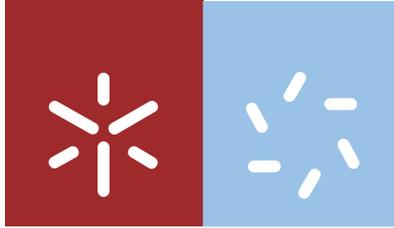


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Pedro Miguel de Faria Mendes

Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em magnetite para aplicações na entrega de fármacos antitumorais



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Pedro Miguel de Faria Mendes

**Desenvolvimento de magnetolipossomas
baseados em magnetite para aplicações
na entrega de fármacos antitumorais**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho realizado sob a orientação da
**Professora Doutora Elisabete Maria dos Santos
Castanheira Coutinho**
e co-orientação do
Professor Doutor Paulo José Gomes Coutinho

Abril de 2013

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, ___/___/_____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Doutor Paulo Coutinho e Prof. Doutora Elizabete Coutinho pela sua disponibilidade, paciência e partilha de conhecimentos.

À Doutora Maria João R. P. Queiroz, pela disponibilização dos compostos antitumorais e ao Prof. Bernardo Almeida pela ajuda na caracterização das propriedades magnéticas das nanopartículas.

Aos meus colegas de laboratório, Rita Rodrigues, Ivo Lopes e Henrique Cachetas, pela ajuda na elaboração de algumas atividades experimentais e discussão de resultados.

A todos os professores do Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas, agradeço o vosso profissionalismo e apoio.

À minha namorada, pais e restante família e amigos pelo seu apoio, incentivo e compreensão.

Ao Departamento de Física, à Escola de Ciências e à Universidade do Minho por tornarem este trabalho possível.

RESUMO

O cancro é uma das doenças com maior incidência na população mundial na atualidade, com uma taxa de mortalidade enorme. Os principais problemas na luta contra o cancro prendem-se com a dificuldade de diagnóstico precoce, a citotoxicidade associada aos fármacos anticancerígenos usados em quimioterapia convencional e a falta de tratamentos mais eficazes. A nanotecnologia surge agora com capacidade para dar resposta a este tipo de problemas estando a revolucionar a área da medicina.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de magnetolipossomas (MGLs) baseados em magnetite com potencial de aplicação no tratamento do cancro pelo efeito conjugado da hipertermia intracelular e entrega controlada de fármacos antitumorais (quimioterapia direcionada), por aplicação de um campo magnético externo.

Foram preparadas nanopartículas magnéticas (NMPs) de magnetite por vários métodos. Algumas das nanopartículas sintetizadas apresentam tamanho reduzido (<20 nm), tendo baixa polidispersividade e baixa coercividade ($H_C \approx 10$ Oe). Essas nanopartículas foram incorporadas com sucesso em lipossomas, obtendo-se magnetolipossomas.

Três compostos fluorescentes, potencialmente antitumorais, derivados de tieno[3,2-*b*]piridinas previamente sintetizados no Centro de Química da Universidade do Minho, foram caracterizados por espectroscopia de absorção (UV-visível) e fluorescência. Os compostos demonstraram emissão de fluorescência razoável em vários solventes, com rendimentos quânticos de fluorescência entre os 2% (clorofórmio) e os 69% (dimetilsulfóxido). No entanto não apresentam emissão de fluorescência em solventes práticos como (água ou álcoois).

Os resultados do estudo fotofísico dos compostos em vesículas lipídicas indicaram que estes se localizam na zona da bicamada lipídica, num ambiente relativamente hidrofóbico, apresentando uma emissão de fluorescência razoável nessas condições. Assim sendo, estes compostos podem ser transportados na bicamada lipídica de MGLs para entrega controlada de fármacos.

Por fim, foram feitos estudos da interação não específica entre os magnetolipossomas e as células usando vesículas unilamelares gigantes (GUVs) como modelos de membrana celular. Neste sentido, foram realizados ensaios para avaliar a transferência de energia ressonante de Förster (FRET) entre os compostos (doadores) incorporados em magnetolipossomas e lípidos marcados com a sonda fluorescente NBD (acetante) incorporados nos GUVs. Apesar de não ter sido possível comprovar inequivocamente a ocorrência de FRET entre os fluoróforos, a inibição de fluorescência do NBD pelas MNPs nos magnetolipossomas parece ser indicativo da interação entre os dois sistemas, possivelmente por fusão membranar.

ABSTRACT

Cancer is one of the diseases with higher incidence among the world's population nowadays, with a huge mortality rate. The main obstacles in the fight against cancer are due to difficulties in early diagnosis, the cytotoxicity associated with the antitumoral drugs used in conventional chemotherapy and the lack of more efficient treatments. Nanotechnology now arises with ability to provide answers to such problems, causing a revolution in medicine.

The goal of this work was the development of magnetoliposomes (MGLs) based on magnetite to be applied in the treatment of cancer by the synergistic effect of intracellular hyperthermia and antitumor drug delivery, by application of an alternating magnetic field.

Magnetic nanoparticles of magnetite were prepared by several methods. Some of the synthesized nanoparticles had a small size ($<20\text{nm}$), a narrow size distribution and low coercivity ($H_C \approx 10\text{ Oe}$). Those nanoparticles were successfully incorporated into liposomes leading to magnetoliposomes.

Three fluorescent compounds, with potential antitumor activity, thieno[3,2-*b*]pyridine derivatives, previously synthesized in the Centre of Chemistry of Minho University, were characterized by absorption and fluorescence spectroscopy. All compounds showed significant fluorescence emission in several solvents, with fluorescence quantum yields between 2% (chloroform) and 69% (dimethylsulfoxide). However, they are not fluorescent in protic solvents (like water and alcohols).

The results of the photophysical study of compounds incorporated in lipid vesicles indicated that compounds were mainly located in the lipid bilayer, in a mainly hydrophobic environment, showing reasonable fluorescence emission under these conditions. Thus, these compounds can be transported in lipid membranes of MGLs to be used as drug delivery systems.

Finally, studies of the non-specific interaction between the MGLs and cells were performed using giant unilamellar vesicles (GUVs) as cell membrane models, in order to assess the Förster resonance energy transfer (FRET) between the compounds (donors) incorporated in MGLs and lipids labeled with the NBD fluorescence probe NBD (acceptor) incorporated in the GUVs. Although it was not possible to prove unequivocally the occurrence of FRET between the fluorophores, the quenching of NBD emission by the magnetic nanoparticles present in the MGLs seems to be indicative of non specific interaction between the two systems, possibly by membrane fusion.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O papel da nanotecnologia na luta contra o cancro	1
1.2. Compostos antitumorais estudados: Derivados de tienopiridinas	3
1.3. Lipossomas	4
1.3.1. Características estruturais	4
1.3.2. Aplicações dos lipossomas	6
1.3.3. Os lipossomas como sistema de encapsulamento e entrega controlada de fármacos em terapia anticancerígena	7
1.3.3.1. Composição	8
1.3.3.2. Tamanho	8
1.3.3.3. Fluidez da bicamada lipídica	9
a) O papel do colesterol na fluidez da bicamada lipídica	9
1.3.3.4. Carga superficial	10
1.4. Nanopartículas magnéticas	11
1.4.1. Métodos de preparação de nanopartículas magnéticas de magnetite	12
1.4.1.1. Co-precipitação em solução	12
1.4.1.2. Síntese de nanopartículas em micelas invertidas	13
1.4.2. Propriedades magnéticas das MNPs	14
1.4.2.1. Efeito do tamanho nas propriedades magnéticas das nanopartículas	14
1.4.2.2. Efeito da forma nas propriedades magnéticas das nanopartículas	15
1.4.3. Proteção e estabilização das nanopartículas magnéticas	16
1.4.3.1. Surfactantes	17
1.4.3.2. Sílica	17
1.4.4. Magnetolipossomas	18
1.4.5. Aplicações das nanopartículas magnéticas em biomédica	18
1.4.5.1. Agentes de contraste em MRI	19
1.4.5.2. Tratamentos por hipertermia	19
1.4.5.3. Entrega controlada de fármacos	21
1.4.6. Considerações físico-químicas para a aplicação de nanopartículas <i>in vivo</i>	22
1.4.6.1. Tamanho	23
1.4.6.2. Forma	23

1.4.6.2. Propriedades de superfície	23
2. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO USADAS	25
2.1. Fundamentos de espectroscopia de absorção no UV-Visível	25
2.1.1. Natureza da radiação eletromagnética	25
2.1.2. Interação luz-matéria	26
2.1.3. Transmitância e absorvância	27
2.1.4. Lei de Lambert-Beer	28
2.1.5. Funcionamento de um espectrofotômetro	29
2.2. Fundamentos de espectrofluorimetria	29
2.2.1. Estados eletrônicos	29
2.2.2. Fluorescência	32
2.2.3. Tempo de vida de fluorescência	32
2.2.4. Rendimento quântico de fluorescência	33
2.2.5. Anisotropia de fluorescência	33
2.2.6. Funcionamento de um espectrofluorímetro	34
2.2.7. Transferência de energia ressonante de Förster (FRET)	36
2.3. Difusão dinâmica de luz (DLS)	37
2.4. Microscopia eletrônica	38
2.4.1. Microscópio eletrônico de varrimento (SEM)	39
2.5. Dispositivo supercondutor de interferência quântica (SQUID)	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. Caracterização fotofísica dos compostos estudados	41
3.1.1. Compostos derivados de tienopiridinas	41
3.1.2. Estudo fotofísico dos compostos em diferentes solventes	42
3.1.3. Determinação do rendimento quântico de fluorescência	43
3.2. Caracterização fotofísica dos compostos em membranas lipídicas	43
3.2.1. Determinação da anisotropia de fluorescência dos compostos em lipossomas	44
3.3. Preparação das nanopartículas de magnetite	44
3.3.1. Síntese de partículas por co-precipitação em solução aquosa	45
3.3.2. Síntese de partículas por co-precipitação inversa em solução aquosa	47
3.3.3. Síntese de partículas por co-precipitação em microemulsões	48
3.3.3.1. Usando Triton X-100 como surfactante	48
3.3.3.2. Usando CTAB como surfactante	50
3.3.4. Síntese de partículas cobertas por lípidos e AOT	51

3.4. Preparação de magnetolipossomas	53
3.5. Caracterização das nanopartículas e dos magnetolipossomas	54
3.6. Estudos de interação magnetolipossoma-célula	54
3.6.1. Preparação dos modelos de membrana celular	54
3.6.2. Ensaio de FRET	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1. Estudo fotofísico dos compostos em solução	57
4.2. Estudo fotofísico dos compostos em vesículas lipídicas	60
4.3. Caracterização das nanopartículas	63
4.3.1. Caracterização morfológica	64
4.3.2. Caracterização das propriedades magnéticas	69
4.4. Estudo fotofísico dos compostos em magnetolipossomas	71
4.5. Estudos de interação magnetolipossomas – modelos de células	73
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	77
6. REFERÊNCIAS	79

1. INTRODUÇÃO

1.1. O papel da nanotecnologia na luta contra o cancro

O cancro é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda causa de morte nos países subdesenvolvidos. Segundo um projeto realizado pela organização mundial de saúde chamado GLOBOCAN, em 2008, surgiram 12,7 milhões de novos casos de cancro e ocorreram 7,6 milhões de mortes no mundo [1]. A incidência desta doença tende a aumentar, em grande parte, devido ao aumento e envelhecimento da população e à adoção de um estilo de vida que promove o desenvolvimento de cancro. O hábito de fumar, a inatividade física e hábitos alimentares errados são as principais causas do aumento da incidência desta doença [1].

A taxa de mortalidade de pacientes com cancro tem diminuído nas duas últimas décadas (22,9% nos homens e 15,3% nas mulheres entre 1990 e 2008) [2], no entanto, ainda há muito a ser feito na área da oncologia, surgindo a necessidade de desenvolver sistemas para deteção precoce, descobrir novos marcadores específicos para o cancro e desenvolver novas abordagens para o tratamento personalizado.

A nanotecnologia é uma tecnologia emergente com grande crescimento nos últimos anos e com uma importância crescente nas mais diversas áreas. A nanotecnologia consiste no desenvolvimento e utilização de materiais, dispositivos ou sistemas através do controlo à escala nanométrica, ou seja, ao nível dos átomos, moléculas e estruturas supramoleculares. O Programa Norte-Americano para a Nanotecnologia - *National Nanotechnology Initiative* define nanotecnologia como o estudo de estruturas em que pelo menos uma das suas dimensões tem tamanho entre 1 e 100nm. No entanto, estruturas com algumas centenas de nanómetros são também consideradas aplicações nanotecnológicas [3].

Nesta escala de tamanhos, os materiais, como metais, semicondutores e polímeros, apresentam propriedades óticas, elétricas e magnéticas diferentes dos mesmos materiais à escala macrométrica, abrindo-se assim, novas possibilidades na sua aplicação [4]. Como a maior parte dos processos biológicos ocorrem à escala dos nanómetros, a nanotecnologia tem enormes potencialidades de aplicação no estudo, tratamento e diagnóstico de doenças [4].

Ultimamente, a nanotecnologia tem sido usada em vários setores da terapêutica, revolucionando o campo da medicina, onde nanopartículas são desenhadas quer para o diagnóstico e terapia de doenças, bem como ferramenta biomédica para investigação [5].

Neste sentido surgiu o termo nanomedicina. De acordo com um grupo de trabalho da Fundação Europeia para a Ciência - *European Science Foundation*, em 2004, nanomedicina é a

construção de sistemas à escala nano (entre 1 e 100nm) que consistem em, pelo menos, dois componentes, em que um dos quais é um princípio farmacológico ativo e o sistema como um todo desempenha funções específicas relacionadas com o diagnóstico, tratamento ou prevenção da doença [6].

Durante os últimos anos, têm sido feitos progressos consideráveis na nano-oncologia, ou seja, na aplicação da nanomedicina no cancro que é, atualmente, o ramo mais importante da nanomedicina [7].

A nano-oncologia tem sido implementada no controlo e tratamento do cancro e pensa-se que esta possa levar a grandes avanços no diagnóstico, deteção e tratamento da doença. Uma das ferramentas mais úteis são os nanovetores, ou seja, nanopartículas ou nanossistemas que podem transportar drogas ou agentes de contraste, e que, podem ser direccionados para a zona do tumor, aumentando a eficiência do tratamento e/ou diagnóstico, reduzindo ao mesmo tempo, a citotoxicidade geralmente associada aos agentes antitumorais em tratamentos de quimioterapia convencional.

A nanooncologia é reconhecida até mesmo pelo *National Cancer Institute* que considera que esta representa uma oportunidade para que ocorram grandes avanços no diagnóstico e tratamento do cancro [4].

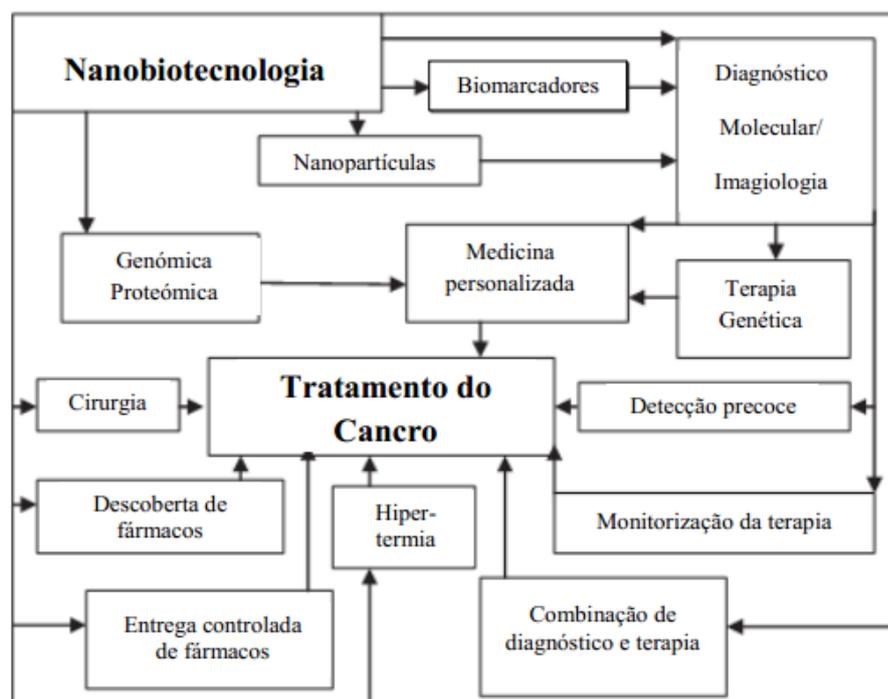


Figura 1 - Papel da nanobiotecnologia e da interação desta com outras tecnologias e abordagens no combate ao cancro. (adaptado de [7])

1.2. Compostos antitumorais estudados: Derivados de tienopiridinas

As piridinas e seus derivados são de grande interesse em química orgânica devido ao facto de apresentarem uma grande variedade de atividades biológicas. Compostos contendo piridinas ou anéis de piperidina estão presentes em mais de 10% dos 1500 medicamentos mais usados no final do século XX. De entre esses medicamentos, encontram-se vitaminas (B3, B6 e PP), analgésicos, analépticos, antiarrítmicos, antisséticos, antidepressivos, espasmolíticos, neurolépticos, agentes tranquilizantes e substâncias com outras atividades farmacológicas [8].

No âmbito deste trabalho, foram estudados três compostos derivados de tienopiridinas sintetizados no Departamento de Química da Universidade do Minho. Estes derivados são 1,3-diarilureias fluorescentes (**2a-c**) preparadas por reação dos grupos amina dos produtos de acoplamento de Suzuki (**1a-b**) obtidos a partir de metil 3-amino-6-bromotieno[3,2-*b*]piridina-2-carboxilato e ésteres pinacolboronados de anilinas, com arilisocianatos, tendo-se obtido elevados rendimentos na reação. O esquema de síntese encontra-se representado na figura 2 [9].

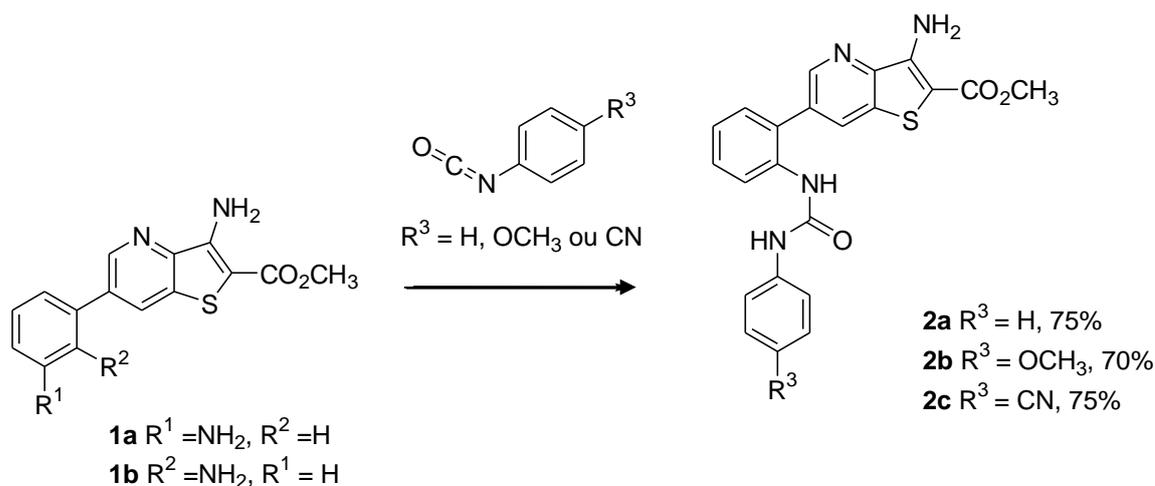


Figura 2 – Esquema de síntese dos compostos estudados (2a-c). As percentagens indicadas correspondem ao rendimento da reação de síntese.

No âmbito deste trabalho, as tieno[3,2-*b*]piridinas são de especial interesse pelo facto de demonstrarem atividade antitumoral e anticancerígena [8]. Derivados de tieno[3,2-*b*]piridinas demonstraram capacidade de inibir o recetor do fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR-2) [10,11,12] e o recetor do fator de crescimento dos hepatócitos (c-MET) [12], recetores estes envolvidos em processos de angiogénese, morfogénese e metastização.

Numa investigação levada a cabo no Centro de Química da Universidade do Minho, pelo grupo de investigadores que nos cedeu os compostos, foram sintetizados derivados de 6-(hetero)ariltieno[3,2-*b*]piridinas. Em testes realizados *in vitro*, alguns desses compostos foram capazes de inibir o crescimento de células de adenocarcinoma da mama (MCF-7), melanoma (A375-C5) e células de cancro do pulmão (NCI-H460), tendo sido possível estabelecer uma relação entre estrutura e atividade (SARs) dos compostos [13].

1.3. Lipossomas

1.3.1. Características estruturais

Lipossomas ou vesículas lipídicas são partículas coloidais, auto-organizadas que ocorrem de forma natural e que podem ser preparados artificialmente [14]. Estes agregados moleculares são geralmente constituídos por fosfolípidos. Os fosfolípidos, são moléculas lipídicas anfipáticas, ou seja, possuem uma cabeça polar (hidrofílica), contendo um grupo fosfato e uma cauda apolar (hidrofóbica), constituída duas cadeias de ácidos gordos. Estas moléculas são capazes de interações hidrofílicas e hidrofóbicas, formando estruturas organizadas em solução aquosa (Figura 3).

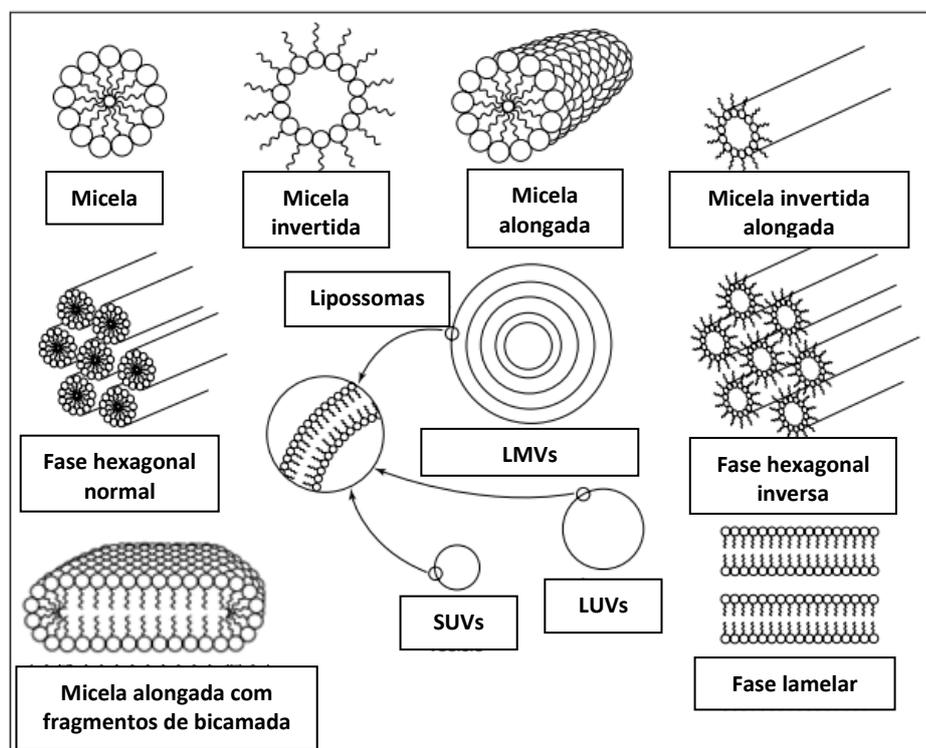


Figura 3 – Possíveis fases resultantes da auto-organização de moléculas anfipáticas em solução aquosa. A fase formada por estas moléculas depende de fatores como, a forma da molécula, concentração, temperatura e força iónica do meio. (adaptado de [15])

SUVs – Vesículas unilamelares pequenas; LUVs – Vesículas unilamelares grandes; LMVs – Vesículas multilamelares grandes.

A forma como as moléculas lipídicas anfipáticas se auto-organizam em solução aquosa, depende de vários fatores que podem ser manipulados de forma a obter agregados lipídicos com as propriedades pretendidas:

1. Concentração do lípido:

A elevadas concentrações formam fases líquido-cristalinas bem organizadas, tais como, fase lamelar, hexagonal ou cúbica. Aumentando a concentração de água, estas fases líquido-cristalinas dispersam-se formando partículas coloidais como micelas ou lipossomas [14].

2. Forma da molécula

Dependendo da molécula, a relação entre área polar (A_p) e a área apolar (A_{np}) varia. Para moléculas em que a $A_p > A_{np}$ formam-se partículas com alta curvatura (por ex. micelas), para moléculas com A_p semelhante a A_{np} formam-se geralmente partículas com bicamada (como lipossomas) e para moléculas com $A_p < A_{np}$ formam-se partículas com curvatura invertida (micelas invertidas) [15] (Figura 4).

3. Temperatura

As moléculas lipídicas anfipáticas são caracterizadas por possuir uma determinada temperatura de transição (T_m), à qual ocorre uma transição de fase. Abaixo da temperatura de transição, os lípidos encontram-se na sua fase gel altamente ordenada. Aumentando a temperatura acima da temperatura de transição, os lípidos passam para a fase líquido-cristalina, mais fluida e desordenada [15].

