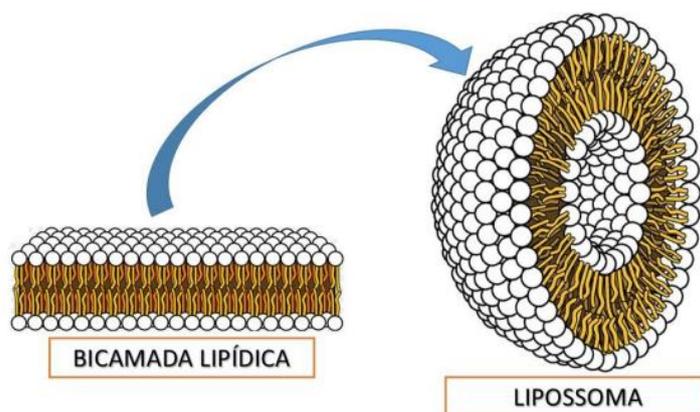


Figura 2. Representação esquemática da bicamada lipídica e de um lipossoma.

Estes nanossistemas têm despertado um elevado interesse na investigação do tratamento do cancro e de inúmeras doenças como, por exemplo, doenças cardiovasculares¹⁰⁻¹², doenças da pele¹³, doenças autoimunes¹⁴ e infeções¹³, uma vez que demonstram a capacidade de melhorar a farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos associados².

Neste trabalho, foram preparados lipossomas compostos por DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol), uma vez que apresentam uma elevada fluidez de membrana, o que facilita na integração de nanopartículas e na fusão com membranas biológicas (figura 3).

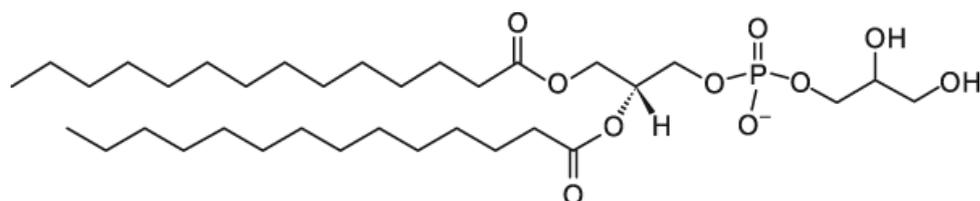


Figura 3. Estrutura química do lipido DMPG. Adaptado do website (<https://www.avantilipids.com>).

Este fosfolípido é um constituinte importante das membranas biológicas e apresenta um grupo fosfato carregado negativamente, sendo assim uma molécula aniônica carregada. O DMPG apresenta uma temperatura de transição de fase de 23 °C, sendo esta característica relevante para o estudo atual, uma vez que resulta na formação de lipossomas com membrana lipídica muito fluida, facilitando nos processos de integração de nanopartículas, fármacos e de fusão membranar com células cancerígenas¹⁵.

Os lipossomas exibem diversas vantagens enquanto nanotransportadores de fármacos e genes, uma vez que apresentam elevada biocompatibilidade, capacidade de reter substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas, alta biodisponibilidade e elevada estabilidade¹⁶⁻¹⁹. Através da funcionalização da superfície dos lipossomas, é possível adotar estratégias de direcionamento e de resistência à opsonização (lipossomas furtivos), para uma localização mais eficaz e uma circulação mais prolongada. Por exemplo, lipossomas funcionalizados com derivados lipídicos de polietilenoglicol (PEG), como carboidratos ou polímeros hidrofóbicos, evitam o reconhecimento e eliminação por parte do sistema imunitário².

1.4. Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas têm revelado um grande potencial em aplicações biomédicas, devido às suas propriedades de superparamagnetismo e à sua elevada biocompatibilidade. Estas apresentam potencial para diagnóstico e terapia: por um lado, podem ser usadas como agentes de contraste para diagnósticos por MRI (do inglês, *Magnetic Resonance Imaging*); por outro lado, podem ser integradas em nanotransportadores, funcionando como mecanismos de direcionamento e libertação de compostos terapêuticos e são capazes de exibir hipertermia.

Partículas ferromagnéticas, com dimensões inferiores a um determinado tamanho crítico, apresentam comportamento superparamagnético. Este comportamento deve-se a configurações magnéticas de domínio único e resulta em elevadas magnetizações. Contudo, estas altas magnetizações ocorrem apenas na presença de campos magnéticos e, na ausência destes, a magnetização é perdida (não sendo observável magnetização remanescente). Isto é de especial interesse no estudo em sistemas biológicos, uma vez que, na ausência de estímulos magnéticos externos, não há formação de agregados²⁰.

Neste trabalho foram preparadas nanovaras de ferrite de manganês (MnFe_2O_4), uma vez que apresentam elevada magnetização e biocompatibilidade. As nanovaras são nanopartículas alongadas que possuem até 100 nm de comprimento e diâmetros extremamente reduzidos, que têm despertado interesse nas áreas industrial e biomédica. Isto deve-se à sua via de síntese conveniente e económica, que não necessita de processos complexos ou temperaturas muito altas, e permite o controlo da sua morfologia e composição. As nanovaras de óxido de ferro apresentam especial interesse neste estudo, devido à sua forma alongada, ao seu comportamento superparamagnético para diâmetros inferiores ao diâmetro crítico e à capacidade de gerar calor (hipertermia) quando sujeitas a campos magnéticos alternados. Na presença de campos magnéticos de baixa frequência, as nanovaras são ainda capazes de vibrar, resultando numa elevada ação mecânica²¹. Esta ação mecânica e o aquecimento resultantes da vibração das nanopartículas, juntamente com a sua forma anisotrópica, podem promover a disrupção da membrana lipídica do nanossistema e facilitar na libertação do seu conteúdo intersticial.

1.5. Magnetolipossomas

Em 1988, De Cuyper e Joniau introduziram o conceito de “magnetolipossoma” para designar a combinação de nanopartículas magnéticas e lipossomas²². Desde então, os magnetolipossomas têm sido usados em técnicas de imagiologia de MRI, entrega controlada de fármacos e libertação controlada de fármacos mediada por hipertermia²³⁻²⁵.

No que toca à encapsulação de nanopartículas nos lipossomas, estas podem encontrar-se num meio aquoso (magnetolipossomas aquosos) ou formar um *cluster* de nanopartículas magnéticas cobertas por uma bicamada lipídica (magnetolipossomas sólidos) (figura 4).

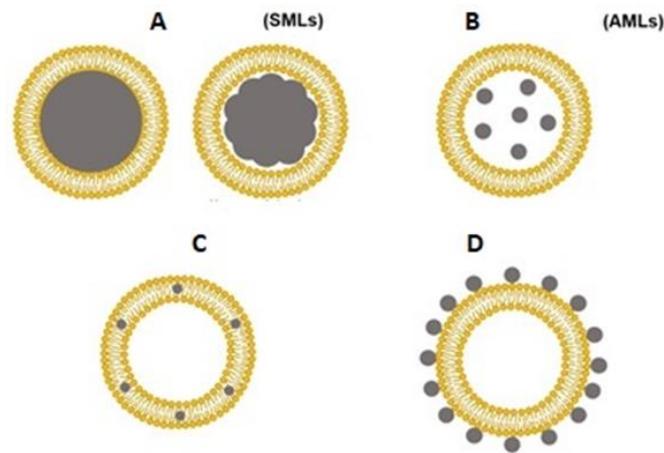


Figura 4. Representação esquemática das principais estruturas de magnetolipossomas. Magnetolipossomas sólidos (SMLs) (A), magnetolipossomas aquosos (AMLs) (B), magnetolipossomas com nanopartículas inseridas na membrana (C) e magnetolipossomas com nanopartículas conjugadas na superfície (D). Adaptado de²³.

A estrutura de cada magnetolipossoma deve ser escolhida de acordo com a sua aplicação e o fármaco a transportar. A localização das nanopartículas no sistema pode também influenciar a eficácia de entrega da carga transportada. Tendo isto em conta, os magnetolipossomas aquosos apresentam vantagens no transporte de fármacos, uma vez que conseguem reter fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, enquanto que os magnetolipossomas sólidos apenas conseguem transportar fármacos hidrofóbicos. Por outro lado, os magnetolipossomas sólidos apresentam melhores propriedades magnéticas do que os aquosos, devido à sua capacidade de manter as propriedades magnéticas semelhantes às das partículas magnéticas isoladas²⁶.

Os magnetolipossomas são dos sistemas de transporte de fármacos mais promissores, uma vez que, aplicando gradientes de campo magnético externos num determinado local, é possível direcionar estes nanossistemas ao local do tumor. Uma das principais aplicações dos magnetolipossomas é a libertação induzida por calor de agentes terapêuticos, provocada pelo aquecimento local por ação de um campo magnético alternado de alta frequência aplicado numa região específica do corpo humano.

No presente trabalho foram propostos dois mecanismos para a libertação da carga terapêutica contida nos lipossomas: a disrupção da bicamada através da ação mecânica das nanovaras, provocada por campos magnéticos alternados de baixa frequência; e a degradação dos lípidos pertencentes à bicamada, sujeitando-os a temperaturas superiores à temperatura crítica de transição de fase²⁷.

A hipertermia induzida pelas nanopartículas magnéticas sob um campo magnético alternado provoca a transição de fase da bicamada lipídica que resulta na indução da libertação controlada de fármacos encapsulados nos magnetolipossomas. Ajustando a composição dos lipossomas constituintes da bicamada, é possível regular a temperatura de transição de fase da membrana para temperaturas próximas das usadas em hipertermia magnética²⁴.

1.6. Hipertermia

A hipertermia resulta da perda de energia na desmagnetização das nanopartículas magnéticas quando estas são sujeitas a campos magnéticos alternados. A combinação do tratamento por hipertermia magnética com a quimioterapia é uma estratégia que tem demonstrado resultados promissores para a terapia do cancro²⁸. Recorrendo ao tratamento por hipertermia em conjunto com lipossomas termosensíveis a baixas temperaturas, é possível melhorar a eficácia do tratamento do cancro de diversas formas, nomeadamente através de:

- Aumento da acumulação de lipossomas nos locais do tumor, aumentando a permeabilidade vascular e a corrente sanguínea local;
- Desencadeamento da libertação do conteúdo intersticial do lipossoma no local do tumor;
- Aumento da permeabilidade membranar das células cancerígenas face aos agentes terapêuticos;
- Efeito citotóxico que este tratamento tem diretamente nas células tumorais.

A hipertermia pode ainda dificultar o processo de reparação de danos no DNA causado pelos agentes terapêuticos nas células cancerígenas, aumentando assim os efeitos quimioterapêuticos destes mesmos^{1,27,29}.

1.7. Contextualização e objetivos

Este trabalho enquadra-se na área de investigação de Bionanossistemas Magnéticos da Linha Estratégica “Física de Materiais Quânticos e Bionanoestruturas” do Centro de Física das Universidades do Minho e do Porto (CF-UM-UP) (pólo da UMinho). Dentro deste tema, têm sido

desenvolvidos vários trabalhos focando o desenvolvimento de magnetolipossomas, publicados em diversos artigos^{30,31}.

O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de magnetolipossomas contendo nanovaras magnéticas de ferrite de manganês, para aplicação na terapia dual do cancro (hipertermia magnética em combinação com quimioterapia), melhorando os sistemas anteriormente desenvolvidos pelo uso de nanopartículas magnéticas com anisotropia de forma. Foram estudadas a capacidade de encapsulamento e de libertação de um fármaco modelo (curcumina), assim como a capacidade de resposta das nanopartículas a estímulos magnéticos.

2. Procedimento experimental

2.1. Síntese de nanopartículas de $MnFe_2O_4$

Neste trabalho, foram sintetizadas nanovaras de ferrite de manganês ($MnFe_2O_4$), uma vez que apresentam boa resposta a estímulos magnéticos. As nanopartículas foram sintetizadas através de dois métodos previamente descritos: método de hidrólise modificado³² (método A) e método de coprecipitação³³ (método B). Estes métodos foram escolhidos pela sua simplicidade, baixo custo e reprodutibilidade em grande escala.

As partículas magnéticas produzidas foram caracterizadas através da técnica de espectroscopia de absorção UV-VIS (ultravioleta-visível), difração de raios-X, difusão dinâmica de luz, microscopia eletrónica de transmissão, SQUID e foi avaliado o seu potencial para serem utilizadas em hipertermia magnética.

2.1.1. Método A

Inicialmente foi preparado um precursor de ferro dopado com manganês ($Mn-\beta-FeOOH$). Para tal, preparou-se uma solução contendo 515 mg de polietilenamina (PEI, de massa molar 43,069 g/mol) em 10 ml de água ultrapura num balão de fundo redondo. Em seguida, foram adicionadas 540 mg de cloreto de ferro (III) hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$, de massa molar 270,30 g/mol) e 125,8 mg de cloreto de manganês (II) tetrahidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$, de massa molar 197,90 g/mol) a esta solução. A solução resultante foi posteriormente aquecida a 80°C durante duas horas, em banho de óleo e sob agitação magnética. Após arrefecimento até à temperatura

ambiente, a solução foi centrifugada a 7000 rotações por minuto e o precipitado foi recolhido e lavado com uma mistura de água ultrapura e etanol (1:1). Por fim, o precursor foi colocado a secar na estufa a 80°C.

