

Universidade do Minho
Escola de Ciências

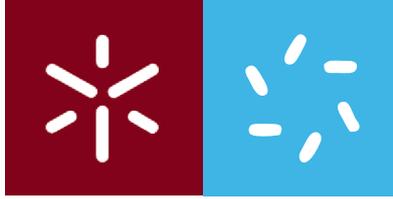
Daniela Sofia Marques Pereira

Nanotransportadores magnéticos de fármacos para aplicação terapêutica no cancro da mama

Daniela Pereira **Nanotransportadores magnéticos de fármacos para aplicação terapêutica no cancro da mama**

UMinho | 2018

Fevereiro de 2018



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Daniela Sofia Marques Pereira

Nanotransportadores magnéticos de fármacos para aplicação terapêutica no cancro da mama

Tese de Mestrado

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação da

Professora Doutora Elisabete Maria dos Santos Castanheira Coutinho

Declaração

Nome: Daniela Sofia Marques Pereira

Cartão de cidadão: 14373984 0 ZZ9

Endereço eletrónico: daniela.s.pereira30@gmail.com

Contato telefónico: 00351 967193556

Título da dissertação de mestrado: “Nanotransportadores magnéticos de fármacos para aplicação terapêutica no cancro da mama”

Orientador: Professora Doutora Elisabete Maria dos Santos Castanheira Coutinho

Designação do mestrado: Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Ano de conclusão: 2018

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

Universidade do Minho, 28/02/2018

Assinatura: _____

Agradecimentos

Na reta final desta etapa tão importante da minha vida académica, gostaria de agradecer às varias pessoas e entidades que tornaram possível este projeto.

Em primeiro lugar, à Doutora Elisabete Coutinho pela orientação, apoio e confiança, pelos ensinamentos e principalmente por me ter dado a oportunidade de desenvolver um tema que me é tão querido.

À Doutora Rita Rodrigues, que foi mais do que uma mentora, transmitindo sempre sua paixão extraordinária pela investigação. Obrigada pelo apoio e por tudo o que me ensinaste.

Ao Doutor Paulo Coutinho por todos os conselhos e ajuda, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Doutora Maria João R. P. Queiroz, do Centro de Química, pela cedência dos compostos antitumorais.

Ao Doutor Ricardo Calhelhas e à Doutora Isabel Ferreira do Centro de Investigação Montanha do Instituto Politécnico de Bragança, pelos testes em linhas celulares.

Aos meus colegas de laboratório pela amizade, apoio e momentos partilhados. Vocês tornaram todos os dias melhores.

Ao Tiago Costa, obrigada pelos conselhos e por me incentivares a dar sempre o meu melhor.

Aos meus amigos que acreditaram sempre em mim, mesmo quando eu duvidava, obrigada por me encorajarem durante este percurso.

Por fim, mas igualmente importante, a toda a minha família. Aos meus avós, que sempre demonstraram um amor incondicional por mim, sinto-me verdadeiramente afortunada por vos ter.

Obrigada mãe e pai, por permitirem que eu concluísse esta etapa da minha vida, por acreditarem em mim e por me ensinarem o valor da perseverança, honestidade e responsabilidade.

À minha irmã, pelo apoio incondicional, por seres um exemplo e por tornares a minha vida melhor. Espero que um dia tenhas tanto orgulho em mim como eu tenho em ti.

Os meus mais sinceros agradecimentos!

“All that is gold does no glitter,
not all those who wander are lost:
the old that is strong does not wither,
deep roots are not reached by the frost.”

J.R.R. Tolkien

The Lord of the Rings

Nanotransportadores magnéticos de fármacos para aplicação terapêutica no cancro da mama

Resumo

Atualmente, o cancro representa um dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial e, apesar dos tratamentos existentes, a sua incidência e mortalidade continuam a aumentar. Isto deve-se, maioritariamente, à resistência ao tratamento, aparecimento de zonas hipóxicas e à falta de especificidade dos agentes quimioterapêuticos. Neste contexto, a aplicação da nanotecnologia à oncologia permite melhorar a eficácia terapêutica dos tratamentos existentes possibilitando, entre outros, aumentar a concentração de fármaco no local de interesse e a oxigenação em zonas hipóxicas do tumor, através de hipertermia mediada por nanopartículas magnéticas.

Neste trabalho, foram desenvolvidos nanotransportadores magnéticos de fármacos, combinando nanopartículas magnéticas com lipossomas (magnetolipossomas). Foram sintetizadas nanopartículas de ferrite de cálcio e de ferrites mistas de cálcio e magnésio através do método de coprecipitação e avaliadas as suas propriedades estruturais, a cristalinidade e as características magnéticas. Através da combinação das nanopartículas com membranas lipídicas, foram formados dois tipos de magnetolipossomas: sólidos e aquosos. Nestes sistemas, foram incorporados novos compostos fluorescentes derivados de tienopiridinas com atividade antitumoral promissora em linhas de cancro da mama. A localização dos compostos nos nanotransportadores foi avaliada por medidas de anisotropia de fluorescência em estado estacionário, sendo que os compostos se localizavam maioritariamente na bicamada lipídica. O estudo preliminar da interação por fusão dos magnetolipossomas com células foi efetuado com recurso a GUVs (vesículas unilamelares gigantes) como modelos de membranas celulares.

Foi possível a encapsulação dos fármacos nos nanotransportadores desenvolvidos, com boas eficiências de encapsulação. A atividade antitumoral dos compostos encapsulados foi preliminarmente avaliada nalgumas linhas celulares, embora os primeiros resultados não se tenham revelado muito promissores. O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de nanotransportadores que aliam as propriedades magnéticas à capacidade de transportar novos compostos antitumorais.

Palavras-Chave: Ferrites de cálcio e magnésio; Magnetolipossomas; Derivados de Tienopiridinas; Cancro da mama.

Magnetic nanocarriers of drugs for therapeutic application in breast cancer

Abstract

Currently, cancer represents one of the world's major public health problems and, despite the existing therapies, its incidence and mortality continue to increase. This is due to resistance to treatment, appearance of hypoxic zones and lack of specificity of the chemotherapeutic agents. In this context, the application of nanotechnology to oncology allows improvement of the therapeutic efficacy of existing treatments allowing, the increase of drug concentration at the site of interest and oxygenation in hypoxic areas of the tumor through magnetic nanoparticles mediated hyperthermia.

In this work, magnetic drug nanocarriers were developed by combining magnetic nanoparticles with liposomes (magnetoliposomes). Nanoparticles of calcium ferrite and mixed calcium and magnesium ferrites were synthesized by the coprecipitation method and evaluated for their structural properties, crystallinity and magnetic characteristics. By combining the nanoparticles with lipid membranes, two types of magnetoliposomes were formed: solid and aqueous. Novel fluorescent compounds derived from thienopyridines and with promising antitumor activity in breast cancer cell lines have been incorporated in these systems. The location of compounds in the nanocarriers was evaluated by steady-state fluorescence anisotropy measurements, compounds being mainly located in the lipid bilayer. Preliminary studies of fusion of magnetoliposomes interaction with cells were performed using fluorescence measurements and GUVs (giant unilamellar vesicles) as models of cell membranes.

It was possible to encapsulate the drugs in the developed nanocarriers, with good encapsulation efficiencies. The antitumor activity of the encapsulated compounds was preliminarily assessed in tumor cell lines, although the first results not being very promising. The general objective of this work was the development of nanocarriers that combine the magnetic properties with the capacity to transport new antitumor compounds.

Keywords: Calcium and magnesium ferrites; Magnetoliposomes, Thienopyridine derivatives; Breast cancer

Conteúdo

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice de figuras.....	xiii
Índice de tabelas.....	xix
Lista de abreviaturas.....	xxi
Capítulo 1 – Introdução.....	3
1.1 Motivação e objetivo.....	3
1.2 Contextualização teórica da dissertação.....	5
1.2.1 Nanotecnologia.....	5
1.2.2 Entrega Controlada de Fármacos.....	6
1.2.3 Direcionamento passivo e ativo.....	13
1.2.4 Nanopartículas magnéticas.....	15
1.2.5 Hipertermia.....	22
1.2.6 Magnetolipossomas.....	24
1.2.7 Terapia anti-angiogénica.....	26
1.3 Referências bibliográficas do capítulo 1.....	30
Capítulo 2 - Técnicas de análise e caracterização.....	41
2.1 Análise por Espectroscopia.....	41
2.1.1 Radiação eletromagnética.....	41
2.2 Espectroscopia de absorção UV-Visível.....	44
2.2.1 Transições eletrônicas.....	44
2.2.2 Lei de Lambert – Beer.....	46
2.2.3 Espectrofotômetro.....	49
2.3 Espectroscopia de fluorescência.....	50

2.3.1 Processos não-radiativos e radiativos.....	51
2.3.2 Rendimento quântico de fluorescência	53
2.3.3 Anisotropia	54
2.3.4 Transferência de energia (FRET)	57
2.2 Difusão Dinâmica de Luz (DLS).....	60
2.3 Difração de Raios-X (XRD)	61
2.4 Microscopia eletrônica	63
2.5 Testes em linhas celulares.....	64
2.6 Referências bibliográficas do capítulo 2.....	66
Capítulo 3 - Procedimento experimental	71
3.1 Preparação das nanopartículas de ferrites mistas de cálcio e magnésio.....	71
3.2 Compostos baseados em diarilureias derivadas de tienopiridinas	73
3.3 Estudo fotofísico dos compostos em solução.....	73
3.4 Rendimento quântico de fluorescência	74
3.5 Preparação dos lipossomas	75
3.6 Estudo fotofísico dos compostos em lipossomas	76
3.7 Medidas de anisotropia.....	76
3.8 Encapsulamento das nanopartículas e compostos em lipossomas.....	77
3.9 Estudos de interação com modelos de membrana celular	77
3.9.1 Interação dos AMLs com modelos de membrana	77
3.9.2 Estudos de interação com modelos membranares por <i>unquenching</i>	79
3.10 Cálculo da eficiência de encapsulação dos compostos	80
3.11 Testes em linhas celulares.....	81
3.12 Referências bibliográficas do capítulo 3.....	82
Capítulo 4 – Resultados e discussão	87
4.1 Caracterização fotofísica e estrutural das nanopartículas	87

4.1.1 Difração de Raios-X.....	87
4.1.2 Espectroscopia de absorção UV-Visível	89
4.1.3 Microscopia eletrônica	90
4.1.4 Propriedades magnéticas.....	90
4.2 Estudo fotofísico dos compostos em vários solventes	91
4.3 Estudo dos compostos em membranas lipídicas	95
4.3.1 Estudos de anisotropia em lipossomas.....	96
4.4 Estudo fotofísico em magnetolipossomas	98
4.4.1 Formação dos magnetolipossomas sólidos.....	98
4.4.2 Caracterização do tamanho dos magnetolipossomas.....	100
4.4.3 Ensaio de fusão com modelos de membrana.....	102
4.4.4 Encapsulamento dos compostos nos magnetolipossomas	105
4.5 Eficiência de encapsulamento.....	108
4.6 Testes em linhas celulares.....	109
4.7 Referências bibliográficas do capítulo 4.....	112
Capítulo 5 – Conclusões e perspectivas futuras	117

Índice de figuras

Figura 1.1 - Taxa de incidência e mortalidade mundiais por cancro estimada (por 100.000 habitantes), em homens e mulheres em 2012. Adaptado de [3].....	3
Figura 1.2 – Nanopartículas para entrega controlada de fármacos. Adaptado de [23].	7
Figura 1.3 - Representação esquemática de um fosfolípido.....	8
Figura 1.4 - Representação esquemática da transição da fase gel para a fase líquido-cristalina. Adaptado de [29].....	9
Figura 1.5 - Tipos de estruturas que se podem formar por métodos de auto-organização.	10
Figura 1.6 - Tipos de lipossomas e comparação de tamanhos.	11
Figura 1.7 - Representação esquemática de um lipossoma para entrega controlada de fármacos. Adaptado de [70].....	12
Figura 1.8 – Tipos de direcionamento. Adaptado de [39].....	13
Figura 1.9 - Representação esquemática da estrutura em espinela. Adaptado de [87].	17
Figura 1.10 - Comportamento magnético de elementos ferromagnéticos e superparamagnéticos na presença de um campo magnético externo. (a) Domínios magnéticos presentes nas partículas com e sem aplicação de um campo magnético externo. (b) Relação entre o tamanho das partículas e domínios magnéticos. D_c - Diâmetro crítico; D_s - Diâmetro a partir do qual ocorre o fenómeno de superparamagnetismo (SPM). Retirado de [64].	20
Figura 1.11 – Comportamento magnético de diferentes tipos de materiais, quando aplicado um campo magnético. O_e - Campo magnético aplicado; M_s - Magnetização de Saturação, M_r - Magnetização remanescente e H_c - Coercividade. Adaptado de [66].....	21
Figura 1.12 - Relação entre os valores de coercividade e o tamanho das partículas. Adaptado de [64].....	21

Figura 1.13 - Benefícios terapêuticos multifatoriais da HT. Adaptado de [71].	23
Figura 1.14 - Efeitos da HT moderada na vasculatura tumoral. Adaptado de [71].	24
Figura 1.15 - Magnetolipossomas sólidos (esquerda) e aquosos (direita).	25
Figura 1.16 – Mecanismo de combinação de entrega controlada de fármacos com hipertermia utilizando magnetolipossomas. Adaptado de [48].	26
Figura 1.17 - Compostos derivados de (1- <i>aril</i> -3-[2-, 3- ou 4-(<i>tieno</i> [3,2- <i>b</i>]piridin-7-iltio)fenil]ureias) com base em <i>tieno</i> [3,2- <i>b</i>]piridina-7-tioéter-1,3-diarilureas. Composto 1- esquerda, composto 2- direita.	27
Figura 1.18 - Comparação entre uma rede vascular normal (a), uma rede vascular típica de tumores (b), a normalização da vasculatura que ocorre após o tratamento com inibidores de VEGRF- 2 (c) e rede vascular após o final da terapia antiangiogénica (d). Adaptado de [81].	28
Figura 2.1 – Oscilações dos campos elétrico (vermelho) e magnético (azul) de radiação eletromagnética polarizada. Adaptado de [2].	42
Figura 2.2 – Espectro da radiação eletromagnética, onde estão definidos os limites entre cada uma das regiões do espectro e os comprimentos de onda correspondentes. Adaptado de [2].	43
Figura 2.3 - Níveis de energia de uma molécula.	45
Figura 2.4 - Transições eletrónicas entre orbitais moleculares. Adaptado de [4].	46
Figura 2.5 - Feixe de radiação eletromagnética a atravessar uma solução. Na imagem estão representadas as intensidades do feixe incidente (I_0) e o feixe transmitido (I), a concentração da espécie absorvente no meio (c), o percurso ótico da radiação (ℓ) e o coeficiente de absorção molar (ϵ).	47
Figura 2.6 - Representação esquemática dos componentes essenciais de um espectrofotómetro de feixe duplo utilizado no decorrer deste trabalho.	50

Figura 2.7 - Configurações eletrônicas para o estado singuleto (a), estado singuleto excitado (b) e estado tripleto (c).....	50
Figura 2.8 - Representação gráfica do desvio de Stokes. Adaptado de [2].	51
Figura 2.9 - Diagrama de níveis de energia para uma molécula, mostrando os processos de perda de energia radiativos e não radiativos: vr: relaxamento vibracional; ic: conversão interna; ec: conversão externa; isc: cruzamento intersistemas; S ₀ : estado fundamental; S ₂ , S ₁ : estados singuletos excitados; T ₁ : estado tripleto excitado. Adaptado de [2].	53
Figura 2.10 - Planos de propagação de ondas de luz polarizada e não polarizada.	54
Figura 2.11 - Fotoseleção provocada por excitação com luz polarizada.	55
Figura 2.12 - Ilustração da sobreposição dos espectros de emissão do doador e de absorção do aceitante. Adaptado de [7].	57
Figura 2.13 – Representação esquemática de um espectrofluorímetro.	59
Figura 2.14 – Movimento browniano de partículas em solução. Relação entre velocidade e tamanho das partículas. Adaptado de [13].	60
Figura 2.15 - Estrutura da Sulforodamina B.....	64
Figura 3.1 – Diagrama de fluxo do processo de síntese das nanopartículas por coprecipitação. 72	
Figura 3.2 - Estrutura dos compostos utilizados no estudo.....	73
Figura 3.3 - Estrutura dos marcadores fluorescentes e sobreposição espectral.	78
Figura 3.4 - Interação com modelos membranares por FRET.....	79
Figura 3.5 – Estrutura da sonda NBD-C ₁₂ -HPC e interação dos SMLs com modelos membranares por unquenching.	79
Figura 3.6 – Ilustração representativa do resultado obtido após a centrifugação dos Magnetolipossomas. A- Composto encapsulado; B- Composto não encapsulado. Adaptado de [19].	80

Figura 4.1 - Difratoogramas de XRD obtidos para a $Mg_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ (a) e às ferrites de magnésio $CaFe_2O_4$ (b).	88
Figura 4.2 - Espectros de absorção das nanopartículas sintetizadas.	89
Figura 4.3 - Imagens de TEM das nanopartículas sintetizadas: A: $CaFe_2O_4$; B: $Mg_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$	90
Figura 4.4 - Comportamento magnético das nanopartículas de ferrite de cálcio ($CaFe_2O_4$) na presença (esquerda) e ausência (direita) de um campo magnético.	91
Figura 4.5 - Espectros de absorvância do composto 1 em solução (10^{-5} M) em vários solventes.	92
Figura 4.6 - Espectros de absorvância do composto 1 em solução (10^{-5} M) em vários solventes.	92
Figura 4.7 - Espectros de fluorescência do composto 1 em solução (10^{-5} M) em etanol, diclorometano, acetonitrilo e acetato de etilo, como exemplos.	93
Figura 4.8 - Espectros de fluorescência do composto 2 em solução (10^{-5} M) em etanol, diclorometano, clorofórmio, acetonitrilo, acetato de etilo e água.	93
Figura 4.9 - Espectros de fluorescência normalizados do composto 2 (5×10^{-6} M) em membranas lipídicas (10^{-3} M) de DODAB, DPPC, Egg-PC e Egg-PC: Colesterol, à temperatura de 25 °C e 55 °C.	95
Figura 4.10 - Esquema de um magnetolipossoma sólido marcado com as sondas.	98
Figura 4.11 - Espectros de fluorescência ($\lambda_{exc}=470$ nm, sem excitação da rodamina) de SMLs contendo apenas NBD- C_{12} -HPC e contendo ambos os lípidos NBD- C_{12} -HPC e Rh-DOPE, contendo as nanopartículas de ferrite de cálcio.	99
Figura 4.12 - Espectros de fluorescência ($\lambda_{exc}=470$ nm, sem excitação da rodamina) de SMLs contendo apenas NBD- C_{12} -HPC e contendo ambos os lípidos NBD- C_{12} -HPC e Rh-DOPE, contendo as nanopartículas ferrites mistas de cálcio e magnésio.	99
Figura 4.13 - Medidas de DLS para os AMLs com nanopartículas de $CaFe_2O_4$	101

Figura 4.14 - Medidas de DLS para os AMLs com nanopartículas de ferrites $Mg_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$.	101
Figura 4.15 - Espectros de fluorescência ($\lambda_{exc} = 440 \text{ nm}$) de AMLs de Egg-PC marcados com curcumina e Nile Red contendo nanopartículas de $CaFe_2O_4$, antes e depois da sua interação com GUVs.....	103
Figura 4.16 - Espectros de fluorescência ($\lambda_{exc} = 440 \text{ nm}$) de AMLs de Egg-PC marcados com Curcumina e Nile Red contendo nanopartículas de $Mg_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$, antes e após sua interação com GUVs.	103
Figura 4.17 – Espectro de fluorescência dos SMLs com nanopartículas de ferrites de cálcio marcadas com NBD- C_{12} -HPC ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$) antes e após interação com os modelos de membrana (GUVs).....	105
Figura 4.18 - Comparação de espectros de fluorescência do composto 1 ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) em lipossomas de Egg-PC (10^{-3} M), magnetolipossomas aquosos de Egg-PC e magnetolipossomas sólidos de DPPC contendo nanopartículas de $Ca_{0.5}Mg_{0.5}Fe_2O_4$. $\lambda_{exc}=260 \text{ nm}$	106
Figura 4.19 - Comparação de espectros de fluorescência do composto 2 ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$) em lipossomas de Egg-PC (10^{-3} M), magnetolipossomas aquosos de Egg-PC e magnetolipossomas sólidos de DPPC. $\lambda_{exc}=260 \text{ nm}$	106
Figura 4.20 - Atividade dos compostos antitumorais 1 e 2 na inibição do crescimento de diferentes linhas de células; NCI-H460 (cancro do pulmão células de não-pequenas), HepG2 (cancro hepático), adenocarcinoma da mama (MCF-7), HeLa (carcinoma cervical) e células primárias de fígado porcino (PLP2).	110

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Atividade dos compostos antitumorais 1 e 2 na inibição do crescimento de diferentes linhas de células tumorais; adenocarcinoma (MCF-7) e células de cancro da mama altamente metastáticas hormono-independentes (MDA-MD-231).....	28
Tabela 3.1 – Componentes utilizados para a síntese por coprecipitação e respectivas quantidades (m) e a sua concentração final (C_f).....	72
Tabela 3.2 – Fornecedores dos solventes e valores de <i>cut-off</i> dos mesmos.....	74
Tabela 3.3 – Lípidos utilizados na formulação de lipossomas, descrição das soluções stock dos mesmos e fornecedores.	75
Tabela 4.1 - Comprimentos de onda máximos de absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{em}), coeficiente de absorção molar (ϵ) e rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) para os compostos 1 e 2 em vários solventes.	94
Tabela 4.2 - Eficiências de FRET (Φ_{FRET}), Raio de Förster (r_0) e distâncias doador-aceitador (r) dos ensaios de formação da dupla camada lipídica em magnetolipossomas sólidos.	100
Tabela 4.3 - Diâmetro dos AMLs, adquiridos a partir de medidas de DLS e respetivos desvios padrão (σ) e valores de polidispersividade.....	102
Tabela 4.4 - Valores de anisotropia de fluorescência dos compostos e valores de comprimentos de emissão máximos dos compostos em magnetolipossomas sólidos e aquosos com diferentes composições abaixo (25 °C) e acima da temperatura de transição (55 °C).	107
Tabela 4.5 - Eficiências de encapsulamento (EE%) dos compostos em magnetolipossomas contendo nanopartículas de $CaFe_2O_4$ (σ : desvio padrão).	108
Tabela 4.6 – Atividade dos compostos antitumorais 1 e 2 na inibição do crescimento de diferentes linhas de células; NCI-H460 (cancro do pulmão células de não-pequenas), HepG2 (cancro	

hepático), adenocarcinoma da mama (MCF-7), HeLa (carcinoma cervical) e células primárias de fígado porcino (PLP2). 109

Lista de abreviaturas

AMLs – Magnetolipossomas Aquosos

DLS – Difusão dinâmica de Luz

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DODAB – Brometo de dioctadecildimetilamônio

DPPE –Dipalmitoilfosfatidilcolina

DRX – Difração de Raios-X

EE – Eficiência de Encapsulamento

EPR – Efeito de permeabilidade e retenção

FBS – Sêrum fetal bovino

FRET – Transferência de energia por ressonância de Förster

GUV – Vesículas unilamelares gigantes

HRTEM – Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução

HT – Hipertermia

LUV – Vesículas unilamelares grandes

MHF – Hipertermia magnética de fluídos

MLV – Vesículas multilamelares

MRI – Ressonância magnética

MVV – Vesículas multivesiculares

NBD – Nitrobenzoxadiazole

NPs – Nanopartículas

NT– Nanotecnologia

QT – Quimioterapia

RT – Radioterapia

SEM – Microscópio eletrônico de varrimento

SMLs – Magnetolipossomas sólidos

SRB – Sulfrodamina B

SUV – Vesículas unilamelares pequenas

T_c – Temperatura de Curie

TEM – Microscopio eletrônico de transmissão

T_m – Temperatura de transição

ULV – Vesículas unilamelares

USA – Estados Unidos da América

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-2 – Recetor do fator de crescimento endotelial vascular-2

Capítulo 1

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Motivação e objetivo

As palavras cancro, tumor e neoplasia, são termos genéricos que definem um amplo conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada de células de um determinado tecido ou órgão. Devido à elevada taxa de divisão, estas células podem invadir o tecido adjacente ou disseminar-se à distância, num processo conhecido como metastização [1].

Atualmente, o cancro representa o maior problema de saúde pública e a segunda causa de morte a nível mundial, sendo estimados mais de um milhão de novos casos nos USA em 2017, resultando em cerca de 600 mil mortes [2]. Em 2012 foram registados cerca de 14 milhões de novos casos e cerca de 8 milhões de mortes devido ao cancro a nível mundial [1,3].

Na figura 1.1 estão representadas as taxas de incidência e mortalidade de doenças do foro oncológico por sexo, a nível mundial. Através da figura, é possível observar que as maiores taxas de incidência e mortalidade no sexo masculino se encontram nos casos de cancro do pulmão, próstata e colorretal, enquanto que no sexo feminino o cancro de mama, colorretal e pulmão representam as patologias com maior incidência e mortalidade.

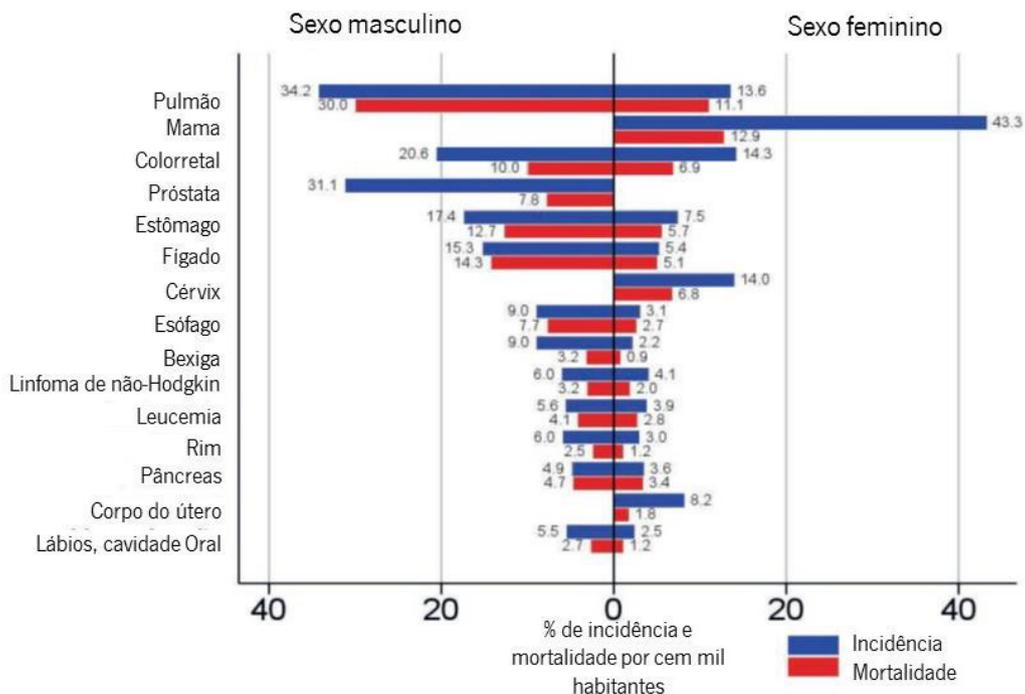


Figura 1.1 - Taxa de incidência e mortalidade mundiais por cancro estimada (por 100.000 habitantes), em homens e mulheres em 2012. Adaptado de [3].

Apesar de não haver um esquema de tratamento padrão adotado, a maioria dos doentes é, geralmente, submetida aos tratamentos primários: radioterapia (RT), quimioterapia (QT) e cirurgia. A hipertermia (HT) apresenta-se como um tratamento maioritariamente utilizado em conjunto com a QT e RT, no entanto, esta também pode ser aplicada de forma isolada. Embora existam ensaios clínicos com resultados promissores [4], ainda há ceticismo quanto à utilização da hipertermia, ainda que esta seja a única terapia capaz de combater diretamente o microambiente tumoral desfavorável (zonas hipóxicas) [5].

A utilização destes tratamentos pode ser realizada de forma individual ou combinada, sendo que o esquema em que são administrados depende do estágio da doença, da biologia tumoral e da condição geral de saúde do doente. Apesar de relativamente eficazes, estes tratamentos apresentam efeitos secundários associados que podem diminuir a qualidade de vida do doente e, em alguns casos, levar à interrupção do tratamento. Deste modo, a utilização de nanotecnologia (NT) irá permitir melhorar o rácio terapêutico dos tratamentos já existentes, combinando assim as vantagens dos mesmos e diminuindo, ao mesmo tempo os efeitos secundários associados.

Apesar das aplicações variadas na medicina, a nanotecnologia tem tido um papel particularmente importante na entrega controlada de fármacos através de sistemas de encapsulamento de dimensões nanométricas. Sendo umas das patologias mais comuns atualmente, o tratamento do cancro tem sido propósito de várias investigações no campo da nanomedicina.

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de nanossistemas biocompatíveis (magnetolipossomas) que permitam o transporte de fármacos antiangiogénicos ao local de interesse, agindo também como sistemas agentes de hipertermia magnética, por ação de nanopartículas magnéticas de ferrite de cálcio e ferrites mistas de cálcio e magnésio. Estes nanossistemas irão atuar como agentes para terapia dual (QT + HT), podendo também ser uma vantagem para a radioterapia, devido ao período de normalização da vasculatura que ocorre após a administração deste tipo de fármacos, onde a radioterapia é mais eficaz, devido à diminuição significativa da hipoxia [6]. Após a caracterização dos nanossistemas anteriormente referidos, serão feitos estudos em linhas celulares, de modo a verificar se o potencial antitumoral dos fármacos se mantém quando encapsulados em magnetolipossomas.

Esta dissertação de mestrado é composta por cinco capítulos. No capítulo 1 serão explicadas a motivação e a organização do trabalho desenvolvido, seguidas da contextualização

teórica desta dissertação onde se irá dar destaque à utilização de nanossistemas para a entrega controlada de fármacos. No capítulo 2 serão descritas as técnicas de análise e caracterização utilizadas no decorrer desta dissertação, que permitiram o estudo dos nanossistemas desenvolvidos. No capítulo 3 irá ser dado destaque ao procedimento experimental realizado ao longo da dissertação, assim como as técnicas para o seu estudo. No capítulo 4, são apresentados os resultados experimentais obtidos e discutidos com base na bibliografia existente e nos conhecimentos teóricos adquiridos. No capítulo 5 são apresentadas as principais conclusões do trabalho e perspectivas futuras.

A referenciação bibliográfica segue as regras do *IEEE Editorial Style Manual*.

1.2 Contextualização teórica da dissertação

1.2.1 Nanotecnologia

O conceito de nanotecnologia foi inicialmente utilizado por Richard Feynman, em 1959 durante a sua palestra intitulada “*There’s plenty of room at the bottom*”, propondo a possibilidade de manipular átomos individuais de modo a criar estruturas com características de interesse. Em 1996, o Nobel da Química Richard E. Smalley afirmou que, brevemente, seria possível construir estruturas átomo a átomo, reforçando assim a ideia da manipulação de estruturas à escala molecular inicialmente concebida por Feynman [7]. A palavra nanotecnologia tem origem no termo grego “nano”, que significa anão e refere-se à produção, manipulação, síntese e aplicação de materiais e estruturas à escala nanométrica, ou seja, até 100 nanómetros (nm) [8,9]. A esta escala, as propriedades da matéria alteram-se, sendo que as leis da física quântica passam a vigorar relativamente às da física clássica, o que permite a criação de novas estruturas com propriedade distintas dos materiais *bulk*. A nanotecnologia apresenta-se como uma ciência multidisciplinar que combina matérias como física do estado sólido, química, engenharia, ciência dos materiais e biologia molecular, esta permitiu o avanço de vários campos, tais como produção, conversão e armazenamento de energia [10], cosmética [11], aumento da produção agrícola [12], indústria alimentar [13], tratamento de águas [14], construção [15], medicina [16] e eletrónica [17].

A evolução da nanotecnologia permitiu o aparecimento de um novo conceito, a

nanomedicina, que utiliza ferramentas moleculares para procedimentos de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças (por exemplo, cancro) ou traumas [9]. Tal como a nanotecnologia, a definição de nanomedicina não é consensual, devido ao facto de muitos dos processos da biologia acontecerem naturalmente à nanoescala. Os seus objetivos são comuns aos da medicina, sendo estes o diagnóstico precoce, o tratamento de patologias minimizando os efeitos secundários e o *follow-up* não invasivo e eficaz [18]. A nanotecnologia apresenta inúmeras vantagens quando aplicada na medicina, oferecendo não só melhorias nas técnicas já existentes, como também a possibilidade de desenvolvimento de novas técnicas com eficácia superior através da manipulação de fármacos à escala molecular, alterando desta forma as suas propriedades fundamentais, tal como a sua solubilidade e permeabilidade membranar e permitindo a sua libertação controlada por estímulos externos [18]. A nanotecnologia pode ser aplicada em inúmeros campos da medicina, tais como imagiologia [19], entrega controlada de fármacos [20], sequenciação de DNA [21] e engenharia de tecidos [22].

1.2.2 Entrega Controlada de Fármacos

Nos últimos anos, a entrega controlada de fármacos tornou-se cada vez mais importante devido às vantagens que esta pode trazer à indústria farmacêutica e tratamento de doenças [23]. Os sistemas de entrega de fármacos a locais específicos emergiram como uma abordagem para superar a falta de especificidade dos agentes citotóxicos convencionais [24].

Com o avanço da nanotecnologia, surgiram novos sistemas para entrega de fármacos que permitiram minimizar tanto a dose de fármaco administrada ao paciente, como também os efeitos secundários associados aos tratamentos convencionais. Esta redução deve-se à libertação localizada do fármaco na zona a tratar através dos sistemas de entrega controlada de fármacos [16,23,25]. Este tipo de sistemas tem a capacidade de melhorar as propriedades dos fármacos e a sua farmacocinética, dependendo da utilização pretendida [16,23]. Por outro lado, a utilização de nanossistemas para entrega controlada de fármacos permite, devido ao seu tamanho reduzido passar despercebido ao sistema imunitário, ultrapassar determinadas barreiras biológicas, tal como a barreira hematoencefálica [23]. Os nanossistemas podem ser conduzidos ao local de interesse a partir de estratégias de direcionamento passivo ou ativo. Estas estratégias visam o aumento da concentração de fármaco nas células alvo e a redução da toxicidade dos tecidos

saudáveis/sistêmica [16,24].