4. Força iónica (pH)

A força iónica pode ser manipulada para promover uma transição de fase. O aumento da força iónica (diminuição do pH) aumenta a área polar (A_p) das moléculas. Assim, bicamadas lipídicas em fase lamelar ou vesicular tornam-se termodinamicamente instáveis, passando a fases de maior curvatura mais estáveis a estas condições → micelas [15].

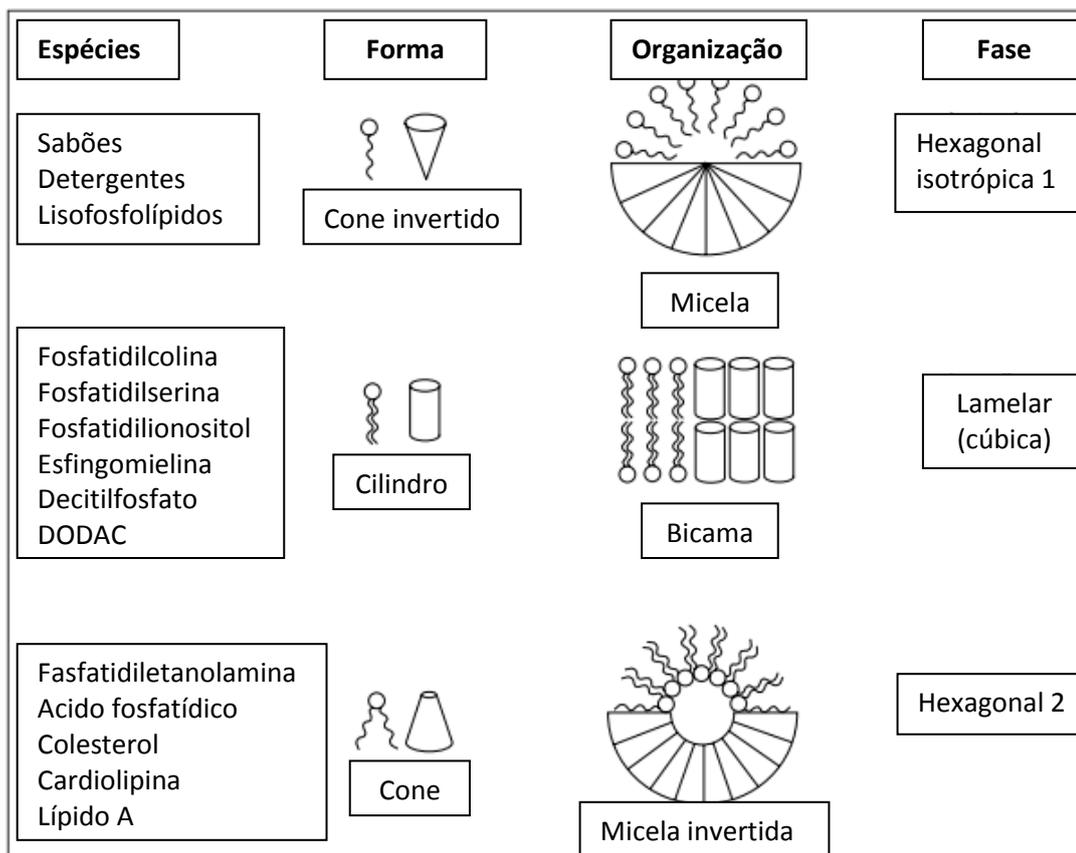


Figura 4 - Efeito da forma molecular no tipo de estruturas formadas (adaptado de [15]).

Os lipossomas são, então, estruturas lipídicas compostas por moléculas anfipáticas que se auto-organizam em solução aquosa numa ou mais bicamadas contendo água no seu interior. De acordo com o seu tamanho e número de camadas os lipossomas podem ser classificados como:

- SUVs – Vesículos unilamelares pequenos (<100nm)
- LUVs – Vesículos unilamelares grandes (>100nm)
- LMVs – Vesículos multilamelares grandes (>100nm) [16]

1.3.2 Aplicações dos lipossomas

Os lipossomas são nanossistemas vistos, atualmente, como tendo um enorme potencial de aplicações nas mais diversas áreas, principalmente devido ao facto de características como o tamanho, estrutura, composição química, densidade de carga e permeabilidade, poderem ser controladas pelo método de preparação. Uma das propriedades mais interessantes destes sistemas é o seu carácter anfifílico, que os torna sistemas de eleição para a solubilização de uma vasta gama de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos. Para além destas propriedades físico-químicas, os

lipossomas podem ser desenvolvidos com lípidos naturais, sendo, portanto, sistemas não tóxicos, não imunogênicos e biodegradáveis [17], com aplicação óbvia em farmacologia e medicina.

Estes sistemas são, ainda, uma ferramenta valiosa em estudos científicos, sendo usados como modelos para estudo de topografia, biofísica membranar, fotofísica, fotoquímica, função celular, interação coloidal, função gênica entre outros [15,17].

Em termos de aplicações práticas estes sistemas são usados como adjuvantes em vacinas, implementadores/transportadores de sinal em diagnóstico médico e bioquímica analítica, solubilizadores ou matriz de suporte para uma vasta gama de compostos para melhorar a penetração tópica em cosméticos [18]. No entanto, ultimamente, o uso de lipossomas como sistema de encapsulamento e entrega controlada de fármacos é a sua área de aplicação mais importante [14].

1.3.3. Os lipossomas como sistema de encapsulamento e entrega controlada de fármacos em terapia anticancerígena

Embora os lipossomas tenham aplicação no encapsulamento e entrega controlada de vários tipos de fármacos, nesta secção será dada particular ênfase à aplicação destes sistemas na terapia anticancerígena, uma vez que esse é o foco deste trabalho.

Avanços recentes nas ciências biomédicas têm resultado ultimamente no desenvolvimento de um grande número de novos compostos com potencial terapêutico comprovado em estudos *in vitro*. No entanto, muitos destes compostos são incapazes de demonstrar resultados satisfatórios na fase dos estudos clínicos (*in vivo*). No caso dos agentes antitumorais, muitos possuem elevada toxicidade para linhas celulares tumorais *in vitro*, mas a sua falta de especificidade para células tumorais, limita a sua aplicação *in vivo*. Uma das maiores limitações de alguns compostos antitumorais, é o seu baixo índice terapêutico (TI), ou seja, a dose necessária para ser eficiente no tratamento de tumores, causa citotoxicidade nos tecidos normais [16]. O baixo índice terapêutico pode dever-se a:

1. Inabilidade de alcançar concentrações terapêuticas no local do tumor [16].
2. Citotoxicidade não específica para os tecidos normais [16].
3. Problemas associados à formulação dos compostos como, por exemplo, baixa solubilidade [16].

Por estas razões, surge a necessidade de desenvolver vetores para o transporte destes compostos, que permitam solubilizá-los e protegê-los de forma a alterar a sua biodistribuição no

organismo, para que a maior parte possa chegar ao local do tumor e tenha, assim, eficiência terapêutica [16].

Devido às propriedades dos lipossomas, anteriormente mencionadas, estes surgem como sistemas capazes de encapsular uma grande variedade de compostos (hidrofóbicos e hidrofílicos), protegendo-os no seu interior, até estes chegarem ao local pretendido (tumor), evitando assim os efeitos citotóxicos nos tecidos normais. Avanços recentes no desenvolvimento de lipossomas têm permitido um melhor controlo da estabilidade e reatividade destes sistemas após administração sistémica [19]. Aquando do desenvolvimento de sistemas baseados em lipossomas para entrega controlada de fármacos, é essencial ter em conta propriedades como composição, tamanho, fluidez e carga superficial, uma vez que estas propriedades influenciam largamente a eficiência de encapsulamento e as interações com componentes biológicos *in vivo*.

1.3.3.1. Composição

Os lipossomas são geralmente constituídos por lípidos de origem natural ou sintética (fosfolípidos e esfingolípidos), podendo conter outros componentes como colesterol e polímeros hidrofílicos. A composição molecular dos lipossomas determina em grande parte as suas propriedades, tais como fluidez da membrana, densidade de carga e permeabilidade. Por sua vez, estas propriedades determinam a forma como os lipossomas interagem com componentes do sangue e outros tecidos e a forma como são internalizados pelas células [16].

1.3.3.2. Tamanho

O tamanho dos lipossomas encontra-se geralmente numa gama de tamanhos entre os muito pequenos (25nm) e os grandes (2,5 μ m). O tamanho dos lipossomas é importante na medida em que este parâmetro determina a capacidade de encapsulação (lipossomas maiores têm maior capacidade de encapsulação) e o tempo de vida de circulação do lipossoma no organismo (lipossomas mais pequenos têm um tempo de vida maior).

Lipossomas mais pequenos, com tamanho inferior a 100nm, têm maior acumulação na zona do tumor. Este facto pode dever-se em parte ao maior tempo de vida de circulação [20], mas também à sua capacidade de circular nos capilares junto ao tumor e de extravasar para o interior dos tecidos tumorais pelas fendas (imperfeições) existentes nesses vasos sanguíneos. A presença de imperfeições ou fendas nos vasos sanguíneos é característica nas zonas do tumor [16].

1.3.3.3. Fluidéz da bicamada lipídica

Como já referido anteriormente, a fluidez da bicamada lipídica é uma propriedade dos lipossomas que depende da sua composição e da temperatura do meio. A fluidez da bicamada lipídica pode ser alterada usando fosfolípidos com diferentes T_m . Cada fosfolípido possui uma T_m específica, que pode variar entre -20 e 90 °C e que depende do comprimento e do grau de saturação das cadeias dos ácidos gordos. Lipossomas constituídos por lípidos com alta T_c (>37 °C), são menos fluidos à temperatura fisiológica e, portanto, menos permeáveis. Pelo contrário, lipossomas constituídos por lípidos com baixa T_m (<37 °C), estão mais suscetíveis a libertar os fármacos encapsulados na sua fase aquosa à temperatura fisiológica [16]. Para além disto, a fluidez da membrana influencia a interação dos lipossomas com as células. Lipossomas compostos por lípidos com elevada T_m parecem ter uma taxa de absorção por parte do sistema retículo-endotelial (RES) menor do que lipossomas compostos por lípidos com baixa T_m [21].

a) O papel do colesterol na fluidez da bicamada lipídica

O colesterol é um lípido frequentemente usado em formulações lipossomais. Esta molécula é importante na medida em que tem um papel regulador na fluidez da membrana do lipossoma, aumentando assim a sua estabilidade. Abaixo da temperatura de transição de fase, quando a membrana se encontra no seu estado líquido-cristalino, a presença de colesterol torna a membrana mais rígida e menos permeável. Acima da temperatura de transição de fase, quando a membrana se encontra no seu estado gel, o colesterol assume o papel inverso, tornando a membrana mais fluida e permeável (Figura 5). Em altas concentrações (razão molar > 30%), o colesterol pode eliminar completamente a transição de fase e diminuir substancialmente a fluidez da membrana acima da T_c , aumentando a sua estabilidade e evitando a libertação do fármaco [16].

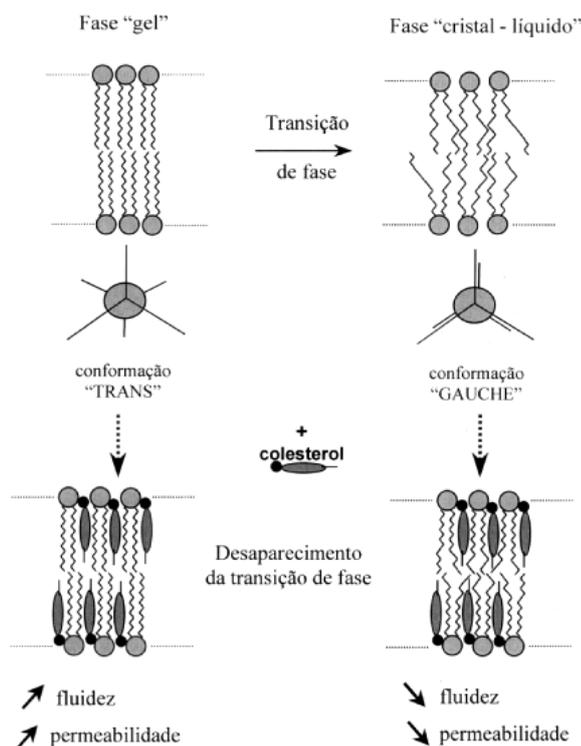


Figura 5 - Influência do colesterol na regulação da fluidez da bicamada lipídica. [22]

1.3.3.4. Carga superficial

Dependendo da sua carga superficial, os lipossomas podem ser neutros, aniônicos ou catiónicos. A densidade de carga superficial dos lipossomas depende da sua composição:

- Lipossomas Neutros – Os lipossomas são neutros quando são constituídos por fosfolípidos neutros (sem carga) ou por fosfolípidos zwitteriônicos (neutros, com duas cargas opostas que se anulam).
- Lipossomas Aniônicos – Compostos por fosfolípidos aniônicos (carregados negativamente)
- Lipossomas Catiônicos – Compostos por fosfolípidos catiónicos (carregados positivamente).

A natureza e a densidade de carga superficial nos lipossomas são parâmetros importantes que influenciam a sua interação com as células. Lipossomas neutros, principalmente SUVs, são fisicamente instáveis devido à falta de carga superficial, tendo tendência para se agregar [23]. Para além disso, os lipossomas neutros não interagem significativamente com as células [24], não sendo, portanto, bons sistemas para entrega controlada de fármacos intracelularmente. Por outro lado, uma

alta densidade de carga superficial promove as interações lipossoma-célula, tendo já sido demonstrado que lipossomas carregados negativamente penetram na célula através de endocitose [25]. No entanto, lipossomas aniônicos podem libertar o fármaco encapsulado na circulação sanguínea ou no espaço extracelular, devido a interações com componentes do sangue e tecidos [24]. Ao contrário dos lipossomas aniônicos, lipossomas catiónicos têm sido propostos como sistemas de entrega controlada de fármacos, capazes de penetrar nas células por fusão membranar [26].

1.4. Nanopartículas Magnéticas

As nanopartículas magnéticas (MNPs) são geralmente definidas como sólidos em que as suas três dimensões são menores do que 100nm e que apresentam propriedades magnéticas. Nesta gama de tamanhos, as partículas possuem uma elevada relação superfície/volume, em que a grande maioria dos átomos se encontram à superfície, fazendo com que estas possuam propriedades únicas, diferentes dos materiais à escala macrométrica [27].

Devido às suas propriedades únicas, as MNPs constituem uma importante ferramenta de pesquisa em áreas como ciências de materiais, física, geologia, biologia e medicina [28]. Para além disso, possuem também um elevado potencial de aplicação prática, nomeadamente em biomedicina, no diagnóstico e tratamento de doenças [29].

As MNPs, particularmente nanopartículas de magnetite, existem na natureza, sintetizadas por vários seres vivos [29]. Por exemplo, os salmões possuem nanopartículas de magnetite nas suas cavidades nasais que, acredita-se, lhes permitem orientar-se nos seus movimentos migratórios, usando o campo magnético da terra como referência [30].

No entanto, atualmente é possível sintetizar MNPs de forma artificial, tendo sido publicados vários métodos de síntese de MNPs de magnetite (Fe_3O_4), greigite (Fe_3S_4), magmite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), ferrites ($\text{MeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$, onde $\text{Me} = \text{Ni}, \text{Co}, \text{Mg}, \text{Zn}, \text{Mn}$), e MNPs de Níquel [29].

A magnetite (Fe_3O_4) é um óxido de ferro de cor negra, sendo o mineral mais magnético na Terra [31]. Partículas de magnetite ou da sua forma oxidada magmite são, de longe, os materiais mais usados para aplicações biomédicas, em parte devido às suas propriedades magnéticas e porque, ao contrário de outros materiais magnéticos como o níquel e o cobalto, os óxidos de ferro não são tóxicos [32].

1.4.1. Métodos de preparação de MNPs de magnetite

A escolha do método de preparação de MNPs para aplicação biomédica, é de extrema importância, pois, dependendo do método usado, as suas propriedades finais serão diferentes. Os métodos de preparação devem permitir obter, de forma reprodutível, nanopartículas com tamanho e forma uniformes [32].

Entre os métodos de síntese mais usados encontram-se a coprecipitação em solução aquosa e a síntese em micelas invertidas.

1.4.1.1. Coprecipitação a partir de solução

Em geral, este método permite um controlo rigoroso do tamanho e da forma, sendo, portanto, apropriado para a síntese de nanopartículas para uso biomédico. As MNPs são preparadas por uma reação de precipitação em solução aquosa, processo que envolve a separação entre a nucleação (formação do núcleo) e crescimento [33]. A nucleação inicia-se quando as espécies reativas em solução atingem um ponto de saturação supercrítica. Depois, os núcleos formados crescem uniformemente por difusão dos solutos em solução para a superfície das nanopartículas até se atingir o tamanho final.

Nanopartículas de magnetite (Fe_3O_4) podem ser sintetizadas por coprecipitação de sais de ferro (II) e (III) em solução aquosa por adição de uma base [34]. O controlo do tamanho, forma e composição das nanopartículas depende do tipo de sais usados (cloretos, sulfatos, nitratos, etc.), da razão $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$, do pH e da força iónica do meio.

Convencionalmente, as partículas de magnetite são preparadas por adição de uma base a uma mistura aquosa de cloreto de ferro (II) e cloreto de ferro (III) numa razão de 1:2 [35].

A formação das partículas de magnetite ocorre segundo a reação química:



De acordo com a termodinâmica da reação, a precipitação completa é esperada entre pH 9 e 14, enquanto se mantiver a razão molar 1:2 sob ambiente livre de oxigénio. Outro método é usar misturas estequiométricas de hidróxido de ferro (II) e hidróxido de ferro (III) em meio aquoso. Com este método obtêm-se partículas de magnetite esféricas e com tamanho homogéneo [36]. Ajustando o pH e a força iónica do meio, é possível controlar o tamanho das partículas numa ordem de

grandeza [37]. O tamanho diminui à medida que o pH e a força iônica do meio aumentam [37]. Ambos os parâmetros afetam a composição química da superfície e, conseqüentemente, a carga eletrostática superficial das partículas.

1.4.1.2. Síntese de nanopartículas em micelas invertidas

Microemulsões de água em óleo (w/o), também designadas de soluções de micelas invertidas, são usadas na síntese de nanopartículas desde os anos 80, quando as primeiras soluções coloidais de nanopartículas metálicas foram sintetizadas [38].

Nestes sistemas, pequenas gotas de água são envolvidas por moléculas de surfactante, dispersas numa fase lipídica contínua. As micelas invertidas assumem um papel de confinamento que limita o crescimento das partículas e a sua aglomeração [39].

Geralmente, as micelas possuem forma esférica, uma vez que esta forma diminui a energia superficial, sendo, portanto, a forma termodinamicamente mais estável. Por esta razão, este método permite obter nanopartículas de forma esférica cujo tamanho será dependente do tamanho micelar.

Quando são adicionados solutos polares ou carregados a uma solução micelar, estes são compartimentados no interior das micelas (fase aquosa). Neste sentido, é importante ter em conta que as micelas são sistemas dinâmicos, ocorrendo frequentemente colisões entre micelas devido ao seu movimento Browniano, resultando na troca dos conteúdos intramicelares [40,41]. Este processo de troca é fundamental na síntese de nanopartículas usando micelas invertidas, permitindo a solubilização de diferentes reagentes em soluções micelares separadas, em que a reação ocorre apenas após a mistura das soluções. Após a mistura das soluções, a nucleação ocorre inicialmente na periferia das micelas, à medida que os reagentes no seu interior se tornam supersaturados. O crescimento das nanopartículas dá-se, posteriormente, a partir desses pontos de nucleação, alimentado pela chegada de reagentes provenientes da troca intermicelar [42].

As primeiras MNPs sintetizadas por este método foram nanopartículas de magnetite (Fe_3O_4) e de magmrite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), por oxidação de sais de ferro (II) [43]. Nesse trabalho foi usado o AOT (dioctilsulfosuccinato de sódio) como surfactante e o *iso*-octano como solvente apolar, tendo sido obtidas nanopartículas com uma pequena distribuição de tamanhos (menos de 10%). Para além do AOT, têm sido usados outros sistemas como o CTAB [44] (brometo de cetiltrimetilamónio) e SDS (dodecilsulfato de sódio) [45].

1.4.2. Propriedades magnéticas das MNPs

Como referido anteriormente, à escala nanométrica, os materiais apresentam propriedades únicas, diferentes dos mesmos materiais à escala macroscópica. No caso de materiais com propriedades magnéticas, como é o caso das MNPs, propriedades magnéticas como a coercividade (H_c) e a suscetibilidade (χ), deixam de ser características intrínsecas, passando a estar dependentes do tamanho, forma e composição. Assim, é possível obter nanopartículas com as propriedades magnéticas desejadas através do controlo dessas variáveis [46,47].

Antes de mais é importante fazer a distinção entre ferromagnetismo e paramagnetismo. De forma simples, ferromagnetismo é a propriedade de um material formar um íman permanente, ou seja, materiais ferromagnéticos têm capacidade de manter-se magnetizados mesmo na ausência de campo magnético externo. Já os materiais paramagnéticos só têm propriedades magnéticas na presença de um campo magnético externo. Na ausência de campo magnético externo perdem rapidamente a sua magnetização.

Nos materiais à escala macroscópica, os parâmetros que definem propriedades magnéticas como a coercividade (H_c) e a suscetibilidade magnética (χ), são a composição química, a estrutura cristalina, a anisotropia magnética e defeitos estruturais. No entanto, quando passamos para a escala dos nanómetros, a forma e o tamanho das partículas passam a desempenhar um papel fundamental nas suas propriedades magnéticas.

1.4.2.1. Efeito do tamanho nas propriedades magnéticas de nanopartículas

Um dos fenómenos mais interessantes das nanopartículas magnéticas, o superparamagnetismo, é altamente dependente do tamanho. A barreira de energia de magnetização anisotrópica para que ocorra inversão de spin de um magneto é proporcional ao produto da constante de magnetização anisotrópica (K_u) e do volume (V) do magneto [48]. Ao contrário dos materiais à escala macroscópica, em que a energia de magnetização anisotrópica é muito maior que a energia térmica (kT) (Figura 6, linha azul), a energia térmica das nanopartículas é suficiente para que ocorra uma inversão no sentido de spin magnético, sendo, no entanto, insuficiente para ultrapassar a energia de emparelhamento spin-spin (Figura 6, linha vermelha). Esta flutuação magnética conduz a uma magnetização total zero, sendo este comportamento designado superparamagnetismo. Assim, as propriedades superparamagnéticas de um material estão dependentes do seu volume.

Nanopartículas de óxido de ferro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) com 55nm exibem um comportamento ferromagnético com coercividade 52 Oe a 300K, mas partículas do mesmo material com 12nm, demonstram um comportamento superparamagnético sem histerese (com coercividade zero) [49]. (Figura 6b, 6c)

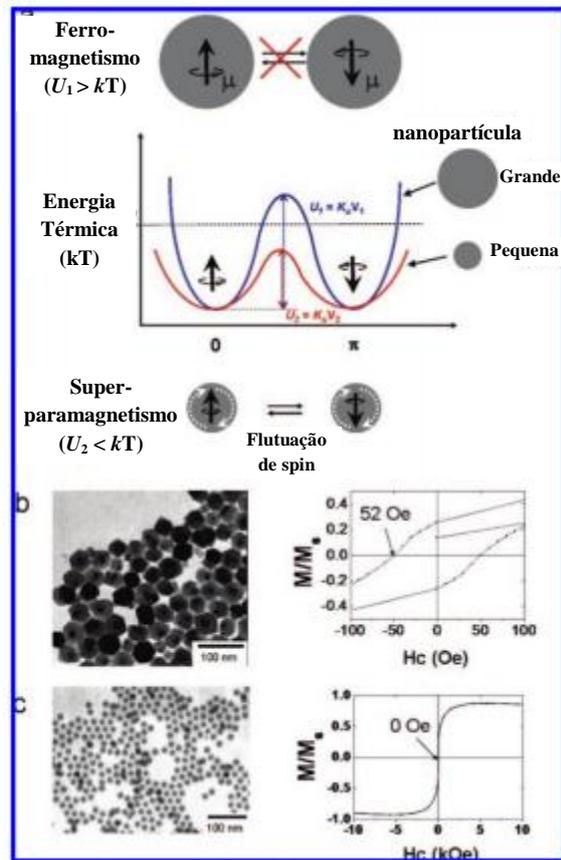


Figura 6 – Transição de um comportamento ferromagnético para superparamagnético de nanopartículas, dependendo do tamanho: (a) – diagrama de energia de nanopartículas magnéticas com diferente alinhamento de spin magnético. Nanopartículas grandes (linha azul) demonstram comportamento ferromagnético, enquanto nanopartículas mais pequenas (linha vermelha), demonstram comportamento superparamagnético. (b e c) – Imagens de TEM e curvas de histerese de nanopartículas de óxido de ferro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), onde partículas de 55nm (b), demonstram comportamento ferromagnético e partículas de 12nm (c) demonstram comportamento superparamagnético. (adaptado de [49])

1.4.2.2. Efeito da forma nas propriedades magnéticas das nanopartículas

Outra propriedade importante que influencia as propriedades magnéticas das nanopartículas é a sua forma. Num estudo feito com nanofios de cobalto em códigos de barras de CoPt [50], a anisotropia dos nanofios de Cobalto demonstrou ter uma grande influência nas suas propriedades magnéticas, nomeadamente nas suas curvas de histerese. Nesse estudo, foram usados nanofios de cobalto com diâmetro (a) fixo de 65nm, onde se variou apenas o comprimento (b) (Figura 7a-d). Para definir a anisotropia dos nanofios foi usada uma razão entre o comprimento e diâmetro:

($\gamma=b/a$). A coercividade dos nanofios foi medida com magnetização na direção b , obtendo-se coercividade ($H_{c(b)}$) = 668 Oe para os nanofios com $\gamma=45$ (Figura 7a). À medida que γ diminui para 3,5, 1 e 0,25, a coercividade diminui para 667, 164 e 76 Oe, respectivamente (Figura 7b-d), indicando que uma maior anisotropia está relacionada com uma maior coercividade magnética.