Para a síntese de nanovaras foi usado o composto orgânico oleilamina (OLA), enquanto agente redutor e surfactante. Foram então misturadas 50 mg de Mn-β-FeOOH e 800 mg de OLA num gobelé de 10 ml sob agitação magnética e corrente de azoto. A solução foi então aquecida a 100°C, durante 30 minutos. Em seguida, realizou-se uma rampa de aquecimento com uma taxa de aquecimento de 5°C/minuto, até atingir a temperatura de 200°C. Esta temperatura foi mantida durante 4 horas. A solução foi posteriormente arrefecida à temperatura ambiente e as nanopartículas resultantes foram lavadas através do método de separação magnética. Este método foi repetido 5 vezes, adicionando 2 ml de hexano para dispersar as partículas e adicionando etanol enquanto agente de floculação. Por fim, as nanopartículas foram divididas em duas partes iguais, sendo uma parte armazenada para posterior caracterização e outra recolhida para fazer a substituição de ligando.

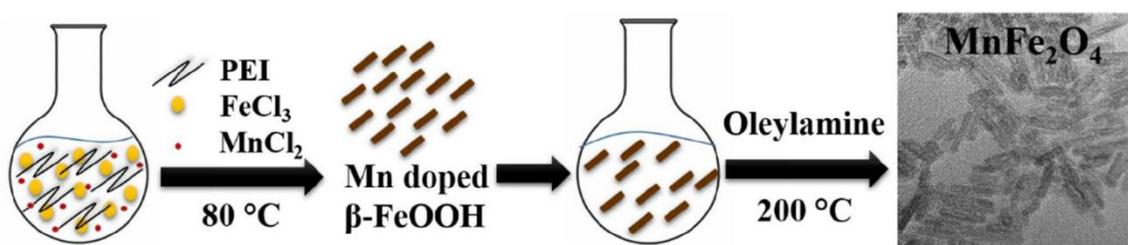


Figura 5. Esquematização do procedimento experimental da síntese das nanopartículas de MnFe₂O₄ revestidas por oleilamina. Adaptado de³².

De modo a tornar as nanovaras de MnFe₂O₄ hidrofílicas, foi usado citrato de tri-sódio (TSC) para substituir a OLA à superfície das nanopartículas. Começou-se por precipitar as nanovaras previamente dispersas em hexano, através da adição de etanol em excesso. Em simultâneo, foi preparada uma solução aquosa 10 ml contendo 240 mg de TSC. Em seguida, foram adicionadas 10 mg de nanovaras a esta solução, tendo sido mantida a 70°C, em atmosfera de azoto e sob agitação magnética, durante 2h. As nanovaras com a superfície modificada foram posteriormente isoladas e lavadas com uma mistura de água e etanol por centrifugação³².

2.1.2. Método B

Esta técnica consistiu no método de co-precipitação dos precursores de ferro e manganês, em atmosfera controlada. Primeiro, dissolveu-se 541 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2 mmol) e 80,9 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,5 mmol) em 100 ml de água desionizada, sob agitação magnética e corrente de azoto. Em seguida, foram lentamente adicionados 10 ml de solução de hidróxido de amônio (NH_4OH , 25%), sob agitação constante até obter uma suspensão de pH = 12-13. A solução resultante, de cor acastanhada, foi aquecida a 85 °C sob condições de refluxo e agitação magnética, durante 4 horas. Por fim, as nanovaras de MnFe_2O_4 foram isoladas por separação magnética e lavadas 5 vezes com água desionizada³³.

2.2. Preparação de magnetolipossomas aquosos (AMLs)

Neste trabalho foram sintetizados magnetolipossomas aquosos (AMLs). Foram realizados ensaios para comprovar a formação dos magnetolipossomas e estudar a sua interação com modelos de membranas, através da técnica de transferência de energia de ressonância (FRET, do inglês *Förster resonance energy transfer*) e inibição de fluorescência (*quenching*).

A síntese dos AMLs foi baseada no método de injeção etanólica, previamente descrito³⁴, e foram utilizadas as nanopartículas cobertas por OLA e nanopartículas cobertas por citrato (TSC). Começou-se por preparar uma solução mãe de nanopartículas com OLA ($2,89 \times 10^{-3}$ M) dispersando 1 mg de nanovaras de MnFe_2O_4 em 1,5 ml do respetivo solvente: clorofórmio (CHCl_3 , de massa molar 119,38 g/mol) no caso das nanopartículas de OLA e água no caso das nanopartículas de citrato. Foram também utilizadas soluções mãe de lípido DMPG (20 mM) e de lípido marcado com a sonda rodamina B (Rh-DOPE, 2×10^{-5} M). Em seguida, foram misturados 345,93 μl da solução de nanopartículas, 150 μl da solução de lípido DMPG e 150 μl da solução de Rh-DOPE. Após isto, procedeu-se à evaporação do solvente, por corrente de azoto, seguida da ressuspensão do filme obtido em 150 μl de etanol. Finalmente, injetou-se esta solução, gota a gota e sob vortéx, em 3 ml de água ultrapura previamente aquecida a 35 °C. De modo a homogeneizar a população de AMLs, a solução foi posteriormente sujeita a ciclos de ultrassons e vortéx alternados (em intervalos de 2 minutos), durante 30 minutos, a 45 °C.

Para confirmar a formação dos AMLs, foram preparados lipossomas baseados nos diferentes tipos de NPs obtidas contendo a sonda lipídica Rh-DOPE: AMLs contendo NPs revestidas

com OLA (A-OLA), AMLs com NPs revestidas com citrato (A-TSC). Para comparação foram preparados lipossomas sem NPs. A emissão da rodamina B nos três tipos de magnetolipossomas foi avaliada através da medição do espectro de fluorescência, com excitação a 545 nm e medindo a sua emissão na gama de comprimentos de onda de 555 nm a 700 nm.

2.3. Síntese de vesículas unilamelares gigantes (GUVs)

Para estudar a capacidade de fusão dos magnetolipossomas com membranas biológicas, procedeu-se à preparação de GUVs, os quais foram usados como modelos de membrana. A síntese dos GUVs foi baseada no método de hidratação do filme lipídico, previamente descrito^{35,36}. Neste método foram usadas soluções mãe de Egg-PC (20 mM) em clorofórmio, colesterol (20 mM) em clorofórmio e solução mãe de lípido marcado com NBD, NBD-C₁₂-HPC ($2,3 \times 10^{-4}$ M). Primeiro, misturou-se 175 µl de solução de Egg-PC, 75 µl de solução de colesterol e 21,7 µl de solução de NBD-C₁₂-HPC. Em seguida, procedeu-se à evaporação do solvente, sob corrente de azoto, até se obter um filme. Posteriormente, acrescentou-se 40 µl de água ultrapura para pré-hidratação a 45 °C durante 15 minutos. No final deste período, foram adicionados 5 ml de glucose (0,1 M) e a solução foi novamente incubada, a 37 °C durante 2 horas. Por fim, realizou-se centrifugação a 12000 rpm durante 30 minutos, para separar os agregados, e recolheu-se o sobrenadante.

Para testar a capacidade de fusão dos AMLs com membranas biológicas foram realizados ensaios de transferência de energia (FRET). A técnica de FRET é um processo físico de transferência de energia não radiativa, que permite estudar interações moleculares entre dois fluoróforos. A sonda lipídica NBD-C₁₂-HPC, que foi introduzida nos GUVs, foi utilizada enquanto doador de energia. Por outro lado, a rodamina B foi usada enquanto aceitador de energia, tendo o lípido Rh-DOPE sido incluído nos AMLs. Para que o processo de FRET ocorra, tem de existir sobreposição espectral entre o espectro de emissão do doador e o espectro de absorção do aceitador e é necessário que a distância entre o doador e o aceitador esteja de entre 10-100 Å³⁷. Para o ensaio de fusão foram preparadas três amostras:

A – 1,5 ml de AMLs + 1,5 ml de água ultrapura

B - 1,5 ml de AMLs + 1,5 ml de GUVs

C - 1,5 ml de GUVs + 1,5 ml de água ultrapura

Foi então medida a emissão das três amostras, utilizando o comprimento de excitação de 450 nm e traçando o espectro de fluorescência na gama de 475 nm a 650 nm.

2.3.1. Ensaios de encapsulamento e liberação de fármacos

Foram realizados ensaios de encapsulamento e liberação do fármaco modelo curcumina. Para isso, foram preparados AMLs, a partir do método previamente descrito, contendo curcumina na concentração de 1×10^{-6} M. De modo a separar os AMLs carregados com curcumina da curcumina não encapsulada, foram usados tubos de *falcon* equipados com filtros Amicon® de 100 kDa. Assim, foram transferidos 3 ml da solução de AMLs para os tubos de *falcon* e procedeu-se à centrifugação da mesma a 3000 rpm, durante 10 minutos. A centrifugação resultou na retenção dos AMLs carregados com curcumina nos filtros e na passagem da curcumina livre para os tubos de *falcon*. Em seguida, colocou-se o conteúdo dos tubos de *falcon* (curcumina não encapsulada) na estufa e, posteriormente, ressuspendeu-se o filme contendo curcumina em água. Por outro lado, os AMLs contendo curcumina foram ressuspensos em 3 ml de água e caracterizados por DLS e fluorescência. Foram ainda determinados os perfis de liberação do fármaco modelo por fluorescência, usando amostras que iam sendo retiradas ao longo de 48 h, mantendo as soluções a temperatura constante sob agitação, e perfazendo o volume que ia sendo retirado.

A quantificação do composto não encapsulado foi feita através de uma reta de calibração previamente obtida (intensidade de fluorescência da curcumina *vs* concentração). Para esta reta, foram preparadas soluções de curcumina de concentração conhecida: 1×10^{-6} M, 5×10^{-7} M, $2,5 \times 10^{-7}$ M, $1,25 \times 10^{-7}$ M, $6,25 \times 10^{-8}$ M e $3,12 \times 10^{-8}$ M, determinando-se a intensidade de fluorescência máxima para cada solução. A eficiência de encapsulamento (EE%) foi obtida a partir da **equação 1**.

$$EE(\%) = \frac{[\text{Fármaco}]_{\text{total}} - [\text{Fármaco}]_{\text{não encapsulado}}}{[\text{Fármaco}]_{\text{total}}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

3. Técnicas de caracterização

As nanovaras de MnFe_2O_4 foram sujeitas as diversas técnicas de caracterização, nomeadamente: Espectroscopia de absorção UV-Visível, Espectroscopia de Fluorescência, SQUID (do inglês *Superconducting Quantum Interference Device*), TEM (do inglês *Transmission Electron Microscopy*), XRD (do inglês X-Ray Diffraction) e DLS (do inglês *Dynamic Light Scattering*).

A técnica de espectroscopia de absorção permite estudar a interação da luz com a matéria e, desta forma, medir propriedades óticas de materiais, como absorção e transmitância. Esta técnica foi usada para avaliar a absorção das nanopartículas. Os espectros de absorção foram obtidos através de um espectrofotómetro Shimadzu UV-3600 Plus UV-Vis-NIR (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipado com um suporte de cuvettes com controlo de temperatura.

A técnica de espectroscopia de fluorescência é outra técnica que permite estudar a interação da luz com a matéria através da medição da fluorescência emitida. Esta técnica foi utilizada para avaliar a síntese dos magnetolipossomas e a sua capacidade de fusão com membranas modelo. Os espectros de emissão dos AMLs e GUVs foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro Fluorolog 3, equipado com monocromadores duplos de excitação e emissão, pertencente ao Centro de Física da Universidade do Minho.

A técnica de SQUID foi usada para a avaliação da magnetização das nanopartículas em função de um campo magnético aplicado, através da medição dos ciclos de histerese. Esta técnica permitiu estudar as propriedades magnéticas das NPs de MnFe_2O_4 como a magnetização de saturação, magnetização remanescente e o campo de coercividade. Para isto, foi utilizado um magnetómetro SQUID, modelo Quantum Design's MPMS 3, do Instituto de Física dos Materiais da Universidade do Porto.

A técnica de TEM foi usada para obter imagens das NPs de MnFe_2O_4 , permitindo, desta forma, estudar a sua forma e os seus tamanhos. A análise foi feita por um microscópio eletrónico de transmissão (TEM), modelo JEM1010, a operar a 100 kV, do Centro de Investigações Biomédicas (CINBIO), da Universidade de Vigo. Os tamanhos das NPs foram medidos a partir das imagens obtidas por TEM utilizando o software *ImageJ*.

A técnica de XRD permite estudar a caracterização da estrutura cristalina e composição elementar das NPs pela medição das intensidades e dos ângulos dos feixes difratados pela amostra. A partir dos difratogramas obtidos, é possível confirmar a síntese das NPs e avaliar a sua pureza³⁸. Estas foram analisadas por um difratómetro PAN'alytical X'Pert PRO (Malvern Panalytical

Ltd., Malvern, UK), a operar com radiação $\text{CuK}\alpha$, em configuração Bragg-Brentano, pertencente à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Os difratogramas foram, posteriormente, processados pelo software *Match!* para a identificação das estruturas cristalinas das NPs e foi realizado um ajuste de Rietveld.