Existem vários tipos de nanossistemas, que podem ser aplicados para entrega de fármacos, entre os quais as nanopartículas (NPs) e os nanotransportadores de base lipídica (figura 1.2). Atualmente, definem-se nanopartículas como sendo estruturas inferiores a 100 nm em pelo menos numa dimensão. Estas possuem um grande potencial como transportadores de moléculas bioativas, devido ao seu tamanho reduzido. As nanopartículas apresentam propriedades físico-químicas e biológicas únicas, que as tornam promissoras para aplicações biomédicas [26,27]. O primeiro artigo que visava a aplicação das nanopartículas para fins terapêuticos foi publicado em 1976 por Peter Speiser, com o objetivo de desenvolver nanopartículas para vacinação [27].

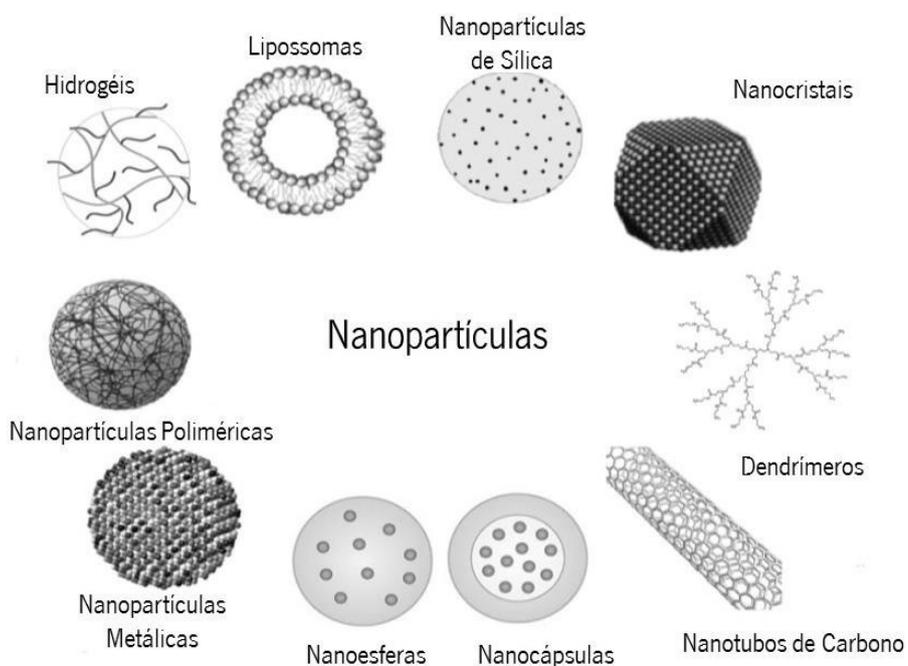


Figura 1.2 – Nanopartículas para entrega controlada de fármacos. Adaptado de [23].

As nanopartículas podem aumentar a concentração intracelular de fármacos em células alvo, evitando a toxicidade em células normais. Além disso, quando as nanopartículas se ligam a recetores específicos e entram na célula, são geralmente envolvidas por endossomas via endocitose mediada pelo recetor, evitando assim o reconhecimento por parte da glicoproteína-P

[24]. Idealmente, as nanopartículas utilizadas em aplicações médicas devem ser biocompatíveis e não tóxicas.

Os efeitos indesejáveis que podem surgir da aplicação de nanopartículas dependem do diâmetro hidrodinâmico, forma, de grupos químicos à superfície, via de administração e tempo de permanência na corrente sanguínea. No que diz respeito ao tamanho, nanopartículas de pequenas dimensões apresentam uma maior área de superfície, sendo mais reativas e, conseqüentemente, mais tóxicas. Desta forma, nanopartículas com um diâmetro hidrodinâmico de 10 a 100 nm são ideais para aplicações *in vivo* [26].

Embora as nanopartículas ofereçam muitas vantagens como sistemas de entrega controlada de fármacos, ainda há muitas limitações a serem resolvidas, como baixa biodisponibilidade após administração oral, instabilidade em circulação, distribuição inadequada em tecidos não-alvo, toxicidade e bioacumulação em órgãos como o fígado e o baço [24].

Outro tipo de nanossistemas extremamente estudados são as estruturas de base lipídica. Estas são, na sua maioria, constituídas por fosfolípidos (figura 1.3), que devido às suas características únicas, sofrem o processo de auto-organização quando se encontram num meio aquoso, formando automaticamente estruturas organizadas. Os fosfolípidos são moléculas anfipáticas/ anfífilicas que têm uma cabeça polar que possui um grupo fosfato - extremidade hidrofílica - e cadeias hidrocarbonadas derivadas de ácidos gordos- extremidade hidrofóbica.

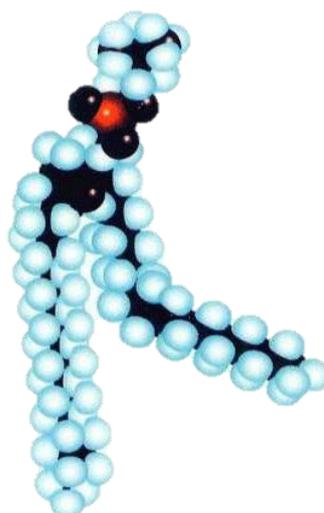


Figura 1.3 - Representação esquemática de um fosfolípido.

Em geral, o comportamento estrutural e dinâmico de moléculas lipídicas em sistemas organizados é afetado por vários fatores, tais como a hidratação, a temperatura e o comprimento da cadeia hidrocarbonada [28]. Cada fosfolípido possui características específicas, tal como a carga e a temperatura de transição de fase (T_m). A temperatura de transição de fase define-se como a temperatura em que a estrutura lipídica passa da fase gel (fase mais organizada e com menor liberdade de movimentos) para a fase líquido-cristalina (fase mais fluida, menos organizada). A temperatura de transição depende do comprimento das cadeias hidrocarbonadas e do grau de hidratação das mesmas [28]. Dependendo da temperatura do meio, um lípido pode estar na fase gel (abaixo da T_m) ou na fase líquido-cristalina (acima da T_m). Quando o lípido se encontra na fase gel, os seus movimentos são mais limitados e as cadeias hidrocarbonadas encontram-se na chamada fase ordenada, se pelo contrário a temperatura do meio onde o lípido se encontra inserido for acima da sua T_m , não ocorre tanta restrição aos movimentos da extremidade hidrofóbica dos lípidos (figura 1.4).

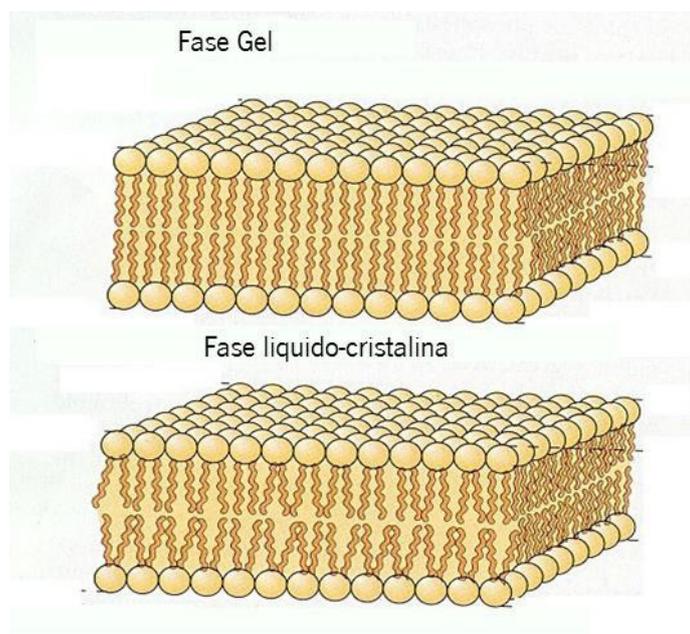


Figura 1.4 - Representação esquemática da transição da fase gel para a fase líquido-cristalina. Adaptado de [29].

A estrutura química do grupo polar dos fosfolípidos determina a sua carga. Na maioria dos valores de pH do meio, o fosfato é carregado negativamente. No entanto, dependendo dos restantes elementos, este pode possuir carga neutra, carga negativa (aniónica), carga positiva

(catiónica) ou pode ser zwitteriónico (possui a carga negativa e carga positiva em diferentes átomos).

O facto de os lípidos serem moléculas anfífilas permite aos mesmos formar estruturas organizadas por processos denominados de auto-organização, do inglês *self-assembly*. Enquanto organizações individuais, os lípidos são estruturas químicas mantidas por ligações covalentes; no entanto as estruturas formadas por estes são mantidas por ligações não-covalentes. A formação destas estruturas resulta de uma combinação das propriedades anfipáticas dos lípidos e do chamado efeito hidrofóbico, que explica a tendência de as moléculas não polares formarem estruturas organizadas em meios aquosos.

Quando presentes num meio aquoso, os lípidos, que possuem uma porção hidrofóbica (cadeias hidrocarbonadas) e uma porção hidrofílica, estão em conflito químico entre si e determinam as regras para a sua organização neste meio, devido ao efeito hidrofóbico [29]. Dependendo da natureza do lípido em questão, este pode formar estruturas distintas: micelas, bicamadas lipídicas ou lipossomas (figura 1.5).

As micelas são estruturas coloidais com um centro hidrofóbico, onde estão localizadas as caudas hidrocarbonadas, rodeadas pelas cabeças polares. As moléculas anfipáticas que possuem um grupo polar e apenas uma cauda hidrocarbonada tem mais tendência para formar micelas [29,30].

A bicamada lipídica, também chamada fase lamelar, consiste na orientação dos lípidos segundo lamelas, com a sua fase polar (hidrofílica) voltada para o meio aquoso, nas duas faces e a sua porção hidrofóbica localizada no interior.

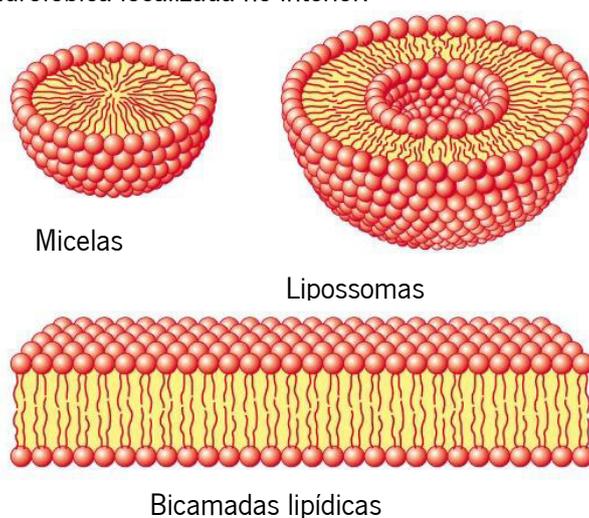


Figura 1.5 - Tipos de estruturas que se podem formar por métodos de auto-organização.

1.2.2.1 Lipossomas

Os lipossomas são definidos como vesículas originadas pelo processo de auto-organização até 1000 nm [16,31]. Estes podem ser classificados de acordo com o número de lamelas que o constituem e com o seu tamanho (figura 1.6). Tendo em conta estas características estes podem ser definidos como Vesículas Multivesiculares (MVV - *Multivesicular vesicles*), que consistem numa vesícula externa com várias vesículas de menores dimensões no seu interior, vesículas multilamelares (MLV - *Multilamellar vesicles*), que compreendem várias bicamadas lipídicas concêntricas (100-1000 nm) e vesículas unilamelares (ULV - *Unilamellar vesicles*), que possuem apenas uma bicamada lipídica em forma esférica no seu exterior. As últimas, podem ser classificadas segundo o seu tamanho, sendo que, quando o seu diâmetro não excede 100 nm estas são chamadas de vesículas unilamelares pequenas (SUV - *Small unilamellar vesicles*), até aos 1000 nm, consideram-se vesículas unilamelares grandes (LUV - *Large unilamellar vesicles*) ou vesículas unilamelares gigantes (GUV - *Giant unilamellar vesicles*) cujo diâmetro pode ir até vários micrómetros [32].

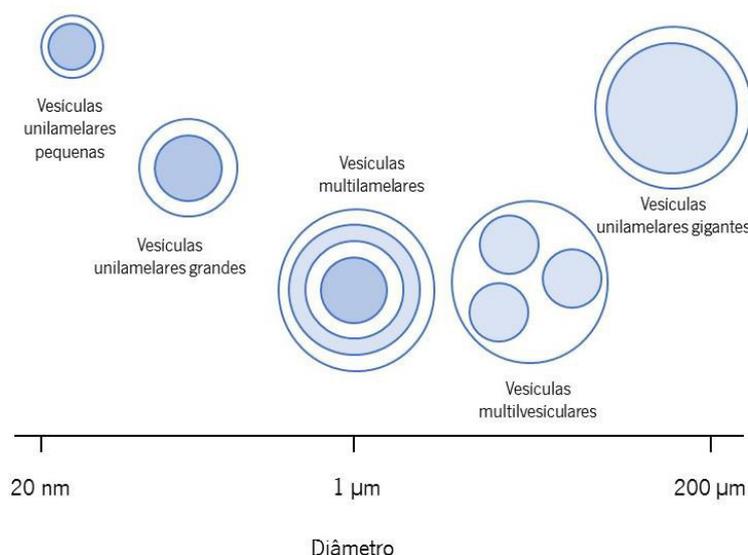


Figura 1.6 - Tipos de lipossomas e comparação de tamanhos.

A adição de moléculas bioativas em transportadores inertes e não tóxicos, juntamente com ligandos específicos do local para entrega localizada e controlada de fármacos *in vivo*, constitui uma abordagem promissora que tem como objetivo melhorar o efeito terapêutico dos fármacos, reduzir a dose administrada e, conseqüentemente, reduzir os efeitos secundários associados a

estes. Nos últimos anos, foram desenvolvidas estratégias que visam melhorar a eficácia e biodisponibilidade de fármacos, através do desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos, produzidos devido ao avanço da nanotecnologia [33]. Devido às suas características vantajosas, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, possibilidade de encapsulamento e retenção de fármacos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos, os lipossomas têm vindo a ser amplamente estudados. As propriedades deste tipo de transportadores podem ser facilmente modificadas através da adição de agentes à membrana lipídica ou pela alteração da composição química da superfície (figura 1.7).

O tamanho, carga, aumento da acumulação no tecido alvo e da internalização celular são exemplos de características facilmente manipuláveis neste tipo de transportadores [34,35]. A preparação de lipossomas foi reportada pela primeira vez pelo Prof. A. D. Bangham em 1965. No entanto, foi Gregory Gregoriadis que estabeleceu o conceito de encapsulamento dos fármacos nos mesmos [33,36]. Desde daí, os lipossomas têm vindo a ser descritos como o sistema ideal de nanoencapsulamento devido à sua capacidade de transportar compostos ultrapassando os problemas associados a outros sistemas, tais como a farmacocinética, estabilidade *in vivo* e a toxicidade. Este tipo de nanossistemas tem vindo a ser utilizado em várias formulações já comercializadas ou em fase de testes clínicos, com o objetivo de tratar várias patologias, destacando-se o tratamento do cancro. No entanto, este sistema apresenta ainda alguns problemas para aplicação *in vivo*, devido ao facto de não ser possível o direccionamento por estímulo externo do mesmo ao local de interesse para a libertação do fármaco e o seu possível reconhecimento pelo sistema imunitário.

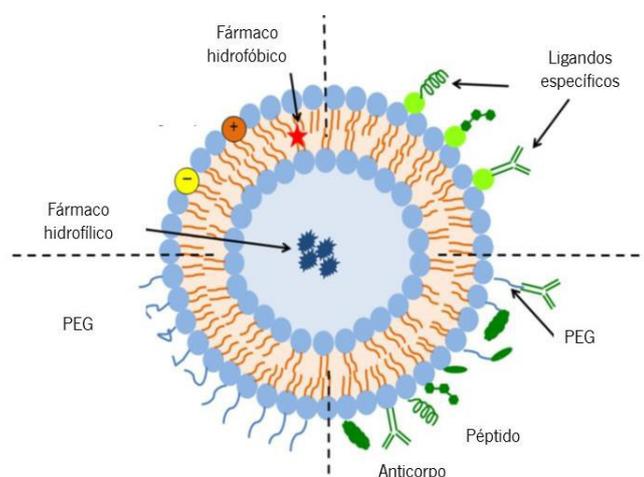


Figura 1.7 - Representação esquemática de um lipossoma para entrega controlada de fármacos. Adaptado de [70].

1.2.3 Direcionamento passivo e ativo

Geralmente, os fármacos utilizados na terapia são administrados sistemicamente, o que provoca efeitos secundários associados em tecidos saudáveis. Desta forma, torna-se necessário a diminuição das concentrações de fármaco, sem comprometer a dose terapêutica no local de interesse. Com o avanço do estudo da biologia tumoral, genética e nanotecnologia, a medicina tornou-se individualizada, sendo que, com os progressos observados, tornou-se possível abordar a variabilidade de respostas a terapêuticas entre doentes e entre tumores. Compreender os processos biológicos envolvidos na distribuição e retenção dos nanotransportadores nos tumores é, portanto, essencial para abordagens de medicina individualizada [37]. Por direcionamento de moléculas bioativas, normalmente consideramos o aumento da concentração destas na área de interesse, em comparação com outros tecidos e órgãos, mediada por sistemas de direcionamento [39]. A maioria dos autores considera dois tipos de direcionamento: direcionamento passivo e ativo (figura 1.8). Enquanto que o primeiro tira proveito das características únicas da fisiopatologia tumoral de modo a conduzir os nanotransportadores ao local de interesse sem qualquer estímulo ou ligando, o segundo considera a utilização de moléculas ou ligandos específicos para a condução do nanossistema ao local de interesse.

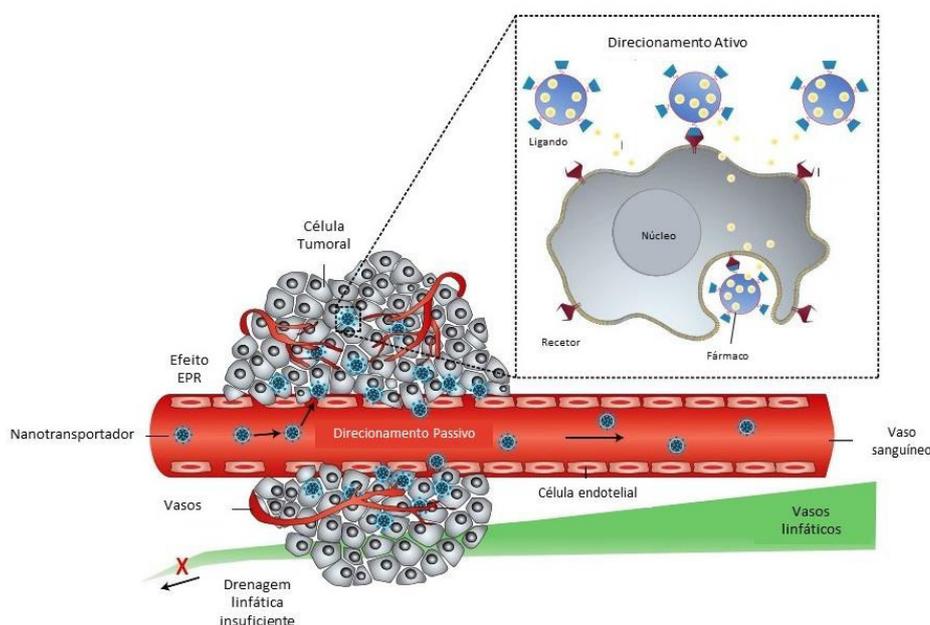


Figura 1.8 – Tipos de direcionamento. Adaptado de [39].

Embora a maioria dos sistemas sejam concebidos para utilizar o direcionamento ativo de modo a chegar ao local de interesse, é o direcionamento passivo que ocorre em primeiro lugar quando o nanossistema se encontra em circulação.

1.2.3.1 Direcionamento Passivo

O direcionamento passivo depende da dimensão dos nanotransportadores, sendo que, se estes possuírem tamanho suficientemente pequeno, ocorre o seu extravasamento da circulação através de defeitos vasculares tipicamente presentes nos locais tumorais, devido à angiogénese acelerada [16,34,40]. Este efeito de direcionamento passivo é, também, dependente do grau de vascularização do tumor, da porosidade dos vasos tumorais e, caso esta se verifique, do tamanho dos poros (que variam com o tipo e o estado do tumor). Estas características, juntamente com o facto de a drenagem linfática ser insuficiente na região tumoral, resultam num fenómeno conhecido como o aumento da permeabilidade e efeito de retenção (EPR, do inglês *enhanced permeability and retention*) [34,40].

O direcionamento passivo consiste na injeção sistémica dos nanotransportadores que se vão acumular preferencialmente no local de interesse devido ao efeito EPR. Este efeito foi inicialmente descrito por Matsumura e Maeda em 1986, e tem sido extremamente investigado por diversos autores. O efeito EPR tem como fundamento o facto de os tumores possuírem uma rede vascular extremamente desorganizada, cujos vasos se apresentam dilatados e com lacunas [37,41,42].

Com o desenvolvimento do tumor, será necessário estender a sua rede vascular, de modo a suprir oxigénio e nutrientes suficientes para suportar este crescimento. Desta forma, os tumores produzem fatores de crescimento que permitem a criação de novos vasos a partir dos capilares pré-existentes. Este processo é chamado de angiogénese e promove o aparecimento de uma nova rede vascular desorganizada, formada por vasos dilatados cujo epitélio apresenta lacunas de tamanho entre os 200 e os 2000 nm [37,42].

A drenagem linfática tem como objetivo principal a renovação do tecido intersticial. No entanto, devido ao facto de esta ser diminuta em tecidos tumorais, não ocorrerá esta renovação, sendo que, desta forma os nanotransportadores poderão ficar retidos no local de interesse [37,41]. É necessário que os nanossistemas se mantenham em circulação o tempo suficiente para que este efeito ocorra e possuam tamanhos adequados (entre os 40-50 nm a 200 nm), de modo a

conseguirem passar pelas lacunas dos vasos do tumor e, desta forma, chegar ao local de interesse sem serem eliminados do organismo prematuramente [38,41,42]. As maiores desvantagens deste tipo de direcionamento são o facto de muitas vezes, não ser possível atingir as concentrações dos nanossistemas necessárias para um efeito terapêutico e também, em alguns casos, os tumores não apresentarem as lacunas nos vasos [37,38].

1.2.3.2 Direcionamento Ativo

O direcionamento ativo consiste na utilização de mecanismos para aumentar a especificidade do transportador para o local de interesse. Uma das maneiras mais eficazes de melhorar a especificidade de um nanotransportador passa pelo aumento da afinidade deste para o alvo, através da ligação de uma molécula com a capacidade de reconhecer e ligar-se ao tecido alvo [38]. Estes ligandos podem ser anticorpos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, açúcares ou até vitaminas, e vão interagir com diferentes recetores, como proteínas ou lípidos presentes na superfície das células do tecido alvo [37]. Um dos ligandos mais estudados é o folato, cujo recetor é sobreexpresso em células de vários tipos de tumores, como osteossarcomas, linfoma de não-Hodgkin, entre outros [42]. O maior desafio do direcionamento ativo é a escolha do agente de direcionamento, de modo a evitar toxicidade para células saudáveis. Um outro tipo de direcionamento ativo é o chamado direcionamento físico, que consiste na utilização de estímulos externos para conduzir o nanossistema ao local de interesse [43]. Este direcionamento é especialmente importante quando nos referimos a nanopartículas magnéticas ou magnetolipossomas, que podem ser guiados ao local de interesse através de um campo magnético externo.

1.2.4 Nanopartículas magnéticas

Dos vários nanossistemas existentes, as nanopartículas magnéticas destacam-se devido à sua versatilidade de aplicações nomeadamente na química analítica, em biossensores e, principalmente, na nanomedicina. A utilização destas na área da medicina tornou-se atrativa devido ao facto de ser possível a sua condução ao local de interesse através de um estímulo

magnético externo, o que permite o controlo mais rigoroso da libertação do fármaco, temporal e espacialmente [43]. Entre as várias aplicações na nanomedicina, destacam-se a sua utilização como agentes de contraste de MRI (do inglês, *Magnetic Resonance Imaging*), sistemas de entrega controlada de moléculas bioativas, engenharia de tecidos e de agentes de hipertermia, através de MHF (do inglês, *Magnetic Fluid Hyperthermia*) [43,44]. As nanopartículas magnéticas têm vindo a ser utilizadas para aplicações biomédicas devido às suas características únicas, tais como não-toxicidade, biocompatibilidade e acumulação no tecido alvo (consequência das suas propriedades magnéticas) [26,45,46].

O tamanho, em conjunto com a forma, determinam a estabilidade física *in vitro* e *in vivo*, assim como as características magnéticas das nanopartículas [43,44,47]. Nanopartículas magnéticas com diâmetros compreendidos entre 10 e 100 nm são as mais promissoras para administração intravenosa, sendo que possuem maior tempo de circulação no organismo. Quando estas possuem diâmetros inferiores a 10 nm ou superiores a 200 nm serão eliminadas por *clearance* renal e sofrem bioacumulação no baço e no fígado, respetivamente. As dimensões das nanopartículas vão permitir a penetração destas em capilares sanguíneos de menores dimensões, ficando mais perto do tecido alvo. As características das nanopartículas são fortemente dependentes do seu método de síntese, por essa razão, este apresenta-se como um passo crucial para otimizar as características das mesmas [41,43,48]. Desta forma, o controlo de parâmetros como o pH e a temperatura torna-se extremamente importante para sintetizar partículas com características ideais.

Geralmente, as nanopartículas magnéticas possuem na sua constituição elementos como ferro, cobalto, níquel, zinco, entre outros, no seu estado normal ou oxidado. No entanto, estes (excluindo o ferro) são metais tóxicos, o que provoca dúvidas quando se trata da sua aplicação na medicina [45]. No transporte de moléculas biologicamente ativas, as nanopartículas oferecem a possibilidade de transportar fármacos com baixa solubilidade, proteger o fármaco de biodegradação, modificar o seu tempo de circulação e a distribuição, aumentar a absorção de fármacos no local de interesse, e a utilização de mais do que um tipo de moléculas bioativas, de modo a ser obtido um efeito sinérgico. No entanto, a combinação de duas moléculas bioativas deve ser estudada, de modo a que a aplicação de uma não prejudique o efeito da outra, como por exemplo, a utilização de fármacos antiangiogénicos que prejudicam, pela destruição da rede sanguínea do tumor, a suscetibilidade do mesmo a outros agentes quimioterapêuticos [37,49].

Quando aplicadas em entrega controlada de fármacos, as nanopartículas magnéticas passam por três fases: numa primeira fase, as nanopartículas serão direcionadas para o local de interesse, por efeito de direcionamento ativo e/ou passivo (ver secção 1.2.3); numa segunda fase, através da presença de um campo magnético, estas ficarão imobilizadas no tecido e, finalmente, após a libertação do fármaco, as nanopartículas serão eliminadas por remoção renal (*clearance*) [44].

1.2.4.1 Ferrites

As ferrites apresentam características superiores relativamente às nanopartículas magnéticas constituídas por outros metais [26,43,46]. Este tipo de materiais apresenta biocompatibilidade, estabilidade, biodegradabilidade, baixo custo de produção e não acarreta perigos para o meio ambiente, o que permite a sua utilização em várias aplicações, nomeadamente biomédicas [43,44]. Estas são complexos que contêm ferro, possuem propriedades magnéticas interessantes e podem apresentar três tipos de estruturas: estrutura cristalina em espinela com iões de oxigénio que formam uma rede cúbica e iões de ferro localizados nos interstícios da rede; hexagonais, *perovskites* e *garnets*. As ferrites com estrutura em espinela são, atualmente, as mais utilizadas nas diversas aplicações [44,47,50-52]. A estrutura em espinela apresenta-se geralmente com a fórmula química tipo $[A]_{Td}[B_2]_{Oh}O_4$, onde Td e Oh se referem aos locais tetraédricos e octaédricos, respetivamente (figura 1.9).

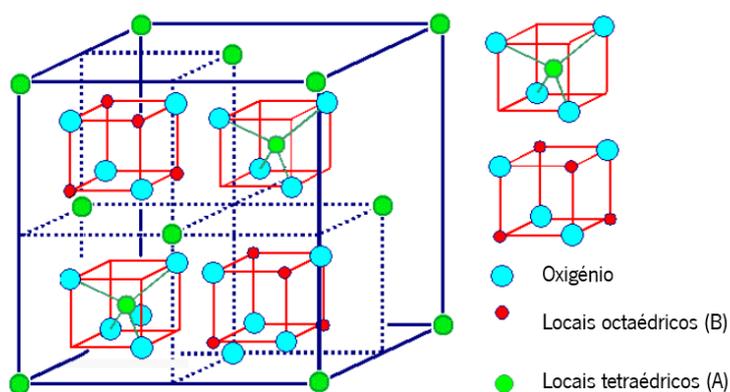


Figura 1.9 - Representação esquemática da estrutura em espinela. Adaptado de [87].

A estrutura em espinela pode ser normal ou invertida, dependendo se os iões divalentes ocupam os locais tetraédricos (A) ou octaédricos (B) da rede. Na estrutura mais simples, as ferrites têm a fórmula geral MFe_2O_3 ou MFe_2O_4 , onde M é o ião metálico divalente. De acordo com o previsto pela teoria de Néel do ferrimagnetismo, as espinelas exibem propriedades ferrimagnéticas resultantes dos acoplamentos antiferromagnéticos entre os momentos magnéticos de catiões localizados em locais tetraédricos e octaédricos. As propriedades magnéticas das ferrites dependem, não apenas dos iões metálicos localizados nos interstícios, mas também da sua distribuição. Ao ajustar a relação entre os iões magnéticos/não magnéticos nos diferentes locais, as ferrites podem exibir propriedades superiores, como maior permeabilidade magnética ou resistividade elétrica, do que as de ferrites simples, como a magnetite (Fe_3O_4) [52].

Entre as várias ferrites existentes, as ferrites de cálcio e magnésio ($Mg_{1-x}Ca_xFe_2O_4$, onde $0 \leq x \leq 1$) são consideradas das mais promissoras para aplicações biomédicas, devido às suas características únicas, como a biocompatibilidade e o facto de serem facilmente metabolizadas [51]. As ferrites mistas de cálcio e magnésio possuem maior capacidade de produzir calor relativamente a outras nanopartículas de óxidos de ferro, o que se mostra como uma mais valia para a aplicação das mesmas como agentes de hipertermia [53,54]. Desta forma, é importante perceber a que nível é que os elementos constituintes das nanopartículas permitem aperfeiçoar as características das mesmas para aplicações biomédicas.

O cálcio (Ca) é um elemento químico com número atómico (Z) 20. É um metal alcalinoterroso e é essencial para todos os organismos vivos, em especial os humanos, onde se apresenta como um nutriente chave em muitos processos biológicos [55]. As nanopartículas de ferrite de cálcio possuem uma vasta gama de aplicações, entre as quais sensores de temperatura, armazenamento de dados, indústria, pigmentação e entrega controlada de fármacos [46,51,56]. As nanopartículas de ferrites de cálcio possuem estabilidade química, estabilidade termal a alta temperatura, propriedades magnéticas adequadas, são biocompatíveis, metabolizadas de forma segura pelo corpo e não prejudicam o meio ambiente. O facto da presença do ião Ca^{2+} substituir metais pesados (como o zinco, cobre ou manganês) nas nanopartículas permite evitar o aparecimento de patologias associadas à acumulação de metais pesados no organismo [46,56,57]. A toxicidade deste tipo de nanopartículas já foi avaliada, mostrando que as nanopartículas de ferrite de cálcio são biocompatíveis para concentrações abaixo de 250 $\mu\text{g/mL}$. A toxicidade verificada acima desta concentração pode dever-se a sobrecarga da célula, devido ao facto das nanopartículas aderirem inicialmente à superfície da célula, serem internalizadas por

endocitose, e se acumularem nos vacúolos digestivos [46].

O elemento magnésio (Mg), com $Z=12$, é um metal alcalinoterroso presente no segundo grupo da tabela periódica. Este elemento apresenta-se como essencial para a nutrição humana, de modo a manter níveis enzimáticos, e também participa na produção de hemácias [55]. As nanopartículas de ferrite de magnésio possuem várias aplicações, tais como sensores de humidade, agentes de catálise e entrega controlada de fármacos [58]. Estas nanopartículas possuem uma capacidade de produção de calor comparável à da magnetite, o que permite a sua aplicação como agentes de hipertermia [53,54].

1.2.4.2 Propriedades magnéticas

Atualmente, têm vindo a ser desenvolvidos novos materiais magnéticos para várias aplicações, nomeadamente aplicações biomédicas, como entrega controlada de fármacos, HT e MRI [47,59].

A classificação de um material como magnético vai depender da sua resposta a um campo magnético externo, ou seja, da sua suscetibilidade magnética (χ) [47,50,60].

Ao aplicar um estímulo magnético externo, os *spins* dos eletrões dos materiais vão responder, alinhando-se segundo este ou no sentido contrário. No primeiro caso, quando os spins se alinham de acordo com o campo, a magnetização máxima do material é atingida, verificando-se a magnetização de saturação (M_s). Quando o campo é retirado, a maioria dos spins deixa de estar orientada segundo este, sendo que a magnetização do material diminui. A magnetização que se mantém após cessar o estímulo é chamada de magnetização remanescente (M_r). De acordo com a sua resposta magnética, os materiais podem ser classificados em diamagnéticos, paramagnéticos ou ferromagnéticos [60,61].