No entanto, os nanofios com $\gamma=0,25$ demonstraram uma coercividade ao longo de b menor que os nanofios com $\gamma=1$, apesar de terem uma maior anisotropia. Apesar de tudo, isto parece não estar relacionado com a sua forma, mas sim com o facto dos nanofios com $\gamma=0,25$ terem menor dimensão na direção do campo magnético b , uma vez que, nas medições feitas ao longo da direção a , os nanofios com $\gamma=1$ apresentarem uma menor coercividade que os nanofios com $\gamma=0,25$. Pode, assim, inferir-se deste estudo que uma forma isotrópica, idealmente esférica, é importante para se obter propriedades superparamagnéticas nas nanopartículas.

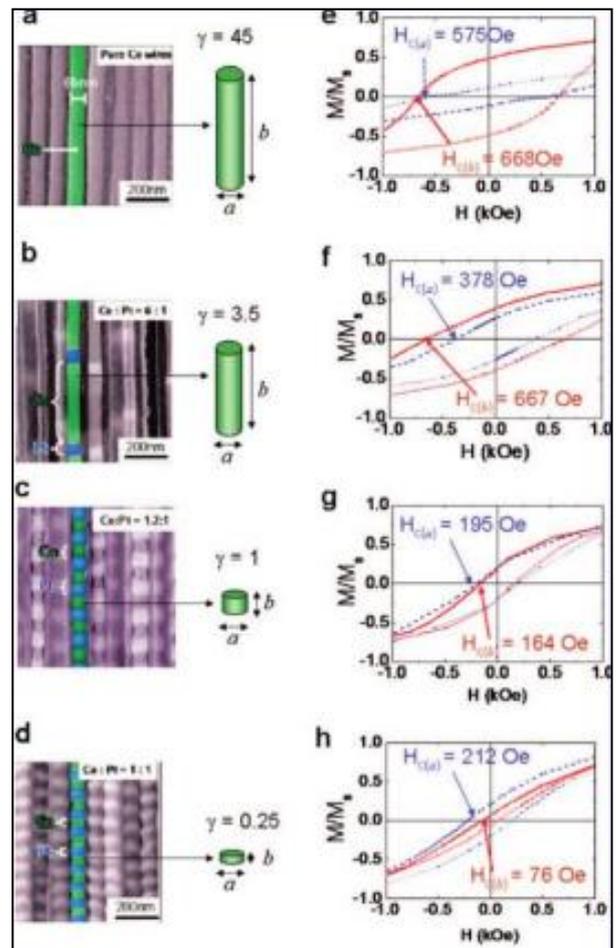


Figura 7 - Imagens de SEM (a-d) de códigos de barras de CoPt com várias relações comprimento/diâmetro ($\gamma=a/b$) dos nanofios de Co, e a dependência da forma nas suas propriedades magnéticas (e-h). Onde as linhas azuis correspondem às medidas de coercividade ao longo do eixo b e as linhas vermelhas ao longo do eixo a . [50]

1.4.3. Proteção e estabilização das nanopartículas magnéticas

Um dos problemas que surge na síntese de nanopartículas prende-se com o facto de estas terem tendência para se agregar ou precipitar ao longo do tempo. Para além disso, nanopartículas magnéticas de metais como Fe, Co e Ni são suscetíveis a oxidação em ambiente aeróbico e essa suscetibilidade aumenta com a diminuição do tamanho das partículas devido à elevada razão superfície/volume [51].

Assim, é importante desenvolver estratégias para tornar as nanopartículas física e quimicamente mais estáveis.

A forma mais comum de estabilizar e proteger as nanopartículas magnéticas é cobrir as nanopartículas com uma camada superficial capaz de evitar a aglomeração e o contacto com o ar. Deste processo, resultam nanopartículas com estrutura de núcleo-coroa, que correspondem às nanopartículas magnéticas (núcleo) revestidas por um material estabilizador/protetor (coroa). Os materiais usados para revestir as nanopartículas podem ser orgânicos, como surfactante ou polímeros, ou inorgânicos, como sílica.

1.4.3.1. Surfactantes

Os surfactantes são frequentemente usados para passivar a superfície de nanopartículas durante ou após o processo de síntese, para evitar a sua aglomeração. Os surfactantes presentes na superfície das nanopartículas criam forças repulsivas que contrabalançam as forças atrativas (magnéticas e de Van der Waals) que causam a aglomeração das partículas, mantendo-as num estado coloidal estável. No entanto, a estabilização de nanopartículas magnéticas metálicas com surfactantes não é suficiente para as proteger da oxidação em condições aeróbicas [51].

1.4.3.2. Sílica

A sílica é um material que tem sido usado para proteger nanopartículas magnéticas. Uma camada de sílica é capaz de proteger a interação dos núcleos magnéticos com agentes externos. Por exemplo, a interação de sondas fluorescentes com nanopartículas magnéticas resulta frequentemente em inibição (*quenching*) de fluorescência, o que não acontece quando as nanopartículas são revestidas com sílica [52]. Para além disso, o revestimento com sílica tem outras vantagens, tais como: [51]

- Estabilidade em solução aquosa (as partículas tornam-se hidrofílicas)
- Facilidade de funcionalização das nanopartículas revestidas com sílica através da modificação da superfície com outros grupos funcionais.
- Proteção contra degradação e oxidação.

O revestimento das nanopartículas com sílica é usualmente realizado por hidrólise de tetraetoxisilano (TEOS) em solução aquosa na presença de uma base (em pH básico). A espessura da camada de sílica pode ser controlada fazendo variar a relação TEOS/H₂O [53].

1.4.4. Magnetolipossomas

Os magnetolipossomas são sistemas compostos por nanopartículas magnéticas englobadas em lipossomas, na sua fase aquosa ou lipídica. Estes sistemas são de especial interesse, uma vez que aliam as propriedades dos lipossomas e das MNPs, referidas anteriormente.

Os lipossomas são agregados esféricos de moléculas anfifílicas que podem ser usados para revestir MNPs de duas formas: incorporação pós-síntese ou sintetizando as MNPs diretamente no seu interior. No primeiro caso, MNPs solúveis em água, são confinadas ao centro aquoso dos lipossomas [54], ou, alternativamente, MNPs hidrofóbicas podem ser revestidas com micelas [55]. No segundo caso, as MNPs podem ser precipitadas diretamente no centro dos lipossomas, obtendo-se nanopartículas uniformes com tamanho tão pequeno como 15nm [55].

O revestimento lipídico constitui vantagens importantes, especialmente para entrega controlada de fármacos, incluindo: [56]

- Modificação superficial simples
- Encapsulação adequada de fármacos
- Proteção dos fármacos no interior do corpo até que o magnetolipossoma seja degradado no interior das células alvo.

No entanto, no processo de preparação de magnetolipossomas há o risco de formação de aglomerados de MNPs no seu interior, conduzindo, por vezes, a propriedades físico-químicas e magnéticas não desejadas [57]. Assim, é importante controlar o processo de revestimento das nanopartículas de forma a tentar obter magnetolipossomas com MNPs isoladas.

1.4.5. Aplicações das nanopartículas magnéticas em biomédica

As nanopartículas magnéticas têm sido usadas na área das biociências e da medicina, desde meados dos anos 70. De entre a larga gama de nanomateriais usados nessas áreas, as nanopartículas magnéticas têm despertado um grande interesse, principalmente devido às suas propriedades magnéticas intrínsecas. A característica principal destas partículas prende-se com o facto de serem capazes de reagir à aplicação de um campo magnético externo, característica esta que pode ser explorada para a entrega controlada de fármacos. A perda de histerese mediada pela aplicação de um campo magnético alternado é outra das suas propriedades interessantes, revelando-se uma boa

ferramenta em tratamentos por hipertermia. Para além disso, estas partículas têm a capacidade de gerar elas próprias um campo magnético, influenciado pelo ambiente onde se encontram, característica esta que pode ser explorada em imagiologia por ressonância magnética (MRI), com grande utilidade no diagnóstico de doenças, nomeadamente na identificação de tumores para diagnóstico precoce do cancro [58].

Este tipo de nanopartículas tem, portanto, grande potencial de aplicação no campo da nanomedicina, nomeadamente para entrega controlada de fármacos, tratamentos de hipertermia por ação de radiação eletromagnética e no melhoramento de contraste em MRI.

1.4.5.1. Agentes de contraste em MRI

A imagiologia por ressonância magnética (MRI) é uma técnica usada no diagnóstico de doenças, com relevância acrescida no diagnóstico do cancro. Esta técnica tem como vantagem uma elevada resolução de contraste espacial entre diferentes tecidos. De forma a melhorar o contraste das imagens obtidas, e dessa forma aumentar as potencialidades da técnica, é necessário desenvolver agentes de contraste cada vez mais eficientes.

Nanopartículas ferromagnéticas e superparamagnéticas têm sido desenvolvidas e usadas como agentes de contraste em diagnóstico clínico. De entre as MNPs usadas como agentes de contraste em MRI, encontram-se as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs), de elevado interesse devido às suas propriedades superparamagnéticas. Os SPIONs pertencem a uma classe de nanopartículas que consistem num núcleo de óxido de ferro que pode ser revestido por materiais inorgânicos (ouro ou sílica) e orgânicos, sintéticos ou naturais (fosfolípidos, ácidos gordos, polissacáridos, polímeros naturais como dextrano ou quitosano, polímeros biodegradáveis como polietilenoglicol (PEG), polímeros não degradáveis como polivinil álcool (PVA), péptidos e outros surfactantes) [59-61]. Para além dos SPIONs, também nanopartículas de óxido de ferro ultra pequenas (USPIONs), estão já em fase de ensaios clínicos, sendo o Combidex©, um dos mais notáveis, encontrando-se na última fase dos ensaios clínicos para deteção de metástases em nódulos linfáticos [62].

1.4.5.2. Tratamentos por hipertermia

Os tratamentos por hipertermia atuam provocando a morte celular por aumento da temperatura. Este tipo de tratamento tem-se mostrado promissor, principalmente aplicado ao cancro. Os sistemas de terapia convencional são desenvolvidos para aquecer os tecidos até temperaturas

entre 42,5 °C e 44 °C. No entanto temperaturas mais elevadas permitem matar um maior número de células, sendo assim mais eficazes [63].

A principal limitação deste tipo de tratamento deve-se à dificuldade de aquecer apenas a zona do tumor, sem causar danos aos tecidos saudáveis. Para contornar este facto, alguns autores propuseram a hipertermia intracelular e desenvolveram partículas magnéticas para esse fim [64,65]. Este conceito baseia-se no princípio de que, sob a ação de um campo magnético alternado, uma partícula magnética é capaz de gerar calor por perda de histerese.

Gordon *et al.* [66] propôs o conceito de hipertermia intracelular pela primeira vez. No seu trabalho, usou nanopartículas de magnetite-dextrano que demonstraram capacidade de aquecer a zona do tumor *in vivo* após injeção em ratos com carcinoma da mama. Contudo, partículas com 15nm são superparamagnéticas e apresentam uma baixa taxa de absorção específica (SAR), o que indica que a capacidade destas para gerar calor é baixa.

Foi já reportado que o tamanho das partículas é um fator crucial para obter uma SAR elevada [67]. No caso da magnetite, a SAR de partículas com 35nm é duas vezes mais elevada que a de partículas com 10nm.

A acumulação das nanopartículas magnéticas nas células tumorais é outro fator crucial para que a hipertermia intracelular seja eficaz. Num trabalho realizado por Shinkai *et al.* [68], foram desenvolvidos magnetolipossomas catiónicos (MLCs) contendo nanopartículas de magnetite (Figura 8A). Esses sistemas demonstraram uma taxa de acumulação em células de glioma de ratos 10 vezes superior em comparação com magnetolipossomas neutros (Figura 8B), indicando assim que a carga superficial é um parâmetro crucial na interação dos magnetolipossomas com as células. Os MLCs demonstraram ainda uma SAR suficientemente alta para ser usada com sucesso em hipertermia e uma biocompatibilidade comparável aos sistemas de dextrano-magnetite.

Num outro trabalho realizado por Yanase *et al.* [69], foram injetados MLCs de forma subcutânea em tumores de ratos (F344) com glioma de rato (T-9). Os ratos foram posteriormente submetidos a um campo magnético alternado durante 30 minutos: uma vez (grupo II), duas vezes (grupo III), e três vezes (grupo IV). No grupo de controlo (grupo I), foram administrados MLCs, mas estes não foram expostos ao campo magnético alternado. A temperatura do tumor subiu rapidamente, atingindo os 43 °C cerca de 15 minutos depois da exposição ao campo magnético alternado (Figura 8C). A temperatura retal dos ratos permaneceu entre 35 e 37 °C. No grupo II, a diminuição do volume do tumor não foi significativa. No entanto, nos grupos III e IV, em que os animais foram sujeitos múltiplas vezes ao campo magnético alternado, a redução do volume do tumor foi evidente. Uma regressão completa do tumor foi observada em um de cinco ratos para o grupo II, em três de cinco ratos para o grupo III e em sete de oito ratos para o grupo IV. Estes

resultados confirmam a eficiência de múltiplas exposições a um campo magnético alternado na regressão dos tumores. No grupo IV, apenas um dos tumores não demonstrou regressão. (Figura 8D).

Estes resultados são promissores e demonstraram que MLCs incorporando partículas de magnetite têm elevado potencial de aplicação para tratamentos de hipertermia do cancro em humanos.

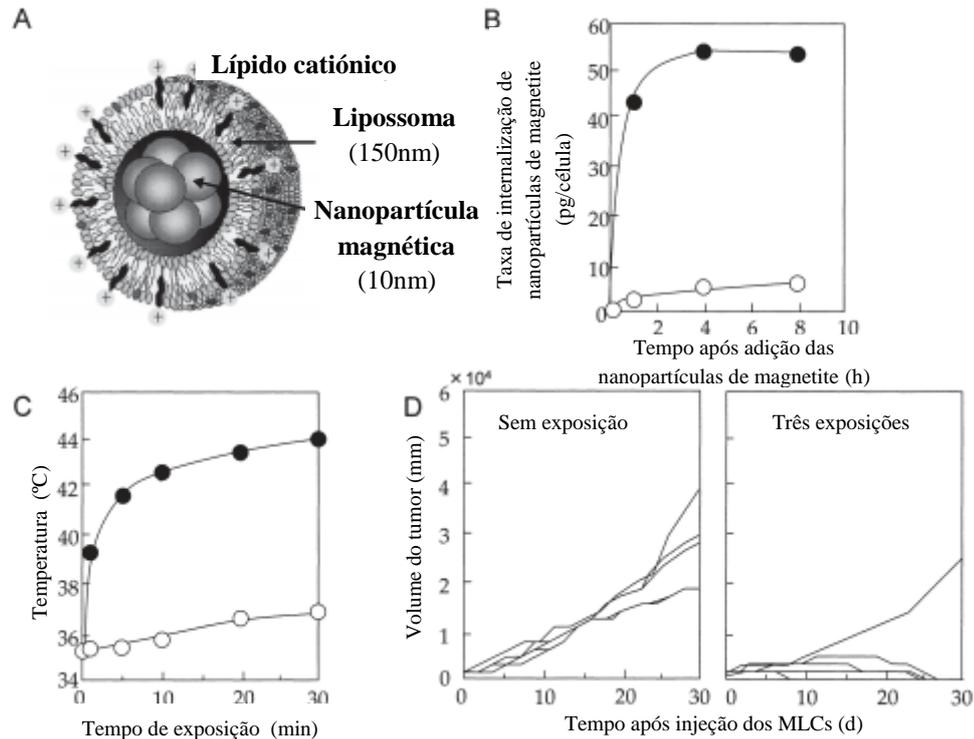


Figura 8 – A - Esquema de um magnetolipossoma catiônico contendo nanopartículas de magnetite para uso em hipertermia. B – Comparação da taxa de entrada nas células de glioma de rato (T-9) *in vitro* por magnetolipossomas catiônicos (círculos preenchidos) e magnetolipossomas neutros (círculos não preenchidos). C – Aumento da temperatura do tumor (círculos preenchidos) e temperatura rectal (círculos não preenchidos) dos ratos, quando sujeitos a um campo magnético alternado de 384 Oe durante 30 minutos. D – Representação do crescimento de tumores em ratos sem exposição a um campo magnético alternado (esquerda), não havendo regressão do tamanho do tumor. Em ratos expostos a um campo magnético alternado três vezes (direita), observa-se a regressão completa dos tumores em 7 dos 8 ratos testados. Não se verificou crescimento dos tumores tratados durante um período de 3 meses após a realização do tratamento. (adaptado de [69])

1.4.5.3. Entrega controlada de fármacos

O tratamento de tumores com base na quimioterapia convencional tem estado limitado pelo facto de provocar toxicidade sistémica no organismo e, por esta razão, são usadas dosagens abaixo do que seria ideal para um tratamento eficaz do tumor. A terapia direcionada para entrega controlada de fármacos usando nanopartículas pode melhorar a eficiência do tratamento,

aumentando a concentração do fármaco no local do tumor, evitando, em simultâneo, altas concentrações do fármaco nos restantes tecidos.

Para este propósito, os fármacos podem ser imobilizados em nanopartículas biocompatíveis ou em magnetolipossomas, numa formulação farmacêutica estável. Esses sistemas podem, posteriormente, ser injetados na artéria que alimenta o órgão alvo ou o tumor, na presença de um campo magnético externo. A presença do campo magnético externo mantém as nanopartículas injetadas no local alvo, reduzindo a eliminação por parte do sistema retículo-endotelial e facilitando a sua penetração para o espaço extravascular [70].

De forma a reter eficazmente as MNPs, o campo magnético aplicado deve ser forte o suficiente para contrabalançar as taxas de fluxo linear no órgão ou no tumor (entre 10 e 0,05 cm/s, dependendo do tamanho do vaso e dos padrões de ramificação) [71,72].

Um estudo realizado por M. Suzuki *et al.* [73], em tumores subcutâneos em ratos, demonstrou um aumento significativo da taxa de absorção pelas células tumorais quando estava presente um campo magnético externo. Nesse estudo, a taxa de absorção das nanopartículas pelas células de tumor foi de 70% do total de nanopartículas injetadas, sob influência de campo magnético, e de apenas 27,4% na ausência deste.

As nanopartículas magnéticas podem ser incorporadas em lipossomas, obtendo-se magnetolipossomas capazes de englobar uma vasta variedade de fármacos [73,74]. Por exemplo, magnetolipossomas termossensíveis podem ser usados em entrega controlada de fármacos, em que estes apenas libertam os fármacos incorporados, quando é provocado um aumento da temperatura por aplicação de um campo eletromagnético [75].

1.4.6. Considerações físico-químicas para a aplicação de nanopartículas *in vivo*

A farmacocinética e a absorção celular das nanopartículas *in vivo*, incluindo a sua capacidade de atravessar barreiras biológicas, estão intimamente relacionadas com as características físico-químicas das nanopartículas, incluindo a morfologia, raio hidrodinâmico, carga e outras propriedades superficiais [76,77]. Geralmente, as nanopartículas magnéticas são constituídas por um núcleo magneticamente ativo, revestido por um material estabilizador. Agentes terapêuticos podem posteriormente ser embebidos nessa camada externa ou ligar-se química ou estruturalmente à superfície. Em cada etapa do desenvolvimento, o tamanho, a carga, a hidrofobicidade, a forma e a orientação dos materiais constituintes das nanopartículas devem ser considerados, uma vez que essas características irão influenciar a sua interação com os sistemas biológicos.

1.4.6.1. Tamanho

O tamanho das nanopartículas é uma característica determinante na sua biodistribuição *in vivo*:

- Influencia o perfil de concentração das nanopartículas nos vasos sanguíneos [78,79]. Decuzzi *et al.* produziu modelos que sugerem que nanopartículas pequenas apresentam maior taxa de difusão, aumentando a sua concentração no centro dos vasos e diminuindo, assim, as interações com as células endoteliais, prolongando o tempo em que as nanopartículas permanecem em circulação [79].
- Afeta o mecanismo de depuração das nanopartículas, tendo sido já reportado que nanopartículas pequenas (<20nm) são excretadas por via renal [79], enquanto partículas médias (30-150nm) se acumulam na medula óssea [80], no coração, no fígado e no estômago [81] e nanopartículas maiores (150-300nm) foram encontradas no fígado e no baço [82].
- Determina a permeabilidade das nanopartículas aos tecidos vasculares [83]. Em relação à maioria das barreiras endoteliais, estas permitem a passagem de nanopartículas até 150nm. Já em relação a outras barreiras, como a barreira hematoencefálica, nanopartículas de ouro entre 15 e 50nm demonstraram capacidade de atravessar, enquanto as mesmas partículas com 100 e 200nm não foram capazes [84].

1.4.6.2. Forma

Em relação à forma das nanopartículas, foi já demonstrado em estudos comparativos que partículas com formas anisotrópicas são capazes de evitar a bioeliminação melhor que nanopartículas esféricas [85]. No entanto, mais estudos são necessários para compreender a influência da forma no seu comportamento *in vivo*.

1.4.6.3. Propriedades de superfície

As propriedades superficiais das nanopartículas, como a carga e a hidrofobicidade, podem afetar a sua biodistribuição, limitando ou promovendo interações entre as nanopartículas e o sistema

imunitário, proteínas do plasma e matrizes extracelulares [32]. Por exemplo, nanopartículas hidrofóbicas e carregadas apresentam tempo de circulação reduzido devido à adsorção de proteínas do plasma (opsonização), que leva ao reconhecimento por parte do sistema reticuloendotelial (RES) [77]. No caso de nanopartículas carregadas positivamente, estas tendem a ligar-se às células (carregadas negativamente) de forma não específica, sendo posteriormente internalizadas. Num estudo referido anteriormente [68], magnetolipossomas catiónicos, demonstraram uma taxa de internalização 10 vezes superior, em relação a magnetolipossomas neutros. Em relação às nanopartículas hidrofóbicas, estas tendem a formar agregados após injeção na corrente sanguínea, sendo rapidamente removidas de circulação pelo sistema reticuloendotelial. Na tentativa de evitar a aglomeração, a superfície das nanopartículas pode ser funcionalizada com moléculas hidrofílicas, lipossomas ou polietilenoglicol (PEG), sendo que este último demonstrou prolongar o tempo de circulação de nanopartículas injetadas [86].

2. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO USADAS

2.1. Fundamentos de espectroscopia de Absorção no UV-Visível [87]

2.1.1. Natureza da radiação eletromagnética

A radiação eletromagnética resulta de uma combinação de um campo elétrico e um campo magnético que se propaga pelo espaço com natureza ondulatória. Como este tipo de radiação se comporta como uma onda, a esta está associado um comprimento de onda (λ) e uma frequência (ν) que se relacionam de acordo com a equação:

$$\nu = c/\lambda \quad (1)$$

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

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

$$E = h\nu \quad (2)$$

Onde E é a energia em Joules, h é a constante de Planck ($6.62 \times 10^{-34} \text{ Js}$) e ν a frequência em segundos. Assim, de acordo com as equações apresentadas, a energia e o comprimento de onda variam de forma inversa, sendo que radiação com maior comprimento de onda é menos energética do que radiação com maior comprimento de onda.

A radiação ultravioleta (UV) e visível constitui apenas uma pequena parte do espectro eletromagnético como está representado na figura 9:

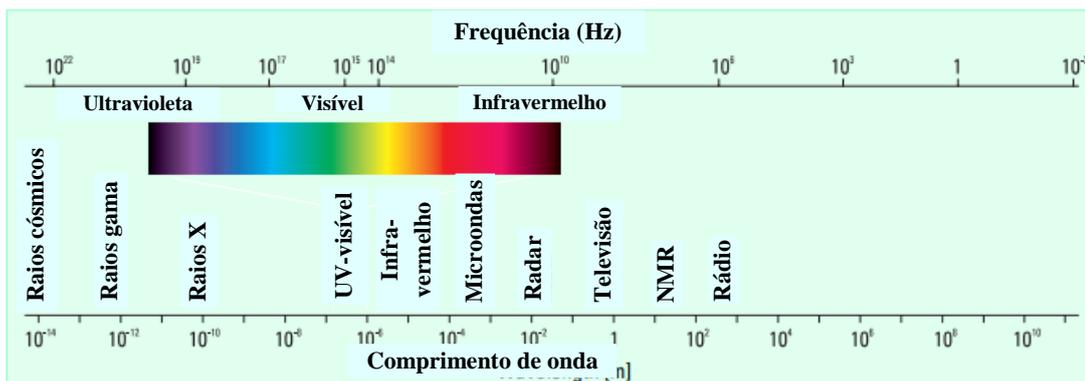


Figura 9 - Representação do espectro eletromagnético. (adaptado de [87])

2.1.2. Interação luz-matéria

Quando a luz interage com a matéria, vários processos podem ocorrer, entre eles reflexão, dispersão, absorção, fluorescência/fosforescência e reações fotoquímicas. Em espectroscopia UV-visível, pretende-se que ocorra apenas absorção que pode ser, ou não, seguida de emissão (fluorescência ou fosforescência).