A técnica de DLS permite determinar os tamanhos hidrodinâmicos de NPs e magnetolipossomas de uma forma não destrutiva, baseando-se no movimento Browniano das partículas em suspensão e na forma como a radiação incidente é espalhada. Esta técnica foi usada para a determinação dos diâmetros hidrodinâmicos, distribuição de tamanhos, potenciais zeta, índices de polidispersividade e estabilidade das NPs de MnFe_2O_4 e dos AMLs. Para estas análises, foi usado o equipamento Litesizer 500, da Anton Paar, operando nos ângulos de deteção backscatter (175°) e sidescatter (90°), do Centro de Física da Universidade do Minho.

A capacidade de aquecimento das nanopartículas magnéticas na presença de um campo magnético alternado externo pode ser quantificada através da sua taxa de absorção específica (SAR).

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização das nanovaras de ferrite de manganês (MnFe_2O_4)

4.1.1. Difração de raios-X

As características estruturais das ferrites de manganês foram analisadas utilizando a técnica de Difração de Raios-X (XRD), a partir da qual foi possível obter o difractograma experimental das nanopartículas A-OLA e B (representado a azul na figura 6 e 7, respetivamente). Com base nesses dados, foram identificados e comparados os difratogramas correspondentes a uma fase cristalina de MnFe_2O_4 (representados a vermelho) que estavam disponíveis na base de dados do software *Match!*. Os dados dessas fases foram obtidos dos ficheiros com informação cristalográfica CIF n° 96-230-0619 e n° 96-152-8317, respetivamente. Através da aplicação de um ajuste de Rietveld das fases selecionadas aos dados da amostra experimental, foi possível estimar parâmetros estruturais, como a composição e a pureza.

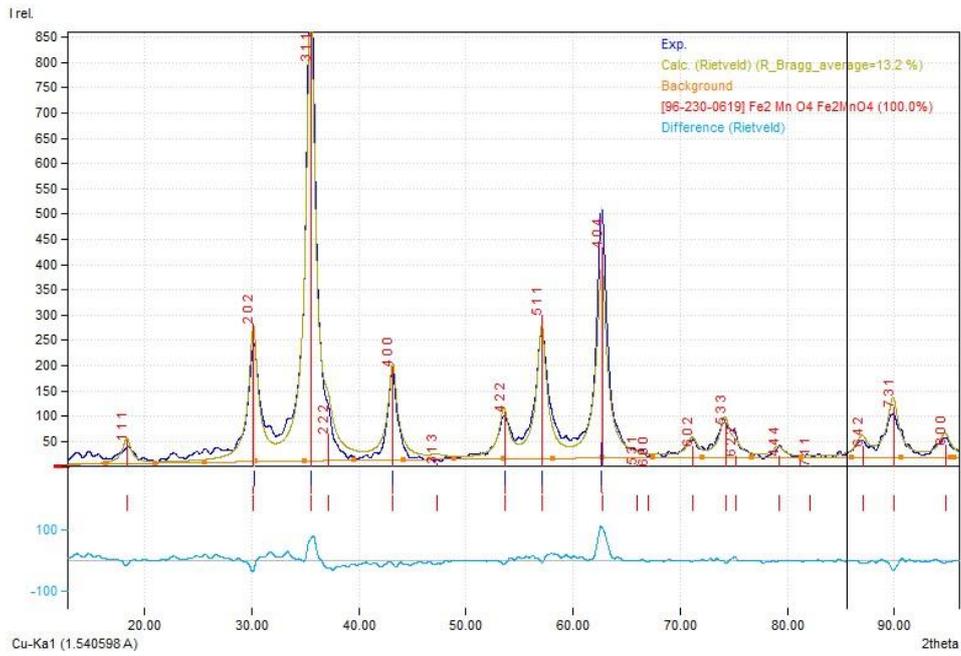


Figura 6. Difratoograma de raios-X das nanopartículas A-OLA e correspondente análise de Rietveld com os índices de Miller.

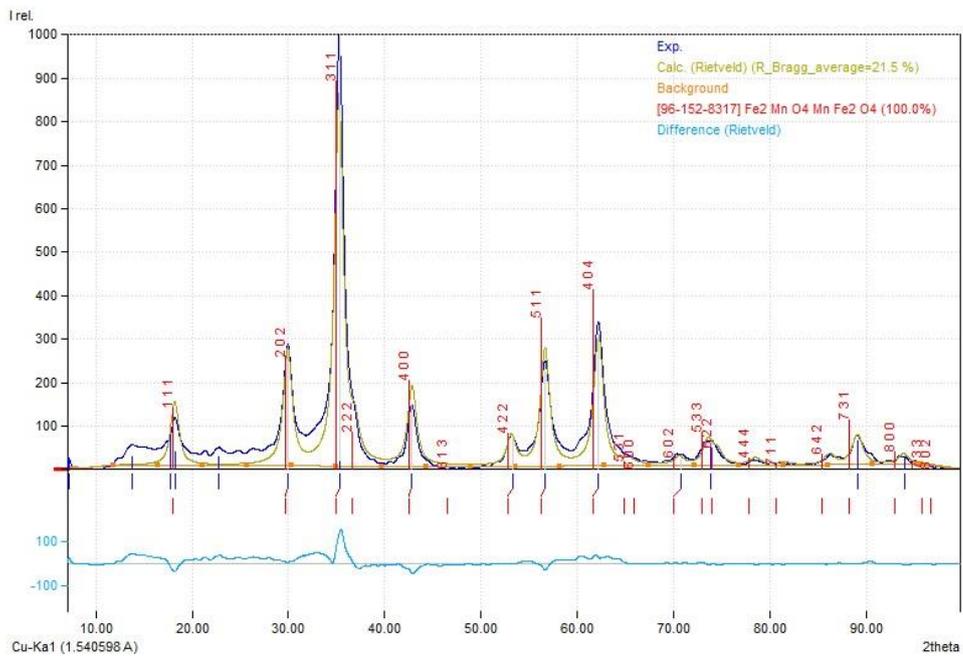


Figura 7. Difratoograma de raios-X das nanopartículas B e correspondente análise de Rietveld com os índices de Miller.

A análise de difração de raios-X (XRD) dos resultados obtidos para as nanopartículas magnéticas confirmou que as nanopartículas sintetizadas são cristalinas. Os dados coletados apontam para uma amostra composta por 100% de uma fase cristalina cúbica de MnFe_2O_4 , independentemente do método de síntese das nanopartículas. Para determinar o tamanho das nanopartículas, a largura a meia altura dos picos de maior intensidade e os ângulos de difração correspondentes para cada fase cristalina foram utilizados na equação de Scherrer (**equação 2**).

$$\tau = \frac{k \times \lambda}{\beta \times \cos \theta} \quad \text{Equação 2}$$

Nesta equação, τ representa o tamanho médio das cristalites, k é a constante geométrica (normalmente com valor de 0,9), λ é o comprimento de onda dos raios-X utilizado no equipamento (0,1541874 nm), β indica a largura total do pico de intensidade máxima a meia altura, e θ é o ângulo de difração de Bragg³⁹. Os tamanhos estimados das nanopartículas foram de 8,21 nm e 7,67 nm para as nanopartículas A-OLA e B, respectivamente.

4.1.2. Espectroscopia de Absorção

A técnica de espectroscopia de absorção no UV-Visível foi utilizada para determinar o espectro de absorção da dispersão aquosa das nanopartículas magnéticas sintetizadas, num intervalo de comprimento de onda de 240 nm a 900 nm. O gráfico de absorvância em função do comprimento de onda resultante pode ser visualizado na figura 8. A análise desse gráfico revelou que as nanopartículas magnéticas exibem uma larga banda de absorção entre 240 nm e 900 nm, com um pico próximo de 440 nm. A presença dessa banda, que é uma característica comum dos óxidos metálicos, confirmou a síntese das nanopartículas magnéticas^{34,40,41}.

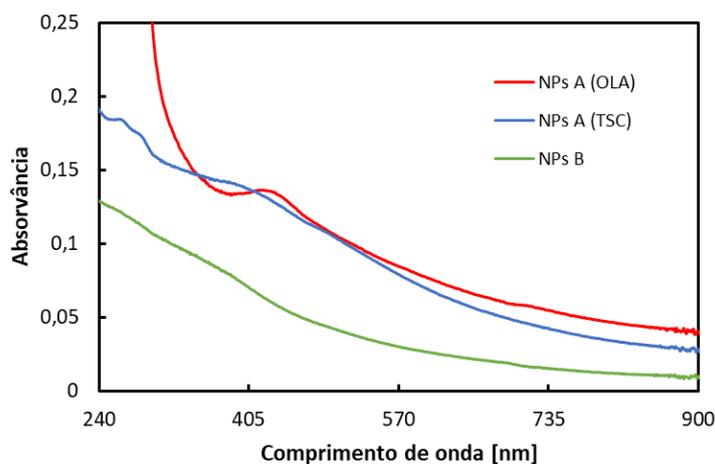


Figura 8. Espectro de absorção UV-VIS, na gama de 240 nm a 900 nm, das nanopartículas A-OLA (a vermelho), A-TSC (a azul) e B (a verde).

4.1.3. Medidas de Difusão Dinâmica de Luz - Potencial Zeta, Tamanho e Estabilidade

Utilizando a técnica de Difusão Dinâmica de Luz (DLS), foram obtidos resultados referentes ao diâmetro hidrodinâmico, distribuição de tamanhos, potencial zeta e estabilidade coloidal das nanopartículas de ferrite de manganês. Os resultados obtidos foram resumidos na tabela 1, sendo exemplificada na figura 9 a distribuição de tamanhos obtida pela distribuição de intensidade, com o correlograma correspondente inserido.

Tabela 1. Tamanhos, índice de polidispersividade e potencial zeta das nanopartículas A-OLA, A-TSC e B.

	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial Zeta (mV)
A-OLA	378,8 ± 55	0,27 ± 0,05	-1,5 ± 0,3
A-TSC	170,6 ± 11	0,25 ± 0,004	-28,9 ± 0,6
B	156,7 ± 48	0,21 ± 0,05	-19,5 ± 0,9(6)

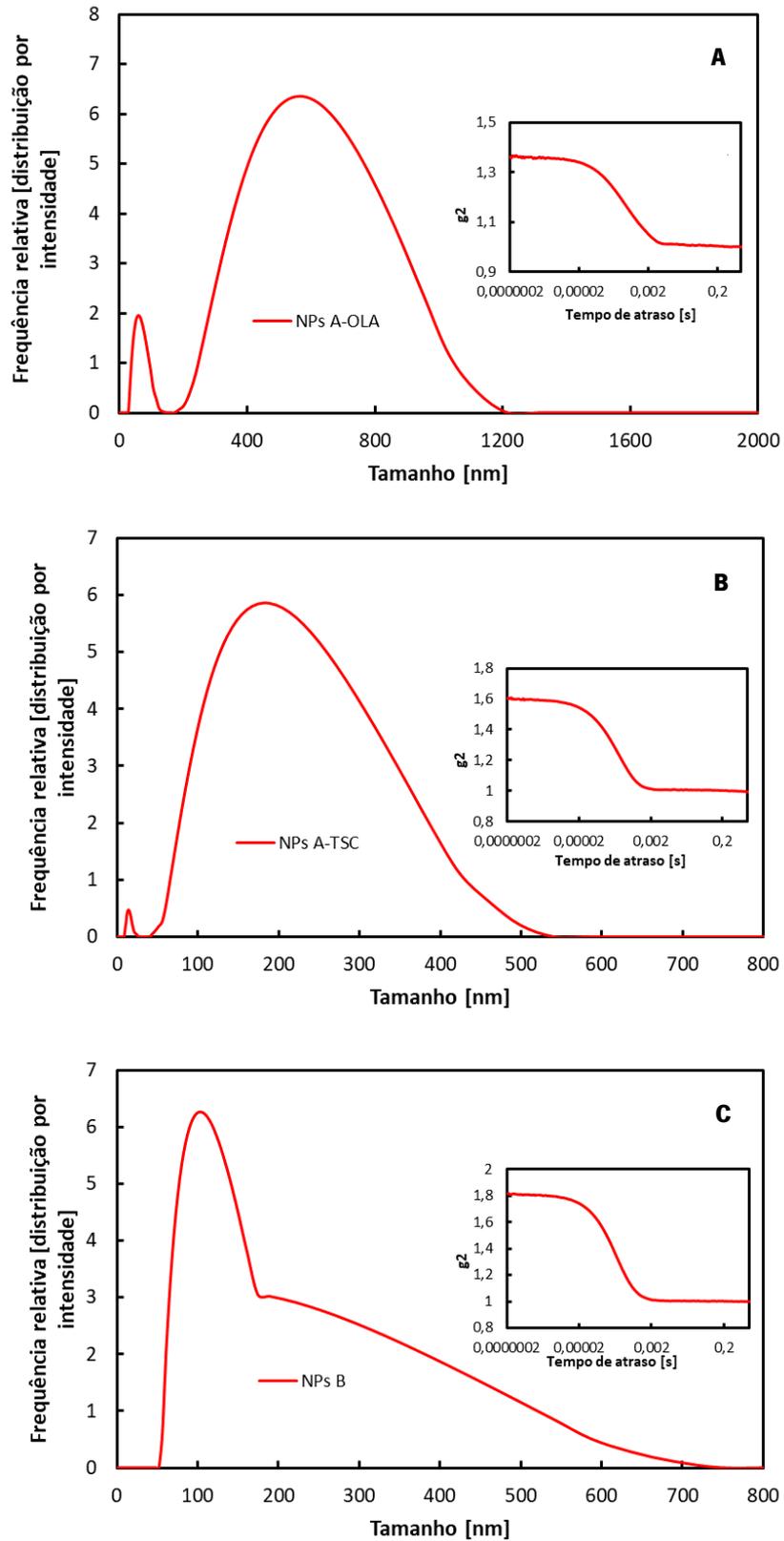


Figura 9. Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma das nanopartículas A-OLA (A), A-TSC (B) e B (C).