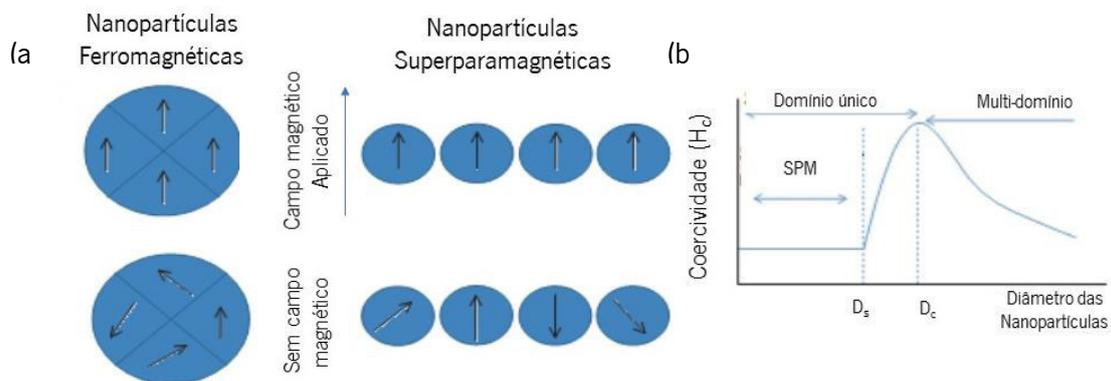
Os materiais diamagnéticos não apresentam momento magnético na ausência de um campo externo e, no momento da aplicação deste, exibem uma ligeira repulsão (devido ao facto dos *spins* dos eletrões do material se encontrarem todos emparelhados) ou seja, $\chi < 0$. Por outro lado, os materiais paramagnéticos respondem na presença de um campo magnético, perdendo a magnetização na ausência deste. Neste tipo de materiais, a χ é muito baixa (10^{-6} a 10^{-1}), no entanto positiva. Por último, os materiais ferromagnéticos, apresentam suscetibilidade magnética

positiva e forte, apresentando, por isso, magnetização mesmo sem a presença de um campo magnético externo aplicado [60,61].

Em 1930, Frenkel e Dorfman [62] mostraram, que partículas de tamanho suficientemente pequeno deveriam ser de domínio único. Em meados do século XX, a teoria das partículas de domínio único começou a ser ativamente desenvolvida e os fenômenos relacionados estudados experimentalmente. A formação de domínios deve-se à diminuição da energia magnetostática e depende da competição entre esta e a energia necessária para formar paredes que separam os domínios. A dimensão destas paredes é comparável à dimensão das nanopartículas sendo, por isso, energeticamente desfavorável a existência de multidomínios [63].

Em materiais ferromagnéticos com dimensões suficientemente pequenas passa a ocorrer o superparamagnetismo [41,44,47,64].

Abaixo de um diâmetro crítico (geralmente entre 10^{-7} a 10^{-8} m), ocorre um monodomínio magnético e a coercividade torna-se nula [63,64]. Na presença de temperaturas suficientemente elevadas (acima da temperatura de bloqueio), a energia térmica induz a rotação das partículas, resultando na perda da magnetização na ausência de um campo magnético externo [64,65]. Quando estas características estão presentes, estamos perante um comportamento superparamagnético (figura 1.10).



A reação de um material a um campo magnético é representada pela curva de histerese, que permite estudar a capacidade de um material manter o magnetismo na ausência do estímulo. Na figura 1.11 está representada a diferença entre uma curva de histerese de materiais com diferentes comportamentos magnéticos.

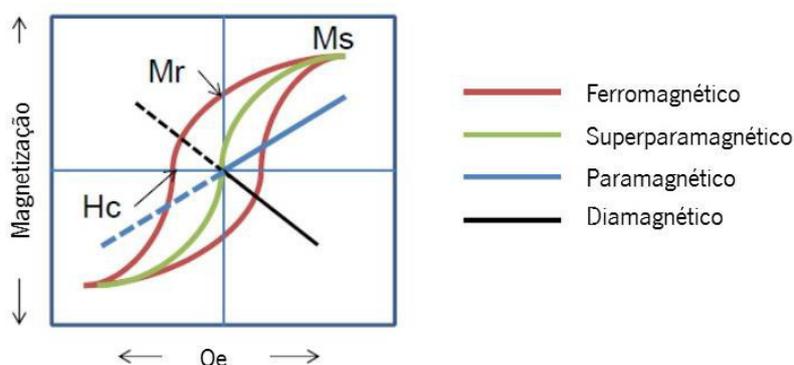


Figura 1.11 – Comportamento magnético de diferentes tipos de materiais, quando aplicado um campo magnético. Oe - Campo magnético aplicado; Ms- Magnetização de Saturação, Mr- Magnetização remanescente e Hc - Coercividade. Adaptado de [66].

É possível verificar que a diferença essencial entre os materiais ferro e superparamagnéticos é a espessura da curva de histerese, ou seja a coercividade. A coercividade representa o campo magnético que seria necessário para anular a magnetização remanescente do material em estudo e demonstra-se como o parâmetro de mais interesse em partículas de diâmetro nanométrico [64]. Na figura 1.12 está representada a relação entre a coercividade e o tamanho das nanopartículas.

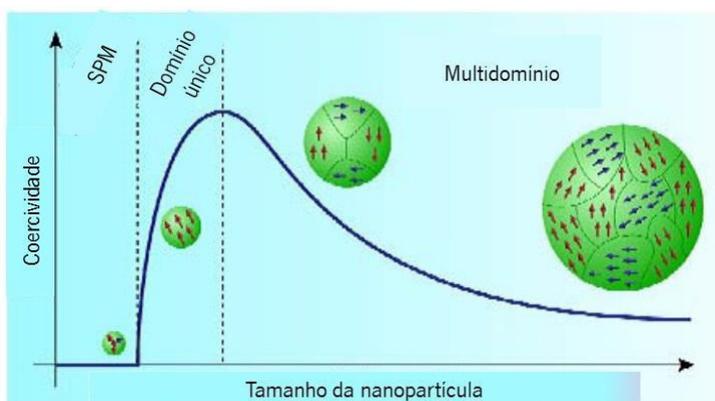


Figura 1.12 - Relação entre os valores de coercividade e o tamanho das partículas. Adaptado de [64].

Outro parâmetro importante no magnetismo é a temperatura de Curie (T_c), sendo que abaixo desta temperatura as nanopartículas apresentam comportamento superparamagnético. No entanto, quando esta temperatura é atingida, a magnetização das nanopartículas decresce bruscamente para 0. A T_c depende fortemente da estrutura cristalina e do tamanho da nanopartícula.

As nanopartículas com comportamento superparamagnético apenas apresentam magnetização na presença de um campo externo [67]. O facto de estas não apresentarem magnetismo permanente mostra-se como uma mais-valia, pois impede a agregação das mesmas [44,47,68]. Um dos benefícios das nanopartículas magnéticas é o facto de libertarem calor como resultado da perda de histerese, da relaxação de Néel e da relaxação Browniana, quando estão sob a influência de um campo magnético alternado [53]. A relaxação de Néel deve-se à reorientação do *spin* de acordo com o campo magnético alternado após cada oscilação; a relaxação Browniana refere-se à fricção entre a partícula e o meio líquido em que a mesma está inserida, causada pela rotação da mesma.

A relaxação de Néel e a relaxação Browniana são dependentes do tamanho da partícula, sendo que a segunda é também dependente da viscosidade do meio. Para partículas de menores dimensões, o mecanismo de relaxação de Néel prevalece, sendo por isso o principal responsável pela libertação de calor nas nanopartículas magnéticas [41].

1.2.5 Hipertermia

Por definição, a hipertermia consiste na exposição de uma superfície específica ou de todo o organismo a temperaturas acima do nível fisiológico (entre os 40 °C e os 45 °C) [69]. *O National Cancer Institute* reconhece três tipos de hipertermia, tendo em conta o local da sua aplicação. A hipertermia local, que visa o aumento da temperatura numa pequena área; a hipertermia regional, que engloba maiores áreas do corpo como membros e órgãos; e a hipertermia corporal total, geralmente utilizada para cancro metastático e como tratamento paliativo [61]. Quando utilizada de forma isolada, a hipertermia não desempenha um papel curativo no tratamento do cancro. No entanto, o seu potencial clínico reside no seu uso como tratamento adjuvante a outras modalidades como RT e QT (figura 1.13) [70]. A temperaturas relativamente elevadas (acima de 43 °C), todas as células são afetadas. Contudo, a temperaturas moderadas (entre 39 e 43 °C), as células

normais não são sensíveis ao aumento de temperatura, ao passo que as células tumorais o são.

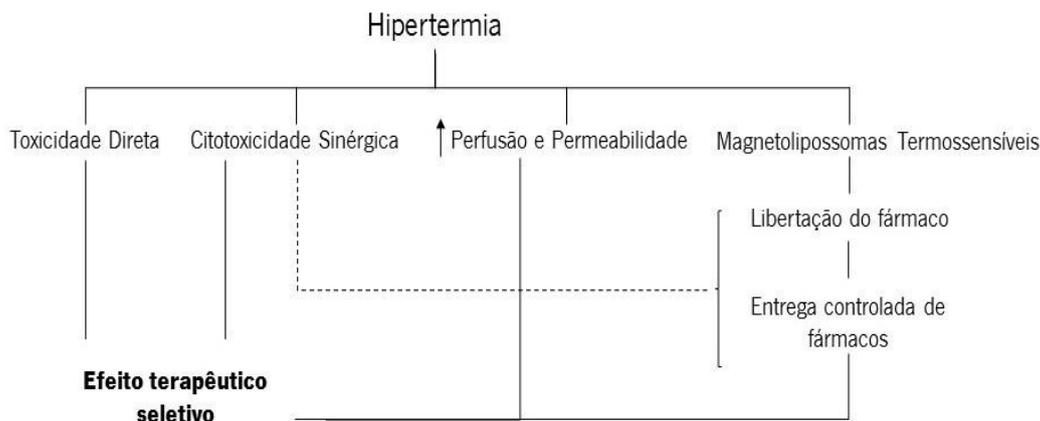


Figura 1.13 - Benefícios terapêuticos multifatoriais da HT. Adaptado de [71].

A diferença reside no microambiente em que as células estão inseridas, sendo que o microambiente tumoral, que se apresenta como hipóxico e ácido, representa um fator acrescido de *stress* para as mesmas, sensibilizando-as a fatores externos como o aumento de temperatura [70]. O aumento da temperatura causa a diminuição do fluxo sanguíneo no tumor, o que diminui a dissipação do calor, ou seja, ocorre aumento da temperatura local [41]. Este aumento, vai provocar a desnaturação das proteínas que resulta em inativação celular por via da apoptose (em caso de temperaturas moderadas) e/ou necrose (temperaturas mais elevadas).

Em zonas hipóxicas do tumor é difícil que o fármaco atinja concentrações que permitam eficácia terapêutica [72]. Desta forma, as temperaturas características da hipertermia moderada (39 - 43 °C), constituem-se como ideais para o transporte de fármacos. Através do aumento da vasodilatação na zona do tumor (figura 1.14) e do tamanho dos poros presentes nos vasos, a hipertermia moderada permite o aumento da perfusão vascular ao oxigênio e da acumulação do fármaco no local de interesse [71]. As temperaturas características deste tipo de hipertermia podem também funcionar como um mecanismo de *trigger* de libertação de fármaco presente nos magnetolipossomas, se o lípido constituinte possuir uma T_m adequada. Esta é geralmente utilizada de modo a aumentar o resultado terapêutico de tratamentos como quimioterapia ou radioterapia [71,73].

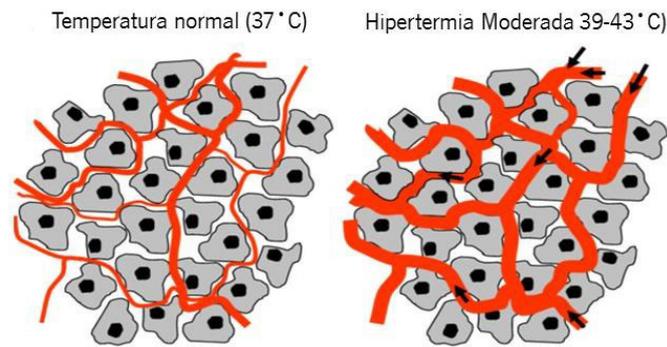


Figura 1.14 - Efeitos da HT moderada na vasculatura tumoral. Adaptado de [71].

Apesar do uso da hipertermia para tratamento de cancro não ser recente, o desafio de aumentar a temperatura apenas nas células alvo torna-se um desafio, sendo que, nos últimos 20 anos, têm sido feitos diversos esforços de modo a aprimorar as técnicas de hipertermia existentes com esse intuito. Os avanços na área da nanotecnologia permitiram o desenvolvimento de novos agentes de hipertermia, como por exemplo, as nanopartículas magnéticas [45,74].

A primeira aplicação de materiais magnéticos como agentes de hipertermia data de 1957 quando Gilchrist *et al.* utilizaram partículas de magnetite para aumentar a temperatura de várias amostras de tecido quando expostas a um campo magnético [71]. Desde então, houve inúmeras publicações descrevendo uma variedade de esquemas utilizando diferentes tipos de materiais magnéticos, como por exemplo diferentes tipos de nanopartículas [41,75], em conjunto com radioterapia ou quimioterapia [76,77], ou verificando o efeito da hipertermia [78]. A utilização de nanomateriais, nomeadamente nanopartículas, como agentes de hipertermia, demonstra ser uma abordagem promissora que reduz significativamente os efeitos colaterais relativamente ao tratamento padrão, sem comprometer o seu efeito terapêutico [18].

1.2.6 Magnetolipossomas

Os magnetolipossomas são conhecidos pelo seu potencial no campo de entrega de fármacos, genes e diagnóstico/terapêutica do cancro [25]. Estes resultam da encapsulação de

nanopartículas magnéticas em vesículas compostas por bicamadas lipídicas concêntricas, ou seja, lipossomas, combinando as vantagens de ambos [48,79,80].

Foram inicialmente descritos por De Cuyper e Joniau em 1988 e, desde então, este tipo de nanotransportadores tornaram-se extremamente importantes devido às suas propriedades, pois possuem a capacidade de transportar o fármaco, mas também de provocar a sua libertação devido à sua capacidade de gerar calor quando submetidos a um campo magnético alternado, o que se prova vantajoso na sua aplicação em tumores [45,48].

Os magnetolipossomas podem ser aquosos (nanopartículas dispersas em água e rodeadas por uma bicamada lipídica) ou sólidos (*clusters* de nanopartículas magnéticas rodeadas por uma bicamada lipídica) (figura 1.15) [45].

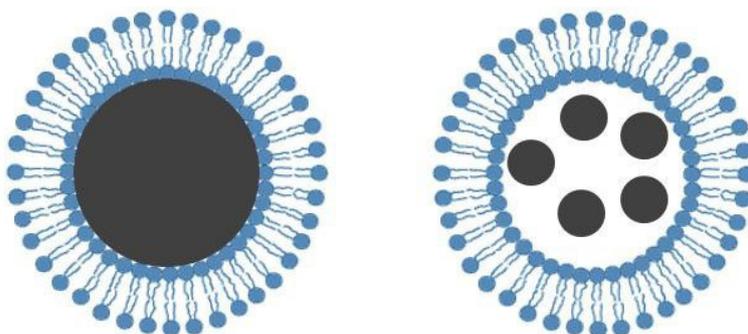


Figura 1.15 - Magnetolipossomas sólidos (esquerda) e aquosos (direita).

O uso de magnetolipossomas permite melhorar as propriedades farmacológicas (como, por exemplo a biodisponibilidade) dos agentes quimioterapêuticos tradicionais. Os magnetolipossomas apresentam várias vantagens para a sua aplicação em oncologia, tais como a proteção do fármaco, de modo a evitar degradação prematura, impedindo o fármaco de interagir prematuramente com o ambiente biológico. Promovem uma melhor absorção do fármaco num tecido de interesse (por exemplo, tumor sólido), oferecem a possibilidade de terapia combinada (quimioterapia e hipertermia), aumentam a penetração intracelular do fármaco, permitem o transporte de fármacos com diferentes afinidades para a água e têm possibilidade de direcionamento ativo e/ou passivo [34]. Na figura 1.16 está representado um esquema que explica a utilização de magnetolipossomas em entrega controlada de fármacos.

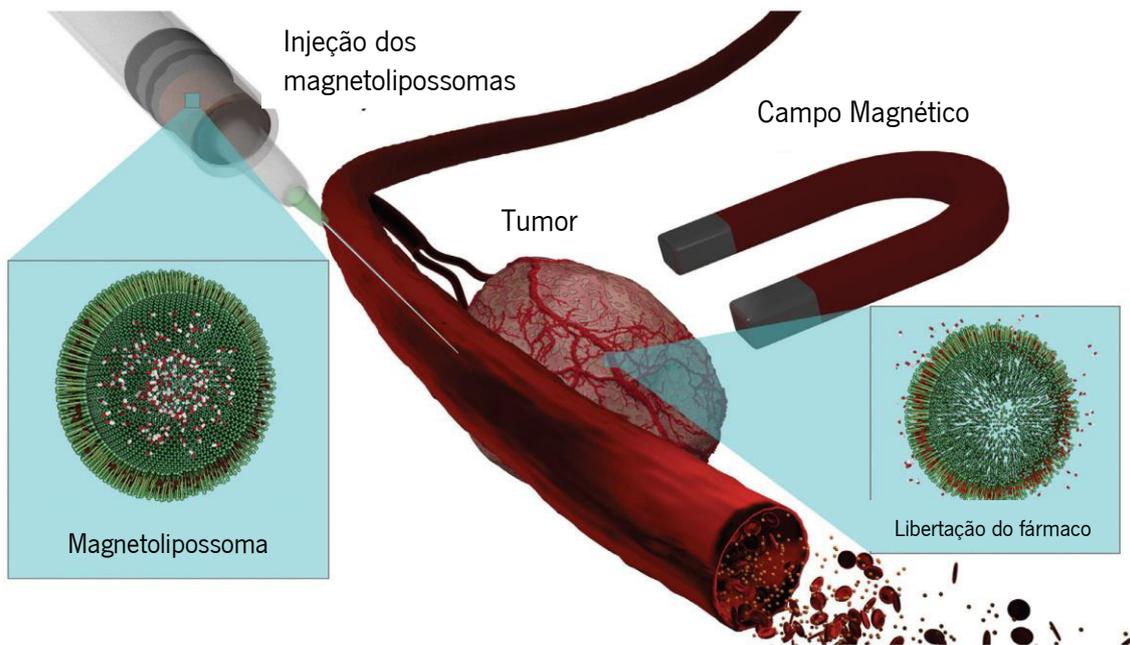


Figura 1.16 – Mecanismo de combinação de entrega controlada de fármacos com hipertermia utilizando magnetolipossomas. Adaptado de [48].

1.2.7 Terapia anti-angiogénica

A hipoxia representa uma das maiores problemáticas no tratamento do cancro pois aumenta a resistência das células tumorais à RT e à QT. Esta acontece devido ao desequilíbrio entre o oxigénio necessário ao sistema tumoral e o que é efetivamente fornecido. O facto de a vasculatura tumoral ter características únicas, resultado da angiogénese acelerada e do crescimento do tumor não permitir a perfusão de oxigénio a todas as células, promovem o aparecimento de microambientes hipóxicos no tumor. O processo de angiogénese inicia-se através de um desequilíbrio entre os fatores pró e antiangiogénicos, que vai promover a migração das células endoteliais de modo a formar uma rede vascular espacialmente desorganizada. Um dos fatores pró-angiogénicos mais importantes é o fator de crescimento endotelial vascular – VEGF, que está presente em todo o desenvolvimento do tumor [81]. Em 1971, o cientista Judah Folkman sugeriu que o crescimento do tumor poderia ser evitado se fosse possível evitar a formação de novos vasos tumorais [82]. As vias de sinalização da quinase participam em muitos processos característicos da biologia tumoral, incluindo proliferação, diferenciação, metabolismo, motilidade, angiogénese, respostas imunes antitumorais e metastização [83,84]. O papel das tirosina-quinases na patogénese molecular do cancro é imenso e estas têm vindo a ser estudadas como

potenciais fármacos anticancerígenos [84]. O recetor do fator de crescimento endotelial vascular – 2 (VEGFR-2) é um recetor da tirosina-quinase de classe V localizado nas células endoteliais e é ativado através da ligação específica do VEGF, secretado pelas células tumorais. Uma vez ativado, o VEGFR-2 sofre autofosforilação, o que leva à proliferação celular e conseqüente angiogénese, que promove o crescimento tumoral e o surgimento de metástases [83]. Atendendo a estas características, a intervenção nas vias de sinalização surge como uma hipótese de interferir precocemente no desenvolvimento tumoral [83]. Um exemplo de fármacos concebidos para este efeito são moléculas baseadas em diarilureias derivadas de tienopiridinas. Este tipo de moléculas representa um inibidor de quinase do tipo II que, contrariamente ao tipo I, não compete com a molécula adenosina trifosfato (ATP) para a ligação ao VEGFR -2 [83,85].

Este tipo de inibidores interage com o local catalítico da conformação inativa fosforilada das quinases, explorando novas interações na zona lipofílica que surgem devido a mudanças na conformação do domínio DFG [85]. Estas interações lipofílicas fazem com que os inibidores de tipo II sejam bastante mais seletivos que os restantes [83,85]. Machado *et al.* desenvolveram inibidores de VEGFR-2 (1-*aril*-3-[2-, 3- ou 4-(tieno[3,2-*b*]piridin-7-iltio)fenil]ureias) com base em tieno[3,2-*b*]piridina-7-tioéter-1,3-diarilureas. Na figura 1.17 estão representadas as moléculas que vão ser utilizadas neste trabalho.

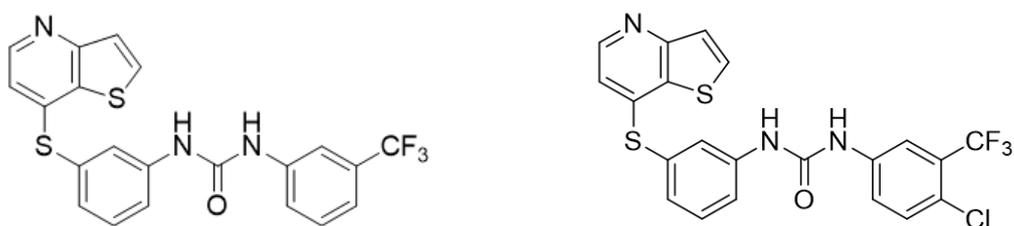


Figura 1.17 - Compostos derivados de (1-*aril*-3-[2-, 3- ou 4-(tieno[3,2-*b*]piridin-7-iltio)fenil]ureias) com base em tieno[3,2-*b*]piridina-7-tioéter-1,3-diarilureas. Composto 1- esquerda, composto 2- direita.

A eficácia destes compostos em linhas celulares de cancro da mama já foi comprovada em [86]. Na tabela 1.1 estão representados os valores de GI50 para os compostos em estudo.

Tabela 1.1 - Atividade dos compostos antitumorais 1 e 2 na inibição do crescimento de diferentes linhas de células tumorais; adenocarcinoma (MCF-7) e células de cancro da mama altamente metastáticas hormono-independentes (MDA-MD-231).

Linhas celulares	GI ₅₀ (μM) ^a	
	MCF-7	MDA-MD-231
Composto 1	1.2	5.0
Composto 2	1.6	7.0

^a Concentração mais baixa a causar 50% da inibição do crescimento celular (GI₅₀).

A ligação deste tipo de fármacos ao VEGFR-2 provoca apoptose nas células tumorais, diminuindo a densidade e diâmetro dos vasos da rede vascular tumoral, o que vai permitir, ainda que temporariamente, a normalização da vasculatura tumoral (figura 1.18).

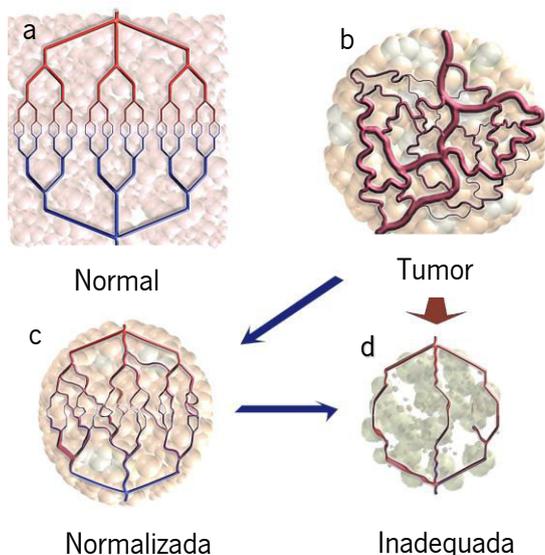


Figura 1.18 - Comparação entre uma rede vascular normal (a), uma rede vascular típica de tumores (b), a normalização da vasculatura que ocorre após o tratamento com inibidores de VEGFR- 2 (c) e rede vascular após o final da terapia antiangiogénica (d). Adaptado de [81].

Este período de normalização permite aumentar temporariamente a oxigenação dos tecidos e a concentração de fármacos no tumor. Paradoxalmente, o tumor também receberá mais

nutrientes necessários para a divisão celular. No entanto, esta constitui uma das fases em que o tumor está mais sensível à radiação [81].

1.3 Referências bibliográficas do capítulo 1

- [1] “World Health Organization,” WHO Cancer Control Programme, 2017. [Online]. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/> [Acedido em 20 de dezembro de 2017].
- [2] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2017,” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 67, no. 1, pp. 7–30, 2017.
- [3] B. W. Stewart and C. P. Wild, “World cancer report 2014,” 2014.
- [4] J. Man, J. D. Shoemake, T. Ma, A. E. Rizzo, A. R. Godley, Q. Wu, A. M. Mohammadi, S. Bao, J. N. Rich and J. S. Yu “Hyperthermia sensitizes Glioma stem-like cells to radiation by inhibiting AKT signaling,” *Cancer Research*, vol. 75, no. 8, pp. 1760–1769, 2015.
- [5] G. F. Baronzio and E. D. Hager, *Hyperthermia in cancer treatment: a primer*. Nova Iorque, 2006.
- [6] F. Winkler, S.V. Kozin, R.T. Tong, S.S. Chae, M.F. Booth, I. Garkavtsev, L. Xu, D.J. Hicklin, D. Fukumura, E. di Tomaso, L.L. Munn, and R.K. Jain., “Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: Role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases,” *Cancer Cell*, vol. 6, no. 6, pp. 553–563, 2004.
- [7] D. F. Emerich and C. G. Thanos, “Nanotechnology and medicine.,” *Expert Opinion on Biological Therapy*, vol. 3, no. 4, pp. 655–663, 2003.
- [8] S. Logothetidis, “Nanotechnology: Principles and Applications,” in *Nanostructured Materials and Their Applications*, 1st ed., S. Logothetidis, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012, pp. 1–22.
- [9] K. Niemirowicz and H. Car, “Nanocarriers in modern drug delivery systems,” *Chemik*, vol. 66, no. 8, pp. 868–881, 2012.
- [10] E. Serrano, G. Rus, and J. García-Martínez, “Nanotechnology for sustainable energy,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 13, no. 9, pp. 2373–2384, 2009.
- [11] S. Raj, U. Sumod, S. Jose, and M. Sabitha, “Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges,” *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences.*, vol. 4, no. 3, pp. 186–193, 2012.

- [12] C. Parisi, M. Vigani, and E. Rodríguez-Cerezo, "Agricultural nanotechnologies: What are the current possibilities?," *Nano Today*, vol. 10, no. 2, pp. 124–127, 2015.
- [13] S. M. Amini, M. Gilaki, and M. Karchani, "Safety of nanotechnology in food industries.," *Electronic physician*, vol. 6, no. 4, pp. 962–968, 2014.
- [14] I. Gehrke, A. Geiser, and A. Somborn-Schulz, "Innovations in nanotechnology for water treatment," *Nanotechnology, Science and Applications*, vol. 8, pp. 1–17, 2015.
- [15] N. S. D. Patel Abhiyan S, Rathod Hiren A., "An Over View Of Application of nanotechnology in Construction Industry," *International Journal Of Innovative Research In Science, Engineering And Technology.*, vol. 2, no. 11, pp. 6094–6098, 2013.
- [16] A. P. Nikalje, "Nanotechnology and its Applications in Medicine," *Medicinal Chemistry*, vol. 5, no. 2, pp. 81–89, 2015.
- [17] V. Subramanian and T. Lee, "Nanotechnology-based flexible electronics," *Nanotechnology*, vol. 23, no. 34, pp. 32–34, 2012.
- [18] S. D. Caruthers, S. A. Wickline, and G. M. Lanza, "Nanotechnological applications in medicine," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 18, no. 1. pp. 26–30, 2007.
- [19] D. P. Cormode, T. Skajaa, Z. a. Fayad, and W. J. M. Mulder, "Nanotechnology in medical imaging: probe design and applications," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.*, vol. 29, no. 7, pp. 992–1000, 2010.
- [20] A. R. O. Rodrigues, B. G. Almeida, J.M. Rodrigues, M. J. R. P. Queiroz, R. C. Calhelha, I. C. F. R. Ferreira, A. Pires, A. M. Pereira, J. P. Araújo, P. J. G. Coutinho and E. M. S. Castanheira "Magnetoliposomes as carriers for promising antitumor thieno[3,2-b]pyridin-7-arylamines: photophysical and biological studies," *RSC Advances*, vol. 7, no. 25, pp. 15352–15361, 2017.
- [21] J. Clarke, H. C. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Reid, and H. Bayley, "Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing," *Nature Nanotechnology*, vol. 4, no. 4, pp. 265–270, 2009.
- [22] J. Danie Kingsley, S. Ranjan, N. Dasgupta, and P. Saha, "Nanotechnology for tissue engineering: Need, techniques and applications," *Journal of Pharmacy Research*, vol. 7, no. 2, pp. 200–204, 2013.

- [23] S. Caban, E. Aytakin, A. Sahin, and Y. Capan, "Nanosystems for drug delivery," *OA Drug Design and Delivery*, vol. 2, no. 1, pp. 1–7, 2014.
- [24] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, and D. M. Shin, "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 5, pp. 1310–1316, 2008.
- [25] P. Pradhan, J. Giri, F. Rieken, C. Koch, O. Mykhaylyk, M. Döblinger, R. Banerjee, D. Bahadur, and C. Plank "Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy," *Journal of Controlled Release*, vol. 142, no. 1, pp. 108–121, 2010.
- [26] A. Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K. H. Markiewicz, and H. Car, "Nanoparticles as drug delivery systems," *Pharmacological Reports*, vol. 64, no. 5, pp. 1020–1037, 2012.
- [27] P. Couvreur, "Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, no. 1, pp. 21–23, 2013.
- [28] V. K. Sharma, E. Mamontov, D. B. Anunciado, H. Oneill, and V. Urban, "Nanoscope dynamics of phospholipid in unilamellar vesicles: Effect of gel to fluid phase transition," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 119, no. 12, pp. 4460–4470, 2015.
- [29] P. L. Yeagle, "The Lipids of Biological Membranes," in *The membranes of cells*, 3rd ed., Connecticut: Elsevier, 2016, p. 452.
- [30] V. P. Torchilin, "Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery," *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 13, no. 11, pp. 813–827, 2014.
- [31] M. E. Ruiz, M. E. Gantner, and A. Talevi, "Applications of nanosystems to anticancer drug therapy (Part II. Dendrimers, micelles, lipid-based nanosystems)," *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, vol. 9, no. 1, pp. 99–128, 2014.
- [32] J. C. Scholtz, "Liposomes as drug delivery systems," Tese de mestrado, Universidade Northwest, Potchefstroom, África do Sul, 2010.
- [33] A. Puri, K. Loomis, B. Smith, J. Lee, A. Yavlovich, E. Heldman, and Robert Blumenthal, "Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic," *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, vol. 26, no. 6, pp. 523–580, 2009.

- [34] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy.," *Nature Nanotechnology*, vol. 2, no. 12, pp. 751–760, 2007.
- [35] P. P. Deshpande, S. Biswas, and V. P. Torchilin, "Current trends in the use of liposomes for tumor targeting," *Nanomedicine (London)*, vol. 8, no. 9, pp. 1–32, 2014.
- [36] T. M. Allen and P. R. Cullis, "Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, no. 1, pp. 36–48, 2013.
- [37] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, and O. C. Farokhzad, "Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 66, pp. 2–25, 2014.
- [38] V. P. Torchilin, "Passive and Active Drug Targeting: Drug Delivery to Tumors as an Example," in *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 197, pp. 3–53, 2010.
- [39] Flonja L, "Cancer nanotechnology, challenges and achievements," 2013. [Online]. Disponível em: <http://medglobe.blogspot.pt/2013/05/cancer-nanotechnology-challenges-and.html>. [20 de dezembro de 2017].
- [40] D. R. Khan, "The use of nanocarriers for drug delivery in cancer therapy." *Journal of Cancer Science and Therapy*. ; vol.2, no.3, pp. 58–62. 2010.
- [41] A. Hervault and N. T. K. Thanh, "Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer," *Nanoscale*, vol. 6, no. 20, pp. 11553–11573, 2014.
- [42] R. R. Wakaskar, "Passive and Active Targeting in Tumor Microenvironment," *International Journal of Drug Development and Research*, vol. 9, no. 2, pp. 37–41, 2017.
- [43] J. Kudr, Y. Haddad, L. Richtera, Z. Heger, M. Cernak, V. Adam, and O. Zitka "Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications," *Nanomaterials*, vol. 7, no. 243, p. 1-29, 2017.
- [44] L. H. Reddy, J. L. Arias, J. Nicolas, and P. Couvreur, "Magnetic nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications," *Chemical Reviews*., vol. 112, pp. 5818–5878, 2012.