Como a radiação é uma forma de energia, no processo de absorção de luz, a energia total dos átomos ou moléculas aumenta. Não considerando a contribuição nuclear, a energia potencial de uma molécula é dada pela soma da sua energia eletrônica, vibracional e rotacional, de acordo com a equação:

$$E_{total} = E_{eletronica} + E_{vibracional} + E_{rotacional} \quad (3)$$

sendo que a energia eletrônica é a mais energética e a energia rotacional a menos energética.

A energia total de uma molécula possui uma serie de níveis discretos ou estados, ou seja, a energia de um átomo ou molécula, não é dada por uma função contínua. Os fótons de radiação UV ou visível, absorvidos por um átomo ou molécula possuem por vezes energia suficiente para provocar transições nos seus níveis eletrônicos, fazendo com que um elétron transite do seu nível de energia mais baixo (estado fundamental) para um nível de energia mais alto.

No caso de átomos, estas transições resultam em bandas de absorção estreitas correspondentes aos níveis eletrônicos característicos do elemento químico em questão (figura 10).

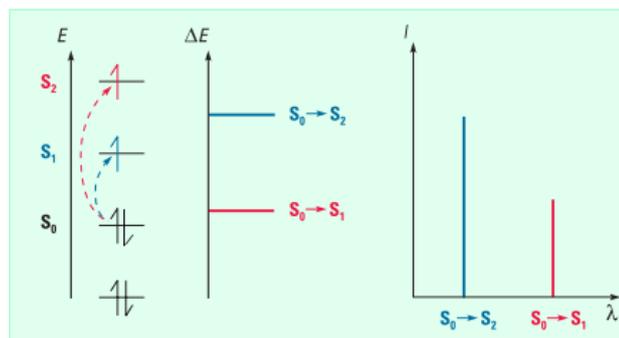


Figura 10 - Transição eletrônica e espectro de absorção UV-visível de átomos. [87]

No entanto, no caso das moléculas, os níveis vibracionais e rotacionais, sobrepõem-se aos níveis eletrônicos. Neste caso, podem ocorrer várias transições com diferentes níveis de energia e assim, as bandas no espectro tornam-se mais largas (figura 11). Essas bandas tornam-se ainda mais largas em soluções em que ocorrem interações soluto-solvente.

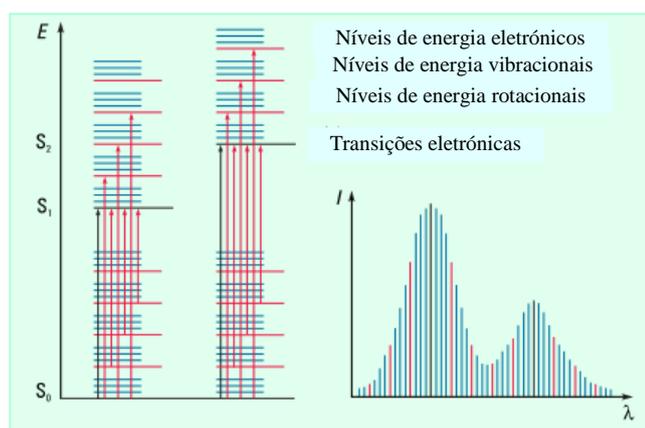


Figura 11 - Transições eletrônicas e espectro de absorção UV-visível em moléculas. (adaptado de [87])

2.1.3. Transmitância e absorvância

Quando um feixe de luz atravessa uma amostra, a quantidade de luz absorvida resulta da diferença entre a radiação incidente (I_0) e a radiação transmitida (I). A luz absorvida pela amostra pode ser expressa como transmitância ou como absorvância. A transmitância é dada como uma fração da radiação transmitida (I) ou como percentagem:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{ou} \quad \%T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (4)$$

A absorvância é dada pela seguinte equação:

$$A = -\log_{10} T \quad (5)$$

Na maioria das aplicações práticas, são usados valores de absorvância, visto que a relação entre a absorvância e a concentração da amostra é linear, de acordo com a lei de Lambert-Beer.

2.1.4. Lei de Lambert-Beer

A lei de Lambert-Beer baseia-se no facto da quantidade de luz absorvida por uma amostra ser proporcional ao número de moléculas capazes de absorver a luz transmitida, presentes nessa amostra.

Na lei de Lambert-Beer, a absorvância é dada pela seguinte expressão linear:

$$A = \epsilon bc \quad (6)$$

onde A é a absorvância, ϵ é o coeficiente de absorção molar (característico da espécie absorvente), b é a distância percorrida pela luz na amostra e c é a concentração. Como ϵ e b são constantes, a absorvância é proporcional à concentração (Figura 12).

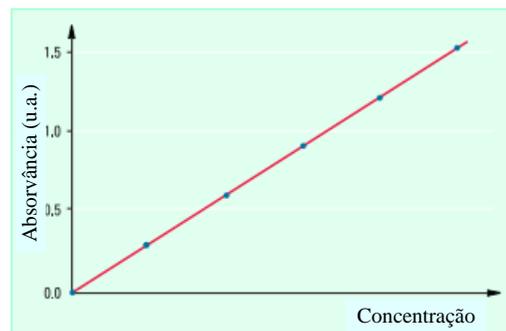


Figura 12 – Relação linear entre a absorvância e a concentração de uma amostra segundo a lei de Lambert-Beer. (adaptado de [87])

Na prática, a Lei de Lambert-Beer é usada para determinar a concentração de uma espécie absorvente em solução. Para isso, é feita uma reta de calibração usando diferentes soluções de concentração conhecida da espécie absorvente. (Figura 12)

2.1.5. Funcionamento de um espectrofotômetro

Um espectrofotômetro é o instrumento usado para medir a absorvância de uma amostra. Em espectroscopia UV-visível, este equipamento é geralmente composto por duas fontes de luz policromática, em que uma delas é usada para a zona UV do espectro e a outra para a zona visível do espectro. A luz proveniente da fonte passa posteriormente por um monocromador que seleciona o comprimento de onda transmitido para a amostra. A luz que sai do monocromador atravessa a amostra e incide nos detetores. A absorvância é determinada medindo a intensidade de luz absorvida após atravessar a amostra, à qual é subtraída a intensidade de luz absorvida pela célula contendo o branco (célula onde a amostra que queremos analisar não está presente). O esquema de um espectrofotômetro simples encontra-se representado na figura 13.

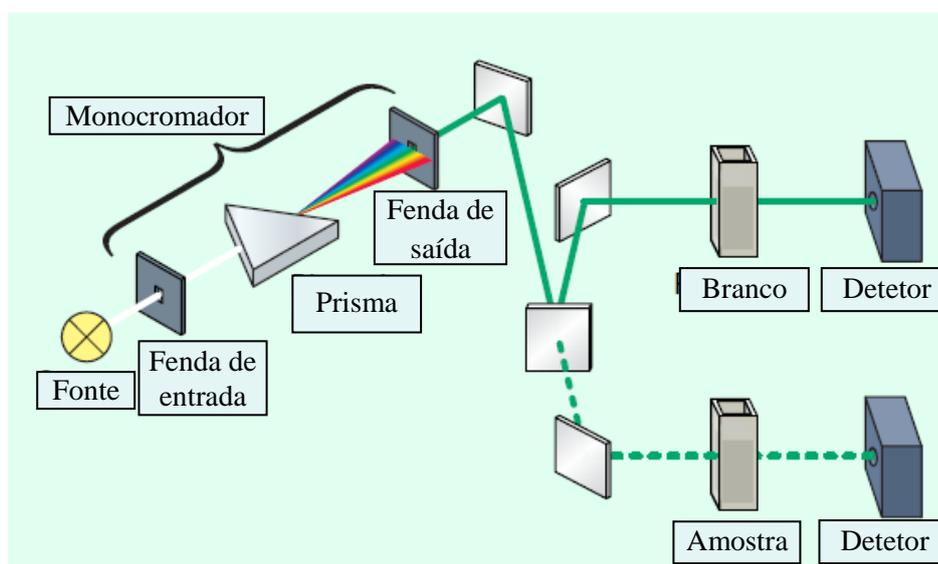


Figura 13 - Esquema de um espectrofotômetro de feixe duplo. (adaptado de [87])

2.2. Fundamentos de espectrofluorimetria

2.2.1. Estados eletrônicos [88]

As moléculas na natureza encontram-se geralmente no seu estado de menor energia, designado estado fundamental (S_0). Quando uma molécula absorve um fóton, esta transita do seu estado fundamental para um estado de energia superior (estado excitado). Os estados excitados de uma molécula dividem-se em estados singleto (S_n) e tripleto (T_n), que dizem respeito aos números quânticos de spin dos elétrons na molécula. De acordo com o princípio de exclusão de Pauli, dois

eletrões numa mesma orbital não podem ter os quatro números quânticos iguais e, por isso, estes diferem no número quântico de spin. Assim, numa mesma orbital, um eletrão possui número quântico de spin $-1/2$ e o outro $+1/2$, ou seja, têm spins opostos. Quando um eletrão passa para uma orbital de maior energia, este pode assumir um número quântico de spin positivo ou negativo.

Para quantificar o spin dos eletrões em cada estado eletrónico é usado um parâmetro designado por multiplicidade (M), definido por $M=|2S+1|$, sendo S a soma dos números quânticos de spin. Quando os eletrões estão emparelhados, o número quântico de spin total é 0, $S=0$, e a multiplicidade é 1, $M=1$. Neste caso, a molécula encontra-se num estado singlete. Quando os eletrões estão desemparelhados, o número quântico de spin total é 1 ou -1 , $S=1$ ou $S=-1$, e a multiplicidade é 3, $M=3$. Neste caso, a molécula encontra-se num estado tripleto.

A figura 14 representa a configuração dos spins dos eletrões nos estados singlete e tripleto.

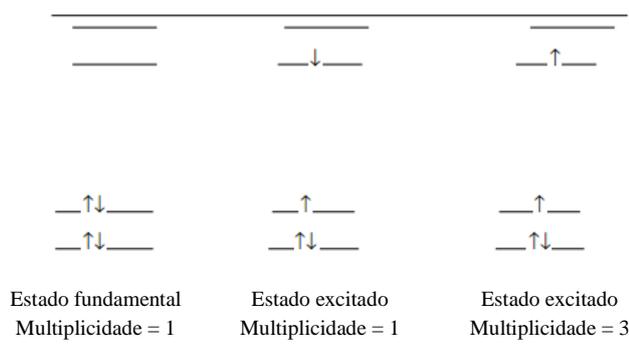


Figura 14 - Configuração dos Spins dos eletrões em estados de singlete ($M=1$) e tripleto ($M=3$). (adaptado de [88])

Quando uma molécula absorve um fóton de luz, os eletrões na molécula passam do seu nível eletrónico de menor energia (S_0) para um nível eletrónico de maior energia (S_n , $n>1$). A partir deste estado excitado de maior energia, a molécula regressa ao seu estado fundamental de menor energia (S_0) por vários processos. Inicialmente a molécula num estado excitado S_n passa ao estado excitado de menor energia S_1 dissipando a energia para o ambiente envolvente, processo geralmente designado por conversão interna. A partir do estado S_1 , a molécula passa para o seu estado fundamental S_0 por um dos seguintes processos:

- Emissão de um fóton (fluorescência).
- Dissipação da energia para o meio em forma de calor.
- Dissipação da energia para moléculas vizinhas, por um processo designado de *quenching*.

Para além destes processos, pode ocorrer uma passagem do estado S_1 para um estado tripleto T_1 , por um processo de cruzamento intersistemas. Para cada estado excitado singleto S_n , existe um sistema tripleto T_n cujo nível vibracional zero tem energia inferior ao do estado singleto correspondente. No entanto, os estados tripleto são estados energeticamente instáveis e, por isso, ocorrem processos de desexcitação para o estado fundamental semelhantes aos que ocorrem na passagem do estado S_1 para o estado S_0 , com a diferença de, neste caso, a emissão de um fóton no processo de desexcitação ocorrer mais lentamente do que na fluorescência. Este processo é designado de fosforescência.

Os processos descritos acima são geralmente esquematizados pelo diagrama de Jablonski (figura 15).

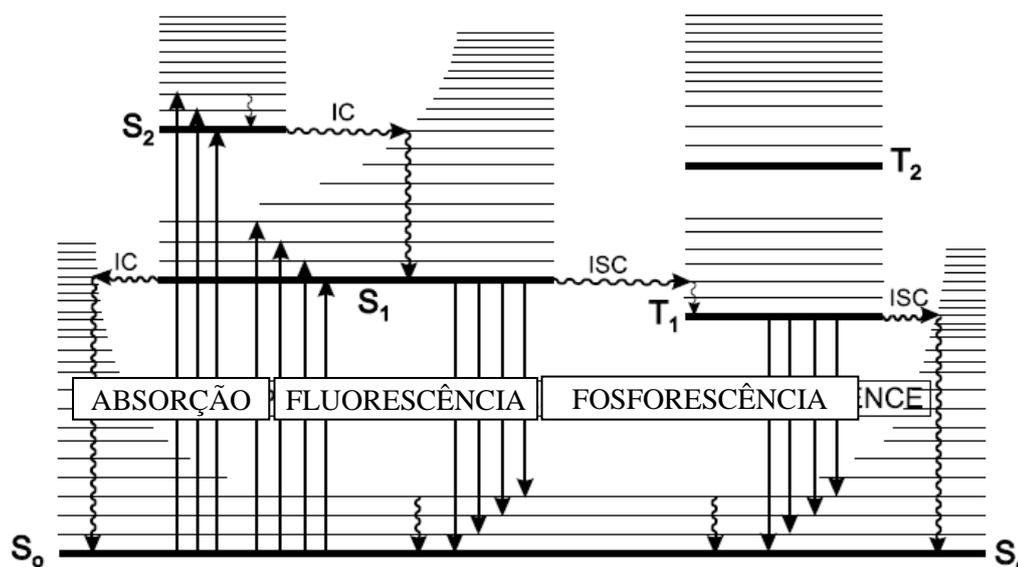


Figura 15 - Diagrama de Jablonski representando as transições de estados eletrônicos. (adaptado de [89]).

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

processos de relaxação vibracional que ocorrem na passagem de um nível vibracional de maior energia (V_n) para o nível vibracional de menor energia (V_0), dentro do mesmo estado eletrônico.

2.2.2. Fluorescência [88]

A fluorescência é um processo de desexcitação radiativa, em que ocorre a emissão de um fóton. Este processo ocorre sempre (salvo raras exceções) a partir do nível eletrônico S_1 , sendo que, após a emissão do fóton, a molécula passa para nível eletrônico de menor energia, S_0 . No entanto essa passagem pode ocorrer para qualquer nível vibracional (V_n) do estado S_0 , ocorrendo posteriormente relaxação vibracional para o nível vibracional de menor energia (V_0). Por essa razão, os fótons emitidos por fluorescência têm sempre menor energia do que os fótons absorvidos. Este fenômeno foi observado pela primeira vez por George Stokes e, por isso, é designado de desvio de Stokes. O desvio de Stokes corresponde à diferença de comprimento de onda onde a absorção é máxima e aquele onde a emissão é máxima.

2.3.3. Tempo de vida de fluorescência [88]

Após excitação, as moléculas permanecem excitadas durante um curto período de tempo antes de regressarem ao seu estado fundamental. O tempo de vida do estado excitado ou tempo de vida de fluorescência é dado pelo tempo médio durante o qual as moléculas permanecem no estado excitado, tempo esse que pode variar entre os nanosegundos (10^{-9} s) e os picosegundos (10^{-12} s).

O tempo de vida de fluorescência é dado por:

$$\tau_F = \frac{1}{k} = \frac{1}{k_r k_{isc} k_{ic}} \quad (7)$$

Onde k_r é a contante de desexcitação radiativa, k_{isc} é a contante de desexcitação por conversão intersistemas e k_{ic} é a constante de desexcitação por conversão interna.

Assim, o tempo de vida de fluorescência é dado, na verdade, pela desexcitação radiativa e não-radiativa do fluoróforo. O tempo de vida de emissão de um fóton, dado pela constante de desexcitação radiativa $1/k_r$, deveria ser medido independentemente dos processos não radiativos de desexcitação da molécula, no entanto, uma vez que esses processos ocorrem paralelamente, não é possível eliminá-los durante a medição do tempo de vida na prática.

2.2.4. Rendimento quântico de fluorescência [88]

As moléculas no estado fundamental absorvem luz com intensidade I , passando para um estado excitado, S_n . A partir do seu estado excitado, as moléculas sofrem vários processos de desexcitação, incluindo fluorescência, que competem entre eles na desexcitação da molécula. O rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) é dado pela razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos e indica a proporção de moléculas que sofre desexcitação por fluorescência:

$$\Phi_F = \frac{\text{número de fótons emitidos}}{\text{número de fótons absorvidos}} = \frac{k_r}{k_r k_{ics} k_{ic}} \quad (8)$$

A determinação do rendimento quântico de fluorescência de uma molécula pode ser feita por comparação entre as áreas dos espectros de fluorescência dessa molécula e de uma molécula de referência com rendimento conhecido, sob determinadas condições experimentais definidas, de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{\Phi_A}{\Phi_R} = \frac{F_A}{F_R} \times \frac{A_R}{A_A} \times \frac{n_A^2}{n_R^2} \quad (9)$$

Onde, Φ_A e Φ_R são os rendimentos quânticos de fluorescência da amostra e da referência, respectivamente; F_A e F_R são as áreas do espectro de fluorescência da amostra e da referência; A_R e A_A são os valores de absorvância no comprimento de excitação; e n_A e n_R são os índices de refração dos solventes das soluções da amostra e da referência.

2.2.5. Anisotropia de Fluorescência [90]

Em termos simples, luz polarizada é luz, cujo campo elétrico se propaga segundo um plano definido. Quando um fluoróforo é excitado por luz polarizada, as moléculas com os momentos dipolares de transição orientados paralelamente ao campo elétrico da radiação incidente são excitadas preferencialmente, ocorrendo assim um efeito de fotoseleção.

Para se entender a forma como os fluoróforos se comportam em processos de absorção e emissão de luz polarizada, é preciso considerar dois conceitos: O tempo de vida do estado excitado, τ_F , que define o tempo que decorre entre a absorção e a emissão de um fóton por um fluoróforo, e o

tempo de correlação rotacional, τ_c , que define o tempo de rotação de uma molécula por difusão. Ao contrário do tempo de vida do estado excitado, que é característico do fluoróforo, o tempo de correlação rotacional, depende da viscosidade do meio onde este se encontra.

Assim, quando o tempo de correlação rotacional é mais lento que o tempo de vida de fluorescência, a luz emitida por um fluoróforo excitado com luz polarizada é também polarizada. Isto acontece quando o fluoróforo se encontra numa matriz rígida, de alta viscosidade, por exemplo, conjugado com biomoléculas grandes, em solventes orgânicos a baixa temperatura, ou em polímeros ou membranas lipídicas à temperatura ambiente. Por outro lado, quando o tempo de correlação rotacional é mais rápido que o tempo de vida de fluorescência, a molécula roda antes de emitir o fóton e, neste caso, a luz emitida é despolarizada. Isto acontece quando o fluoróforo se encontra em solventes com baixa viscosidade, como a água.

Nos ensaios de fluorimetria com luz polarizada, a anisotropia, r , é definida por:

$$r = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2G \cdot I_{VH}} \quad (10)$$

Onde I_{VV} e I_{VH} são as intensidades de fluorescência medidas com excitação com luz polarizada verticalmente (V), com detecção paralela (VV) ou perpendicular (VH). O fator de correção instrumental (G) é dado pelo quociente entre a intensidade de fluorescência medida com excitação com luz polarizada horizontalmente (H), com detecção perpendicular (HV) e paralela (HH), de acordo com a equação:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (11)$$

Para isto, são colocados polarizadores na fonte luminosa e nos detetores, que selecionam o plano de polarização.

Na prática, a determinação da anisotropia usando luz polarizada é uma ferramenta com grande utilidade para estudar o meio onde os fluoróforos se encontram.

2.2.6. Funcionamento de um espectrofluorímetro [91]

Um espectrofluorímetro é um aparelho usado em espectroscopia que permite obter dois tipos de espectros: espectros de fluorescência (ou emissão) e espectros de excitação.

- Espetro de fluorescência: Neste tipo de medição, o comprimento de onda de excitação é mantido contante. Geralmente, é selecionado o comprimento de onda onde a absorção de luz pelo fluoróforo é máxima. O espectro obtido corresponde a uma distribuição espectral da emissão do composto.
- Espetro de excitação: Neste caso, o comprimento de onda da fonte de excitação varia, enquanto a detecção da luz emitida é feita a um comprimento de onda específico. Daí, obtém-se informação acerca da variação da intensidade de fluorescência num determinado comprimento de onda, dependente do comprimento de onda de excitação.

Um espectrofluorímetro convencional é geralmente composto por uma fonte de emissão, dois monocromadores (um a seguir à fonte e outro antes do detetor), usados para selecionar o comprimento de onda, e um detetor (Figura 16.) Para além disso, os espectrofluorímetros possuem, por vezes, dois polarizadores, um a seguir à fonte e outro antes do detetor, usados para selecionar o plano de polarização da luz. A presença de polarizador é essencial para determinação da anisotropia.

Ao contrário do que acontece nos espectrofotómetros, nos espectrofluorímetros, a detecção é feita num ângulo de 90°, de forma a reduzir ao máximo a intensidade de luz transmitida que chega ao detetor.

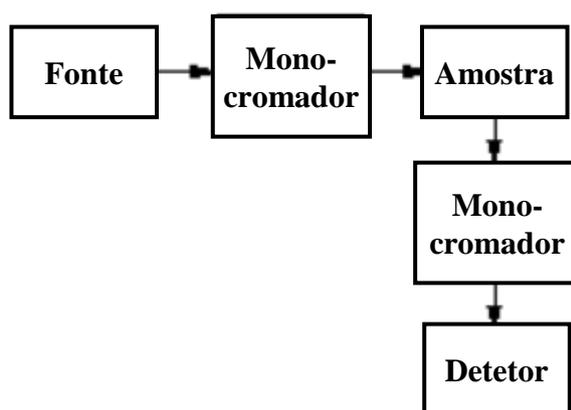


Figura 16 – Simples esquema representativo de um espectrofluorímetro convencional.

2.2.7. Transferência de energia ressonante de Förster (FRET) [88]

A transferência de energia ressonante ocorre entre duas moléculas, um dador (um fluoróforo excitado) e um aceitante (um cromóforo ou fluoróforo). A transferência de energia entre o dador e o aceitante ocorre por ressonância, ou seja, o elétron excitado na molécula dadora, induz uma oscilação do campo elétrico que excita os elétrons na molécula aceitante. No caso da molécula aceitadora ser um fluoróforo, a sua desexcitação para o estado fundamental irá ocorrer principalmente pela emissão de um fóton. No caso de ser um cromóforo, a desexcitação ocorre principalmente por interação com as moléculas do solvente.

A eficiência deste processo depende dos seguintes fatores:

- Distância (R) entre o dador e o aceitante.
- Sobreposição espectral entre o espectro de fluorescência do dador e o espectro de absorção do aceitante.
- Fator de orientação k^2 , o qual indica o alinhamento relativo dos dipolos do aceitante no estado fundamental e do dador no estado excitado.

Para que ocorra FRET, as duas moléculas têm de estar a uma distância entre 10 e 60-100Å. Para distâncias inferiores a 10Å, a transferência de energia entre as moléculas pode ocorrer por transferência de elétron. Os valores do fator de orientação k^2 , variam entre 0 e 4. Para transições entre dipolos alinhados e paralelos, a transferência de energia é máxima, $k^2 = 4$. Para dipolos orientados perpendicularmente a transferência de energia é mínima, $k^2 = 0$.

A figura 17 mostra um espectro que resulta da ocorrência de FRET entre um doador 4,6-diamino-2-fenilindole (DAPI) e de um aceitante, laranja de acridina (AO). No espectro é possível observar uma inibição (*quenching*) de fluorescência do DAPI com o aumento da concentração de AO. Verifica-se que a intensidade de fluorescência do DAPI diminui, enquanto a intensidade de fluorescência do AO aumenta.

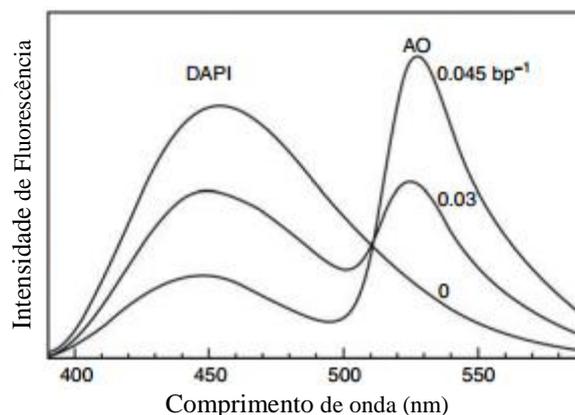


Figura 17 – Espectro de emissão de DAPI, ligado a DNA, na presença de 0.03 e 0.045bp⁻¹ de AO. O comprimento de onda de excitação é 360 nm. (adaptado de [88])

2.3. Difusão dinâmica de luz (DLS)

Quando a luz atravessa uma amostra contendo moléculas, dependendo das propriedades óticas do sistema, parte dessa luz é difundida. A difusão de luz por parte de um sistema pode ser analisada em termos de intensidade ou de flutuações, sendo designados difusão de luz estática e difusão de luz dinâmica (DLS), respetivamente.