As NPs magnéticas apresentaram tamanhos de $378,8 \pm 55$ nm (A-OLA), $170,6 \pm 11$ nm (A-TSC) e $156,7 \pm 48$ nm (B), sendo estes tamanhos obtidos da distribuição por intensidade. Obtiveram-se também valores de potencial zeta de $-1,5 \pm 0,3$ mV, $-28,9 \pm 0,6$ mV, e $-19,5 \pm 0,9(6)$ mV e índices de polidispersividade de $0,27 \pm 0,05$, $0,25 \pm 0,004$ e $0,21 \pm 0,05$ para as NPs A-OLA, A-TSC e B, respetivamente.

A medição do potencial zeta é crucial para avaliar a estabilidade das soluções coloidais, uma vez que permite determinar a carga superficial das partículas. Geralmente, soluções com potencial zeta acima de ± 30 mV são consideradas altamente estáveis, uma vez que a elevada carga superficial (negativa ou positiva) aumenta a repulsão eletrostática entre as partículas. Consoante o valor do potencial zeta se aproxima de zero, as partículas tendem a agregar devido à baixa repulsão eletrostática e às forças de van der Waals. A análise da polidispersividade é outro fator importante na caracterização das NPs, permitindo identificar a presença de populações de diferentes tamanhos numa amostra. Em geral, valores de polidispersividade inferiores a 0,3 indicam uma população razoavelmente homogénea de partículas em termos de tamanho^{42,43}, tal como se verificou para o estudo em questão.

Além disso, foi conduzido um estudo de estabilidade, no qual a transmitância das soluções de NPs foi medida ao longo de 20 minutos para as NPs A e ao longo de 1 hora para as NPs B (conforme mostrado na figura 10). Os resultados demonstraram que não houve mudanças significativas na transmitância da solução durante todo o período de medição, tendo as NPs A-OLA apresentado valores próximos de 81,3%, as NPs A-TSC valores próximos de 76,2% e as NPs B valores próximos de 74,5%.

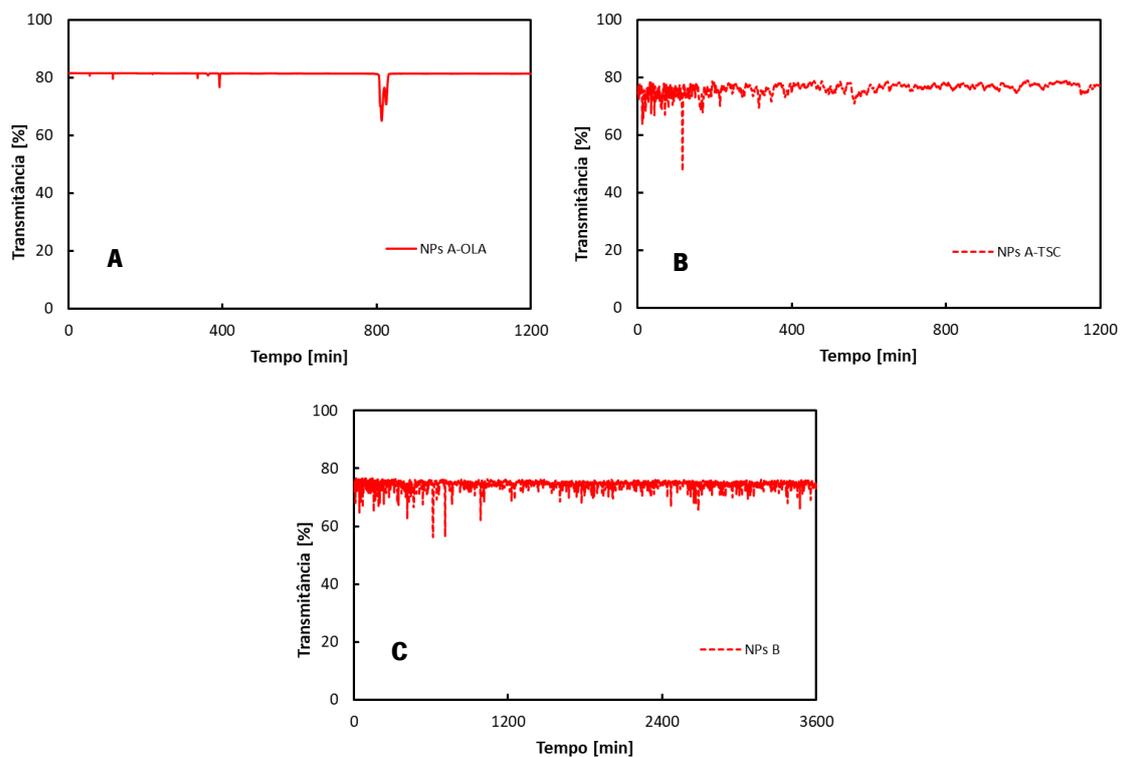


Figura 10. Transmittância das nanopartículas A-OLA (A), A-TSC (B) e B (C) em função do tempo.

4.1.4. Microscopia eletrônica de transmissão

A figura 11 exibe as imagens das nanopartículas A-OLA, capturadas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão. As imagens correspondentes, obtidas com diferentes níveis de ampliação, passaram por um processo de análise no software ImageJ. Isto possibilitou a contagem manual de 82 nanopartículas e a subsequente conversão das áreas medidas em diâmetros, permitindo, assim, a determinação da média e do desvio padrão do tamanho das nanopartículas (figura 11 **A-C**). O resultado desse processo é refletido no histograma que representa os tamanhos obtidos, o qual foi ajustado para se adequar a uma distribuição Gaussiana, conforme representado na figura 11-**D**.

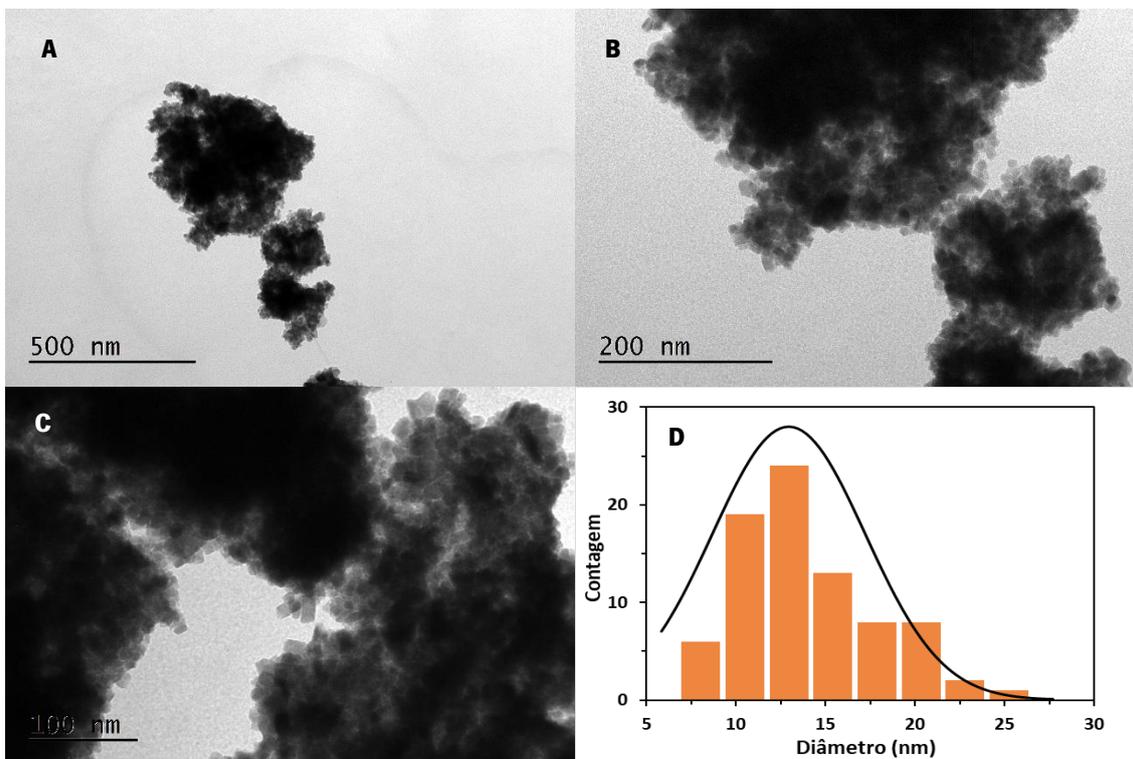


Figura 11. Imagens TEM e histogramas de tamanho (nm) ajustados segundo uma distribuição gaussiana, das nanopartículas A-OLA (A-C), em diferentes ampliações.

Através das imagens adquiridas, é evidente que as nanopartículas são de dimensões muito reduzidas, com algumas delas exibindo uma morfologia cúbica ou alongada, conforme era pretendido no trabalho. Embora se perceba alguma agregação, que pode estar relacionada com o processo de preparação das amostras para a análise microscópica (que envolve submeter as amostras a vácuo), é possível constatar que as NPs exibem uma distribuição de tamanhos relativamente uniforme. Isso fica evidente no histograma da figura 11-D, onde se pode concluir que o tamanho médio medido foi de $12,9 \pm 4,3$ nm.

Utilizando a mesma técnica, foram capturadas imagens em diferentes níveis de ampliação das nanopartículas do tipo B. Posteriormente, essas imagens foram submetidas à análise por meio do software ImageJ.

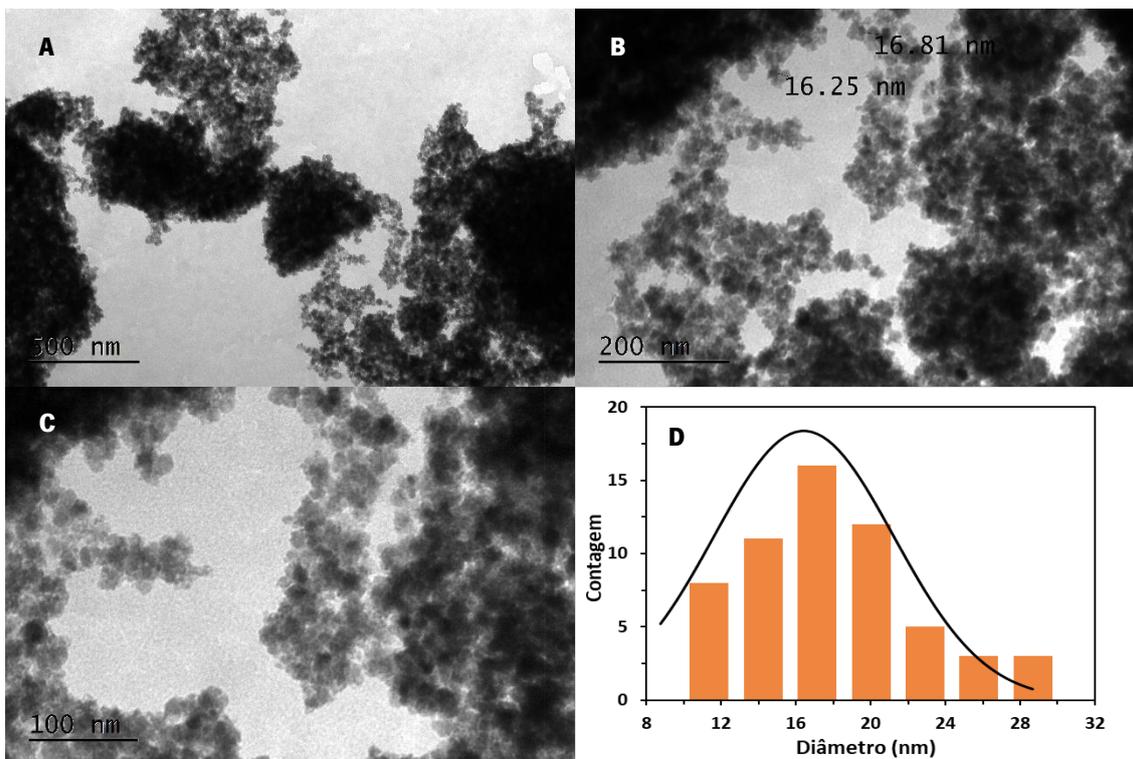


Figura 12. Imagens TEM e histogramas de tamanho (nm) ajustados segundo uma distribuição gaussiana, das nanopartículas B (A-C), em diferentes ampliações.