- [45] L. L. Vatta, R. D. Sanderson, and K. R. Koch, "Magnetic nanoparticles : Properties and potential applications," *Advanced Materials*, vol. 78, no. 9, pp. 1793–1801, 2006.
- [46] L. Khanna and N. K. Verma, "Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity study of calcium ferrite nanoparticles," *Materials Science in Semiconductor Processing*, vol. 16, no. 6, pp. 1842–1848, 2013.
- [47] I. M. M. Ferreira, "Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas para tratamento de cancro: estudo da síntese e estabilização das soluções coloidais de Fe₃O₄," Tese de mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.
- [48] C. A. Monnier, D. Burnand, B. Rothen-Rutishauser, M. Lattuada, and A. Petri-Fink, "Magnetoliposomes: Opportunities and challenges," *European Journal of Nanomedicine*, vol. 6, no. 4, pp. 201–215, 2014.
- [49] K. Derakhshandeh and A. H. Azandaryani, "Active-targeted Nanotherapy as Smart Cancer Treatment," in *Smart Drug Delivery System*, pp. 75–100, 2016.
- [50] D. S. Mathew and R. S. Juang, "An overview of the structure and magnetism of spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in microemulsions," *Chemical Engineering Journal*, vol. 129, pp. 51–65, 2007.
- [51] H. Saleh, "Synthesis and Formation of Calcium Ferrite Compounds," *Journal of Materials Science & Technology*, vol. 20, no. 5, pp. 530–534, 2004.
- [52] N. T. Thanh, *Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Clinical Applications*. 2012.
- [53] M. M. G. Saldívar-Ramírez, . G. Sánchez-Torres, D. A. Cortés-Hernández, J. C. Escobedo-Bocardo. J. M. Almanza-Robles, A. Larson, P. J. Reséndiz-Hernández, and I. O. Acuña-Gutiérrez, "Study on the efficiency of nanosized magnetite and mixed ferrites in magnetic hyperthermia," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 25, no. 10, pp. 2229–2236, 2014.
- [54] H. Hirazawa, S. Kusamoto, H. Aono, T. Naohara, K. Mori, Y. Hattori, T. Maehara, and Y. Watanabe, "Preparation of fine Mg_{1-x}Ca_xFe₂O₄ powder using reverse coprecipitation method for thermal coagulation therapy in an ac magnetic field," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 461, no. 1–2, pp. 467–473, 2008.
- [55] R. E. Krebs, "The History and Use of Our Earth's Chemical Elements: A Reference Guide", 2 nd edition. 2006.

- [56] N. H. Sulaiman, M. J. Ghazali, J. Yunas, A. Rajabi, B. Y. Majlis, and M. Razali, "Synthesis and characterization of CaFe₂O₄ nanoparticles via co-precipitation and auto-combustion methods," *Ceramics International*, vol. 44, no. 1, pp. 46–50, 2018.
- [57] M. J. Pirouz, M. H. Beyki, and F. Shemirani, "Anhydride functionalised calcium ferrite nanoparticles: A new selective magnetic material for enrichment of lead ions from water and food samples," *Food Chemistry*, vol. 170, pp. 131–137, 2015.
- [58] Y.L. Liu, Z.M. Liu, Y. Yang, H.F. Yang, G.L. Shen, and R.-Q. Yu, "Simple synthesis of MgFe₂O₄ nanoparticles as gas sensing materials," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 107, no. 2, pp. 600–604, 2005.
- [59] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, and T. Sen, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 1–2, pp. 24–46, 2011.
- [60] M. Hofmann-Antenbrink, H. Hofmann, M. Pully, C. J. Pavillard, E. Hospital, and V. F. Zurich, "Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications," in *Nanostructured Materials for Biomedical Applications*, vol. 661, no. 2, M.C.Tan, Ed. 2009.
- [61] S. Laurent, S. Dutz, U. O. Häfeli, and M. Mahmoudi, "Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 166, no. 1–2, pp. 8–23, 2011.
- [62] J. Frenkel, J. Doefman, and J. Dorfman, "Spontaneous and Induced Magnetisation in Ferromagnetic Bodies.," *Nature*, vol. 126, no. 3173, pp. 274–275, 1930.
- [63] B. Pacakova, S. Kubickova, A. Reznickova, D. Niznansky, A. Reznickova, and D. Niznansky, "Spinel Ferrite Nanoparticles : Correlation of Structure and Magnetism," in *Magnetic Spinel synthesis, properties and applications*, pp. 1–28, 2017.
- [64] A. Akbarzadeh, M. Samiei, and S. Davaran, "Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine," *Nanoscale Research Letters.*, vol. 7, no. 1, p. 144, 2012.
- [65] M. Benz, "Superparamagnetism : Theory and Applications," Discussão. 2012.

- [66] A. G. Kolhatkar, A. C. Jamison, D. Litvinov, R. C. Willson, and T. R. Lee, "Tuning the magnetic properties of nanoparticles", vol. 14, no. 8. 2013.
- [67] A. R. O. Rodrigues, I. T. Gomes, B. G. Almeida, J. P. Araújo, E. M. S. Castanheira, and P. J. G. Coutinho, "Magnetoliposomes based on nickel/silica core/shell nanoparticles: Synthesis and characterization," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 148, no. 3, pp. 978–987, 2014.
- [68] T. Indira, "Magnetic Nanoparticles: A Review," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, vol. 3, no. 3, pp. 1035–1042, 2010.
- [69] G. F. Baronzio and E. D. Hager, "Hyperthermia in cancer treatment: a primer". Nova lorque, 2006.
- [70] M. R. Horsman and D. W. Siemann, "Pathophysiologic effects of vascular-targeting agents and the implications for combination with conventional therapies," *Cancer Research*, vol. 66, no. 24, pp. 11520–11539, 2006.
- [71] C. D. Landon, J. Y. Park, D. Needham, and M. W. Dewhirst, "Nanoscale Drug Delivery and Hyperthermia: The Materials Design and Preclinical and Clinical Testing of Low Temperature-Sensitive Liposomes Used in Combination with Mild Hyperthermia in the Treatment of Local Cancer," *Open Nanomedicine Journal*, vol. 3, no. 1, pp. 38–64, 2011.
- [72] A. J. Primeau, A. Rendon, D. Hedley, L. Lilge, and I. F. Tannock, "The distribution of the anticancer drug doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors," *Clinical Cancer Research*, vol. 11, no. 24, pp. 8782–8788, 2005.
- [73] L. Li, T.L.M. Hagen, M. Bolkestein, A. Gasselhuber, J. Yatvin, G.C. van Rhoon, A.M.M. Eggermont, D. Haemmerich, G. A. Koning, "Improved intratumoral nanoparticle extravasation and penetration by mild hyperthermia," *Journal of Controlled Release*, vol. 167, no. 2, pp. 130–137, 2013.
- [74] P. Cherukuri, E. S. Glazer, and S. A. Curley, "Targeted hyperthermia using metal nanoparticles," *Advances Drug Delivery Reviews*, vol. 62, no. 3, pp. 339–345, 2010.
- [75] L. Bubnovskaya, A. Belous, S. Solopan, A. Kovelskaya, L. Bovkun, A. Podoltsev, "Magnetic fluid hyperthermia of rodent tumors using manganese perovskite nanoparticles," *Journal of Nanoparticles*, vol. 2014, pp. 1–9, 2014.

- [76] M. Armour, M. Hedayati, Y. Zhang, and L. Theodore, "Magnetic nanoparticle hyperthermia enhances radiation therapy: A study in mouse models of human prostate cancer," *International Journal of Hyperthermia.*, vol. 31, no. 4, pp. 359–374, 2015.
- [77] I. Venugopal, S. Pernal, A. Duproz, J. Bentley, H. Engelhard, and A. Linninger, "Magnetic field-enhanced cellular uptake of doxorubicin loaded magnetic nanoparticles for tumor treatment," *Materials Research Express*, vol. 3, no. 9, pp. 1–13, 2016.
- [78] N. A. Brusentsov, L.V. Nikitin, T.N. Brusentsova, A.A. Kuznetsov, F.S. Bayburtskiy, L.I. Shumakov, N.Y. Jurchenko., "Magnetic fluid hyperthermia of the mouse experimental tumor," *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.*, vol. 252, no. 1–3, pp. 378–380, 2002.
- [79] A. R. O. Rodrigues, J. M. F. Ramos, I. T. Gomes, B.G. Almeida, J. P. Araújo, M.J.R. P. Queiroz, P.J. G. Coutinho and E.M. S. Castanheira. "Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs," *RSC Advances*, vol. 6, no. 21, pp. 17302–17313, 2016.
- [80] C. M. Batista, C. M. B. De Carvalho, and N. S. S. Magalhães, "Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte," *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas*, vol. 43, no. 2, pp. 167–179, 2007.
- [81] R. K. Jain, "Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy," *Science (80).*, vol. 7, no. 9, pp. 987–989, 2005.
- [82] R. R. Wakaskar, "Passive and Active Targeting in Tumor Microenvironment," *International Journal of Drug Development and Research*, vol. 9, no. 2, pp. 37–41, 2017.
- [83] V. A. Machado, D. Peixoto, R. Costa, H. J. C. Froufe, R. C. Calhelha, R. M. V. Abreu, I. C. F. R. Ferreira, R. Soares, M.-J.R. P. Queiroz, "Synthesis, antiangiogenesis evaluation and molecular docking studies of 1-aryl-3-[(thieno[3,2-b]pyridin-7-ylthio)phenyl]ureas: Discovery of a new substitution pattern for type II VEGFR-2 Tyr kinase inhibitors," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 23, no. 19, pp. 6497–6509, 2015.
- [84] M. K. Paul and A. K. Mukhopadhyay, "Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer.," *International Journal of Medical Sciences*, vol. 1, no. 2, pp. 101–115, 2004.
- [85] J. Blanc, R. Geney, and C. Menet, "Type II kinase inhibitors: an opportunity in cancer for rational design.," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.*, vol. 13, no. 5, pp. 731–47, 2013.

[86] V. A. Machado, D. Peixoto, M. J. Queiroz, and R. Soares, "Antiangiogenic 1-Aryl-3-[3-(thieno[3,2- *b*]pyridin-7-ylthio)phenyl]ureas Inhibit MCF-7 and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Lines through PI3K/Akt and MAPK/Erk Pathways," *Journal of Cellular Biochemistry.*, no. April 2016, pp. 1–24, 2016.

[87] B. Issa, I. M. Obaidat, B. A. Albiss, and Y. Haik, "Magnetic nanoparticles: Surface effects and properties related to biomedicine applications," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 11, pp. 21266–21305, 2013.

Capítulo 2

Capítulo 2 - Técnicas de análise e caracterização

2.1 Análise por Espectroscopia

A maioria dos estudos experimentais com biomoléculas envolve a sua interação com a radiação eletromagnética [1]. Quando a luz incide na matéria podem ocorrer vários processos, entre os quais a difusão e a absorção. Ambos os processos levaram ao desenvolvimento de técnicas fundamentais que permitem analisar e caracterizar biomoléculas. A interação entre a radiação eletromagnética e a matéria pode ser estudada por espectroscopia. Até ao fim do século XIX, a espectroscopia era limitada à absorção, emissão e dispersão de luz visível, ultravioleta e infravermelhos. Atualmente, inclui outros tipos de radiação eletromagnética, tais como raios-X, microondas, entre outras [2]. A espectroscopia UV-Visível tem tido um papel importante na determinação da estrutura de moléculas e das concentrações de moléculas em solução. O processo de absorção necessário para a determinação destes parâmetros depende das propriedades da radiação eletromagnética e das características estruturais da molécula em estudo [1].

A radiação eletromagnética possui *quanta* de luz (fotões) com um determinado valor de energia. Coincidentemente, as moléculas possuem níveis de excitação quantificados e podem absorver fotões com energia equivalente à necessária para a passagem de eletrões do estado fundamental para o estado excitado. Quando os fotões interagem com a matéria pode ocorrer a absorção deste fotão e da sua energia por parte da amostra [1,2].

2.1.1 Radiação eletromagnética

Comumente chamada de luz, a radiação eletromagnética é uma forma de energia cujo comportamento pode ser descrito pelas propriedades de ondas e de partículas. Algumas propriedades da luz, como a refração ao passar de um meio para o outro, são melhor explicadas se considerarmos a luz como uma onda. No entanto, ao considerarmos a absorção e a emissão, assumimos que o comportamento da luz é semelhante ao de uma partícula [2]. A radiação eletromagnética é caracterizada por ondas que se propagam linearmente no espaço, a uma

velocidade constante. Estas ondas são compostas por um campo elétrico e um campo magnético que oscilam perpendicularmente entre si e perpendicularmente à direção de propagação da onda (figura 2.1) [2].

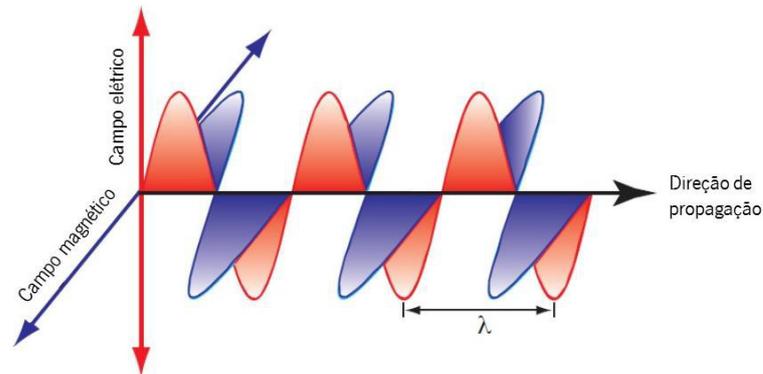


Figura 2.1 – Oscilações dos campos elétrico (vermelho) e magnético (azul) de radiação eletromagnética polarizada. Adaptado de [2].

A radiação eletromagnética é caracterizada essencialmente pela sua energia (E), comprimento de onda (λ) e frequência (ν), sendo as duas últimas grandezas referentes essencialmente ao seu comportamento ondulatório e relacionadas pela equação 2.1,

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \quad (2.1)$$

onde c representa a velocidade da luz no vácuo, $3 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$, λ representa o comprimento de onda, ou seja, a distância entre dois picos máximos de onda consecutivos e ν representa a frequência definida como o número de oscilações por unidade de tempo.

A radiação eletromagnética pode também apresentar comportamento corpuscular, devido à presença de partículas com energia, os fótons. A energia (E) dos fótons depende da frequência da radiação (ν). A relação entre as duas grandezas está representada na equação 2.2,

$$E = h \nu \quad (2.2)$$

Em que h representa a constante de Planck ($6.6256 \times 10^{-34} \text{ J s}^{-1}$). As equações 2.1 e 2.2 podem ser relacionadas através da equação 2.3.

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.3)$$

A radiação eletromagnética pode ser representada através de um espectro contínuo de ondas com diferentes propriedades (figura 2.2).

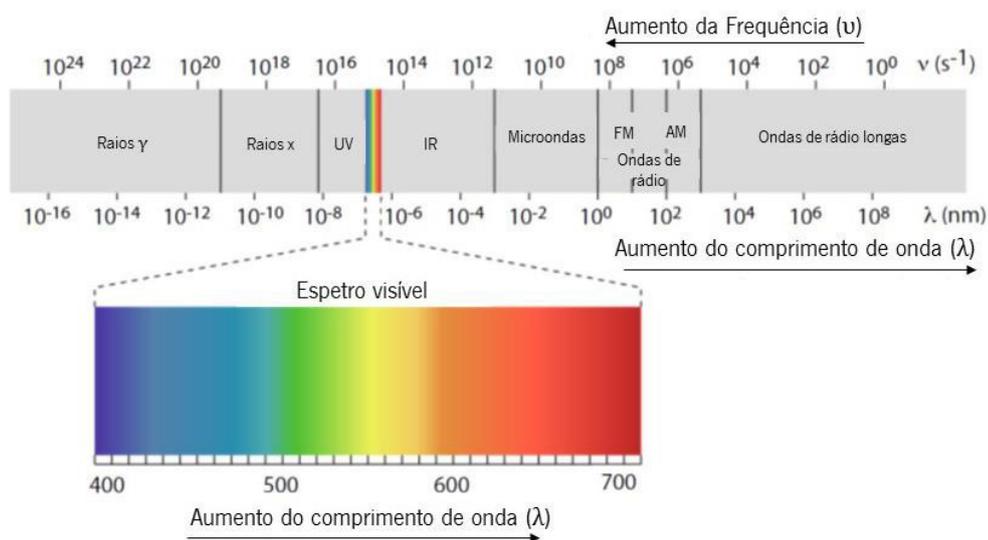


Figura 2.2 – Espectro da radiação eletromagnética, onde estão definidos os limites entre cada uma das regiões do espectro e os comprimentos de onda correspondentes. Adaptado de [2].

A maioria das regiões do espectro eletromagnético são de grande importância para estudos moleculares, nomeadamente a região UV-Visível ($\lambda \approx 180 - 800 \text{ nm}$). Nestas regiões, a radiação eletromagnética possui energia suficiente para excitar os elétrons de valência das moléculas e promover a passagem destes do estado fundamental para o estado excitado [1,2].

2.2 Espectroscopia de absorção UV-Visível

Quando a radiação eletromagnética interage com a matéria podem ocorrer vários processos, entre os quais a sua difusão ou transferência da sua energia para a amostra (absorção). O primeiro processo é chamado de difusão de Rayleigh e ocorre quando um fóton colide com uma molécula e é difratado sem sofrer alterações na sua frequência. O segundo processo é chamado de absorção e consiste na absorção da energia do fóton por parte das moléculas da amostra, ocorrendo, assim transições eletrônicas de estados de menor energia (estado fundamental) para estados de maior energia (estado excitado). Este processo apenas ocorre quando a energia dos fótons incidentes ($h\nu$) é igual à diferença de energia entre os dois estados de energia (ΔE) [1,2].

$$h\nu = \Delta E \quad (2.4)$$

Na espectroscopia de absorção UV- Visível, quando um fóton é absorvido por um átomo ou molécula ocorre a absorção da sua energia e, conseqüentemente, a transição entre níveis eletrônicos. O tipo de transição depende da energia do fóton, sendo que para fótons na gama do UV- Visível, são promovidas maioritariamente transições dos elétrons de valência para um nível de energia superior [2].

2.2.1 Transições eletrônicas

A energia total de uma molécula é, geralmente, representada pela soma da sua energia eletrônica, vibracional e rotacional. Como o nome indica, a energia eletrônica está associada com a distribuição dos elétrons nos átomos, a vibracional com a vibração dos mesmos nas moléculas e a energia rotacional diz respeito à rotação das moléculas em torno do seu eixo [3]. A quantidade de energia de uma molécula é representada por uma série de estados discretos e contínuos, que englobam os níveis de energia vibracionais e rotacionais (figura 2.3).

A absorção de radiação eletromagnética na gama UV-Visível induz geralmente uma modificação nos níveis de energia eletrônicos da molécula estudada, enquanto a radiação infravermelha apenas provoca mudanças na energia vibracional, sem causar qualquer alteração

nos níveis de energia da molécula [2,4]. À temperatura ambiente, a maioria das moléculas encontra-se no estado vibracional mais baixo do estado fundamental, sendo que transições para o estado excitado ocorrem sempre a partir deste nível.

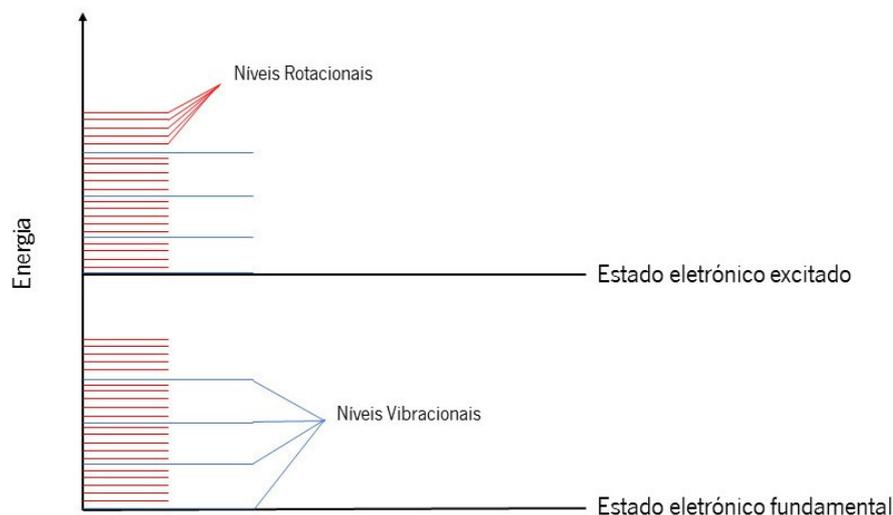


Figura 2.3 - Níveis de energia de uma molécula.

Nas moléculas, os elétrons podem ocupar orbitais moleculares ligantes (π, σ), antiligantes (π^*, σ^*) e não ligantes (n). Tendo em conta a energia de cada uma das orbitais tem-se [5]:

$$\sigma^* > \pi^* > n > \pi > \sigma$$

A estrutura da molécula no estado fundamental apenas permite que ocorram algumas transições. Na maioria das moléculas, as orbitais ligantes encontram-se cheias e, devido à rapidez da transição entre orbitais, esta só é possível em orbitais sobrepostas espacialmente. Consequentemente, os elétrons transitam maioritariamente para as orbitais antiligantes correspondentes (excetuando a orbital n) (figura 2.4) [4].

Se duas orbitais envolvidas na transição não possuírem sobreposição espacial, a probabilidade de a transição ocorrer será menor e, por isso a transição diz-se proibida por simetria, como é o caso de transições $n \rightarrow \pi^*$. Se, por outro lado, a sobreposição espacial se verificar, a transição passa a ser denominada permitida, sendo um exemplo destas as transições que ocorrem entre π e π^* . As transições que envolvem orbitais σ e σ^* , ocorrem geralmente em energias muito

elevadas na zona do ultravioleta. Por outro lado, as transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ envolvem grupos funcionais geralmente presentes nas moléculas analisadas e ocorrem com energias presentes na zona do UV-Visível, o que se mostra uma mais valia em espectroscopia de absorção [2,4]. As ligações e grupos funcionais que permitem a absorção de radiação na gama UV-Visível são chamados cromóforos ou fluoróforos [2].

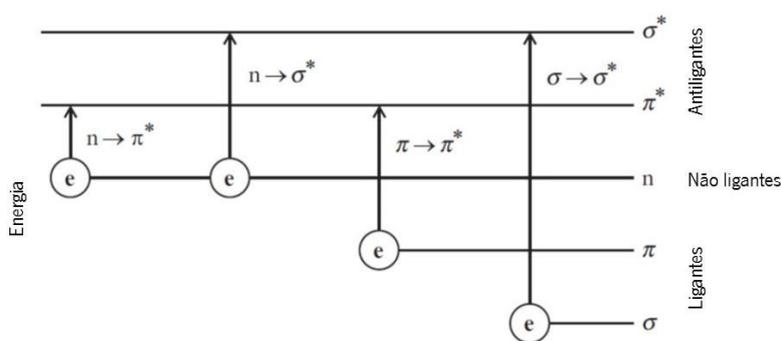


Figura 2.4 - Transições eletrônicas entre orbitais moleculares. Adaptado de [4].

2.2.2 Lei de Lambert – Beer

A atenuação da radiação eletromagnética quando atravessa uma amostra é normalmente apresentada em função do comprimento de onda. Teoricamente, apenas certos fótons com valores de energias específicos seriam absorvidos, resultando num espectro de absorção com picos de absorção discretos semelhantes aos de um átomo. No entanto, o facto de existirem níveis vibracionais distintos em cada nível de energia aumenta o número de transições possíveis, o que resulta num espectro largo com várias transições representadas. Este tipo de espectros é importante na identificação de moléculas, visto que o comprimento de onda de absorção depende dos grupos funcionais e do arranjo espacial dos átomos na amostra [1].

Ao atravessar um meio, a intensidade da luz é atenuada devido à absorção de certos comprimentos de onda. Esta atenuação é descrita por dois termos relacionados: transmitância (T)

e absorvância (A) [2]. Ambos caracterizam a relação entre a intensidade do feixe incidente (I_0) e o feixe transmitido (I) (equação 2.5) [3],

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.5)$$

sendo que a absorvância pode ser relacionada com a transmitância através da equação 2.6:

$$A = -\log T \quad (2.6)$$

Ao atravessar um meio, a radiação eletromagnética monocromática sofre um decréscimo na sua intensidade devido principalmente à absorção de fótons por parte da amostra (figura 2.5). A absorvância é a unidade mais comum para expressar a atenuação da radiação porque varia de forma linear com a concentração do analito [2][80].

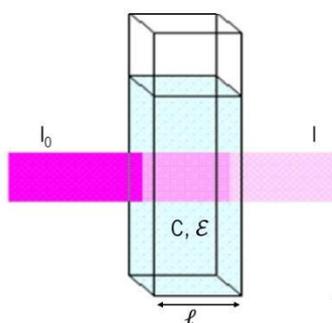


Figura 2.5 - Feixe de radiação eletromagnética a atravessar uma solução. Na imagem estão representadas as intensidades do feixe incidente (I_0) e o feixe transmitido (I), a concentração da espécie absorvente no meio (c), o percurso óptico da radiação (ℓ) e o coeficiente de absorção molar (ϵ).

A lei de Lambert-Beer estabelece a relação entre a absorvância de uma solução e a sua concentração [3,4]. Apesar de ser aceite que Lambert, em 1760, formulou a primeira teoria matemática deste efeito, há autores que consideram Bouguer (1729) como sendo o autor da

expressão matemática a partir da qual é possível de deduzir a expressão da lei de Lambert-Beer [3] (equação 2.7):

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-k\ell c} \quad (2.7)$$

em que k representa o coeficiente de absorção da espécie, ℓ o percurso ótico da radiação na amostra (cm) e c a concentração da espécie absorvente na solução (M).

A lei de Lambert-Beer é traduzida pela seguinte expressão matemática:

$$A = \epsilon \ell c \quad (2.8)$$

onde A representa a absorvância e ϵ o coeficiente de absorção molar ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). O coeficiente de absorção molar é característico de cada substância e dependente de condições controladas como a temperatura da solução e o solvente em que esta está inserida [3]. A lei de Lambert-Beer pode ser estendida a amostras com mais do que uma espécie absorvente, no caso de não se verificarem interações entre estas. Para uma amostra com duas espécies (X e Y) a absorvância total é dada pela expressão [2,3]:

$$A_{total} = A_X + A_Y = \epsilon_X \ell c_X + \epsilon_Y \ell c_Y \quad (2.9)$$

Apesar de ser um dos instrumentos matemáticos mais importantes na espectroscopia de absorção, a aplicação da lei de Beer apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. Apesar de ser assumido que existe uma relação linear entre o valor da absorvância e a concentração da amostra, esta suposição apenas é válida para concentrações relativamente baixas do analito pois para concentrações elevadas as moléculas absorventes interagem entre si, o que pode alterar os valores de absorvância [1,2].

Relativamente às limitações instrumentais, a lei de Lambert-Beer assume que a radiação utilizada na medição é monocromática. No entanto, independentemente da sofisticação do monocromador, há sempre passagem de radiação numa pequena gama de comprimentos de onda. Em segundo lugar, há a possibilidade de ser detetada radiação sem que esta tenha atravessado pela amostra, ou seja, sem ter sofrido um decréscimo na sua intensidade,

influenciando os resultados obtidos [1,2].

A escolha do solvente adequado para a análise é um parâmetro de grande importância uma vez que deve ser evitada a formação de pontes de hidrogénio entre o solvente e a molécula absorvente, reações entre ambos e verificada a inexistência de impurezas na solução. Em termos práticos, é também importante verificar a influência do solvente nas medidas de absorção, ou seja, verificar a sua transparência na gama de comprimentos de onda em estudo. Por essa razão, a sua absorvância é sempre tida em conta como a referência e subtraída da absorvância total [1]:

$$A_{amostra} = A_{total} - A_{ref} = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) - \log\left(\frac{I_0}{I_{ref}}\right) = \log\left(\frac{I_{ref}}{I}\right) \quad (2.10)$$

2.2.3 Espectrofotómetro

Um espectro de absorção consiste numa representação gráfica da absorvância de uma amostra em função do comprimento de onda da radiação incidente. Através da análise deste, é possível determinar os comprimentos de onda em que o composto em estudo apresenta maior capacidade de absorção.

O equipamento utilizado para medir a absorção de uma amostra designa-se espectrofotómetro, que pode ser de dois tipos: feixe único e feixe duplo ou dividido. Os espectrofotómetros de feixe único são geralmente mais simples e mais económicos; no entanto, este tipo de instrumento implica que as medições da amostra e da referência sejam efetuadas em separado, o que pode influenciar as medições. Num aparelho de feixe duplo, a luz proveniente da fonte de radiação é dividida em dois feixes que passarão simultaneamente na amostra e na referência. A leitura simultânea apresenta-se vantajosa, pois evita variações entre as medidas [4].

Nos espectrofotómetros UV-Visível, um feixe de luz de uma fonte de luz UV e/ou visível adequada é direcionado através de um monocromador de tipo prisma ou rede de difração. A luz atravessa então a amostra, antes de atingir o detetor e o sinal obtido é processado (figura 2.6) [4].

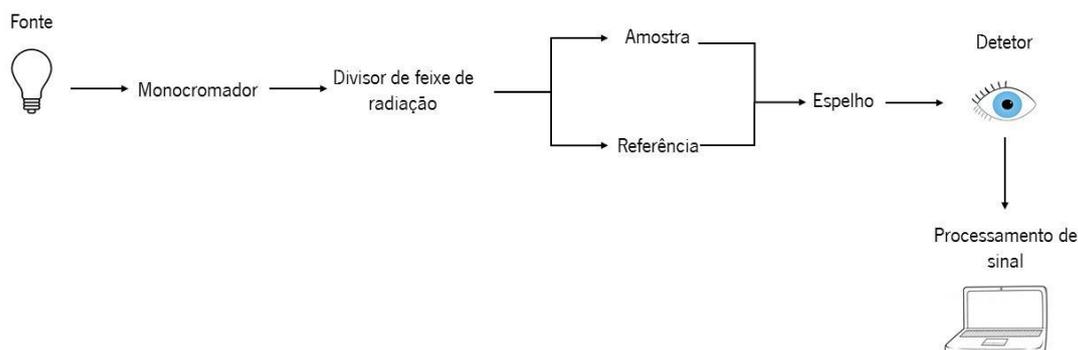


Figura 2.6 - Representação esquemática dos componentes essenciais de um espectrofotômetro de feixe duplo utilizado no decorrer deste trabalho.

2.3 Espectroscopia de fluorescência

Como referido na secção anterior, a interação entre fótons e moléculas provoca modificação do seu estado eletrónico devido à transição de eletrões para níveis de energia superiores (estado excitado).

Tendo em conta a multiplicidade, os estados eletrónicos da maioria das moléculas podem ser divididos em estados singuletos e estados tripletos. A multiplicidade é definida pela expressão $2S+1$, onde S representa a soma dos números quânticos de spin do sistema. Quando os spins dos eletrões se anulam ($S=0$), a multiplicidade do estado é 1 (estado singuleto). Por outro lado, se os eletrões se encontrarem desemparelhados ($S=1$) estamos perante um estado tripleto (figura 2.7).

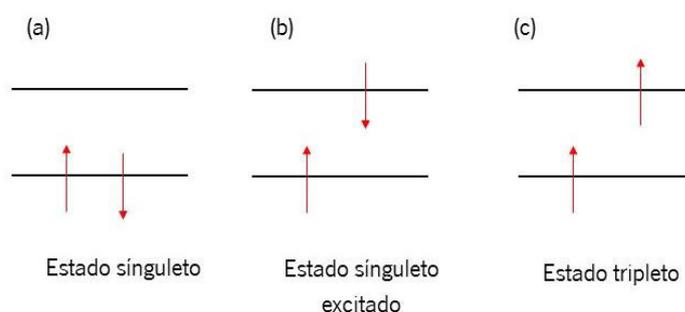


Figura 2.7 - Configurações eletrónicas para o estado singuleto (a), estado singuleto excitado (b) e estado tripleto (c).

As moléculas não permanecem no estado excitado muito tempo, regressando ao estado fundamental por mecanismos espontâneos de libertação de energia. A perda da energia pode ser efetuada por processos não radiativos (relaxamento vibracional, conversão interna, conversão externa e cruzamento intersistemas) e radiativos (fosforescência e fluorescência).

2.3.1 Processos não-radiativos e radiativos

Quando uma molécula perde energia sem emissão de um fóton, estamos perante processos não radiativos. Neste tipo de processos, a energia é libertada para o solvente ou para outras moléculas da solução. Existem quatro tipos de processos não radiativos: relaxamento vibracional, conversão interna, conversão externa e cruzamento intersistemas. No primeiro caso, a energia é libertada através da movimentação de uma molécula do nível de energia vibracional mais alto para o nível de energia vibracional mais baixo do mesmo estado eletrónico. Este processo é muito rápido, com uma vida média de 10^{-12} s. Como este processo é tão eficiente, uma molécula num dos níveis de energia vibracionais mais altos do estado excitado retorna rapidamente ao nível de energia vibracional mais baixo do estado excitado. Como consequência deste processo, a banda de fluorescência dos compostos é sempre desviada para maiores comprimentos de onda relativamente à banda de absorção - desvio de Stokes (figura 2.8) [2].

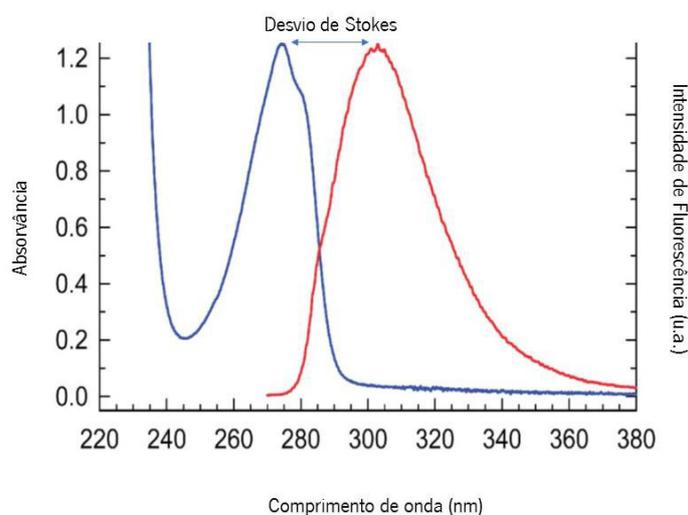


Figura 2.8 - Representação gráfica do desvio de Stokes. Adaptado de [2].

Na conversão interna, as moléculas são transferidas para um estado eletrônico de multiplicidade igual. Este processo ocorre quando os estados vibracionais mais baixos de um determinado estado eletrônico se sobrepõem aos estados vibracionais eletrônicos mais altos de um nível eletrônico de menor energia. Pela combinação entre conversões internas e relaxamentos vibracionais, a molécula pode regressar ao estado fundamental sem a emissão de fótons. Uma forma relacionada de perda de energia sem emissão de luz é a conversão externa, na qual o excesso de energia é transferido para o solvente ou para outro componente da amostra [2]. Por fim, o cruzamento intersistemas sucede quando a transição ocorre para estados eletrônicos de multiplicidades diferentes. Neste processo, uma molécula passa do nível de energia vibracional mais baixo de um estado para o nível de energia vibracional mais alto de um estado de spin diferente [2].