Em DLS, são detetadas flutuações de intensidade de luz difundida, devido ao movimento Browniano das moléculas em solução, quando estas são irradiadas por um laser. A luz difundida é detetada e analisada por um correlador. A função de correlação resultante pode, posteriormente, ser invertida, para determinar a distribuição de tamanhos das moléculas em solução. Esta técnica funciona sem um conhecimento exato da concentração da solução. O único requisito é que a intensidade de luz difundida pela amostra deve ser suficiente para que a função de correlação tenha significado estatístico [92].

Para a determinação do tamanho de nanopartículas magnéticas e de lipossomas neste trabalho foi usado o Nano Zetasizer (Malvem), um equipamento que usa como base de funcionamento a difusão de luz dinâmica. Este equipamento permite medir três características de partículas ou moléculas em meio líquido, o tamanho, o potencial zeta e o peso molecular. No entanto, vai ser apenas referido o método de determinação do tamanho, uma vez que as outras modalidades não têm aplicação neste trabalho.

O Nano Zetasizer é capaz de determinar o tamanho das partículas por medição do seu movimento Browniano, sendo posteriormente usada uma função de correlação. Este equipamento tem como base o facto do movimento Browniano das partículas estar altamente relacionado com o seu tamanho. Sabe-se que a taxa de difusão das partículas depende do seu tamanho, sendo que,

partículas mais pequenas movimentam-se mais rápido e partículas maiores mais lentamente. Através do uso de DLS, o Nano Zetasizer determina a posição das partículas ao longo do tempo, obtendo, assim, a sua velocidade de movimentação [93] (Figura 18).

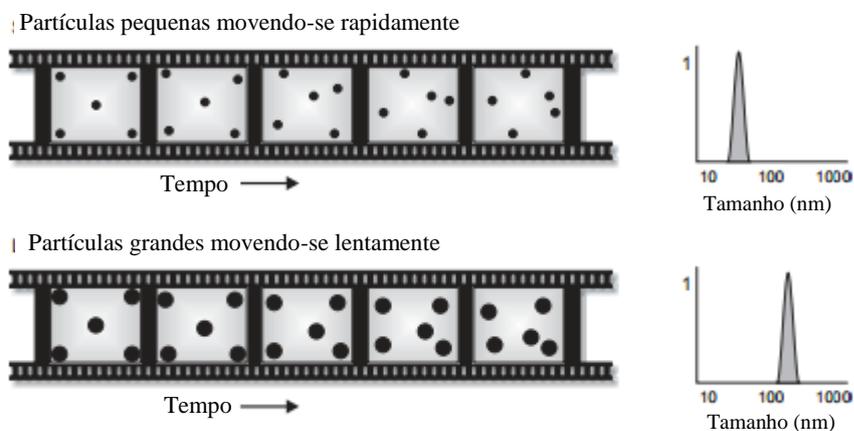


Figura 18 – Representação simples da forma como o Nano Zetasizer determina a distribuição do tamanho de partículas, com base na velocidade a que estas se movem. (adaptado de [89])

2.4. Microscopia eletrónica [94]

Os microscópios eletrónicos são instrumentos que usam feixes de eletrões altamente energéticos para examinar objetos a uma escala muito reduzida, sendo capazes de fornecer informações detalhadas da topografia (características superficiais), morfologia (forma, tamanho), composição (elementos que constituem o material e a sua quantidade relativa) e cristalografia (forma como os átomos se arranjam) da amostra analisada. Os microscópios eletrónicos foram desenvolvidos para ultrapassar as limitações dos microscópios óticos, cuja capacidade de resolução máxima é de 0,2 micrómetros, estando limitados pelas propriedades físicas da luz. Ao contrário dos microscópios óticos que usam a luz para formar uma imagem, os microscópios eletrónicos usam um feixe de eletrões. Esse feixe de eletrões é formado em alto vácuo por um canhão de eletrões, que é acelerado por um potencial elétrico positivo até incidir na amostra, enquanto é confinado por lentes magnéticas que mantêm o feixe estreito, focado e monocromático. Quando o feixe de eletrões incide na amostra, esses eletrões interagem com os átomos da amostra. Essas interações provocam alterações do feixe de eletrões que são detetadas e usadas para formar uma imagem.

2.4.1. Microscópio eletrônico de varrimento (SEM)

Nos microscópios eletrônicos de varrimento, os feixes de elétrons produzidos passam por uma série de bobinas e de lentes objetivas que defletem vertical e horizontalmente de forma a fazer um varrimento da superfície da amostra. Neste tipo de equipamento, os elétrons têm uma baixa capacidade de penetração da amostra, sendo indicado para estudos de superfície. Para além disso, este equipamento permite determinar a composição química da amostra usando raios-X (SEM-EDX). A determinação dos elementos químicos é feita com base no seu número atômico, sendo que, elementos de maior número atômico apresentam maior brilho.

No entanto, os microscópios eletrônicos de varrimento apenas permitem a observação da superfície das amostras, estando a resolução e a informação cristalográfica limitadas.

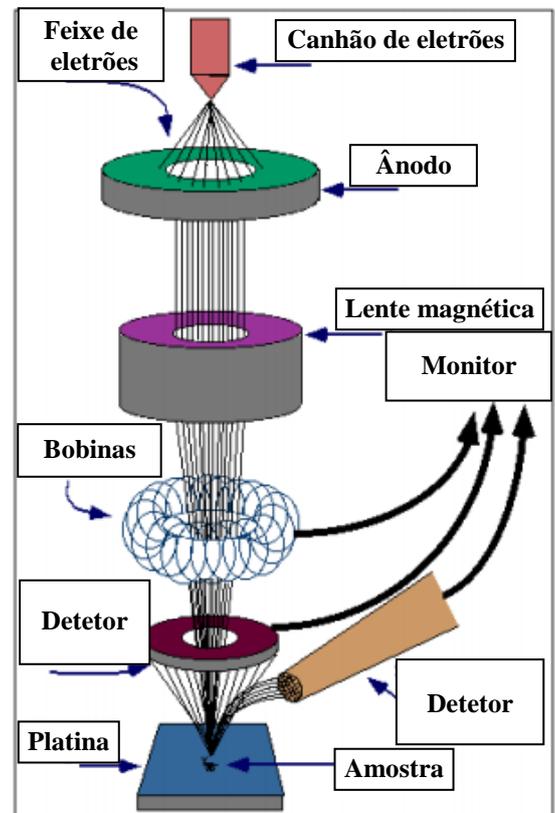


Figura 19 - Esquema representativo de um microscópio eletrônico de varrimento. (adaptado de [94])

2.5. Dispositivo supercondutor de interferência quântica (SQUID) [95]

Um dispositivo supercondutor de interferência quântica (SQUID) é um equipamento capaz de medir campos magnéticos, ou seja, um magnetómetro. De todos os magnetómetros existentes, o SQUID é o mais sensível, tendo uma capacidade de resolução de 10^{-4} nT (nanoTesla). O que diferencia um SQUID dos outros magnetómetros é o que lhe permite ter uma tão boa capacidade de resolução é o seu sensor.

Em 1962, Brian D. Josephson previu que corrente supercondutora podia fluir entre dois supercondutores separados por uma fina camada de isolador (junção de Josephson) (figura 20). A magnitude da corrente entre os supercondutores separados por uma junção de Josephson é afetada pela presença de um campo magnético, sendo estas as bases de funcionamento de um magnetómetro SQUID. Desta forma, estes equipamentos conseguem medir variações ínfimas de campo magnético.

O campo de aplicação principal dos SQUID é em investigação biomédica, uma vez que este equipamento tem uma sensibilidade suficientemente alta para medir campos magnéticos fracos gerados pelo corpo.

Os SQUID são, assim, equipamentos potentes, com enorme sensibilidade na medição de campos magnéticos extremamente fracos. No entanto, os seus sensores (junções de Josephson) operam a temperaturas extremamente baixas (abaixo dos 4,2K), necessitando de sistemas especiais de controlo de temperatura. Isto faz com que os SQUIDs sejam mais caros, menos robustos e menos confiáveis, em comparação com outros magnetómetros.

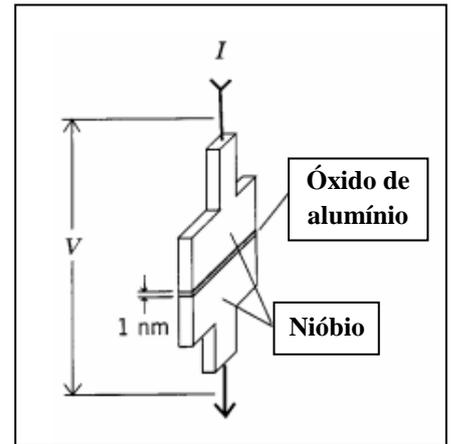


Figura 20 – Esquema representativo de uma junção de Josephson que consiste em dois supercondutores de nióbio separados por uma fina camada de isolador de óxido de alumínio. (adaptado de [95])

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização fotofísica dos compostos estudados

A caracterização fotofísica dos novos compostos potencialmente antitumorais foi realizada no Laboratório de Fotofísica do Centro de Física da Universidade do Minho. As medidas de absorção foram realizadas num espectrofotómetro Shimadzu UV-Vis-NIR, modelo UV-3101PC, e as medidas de fluorescência num espectrofluorímetro Fluorolog 3 (Horiba/Jobin-Yvon), equipado com um sistema de controlo de temperatura da amostra usando circulação de água, com possibilidade de acoplar polarizadores para ensaios de fluorescência com luz polarizada. Em ambos os casos foram usadas células de quartzo com percurso ótico de 1,0cm.

3.1.1. Compostos derivados de tienopiridinas

Os compostos estudados são ureias derivadas de tienopiridinas com potencial antitumoral, sintetizados e estruturalmente caracterizados pelo Centro de Química da Universidade do Minho (grupo da Prof. Maria-João R. P. Queiroz).

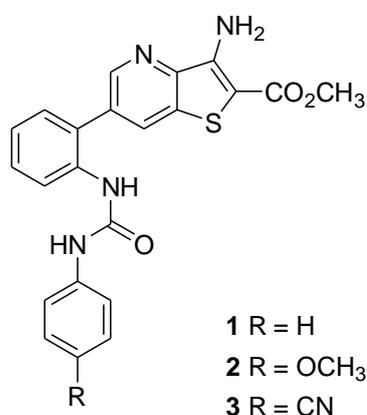


Figura 20 – Estrutura química dos compostos estudados e composição química dos grupos terminais, R, nos compostos 1, 2 e 3.

Os três compostos são idênticos, variando apenas no seu grupo terminal, R.

- Composto 1: R = H de massa molecular, M = 418,12g/mol.
- Composto 2: R = OCH₃ de massa molecular, M = 448,2g/mol.
- Composto 3: R = CN de massa molecular, M = 443,13g/mol.

Foram feitas soluções *stock* dos compostos em etanol, com uma concentração final de 2×10^{-4} M, usadas a partir daí como base de preparação para as restantes soluções.

3.1.2. Estudo fotofísico dos compostos em diferentes solventes

O comportamento fotofísico dos compostos foi estudado em vários solventes de grau espectroscópico (ultrapuros), fornecidos pela Sigma-Aldrich. (tabela 1)

Tabela 1 – Solventes usados e suas características.

Solvente	Massa Molecular (g/mol)	Densidade (Kg/L) (20°C)	Índice de refração (n_D^{20})	Polaridade ϵ^0 (Al ₂ O ₃)	Cut off (nm)
Etanol	46,07	0,79	1,3611	0,88	207
Metanol	32,04	0,79	1,3288	0,95	205
Ciclohexano	84,16	0,78	1,4266	0,04	200
Acetonitrilo	41,05	0,79	1,3442	0,65	190
Acetato de Etilo	88,12	0,90	1,3723	0,58	255
Clorofórmio	119,38	1,49	1,4459	0,4	245
Dioxano	88,12	1,03	1,4224	0,56	215
Diclorometano	84,93	1,32	1,4242	0,42	235
Dimetilsulfóxido	78,13	1,10	1,477	0,75	265
Demetilformamida	73,09	0,95	1,4305	-	268

Para a determinação dos espectros de absorção e fluorescência, foram preparadas amostras de concentração final 3×10^{-6} M. As soluções foram preparadas a partir das soluções *stock* por substituição do solvente, tendo o etanol sido evaporado por uma corrente de azoto ultrapuro comprimido, seguindo-se a adição do solvente em causa. As soluções foram depois colocadas num banho de ultrassons durante meia-hora para facilitar a dissolução. Para as medições de fluorescência, as soluções foram desarejadas durante 20 minutos, também usando corrente de azoto ultrapuro, de forma a evitar a inibição de fluorescência pelo O₂ atmosférico.

Os espectros de absorção foram medidos numa gama espectral entre os 220nm e os 500nm. No entanto, nos solventes que possuem um *cut off* acima dos 220nm (tabela 1), os espectros de absorção foram medidos entre o *cut off* e os 500 nm.

Em relação aos espectros de fluorescência, estes foram registados numa gama espectral entre os 380 e os 600nm com excitação no comprimento de onda 370nm. As fendas do espectrofluorímetro foram ajustadas para 1,5nm, para não saturar o sinal do aparelho.

3.1.3. Determinação do rendimento quântico de fluorescência

A determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência dos compostos nos vários solventes foi feita pelo método do padrão, por comparação entre o espectro de fluorescência integrado da amostra e o espectro de fluorescência de uma molécula de referência com rendimento quântico conhecido, conforme referido no capítulo 2. (equação 9)

Como referência, foi usada uma solução de sulfato de quinino em ácido sulfúrico 0,05M, com uma concentração de 1ppm (partes por milhão). O rendimento quântico de fluorescência do sulfato de quinino nessas condições é $\Phi_R = 0,546$ a 25 °C [96].

3.2. Caracterização fotofísica dos compostos em membranas lipídicas

Para o estudo fotofísico dos compostos em membranas lipídicas, foram preparados vesículos lipídicos de várias composições:

- Egg-PC (Fosfatidilcolina do ovo ou lecitina do ovo)
- Egg-PC/Colesterol (70% Egg-PC/30% Colesterol)
- DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina)
- DPPC/Colesterol (70% DPPC/30% Colesterol)
- DPPG (dipalmitoilfosfatidilglicerol)
- DODAB (brometo de doctadecildimetilamónio)

Os lípidos e os compostos em etanol foram injetados em conjunto numa solução tampão de Tris-HCl (Tris(hidroximetil)aminometano, pH = 7,4 ajustado com HCl) de concentração 10mM. O volume injetado foi calculado para que a concentração final de lípido na solução fosse de 10^{-3} M e de composto 3×10^{-6} M. A injeção foi realizada sob agitação em vortex a aproximadamente 55 °C, ou seja, a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase dos lípidos usados ($T_m(\text{DPPC})=41$ °C [97], $T_m(\text{DPPG})=39,6$ °C [98] e $T_m(\text{DODAB})=45$ °C [99]). Como a temperatura de transição do Egg-PC é -20°C [100], a sua injeção foi realizada à temperatura ambiente.

O DODAB foi fornecido pela Tokyo Kasei e os restantes lípidos pela Sigma-Aldrich. A seguir, apresentam-se as estruturas dos lípidos usados.

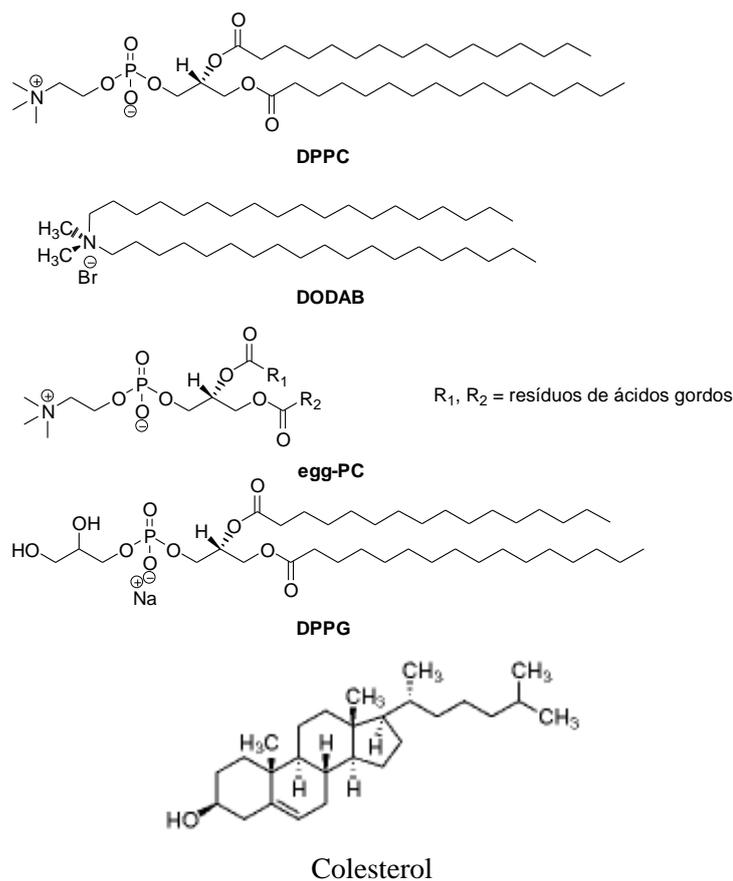


Figura 21 – Estrutura química dos lípidos usados. R₁ e R₂ no Egg-PC correspondem a resíduos de ácidos gordos.

3.2.1. Determinação da anisotropia de fluorescência dos compostos em lipossomas

Para avaliar a fluorescência dos compostos em lipossomas, foram obtidos espectros de emissão para as várias formulações lipídicas, à temperatura ambiente (abaixo da temperatura de transição dos lípidos) e a 55 °C (acima da temperatura de transição dos lípidos). Nas formulações de Egg-PC foram apenas obtidos os espectros à temperatura ambiente (acima da T_m), uma vez que a sua T_m é muito baixa.

A anisotropia de fluorescência dos compostos foi determinada, usando luz polarizada para a excitação, de acordo com a equação (10), conforme referido no capítulo 2.

3.3. Preparação das nanopartículas de magnetite

As nanopartículas de magnetite foram preparadas por diferentes métodos, usando Sulfato de ferro (II) heptahidratado (FeSO₄·7H₂O) de massa molecular M=278g/mol e sulfato de ferro (III)

nonahidratado ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) de massa molecular $M=562\text{g/mol}$. Como base foi usado hidróxido de sódio (NaOH) de concentração $8,25\text{M}$. Na preparação das soluções usou-se água desionizada e desarejada por uma corrente de azoto comprimido, uma vez que o ião Fe^{2+} é rapidamente oxidado na presença de O_2 . Por essa mesma razão, não foram preparadas soluções *stock*. Todas as soluções usadas foram preparadas imediatamente antes da síntese das partículas.

A formação da magnetite ocorre segundo a reação química:



As partículas foram preparadas segundo vários métodos em solução aquosa e em microemulsões (solução de micelas invertidas). Algumas das partículas foram estabilizadas por adição de surfactantes e outras foram cobertas por uma camada de sílica ou de lípidos.

Após a síntese das partículas (formação de um precipitado) estas foram lavadas por substituição do solvente (sobrenadante) após a sua precipitação, por ação de um magneto (decantação magnética) ou por centrifugação. O processo foi repetido o número de vezes que se achou necessário, dependendo das condições de preparação das partículas.

Os métodos e as condições de preparação das partículas serão descritos em pormenor à frente.

3.3.1. Síntese de partículas por co-precipitação em solução aquosa

Partículas 1a:

Tabela 2 – Condições de preparação das partículas 1a.

Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Sulfato Ferro (II)	0,0125M	250 μl
Sulfato Ferro (III)	0,0125M	500 μl
NaOH	8,25M	70 μl
Água	-	5ml
Hidrazina	20,188M	18 μl
Ácido cítrico	0,2M	33 μl

As nanopartículas **1a** foram preparadas por um método de co-precipitação em solução aquosa de sulfato de ferro (II) e sulfato de ferro (III), numa razão estequiométrica de 1:2 à temperatura ambiente. (adaptado de [101])

As soluções de sulfato de ferro (II) e (III) foram preparadas com água destilada e pré desarejada durante 30 minutos.

A reação foi realizada num tubo de ensaio contendo 5ml de água destilada e desarejada, à qual foram adicionados 70 μ l de NaOH (8,25M), para uma concentração final de iões OH⁻ em solução de aproximadamente 0,1M (pH=13) e 18 μ l de hidrazina mono-hidratada (N₂H₄·H₂O) de concentração 20,188M, de forma a ter uma concentração de hidrazina em solução aproximadamente 4x superior à concentração de ferro total. Após 5 minutos foram adicionados 500 μ l de solução de sulfato de ferro (III) (0,0125M), seguidos pela adição imediata de 250 μ l de solução de sulfato de ferro (II) (0,0125M).

Todo o processo foi realizado sob agitação magnética vigorosa num tubo de ensaio fechado.

A hidrazina foi usada como agente redutor de forma a evitar a oxidação do ião Fe²⁺ pelo O₂. Pelo mesmo motivo, as soluções de ferro foram adicionadas com o mínimo intervalo de tempo possível para reduzir o tempo de exposição ao ar.

Por fim, as partículas foram dispersas num banho de ultra-sons e foi adicionado o ácido cítrico (para uma concentração final de 70% em relação à concentração de ferro total). O ácido cítrico funciona como surfactante, aumentando a estabilidade das nanopartículas evitando a sua aglomeração [102].

Partículas 1b:

Tabela 3 – Condições de preparação das partículas **1b**.

Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Sulfato Ferro (II)	0,05M	250 μ l
Sulfato Ferro (III)	0,05M	500 μ l
NaOH	8,25M	70 μ l
Água	-	5ml
Hidrazina	20,188M	72 μ l
Ácido cítrico	0,2M	188 μ l

As partículas **1b** foram preparadas da mesma forma que as partículas **1a**. No entanto, neste caso, foram usadas soluções de sulfato de ferro (II) e (III) mais concentradas (0,05M) e o ácido cítrico foi adicionado numa proporção molar de 1:1 em relação ao ferro total.

3.3.2. Síntese de partículas por co-precipitação inversa em solução aquosa

A co-precipitação inversa é um método de preparação de nanopartículas de magnetite (ou magmrite) onde apenas é usado um sal de ferro (II) [103]. Neste método é adicionado um sal de ferro (II) a uma solução aquosa de pH básico (pH elevado), em condições aeróbias. À medida que parte do ião Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} por ação do O_2 atmosférico, a reação de síntese inicia-se.

As partículas **2a** e **2b** foram preparadas num goblé de 50ml, em condições atmosféricas e à temperatura ambiente.

Partículas 2a:

Tabela 4 – Condições de preparação das partículas 2a.

Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Sulfato Ferro (II)	0,2M	5ml
NaOH	8,25M	121 μ l
Água	-	10ml

Foram colocados 10ml de água desionizada num goblé de 50ml e foram adicionados 121 μ l de NaOH (8,25M), para ajustar o pH da solução para aproximadamente 13. Entretanto foi preparada uma solução de sulfato de ferro (II) de concentração 0,2M, usando água desionizada não desarejada. De seguida, 5ml de solução de sulfato de ferro (II) foram adicionados, gota a gota, à solução de NaOH. Deixou-se a reação ocorrer durante 1h. Todo o processo foi realizado sob agitação magnética.

No final, as partículas foram lavadas várias vezes com água desionizada, por decantação magnética.

Partículas 2b:

Tabela 5 – Condições de preparação das partículas 2b.

Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Sulfato Ferro (II)	0,2M	5x1ml
NaOH	8,25M	121 μ l
Água	-	10ml

As partículas **2b** foram preparadas de forma idêntica às partículas **2a**, sendo que a única diferença foi a forma como a solução de sulfato de ferro (II) foi adicionada. Neste caso, foram

adicionados à solução de NaOH, 5ml de solução de sulfato de ferro (II), em parcelas de 1ml, em intervalos de 10 minutos. As adições foram feitas gota a gota e no final da última adição a solução foi deixada a reagir durante 1h.

3.3.3. Síntese de partículas por co-precipitação em microemulsões

Na preparação de nanopartículas em microemulsões, as partículas são sintetizadas no interior das micelas invertidas, por um processo descrito anteriormente (capítulo 1.4.1.2.).

As microemulsões são preparadas usando um surfactante que é diluído num solvente apolar, podendo ser usado, ou não, um co-surfactante. De seguida a essa mistura é adicionado um determinado volume de água (ou solução aquosa) sob agitação em vortex, levando à formação de micelas invertidas.

No caso da síntese de magnetite são geralmente preparadas duas soluções micelares, em que uma delas contém na sua fase aquosa os iões de ferro, Fe^{2+} e Fe^{3+} , e a outra a base (iões OH^-). A reação é posteriormente iniciada por junção das duas soluções.

3.3.3.1. Usando Triton X-100 como surfactante

As partículas **3a** e **3b** foram preparadas em microemulsões num sistema de Triton X-100/Ciclohexano/n-heptanol, onde o ciclohexano é o solvente apolar, o Triton X-100 desempenha um papel de surfactante e o n-heptanol de co-surfactante [104]. O Triton X-100 ($M = 576,6\text{g/mol}$, densidade $1,07\text{g/cm}^3$), o ciclohexano ($M = 84,16\text{g/mol}$, densidade $0,779\text{g/cm}^3$) e o n-heptanol ($M = 116,2\text{g/mol}$, densidade $0,82\text{g/cm}^3$) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich.