As imagens obtidas revelaram NPs arredondadas e um grau de aglomeração maior em comparação com as NPs A-OLA, o que dificultou a determinação do seu diâmetro. Através da análise de um conjunto de 58 nanopartículas de ferrite de manganês visíveis na figura 12 **A-C**, foi possível estimar um diâmetro médio de $16,4 \pm 4,8$ nm. Este valor não apresenta uma diferença substancial em relação ao obtido para as nanopartículas do tipo A-OLA, onde não foi feita distinção entre aglomerados e nanopartículas isoladas. O histograma que representa a distribuição dos tamanhos das nanopartículas do tipo B está disponível na figura 12-**D**.

4.1.5. SQUID

Durante a realização deste trabalho, apenas foi possível realizar medidas magnéticas por SQUID para duas amostras preparadas com NPs B e A-OLA. A figura 13 ilustra a variação do momento magnético em função do campo magnético aplicado. Ao ampliar a região central da figura, pode-se observar a curva de histerese. A partir da curva de histerese foi possível determinar

os valores de coercividade (valor do campo magnético inverso necessário para que o fluxo magnético retorne a zero), magnetização remanescente e magnetização de saturação (tabela 2).

As partículas superparamagnéticas não exibem histerese, ou seja, a sua resposta a um campo magnético externo é semelhante ao comportamento de Langevin observado em materiais paramagnéticos. No entanto, as partículas superparamagnéticas possuem altos valores de magnetização e suscetibilidade, características dos materiais ferromagnéticos que as compõem⁴⁴.

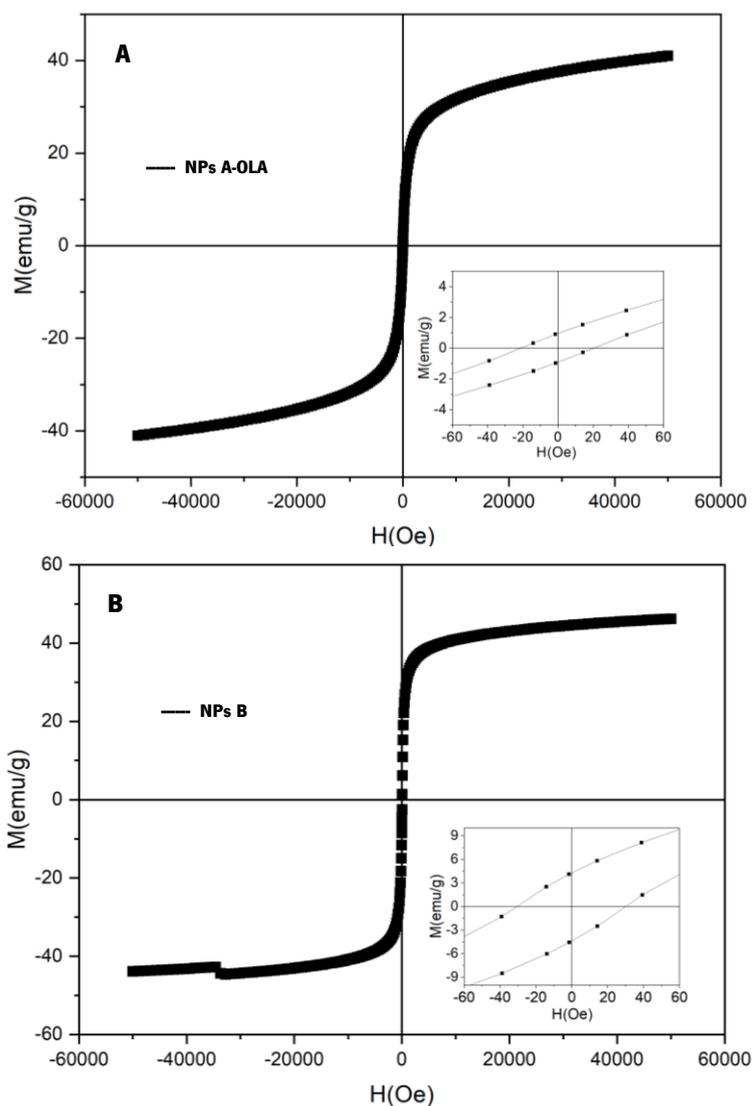


Figura 13. Ciclo de histerese de magnetização das nanopartículas A-OLA (A) e B (B). Inserido no quadrante, uma ampliação da região de baixo campo.

Tabela 2. Valores de coercividade (H), magnetização de saturação (M_s) e remanescente (M_r) e da razão entre as magnetizações de saturação e remanescente (M_r/M_s) das nanopartículas A-OLA e B.

	H (Oe)	M_r (emu/g)	M_s (emu/g)	M_r/M_s
B	30	4,2	46,24	0,091
A-OLA	20	1	40,99	0,024

Ao analisar os resultados obtidos, pode-se observar ausência de histerese, com uma curva fechada e valores reduzidos de coercividade de, aproximadamente, 30 Oe para as NPs B e 20 Oe para as NPs A-OLA. Em relação à magnetização, registou-se uma magnetização de saturação bastante razoável, com valores de 46,24 emu/g e 40,99 emu/g, e magnetização remanescente de apenas 4,2 emu/g e 1 emu/g para as NPs B e A-OLA, respetivamente.

As nanopartículas exibiram um comportamento superparamagnético, com uma relação entre a magnetização remanescente e a magnetização de saturação menor do que 0,1. Conforme indicado na literatura, quando o valor de M_r/M_s é inferior a 0,1, mais de 90% da magnetização da amostra é perdida quando o campo magnético externo é removido, o que confirma o comportamento superparamagnético das nanopartículas³⁴.

4.1.6. Hipertermia magnética

Foi ainda testada a capacidade de produção de calor das nanovaras magnéticas A-OLA na presença de um campo magnético alternado (AMF). Para isso, foi preparada uma solução aquosa de nanovaras de concentração 45 mg/mL. Esta solução foi sujeita a um campo magnético de frequência de 155 kHz e intensidade de campo de 8,5 kA/m durante, aproximadamente, 23 minutos. A figura 14-A mostra o ciclo completo de exposição ao campo magnético durante 23 minutos e a sua posterior remoção. É possível observar um aumento de temperatura quando as nanovaras são sujeitas ao campo magnético e o arrefecimento após a sua remoção. O gráfico da figura 14-B representa a curva de aquecimento da solução quando sujeita ao campo magnético.

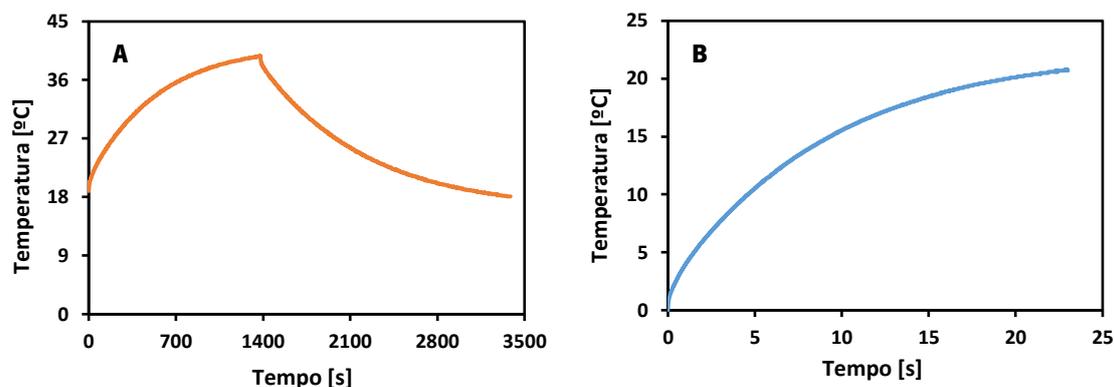


Figura 14. Perfis do ciclo de aquecimento e arrefecimento (A) e da curva de aquecimento (B) de soluções aquosas de nanopartículas A-OLA após exposição a um campo magnético alternado.

Os valores de SAR (do inglês, *Specific Absorption Rate*) foram calculados através dos métodos IAM (do inglês, *Incremental Analysis Method*) e pelo modelo Lucas-Box. Através destes métodos, estimaram-se os valores de $4,80 \pm 0,614$ W/g e 4,2 W/g, respetivamente. Foi ainda calculada a perda de potência intrínseca (ILP), para a qual se estimou um valor de $0,43 \pm 0,055$ nHm²/K.

Estes valores de SAR refletem uma boa capacidade de geração de calor por parte das nanopartículas. Foi registado um aquecimento de aproximadamente 21 °C, o que demonstra um efeito de hipertermia magnética suficiente para efeitos terapêuticos.

4.2. Caracterização dos magnetolipossomas

4.2.1. Magnetolipossomas contendo sonda fluorescente Rodamina

4.2.1.1. Espectroscopia de fluorescência

Utilizando a técnica de fluorescência, compararam-se os espectros de emissão de rodamina incorporada em lipossomas individuais, magnetolipossomas que incluem nanopartículas do tipo A-OLA e magnetolipossomas que contêm nanopartículas do tipo A-TSC (conforme apresentado na figura 15). Isto foi realizado com o propósito de confirmar a incorporação bem-sucedida das nanopartículas nos lipossomas, validando assim a formação dos nanossistemas em questão.

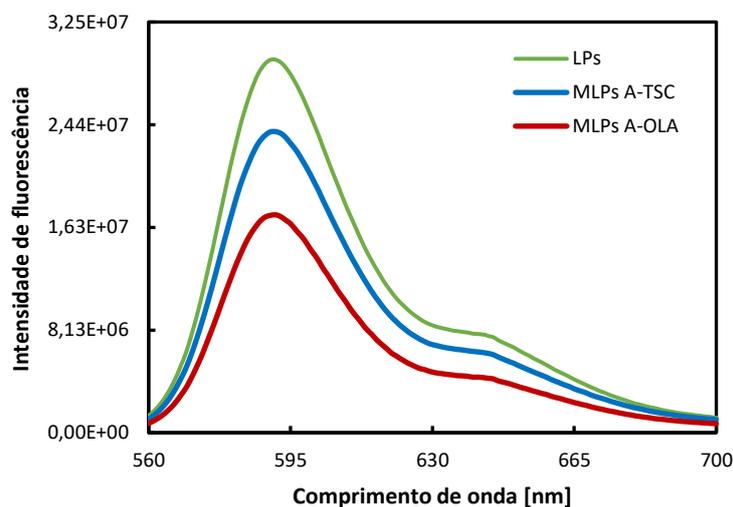


Figura 15. Espectros de emissão de fluorescência dos magnetolipossomas (marcados com rodamina B) contendo nanopartículas A-OLA (a vermelho), magnetolipossomas contendo nanopartículas A-TSC (a azul) e lipossomas simples (a verde).

Conforme antecipado, observa-se uma maior intensidade de fluorescência da rodamina nos lipossomas que não contêm nanopartículas. Quando as nanopartículas estão presentes nos magnetolipossomas, nota-se uma redução na fluorescência, um fenómeno conhecido como "*quenching*". Isto ocorre porque as nanopartículas possuem uma ampla gama de absorção, o que significa que elas absorvem parte da energia que normalmente seria absorvida pela Rodamina. Além disso, podemos inferir que o efeito de *quenching* é mais acentuado nos magnetolipossomas baseados em nanopartículas do tipo A-OLA, devido à maior proximidade destas nanopartículas em relação à Rodamina. De facto, uma vez que estas nanopartículas contêm OLA, é esperado que elas tenham uma afinidade maior com a membrana e a Rodamina também está ligada a fosfolípidos presentes na membrana.

4.2.1.2. Medidas de Difusão Dinâmica de Luz - Potencial Zeta, Tamanho e Estabilidade

A técnica de DLS foi utilizada novamente para a caracterização estrutural dos lipossomas que contêm as nanopartículas magnéticas. Nesta fase os magnetolipossomas (MLPs) foram marcados com rodamina B para posteriormente ser feito o estudo da fusão com modelos de membrana. Na tabela 3, estão resumidos os valores do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade e potencial zeta obtidos. A figura 16 ilustra os gráficos de distribuição de tamanho dos MLPs contendo NPs A-OLA e A-TSC, com os respetivos correlogramas inseridos.

Tabela 3. Tamanhos, índice de polidispersividade e potencial zeta dos magnetolipossomas contendo nanopartículas A-OLA e A-TSC marcadas pela sonda fluorescente rodamina B.