Por outro lado, algumas moléculas regressam ao seu estado fundamental através da emissão de luz - luminescência [1,6]. A luminescência é dividida em duas categorias: fluorescência e fosforescência, que diferem principalmente devido à natureza do estado excitado.

Em alguns casos, elétrons que se encontram num estado singuleto excitado (figura 2.7-b) podem transformar-se num estado tripleto excitado, o que significa que o seu spin já não se encontra emparelhado com o spin do elétron correspondente no estado fundamental. A emissão entre um estado tripleto e o estado fundamental é chamada de fosforescência [2]. Este tipo de emissão possui tempos de vida grandes, pelo que é possível que o processo de fosforescência se verifique mesmo após a remoção da fonte de excitação.

Em estados singuletos excitados, o elétron que transitou para o nível de energia superior não altera o seu spin. Consequentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido por spin e ocorre rapidamente através da emissão de um fóton. Este processo é chamado fluorescência, depende da estrutura molecular e permite a caracterização e análise de moléculas biologicamente significativas e processos dinâmicos entre elas [1]. O processo de fluorescência ocorre quando uma molécula no nível de energia vibracional mais baixo do estado excitado retorna a um estado eletrônico de energia inferior ao emitir um fóton. A duração deste processo é de cerca de 10 ns [6]. Como as moléculas retornam ao seu estado fundamental pelo mecanismo mais rápido, a fluorescência é observada apenas se for o processo de libertação de energia mais eficiente [2].

Na figura 2.9 é possível verificar um diagrama de Jablonski com a representação dos processos radiativos e não radiativos discutidos nesta secção.

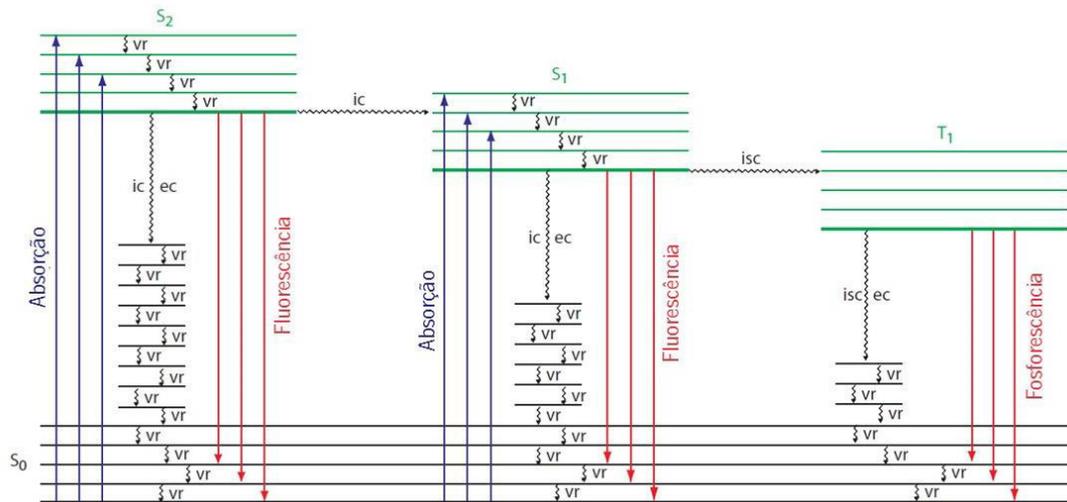


Figura 2.9 - Diagrama de níveis de energia para uma molécula, mostrando os processos de perda de energia radiativos e não radiativos: vr: relaxamento vibracional; ic: conversão interna; ec: conversão externa; isc: cruzamento intersistemas; \$S_0\$: estado fundamental; \$S_2\$, \$S_1\$: estados singletos excitados; \$T_1\$: estado tripleto excitado. Adaptado de [2].

2.3.2 Rendimento quântico de fluorescência

O tempo de vida (\$\tau\$) e o rendimento quântico de fluorescência (\$\Phi_F\$) são talvez as características mais importantes de um fluoróforo. O rendimento quântico de fluorescência é uma expressão quantitativa que representa a razão entre o número de fótons emitidos em relação ao número de fótons absorvidos (equação 2.11) [6]. O valor de \$\Phi_F\$ pode variar entre 0, quando a fluorescência não ocorre, e 1 quando cada molécula no estado excitado perde energia pelo processo de fluorescência [2].

$$\Phi_F = \frac{N^\circ \text{ de fótons emitidos}}{N^\circ \text{ de fótons absorvidos}} \quad (2.11)$$

Este parâmetro é dependente da temperatura, na medida em que é verificado um decréscimo no seu valor com o aumento da temperatura. Isto ocorre, pois os processos não radiativos relacionados com a agitação térmica são mais eficientes a temperaturas mais altas [7]. Na ausência de inibição de fluorescência, \$\Phi_F\$ é dado por:

$$\Phi_F = \frac{K_F}{K_F + K_{IC} + K_{ISC}} \quad (2.12)$$

onde K_F , K_{IC} e K_{ISC} representam as constantes de velocidade do processo de fluorescência, de conversão interna e de cruzamento intersistemas, respetivamente.

2.3.3 Anisotropia

A luz não polarizada propaga-se livremente em todas as direções do espaço, sendo que as ondas eletromagnéticas que a compõem vibram em planos perpendiculares à sua propagação. Os vetores elétrico e magnético giram perpendicularmente em torno do eixo de propagação da luz. Por sua vez, a luz polarizada propaga-se apenas num plano, o que significa que o vetor elétrico e o vetor magnético não rodam, oscilando num único sentido (figura 2.10).

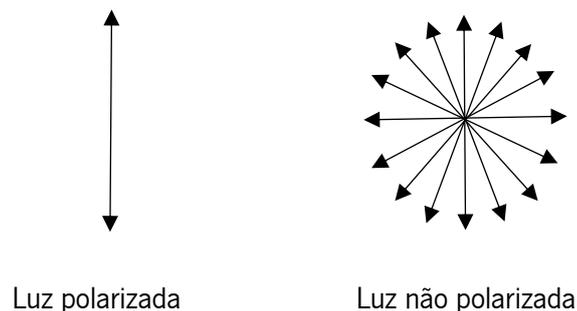


Figura 2.10 - Planos de propagação de ondas de luz polarizada e não polarizada.

Quando uma amostra é excitada com luz polarizada, apenas serão excitadas as moléculas cujos momentos de transição se encontram orientados paralelamente ao vetor elétrico da luz incidente. Esta excitação seletiva leva, por isso, a uma emissão de fluorescência polarizada por parte das moléculas fluorescentes. O termo “anisotropia” (r) foi inicialmente definido pelo professor Alexander Jablonski para descrever o nível de polarização da luz emitida por uma amostra [6,8].

A base dos estudos de anisotropia está na existência de momentos de transição para a absorção e emissão em direções específicas dentro da estrutura do fluoróforo. Os estudos de

anisotropia fornecem informações acerca da rigidez de ambientes onde as moléculas fluorescentes estão inseridas, associações interproteicas, entre outras [6,8].

A excitar uma solução homogénea com luz polarizada, as moléculas cujos momentos de transição se encontram orientados paralelamente ao vetor elétrico da luz incidente têm maior probabilidade de serem excitadas. No entanto, o dipolo elétrico da molécula não tem de estar necessariamente alinhado com o vetor elétrico da luz polarizada para ocorrer absorção da mesma. Desta forma, a população de fluoróforos excitados por esta luz pode apenas estar parcialmente orientada segundo este eixo. Este processo é chamado de fotoseleção (figura 2.11) [6,8].

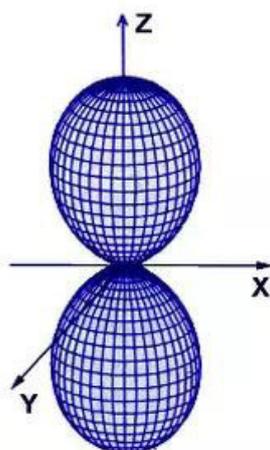


Figura 2.11 - Fotoseleção provocada por excitação com luz polarizada.

Os valores de anisotropia podem ser obtidos por espectroscopia de fluorescência através da equação:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (2.13)$$

onde r se refere à anisotropia, I_{VV} e I_{VH} representam a intensidade de fluorescência obtida com o polarizador de emissão na posição vertical e horizontal, respetivamente, para luz de excitação polarizada verticalmente; G é o rácio da sensibilidade do sistema de deteção para luz de excitação polarizada horizontalmente ($G = I_{HV} / I_{HH}$) e I_{HV} e I_{HH} são as intensidades de fluorescência obtidas com o polarizador de emissão na posição vertical e horizontal para luz de excitação polarizada horizontalmente.

Teoricamente, o valor de r máximo seria 1, se a população de moléculas excitadas

estivesse exatamente orientada paralelamente ao vetor elétrico da luz incidente. No entanto, devido à fotoseleção o valor é reduzido para 0,4 pois, como foi referido anteriormente, a população de moléculas excitadas pode apenas estar parcialmente orientada segundo este eixo. A luz polarizada pode ter outras origens, tais como a reflexão e difusão de luz por parte da amostra. Quando as medições de anisotropia são superiores ao valor anteriormente referido, podemos considerar a interferência de luz dispersa com os valores de anisotropia [6,8].

A emissão de fluorescência de uma dada amostra pode tornar-se despolarizada devido à difusão rotacional do fluoróforo. Dado que a taxa de difusão rotacional de uma molécula depende da viscosidade do solvente e das características estruturais da mesma (tamanho e forma), o estudo dos valores de anisotropia (e, conseqüentemente, os movimentos rotacionais dos fluoróforos) permite a aplicação desta técnica nos mais variados campos de investigação [8]. Numa solução fluida, os valores de anisotropia são geralmente próximos de 0 devido à difusão rotacional das moléculas. Esta difusão ocorre durante o tempo de vida do estado excitado e desloca o dipolo de emissão do fluoróforo. Desta forma, é possível relacionar os valores de anisotropia com o tempo de vida do estado excitado e com a difusão rotacional através da equação 2.14:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c} \right) \quad (2.14)$$

onde r é a anisotropia, r_0 é a anisotropia intrínseca (que seria observada na ausência de difusão rotacional), τ é o tempo de vida do estado excitado e τ_c corresponde ao tempo de difusão rotacional.

A medição da anisotropia fornece informação sobre o deslocamento angular relativo da molécula fluorescente entre o momento de absorção e de emissão [8]. Em meios pouco viscosos estas moléculas podem rodar livremente, por essa razão, durante o tempo de vida do estado excitado (1-10 ns) as moléculas emitem luz de forma aleatória, diminuindo assim a anisotropia da amostra. Desta forma, será possível concluir que as medições de anisotropia serão sensíveis a qualquer fator que afete a difusão rotacional. Um exemplo ilustrativo é a membrana celular, pois a difusão de compostos inseridos nesta ocorrem na escala dos nanossegundos e, por isso os valores de anisotropia são sensíveis à sua composição. De forma indireta, esta será também influenciada pela temperatura [8].

2.3.4 Transferência de energia (FRET)

FRET (do inglês *Förster Resonance Energy Transfer*) é um processo de transferência de energia que ocorre entre uma espécie doadora (D) e uma espécie aceitante (A). O FRET permite estudar interações moleculares e baseia-se na transferência de energia de excitação eletrônica, não radiativa, entre dois fluoróforos [9]. De modo a ocorrer FRET é necessário que o doador tenha um tempo de vida longo o suficiente, que as moléculas doadoras e aceitantes estejam a uma distância entre 1 e 10 nm e que o espectro de absorção do fluoróforo aceitante se sobreponha ao espectro de emissão de fluorescência do doador, ou seja, que seja verificada uma condição ressonante [7,10] (figura 2.12).

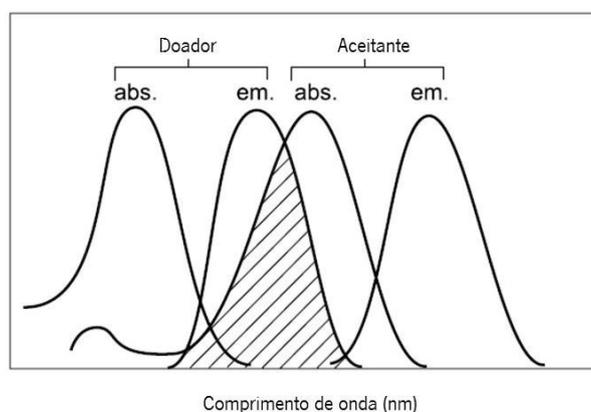


Figura 2.12 - Ilustração da sobreposição dos espectros de emissão do doador e de absorção do aceitante. Adaptado de [7].

A transferência de energia depende da extensão da sobreposição dos espectros de emissão e absorção do doador e do aceitante, respetivamente, do rendimento quântico de fluorescência do doador e da distância entre o doador e o aceitante. A dependência da distância resultou no uso do FRET para determinar a distância entre doadores e aceitantes em sistemas macromoleculares [11].

A eficiência deste processo, Φ_{FRET} , pode ser calculada a partir da equação 2.15:

$$\Phi_{FRET} = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (2.15)$$

em que F_{DA} e F_D representam a intensidade de fluorescência do doador na presença do aceitante e na ausência do aceitante, respetivamente [7]. A partir da equação anterior é ainda possível determinar a distancia entre doador-aceitante (r_{AD}), através da seguinte expressão:

$$r_{AD} = r_0 \times \left(1 - \frac{F_{DA}}{F_D}\right)^{1/6} \quad (2.16)$$

onde r_0 representa o raio de Förster, cujo valor varia entre 2 e 9 nm [10,11]. A eficiência desta transferência de energia é inversamente proporcional à sexta potência da distância entre doador e aceitante, tornando o FRET extremamente sensível a pequenas alterações na distância entre o doador e aceitante. O raio de Förster (distância crítica) pode ser obtido pela sobreposição espectral, $J(\lambda)$, entre a emissão do doador e a absorção do aceitador, de acordo com as equações 2.17 e 2.18 (com R_0 em Å, λ em nm, $\epsilon_A(\lambda)$ em $M^{-1} cm^{-1}$):

$$R_0 = 0.2108 [k^2 \Phi_D^0 n^{-4} J(\lambda)]^{1/6} \quad (2.17)$$

$$J(\lambda) = \int_0^\infty I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.18)$$

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

O rendimento quântico de fluorescência de um determinado composto é obtido experimentalmente pelo método do padrão, que consiste na comparação da área espectral obtida para o composto com a área obtida para uma referência (padrão) com rendimento quântico de fluorescência conhecido:

$$\phi_s = \left(\frac{A_r F_s n_s^2}{A_s F_r n_r^2} \right) \phi_r \quad (2.19)$$

onde A é o valor da absorvância no comprimento de onda de excitação, F é a área de emissão integrada e n é o índice de refração do solvente. Os subscritos r e s referem-se à referência e à amostra, respetivamente.

2.3.5 Espectrofluorímetro

A figura 2.13 mostra o esquema básico de um instrumento que permite medir a intensidade de fluorescência – espectrofluorímetro. Este aparelho inclui uma fonte de radiação contínua (geralmente uma lâmpada de arco de xénon), dois monocromadores, o primeiro que tem como objetivo selecionar o comprimento de onda de excitação antes de a radiação incidir na amostra, e o segundo que se encontra após a amostra, na direção perpendicular à luz de excitação e que permite a seleção de uma série de comprimentos de onda a serem medidos. Por fim, a radiação emitida é detetada e processada, dando origem ao espectro de emissão ou excitação. No primeiro caso, é selecionado um comprimento de onda onde a amostra absorve (no primeiro monocromador) e verificados todos os comprimentos de onda onde a amostra emite (segundo monocromador). Nos espectros de excitação são apresentados todos os comprimentos de onda onde a amostra pode ser excitada (no primeiro monocromador são selecionados uma gama de comprimentos de onda e no segundo é fixo um comprimento de onda onde a amostra emite) [2,6].

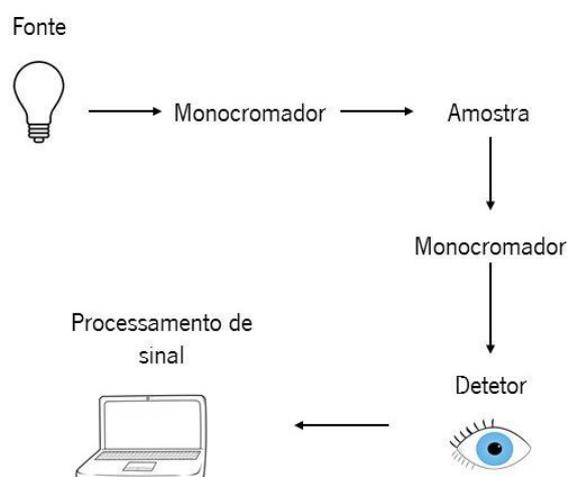


Figura 2.13 – Representação esquemática de um espectrofluorímetro.

Idealmente, os espectros de excitação e emissão registados representariam a intensidade relativa dos fótons por comprimento de onda. De modo a obter espectros com o mínimo de erros associados seria necessário que a fonte de radiação contínua produzisse o mesmo número de fótons em todos os comprimentos de onda, que o monocromador deixasse passar fótons de todos

os comprimentos de onda com eficácia independentemente da polarização da luz e que o detetor identificasse fótons de todos os comprimentos de onda [6].

2.2 Difusão Dinâmica de Luz (DLS)

Tal como o nome sugere, a técnica de DLS consiste no estudo da interação entre um feixe de luz monocromático de comprimento de onda conhecido (geralmente um laser) e uma solução que contém partículas em movimento browniano, e a transformação da interação ao longo do tempo [12].

Quando um feixe de luz monocromático incide numa solução de partículas em suspensão, a luz é difusa em todas as direções (difusão de Rayleigh), dependendo do tamanho e forma das partículas. A velocidade do movimento Browniano das partículas é definida pelo coeficiente de difusão translacional das mesmas e pode fornecer informações acerca das suas dimensões.

Para a mesma temperatura, partículas maiores dispersam mais luz e movimentam-se mais devagar, o que resulta em posições semelhantes ao longo do tempo. Por outro lado, partículas de menores dimensões movem-se mais rapidamente, dispersando menos luz (figura 2.14). Ao incidir numa solução de partículas com movimento Browniano, a luz é dispersa a um comprimento de onda diferente, dependendo do tamanho da partícula. Essa diferença no comprimento de onda é chamada de Efeito Doppler [13].

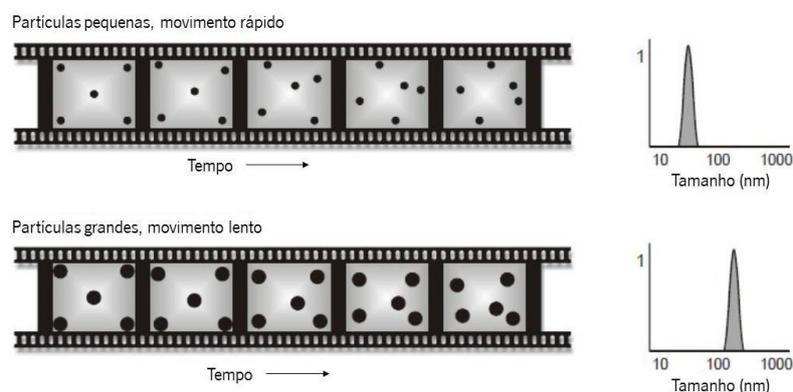


Figura 2.14 – Movimento browniano de partículas em solução. Relação entre velocidade e tamanho das partículas. Adaptado de [13].

Após atravessar a amostra, a luz dispersa é detetada por um fotomultiplicador, que se move horizontalmente, posicionado a um determinado ângulo relativamente à luz incidente.

Medindo o coeficiente de difusão translacional da partícula através da curva de correlação, é possível determinar o raio hidrodinâmico, r , utilizando a Equação de Stokes-Einstein e obter uma descrição do movimento das partículas:

$$r = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (2.20)$$

onde D é o coeficiente de difusão, k é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, η a viscosidade do solvente. É importante ressaltar que o diâmetro obtido a partir do DLS corresponde ao diâmetro hidrodinâmico, ou seja, o diâmetro de uma esfera que possui o mesmo coeficiente de difusão que a partícula. O coeficiente de difusão depende não só do tamanho do núcleo da partícula, mas também da estrutura superficial, a concentração e dos íões presentes no meio [14].

2.3 Difração de Raios-X (XRD)

A descoberta dos raios-X em 1895 por Röntgen permitiu avanços em todas as áreas científicas, sendo desenvolvidas várias técnicas de modo a tirar proveito das características únicas destes. Este tipo de radiação eletromagnética possui comprimento de onda compreendido entre 0.1 e 1 Å, podendo interagir com a matéria através de três mecanismos diferentes: efeito fotoelétrico, dispersão de Compton e dispersão de Thompson [15].

A difração de raios-X foi desenvolvida em 1912 por Laue, Friedrich, e Knipping e tornou possível o estudo de materiais cristalinos [15]. Nesta técnica, a interação predominante é a dispersão de Thompson, onde os fótons do feixe incidente e os fótons emitidos possuem a mesma energia [16,17]. A XRD permite obter informação acerca da estrutura cristalina das partículas e determinar o tamanho das mesmas.

Quando um feixe de raios-X incide numa amostra cristalina com arranjo atômico periódico, a amostra difrata os mesmos em diferentes direções [15,18]. A intensidade dos raios-X difratados

depende não só do arranjo atômico do cristal, mas também da espécie atômica. Quando consideramos a difração de raios-X de um cristal, são necessárias informações que dizem respeito à capacidade de dispersão por átomo. Como o núcleo de um átomo é relativamente pesado em comparação com um fóton, este não participará na dispersão do mesmo. Por essa razão, a capacidade de difratar raios-X depende apenas dos elétrons do átomo [17].

Os feixes difratados geram fenômenos de interferência, que podem ser construtivos ou destrutivos. No primeiro caso, em que estes geram fenômenos que produzem uma interferência construtiva, ocorre a difração do feixe em direções bem definidas, conservando a energia inicial. A direção e intensidade dos raios difratados dependem da simetria, do número atômico e da distribuição dos átomos na amostra fornecendo, desta forma, informações acerca da estrutura tridimensional da amostra [18].

Quando consideramos dois planos de uma rede cristalina, a ocorrência da difração de raios-X é dependente da diferença do caminho percorrido pelos feixes de raios-X difratados por 2 átomos de diferentes planos e do comprimento de onda da radiação incidente. A nível atômico podemos supor que cada átomo constituinte da amostra, quando atingido por raios-X de um determinado comprimento de onda, difrata a radiação. A configuração periódica dos átomos nos cristais causa interferências de fase entre a radiação difratada e a radiação incidente. O feixe de radiação incidente pode também penetrar os átomos na camada seguinte do cristal, que produzem outro feixe difratado [19].

Para uma radiação incidente monocromática de comprimento de onda conhecido, a difração da mesma ocorre quando a lei de Bragg é verificada [17]. Esta lei interpreta a difração da radiação incidente por átomos presentes num cristal e é descrita pela seguinte expressão:

$$2d \sin \theta = \lambda \quad (2.21)$$

onde d representa a distância entre planos atômicos e θ representa o ângulo de incidência.

Como os planos de difração, as distâncias entre planos, e as densidades atômicas são características específicas de cada material cristalino, o padrão obtido por difração de raios-X também será. Tendo em conta os picos do difratograma de XRD, é possível deduzir o tamanho

dos cristais, a partir da equação de Scherrer:

$$t = \frac{k\lambda}{B \cos\theta} \quad (2.22)$$

na qual t representa o tamanho do cristal, B a largura a meia altura, k a função da forma geométrica da partícula (geralmente assumimos o valor 0,9) e θ representa o ângulo de incidência.

2.4 Microscopia eletrónica

Desde a sua descoberta, a microscopia eletrónica permitiu a cientistas e engenheiros a observação de materiais à nanoescala, e das suas propriedades. A possibilidade da observação de partículas de tamanhos reduzidos levou ao desenvolvimento de nanotecnologias completamente novas e também possibilitou desenvolvimentos notáveis a partir de engenharia nanométrica de componentes [20].

O primeiro microscópio eletrónico de varredura (SEM) foi desenvolvido em 1942 com os primeiros instrumentos comerciais por volta de 1965 [21]. Os microscópios SEM foram projetados principalmente para examinar a superfície de materiais, enquanto que os microscópios eletrónicos de transmissão (TEM) são projetados principalmente para examinar a estrutura interna das espécies. O TEM foi desenvolvido por Max Knoll e Ernst Ruska na Alemanha em 1931. Neste microscópio é utilizado um feixe de eletrões (com energias compreendidas entre 80 – 300 keV) que interage e atravessa a amostra de modo a obter uma imagem em profundidade da mesma [20,21].

Na microscopia eletrónica de transmissão, é possível visualizar a estrutura atómica da amostra analisada [21]. O TEM é geralmente a técnica mais utilizada para o estudo da estrutura interna de nanossistemas, como fibras, filmes finos e nanopartículas e permite medições precisas e estudos em diferentes tipos de materiais, sendo que é possível a observação à escala atómica utilizando o modo HRTEM [21,22]. Os componentes chave de um TEM são uma fonte de eletrões, lentes que permitem o foco do feixe de eletrões antes e após a passagem pelo substrato analisado, e um sistema de deteção dos eletrões transmitidos [20].

O TEM é a técnica mais poderosa para determinar o tamanho e a morfologia das

partículas, reportando o tamanho total da NP e fornecendo detalhes acerca da sua distribuição de tamanho, forma e também estrutura interna.

2.5 Testes em linhas celulares

O ensaio da sulforodamina B (SRB) (figura 2.15), desenvolvido por Skehan e colegas [23], permite medir a citotoxicidade induzida por compostos. O seu princípio baseia-se na capacidade do corante SRB se ligar de forma eletrostática e dependente do pH a resíduos de aminoácidos básicos das proteínas das células. Desta forma, uma diminuição na proteína celular total causada por um composto também pode ser usada como parâmetro de viabilidade celular.

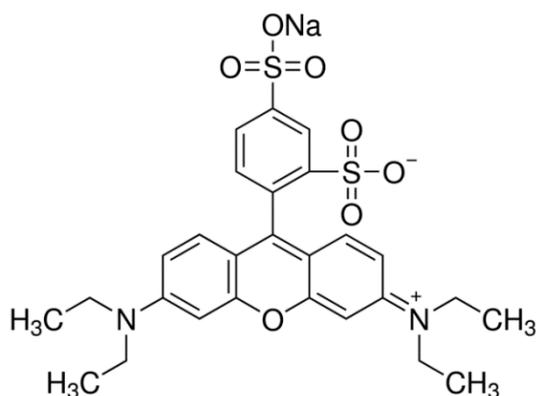


Figura 2.15 - Estrutura da Sulforodamina B.

O ensaio SRB apresenta-se como um ensaio não destrutivo e permanentemente estável. Esses avanços práticos tornam o ensaio SRB um ensaio adequado e sensível à citotoxicidade induzida mesmo em aplicações de grande escala. O ensaio SRB representa um ensaio adequado e sensível para medir a citotoxicidade induzida por compostos e é útil para quantificar a clonogenicidade das células e permite obter os valores de GI_{50} , ou seja, a concentração necessária de composto capaz de inibir o crescimento em 50% das células [24,25]. O GI_{50} é corrigido para a contagem de células no tempo zero (início da exposição ao composto) e segue a seguinte expressão:

$$GI_{50} = 100 \times \left(\frac{T - T_0}{C - T_0} \right) \quad (2.23)$$

onde T é a densidade ótica após a exposição a uma determinada concentração de composto, T_0 é a densidade ótica no início da exposição ao composto e C é a densidade ótica do controle.

2.6 Referências bibliográficas do capítulo 2

- [1] R. F. Boyer, "Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques", 2nd ed. New Jersey, 2012.
- [2] D. Harvey, "Modern Analytical Chemistry", 1st ed. San Francisco, 2000.
- [3] T. Owen, "Principles and applications of UV-visible spectroscopy: A primer.", Hewlett-Packard, 1996.
- [4] M. Nilapwar, S. M., Nardelli, M., Westerhoff, H. V., Verma, "Absorption Spectroscopy," in *Methods in enzymology*, M. L. S. John N. Abelson, Ed. Manchester, 2011, pp. 60–75.
- [5] H. Förster, "UV/VIS Spectroscopy," in *Molecular Sieves - Characterization*, Springer Berlin Heidelberg, 2004, pp. 337–426.
- [6] J. R. Lakowicz, "Introduction to fluorescence," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Ed. Springer US, 2006, pp. 1–26.
- [7] B. Valeur, "Molecular fluorescence - principles and applications.", Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- [8] J. R. Lackowicz, "Fluorescence Anisotropy," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., J. R. Lakowicz, Ed. Springer US, 2006, pp. 353–382.
- [9] A. R. O. Rodrigues, I. T. Gomes, B. G. Almeida, J. P. Araújo, E. M. S. Castanheira, and P. J. G. Coutinho, "Magnetoliposomes based on nickel/silica core/shell nanoparticles: Synthesis and characterization," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 148, no. 3, pp. 978–987, 2014.
- [10] N. Hildebrandt, "How to Apply FRET: From Experimental Design to Data Analysis," in *FRET - Förster Resonance Energy Transfer*, Wiley-VCH, I. Medintz and N. Hildebrandt, Eds. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013, pp. 105–163.
- [11] J. Green, "Optical Spectroscopy," in *Handbook of Spectroscopy*, G. Gauglitz and T. Vo-Dinh, Eds. Weinheim, 2003, pp. 279–287.
- [12] E. Eiser, "Dynamic Light Scattering," in *Multi Length-Scale Characterisation*, D. W. Bruce, D. O'Hare, and R. I. Walton, Eds. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014, pp. 233–279.

- [13] D. Arzenšek, R. Podgornik, and D. Kuzman, "Dynamic light scattering and application to proteins in solutions." University of Ljubljana, Faculty of mathematics and Physics, Ljubljana, pp. 1–18, 2010.
- [14] Malvern Instruments, "Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes," Technical note. Worcestershire, UK, pp. 1–8, 2014.
- [15] H. A. Hauptman, "History of X-Ray Crystallography," in *Science of Crystal Structures - Highlights in Crystallography*, 1st ed., I. Hargittai and B. Hargittai, Eds. Springer International Publishing, 2015, pp. 19–22.
- [16] S. Rouzière, D. Bazin, and M. Daudon, "In-lab X-ray fluorescence and diffraction techniques for pathological calcifications," *Comptes Rendus Chimie*, vol. 19, no. 11–12, pp. 1404–1415, 2016.
- [17] Y. Waseda, K. Shinoda, and E. Matsubara, "X-Ray Diffraction Crystallography". Sendai, Japan: Springer International Publishing, 2011.
- [18] A. Cassetta, "X-Ray Diffraction (XRD)," in *Encyclopedia of Membranes*, E. Drioli and L. Giorno, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, pp. 1–3.
- [19] A. C. T. North, "*X-Ray Crystallography of Macromolecules, Theory and Methods*, 2nd ed. Leeds, 2010.
- [20] B.J. Inkson, "Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM)," in *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, G. Ubschen, I. Altpeter, R. Tschuncky, and H.-G. Herrmann, Eds. Sheffield, UK: Woodhead Publishing, 2016, pp. 17–43.
- [21] B. Voutou, E. Stefanaki, and K. Giannakopoulos, "Electron Microscopy: The Basics," *Physics of Advanced Materials Winter School*. Thessaloniki, pp. 1–11, 2008..
- [22] L. H. Reddy, J. L. Arias, J. Nicolas, and P. Couvreur, "Magnetic nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications," *Chemical Reviews*, vol. 112, pp. 5818–5878, 2012.

[23] P. Skehan R.Storeng, D.Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, B.R Boyd., "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening," *Journal of the National Cancer Institute.*, vol. 82, no. 13, pp. 1107–1112, 1990.

[24] V. Sumantran, "Cellular Chemosensitivity Assays: An Overview," *Methods Mol. Biol.*, vol. 731, pp. 219–236, 2011. [1] V. Sumantran, "Cellular Chemosensitivity Assays: An Overview," *Methods in Molecular Biology.*, vol. 731, pp. 219–236, 2011.

[25] W. Voigt, "Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity," *Methods in Molecular Medicine*, vol. 110. pp. 39–48, 2005.

Capítulo 3

Capítulo 3 - Procedimento experimental

Neste capítulo será dado destaque ao procedimento experimental realizado ao longo da dissertação. Todas as soluções foram preparadas em solventes de grau espectroscópico e água ultrapura, esta última cedida pelo Departamento de Ciências da Terra.

As medidas de absorção e fluorescência foram realizadas no Laboratório de Fotofísica do Centro de Física da Universidade do Minho. Os espectros de absorção foram medidos num espectrofotómetro UV-Vis-NIR Shimadzu, modelo UV-3101PC. Os espectros de emissão de fluorescência foram medidos num espectrofluorímetro Fluorolog 3, com monocromadores duplos na excitação e emissão e um porta-amostras com controlo de temperatura. As medidas de absorção e fluorescência foram efetuadas em células (em inglês, *cuvettes*) de absorção e fluorescência de quartzo, de 10 nm de percurso ótico.

As medidas de difusão dinâmica de luz (DLS) foram realizadas no Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho.

Os estudos em linhas celulares foram efetuados no Centro de Investigação Montanha do Instituto Politécnico de Bragança.

3.1 Preparação das nanopartículas de ferrites mistas de cálcio e magnésio

Durante o desenvolvimento da tese, foram sintetizadas nanopartículas de ferrites mistas de cálcio e magnésio e de ferrites de cálcio pelo método de coprecipitação química (Figura 3.1). Seguindo o procedimento descrito em Hirazawa *et al.*, 2008 [1] foram preparadas nanopartículas com diferentes proporções de cálcio e magnésio. Para isso, foram utilizados os seguintes reagentes:

- Sulfato de Magnésio (MgSO_4), de massa molar $120,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$;
- Acetato de cálcio hidratado ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}\cdot\text{H}_2\text{O}$) de massa molar $158,17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$;
- Cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) de massa molar $270,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Os constituintes das nanopartículas e as respetivas quantidades e concentrações estão representados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Componentes utilizados para a síntese por coprecipitação e respectivas quantidades (m) e a sua concentração final (C_f).