As microemulsões **A** e **B** foram preparadas em tubos de ensaio, por injeção das soluções aquosas nas misturas de Triton X-100/Ciclohexano/n-heptanol, sob agitação vigorosa em vortex.

Após a injeção das soluções, as microemulsões foram colocadas num banho de ultrassons para promover a homogeneização.

A reação foi iniciada por adição da microemulsão **B** à microemulsão **A**, gota a gota, e a microemulsão resultante (**A + B**), foi colocada de novo no banho de ultrassons durante 2 horas.

Por fim, as partículas foram lavadas várias vezes com etanol por centrifugação e ressuspensão.

Partículas 3a:

Tabela 6 – Condições de preparação das partículas 3a.

Microemulsão A		
Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Triton-X	-	530µl
Ciclohexano	-	2,25ml
n-heptanol	-	540µl
Sulfato de ferro (II)	0,15M	50µl
Sulfato de ferro (III)	0,3M	50µl
Água	-	62µl
TEOS	-	1µl

Microemulsão B		
Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Triton -X	-	530µl
Ciclohexano	-	2,25ml
n-heptanol	-	540µl
NaOH	2M	81µl
Água	-	81µl
TEOS	-	2µl

Partículas 3b:

Tabela 7 – Condições de preparação das partículas 3b.

Microemulsão A		
Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Triton-X	-	530µl
Ciclohexano	-	2,25ml
n-heptanol	-	540µl
Sulfato de ferro (II)	0,15M	50µl
Sulfato de ferro (III)	0,3M	50µl
Água	-	62µl

Microemulsão B		
Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Triton -X	-	530µl
Ciclohexano	-	2,25ml
n-heptanol	-	540µl
NaOH	2M	81µl
Água	-	81µl

Durante a preparação e mistura das microemulsões, foi usada uma corrente de azoto ultra-puro e as soluções usadas foram previamente desarejadas.

Na preparação das partículas **3a** foi usado TEOS de forma a obter partículas recobertas por uma camada de sílica. O TEOS foi adicionado diretamente nas microemulsões para promover a sua hidrólise e reação de polimerização, visto que a reação de polimerização ocorre muito mais lentamente em microemulsões do que em solução aquosa [104]. Às partículas **3b** não foi adicionado TEOS.

3.3.3.2. Usando CTAB como surfactante

Partículas 3c:

Tabela 8 – Condições de preparação das partículas **3c**.

Microemulsão A		
Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Mistura (CTAB+Pentanol)	-	2,5ml
Sulfato de ferro (II)	0,15M	50µl
Sulfato de ferro (III)	0,3M	50µl
Água	-	100µl

Microemulsão B		
Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Mistura (CTAB+Pentanol)	-	2,5ml
NaOH	1M	80µl
Água	-	120µl

Partículas 3d:

Tabela 9 – Condições de preparação das partículas **3d**.

Microemulsão A		
Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Mistura (CTAB + Pentanol)	-	2,5ml
Sulfato de ferro (II)	0,15M	50µl
Sulfato de ferro (III)	0,3M	50µl
Água	-	900µl

Microemulsão B		
Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Mistura (CTAB + Pentanol)	-	2,5ml
NaOH	1M	80µl
Água	-	920µl

As partículas **3c** e **3d** foram preparadas em microemulsões num sistema de H₂O/CTAB/pentanol, onde o CTAB desempenha o papel de surfactante e o pentanol de solvente apolar. O pentanol (M = 88,15g/mol, densidade 0,81g/cm³) foi fornecido pela Sigma-Aldrich.

O procedimento de síntese foi similar ao procedimento realizado na preparação das nanopartículas **3a** e **3b**, embora, neste caso, não foi usado qualquer co-surfactante. A mistura CTAB + pentanol foi preparada numa razão de 0,733g CTAB / 1g pentanol [105], usando pentanol previamente desarejado. A solução foi aquecida e colocada num banho de ultra-sons até completa homogeneização.

Estas partículas foram preparadas usando-se diferentes quantidades de água (400µl de água total nas partículas **3c** e 2ml nas partículas **3d**). O tamanho das “piscinas” de água em microemulsões de água/CTAB/n-hexanol aumenta com o aumento do teor de água adicionado [105] e, por isso, a quantidade de água adicionada pode influenciar as propriedades das nanopartículas obtidas.

3.3.4. Síntese de partículas cobertas por lípidos e AOT

Para obter partículas recobertas por lípidos (magnetolipossomas), foram adicionadas soluções de lípidos antes e após a síntese das partículas. Para isso, foi usado um procedimento descrito em [106], que descreve uma forma de obter magnetolipossomas de magnetite/DOPG.

Numa fase inicial, foram produzidas nanopartículas de magnetite por co-precipitação em solução aquosa a alta temperatura (80 °C) na presença de moléculas de fosfolípidos. Os íons de ferro (II) e (III) foram dissolvidos em água (a 80 °C) sob agitação magnética. De seguida, 20% da quantidade de fosfolípidos a ser adicionada (1,36mg de DOPG dissolvido em 54µl metanol (25mg/ml)), foi adicionada à solução, imediatamente seguido da adição da base. Posteriormente, os restantes 80% de fosfolípidos (5,44mg de DOPG dissolvido em 218µl de metanol (25mg/ml)) foram adicionados à mistura lentamente, durante um período de 5 minutos e a mistura foi deixada a reagir durante 15 minutos. Deste processo obtém-se nanopartículas de magnetite revestidas por uma camada de DOPG (DOPG-Fe₃O₄) (partículas **4a**). Essas partículas foram posteriormente lavadas com uma mistura de metanol/acetona (50/50 v/v) por vários passos de centrifugação e ressuspensão.

Numa segunda fase, as nanopartículas obtidas são dispersas em água e a mistura é aquecida até 65° C. Após 15 minutos, são adicionados lentamente 6,8mg de DOPG dissolvido 272µl em metanol (25mg/ml). A mistura é deixada a 65 °C sob agitação magnética durante 30 minutos, obtendo-se nanopartículas de magnetite revestidas por uma segunda camada de DOPG (magnetolipossomas DOPG/DOPG-Fe₂O₄). Os magnetolipossomas obtidos por este método são magnetolipossomas sólidos, ou seja, não possuem uma fase interior aquosa.

Para além dos magnetolipossomas de DOPG/DOPG-Fe₃O₄ (magnetolipossomas **4b**), este procedimento foi adaptado, usando o lípido DPPC e o surfactante AOT, de forma a obter lipossomas de DPPC/DPPC-Fe₃O₄ (magnetolipossomas **4c**) e de AOT/AOT-Fe₃O₄ (magnetolipossomas **4d**).

A fase inicial deste procedimento foi também usada para obter partículas de magnetite sem qualquer cobertura de lípido (partículas **4e**), para servirem de comparação entre nanopartículas e magnetolipossomas.

Todos os passos experimentais foram realizados sob agitação magnética e sob uma corrente de azoto ultra-puro.

Partículas 4a:

Tabela 10 – Condições de preparação das partículas **4a**.

Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Sulfato Ferro (II)	0,15M	27µl
Sulfato Ferro (III)	0,3M	27µl
NaOH	1M	200µl
Água	-	2ml
DOPG em metanol	25mg/ml	272µl

Magnetolipossomas 4b:

Tabela 11 - Condições de preparação dos magnetolipossomas **4b**.

Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Sulfato Ferro (II)	0,15M	27µl
Sulfato Ferro (III)	0,3M	27µl
NaOH	1M	200µl
Água	-	2ml
DOPG em metanol (1ª camada)	25mg/ml	272µl
DOPG em metanol (2ª camada)	25mg/ml	272µl

Magnetolipossomas 4c:

Tabela 12 – Condições de preparação dos magnetolipossomas 4c.

Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Sulfato Ferro (II)	0,15M	27µl
Sulfato Ferro (III)	0,3M	27µl
NaOH	1M	200µl
Água	-	2ml
DPPC em metanol (1ª camada)	25mg/ml	272µl
DPPC em metanol (2ª camada)	25mg/ml	272µl

Magnetolipossomas 4d:

Tabela 13 - Condições de preparação dos magnetolipossomas 4d.

Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Sulfato Ferro (II)	0,15M	27µl
Sulfato Ferro (III)	0,3M	27µl
NaOH	1M	200µl
Água	-	2ml
AOT em etanol (1ª camada)	25mg/ml	272µl
AOT em etanol (2ª camada)	25mg/ml	272µl

Partículas 4e:

Tabela 14 - Condições de preparação das partículas 4e.

Reagentes	Concentração	Volume adicionado
Sulfato Ferro (II)	0,15M	27µl
Sulfato Ferro (III)	0,3M	27µl
NaOH	1M	200µl
Água	-	2ml

3.4. Preparação de magnetolipossomas

Para além dos magnetolipossomas sólidos preparados anteriormente (**4b**, **4c** e **4d**), foram preparados magnetolipossomas por um método diferente de forma a obter magnetolipossomas com uma fase interna aquosa. Neste método foi usada uma solução de nanopartículas bem dispersas (submetida a um banho de ultra-sons para garantir uma boa dispersão das nanopartículas) e aquecida (caso necessário), até uma temperatura superior à temperatura de transição dos lípidos. A esta solução foi injetada uma mistura contendo lípido e composto, sob agitação vigorosa em vortex,

para uma concentração final de lípido em solução 10^{-3} M e de composto 3×10^{-6} M (mesmas concentrações usadas no estudo fotofísico dos compostos em membranas lipídicas – capítulo 3.2.). Deste processo, obtém-se uma solução contendo lipossomas (sem nanopartículas magnéticas no seu interior), magnetolipossomas (contendo uma ou várias nanopartículas no seu interior) e nanopartículas em solução (não encapsuladas).

De seguida foi feita uma decantação magnética de forma para retirar as nanopartículas não encapsuladas da solução.

Os magnetolipossomas aquosos são de especial interesse, uma vez que permitem solubilizar, na sua fase aquosa, compostos hidrofílicos.

3.5. Caracterização das nanopartículas e dos magnetolipossomas

As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas usando difusão dinâmica de luz (DLS), microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e dispositivo supercondutor de interferência quântica (SQUID), com o objetivo de avaliar a sua forma, tamanho e propriedades magnéticas.

Os magnetolipossomas foram caracterizados por DLS para determinação do tamanho.

Foram ainda obtidos os espectros de fluorescência dos compostos potencialmente antitumorais englobados em magnetolipossomas.

3.6. Estudos de interação magnetolipossoma-célula

Para o estudo da interação não específica magnetolipossoma-célula, foram realizados ensaios de transferência de energia ressonante de Förster (FRET), usando magnetolipossomas contendo os compostos estudados (que funcionam como doador) e modelos de membranas biológicas contendo sondas fluorescentes (que funcionam como aceitador).

3.6.1. Preparação dos modelos de membrana

Como modelos de membrana foram usados vesículos unilamelares gigantes (GUVs) de lecitina de soja. Na preparação dos GUVs, foram incorporadas sondas fluorescentes:

- NBD-C₆-HPC (marca a parte média da cadeia de hidrocarbonetos)
- NBD-C₁₂-HPC (marca o final da cadeia de hidrocarbonetos)
- NBD-PE (marca a cabeça polar dos fosfolípidos)

Na preparação dos GUVs foi adaptado um protocolo descrito em [107]. A partir de 1ml de solução etanólica de lecitina de soja 10^{-3}M e sonda fluorescente 10^{-5}M foi obtido um filme por evaporação do solvente usando uma corrente de azoto ultra-puro. O filme obtido foi pré-hidratado com $20\mu\text{l}$ de água e foi incubado a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 minutos. De seguida, foram adicionados 3ml de solução de glucose $0,1\text{M}$ e a mistura foi encubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante duas horas. Por fim a mistura foi centrifugada a 14000g durante meia-hora a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para sedimentar agregados moleculares de maiores dimensões.

3.6.2. Ensaios de FRET

Inicialmente foram traçados os espectros de fluorescência dos compostos em magnetolipossomas ($500\mu\text{l}$ de solução de magnetolipossomas + $1500\mu\text{l}$ de água) e das sondas fluorescentes nos GUVs ($1250\mu\text{l}$ de solução de GUVs + $750\mu\text{l}$ H_2O), isoladamente.

De seguida, para avaliar a transferência de energia ressonante de Förster, foram traçados espectros de fluorescência de soluções com:

- $500\mu\text{l}$ de solução contendo os magnetolipossomas e os compostos
- $250\mu\text{l}$ de água desionizada
- $1250\mu\text{l}$ de solução contendo os GUVs e as sondas fluorescentes

No caso de ocorrer interação não específica (fusão) entre os magnetolipossomas e os GUVs, os compostos (doadores) e as sondas fluorescentes (aceitantes) passam a estar a uma distância suficientemente pequena (entre 10 e $60\text{-}100\text{\AA}$) para que ocorra transferência de energia ressonante de Förster, o que é facilmente observado no espectro de fluorescência por uma diminuição da intensidade de fluorescência do doador e um aumento da intensidade de fluorescência do aceitante. De forma a promover esta interação não específica foram adicionados, em alguns ensaios, $5\mu\text{l}$ de solução de cloreto de cálcio 1M .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo fotofísico dos compostos em solução

Visto que, como referido anteriormente, os compostos antitumorais estudados apresentam potencial antitumoral, o seu estudo fotofísico em solução e em vesículas lipídicas é de extrema importância.

No estudo fotofísico dos compostos em solução foram determinados os espectros de absorção e fluorescência em vários solventes (tabela 1, capítulo 3.1.2.). Os solventes estudados não incluem ciclo- e n-alcanos, uma vez que a solubilidade dos compostos nesse tipo de solventes se revelou extremamente baixa.

De seguida apresentam-se os espectros de fluorescência dos compostos nos vários solventes. A título de exemplo estão também representados os espectros de absorção em acetonitrilo e dioxano.

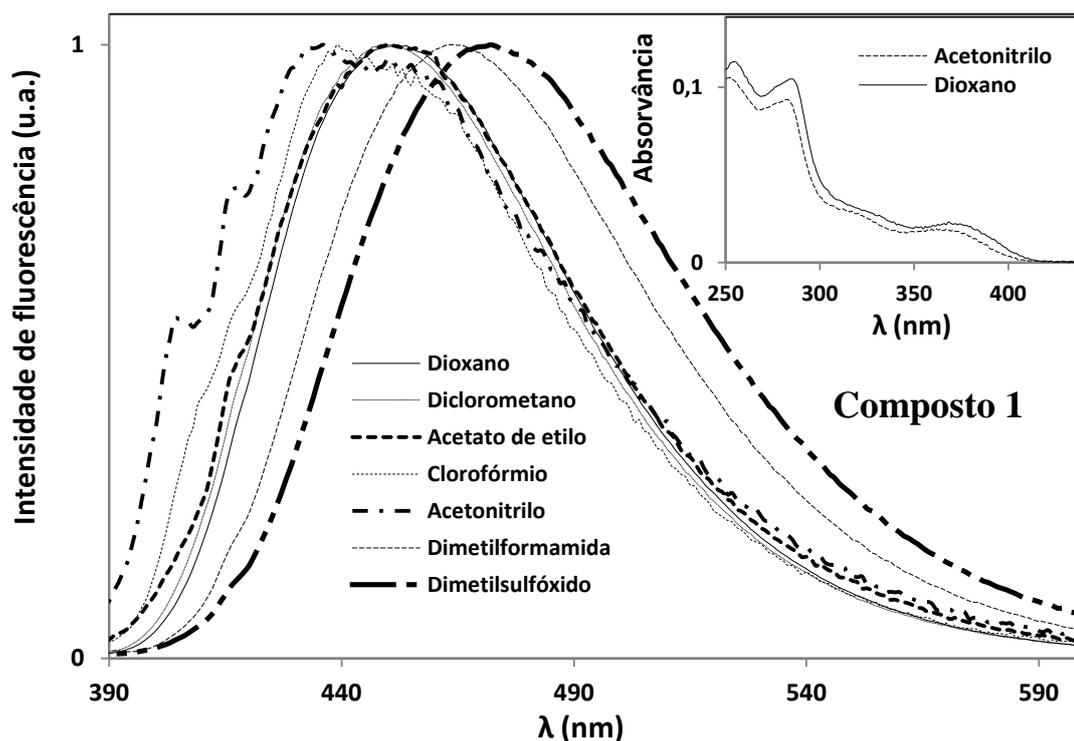


Figura 22 – Espectros de fluorescência normalizados do composto **1** (3×10^{-6}) nos vários solventes ($\lambda_{exc} = 370$ nm). Inserido: Espectros de absorção do composto **1** (10^{-5}) em acetonitrilo e em dioxano, como exemplo.

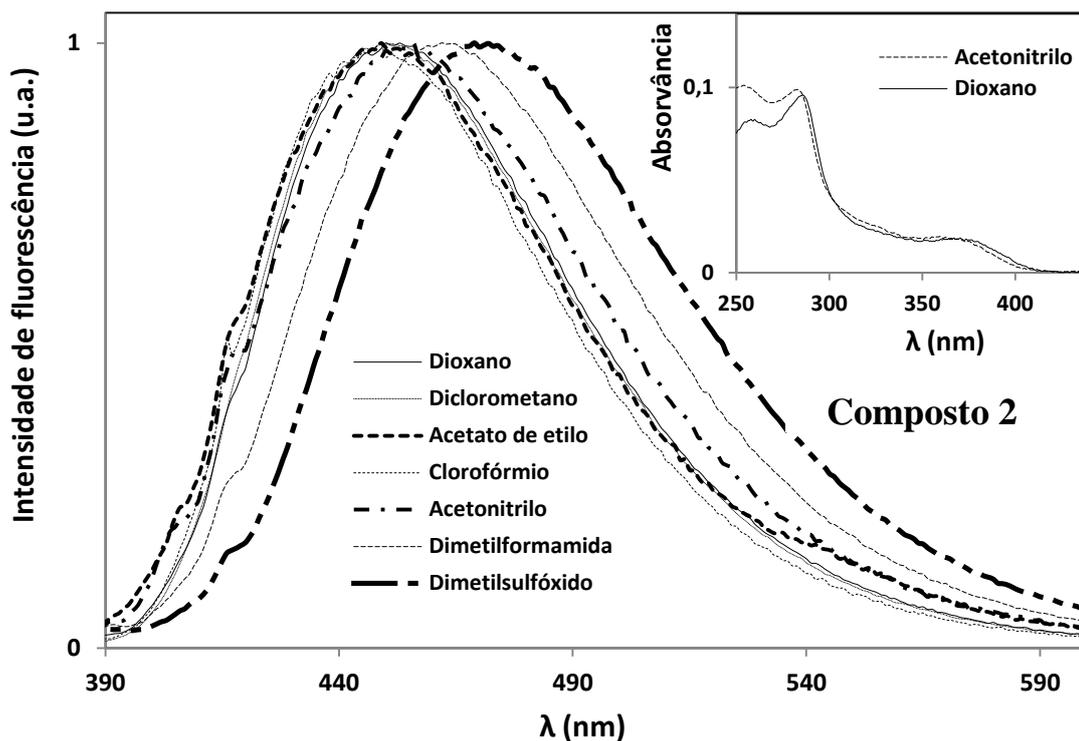


Figura 23 - Espectros de fluorescência normalizados do composto 2 (3×10^{-6}) nos vários solventes ($\lambda_{exc}=370$ nm). Inserido: Espectros de absorção do composto 2 (10^{-5}) em acetonitrilo e em dioxano, como exemplo.

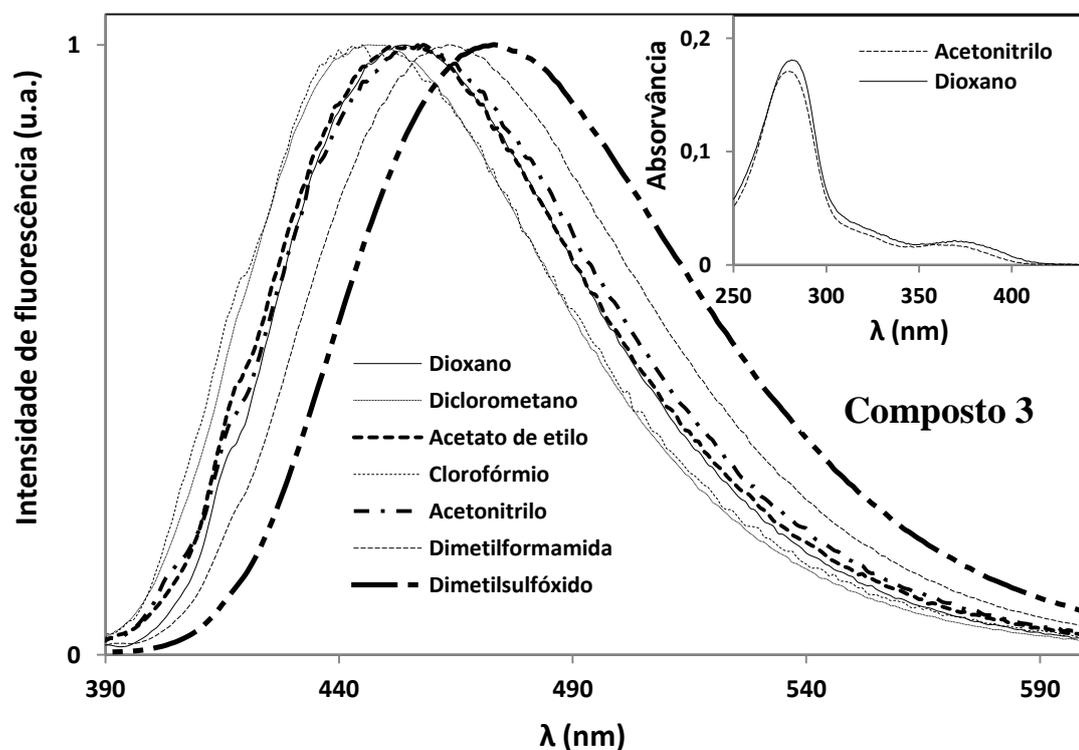


Figura 24 - Espectros de fluorescência normalizados do composto 3 (3×10^{-6}) nos vários solventes ($\lambda_{exc}=370$ nm). Inserido: Espectros de absorção do composto 3 (10^{-5}) em acetonitrilo e em dioxano, como exemplo.

Tabela 15 - Comprimentos de onda máximo de absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{em}), coeficiente de absorção molar (ϵ) e rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) para os compostos 1, 2 e 3 nos vários solventes.

Solvente	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm} (\epsilon/10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$			$\lambda_{\text{em}} (\text{nm})$			Φ_F^a		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Dioxano	369 (0,76); 285 (3,49); 255 (3,81)	370 (0,62); 286 (3,20); 258 (2,76)	369 (0,72); 281 (6,02)	449	450	453	0.22	0.15	0.11
Diclorometano	367 (0,61); 286 (3,16); 248 (2,98)	368 (0,58); 286 (2,95)	367 (0,55); 280 (5,10)	451	452	451	0.41	0.31	0.14
Acetato de Etilo	368 (0,62); 285 (2,56)	369 (0,65); 284 (3,14)	369 (0,61); 282 (5,91)	450	449	457	0.09	0.08	0.05
Clorofórmio	368 (0,59); 287 (4,71)	368 (0,54); 287 (4,52)	367 (0,62); 279 (7,35)	449	449	448	0.06	0.08	0.02
<i>N,N</i> - Dimetilformamida	371 (0,60); 288 (2,57)	371 (0,67); 287 (3,16)	371 (0,64); 286 (5,66)	463	462	464	0.42	0.16	0.21
Dimetilsulfóxido	372 (0,70); 288 (3,06)	372 (0,68); 286 (2,65)	372 (0,61); 287 (4,64)	469	467	470	0.65	0.39	0.69
Acetonitrilo	367 (0,64); 282 (3,10); 253 (3,51)	369 (0,60); 283 (3,29); 254 (3,37)	366 (0,59); 280 (5,69)	456	457	458	0.07	0.09	0.08

^a – Relativamente ao sulfato de quinino em H_2SO_4 0,05M ($\Phi_F = 0.546$). Erro cerca de 10%.

Os três compostos demonstraram uma emissão de fluorescência razoável em todos os solventes estudados, com rendimentos quânticos de fluorescência numa gama entre 2% em clorofórmio e 69% em DMSO (tabela 15). No entanto, não foi observada emissão de fluorescência em solventes próticos como água, etanol e metanol. Este comportamento foi já observado para di(hetero)ariléteres derivados de tieno[3,2-*b*]piridinas [108] e pode dever-se a uma interação soluto-solvente por formação de pontes de hidrogénio com solventes próticos, nomeadamente pela protonação do átomo de azoto no anel de piridina. Pela mesma razão, podem ser justificados os baixos valores de rendimento quântico de fluorescência em clorofórmio, uma vez que a formação de pontes de hidrogénio entre o clorofórmio e moléculas aceitadoras de prótons foi já descrito [109].

Os compostos demonstraram ser mais fluorescentes em solventes polares como dimetilsulfóxido e dimetilformamida, sendo esse um comportamento comum em derivados de di(hetero)ariléteres [108]. No entanto, o grupo substituinte que difere nos três compostos (H

(composto 1), OCH₃ (composto 2) e CN (composto 3)), parece não ter uma influência significativa nos valores de rendimento quântico (tabela 15).

Para além disso, verificaram-se desvios significativos na emissão de fluorescência para a zona do vermelho em solventes polares (20-25 nm entre o clorofórmio e o dimetilsulfóxido). No entanto, nos espetros de absorção esse desvio é negligenciável, indicando que a relaxação do solvente após a fotoexcitação desempenha um papel determinante.