	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial Zeta (mV)
A-OLA	282,8 ± 23	0,29 ± 0,01	-0,35 ± 0,1
A-TSC	287,0 ± 15	0,31 ± 0,02	-21,7 ± 0,9

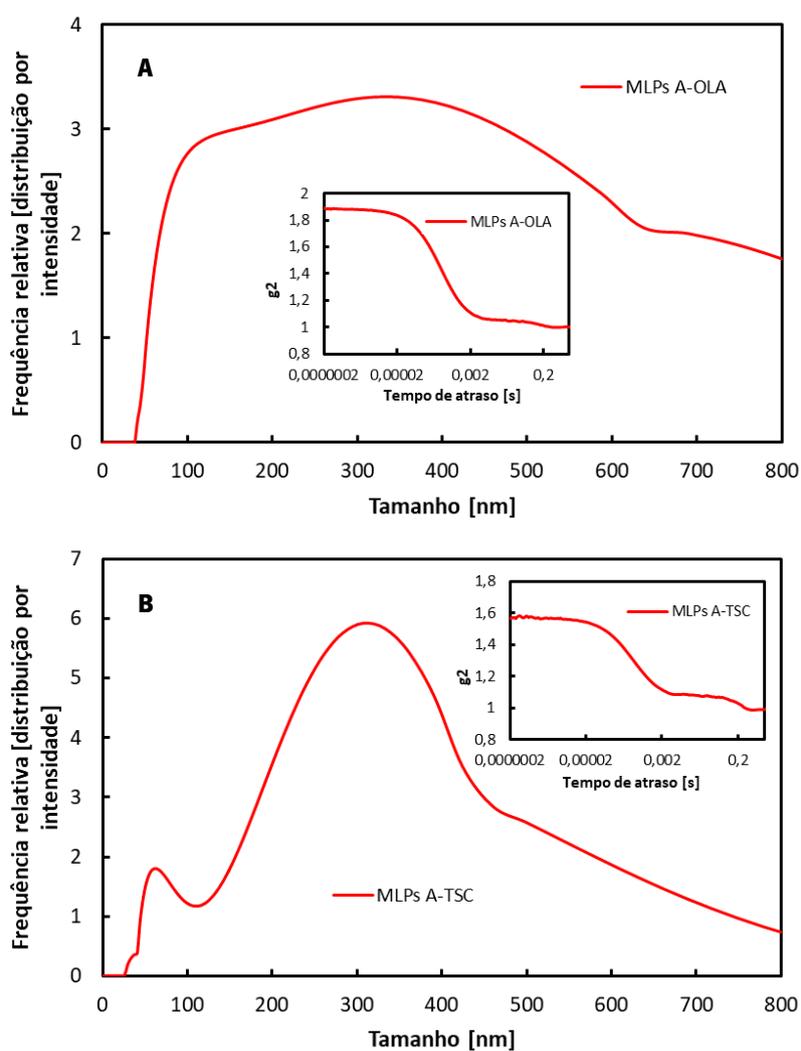


Figura 16. Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma dos magnetolipossomas contendo nanopartículas A-OLA (A) e A-TSC (B) marcadas pela sonda fluorescente rodamina B.

Os magnetolipossomas apresentaram tamanhos de $282,8 \pm 23$ nm (A-OLA) e $287,0 \pm 15$ nm (A-TSC), sendo estes tamanhos obtidos da distribuição por intensidade. Obteve-se também valores de potencial zeta de $-0,35 \pm 0,1$ mV e $-21,7 \pm 0,9$ mV e índices de polidispersividade de $0,29 \pm 0,01$ e $0,31 \pm 0,02$ para os MLPs A-OLA e A-TSC, respectivamente.

Foi ainda conduzido um estudo de estabilidade, no qual a transmitância das soluções de MLPs foi medida ao longo de 1 hora (conforme mostrado na figura 17). Os resultados demonstraram que não houve mudanças significativas na transmitância da solução durante todo o período de medição, tendo os LPs A-OLA apresentado valores próximos de 72% e os LPs A-TSC valores próximos de 78,2%.

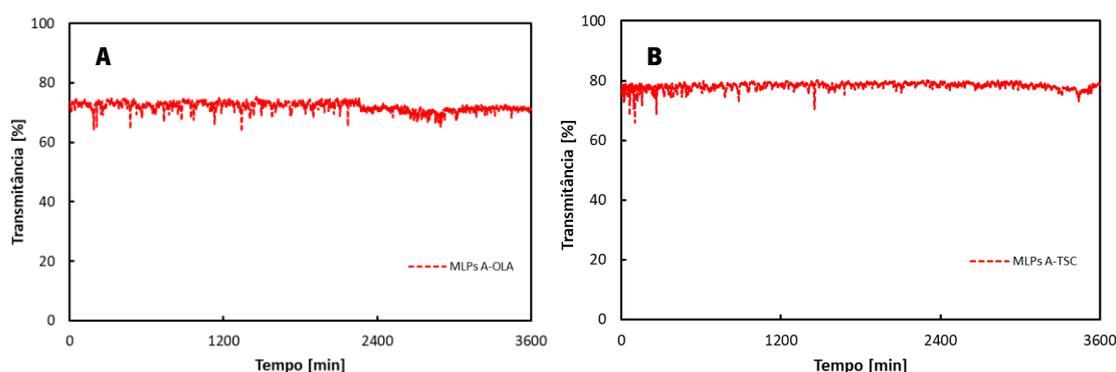


Figura 17. Transmitância dos magnetolipossomas contendo nanopartículas A-OLA (A) e A-TSC (B) marcadas pela sonda fluorescente rodamina B em função do tempo.

4.2.2. Magnetolipossomas contendo o fármaco modelo curcumina

4.2.2.1. Eficiência de encapsulamento da curcumina

Foi calculada a quantidade de curcumina encapsulada em lipossomas multilamelares aquosos (AMLs) em relação à quantidade inicial de fármaco adicionado, por meio de ensaios com nanopartículas do tipo A-OLA, utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência. Os valores da eficiência de encapsulamento, EE (%), obtidos através da **equação 1**, foram de $99,98 \pm 0,00014$, tendo sido realizados três ensaios independentes.

Foi alcançada uma elevada eficiência de encapsulamento que revela uma perspectiva promissora para a utilização destes novos magnetolipossomas que incorporam nanovaras magnéticas na terapia dual do cancro, envolvendo hipertermia e quimioterapia magneticamente controlada. Este elevado nível de encapsulamento possibilita uma otimização significativa do

potencial terapêutico da curcumina. Além disso, estes resultados atestam que o método de síntese é apropriado e assegura a incorporação eficaz do fármaco entre as duas camadas lipídicas.

4.2.2.2. Medidas de Difusão Dinâmica de Luz - Potencial Zeta, Tamanho e Estabilidade

Foram também obtidos resultados referentes ao diâmetro hidrodinâmico, distribuição de tamanhos, potencial zeta e estabilidade coloidal dos magnetolipossomas contendo curcumina, através da técnica de DLS. Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 4, sendo exemplificada na figura 18 a distribuição de tamanhos obtida pela distribuição de intensidade, com o correlograma correspondente inserido.

Tabela 4. Tamanhos, índice de polidispersividade e potencial zeta dos magnetolipossomas contendo nanopvaras A-OLA carregados com curcumina.

	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial Zeta (mV)
A-OLA	377,8 ± 62	0,28 ± 0,04	-57,3 ± 2

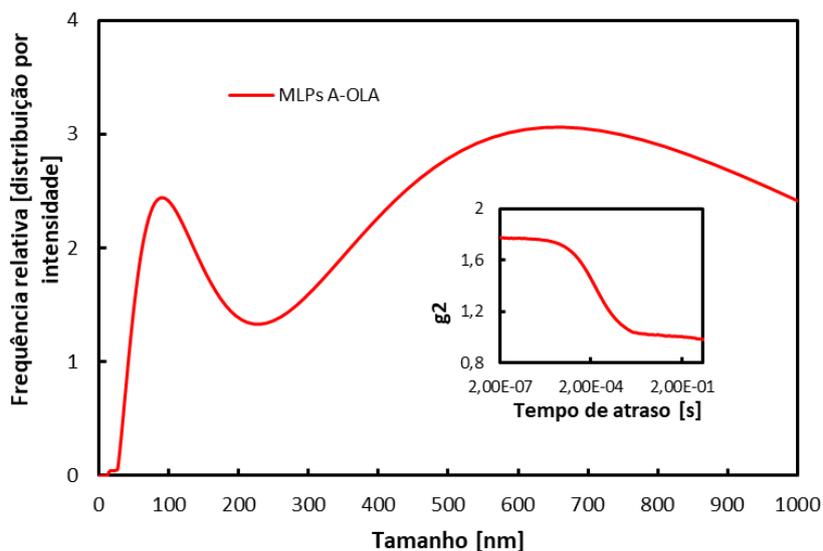


Figura 18. Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma dos magnetolipossomas contendo nanopvaras A-OLA carregados com curcumina.

Os magnetolipossomas apresentaram tamanhos de $377,8 \pm 62$ nm, sendo estes tamanhos obtidos da distribuição por intensidade. Obtiveram-se também valores de potencial zeta de $-57,3 \pm 2$ mV e índice de polidispersividade de $0,28 \pm 0,04$, revelando boa homogeneidade e estabilidade coloidal dos nanossistemas, atendendo ao potencial zeta muito negativo.

4.2.3. Ensaios de liberação do fármaco

O perfil de liberação da curcumina dos nanossistemas foi determinado através de medições de fluorescência (conforme ilustrado na figura 19), com o objetivo de, no futuro, estabelecer a dose adequada que seja capaz de alcançar a concentração local necessária para o tratamento oncológico. Após 48 horas, observou-se uma taxa de liberação de aproximadamente 21%. É razoável supor que os magnetolipossomas continuariam a libertar curcumina ao longo do tempo, uma vez que o ensaio não parece ter atingido um estado de saturação.

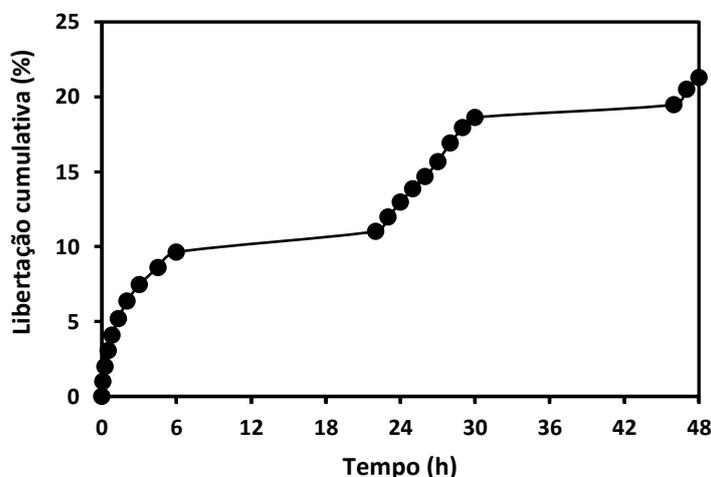


Figura 19. Perfil de liberação cumulativa da curcumina (%) ao longo do tempo (h) encapsulada em AMLs.

Com o propósito de obter uma avaliação das cinéticas de liberação, diferentes modelos matemáticos têm sido utilizados para ajustar os perfis de liberação. Neste estudo específico, a curva que representa a quantidade cumulativa de curcumina libertada foi ajustada ao modelo de Weibull, bem como à cinética de primeira ordem.

O modelo de Weibull é uma função de distribuição usada para descrever a fração do fármaco que se dissolve na solução “m” ao longo do tempo “t” (conforme apresentado na **equação 3**):

$$m = 1 - \exp^{-(t-T_i)\frac{b}{a}} \quad \text{Equação 3}$$

Nesta equação, T_i representa o tempo de latência da libertação (geralmente igual a 0), e a variável " a " descreve a escala de tempo do processo. O parâmetro " b " descreve a forma da curva de libertação. Quando $b = 1$, a cinética de libertação segue uma função exponencial. Se $b > 1$, a função assume uma forma sigmoide com um ponto de inflexão. No caso de $b < 1$, a função assemelha-se a uma curva parabólica com um declive inicial acentuado⁴⁵.

Uma abordagem alternativa é o modelo de cinética de primeira ordem, no qual o padrão de libertação é descrito pela **equação 4**.

$$F(\%) = M_0 \times (1 - e^{-kt}) \quad \text{Equação 4}$$

Nesta equação, " F " representa a percentagem de fármaco libertado, " M_0 " corresponde à quantidade total de fármaco libertado, " k " representa a taxa de primeira ordem (que pode variar) e " t " representa o tempo⁴⁶.

Ambos os ajustes realizados até ao período de medição de 24 horas demonstraram descrever bem os dados experimentais, e os parâmetros obtidos estão detalhados na tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros obtidos através dos ajustes dos modelos matemáticos aplicados à cinética de libertação da curcumina encapsulada em AMLs (Weibull e primeira ordem) e respetivos coeficientes de determinação (R^2).

Weibull			Primeira Ordem	
b	a	R^2	k	R^2
0,631	0,394	0,9998	0,368	0,9557

Os coeficientes de determinação (R^2) indicam que o modelo de Weibull (figura 20) é a melhor escolha para descrever com precisão o perfil de libertação do fármaco. No entanto, é importante notar que, uma vez que se trata de um modelo empírico, os parâmetros " a " e " b " associados a este modelo não possuem uma interpretação física direta. Na literatura, já foi estabelecida uma correlação entre o parâmetro " b " e o mecanismo de difusão da libertação do agente antitumoral: quando " b " é menor ou igual a 0,75, a difusão segue um padrão do tipo *Fickiano*, o que significa que ocorre através de espaços euclidianos e fractais; se o valor de " b " está entre 0,75 e 1, ocorre uma combinação dos mecanismos de difusão *Fickiana* e transporte

de tipo-II; por outro lado, quando " b " ultrapassa o valor de 1, a liberação segue um mecanismo mais complexo⁴⁷. Portanto, com base nestas considerações, é possível concluir que o mecanismo de difusão da curcumina é do tipo *Fickiano*.