		Sulfato de magnésio	Acetato de cálcio hidratado	Cloreto de ferro (III) hexahidratado
CaFe_2O_4	m (g)	–	0,158	0,54
	C_f (M)	–	0,5	1
$\text{Mg}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$	m (g)	0,06	0,079	0,54
	C_f (M)	0,250	0,250	1

Os constituintes descritos na tabela foram dissolvidos em 2 mL de água ultrapura (grau Milli-Q), de acordo com as proporções indicadas e esta solução foi seguidamente adicionada, gota a gota, a uma solução de NaOH (6 M, 1,4 mL) + 1,6 mL de H_2O previamente aquecida a 90 °C. A amostra resultante foi lavada por decantação magnética, descartando o sobrenadante.

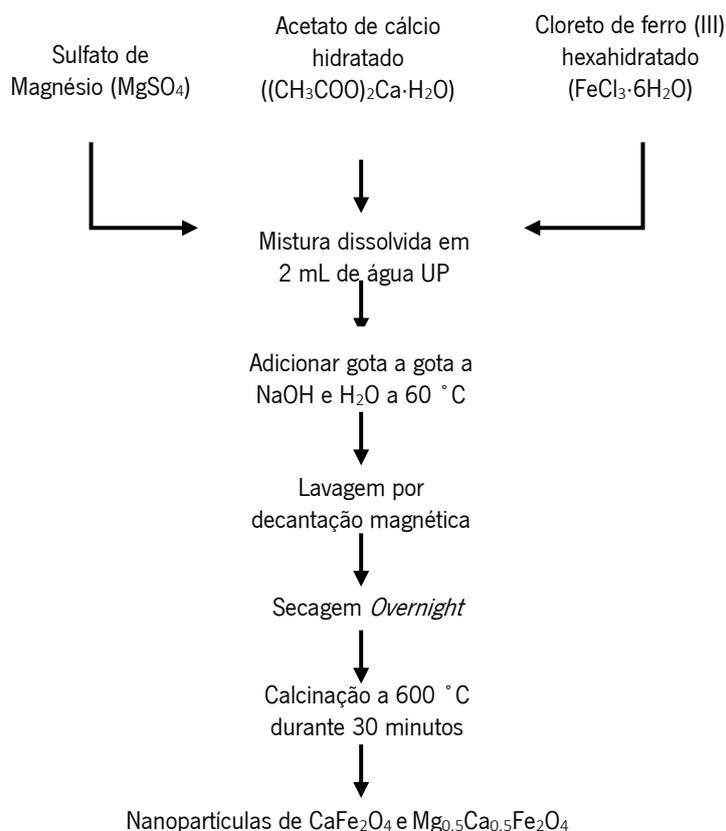
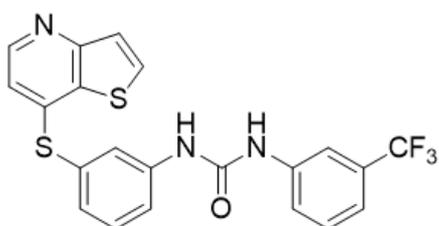


Figura 3.1 – Diagrama de fluxo do processo de síntese das nanopartículas por coprecipitação.

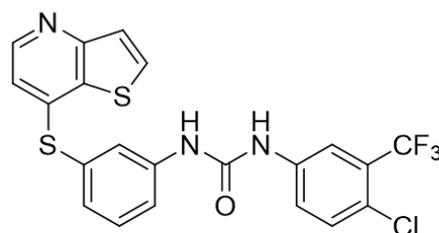
As partículas foram calcinadas durante 30 minutos a 600 °C. No final, foram obtidos 178,6 mg de CaFe_2O_4 e 131,3 mg de $\text{Mg}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$.

3.2 Compostos baseados em diarilureias derivadas de tienopiridinas

Os compostos antitumorais (moléculas baseadas em diarilureias derivadas de tienopiridinas) estudados foram sintetizados e purificados pelo Centro de Química da Universidade do Minho. O seu potencial antitumoral foi avaliado em [2,3]. Na figura 3.2 estão representadas as estruturas dos compostos utilizados neste estudo.



Composto 1



Composto 2

Figura 3.2 - Estrutura dos compostos utilizados no estudo.

As massas molares destes compostos são $445,48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (composto 1) e $479,93 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (composto 2). As soluções-mãe dos compostos foram preparadas em etanol, com uma concentração final de cerca de $2 \times 10^{-4} \text{ M}$.

3.3 Estudo fotofísico dos compostos em solução

As propriedades fotofísicas dos compostos foram avaliadas em vários solventes, através de medidas de absorção e de fluorescência. Os estudos foram efetuados com concentrações finais

de 1×10^{-5} M, tanto para as análises de fluorescência como para as medidas de absorção. Os solventes utilizados foram: acetato de etilo, acetonitrilo, ciclohexano, clorofórmio, diclorometano, dioxano e etanol.

Todos os solventes possuem um comprimento de onda de *cut-off* de absorvância UV-VIS, este define-se como o comprimento de onda abaixo do qual o próprio solvente absorve. Os fornecedores dos solventes e os respectivos valores de *cut-off* estão representados na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Fornecedores dos solventes e valores de *cut-off* dos mesmos.

	Fornecedor	$\lambda_{\text{cut-off}}$ (nm)
Acetato de etilo	Sigma-Aldrich	255
Acetonitrilo	Sigma-Aldrich	190
Ciclohexano	Sigma-Aldrich	200
Clorofórmio	Sigma-Aldrich	245
Diclorometano	Sigma-Aldrich	235
Dioxano	Fluka	215
Etanol	Appllichem	205

3.4 Rendimento quântico de fluorescência

Os rendimentos quânticos de fluorescência dos compostos estudados foram determinados a partir do método padrão ou referência (equação 3.1), descrito em [4,5]. O rendimento quântico de fluorescência de cada composto é obtido a partir da comparação da área espectral obtida para os compostos com a área obtida para a referência com rendimento quântico de fluorescência conhecido.

$$\phi_s = \left(\frac{A_r F_s n_s^2}{A_s F_r n_r^2} \right) \phi_r \quad (3.1)$$

onde A é o valor da absorvância no comprimento de onda de excitação, F é a área de emissão integrada e n é o índice de refração do solvente. Os subscritos r e s referem-se à referência e à amostra, respetivamente.

Como referência foi utilizada uma solução de triptofano a pH=7.2 de concentração 1×10^{-5} M, cujo rendimento quântico de referência (Φ_r) é 0,14 a 25 °C [6].

3.5 Preparação dos lipossomas

Os lípidos utilizados na formulação dos lipossomas estão representados na tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Lípidos utilizados na formulação de lipossomas, descrição das soluções stock dos mesmos e fornecedores.

Lípidos	Soluções <i>Stock</i>	Fornecedor
DODAB (brometo de <i>dioctadecildimetilamónio</i>)	20 mM em etanol	Sigma-Aldrich
DPPC (<i>dipalmitoilfosfatidilcolina</i>)	20 mM em etanol	Sigma-Aldrich
Egg-PC (<i>fosfatidilcolina</i> ou <i>lecitina do ovo</i>)	180 mM em clorofórmio	Sigma-Aldrich

Os lipossomas foram preparados através do método de injeção etanólica [7,8]. Este método foi inicialmente descrito em 1973 por Batrzi e Korn [7] como uma alternativa para a síntese de SUVs sem necessidade de extrusão. Consiste na co-injeção de uma solução etanólica de fosfolípidos e composto numa solução tampão obtida a partir de uma solução mista 0,2 M em ácido bórico (Aldrich, MW=61,83 g mol⁻¹) e 0,05 M em ácido cítrico (Aldrich, MW=210,14 g mol⁻¹) e de uma solução 0,1 M de fosfato de sódio decahidratado (Aldrich, MW=380,12 g mol⁻¹), de pH=7,4. Para a preparação dos lipossomas, a mistura fosfolípido+composto foi adicionada gota a gota ao tampão, sob agitação vigorosa. Para a formação das vesículas de DPPC e de DODAB, a solução tampão foi previamente aquecida a cerca de 60 °C, de modo a estar acima da temperatura de transição, T_m destes lípidos. No caso dos lipossomas com Egg-PC, a injeção do mesmo foi

efetuada gota a gota em solução tampão à temperatura ambiente, pois, a esta temperatura o lípido já se encontra na sua fase líquido cristalina [81].

A agitação constante e vigorosa vai permitir a dissipação de energia, levando a que os fragmentos de bicamadas planares originalmente formados diminuam a exposição das partes hidrofóbicas dos seus constituintes ao ambiente aquoso, resultando na curvatura dos fragmentos, formando estruturas aproximadamente esféricas denominadas lipossomas [8].

3.6 Estudo fotofísico dos compostos em lipossomas

O comportamento dos compostos em vesículas lipídicas (lipossomas) foi também alvo de estudo. Para esse efeito, os compostos foram incorporados em lipossomas com concentração de $5 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Foram também preparados lipossomas de Egg-PC com colesterol numa proporção de (7:3). O colesterol representa cerca de 20-30 mol% da membrana lipídica das células animais, permitindo a estabilização da membrana quando esta se encontra na fase líquido-cristalina [9].

3.7 Medidas de anisotropia

Neste trabalho, foram estudados os efeitos de vários lípidos na composição da bicamada lipídica nos valores de anisotropia dos fármacos (moléculas fluorescentes), inseridos nesta. Como os lípidos possuem uma temperatura a partir da qual ficam mais fluidos e oferecem menos restrições de movimento aos fluoróforos (T_m) (ver capítulo 1, secção 1.2.2), quando a amostra se encontra acima desta temperatura, os lípidos da membrana perdem rigidez e, por essa razão, o meio em que as moléculas estão inseridas torna-se mais fluido, diminuindo a anisotropia por consequência do aumento da difusão rotacional das moléculas fluorescentes.

A localização dos compostos nas diferentes estruturas foi estudada por anisotropia de fluorescência em estado estacionário. Estas medidas foram conseguidas através da obtenção de espetros de fluorescência com recurso a polarizadores.

3.8 Encapsulamento das nanopartículas e compostos em lipossomas

O encapsulamento das nanopartículas em lipossomas foi realizada através de dois métodos.

O primeiro método consiste na adição gota a gota de mistura de lípidos (10^{-3} M) e composto (10^{-5} M) em etanol numa solução aquosa de nanopartículas dispersas (4×10^{-4} M) sob vórtex. Através deste método, são obtidos magnetolipossomas aquosos [11,12]. No final efetua-se lavagem por decantação magnética de modo a remover as nanopartículas não encapsuladas, em que é guardado o sobrenadante onde estão presentes os AMLs.

Para a formação de magnetolipossomas sólidos, foi seguido o método desenvolvido por Rodrigues *et al.* (2015,2016) em [13,14]. As nanopartículas (3×10^{-4} M) foram dispersas em 10 μ L de água ultrapura e ultrasonicou-se a dispersão. De seguida, foram adicionados 3 mL de clorofórmio e a mistura é aquecida, de modo a ficar acima da T_m do lípido em questão aquando da injeção do mesmo. O lípido é, então, injetado rapidamente à mistura sob agitação constante de modo a formar a primeira camada lipídica. De seguida, a solução é lavada por decantação magnética de modo a remover o lípido em excesso, adicionando, no fim de cada lavagem, 3 mL de H_2O . A segunda camada lipídica é formada por injeção do lípido na solução aquosa contendo as nanopartículas (já com uma camada lipídica). Os magnetolipossomas resultantes são lavados e purificados por centrifugação, de forma a preservar a estrutura dos mesmos.

3.9 Estudos de interação com modelos de membrana celular

3.9.1 Interação dos AMLs com modelos de membrana

Os modelos membranares são úteis para estudar muitos processos celulares, incluindo interações não-específicas com magnetolipossomas. Como modelos de membrana, foram utilizados GUVs (*Giant Unilamellar Vesicles*) de lecitina de soja (10^{-3} M, $776 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Estes foram preparados a partir da hidratação de filme lipídico com 40 μ L de H_2O , seguida da incubação do mesmo durante 30 minutos a cerca de 45°C . De seguida, foram adicionados 5 mL de glucose 0,1 M e a solução resultante foi incubada durante duas horas a 37°C . Por fim, a solução foi

centrifugada durante 30 minutos a 12000 rotações por minuto de modo a eliminar agregados moleculares de pequenas dimensões [15,16].

A avaliação da interação não-específica dos magnetolipossomas aquosos com modelos de membranas (GUVs) foi estudada por transferência de energia de ressonância (FRET). Este processo fotofísico permite estudar interações moleculares e baseia-se na transferência de energia de excitação eletrônica, não radiativa, entre dois fluoróforos [17]. Na figura 3.3 está representada a sobreposição espectral entre dois fluoróforos, necessária para a ocorrência de FRET.

Como marcadores fluorescentes, foram utilizadas as sondas curcumina (doador) e Nile Red (aceitante) a uma concentração de 2×10^{-6} M. A estrutura destes marcadores está representada na figura 3.3.

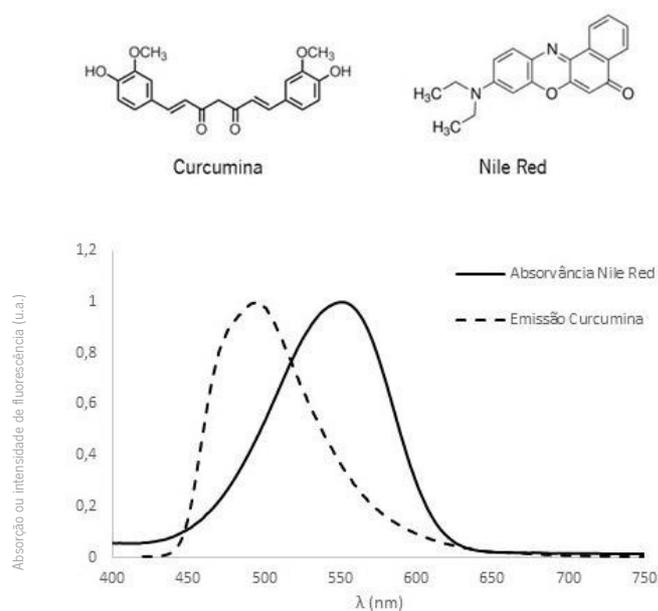


Figura 3.3 - Estrutura dos marcadores fluorescentes e sobreposição espectral.

Desta forma, quando ocorre a fusão com os GUVs, a distância entre o doador e o aceitante aumenta. Isto é verificado através de um aumento na intensidade de fluorescência da emissão do doador e diminuição da intensidade na banda de emissão do aceitante (figura 3.4).

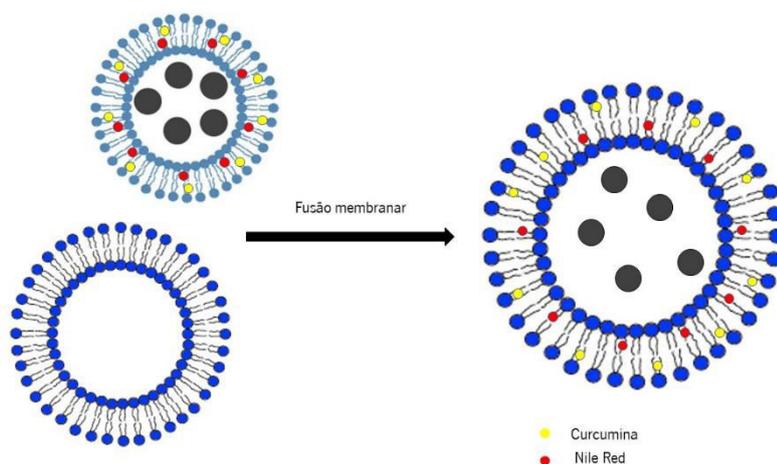


Figura 3.4 - Interação com modelos membranares por FRET.

3.9.2 Estudos de interação com modelos membranares por *unquenching*

A interação não específica dos magnetolipossomas sólidos com modelos celulares (GUVs) foi avaliada por alterações na emissão de fluorescência do fluoróforo incorporado. Devido ao fato de os SMLs possuírem maior concentração de nanopartículas e de estas absorverem numa grande região espectral, a emissão de fluorescência por parte do fluoróforo poderá ser inibida, devido à proximidade entre o *cluster* de nanopartículas e o mesmo (*quenching*). Ocorrendo interação com os GUVs, o aumento da distância entre o cluster de nanopartículas e a sonda fluorescente NBD-C₁₂-HPC, fará aumentar a fluorescência da sonda (figura 3.5).

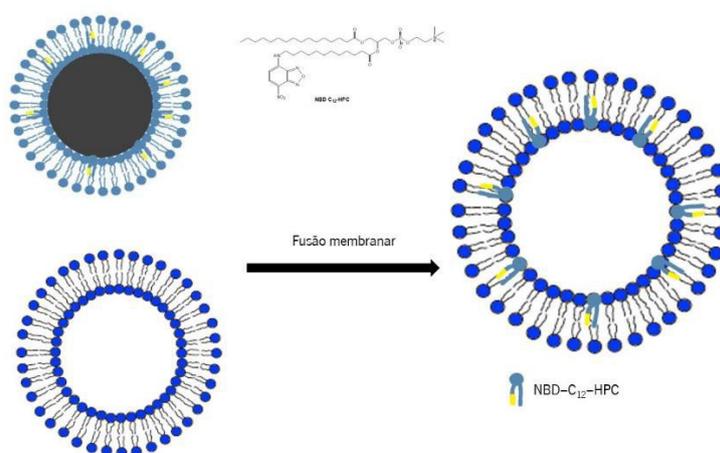


Figura 3.5 – Estrutura da sonda NBD-C₁₂-HPC e interação dos SMLs com modelos membranares por unquenching.

3.10 Cálculo da eficiência de encapsulação dos compostos

O cálculo da eficiência de encapsulação, EE (%), dos compostos foi determinada através do método descrito em [20]. Após a preparação dos magnetolipossomas carregados com os compostos, seguindo o processo descrito anteriormente neste capítulo, os mesmos foram centrifugados durante 10 minutos a 4000 rpm. Na figura 3.6 está representado o resultado obtido após a centrifugação.



Figura 3.6 – Ilustração representativa do resultado obtido após a centrifugação dos Magnetolipossomas. A- Composto encapsulado; B- Composto não encapsulado. Adaptado de [19].

Após a centrifugação, foram obtidos os espectros de emissão do composto não encapsulado (B) e do composto encapsulado (A), determinando assim as concentrações a partir da curva de calibração obtida anteriormente. Foram realizadas três medidas para cada sistema e a eficiência de encapsulamento dos compostos foi obtida a partir da equação 3.2.

$$EE (\%) = \frac{\text{Concentração Total} - \text{Concentração do composto não encapsulado}}{\text{Concentração Total}} \quad (3.2)$$

3.11 Testes em linhas celulares

Foram preparados magnetolipossomas sólidos e aquosos com diferentes composições com os compostos 1 ou 2 incorporados com diferentes concentrações. Foi avaliada a toxicidade *in vitro* destes compostos para as seguintes linhas celulares tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (cancro do pulmão de células não-pequenas), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (cancro hepático). A linha celular PLP2 (células normais) foi utilizada de modo a estudar a toxicidade dos nanossistemas em tecidos saudáveis. Foi também avaliada a toxicidade dos compostos estudados nas linhas (sem os nanotransportadores). Estes compostos foram dissolvidos numa solução de 5% de DMSO, para uma concentração final de 10 mM. As linhas celulares foram obtidas no Instituto Leibniz DSMZ – *German Collection of Microorganism and Cell Cultures*.

As células foram mantidas como culturas de células aderentes em meio RPMI-640 contendo 10% de sêrum fetal de bovino (FBS) inativado por calor, a 37°C num incubador com ar humidificado contendo 5% de CO₂. Cada linha celular foi plaqueada a uma densidade adequada (1x10⁴ células por poço) em placas de 96 poços e deixada durante 24 h, de modo a aderir. As células foram então tratadas com diferentes soluções durante 48 h. Após este período de incubação, as células foram fixadas adicionando tetracloroanisol (TCA) 10% frio (100 µL) e incubadas a 4 °C durante 60 minutos. As placas foram então lavadas com água desionizada e secas. Uma solução de SRB (0.1% em 1% de ácido acético, 100 µL) foi adicionada a cada poço e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente. A SBR não ligada foi removida através da lavagem com ácido acético (1%). As placas foram secas e a SRB ligada foi solubilizada com 10 mM de tampão Tris-HCl (200 µL, pH=7,4). A absorvância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀, ou seja, a concentração de fármaco que inibe 50% do crescimento celular.

3.12 Referências bibliográficas do capítulo 3

- [1] H. Hirazawa, S. Kusamoto, H. Aono, T. Naohara, K. Mori, Y. Hattori, T. Maehara, and Y. Watanabe, "Preparation of fine Mg_{1-x}Ca_xFe₂O₄ powder using reverse coprecipitation method for thermal coagulation therapy in an ac magnetic field," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 461, no. 1–2, pp. 467–473, 2008.
- [2] V. A. Machado, D. Peixoto, R. Costa, H. J. C. Froufe, R. C. Calhelha, R.M. V. Abreu, I.C. F. R. Ferreira, R. Soares, and M.J. P. Queiroz., "Synthesis, antiangiogenesis evaluation and molecular docking studies of 1-aryl-3-[(thieno[3,2-b]pyridin-7-ylthio)phenyl]ureas: Discovery of a new substitution pattern for type II VEGFR-2 Tyr kinase inhibitors," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 23, no. 19, pp. 6497–6509, 2015.
- [3] V. A. Machado, D. Peixoto, M. J. Queiroz, and R. Soares, "Antiangiogenic 1-Aryl-3-[3-(thieno[3,2-b]pyridin-7-ylthio)phenyl]ureas Inhibit MCF-7 and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Lines through PI3K/Akt and MAPK/Erk Pathways," *Journal of Cellular Biochemistry*., no. April 2016, pp. 1–24, 2016.
- [4] S. Fery-Forgues and D. Lavabre, "Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products," *Journal of Chemical Education*, vol. 76, no. 9, pp. 1260–1264, 1999.
- [5] D. F. Eaton, "Reference materials for fluorescence measurement," *Pure and Applied Chemistry*., vol. 60, no. 7, pp. 1107–1114, 1988.
- [6] E. P. Kirby and R. F. Steiner, "The Influence of Solvent and Temperature upon the Fluorescence of Indole Derivatives," *Journal of Physical Chemistry A*., vol. 74, no. 26, pp. 4480–4490, 1970.
- [7] S. Batzri and E. D. Korn, "Single bilayer liposomes prepared without sonication," *BBA Biomembranes*, vol. 298, pp. 1015–1019, 1973.
- [8] C. Charcosset, A. Juban, J. P. Valour, S. Urbaniak, and H. Fessi, "Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices," *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 94, pp. 508–515, 2015.

- [9] J. Li, X. Wang, T. Zhang, C. Wang, Z. Huang, X. Luo, and Y. Deng., "A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems," *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 10, no. 2, pp. 81–98, 2014.
- [10] M. C. Rheinstädter and O. G. Mouritsen, "Small-scale structure in fluid cholesterol-lipid bilayers," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 18, no. 5, pp. 440–447, 2013.
- [11] T. Indira, "Magnetic Nanoparticles: A Review," *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology.*, vol. 3, no. 3, pp. 1035–1042, 2010.
- [12] L. L. Vatta, R. D. Sanderson, and K. R. Koch, "Magnetic nanoparticles : Properties and potential applications," *Advanced Materials*, vol. 78, no. 9, pp. 1793–1801, 2006.
- [13] A. R. O. Rodrigues, I. T. Gomes, B. G. Almeida, J. P. Araújo, E. M. S. Castanheira, and P. J. G. Coutinho, "Magnetic liposomes based on nickel ferrite nanoparticles for biomedical applications," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 17, no. 27, pp. 18011–18021, 2015.
- [14] A. R. O. Rodrigues, J. M. F. Ramos, I. T. Gomes, B. G. Almeida, J. P. Araújo, M. J. R. P. Queiroz, P. J. G. Coutinho and E. M. S. Castanheira, "Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs," *RSC Advances*, vol. 6, no. 21, pp. 17302–17313, 2016.
- [15] Y. Tamba, H. Terashima, and M. Yamazaki, "A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 164, no. 5, pp. 351–358, 2011.
- [16] T. Tanaka, Y. Tamba, S. M. Masum, Y. Yamashita, and M. Yamazaki, "La³⁺ and Gd³⁺ induce shape change of giant unilamellar vesicles of phosphatidylcholine," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1564, no. 1, pp. 173–182, 2002.
- [17] A. R. O. Rodrigues, I. T. Gomes, B. G. Almeida, J. P. Araújo, E. M. S. Castanheira, and P. J. G. Coutinho, "Magnetoliposomes based on nickel/silica core/shell nanoparticles: Synthesis and characterization," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 148, no. 3, pp. 978–987, 2014.
- [18] A. R. O. Rodrigues, B. G. Almeida, J. M. Rodrigues, M. J. R. P. Queiroz, R. C. Calhelha, I. C. F. R. Ferreira, A. Pires, A. M. Pereira, J. P. Araújo, P. J. G. Coutinho and E. M. S. Castanheira, "Magnetoliposomes as carriers for promising antitumor thieno[3,2-*b*]pyridin-7-arylamines: photophysical and biological studies," *RSC Advances*, vol. 7, no. 25, pp. 15352–15361, 2017.

[19] “Lab Supply Outlaws,” EMD Millipore Amicon Ultra-0.5 and Ultra-2.0 Centrifugal Filter Units, 2018. [Online]. Available: <https://www.labsupplyoutlaws.com/emd-millipore-amicon-ultra-0.5-and-ultra-2.0-centrifugal-filter-units.htm>.

Capítulo 4

Capítulo 4 – Resultados e discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos no decorrer do trabalho. Inicialmente, serão discutidos os resultados relativos às propriedades das nanopartículas, seguidos do estudo fotofísico dos compostos em vários solventes e em membranas lipídicas. Após isso, serão analisados os resultados referentes aos magnetolipossomas, nomeadamente as provas da sua formação, tamanho e, finalmente, o encapsulamento dos compostos nos mesmos. Em último lugar, serão apresentados os resultados obtidos para estes nanossistemas em testes de linhas celulares.

4.1 Caracterização fotofísica e estrutural das nanopartículas

4.1.1 Difração de Raios-X

A análise dos difratogramas das nanopartículas sintetizadas foi efetuada com a utilização do *software Match!*. No entanto, os dados obtidos representam uma análise preliminar, devendo posteriormente realizar-se uma análise de Rietveld.

Na figura 4.1 estão representados os difratogramas obtidos por XRD das nanopartículas de ferrites mistas de magnésio e cálcio ($Mg_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$) e ferrite de cálcio ($CaFe_2O_4$). É possível verificar a presença dos picos característicos deste tipo de estruturas em espinela (parcialmente invertida), marcados pelos seus índices de Miller (*space group* $Fd\bar{3}m$, CIF 1011245).

O tamanho das cristalites foi calculado a partir da equação de Scherrer (equação 2.22) ($2\theta \approx 34,17$ para $CaFe_2O_4$ e $2\theta \approx 35,62$ para $Mg_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$). Através desta, foi possível verificar que a dimensão das cristalites, tanto de $CaFe_2O_4$ como de $Mg_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$, rondam os 9 nm (8,68 nm para as nanopartículas de $CaFe_2O_4$ e 8,72 nm para as de $Mg_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$), o que se encontra em concordância com os valores reportados na literatura para o método de síntese em foco, para a mesma temperatura de calcinação [1]. O uso da equação de Scherrer com o objetivo da determinação do tamanho da cristalite é cada vez mais comum na literatura. No entanto, apesar de ser uma medida que permite ter uma noção geral das dimensões das partículas, esta medida

apresenta algumas limitações. De modo a aplicar de forma confiável esta análise, é necessário ter em consideração alguns aspetos importantes como, por exemplo, fatores instrumentais (fonte de raios-X) e fatores relativos à amostra, como a função da forma geométrica da partícula (k), entre outros. Se tais aspetos não forem tidos em conta, a informação resultante pode ser imprecisa.

O uso de fontes não-monocromáticas de raios-X pode implicar alargamentos de picos, enquanto que o valor de k depende de uma série de fatores, incluindo a morfologia do cristal e a homogeneidade da amostra, sendo que este valor é, muitas vezes considerado 0,9 independentemente da morfologia das partículas. Por outro lado, esta equação permite-nos determinar o tamanho das cristalites, o que pode não corresponder às dimensões das nanopartículas, podendo originar um viés de informação [2]. Desta forma, o valor obtido através desta equação deve ser meramente indicativo, sendo necessário o estudo das dimensões e homogeneidade das nanopartículas a partir de microscopia.

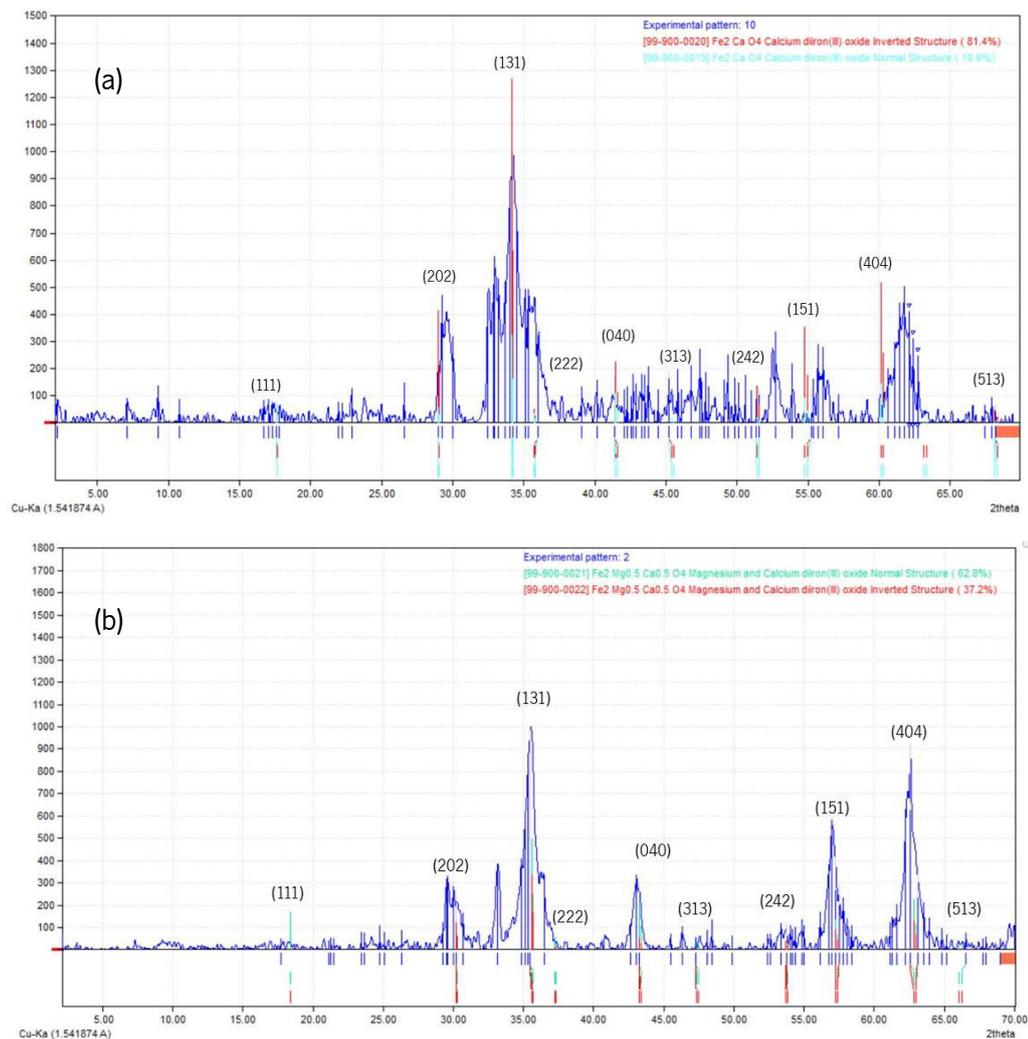


Figura 4.1 - Difratoogramas de XRD obtidos para a $Mg_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ (a) e às ferrites de magnésio $CaFe_2O_4$ (b).

Através da análise do difratograma, é possível assumir a síntese das nanopartículas, sendo que ambas apresentam estrutura parcialmente invertida, pois em ambas as amostras são identificadas estruturas normais e invertidas.

Os padrões de XRD mostram picos ligeiramente alargados, que podem advir de fatores instrumentais, de falhas na rede cristalina ou do tamanho reduzido das cristalites [3]. Esta condição já foi verificada para outros métodos de síntese, tal como sol-gel [4]. Uma forma de evitar este alargamento seria, no caso da síntese por coprecipitação, aumentar a temperatura de calcinação [1]. Em [5], foi verificado o desvio dos picos para menores valores de 2θ em ferrites mistas de cálcio e magnésio, o que pode ser explicado devido à substituição parcial do ião Fe^{2+} pelo ião Mg^{2+} na estrutura cristalina em consequência de este possuir menor raio iónico.

4.1.2 Espectroscopia de absorção UV-Visível

Na figura 4.2 está representado o espectro de absorção das nanopartículas sintetizadas. Através da sua análise é possível verificar que estas possuem um largo espectro de absorção. Desta forma, quando estas se encontram inseridas no mesmo sistema que sondas ou compostos fluorescentes, pode ocorrer diminuição da fluorescência detetada ou *quenching*. Este efeito já foi verificado para outras nanopartículas de ferrites [6-9], sendo que existem diversos estudos que utilizam esta característica para várias aplicações, tais como deteção de trombina [10] e de nanopartículas em sistemas [11].

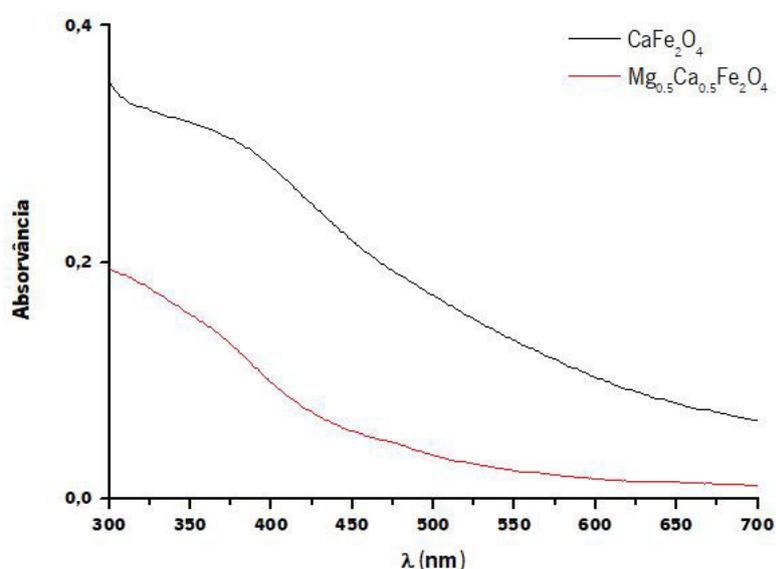


Figura 4.2 - Espectros de absorção das nanopartículas sintetizadas.