O comportamento fotofísico dos compostos demonstra que estes podem ser considerados sondas solvatocrômicas, sendo que a emissão de fluorescência é sensível ao ambiente onde o fluoróforo se encontra. Esta característica pode ser bastante útil no estudo do comportamento e localização dos compostos em membranas lipídicas.

4.2. Estudo fotofísico dos compostos em vesículas lipídicas

Foram realizados ensaios de espectroscopia de fluorescência dos três compostos incorporados em vesículas lipídicas de várias composições (capítulo 3.2.).

Os compostos foram incorporados em lipossomas de EGG-PC (mistura de lípidos zwitteriônicos), DPPC (zwitteriônico), DODAB (catiônico), DPPG (aniônico) e em misturas de EGG-PC:Ch (7:3) e DPPC:Ch (7:3). O colesterol (Ch) foi incorporado em lipossomas para melhor simular as membranas biológicas, sendo que misturas de EGG-PC:Ch (7:3) são frequentemente usadas para esse fim [110,111].

Os espetros de fluorescência dos compostos incorporados nos lipossomas foram obtidos para temperaturas abaixo (25 °C) e acima (55 °C) da temperatura de transição de fase dos lípidos DPPC, DODAB e DPPG, de forma a monitorizar a fase gel e a fase líquido-cristalina dos lípidos, respetivamente. No caso do EGG-PC foi apenas estudada a sua fase líquido-cristalina, uma vez que este já se encontra nessa fase à temperatura ambiente (T_m muito baixa).

Os espetros de fluorescência dos compostos incorporados em vesículas lipídicas estão apresentados na figura 25. Todos os compostos exibem emissão de fluorescência razoável quando incorporados em membranas lipídicas, indicando que estes estão localizados preferencialmente na região da bicamada lipídica, uma vez que estes não apresentam emissão de fluorescência em água e álcoois. Tendo em conta os comprimentos de onda de emissão máxima dos compostos nos agregados lipídicos, conclui-se que estes se encontram num ambiente hidrofóbico de polaridade semelhante ou mesmo inferior ao dioxano, no entanto, um ambiente ligeiramente mais hidratado (de polaridade superior) é antecipado para os vesículos de DPPC a 25 °C (tabela 16).

Neste estudo foi determinada a anisotropia de fluorescência dos compostos incorporados em lipossomas por espectroscopia de fluorescência usando luz polarizada. A análise da anisotropia de fluorescência (r) pode fornecer informação importante acerca da localização dos compostos nos lipossomas, uma vez que r aumenta com o tempo de correlação rotacional do fluoróforo e, portanto, com a viscosidade do meio onde este se encontra [89]. A anisotropia em estado estacionário está relacionada com o tempo de vida do estado excitado e com o tempo de correlação rotacional do fluoróforo [89]:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c} \right) \quad (12)$$

onde, r_0 é a anisotropia fundamental (ou intrínseca), τ é o tempo de vida do estado excitado e τ_c é o tempo de correlação rotacional.

Os valores de anisotropia dos compostos 1, 2 e 3 em membranas lipídicas estão indicados na tabela 16. Foi também determinada a anisotropia dos compostos em glicerol, à temperatura ambiente, como termo de comparação.

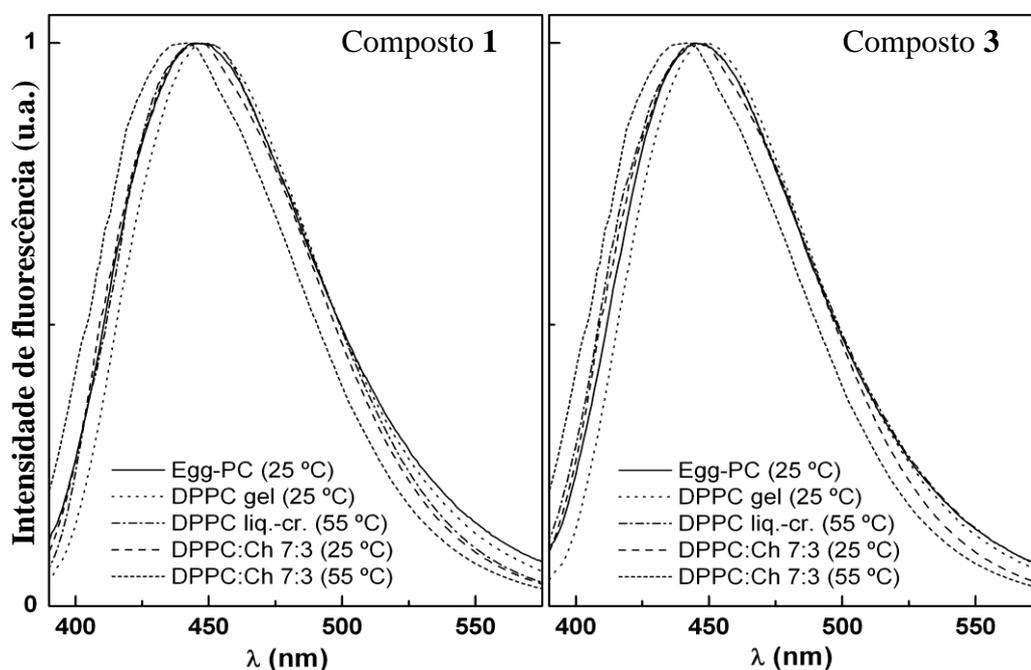


Figura 25 – Espectro de fluorescência normalizado dos compostos 1 e 3 (3×10^{-6} M) em lipossomas de EGG-PC, EGG-PC:Ch, DPPC e DPPC:Ch, a 25 °C e a 55 °C.

Tabela 16 – Valores da anisotropia de fluorescência de estado estacionário (r) e comprimentos de onda de emissão máxima (λ_{em}) para os compostos 1, 2 e 3 em lipossomas, abaixo (25 °C) e acima (55°C) da temperatura de transição dos lípidos. Valores de anisotropia dos compostos em glicerol à temperatura ambiente, como termo de comparação.

Lípido	T (°C)	1		2		3	
		λ_{em} (nm)	r	λ_{em} (nm)	r	λ_{em} (nm)	r
Egg-PC	25	449	0.248	451	0.249	449	0.240
Egg-PC:Ch (7:3)	25	446	0.228	446	0.221	445	0.231
DPPC	25	452	0.256	451	0.259	452	0.251
	55	449	0.163	448	0.122	449	0.180
DPPC:Ch (7:3)	25	450	0.199	449	0.171	450	0.194
	55	446	0.104	445	0.118	446	0.127
DODAB	25	448	0.230	456	0.251	451	0.247
	55	445	0.172	444	0.180	444	0.183
DPPG	25	461	0.233	464	0.226	457	0.209
	55	457	0.149	460	0.138	454	0.102
Glicerol	25	464	0.330	462	0.327	459	0.324

Os resultados referentes à anisotropia de fluorescência permitem concluir que todos os compostos estão localizados na região interna da bicamada lipídica. A transição da fase gel para a fase líquido-cristalina é claramente detetada por uma descida significativa dos valores de anisotropia a 55 °C. Um aumento da anisotropia é previsto por uma diminuição do tempo de vida do estado excitado (equação 12), que é espectável por aumento da temperatura. Desta forma, uma diminuição da anisotropia a 55 °C pode ser atribuída à diminuição do tempo de vida correlacional do fluoróforo, ou seja, a uma diminuição da microviscosidade do meio onde este se localiza.

Os valores de anisotropia sofrem também um decréscimo significativo quando a fluidez das membranas lipídicas é aumentada por adição de colesterol. Estas variações são acompanhadas de um desvio da emissão de fluorescência para a zona azul do espectro (figura 25, tabela 16), tanto na fase gel como na fase líquido-cristalina. Este desvio pode indicar um reposicionamento dos fluoróforos num ambiente menos hidratado. Assim, uma diminuição da microviscosidade do meio (por aquecimento ou adição de colesterol) parece permitir uma maior penetração dos fluoróforos no interior da bicamada lipídica. A influência do colesterol na fluidez das membranas deverá ser investigada em maior detalhe em trabalhos futuros.

Os resultados obtidos permitem afirmar que todos os três compostos possuem elevado potencial de aplicação no estudo da fluidez de membranas lipídicas. Para além disso estes compostos podem ser solubilizados na fase hidrofóbica de lipossomas ou magnetolipossomas, com especial potencial de aplicação em tratamentos por entrega controlada de fármacos.

4.3. Caracterização das nanopartículas

Neste trabalho foram preparadas, com sucesso, nanopartículas magnéticas por vários métodos (capítulo 3.3.):

- Co-precipitação em solução aquosa à temperatura ambiente (**1a** e **1b**) e a 80 °C (**4e**).
- Co-precipitação inversa em solução aquosa (**2a** e **2b**).
- Co-precipitação em micelas invertidas (microemulsões), usando como surfactante o Triton X-100 (**3a** e **3b**) e o CTAB (**3c** e **3d**).
- Foram ainda preparados magnetolipossomas secos (**4a**, **4b**, **4c** e **4e**), por adição de lípidos ou AOT, no processo de síntese das partículas.

A formação das partículas foi confirmada durante a reação de síntese por formação de um precipitado de cor variando entre o negro e o castanho. A cor das nanopartículas de óxido de ferro está dependente do seu grau de oxidação, sendo que a magnetite (Fe_3O_4) apresenta uma cor negra característica, enquanto formas oxidadas como a magmite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) apresentam cor acastanhada [112]. Tendo em conta este facto, algumas nanopartículas obtidas (**2b**, **3a**, **3b**, **3c** e **3d**) poderão ser na verdade nanopartículas de magmite ou de magnetite parcialmente oxidada ($\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$). Nos restantes ensaios, as nanopartículas obtidas apresentam a cor negra característica da magnetite (Fe_3O_4).

Em relação às nanopartículas **2b**, os resultados estão de acordo com os resultados publicados no artigo no qual o método foi baseado [103]. Neste método, 5 ml de solução de sulfato de ferro (II) 0,2 M foi adicionada progressivamente em parcelas de 1 ml em intervalos de 10 minutos. A adição faseada parece promover um maior grau de oxidação das partículas obtidas.

Quanto às nanopartículas produzidas em microemulsões (**3a**, **3b**, **3c** e **3d**), um elevado grau de oxidação pode dever-se ao tamanho das partículas. Nanopartículas mais pequenas têm uma elevada razão superfície/volume, estando, portanto, mais suscetíveis à oxidação. Para além disso, este método é mais complicado, pois manter um ambiente livre de O_2 durante todo o processo é relativamente mais difícil.

Para a determinação da estrutura cristalina das partículas seria necessário, no entanto, uma análise mais extensiva, por exemplo, por difração de raios X (XRD), técnica geralmente usada para esse fim.

Apesar de tudo, nanopartículas magnéticas, quer de magnetite quer de magmite, têm igual potencial de aplicação em diagnóstico médico (MRI), tratamentos por hipertermia e entrega

controlada de fármacos [113], pelo que a determinação da estrutura cristalina das nanopartículas aqui sintetizadas não é de extrema importância para o objetivo deste trabalho.

4.3.1. Caracterização morfológica

As nanopartículas sintetizadas foram analisadas por dispersão dinâmica de luz (DLS) para se obter informação acerca do seu tamanho e índice de polidispersividade.

Tabela 17 – Valores de DLS do tamanho médio (raio (nm)), polidispersividade (PdI), e intensidade média dos picos (raio(nm) e %) das nanopartículas analisadas.

Amostra	Tamanho médio	PdI	Pico 1	Pico 2	Pico 1 (int. média)	Pico 2 (int. média)
	r (nm)		r (nm)	r (nm)	%	%
1a	125,9	0,334	123,9	12,70	88,3	11,7
2a	1152	0,787	417,7	0,0	100	0,0
2a^a	78,03	0,026	81,63	0,0	100	0,0
2b	959,0	0,597	395,9	0,0	100	0,0
3a	153,4	0,354	47,52	2613	94,7	5,3
3c	89,29	0,127	96,02	0,0	100	0,0
3d	81,46	0,293	68,80	0,0	100	0,0
4a	104,1	0,274	80,63	0,0	100	0,0
4b	59,98	0,411	72,47	20,72	84,8	15,2
4c	91,28	0,225	112,4	0,0	100	0,0
4d	329,5	0,769	100,1	16,41	89,9	10,1
4e	67,20	0,209	58,37	20,52	66,6	33,4

^a- Solução de nanopartículas 2a diluídas 50×, com ácido cítrico (100µl de solução de nanopartículas e 100µl de solução de ácido cítrico 0,2 M para um volume final de 5 ml).

Pela análise dos resultados de DLS (tabela 17), o método de preparação das partículas parece ter alguma influência no seu tamanho. No entanto, excluindo os resultados das partículas sintetizadas por co-precipitação inversa (**2a** e **2b**), os tamanhos não variam significativamente.

A técnica de DLS permite determinar o tamanho de partículas em solução aquosa através da determinação da velocidade a que estas se movem, mas não faz a distinção entre partículas isoladas e agregados de partículas.

Na verdade, os resultados parecem indicar uma elevada taxa de agregação das partículas, sendo os valores obtidos para as partículas **2a** e **2b** o caso mais evidente. Essa elevada taxa de aglomeração nas partículas **2a** e **2b** pode dever-se às elevadas concentrações usadas no método de síntese, e por isso, a quantidade de partículas obtidas é consideravelmente maior, o que pode

promover a sua agregação. Para verificar esta hipótese, foi realizada uma análise das partículas **2a** numa diluição de 50× (**2a^a**), contendo ácido cítrico (100µl de ácido cítrico 0,2M para 5ml de solução). Os resultados dessa análise revelam uma descida acentuada do tamanho e do índice de polidispersividade, concluindo-se que a diluição das partículas e a presença do ácido cítrico as torna mais estáveis em solução, evitando ou limitando a sua agregação.

Os elevados valores de polidispersividade observados na maioria das amostras são outro indicador da ocorrência de aglomeração. Para além disso, em algumas amostras (**1a**, **4b**, **4c** e **4e**), são observadas duas populações distintas com tamanho diferente, sendo que as populações com tamanho menor poderão corresponder a nanopartículas isoladas e as populações com tamanho maior poderão corresponder a agregados de partículas. Assim, terão sido produzidas nanopartículas bastante pequenas com raio a variar entre os 12,70 (**1a**) e os 20,72nm (**4b**).

Em relação às nanopartículas preparadas em micelas invertidas, as partículas onde foi usado o Triton X-100 (**3a**) como surfactante parecem ser ligeiramente mais pequenas que as partículas preparadas com CTAB (**3c** e **3d**). Nos resultados das partículas **3a**, observam-se duas populações, no entanto, tendo em conta o tamanho (2613nm) e a percentagem de intensidade média (5,3%) da população referente ao pico 2, esses valores deverão ser resultado da presença de impurezas como partículas de sujidade ou poeira. O menor tamanho das partículas **3a** pode dever-se à diferença dos surfactantes usados, mas pode ser também explicado pelo revestimento das partículas **3a** com uma camada de sílica, que pode estar a limitar a agregação das partículas.

Devido aos fenómenos de agregação já referenciados, os resultados obtidos por DLS constituem uma sobrestimação do verdadeiro tamanho das nanopartículas, sendo que o tamanho real deverá ser menor.

Uma caracterização mais pormenorizada das partículas foi realizada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

As imagens obtidas por SEM (figuras 26, 27, 28 e 29) comprovam definitivamente a síntese de nanopartículas por todos os métodos. A grande maioria das nanopartículas parece ter uma pequena distribuição de tamanhos, contrariando os valores de polidispersividade obtidos por DLS. Na verdade, as imagens de SEM permitem comprovar a aglomeração das nanopartículas e a formação de agregados numa grande parte das amostras, comprovando a análise feita por DLS. No entanto, por SEM conseguem-se distinguir os aglomerados das nanopartículas isoladas, uma vez que os agregados apresentam geralmente tamanhos maiores, formas irregulares e diferenças na sua tonalidade, o que é evidente principalmente na amostra **3b**.

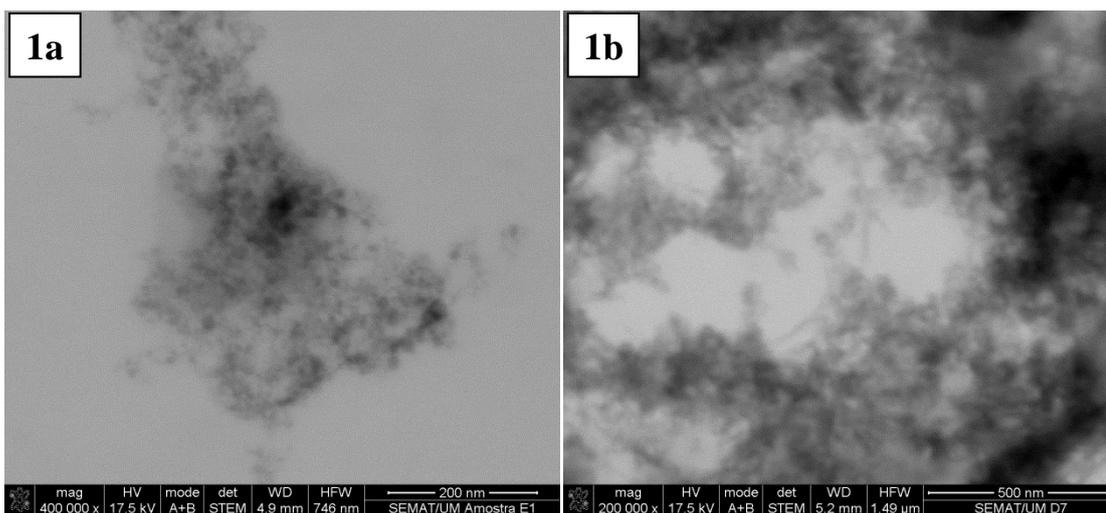


Figura 26 – Imagens de SEM das nanopartículas **1a** e **1b** preparadas por co-precipitação em solução aquosa à temperatura ambiente com ácido cítrico. **1a**: $[\text{Fe}]_{\text{total}} \approx 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{Fe}]_{\text{total}}:[\text{ácido cítrico}]$ 10:7. **2b**: $[\text{Fe}]_{\text{total}} \approx 6,2 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{Fe}]_{\text{total}}:[\text{ácido cítrico}]$ 1:1.

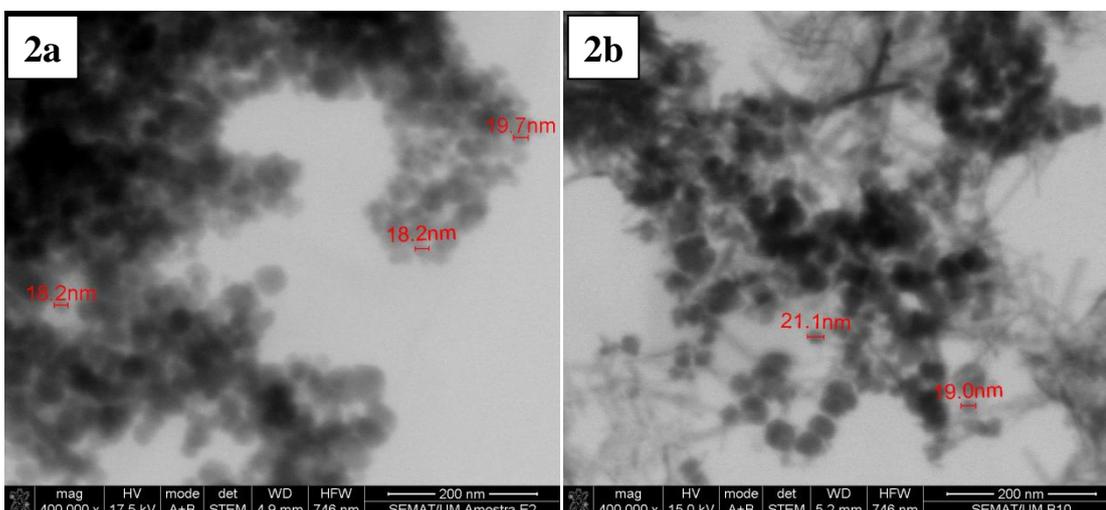


Figura 27 – Imagens de SEM das nanopartículas **2a** e **2b** preparadas por co-precipitação inversa em solução aquosa. **2a**: $[\text{Fe}]_{\text{total}} \approx 66 \times 10^{-3} \text{ M}$, adicionado de uma só vez. **2b**: $[\text{Fe}]_{\text{total}} \approx 66 \times 10^{-3} \text{ M}$, adicionado em cinco parcelas de 1ml em intervalos de 10 minutos.

Apesar da aglomeração, as imagens de SEM permitiram avaliar com maior segurança o tamanho das nanopartículas.

Os tamanhos das nanopartículas **2a**, **2b**, **3b** e **4e** encontram-se entre os 16nm (para as partículas **4e**) e os 34nm (para as partículas **3b**). No caso das partículas **2a** e **2b**, estas apresentam uma pequena distribuição de tamanhos, provavelmente entre 15nm e 25nm. Os resultados aqui obtidos para as partículas sintetizadas por co-precipitação inversa (**2a** e **2b**), estão de acordo com os resultados publicados [103]. Em ambos os casos, as nanopartículas apresentam uma pequena distribuição de tamanhos, forma aproximadamente esférica e tamanho médio de, aproximadamente, 20nm. O método de adição de solução contendo o sal de ferro (II) não parece influenciar o tamanho,

forma e polidispersividade das nanopartículas sintetizadas, o que também está de acordo com os resultados publicados.

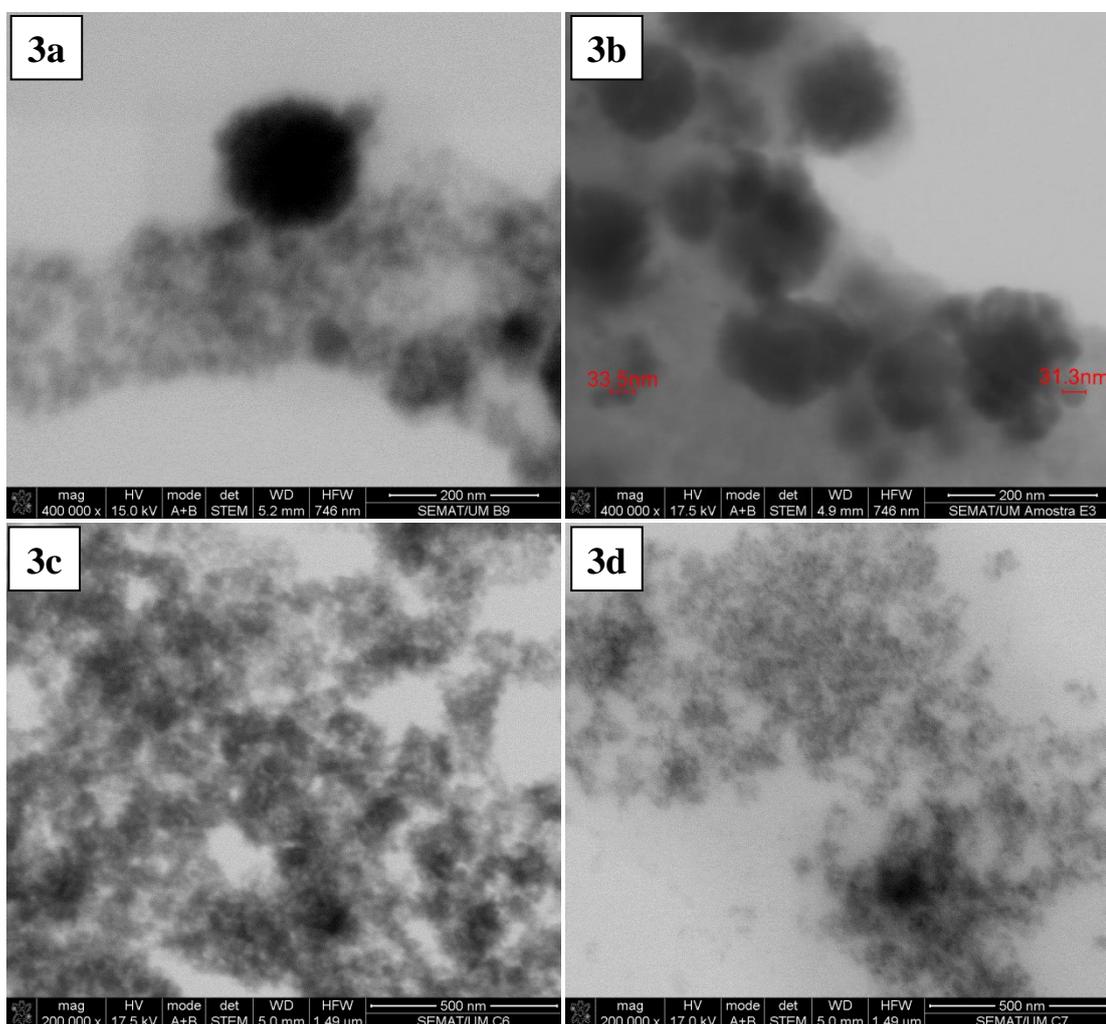


Figura 28 - Imagens de SEM das nanopartículas **3a**, **3b**, **3c** e **3d** preparadas por co-precipitação em micelas invertidas. **3a** e **3b**: $[\text{Fe}]_{\text{total}} \approx 69 \times 10^{-3} \text{ M}^*$, usando Triton X-100 como surfactante e n-heptanol como co-surfactante, com (**3a**) e sem (**3b**) TEOS. **3c**: $[\text{Fe}]_{\text{total}} \approx 56 \times 10^{-3} \text{ M}^*$, usando o CTAB como surfactante. **3d**: $[\text{Fe}]_{\text{total}} \approx 11 \times 10^{-3} \text{ M}^*$, usando o CTAB como surfactante.
 *- Concentrações calculadas para a fase aquosa das microemulsões, onde decorre a reação de síntese.