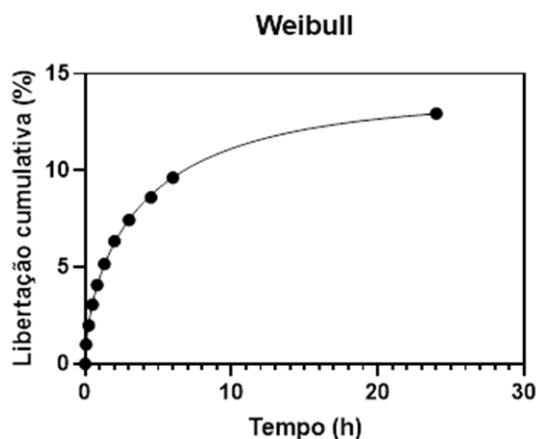


Figura 20. Perfil de liberação cumulativa da curcumina (%) ao longo do tempo (h) encapsulada em AMLs, ajustado ao modelo de Weibull.

No que diz respeito à cinética de primeira ordem (figura 21), fica claro que os magnetolipossomas apresentam uma taxa de liberação eficiente nas primeiras 24 horas. Essa conclusão é corroborada pelo parâmetro " k ", que apresenta um valor de 0,368. Estes resultados confirmam a validade do desenvolvimento dos magnetolipossomas e reforçam o seu potencial para aplicação em terapias oncológicas.

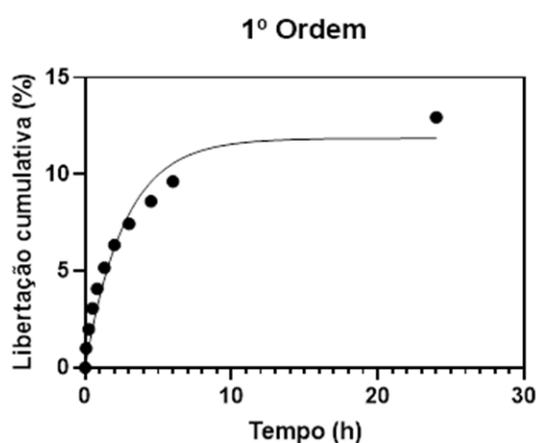


Figura 21. Perfil de liberação cumulativa da curcumina (%) ao longo do tempo (h) encapsulada em AMLs, ajustado à cinética de primeira ordem.

4.3. Modelos de biomembranas (GUVs)

4.3.1. Medidas de Difusão Dinâmica de Luz - Potencial Zeta, Tamanho e Estabilidade

Através da técnica de DLS, foram obtidos dados referentes ao diâmetro hidrodinâmico, distribuição de tamanhos, potencial zeta e estabilidade coloidal das vesículas unilamelares gigantes (GUVs), usadas como modelos de biomembranas. Os resultados obtidos foram resumidos na tabela 6, sendo exemplificada na figura 22 a distribuição de tamanhos obtida pela distribuição de intensidade, com o correlograma correspondente inserido.

Tabela 6. Tamanhos, índice de polidispersividade e potencial zeta dos GUVs.

	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial Zeta (mV)
GUVs	$196,8 \pm 7$	$0,28 \pm 0,006$	$-29,7 \pm 0,2$

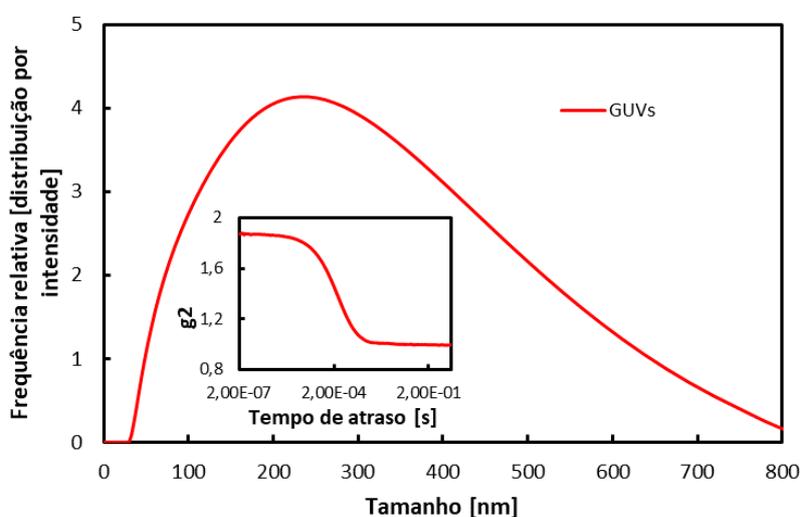


Figura 22. Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma dos GUVs.

Os GUVs apresentaram tamanhos de $196,8 \pm 7$ nm, sendo estes tamanhos obtidos da distribuição por intensidade. Obteve-se também o valor de potencial zeta de $-29,7 \pm 0,2$ e índice de polidispersividade de $0,28 \pm 0,006$.

4.4. Estudo de fusão dos magnetolipossomas com modelos de membrana

4.4.1. Espectroscopia de fluorescência

Em seguida, apresentam-se os gráficos de emissão de fluorescência que demonstram a fusão dos MLPs com modelos de membrana (GUVs) (gráficos 23 e 24).

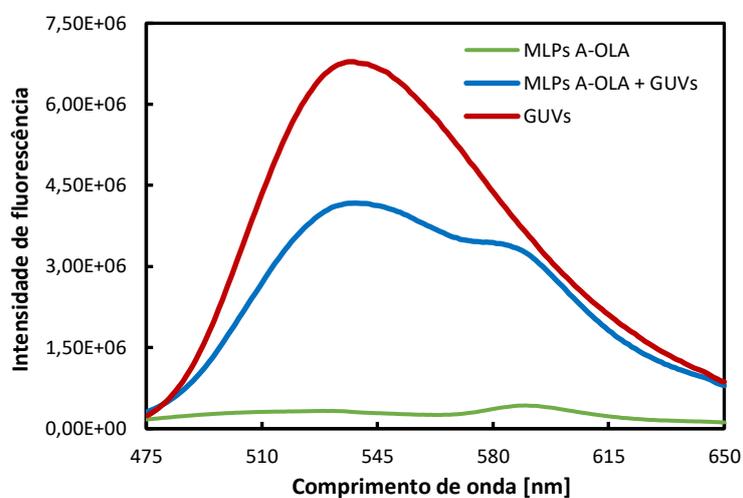


Figura 23. Espectros de emissão de fluorescência dos magnetolipossomas (marcados com rodamina B) contendo nanopartículas A-OLA (a verde), dos GUVs (a vermelho) e da sua interação (a azul).

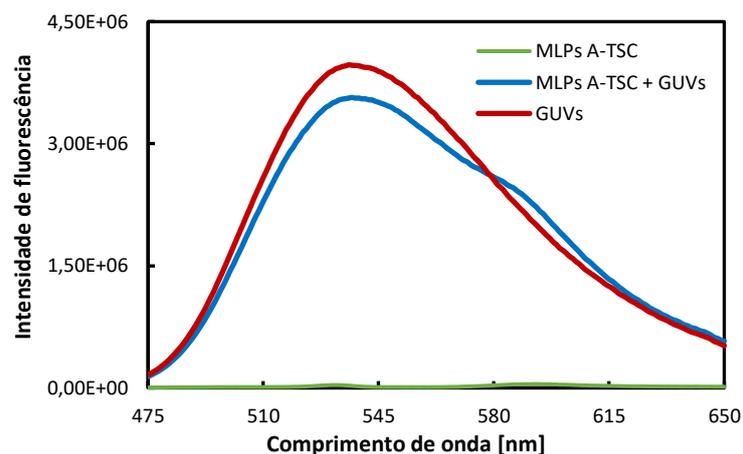


Figura 24. Espectros de emissão de fluorescência dos magnetolipossomas (marcados com rodamina B) contendo nanopartículas A-TSC (a verde), dos GUVs (a vermelho) e da sua interação (a azul).

Para investigar a capacidade de interação não específica dos magnetolipossomas aquosos desenvolvidos com membranas celulares, procedeu-se a estudos de fusão com modelos de membrana, neste caso, os GUVs. Este ensaio foi realizado com magnetolipossomas marcados

com rodamina e GUVs marcados com NBD. Considerando que o NBD é o doador de energia e a rodamina o aceitador de energia, e fazendo a excitação na zona em que o NBD absorve, verifica-se que é notória a banda típica da emissão do NBD nos GUVs, enquanto apenas existe uma emissão residual para os MLPs com rodamina (uma vez que não está a ser excitada diretamente). Após a fusão, observa-se uma diminuição da banda do doador NBD (aproximadamente a 545 nm), e o aumento da banda de emissão da rodamina (a cerca de 590 nm), que resulta da transferência de energia das moléculas excitadas de NBD, que só pode ocorrer devido à proximidade entre as duas moléculas doadora e aceitante (NBD e rodamina).

Assim, podemos concluir que ocorreu FRET, indicando que há fusão entre os dois sistemas. Por isso, os MLPs desenvolvidos são promissores para o transporte e entrega de fármacos, podendo fundir com as membranas biológicas.

4.4.2. Medidas de Difusão Dinâmica de Luz - Potencial Zeta, Tamanho e Estabilidade

Foram caracterizados os diâmetros hidrodinâmicos, distribuição de tamanhos, potenciais zeta e estabilidade coloidal dos nanossistemas resultantes da fusão dos MLPs com os GUVs através da técnica de DLS. Os resultados obtidos foram resumidos na tabela 7, sendo exemplificada na figura 25 a distribuição de tamanhos obtida pela distribuição de intensidade, com o correlograma correspondente inserido.

Tabela 7. Tamanhos, índice de polidispersividade e potencial zeta dos AMLs resultantes da fusão dos GUVs com magnetolipossomas contendo nanopartículas A-OLA e A-TSC.

	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersividade	Potencial Zeta (mV)
A-OLA + GUVs	433,9 ± 39	0,26 ± 0,01	9,1 ± 0,4
A-TSC + GUVs	175,3 ± 5	0,27 ± 0,02	-27,9 ± 1

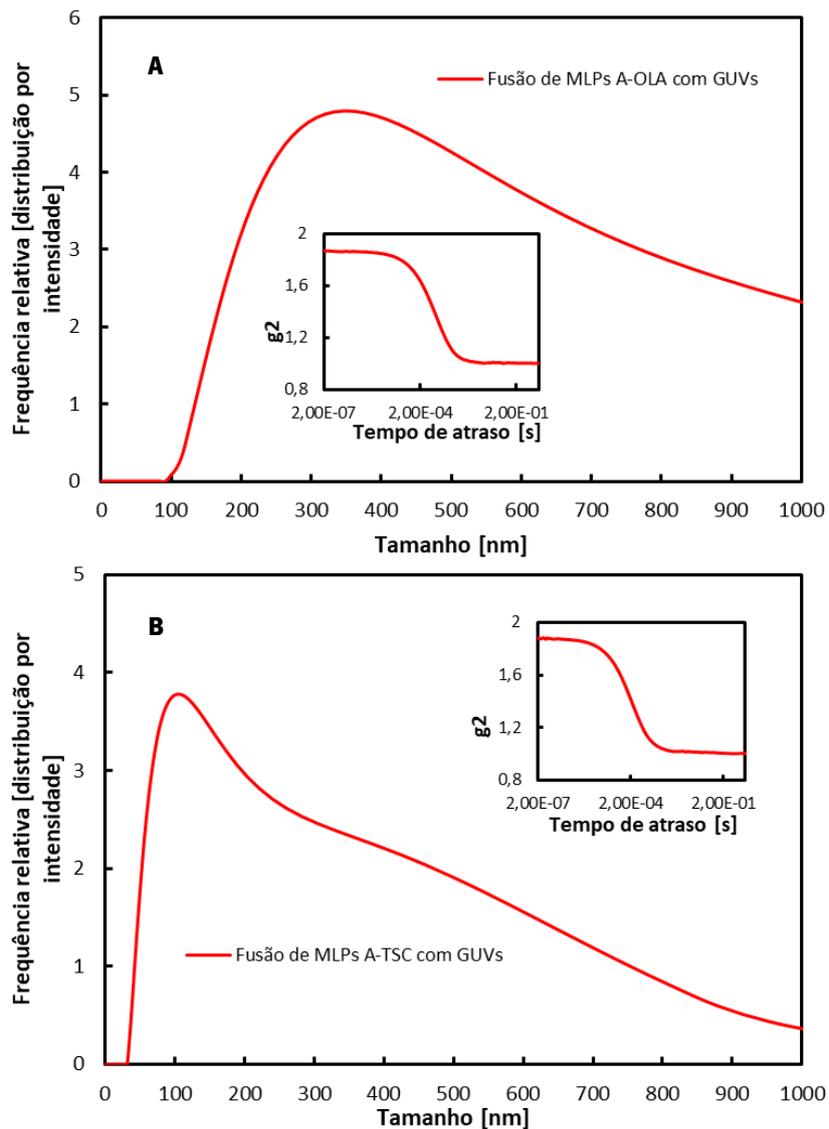


Figura 25. Distribuição dos tamanhos e respetivo correlograma da fusão dos GUVs com magnetolipossomas contendo nanopartículas A-OLA (A) e A-TSC (B).