É possível verificar que as nanopartículas absorvem significativamente nas zonas de emissão dos compostos (entre os 300 e 450 nm), o que provoca uma diminuição significativa da fluorescência detetada quando os compostos e as nanopartículas se encontram no mesmo sistema. Este processo, denominado *quenching*, permite estabelecer a proximidade entre as nanopartículas e os compostos e, conseqüentemente, assumir a formação de magnetolipossomas.

4.1.3 Microscopia eletrónica

Na figura 4.3 estão representadas imagens de microscopia eletrónica de varrimento das nanopartículas sintetizadas. Através da análise das mesmas, é possível verificar o tamanho reduzido das nanopartículas, o que se encontra em concordância com os resultados obtidos no XRD. É possível ainda observar agregados e partículas de maiores dimensões.

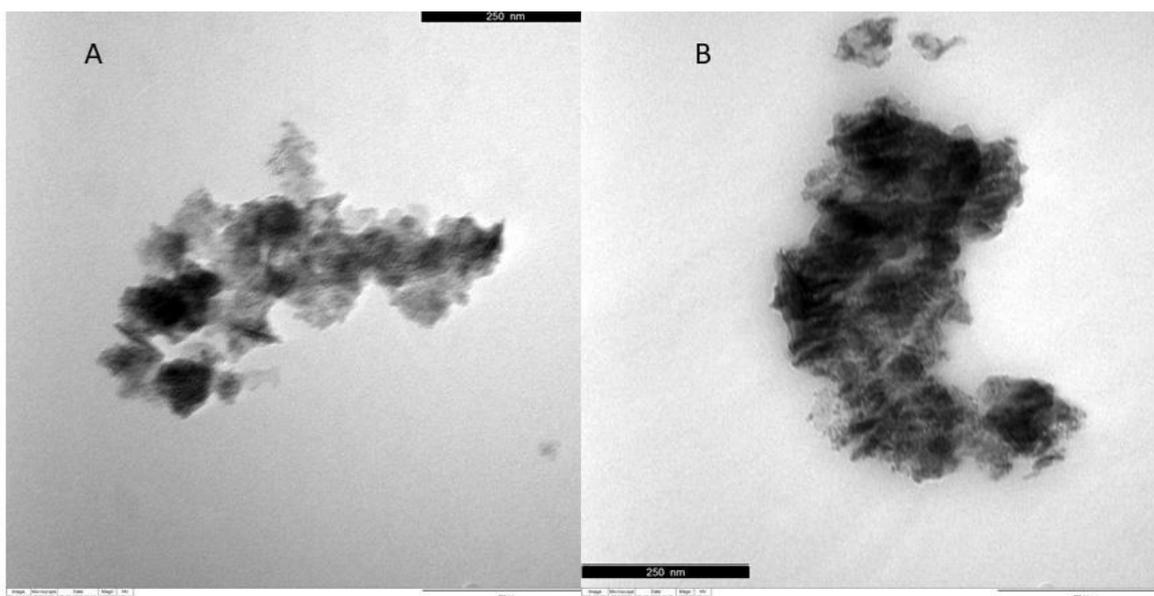


Figura 4.3 - Imagens de TEM das nanopartículas sintetizadas: A: CaFe_2O_4 ; B: $\text{Mg}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$.

4.1.4 Propriedades magnéticas

Todas as nanopartículas sintetizadas a partir do procedimento descrito no capítulo anterior apresentam comportamento magnético, uma vez que é perceptível a sua resposta imediata após a aplicação de um estímulo magnético. Na figura 4.4 está representada, a título de exemplo,

uma fotografia do comportamento das nanopartículas de CaFe_2O_4 na presença e na ausência de um campo magnético. Após retirar o campo magnético, é possível verificar a inexistência de magnetização remanescente, indicando que estas partículas podem apresentar comportamento superparamagnético.



Figura 4.4 - Comportamento magnético das nanopartículas de ferrite de cálcio (CaFe_2O_4) na presença (esquerda) e ausência (direita) de um campo magnético.

Tendo em conta as dimensões das nanopartículas, podemos afirmar que estas se encontram abaixo do diâmetro crítico necessário para apresentar superparamagnetismo.

No período em que decorreram os trabalhos da tese não foi possível realizar ensaios de modo a apurar as propriedades magnéticas das nanopartículas. No entanto, através da análise da literatura é possível afirmar que as nanopartículas apresentam comportamento superparamagnético [1,4,12].

4.2 Estudo fotofísico dos compostos em vários solventes

Os compostos estudados apresentam valores de concentração inibitória de crescimento (GI_{50}) muito baixos para várias linhas celulares tumorais humanas, em especial linhas de cancro da mama [13]. O estudo do comportamento fotofísico destes compostos em vários

solventes e em lipossomas é, por isso, de extrema importância, pois permite determinar a afinidade dos compostos para meios polares e apolares, por exemplo. Deste modo, numa fase inicial, as propriedades de absorção e fluorescência dos compostos estudados foram avaliadas em vários solventes com diferentes características. As figuras 4.5 e 4.6 mostram os espectros de absorção dos compostos estudados em vários solventes.

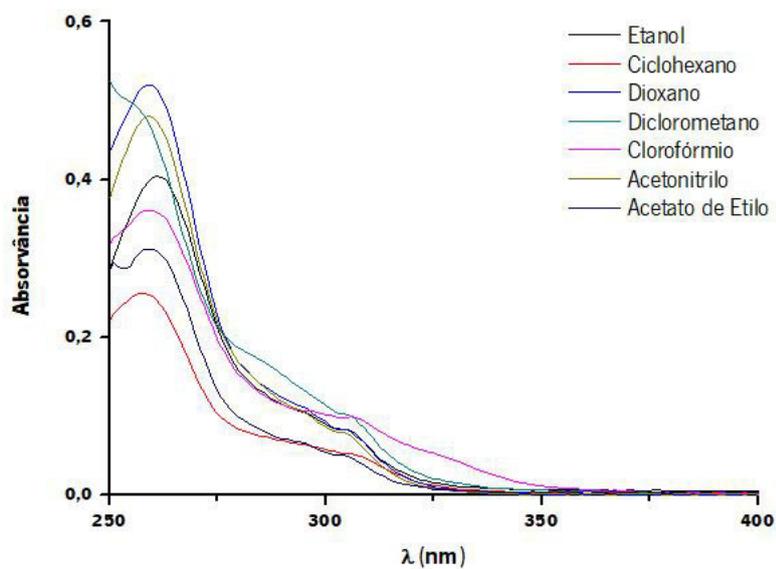


Figura 4.5 - Espectros de absorvância do composto 1 em solução (10^{-5} M) em vários solventes.

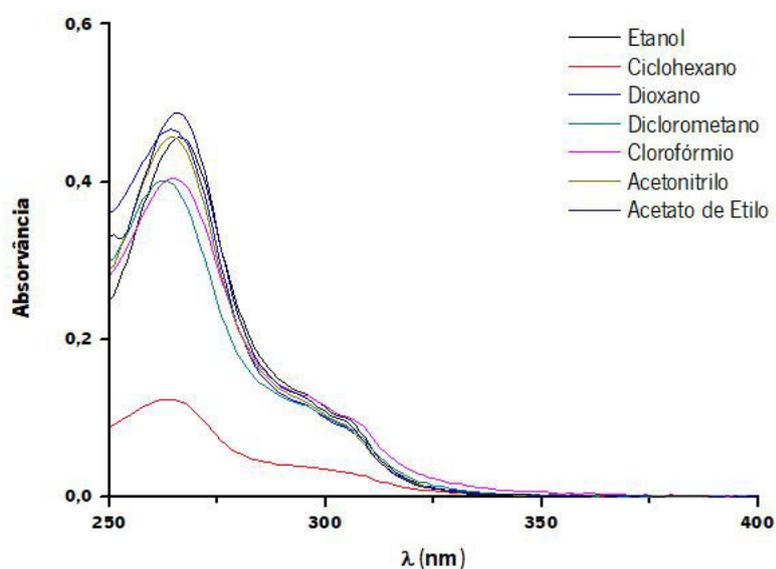


Figura 4.6 - Espectros de absorvância do composto 1 em solução (10^{-5} M) em vários solventes.

A partir dos espectros de absorção dos compostos em diferentes solventes, é possível verificar que os compostos apresentam um comportamento semelhante em termos de absorção

e que absorvem entre os 250 e os 320 nm, sendo que apresentam o máximo de absorção a cerca de 260 nm. Desta forma, todos os estudos de fluorescência foram efetuados utilizando este comprimento de onda de excitação. Para o composto 2, é possível verificar baixa absorção para o solvente ciclohexano, o que pode ser explicado, por exemplo, por baixa solubilidade do composto neste solvente.

Nas figuras 4.7 e 4.8 estão representados os espectros de fluorescência normalizados dos compostos estudados.

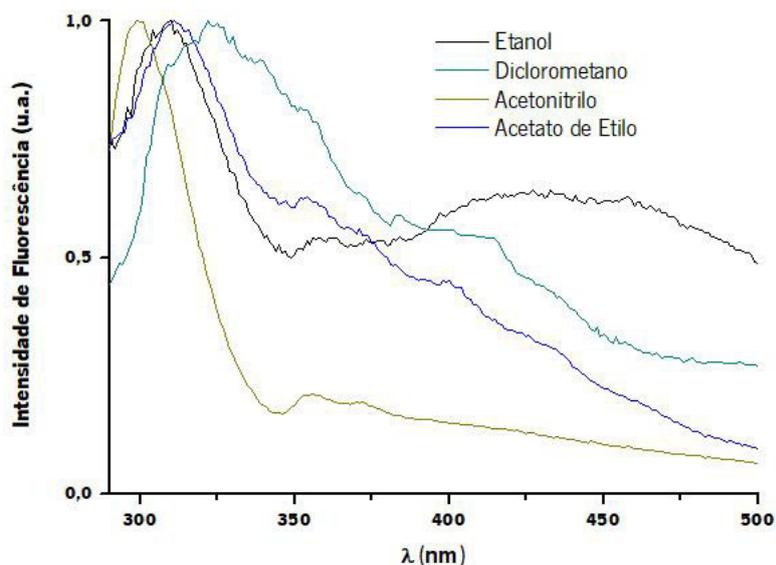


Figura 4.7 - Espectros de fluorescência do composto 1 em solução (10^{-5} M) em etanol, diclorometano, acetonitrilo e acetato de etilo, como exemplos.

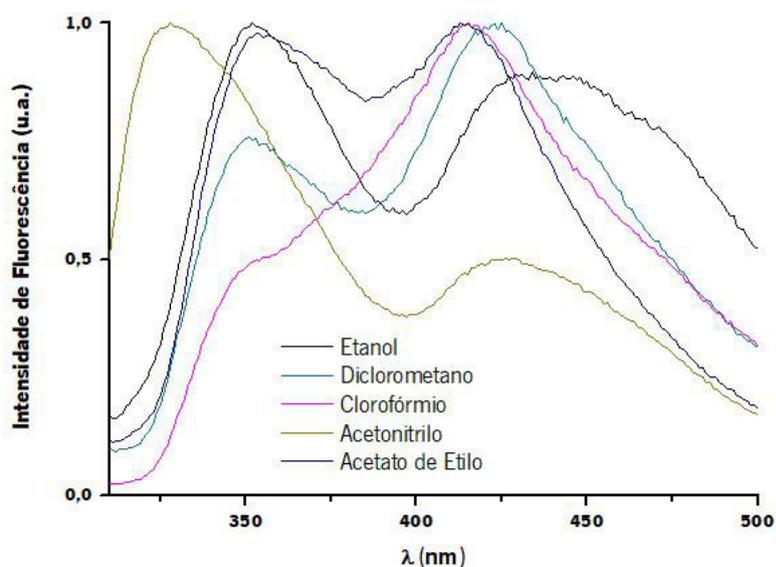


Figura 4.8 - Espectros de fluorescência do composto 2 em solução (10^{-5} M) em etanol, diclorometano, clorofórmio, acetonitrilo, acetato de etilo e água.

Como é possível verificar pela análise das figuras, ambos os compostos apresentam fluorescência em vários solventes, independentemente da sua polaridade e da sua capacidade, ou não, de gerar pontes de hidrogénio. No entanto, nenhum dos compostos apresenta fluorescência em água, o que demonstra o seu carácter hidrofóbico e pode ser explicado pela interação através de pontes de hidrogénio com a água, forte o suficiente para inibir a fluorescência neste solvente. Este fenómeno já foi reportado em estudos fotofísicos de outros derivados de tienopiridinas [14]. O estudo de emissão de fluorescência de ambos os compostos em solventes polares e apolares, evidenciou a presença de duas bandas de emissão que podem corresponder a duas espécies fluorescentes cuja proporção varia para os diferentes solventes.

Os rendimentos quânticos de fluorescência e os máximos de absorção e emissão para os dois compostos estudados encontram-se na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Comprimentos de onda máximos de absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{em}), coeficiente de absorção molar (ϵ) e rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) para os compostos 1 e 2 em vários solventes.

Solventes	λ_{abs}/nm ($\epsilon/10^4 M^{-1}cm^{-1}$)		$\lambda_{em}(nm)$		ϕ_F	
	1	2	1	2	1	2
Etanol	261 (0,404)	267 (0,4558)	310	332	0,004	0,002
	307 (0,078)	295 (0,1322)	424	428		
		305 (0,0997)				
Ciclohexano	258 (0,256)	265 (0,1230)	–	330	0,003	0,003
	305 (0,053)	295 (0,0385)		396		
		306 (0,0306)				
Acetato de Etilo	259 (0,311)	266 (0,4875)	311	334	0,005	0,002
	306 (0,047)	296 (0,1234)	356	395		
		305 (0,0951)				
Clorofórmio	259 (0,361)	260 (0,4026)	–	334	0,002	0,001
	307 (0,098)	297 (0,1254)		395		
		308 (0,0924)				
Diclorometano	255 (0,498)	263 (0,4013)	322	332	0,003	0,001
	308 (0,090)	297 (0,1118)	388	402		
		307 (0,0823)	411			
Dioxano	259 (0,404)	265 (0,4661)	–	334	0,007	0,001
	306 (0,079)	295 (0,1177)		395		
		306 (0,0836)				
Acetonitrilo	259 (0,480)	265 (0,4571)	299	307	0,002	0,003
	306 (0,074)	295 (0,0385)	358	407		
		306 (0,0306)	372			

Relativamente aos rendimentos quânticos de fluorescência, é possível verificar que os compostos apresentam muito baixo valor de rendimento, o que pode dificultar a análise de alguns dados e afetar alguns estudos.

4.3 Estudo dos compostos em membranas lipídicas

Foram efetuados estudos de emissão de fluorescência dos compostos quando se encontram em membranas lipídicas. Os compostos (5×10^{-6} M) foram incorporados em lipossomas de diferentes composições e cargas à superfície. Foram preparados lipossomas de DPPC (lípidio zwitteriônico), DODAB (lípidio catiónico), Egg-PC (mistura de lípidos Zwitteriônicos) e mistura Egg-PC: Colesterol (7:3). Desta forma, foi estudada a fluorescência do composto acima da temperatura de transição (55°C) e abaixo da temperatura de transição (25°C) de cada fosfolípido. Como já referido, à temperatura ambiente os lípidos DPPC e DODAB encontram-se na fase ordenada, por outro lado, o lípidio Egg-PC, encontra-se na fase desordenada ou líquido-cristalina, pois a sua temperatura de transição é extremamente baixa [15].

Na figura 4.9 estão representados, a título de exemplo, os espetros de fluorescência normalizados do composto 2 incorporados em lipossomas.

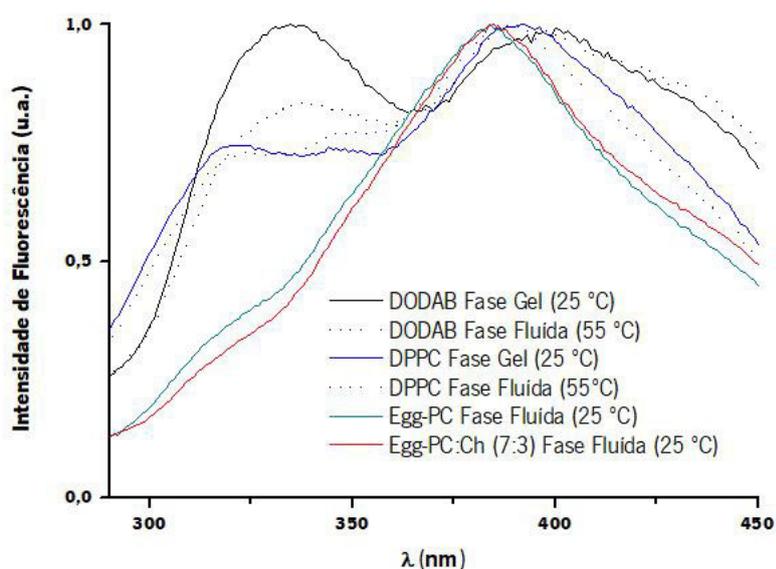


Figura 4.9 - Espectros de fluorescência normalizados do composto 2 (5×10^{-6} M) em membranas lipídicas (10^{-3} M) de DODAB, DPPC, Egg-PC e Egg-PC: Colesterol, à temperatura de 25°C e 55°C .

Ambos os compostos apresentam fluorescência em lipossomas, o que pode indicar que estes estão maioritariamente localizados na região da bicamada lipídica. Uma vez que estes não fluorescem em água, podemos afirmar que os compostos serão transportados na zona hidrofóbica da bicamada.

Com o aumento da fluidez da membrana, ocorre um desvio para menores comprimentos de onda (desvio hipsocrómico) para a maior parte dos sistemas estudados (exceto para o lípido DODAB), como verificado em [16]. No caso dos lipossomas de DODAB, é possível verificar um alargamento da banda de emissão de maiores comprimentos de onda, indicando que o composto se localiza num ambiente mais hidratado, ou seja, mais próximo da zona polar do lípido. Este desvio foi verificado para outros compostos derivados de tienopiridinas para lipossomas de composição semelhante [14].

4.3.1 Estudos de anisotropia em lipossomas

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

As medidas foram obtidas acima e abaixo da T_m para os vários lípidos, exceto para Egg-PC e Egg-PC:Ch(7:3). Estas medidas foram adquiridas através da obtenção de espetros de fluorescência com recurso a polarizadores. Os valores de anisotropia dos compostos em lipossomas encontram-se na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Valores de anisotropia de fluorescência (r) dos compostos e valores de comprimentos de emissão máximos do composto 2 (λ_{em}) em lipossomas a 25 °C e a 55 °C. Valores de anisotropia de fluorescência dos fármacos em Glicerol (25 °C) para comparação.

	Composto 1		Composto 2		
	T (°C)	r	λ_{em} (nm)		r
DODAB	25	–	345	411	0,181
	55	–	350	406	0,115
Egg-PC	25	0,199	–	394	0,155
Egg-PC:Ch(7:3)	25	–	–	395	0,131
DPPC	25	0,298	326	398	0,146
	55	0,233	327	397	0,120
Glicerol	25	0,308	305	380	0,225

Devido aos valores de anisotropia elevados, é possível assumir que os compostos se localizam mais próximos das extremidades polares dos lipossomas, pois a microviscosidade da membrana diminui com o aumento da distância às cabeças polares do mesmo. Por essa razão, valores de anisotropia elevados permitem confirmar a proximidade entre os compostos e as cabeças polares [17,18]. Estes valores indicam que os fármacos se localizam na bicamada lipídica, ocorrendo alterações nos valores de anisotropia com o aumento da temperatura, sendo a transição da fase gel para a fase líquido-cristalina dos lípidos claramente detetada pelos fármacos.

Com o aumento da temperatura, é possível verificar o decréscimo nos valores de anisotropia. Este decréscimo pode ser explicado pela equação 2.14, que relaciona os valores de anisotropia com o tempo de vida do estado excitado e com o tempo de difusão rotacional.

Sabendo que a taxa de difusão rotacional de uma molécula fluorescente depende da viscosidade do solvente e das características estruturais (tamanho, forma) da mesma [19], numa solução fluida, os valores de anisotropia são geralmente próximos de 0 devido à rápida difusão rotacional das moléculas. Por essa razão, quando a temperatura é aumentada para 55 °C, os lípidos passam para a sua fase líquido-cristalina e as moléculas podem rodar livremente. Como consequência, durante o tempo de vida do estado excitado (em geral, 1-10 ns) as moléculas emitem luz de forma aleatória diminuindo, assim, a anisotropia da amostra. Desta forma é, então, verificado o aumento da fluidez e da difusão rotacional e consequente diminuição da anisotropia.

Com a adição de colesterol à composição da bicamada, verificou-se a diminuição da anisotropia que pode dever-se ao aumento da fluidez provocada pela adição deste à bicamada lipídica.

A diminuição da viscosidade local (por aumento da temperatura ou por adição de colesterol) poderá facilitar uma penetração mais profunda dos compostos nas bicamadas lipídicas (ficando num ambiente menos hidratado e diminuindo os valores de anisotropia). Desta forma, os compostos 1 e 2 revelam-se eficientes quando utilizados como sondas de controlo de alterações na viscosidade de membranas lipídicas.

4.4 Estudo fotofísico em magnetolipossomas

4.4.1 Formação dos magnetolipossomas sólidos

A formação dos magnetolipossomas sólidos foi avaliada por FRET. Para tal, o lípido marcado NBD-C₁₂-HPC (3×10^{-6} M) foi injetado com a primeira camada lipídica, atuando como doador de energia, enquanto o lípido marcado com Rodamina Rh-DOPE (3×10^{-6} M), foi injetado com a segunda camada lipídica (atuando como aceitante) (figura 4.10). Para comparação, foram preparados SMLs marcados apenas com NBD-C₁₂-HPC, com igual concentração de modo a confirmar o aumento da intensidade de fluorescência deste na ausência do aceitante.

Os SMLs de cada tipo de nanopartículas foram marcados apenas com NBD-C₁₂-HPC e com ambos os lípidos NBD-C₁₂-HPC (na primeira camada lipídica) e Rh-DOPE (na segunda camada lipídica), possibilitando, deste modo, a comparação do espectro de fluorescência dos SMLs marcados apenas com o doador, com o dos SMLs marcados com o doador e o aceitador de energia.

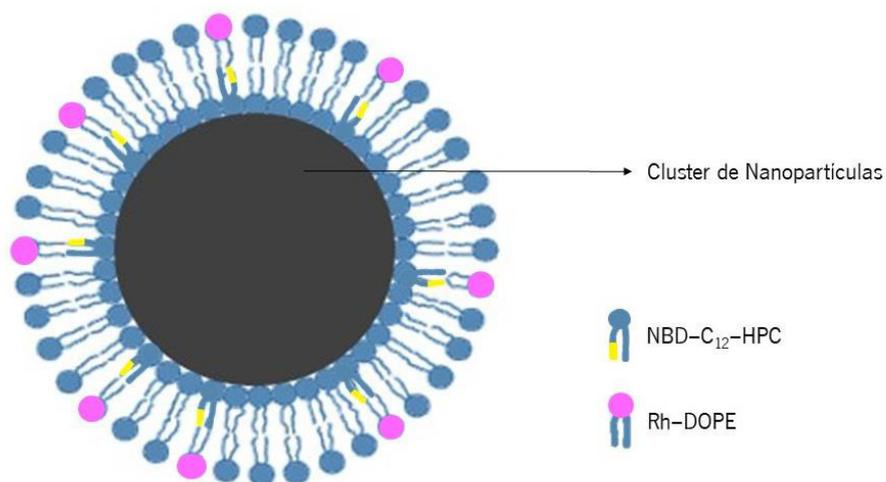


Figura 4.10 - Esquema de um magnetolipossoma sólido marcado com as sondas.

Em teoria, se os SMLs estiverem formados, quando excitamos apenas a molécula doadora (NBD) ocorre transferência de energia entre o NBD e a rodamina, devido à proximidade de ambos. Nas figuras 4.11 e 4.12 estão representados os espectros obtidos.

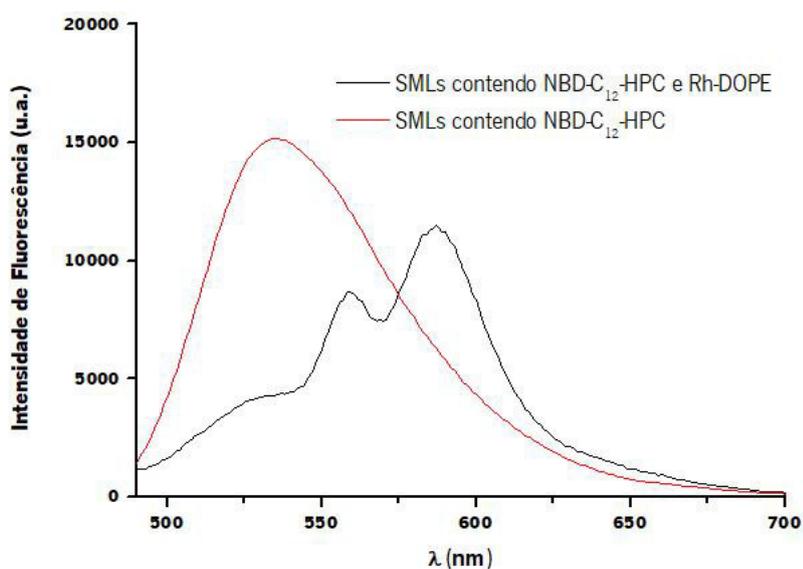


Figura 4.11 - Espectros de fluorescência ($\lambda_{exc}=470$ nm, sem excitação da rodamina) de SMLs contendo apenas NBD-C₁₂-HPC e contendo ambos os lipídios NBD-C₁₂-HPC e Rh-DOPE, contendo as nanopartículas de ferrite de cálcio.

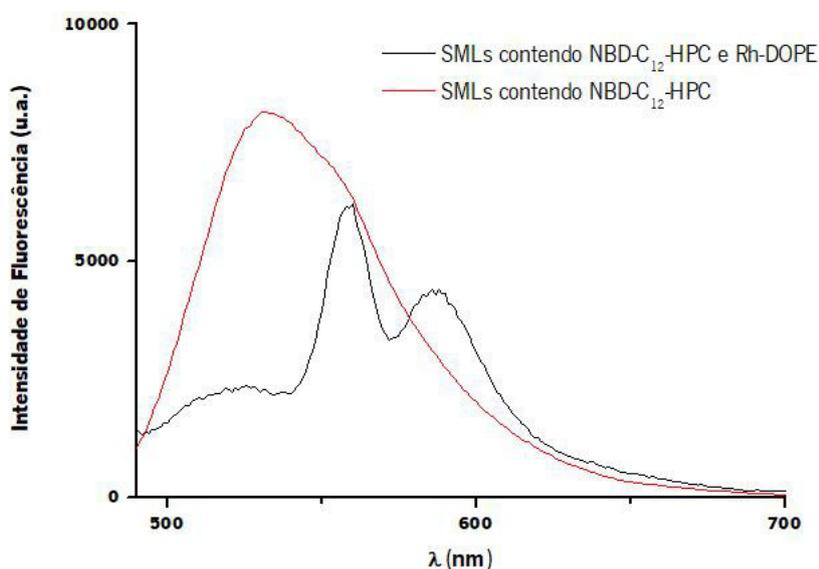


Figura 4.12 - Espectros de fluorescência ($\lambda_{exc}=470$ nm, sem excitação da rodamina) de SMLs contendo apenas NBD-C₁₂-HPC e contendo ambos os lipídios NBD-C₁₂-HPC e Rh-DOPE, contendo as nanopartículas ferrites mistas de cálcio e magnésio.

Foi estudada a emissão de fluorescência para os SMLs marcados com ambos as sondas, excitando apenas o doador, NBD ($\lambda_{exc}=470$ nm), verificando-se o aparecimento da banda de

emissão do aceitante, neste caso a rodamina, sendo isto resultado da transferência de energia entre os fluoróforos. Visto que a transferência de energia só ocorre quando as moléculas se encontram a distâncias reduzidas (menos de 10 nm), podemos comprovar a formação da bicamada lipídica à volta do *cluster* de nanopartículas. Nos magnetolipossomas apenas com NBD-C₁₂-HPC, verifica-se a banda de fluorescência do NBD com maior intensidade do que nos magnetolipossomas com as duas sondas. Este aumento de intensidade é mais evidente nos magnetolipossomas com nanopartículas de ferrites mistas de cálcio e magnésio.

Com o resultado destes ensaios, foram calculadas as eficiências de FRET e as distâncias doador-aceitante correspondentes, de modo a comparar as mesmas com a espessura da membrana celular através das equações 2.15 a 2.18. Na tabela 4.2 estão representados os resultados obtidos a partir das equações anteriores para os SMLs de ferrite de cálcio de ferrites mistas de cálcio e magnésio.

Tabela 4.2 - Eficiências de FRET (Φ_{FRET}), Raio de Förster (r_0) e distâncias doador-aceitante (r) dos ensaios de formação da dupla camada lipídica em magnetolipossomas sólidos.

	Φ_{FRET}	Φ_d^0	$r_0(\text{nm})$	$r(\text{nm})$
CaFe ₂ O ₄	0,704	0,023	4,0	3,5
Mg _{0,5} Ca _{0,5} Fe ₂ O ₄	0,965	0,222	5,9	3,4

Relativamente aos valores de eficiência de transferência de energia, esta é superior para os magnetolipossomas sólidos com nanopartículas de ferrites mistas, sendo que as distâncias doador-aceitante são semelhantes em ambos os casos. Tendo em conta que a espessura da membrana celular pode variar entre 7 e 9 nm [20] é, por isso, possível concluir que o NBD-C₁₂-HPC está localizado na primeira camada lipídica e o Rh-DOPE está localizado na segunda camada lipídica, envolvendo o *cluster* de nanopartículas.

4.4.2 Caracterização do tamanho dos magnetolipossomas

O método de síntese utilizado para a produção de magnetolipossomas aquosos (injeção etanólica) já se mostrou eficiente na produção dos mesmos, sendo um dos métodos mais

utilizados na literatura [7,8]. A caracterização do tamanho dos magnetolipossomas aquosos foi realizada pela técnica de DLS. No que diz respeito a esta técnica, é importante salvaguardar que o diâmetro obtido a partir do DLS corresponde ao diâmetro hidrodinâmico, ou seja, o diâmetro de uma esfera que possui o mesmo coeficiente de difusão que a partícula em estudo. O coeficiente depende, não só do tamanho do núcleo da partícula, mas também da estrutura superficial, da concentração e dos íons presentes no meio [21]. Nas figuras 4.13 e 4.14 é possível verificar as três medições independentes para os AMLs de CaFe_2O_4 e para os AMLs contendo nanopartículas de $\text{Mg}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$, respectivamente.

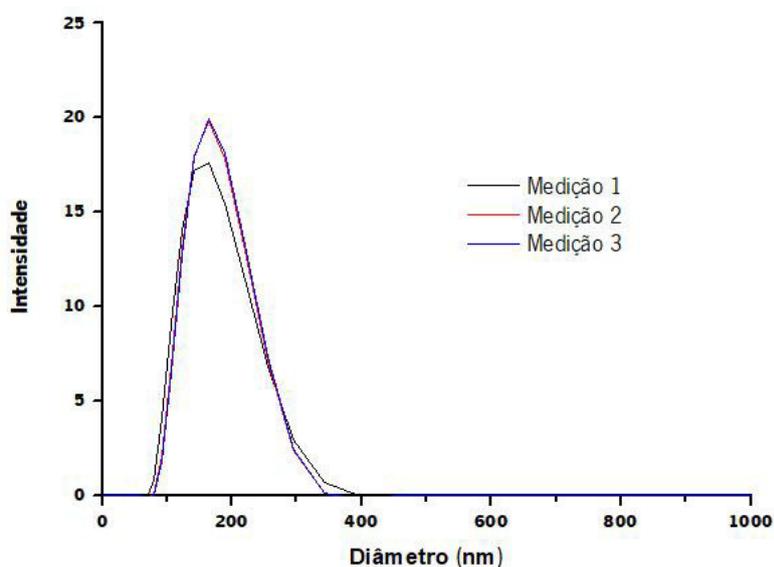


Figura 4.13 - Medidas de DLS para os AMLs com nanopartículas de CaFe_2O_4 .

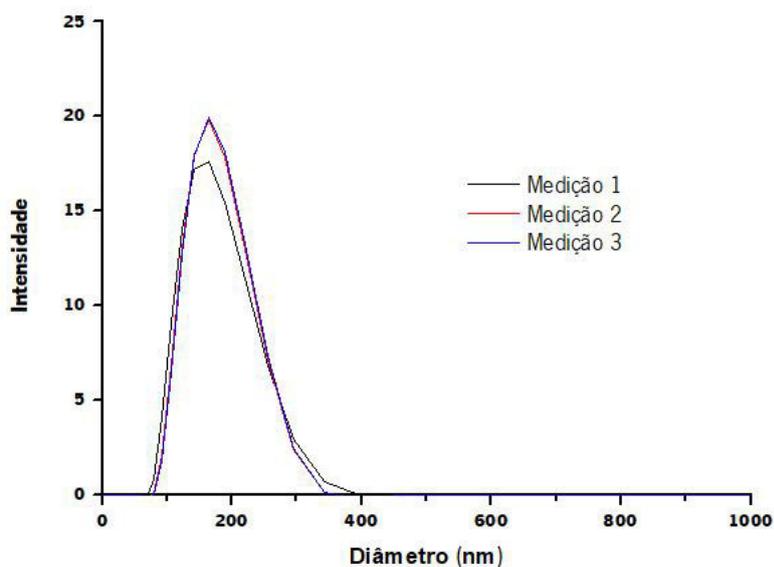


Figura 4.14 - Medidas de DLS para os AMLs com nanopartículas de ferrites $\text{Mg}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$.