Os magnetolipossomas fundidos com GUVs apresentaram tamanhos de $433,9 \pm 39$ nm (no caso das NPs A-OLA) e $175,3 \pm 5$ nm (para as NPs A-TSC), sendo estes tamanhos obtidos da distribuição por intensidade. Obtiveram-se também valores de potencial zeta de $9,1 \pm 0,4$ mV e $-27,9 \pm 1$ mV e índices de polidispersividade de $0,26 \pm 0,01$ e $0,27 \pm 0,02$ para os MLPs contendo NPs A-OLA e NPs A-TSC, respetivamente. Os resultados evidenciam maior capacidade de fusão para os MLPs contendo nanopartículas A-OLA, o que será devido ao facto de estas NPs estarem mais próximas da membrana, podendo atuar como adjuvante na fusão.

5. Conclusão e perspectivas futuras

Neste trabalho, foram preparados e caracterizados nanossistemas lipídicos contendo nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês ($MnFe_2O_4$) de forma cúbica ou alongada. Estes nanossistemas foram desenvolvidos a partir de dois métodos de síntese de nanopartículas distintos: o método A, que produziu nanopartículas revestidas com oleilamina (OLA) e nanopartículas revestidas com citrato (TSC), e o método B baseado em coprecipitação. A análise por XRD confirmou a síntese das nanopartículas com tamanhos médios adequados para encapsulamento, que foram determinados por TEM. As propriedades magnéticas das nanopartículas obtidas pelo método A usando OLA e pelo método B foram avaliadas por SQUID, tendo-se confirmado que as nanopartículas exibem comportamento superparamagnético, com boa magnetização de saturação (40,99 emu/g e 46,24 emu/g, respetivamente), o que é ideal para a sua aplicação como agentes de hipertermia magnética. Os ensaios de hipertermia confirmaram a capacidade destas nanopartículas para serem utilizadas em futuras aplicações terapêuticas. Devido à sua composição, cristalinidade e tamanho apropriados, bem como à magnetização adequada para localização precisa, as nanopartículas A-OLA e A-TSC foram escolhidas como a componente magnética para a formulação de magnetolipossomas.

Verificou-se uma incorporação bem-sucedida do fármaco modelo curcumina na bicamada lipídica dos magnetolipossomas aquosos contendo as nanopartículas, com uma muito elevada eficiência de encapsulamento ($EE\% = 99,98\%$). Foi comprovada, através do processo de FRET, a capacidade de fusão dos nanossistemas desenvolvidos com modelos de membranas celulares. O perfil de libertação da curcumina foi analisado, revelando um mecanismo de difusão do tipo *Fickiano*. Observou-se uma libertação máxima de 21% da curcumina em 48 horas, confirmando a destabilização da membrana dos magnetolipossomas aquosos.

Apesar de terem sido alcançados bons resultados no desenvolvimento deste nanossistema para aplicações na terapia dual do cancro, é crucial prosseguir uma investigação mais aprofundada nas seguintes direções:

- Aperfeiçoar os processos de síntese, com o objetivo de minimizar contaminações nas amostras.

- Introduzir revestimentos no processo de síntese que evitem a agregação das nanopartículas magnéticas em meio aquoso, uma questão que se tornou evidente nos resultados do estudo de DLS.
- Investigar a capacidade de aquecimento das nanopartículas A-TSC e B por hipertermia magnética.
- Determinar a quantidade máxima de curcumina que os magnetolipossomas aquosos conseguem encapsular.
- Realizar ensaios de libertação da curcumina na presença de um campo magnético alternado (hipertermia magnética).
- Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas e dos magnetolipossomas em células, conduzindo ensaios de viabilidade celular *in vitro* em linhas celulares humanas normais e comparando os resultados com os obtidos em linhas celulares tumorais, tanto na presença como na ausência de um campo magnético alternado.

6. Referências bibliográficas

1. Zhao, C.-Y., Cheng, R., Yang, Z. & Tian, Z.-M. Nanotechnology for Cancer Therapy Based on Chemotherapy. *Molecules* **23**, 826 (2018).
2. Wang, X., Yang, L., Chen, Z. & Shin, D. M. Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging. *CA. Cancer J. Clin.* **58**, 97–110 (2008).
3. Maeda, H., Nakamura, H. & Fang, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 71–79 (2013).
4. Stylianopoulos, T., Economides, E.-A., Baish, J. W., Fukumura, D. & Jain, R. K. Towards Optimal Design of Cancer Nanomedicines: Multi-stage Nanoparticles for the Treatment of Solid Tumors. *Ann. Biomed. Eng.* **43**, 2291–2300 (2015).
5. Ernsting, M. J., Murakami, M., Roy, A. & Li, S.-D. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *J. Control. Release* **172**, 782–794 (2013).
6. Kang, H. *et al.* Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicology of theranostic nanoparticles. *Nanoscale* **7**, 18848–18862 (2015).
7. Crucho, C. I. C. Stimuli-Responsive Polymeric Nanoparticles for Nanomedicine. *ChemMedChem* **10**, 24–38 (2015).
8. Du, J., Lane, L. A. & Nie, S. Stimuli-responsive nanoparticles for targeting the tumor microenvironment. *J. Control. Release* **219**, 205–214 (2015).
9. Fumoto, S. & Kawakami, S. Combination of Nanoparticles with Physical Stimuli toward Cancer Therapy. *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 212–216 (2014).
10. Haeri, A. *et al.* Effective attenuation of vascular restenosis following local delivery of chitosan decorated sirolimus liposomes. *Carbohydr. Polym.* **157**, 1461–1469 (2017).
11. Haeri, A. *et al.* Sirolimus-loaded stealth colloidal systems attenuate neointimal hyperplasia after balloon injury: A comparison of phospholipid micelles and liposomes. *Int. J. Pharm.* **455**, 320–330 (2013).
12. Haeri, A. *et al.* Physicochemical characteristics of liposomes are decisive for their antirestenosis efficacy following local delivery. *Nanomedicine* **12**, 131–145 (2017).
13. Garg, T. Current nanotechnological approaches for an effective delivery of bio-active drug molecules in the treatment of acne. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **44**, 98–105 (2016).
14. Tabansky, I. *et al.* Advancing drug delivery systems for the treatment of multiple sclerosis. *Immunol. Res.* **63**, 58–69 (2015).
15. Lamy-Freund, M. T. & Riske, K. A. The peculiar thermo-structural behavior of the anionic lipid DMPG. *Chem. Phys. Lipids* **122**, 19–32 (2003).
16. Haeri, A., Alinaghian, B., Daeihamed, M. & Dadashzadeh, S. Preparation and characterization of stable nanoliposomal formulation of fluoxetine as a potential adjuvant

- therapy for drug-resistant tumors. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **13**, 3–14 (2014).
17. Haeri, A. *et al.* Use of remote film loading methodology to entrap sirolimus into liposomes: Preparation, characterization and in vivo efficacy for treatment of restenosis. *Int. J. Pharm.* **414**, 16–27 (2011).
 18. Daeihamed, M., Dadashzadeh, S., Haeri, A. & Akhlaghi, M. Potential of Liposomes for Enhancement of Oral Drug Absorption. *Curr. Drug Deliv.* **13**, 1–1 (2016).
 19. Mallick, S. & Choi, J. S. Liposomes: Versatile and Biocompatible Nanovesicles for Efficient Biomolecules Delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **14**, 755–765 (2014).
 20. Demas, V. & Lowery, T. J. Magnetic resonance for in vitro medical diagnostics: superparamagnetic nanoparticle-based magnetic relaxation switches. *New J. Phys.* **13**, (2011).
 21. Andrade, R. G. D., Veloso, S. R. S. & Castanheira, E. M. S. Shape Anisotropic Iron Oxide-Based Magnetic Nanoparticles: Synthesis and Biomedical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2455 (2020).
 22. De Cuyper, M. & Joniau, M. Magnetoliposomes. Formation and structural characterization. *Eur. Biophys. J.* **15**, 311–319 (1988).
 23. Veloso, S. R. S., Andrade, R. G. D. & Castanheira, E. M. S. Magnetoliposomes: recent advances in the field of controlled drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **18**, 1323–1334 (2021).
 24. Bakandritsos, A., Fatourou, A. G. & Fatouros, D. G. Magnetoliposomes and their potential in the intelligent drug-delivery field. *Ther. Deliv.* **3**, 1469–1482 (2012).
 25. Fattahi, H. *et al.* Magnetoliposomes as multimodal contrast agents for molecular imaging and cancer nanotheragnostics. *Nanomedicine* **6**, 529–544 (2011).
 26. Rodrigues, A. R. O. *et al.* Magnetoliposomes for dual cancer therapy. in *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines* (ed. Elsevier) 489–527 (William Andrew, 2018).
 27. Banno, B. *et al.* The functional roles of poly(ethylene glycol)-lipid and lysolipid in the drug retention and release from lysolipid-containing thermosensitive liposomes in vitro and in vivo. *J. Pharm. Sci.* **99**, 2295–2308 (2010).
 28. Wust, P. *et al.* Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* **3**, 487–497 (2002).
 29. Ta, T. & Porter, T. M. Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy. *J. Control. Release* **169**, 112–125 (2013).
 30. Pereira *et al.* Magnetoliposomes Containing Calcium Ferrite Nanoparticles for Applications in Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **11**, 477 (2019).
 31. Cardoso, B. D. *et al.* Stealth Magnetoliposomes Based on Calcium-Substituted Magnesium Ferrite Nanoparticles for Curcumin Transport and Release. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3641 (2020).
 32. R.K., C., Rajagopalan, V. & Sahu, N. K. Synthesis of manganese doped β -FeOOH and MnFe₂O₄ nanorods for enhanced drug delivery and hyperthermia application. *IET*

Nanobiotechnology **14**, 823–829 (2020).

33. Abbasi Pour, S., Shaterian, H. R., Afradi, M. & Yazdani-Elah-Abadi, A. Carboxymethyl cellulose (CMC)-loaded Co-Cu doped manganese ferrite nanorods as a new dual-modal simultaneous contrast agent for magnetic resonance imaging and nanocarrier for drug delivery system. *J. Magn. Magn. Mater.* **438**, 85–94 (2017).
34. Rodrigues, A. R. O. *et al.* Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs. *RSC Adv.* **6**, 17302–17313 (2016).
35. Tamba, Y., Terashima, H. & Yamazaki, M. A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles. *Chem. Phys. Lipids* **164**, 351–358 (2011).
36. Tanaka, T., Tamba, Y., Masum, S. M., Yamashita, Y. & Yamazaki, M. La³⁺ and Gd³⁺ induce shape change of giant unilamellar vesicles of phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1564**, 173–182 (2002).
37. Valeur, B. *Molecular Fluorescence*. (Wiley, 2001). doi:10.1002/3527600248.
38. Epp, J. X-ray diffraction (XRD) techniques for materials characterization. in *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods* 81–124 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-08-100040-3.00004-3.
39. Kumar, L., Kumar, P., Narayan, A. & Kar, M. Rietveld analysis of XRD patterns of different sizes of nanocrystalline cobalt ferrite. *Int. Nano Lett.* **3**, 8 (2013).
40. Veloso, S. R. S. *et al.* Impact of citrate and lipid-functionalized magnetic nanoparticles in dehydropeptide supramolecular magnetogels: Properties, design and drug release. *Nanomaterials* **11**, 1–21 (2021).
41. Rodrigues, A. R. O. *et al.* Development of multifunctional liposomes containing magnetic/plasmonic MnFe₂O₄/Au core/shell nanoparticles. *Pharmaceutics* **11**, (2019).
42. Pereira, R. B. *et al.* Amino alcohols from eugenol as potential semisynthetic insecticides: Chemical, biological, and computational insights. *Molecules* **26**, 1–20 (2021).
43. Mahto, T. K., Roy, A., Sahoo, B. & Sahu, S. K. Citric Acid Fuctionalized Magnetic Ferrite Nanoparticles for Photocatalytic Degradation of Azo Dye. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **15**, 273–280 (2015).
44. Weddemann, A. *et al.* Review and outlook: From single nanoparticles to self-assembled monolayers and granular GMR sensors. *Beilstein J. Nanotechnol.* **1**, 75–93 (2010).
45. Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L. & Chowdhury, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol. Pharm.* **67**, 217–23 (2010).
46. Moussout, H., Ahlafi, H., Aazza, M. & Maghat, H. Critical of linear and nonlinear equations of pseudo-first order and pseudo-second order kinetic models. *Karbala Int. J. Mod. Sci.* **4**, 244–254 (2018).
47. Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M. & Macheras, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int. J. Pharm.* **309**, 44–50 (2006).