Na tabela 4.3 estão representados os tamanhos dos AMLs e o desvio padrão verificado entre as medições.

Tabela 4.3 - Diâmetro dos AMLs, adquiridos a partir de medidas de DLS e respectivos desvios padrão (σ) e valores de polidispersividade.

	CaFe ₂ O ₄		Mg _{0.5} Ca _{0.5} Fe ₂ O ₄	
	Diâmetro (nm) $\pm \sigma$	PDI	Diâmetro (nm) $\pm \sigma$	PDI
AMLs (Egg-PC)	154 \pm 1	0,139 \pm 0,036	163 \pm 2	0,197 \pm 0,004

A partir dos dados obtidos, é possível verificar que os tamanhos dos AMLs são ideais para aplicações na área biomédica, uma vez que possuem tamanhos inferiores a 200 nm [22-24], sendo que os magnetolipossomas de CaFe₂O₄ possuem tamanhos menores relativamente aos magnetolipossomas contendo nanopartículas de ferrites mistas. Relativamente ao índice de polidispersividade (PDI) este indica o grau de homogeneidade na distribuição de tamanhos da amostra. Um PDI até 0,2 indica homogeneidade da amostra, sendo que um valor superior a 0,2 indica heterogeneidade da amostra. Neste estudo todas as medições se encontravam dentro dos padrões ideais no que diz respeito ao PDI indicando, assim, uma homogeneidade de tamanho da amostra [25].

4.4.3 Ensaio de fusão com modelos de membrana

4.4.3.1 Ensaio de fusão de AMLs com modelos de membrana

A interação não específica dos magnetolipossomas aquosos (AMLs) com os modelos de membrana (GUVs) foi avaliada por FRET. Desta forma, foram inseridos nos AMLs a molécula de curcumina (2×10^{-6} M) (atuando como doador de energia) e a sonda lipídica Nile Red (2×10^{-6} M) (atuando como o aceitador de energia). A sobreposição significativa entre a banda de emissão da curcumina e o espectro de absorção do Nile Red (ver capítulo 3, secção 3.9.1) indica que o processo de FRET entre essas duas moléculas fluorescentes deverá ser eficiente, se a distância doador-aceitador for inferior a 10 nm [26].

De forma a confirmar a ocorrência de transferência de energia, foram comparados os espectros de fluorescência dos AMLs antes e após a interação com GUVs (figuras 4.15 e 4.16).

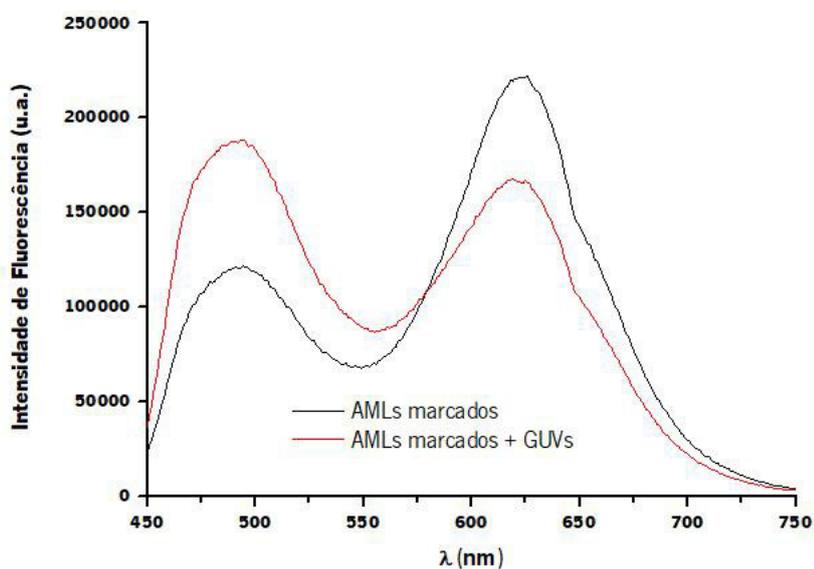


Figura 4.15 - Espectros de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$) de AMLs de Egg-PC marcados com curcumina e Nile Red contendo nanopartículas de CaFe_2O_4 , antes e depois da sua interação com GUVs.

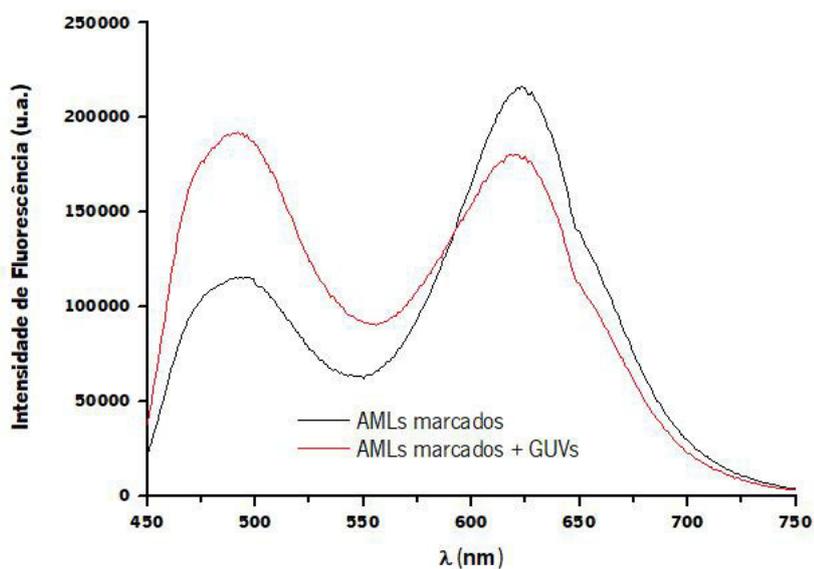


Figura 4.16 - Espectros de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$) de AMLs de Egg-PC marcados com Curcumina e Nile Red contendo nanopartículas de $\text{Mg}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$, antes e após sua interação com GUVs.

Antes da interação com GUVs, observam-se duas bandas de emissão distintas, a primeira ($\lambda_{\text{max}} \approx 500 \text{ nm}$), correspondente à emissão da curcumina e a segunda a 630 nm, correspondente à emissão de Nile Red [8], o que demonstra a ocorrência de FRET das moléculas de doador excitadas para o aceitante. Após a interação com GUVs, se a fusão ocorrer, é formada uma membrana maior [8], o que leva a um aumento na distância doador-aceitante, e à diminuição da eficiência de transferência de energia entre as moléculas.

Os resultados são consistentes com o esperado, sendo perceptível a diminuição da banda de fluorescência do aceitante e o aumento da banda de fluorescência do doador após a fusão de membrana entre as AMLs e GUVs, devido ao aumento da distância entre os mesmos, demonstrando eficácia na capacidade dos mesmos de se fundirem com modelos membranares. Por essa razão, os magnetolipossomas aquosos, tanto com nanopartículas de ferrite de cálcio, como com ferrites mistas de cálcio e magnésio, podem ser utilizados como nanotransportadores magnéticos de compostos hidrofílicos (que podem ser transportados na porção aquosa dos mesmos) assim como de compostos hidrofóbicos, que podem ser transportados na bicamada lipídica.

4.4.3.2 Ensaio de fusão de SMLs com modelos de membrana

A interação não específica com modelos de membranas e SMLs foi estudada através do processo de *unquenching*. Este processo pode ser justificado pelo facto de as nanopartículas absorverem energia numa larga gama espectral (ver capítulo 4, secção 4.1.2), sendo que quando estão próximas dos compostos fluorescentes absorvem a radiação emitida por estes. Desta forma, quando ocorre a fusão com os GUVs, ocorre um aumento da distância entre o *cluster* de nanopartículas e os compostos fluorescentes, diminuindo o *quenching*, ou seja, aumentando a intensidade de fluorescência emitida pelas sondas (*unquenching*).

Na figura 4.17 é possível observar o processo de *unquenching* em magnetolipossomas sólidos com nanopartículas de ferrites de cálcio marcadas com a sonda NBD ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$).

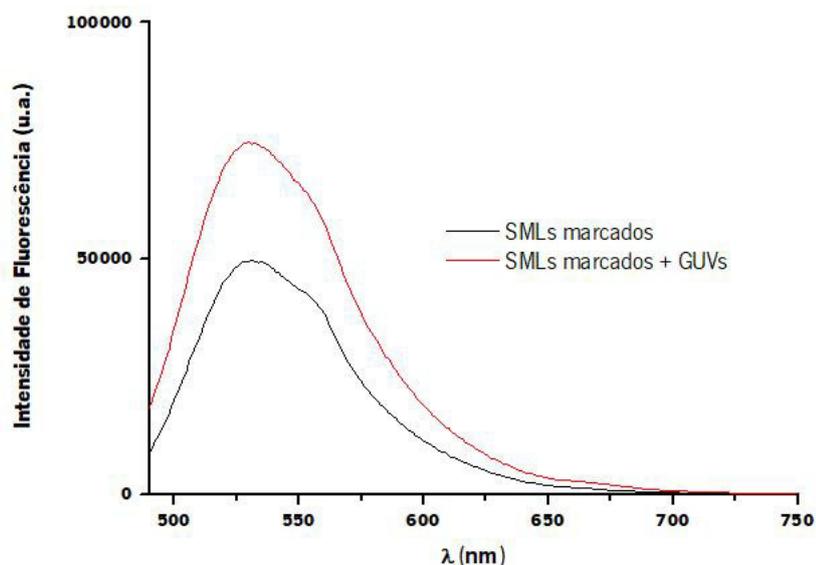


Figura 4.17 – Espectro de fluorescência dos SMLs com nanopartículas de ferrites de cálcio marcadas com NBD-C₁₂-HPC (3×10^{-6} M) antes e após interação com os modelos de membrana (GUVs).

Como é possível aferir através da análise da figura, após a fusão com os GUVs é verificado um aumento da intensidade de fluorescência da sonda, que se deve ao aumento da distância entre o *cluster* de nanopartículas e o lipídeo marcado. Desta forma, é comprovada a capacidade dos SMLs se fundirem com modelos membranares.

Tanto os AMLs como os SMLs se revelaram capazes de se fundirem com modelos de membrana celular, sendo que se mostram como nanotransportadores promissores que vão permitir o transporte de fármacos com diferentes características, aumentando a concentração de fármaco na zona de interesse, diminuindo os efeitos secundários associados à toxicidade sistêmica.

4.4.4 Encapsulamento dos compostos nos magnetolipossomas

4.4.4.1 Estudo dos compostos em magnetolipossomas

As propriedades fotofísicas dos compostos estudados quando inseridos em magnetolipossomas (sólidos e aquosos) foram estudadas. Nas figuras 4.18 e 4.19 são

apresentados os espectros obtidos para os compostos em lipossomas e magnetolipossomas para comparação.

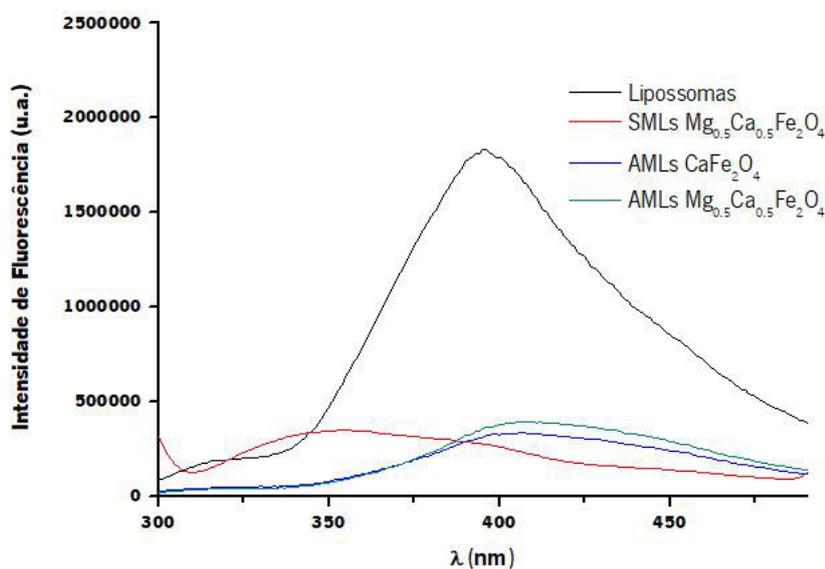


Figura 4.18 - Comparação de espectros de fluorescência do composto 1 (1×10^{-5} M) em lipossomas de Egg-PC (10^{-3} M), magnetolipossomas aquosos de Egg-PC e magnetolipossomas sólidos de DPPC contendo nanopartículas de $\text{Ca}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$. $\lambda_{\text{exc}}=260$ nm

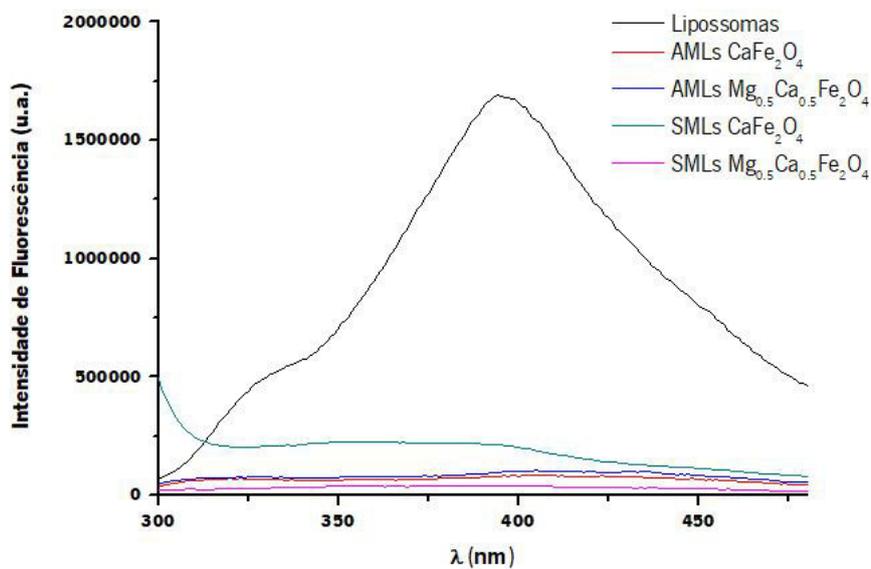


Figura 4.19 - Comparação de espectros de fluorescência do composto 2 (1×10^{-6} M) em lipossomas de Egg-PC (10^{-3} M), magnetolipossomas aquosos de Egg-PC e magnetolipossomas sólidos de DPPC. $\lambda_{\text{exc}}=260$ nm.

Através da análise dos espectros é possível verificar a formação dos magnetolipossomas e o encapsulamento dos compostos nos mesmos, devido à inibição de fluorescência verificada. Esta inibição de fluorescência, ou *quenching*, pode dever-se ao facto das nanopartículas magnéticas absorverem numa larga área espectral e, por essa razão, na presença das mesmas verifica-se uma diminuição de fluorescência dos compostos antitumorais. Consequentemente é assumida a formação dos magnetolipossomas com o encapsulamento eficiente do composto nos mesmos.

4.4.4.2 Estudos de anisotropia em magnetolipossomas

À semelhança dos lipossomas, a localização dos compostos nos magnetolipossomas foi estudada por anisotropia de fluorescência em estado estacionário (r), nas mesmas condições experimentais utilizadas na secção 4.3.1.

Os valores de anisotropia dos compostos em magnetolipossomas encontram-se na tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Valores de anisotropia de fluorescência dos compostos e valores de comprimentos de emissão máximos dos compostos em magnetolipossomas sólidos e aquosos com diferentes composições abaixo (25 °C) e acima da temperatura de transição (55 °C).

		CaFe ₂ O ₄						Mg _{0,5} Ca _{0,5} Fe ₂ O ₄						
		Composto 1			Composto 2			Composto 1			Composto 2			
		T (°C)	λ (nm)	r	λ (nm)	r	λ (nm)	r	λ (nm)	r	λ (nm)	r		
AMLS	Egg-PC	25	323	392	0,185	337	391	0,134	—	—	—	336	420	0,138
	DPPC	25	—	—	0,258	336	422	0,309	—	—	—	—	—	—
		55	—	—	0,148	338	411	0,275	—	—	—	—	—	—
SMLS	DPPC	25	—	—	—	—	—	—	354	444	0,152	345	416	0,138
		55	—	—	—	—	—	—	354	—	0,084	345	—	0,106

Devido aos valores de anisotropia elevados, é possível assumir que os compostos se localizam na bicamada lipídica, atestando a sua proximidade das cabeças polares [17,18]. Com modificações na viscosidade da membrana, seja por aumento da temperatura ou adição de

agentes estabilizadores (colesterol), é possível verificar nitidamente alterações nos valores da anisotropia.

4.5 Eficiência de encapsulamento

As eficiências de encapsulamento (EE) de ambos os compostos em AMLs e SMLs de nanopartículas de CaFe_2O_4 são apresentadas na tabela 4.5. Os valores da eficiência de encapsulamento, calculados a partir da equação 3.2, são superiores a 80% no caso dos AMLs, sendo o EE mais baixo observado para os magnetolipossomas sólidos (cerca de 55% para o composto 2). Este valor pode advir de dois fatores: a destruição não eficiente dos magnetolipossomas sólidos, que não permitiu verificar a intensidade de fluorescência real do composto devido ao *quenching* por parte das nanopartículas e a capacidade de carga dos nanotransportadores ser superior à concentração do composto, levando a resultados de eficiências de encapsulamento efetivamente menores do que as reais.

Tabela 4.5 - Eficiências de encapsulamento (EE%) dos compostos em magnetolipossomas contendo nanopartículas de CaFe_2O_4 (σ : desvio padrão).

	EE% $\pm \sigma$	
	Composto 1	Composto 2
AMLs (Egg-PC)	81,9 \pm 8,48	86,3 \pm 8,16
SMLs (DPPC)	—	55,77 \pm 10,98

As altas eficiências de encapsulamento em magnetolipossomas apontam para um uso promissor destes nanotransportadores no transporte guiado dos compostos 1 e 2 e como agentes para quimioterapia e hipertermia em terapia oncológica. Essas potencialidades permitirão reduzir o tempo de circulação no sangue dos fármacos, o que se mostra especialmente importante na redução dos efeitos secundários associados a este tipo de tratamento. A eficiência de encapsulamento depende do coeficiente de partição da molécula, ou seja da tendência de distribuição dos compostos entre meios polares e apolares, e das condições durante o processo experimental (pH, temperatura) [27]. Os elevados valores de desvio padrão permitem concluir a

necessidade de aperfeiçoamento e adaptação do protocolo escolhido aos compostos e nanotransportadores estudados, sendo que os valores obtidos não podem ser generalizados.

4.6 Testes em linhas celulares

A atividade antitumoral dos compostos individualmente e incorporados em nanossistemas foi avaliada em linhas celulares tumorais humanas, especificamente MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (cancro do pulmão de células não-pequenas), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (cancro hepático). Além disso, também foi avaliada para células não tumorais, usando células primárias de fígado porcino (PLP2). Estes ensaios permitiram a determinação dos valores de GI_{50} (μM), correspondendo à mínima concentração do composto que inibiu 50% do crescimento celular. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Atividade dos compostos antitumorais 1 e 2 na inibição do crescimento de diferentes linhas de células; NCI-H460 (cancro do pulmão células de não-pequenas), HepG2 (cancro hepático), adenocarcinoma da mama (MCF-7), HeLa (carcinoma cervical) e células primárias de fígado porcino (PLP2).

	GI_{50}^a (μM) $\pm \sigma$				
	NCI-H460	HepG2	MCF-7	HeLa	PLP2
Composto 1	34,57 \pm 1,03	25,37 \pm 2,44	9,95 \pm 1,22	13,70 \pm 0,58	46,81 \pm 2,09
Composto 2	30,38 \pm 1,29	24,15 \pm 1,50	7,77 \pm 0,84	12,96 \pm 0,69	34,23 \pm 3,31

^a Concentração mais baixa a causar 50% da inibição do crescimento celular (GI_{50}).

Através da análise dos dados é possível verificar que os compostos apresentam valores de GI_{50} bastante elevados para a linha celular primária, o que evidencia a sua especificidade para células tumorais. Na figura 4.20 é possível verificar a comparação entre a atividade inibitória dos dois compostos nas diferentes linhas celulares.

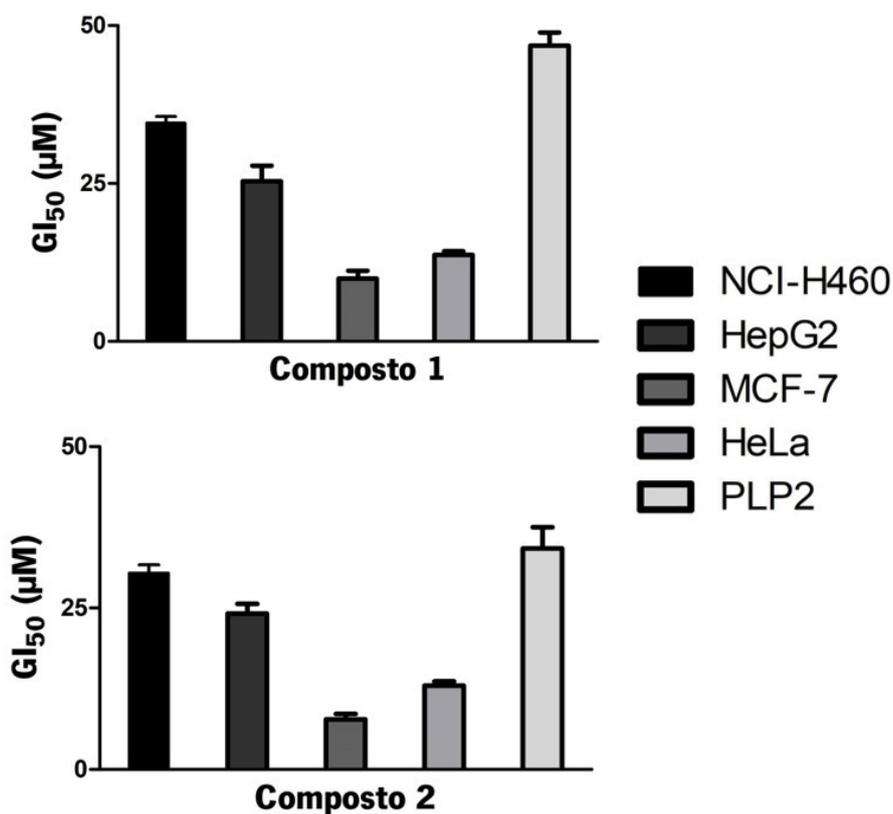


Figura 4.20 - Atividade dos compostos antitumorais 1 e 2 na inibição do crescimento de diferentes linhas de células; NCI-H460 (cancro do pulmão células de não-pequenas), HepG2 (cancro hepático), adenocarcinoma da mama (MCF-7), HeLa (carcinoma cervical) e células primárias de fígado porcino (PLP2).

Os resultados confirmaram a especificidade de ambos os compostos para linhas celulares do cancro da mama, com valores de inibição bastante baixos nestas linhas. Mais ainda, os ensaios *in vitro* realizados revelaram também atividade inibitória nas outras linhas celulares malignas testadas. Os valores de GI_{50} dos compostos variam entre as várias linhas celulares, sendo a inibição de crescimento mais evidente nas linhas MCF-7 e HeLa. É possível verificar que ambos os compostos têm atividade semelhante para todas as linhas, sendo que o composto 2 ($R^1 = Cl$) possui valores mais baixos de GI_{50} para todas as linhas celulares.

Em estudos anteriores [9], verificou-se que magnetolipossomas sólidos de DPPC não apresentaram libertação de compostos antitumorais na ausência de campo magnético, ao contrário de AMLs de Egg-PC. Desta forma, para estes ensaios em linhas de células, os magnetolipossomas sólidos foram sintetizados utilizando o lípido DOPG (1×10^{-3} M), cuja temperatura de transição é cerca de -18 °C [28]. A eficiência na produção de magnetolipossomas

sólidos com este lípido já foi demonstrada por Rodrigues *et al.* (2015) em [8].

Os ensaios de inibição de crescimento das linhas tumorais com os magnetolipossomas (AMLs e SMLs) carregados com composto não mostraram resultados satisfatórios, apresentando valores de GI_{50} superiores a $175 \mu\text{M}$. Apesar destes resultados, é possível concluir que o nanossistema não apresenta toxicidade nas linhas celulares normais. Os resultados obtidos podem ser justificados pelo facto de não ocorrer a libertação do fármaco na ausência de campo magnético, o que se pode mostrar como um resultado promissor, uma vez que a libertação dos compostos deve apenas acontecer sob a ação de um estímulo externo (neste caso, campo magnético alternado).

4.7 Referências bibliográficas do capítulo 4

- [1] H. Hirazawa, S. Kusamoto, H. Aono, T. Naohara, K. Mori, Y. Hattori, T. Maehara, and Y. Watanabe, "Preparation of fine Mg_{1-x}Ca_xFe₂O₄ powder using reverse coprecipitation method for thermal coagulation therapy in an ac magnetic field," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 461, no. 1–2, pp. 467–473, 2008.
- [2] J. S. J. Hargreaves, "Some considerations related to the use of the Scherrer equation in powder X-ray diffraction as applied to heterogeneous catalysts," *Catalysis, Structure & Reactivity*, vol. 2, no. 1–4, pp. 33–37, 2016.
- [3] B. Akbari, M. P. Tavandashti, and M. Zandrahimi, "Particle Size Characterization of Nanoparticles – a practical approach," *Iranian Journal of Materials Science and Engineering*, vol. 8, no. 2, pp. 48–56, 2011.
- [4] L. Khanna and N. K. Verma, "Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity study of calcium ferrite nanoparticles," *Materials Science in Semiconductor Processing*, vol. 16, no. 6, pp. 1842–1848, 2013.
- [5] M. M. G. Saldivar-Ramírez, G. Sánchez-Torres, D. A. Cortés-Hernández, J. C. Escobedo-Bocardo, J. M. Almanza-Robles, A. Larson, P. J. Reséndiz-Hernández, and I. O. Acuña-Gutiérrez, "Study on the efficiency of nanosized magnetite and mixed ferrites in magnetic hyperthermia," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 25, no. 10, pp. 2229–2236, 2014.
- [6] A. R. O. Rodrigues, J. M. F. Ramos, I. T. Gomes, B. G. Almeida, J. P. Araújo, M. J. R. P. Queiroz, P. J. G. Coutinho and E. M. S. Castanheira. "Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs," *RSC Advances*, vol. 6, no. 21, pp. 17302–17313, 2016.
- [7] A. R. O. Rodrigues, I. T. Gomes, B. G. Almeida, J. P. Araújo, E. M. S. Castanheira, and P. J. G. Coutinho, "Magnetoliposomes based on nickel/silica core/shell nanoparticles: Synthesis and characterization," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 148, no. 3, pp. 978–987, 2014.
- [8] A. R. O. Rodrigues, I. T. Gomes, B. G. Almeida, J. P. Araújo, E. M. S. Castanheira, and P. J. G. Coutinho, "Magnetic liposomes based on nickel ferrite nanoparticles for biomedical applications," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 17, no. 27, pp. 18011–18021, 2015.

- [9] A. R. O. Rodrigues, B. G. Almeida, J.M. Rodrigues, M. J. R. P. Queiroz, R. C. Calhelha, I. C. F. R. Ferreira, A. Pires, A. M. Pereira, J. P. Araújo, P. J. G. Coutinho and E. M. S. Castanheira, "Magnetoliposomes as carriers for promising antitumor thieno[3,2-*b*]pyridin-7-arylamines: photophysical and biological studies," *RSC Advances*, vol. 7, no. 25, pp. 15352–15361, 2017.
- [10] J. Yu, L. Yang, X. Liang, T. Dong, and H. Liu, "Bare magnetic nanoparticles as fluorescence quenchers for detection of thrombin," *Analyst*, vol. 140, no. 12, pp. 4114–4120, 2015.
- [11] A. S. Al-Kady, M. Gaber, M. M. Hussein, and E. Z. M. Ebeid, "Structural and fluorescence quenching characterization of hematite nanoparticles," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 83, no. 1, pp. 398–405, 2011.
- [12] N. H. Sulaiman, M. J. Ghazali, J. Yunas, A. Rajabi, B. Y. Majlis, and M. Razali, "Synthesis and characterization of CaFe₂O₄ nanoparticles via co-precipitation and auto-combustion methods," *Ceramics International*, vol. 44, no. 1, pp. 46–50, 2018.
- [13] V. A. Machado, D. Peixoto, M. J. Queiroz, and R. Soares, "Antiangiogenic 1-Aryl-3-[3-(thieno[3,2-*b*]pyridin-7-ylthio)phenyl]ureas Inhibit MCF-7 and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Lines through PI3K/Akt and MAPK/Erk Pathways," *Journal of Cellular Biochemistry*, no. April 2016, pp. 1–24, 2016.
- [14] M.-J. R. P. Queiroz, S. Dias, D. Peixoto, A. R. O. Rodrigues, A. D. S. Oliveira, P. J. G. Coutinho, L. A. Vale-Silva, E. Pinto, E. M. S. Castanheira, "New potential antitumoral di(hetero)arylether derivatives in the thieno[3,2-*b*]pyridine series: Synthesis and fluorescence studies in solution and in nanoliposomes," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 238, pp 71-80, 2012.
- [15] J. Li ,X. Wang, T. Zhang, C. Wang, Z. Huang, X. Luo, Y. Deng* "A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems," *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 10, no. 2, pp. 81–98, 2014.
- [16] A. R. O. Rodrigues, "Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em nanopartículas de níquel com coroa de sílica para aplicações na entrega de fármacos anitumorais," Tese de Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2012.

- [17] L. Tilley, K. R. Thulborn, and W. li, "An Assessment of the Fluidity Gradient of the Lipid Bilayer as Determined by a Set of n-(9- Anthroyloxy) Fatty Acids (n = 2,6,9, 12, 16)", vol. 254, no. 8, pp. 2592–2594, 1979.
- [18] M. A. Bahri, B. J. Heyne, P. Hans, A. E. Seret, A. A. Mouithys-Mickalad, and M. D. Hoebeke, "Quantification of lipid bilayer effective microviscosity and fluidity effect induced by propofol," *Biophysical Chemistry*, vol. 114, no. 1, pp. 53–61, 2005.
- [19] J. R. Lackowicz, "Fluorescence Anisotropy," in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edit., Springer US, 2006, pp. 353–382.
- [20] H. Curtis and N. Barnes, *Biology*, 5th ed. New york: Worth Publishers, 1989.
- [21] Malvern Instruments, "Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes," Technical note. Worcestershire, UK, pp. 1–8, 2014.
- [22] A. Hervault and N. T. K. Thanh, "Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer," *Nanoscale*, vol. 6, no. 20, pp. 11553–11573, 2014.
- [23] R. R. Wakaskar, "Passive and Active Targeting in Tumor Microenvironment," *International Journal of Drug Development and Research*, vol. 9, no. 2, pp. 37–41, 2017.
- [24] V. P. Torchilin, "Passive and Active Drug Targeting: Drug Delivery to Tumors as an Example," in *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 197, 2010, pp. 3–53.
- [25] D. Arzenšek, R. Podgornik, and D. Kuzman, "Dynamic light scattering and application to proteins in solutions," *Semin. Dep. Physics, Univ. Ljubljana*, pp. 1–18, 2010.
- [26] B. Valeur, *Molecular fluorescence - principles and applications*. Weinheim, 2001.
- [27] E. Piacentini, "Encapsulation Efficiency," in *Encyclopedia of Membranes*, E. Drioli and L. Giorno, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016, pp. 706–707.
- [28] A. Radaic, L. R. S. Barbosa, C. Jaime, Y. L. Kapila, F. B. T. Pessine, and M. B. de Jesus, "How Lipid Cores Affect Lipid Nanoparticles as Drug and Gene Delivery Systems," in *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*, 1st ed., Zoe Kruze, 2016, p. 34.

Capítulo 5

Capítulo 5 – Conclusões e perspectivas futuras

Os nanotransportadores magnéticos de fármacos têm sido, na última década, objeto de grande interesse por parte da comunidade científica, devido às suas características interessantes tais como biocompatibilidade, não toxicidade e por oferecerem a possibilidade de encapsulação, transporte e liberação controlada de fármacos.

Durante este trabalho foi possível produzir e caracterizar nanopartículas magnéticas de ferrite de cálcio e ferrites mistas de cálcio e magnésio e incorporar as mesmas em lipossomas, juntamente com novos compostos antitumorais, formando magnetolipossomas.

Através de estudos espectroscópicos, foi possível verificar a encapsulação dos compostos e das nanopartículas magnéticas em lipossomas. Os estudos de anisotropia de fluorescência em estado estacionário permitiram concluir que os compostos se localizavam na bicamada lipídica, devido ao seu caráter hidrofóbico. Os estudos de interação não específica entre os magnetolipossomas e os modelos de membrana permitiram verificar a ocorrência de fusão membranar. Por essa razão, tanto os magnetolipossomas aquosos como os sólidos mostram-se como nanotransportadores promissores que vão permitir o transporte de fármacos com diferentes características, aumentando a concentração de fármaco na zona de interesse e diminuindo os efeitos secundários associados à toxicidade sistêmica.

Os resultados obtidos nos ensaios preliminares de inibição do crescimento de linhas celulares tumorais humanas não permitiram provar a liberação dos compostos encapsulados na ausência de campo magnético. No entanto, estes resultados podem considerar-se positivos, na medida em que é pretendido que os nanossistemas apenas libertem o fármaco sob a ação de um estímulo externo (que, neste caso, seria um campo magnético alternado).

Os resultados alcançados podem ser importantes para aplicações futuras de entrega de fármacos sendo, no entanto, necessários alguns estudos futuros:

- Caracterização estrutural das nanopartículas produzidas por TEM, ou preferencialmente, HR-TEM,
- Produção de nanopartículas por outros métodos de síntese e posterior comparação da variabilidade das características;
- Análise de Rietveld dos difratogramas de XRD das nanopartículas sintetizadas;

- Avaliação por SQUID das propriedades magnéticas das nanopartículas e dos magnetolipossomas produzidos;
- Teste da atividade dos magnetolipossomas com compostos antitumorais encapsulados em linhas celulares tumorais humanas, com recurso a um campo magnético alternado;
- Funcionalização dos diferentes magnetolipossomas, com recurso à PEG-ilação e uso de marcadores específicos, para direcionamento específico a células tumorais.