As partículas **4e** (figura 29) parecem apresentar ainda melhores características que as partículas **2a** e **2b**, tendo um tamanho aproximado de 16nm e baixa polidispersividade. Para além disso, estão relativamente bem dispersas. Estes resultados estão de acordo com os resultados publicados [106], onde é reportada a síntese de partículas com tamanho médio de 13,8nm e desvio padrão 3,7nm caracterizadas por TEM.

Já as partículas **3b** parecem estar extremamente agregadas, o que dificulta a análise da sua polidispersividade. No entanto as partículas mais isoladas parecem ter um tamanho por volta dos 30nm.

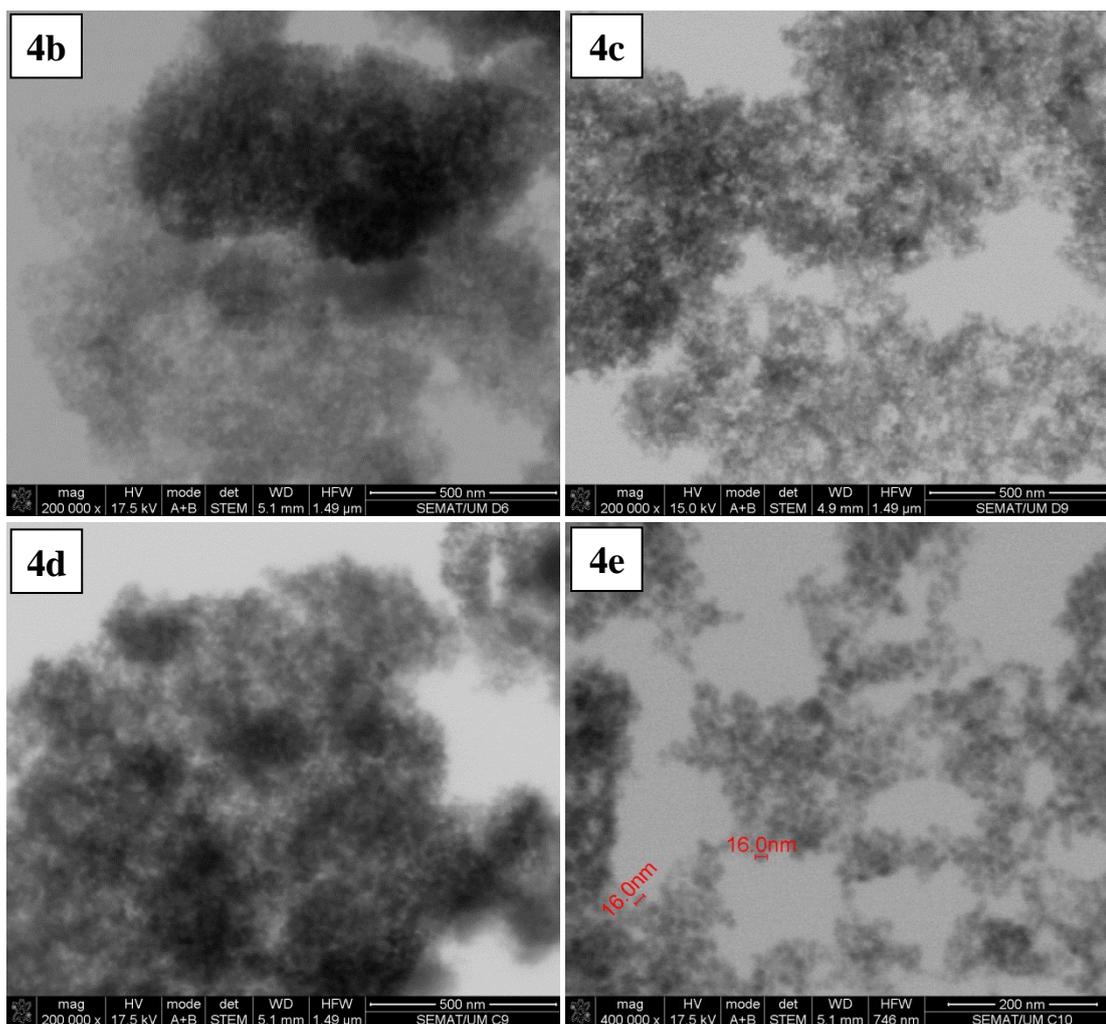


Figura 29 - Imagens de SEM das nanopartículas **4e** preparadas por co-precipitação em solução aquosa a 80 °C, e imagens dos magnetolipossomas **4b** (DOPG), **4c** (DPPC) e **4d** (AOT), preparados por adição do lípido ou AOT, durante e após o processo de síntese das partículas. **4e, 4b, 4c e 4d**: $[Fe]_{total} \approx 5 \times 10^{-3}$ M.

Para as restantes nanopartículas (**1a, 1b, 3a, 3c, 3d, 4b, 4c e 4d**), a determinação do seu tamanho não foi possível devido às limitações do poder de resolução do microscópio, podendo concluir-se que essas partículas serão ainda mais pequenas do que as partículas referidas anteriormente, sendo que o seu tamanho deverá ser de poucos nanómetros (< 15nm).

Como seria de esperar, a concentração de ferro parece influenciar a taxa de aglomeração das partículas (por comparação entre as partículas **1a e 1b**, e **3c e 3d**). No entanto, as concentrações usadas não parecem alterar significativamente o tamanho das nanopartículas obtidas.

Pela análise das partículas sintetizadas em microemulsões usando o Triton X-100 como surfactante (**3a e 3b**), verifica-se que a adição de TEOS influencia significativamente o tamanho e taxa de aglomeração das partículas, sendo que as partículas sintetizadas na presença de TEOS (**3a**) apresentam um tamanho e taxa de aglomeração inferior, o que está de acordo com os resultados publicados [104]. Este facto pode ser explicado pela formação de uma camada de sílica sobre as partículas durante o processo de síntese, limitando o crescimento e agregação. Para além disso, os

resultados publicados reportam a síntese de partículas na gama dos nanómetros cobertas com uma fina camada de sílica (1-2nm), o que também parece estar de acordo com os resultados aqui obtidos.

O revestimento das nanopartículas com sílica parece também promover uma melhor lavagem das partículas, uma vez que nas partículas onde não foi adicionado TEOS (**3b**), observa-se o que parecem ser resíduos de surfactante, o que pode estar a contribuir para uma maior taxa de aglomeração.

Em relação às nanopartículas cobertas por lípido ou AOT (figura **4b**, **4c** e **4d**, figura 29), não é possível observar a estrutura dos magnetolipossomas. Isto pode dever-se ao vácuo produzido no SEM, que poderá estar a comprometer a integridade estrutural dos magnetolipossomas, já que os resultados publicados indicam a formação de magnetolipossomas de, aproximadamente, 50nm observados por *cryo*-SEM. Esse facto pode ser a razão pela qual as partículas aparentam estar mais aglomeradas.

Em conclusão, os resultados obtidos por SEM permitem comprovar a síntese de partículas com tamanho suficientemente pequeno para serem incorporadas em lipossomas formando magnetolipossomas, com aplicações em MRI, tratamentos por hipertermia e entrega controlada de fármacos, *in vivo*, por aplicação de um campo magnético externo, uma vez que, nesta gama de tamanhos, as nanopartículas apresentam comportamento paramagnético.

4.3.2. Caracterização das propriedades magnéticas

Logo após a síntese das nanopartículas, foi usado um pequeno magneto para verificar o seu magnetismo, sendo que todas as partículas demonstraram ser magnéticas ao reagir rapidamente ao campo magnético aplicado. Na figura 30, a título de exemplo, está representado o comportamento das nanopartículas **2a**, antes e após a aplicação de um campo magnético.

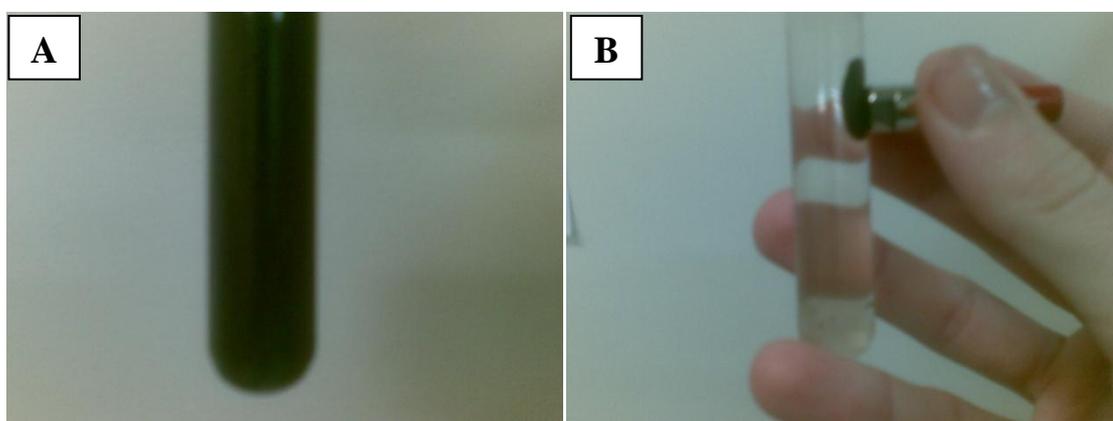


Figura 30 – Comportamento das nanopartículas **2a**, antes (A) e após (B) a aplicação de um campo magnético.

Foi feita uma análise das propriedades magnéticas das nanopartículas **4e** usando um dispositivo supercondutor de interferência quântica (SQUID) na Universidade do Porto, através de uma colaboração com os Profs. Bernardo Almeida (CFUM) e J.P. Araújo (UPorto). A seguir, é apresentado o gráfico do momento magnético em função do campo aplicado (figura 31) e a curva de histerese (figura 32) das nanopartículas **4e**.

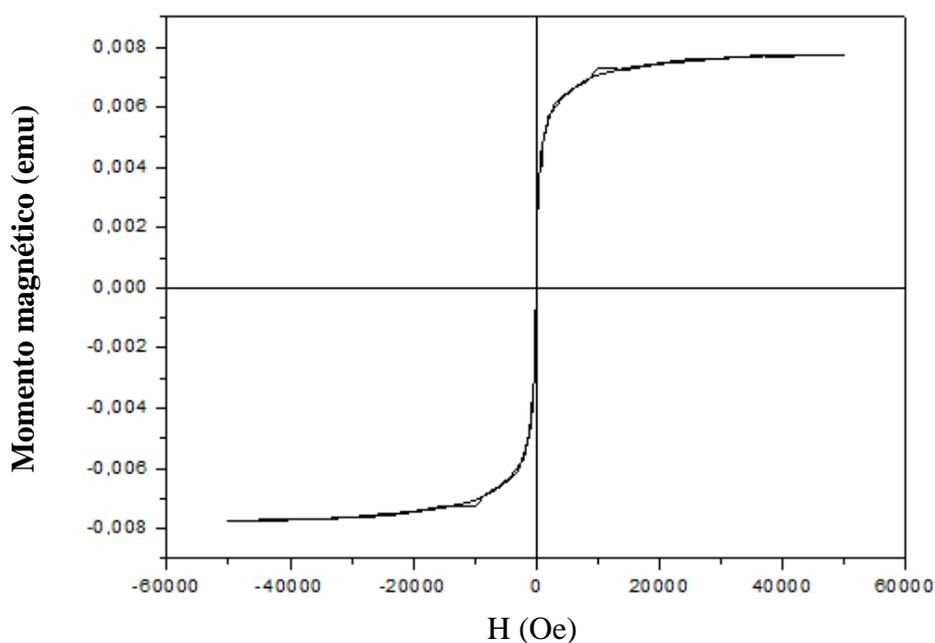


Figura 31 – Momento magnético (emu) em função do campo magnético aplicado (Oe) das nanopartículas **4e**.

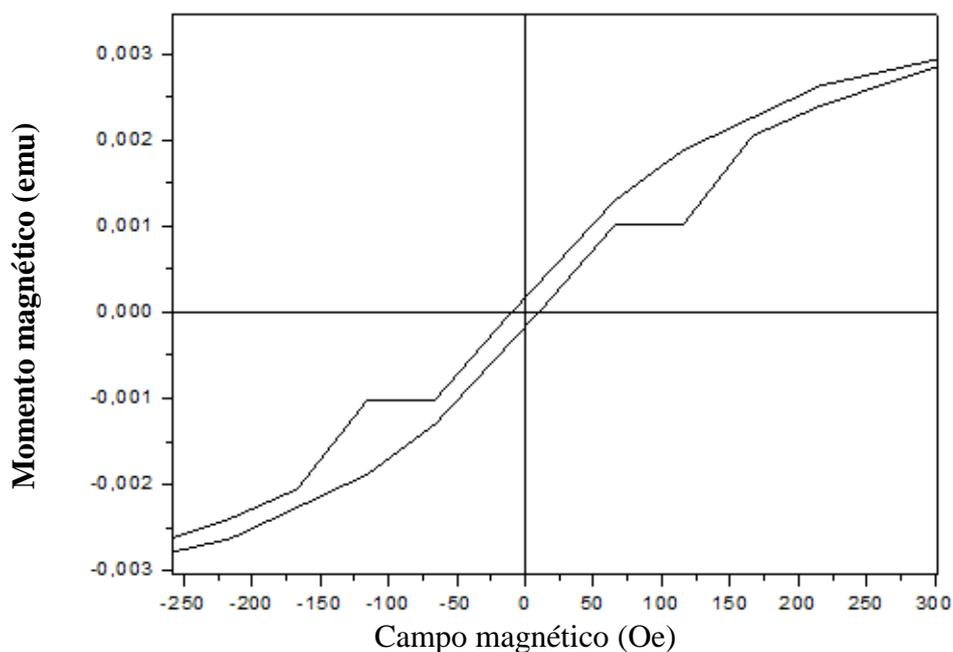


Figura 32 – Curva de histerese das partículas **4e** à temperatura ambiente.

Uma vez que a quantidade de amostra era muito reduzida, não foi possível determinar o valor da suscetibilidade magnética. No entanto, pela análise da curva de histerese, foi possível determinar o valor da coercividade das nanopartículas, sendo este de aproximadamente 10 Oe, a 300K, indicando que as partículas são quási-superparamagnéticas. Tendo em conta que a coercividade depende do tamanho das nanopartículas, este resultado é indicativo de nanopartículas pequenas, comprovando os resultados obtidos por SEM (~16nm) para estas nanopartículas. Resultados publicados indicam que nanopartículas de magnetite com 8nm são paramagnéticas apresentando coercividade zero. No entanto nanopartículas com 12nm apresentam histerese, com coercividade 18 Oe [114]. Assim, as nanopartículas aqui sintetizadas parecem ter melhores propriedades.

Nanopartículas ferromagnéticas ($H_C > 0$), são capazes de gerar calor por perda de histerese mediada pela aplicação de um campo magnético alternado, característica que pode ser explorada em tratamentos de tumores por hipertermia. A capacidade das nanopartículas de gerar calor sob aplicação de um campo magnético alternado aumenta com a coercividade e, portanto, com o seu tamanho (dentro de uma certa gama). Foi reportado que nanopartículas com 16nm ($H_C = 27$ Oe) e 18nm ($H_C = 105$ Oe) foram capazes de gerar calor com alta eficiência [114]. Os mesmos autores calcularam ainda o tamanho para o qual as nanopartículas apresentarão eficiência máxima, sendo que, segundo eles, a eficiência será máxima para partículas com 21nm. De acordo com estes resultados, as nanopartículas **2a** e **2b** (~20nm) aqui produzidas poderão ser boas candidatas para aplicações em hipertermia. No entanto, seria necessário fazer uma caracterização magnética dessas partículas.

Apesar de não ter sido possível fazer a caracterização magnética das restantes amostras, tendo em conta que as nanopartículas de magnetite são paramagnéticas para tamanhos inferiores a 10nm, é provável que tenham sido sintetizadas nanopartículas superparamagnéticas neste trabalho. As nanopartículas **1a**, **3a** e **3d** seriam boas candidatas para uma posterior caracterização na tentativa de verificar o seu possível superparamagnetismo.

4.4. Estudo fotofísico dos compostos em magnetolipossomas

Os magnetolipossomas (EGG-PC/**4e**) foram preparados por injeção etanólica de uma mistura de lípido (EGG-PC) e composto numa solução aquosa de partículas (**4e**) bem dispersas. As concentrações de lípido e composto foram as concentrações usadas no estudo fotofísico dos compostos em membranas lipídicas (capítulo 3.2), para se poder comparar os resultados. De

seguida, apresentam-se os espectros de fluorescência dos compostos 1, 2 e 3 incorporados em lipossomas (EGG-PC) e em magnetolipossomas (EGG-PC/4e).

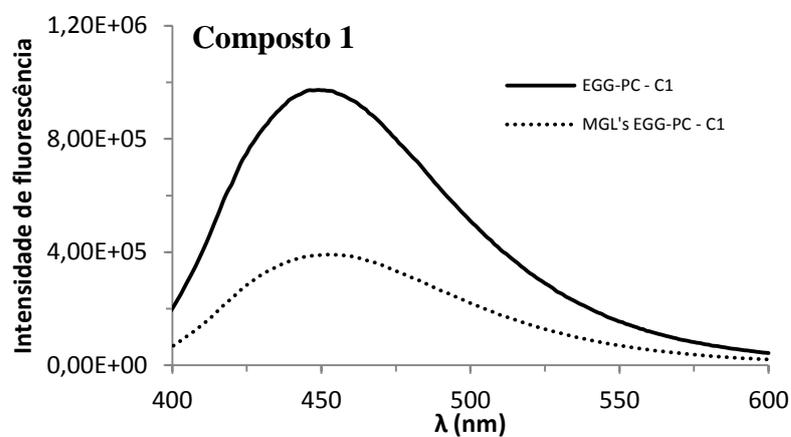


Figura 33 – Espectros de fluorescência do composto 1 incorporado em lipossomas (EGG-PC) e em magnetolipossomas (EGG-PC/4e).

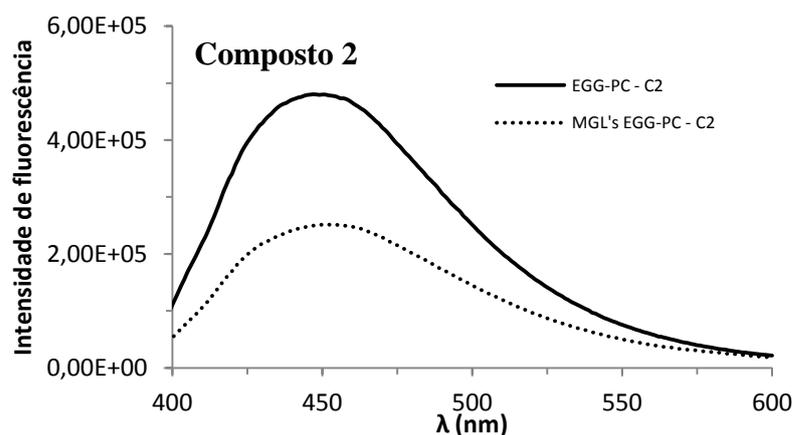


Figura 34 – Espectros de fluorescência do composto 2 incorporado em lipossomas (EGG-PC) e em magnetolipossomas (EGG-PC/4e).

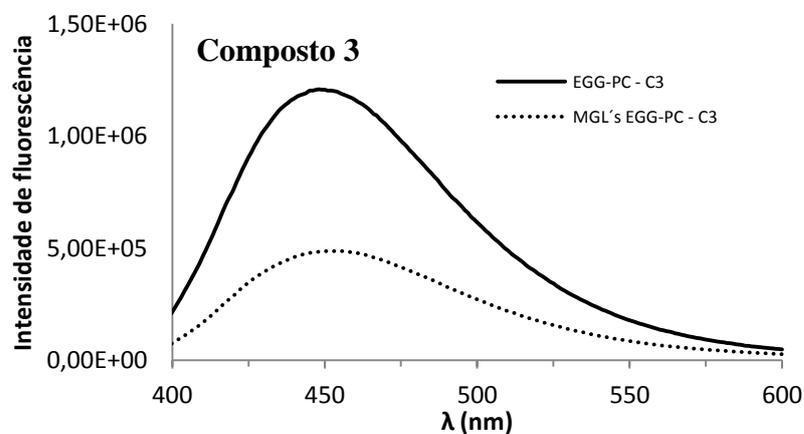


Figura 35 – Espectros de fluorescência do composto 3 incorporado em lipossomas (EGG-PC) e em magnetolipossomas (EGG-PC/4e).

A alteração mais evidente nos espectros de fluorescência dos três compostos incorporados em magnetolipossomas é a diminuição acentuada da emissão de fluorescência. O *quenching* de fluorescência de fluoróforos na presença de nanopartículas de óxido de ferro (magnetite e magmrite) foi já reportado [115,116]. Essa inibição pode ser explicada pela transferência de energia entre os fluoróforos no estado excitado e as nanopartículas por processos radiativos e não radiativos. Para além disso, pode ainda ocorrer transferência de eletrões fotoinduzida (PET) e um aumento da eficiência de cruzamento intersistemas devido ao efeito do átomo pesado. Assim, estes resultados comprovam o sucesso de incorporação das nanopartículas nos lipossomas.

Apesar da inibição de fluorescência observada, os compostos continuam a apresentar uma emissão de fluorescência razoável, e portanto, constituem um método de deteção que permite monitorizar a localização dos magnetolipossomas nas células ou no corpo.

Para além disso, não se verificam desvios significativos nos comprimentos de onda máximos de emissão dos compostos englobados nos magnetolipossomas, indicando que estes estão localizados na zona hidrofóbica da bicamada lipídica, como já tinha sido observado na análise dos compostos em lipossomas.

4.5. Estudos de interação magnetolipossoma – modelos de células

Para o estudo da interação não específica magnetolipossoma-célula, foram realizados ensaios de transferência de energia ressonante de Förster (FRET). Para isso, foram preparados GUVs (vesículas unilamelares gigantes) de lecitina de soja (capítulo 3.6.1), nos quais foram incorporados lípidos marcados com sonda fluorescente NBD (NBD-C₆-HPC, NBD-C₁₂-HPC e NBD-PE) que funcionam como aceitadores nos ensaios de FRET. O objetivo destes ensaios foi verificar a ocorrência (ou não) de transferência de energia ressonante de Förster entre os compostos (doadores) incorporados em magnetolipossomas e os fluoróforos incorporados nos GUVs (aceitantes). Uma premissa essencial para que o processo de FRET possa ocorrer é existir uma sobreposição espectral entre a emissão de fluorescência do doador e a absorção do aceitante. De seguida são apresentados os espectros de fluorescência normalizados dos compostos englobados em magnetolipossomas de EGG-PC/4e e os espectros de excitação dos fluoróforos incorporados nos GUVs (figura 36). Aqui apresentam-se os espectros de excitação porque os espectros de absorção são comprometidos pela dispersão provocada pelos GUVs (de grandes dimensões).

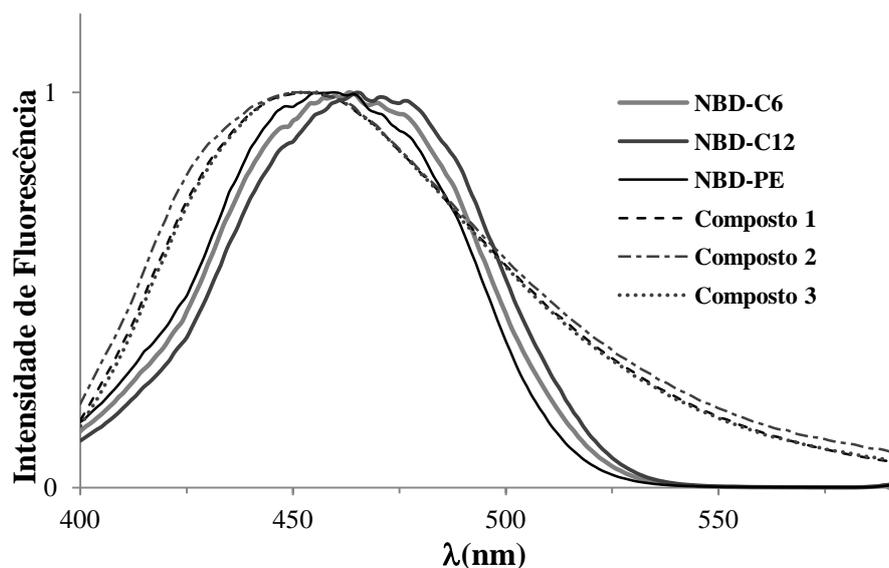


Figura 36 – Sobreposição dos espectros de emissão ($\lambda_{exc}=370$ nm) dos doadores (compostos 1, 2 e 3) incorporados em magnetolipossomas (EGG-PC/4e) e dos espectros de excitação ($\lambda_{em}=600$ nm) dos aceitantes (NBD-C₆-HPC, NBD-C₁₂-HPC e NBD-PE) incorporados em GUVs de lecitina de soja.

Uma vez que a emissão dos doadores e a absorção do aceitante (NBD) se sobrepõe, a ocorrência de FRET é possível desde que a distância entre os fluoróforos seja suficientemente baixa (entre 10 e 100 Å) [88].

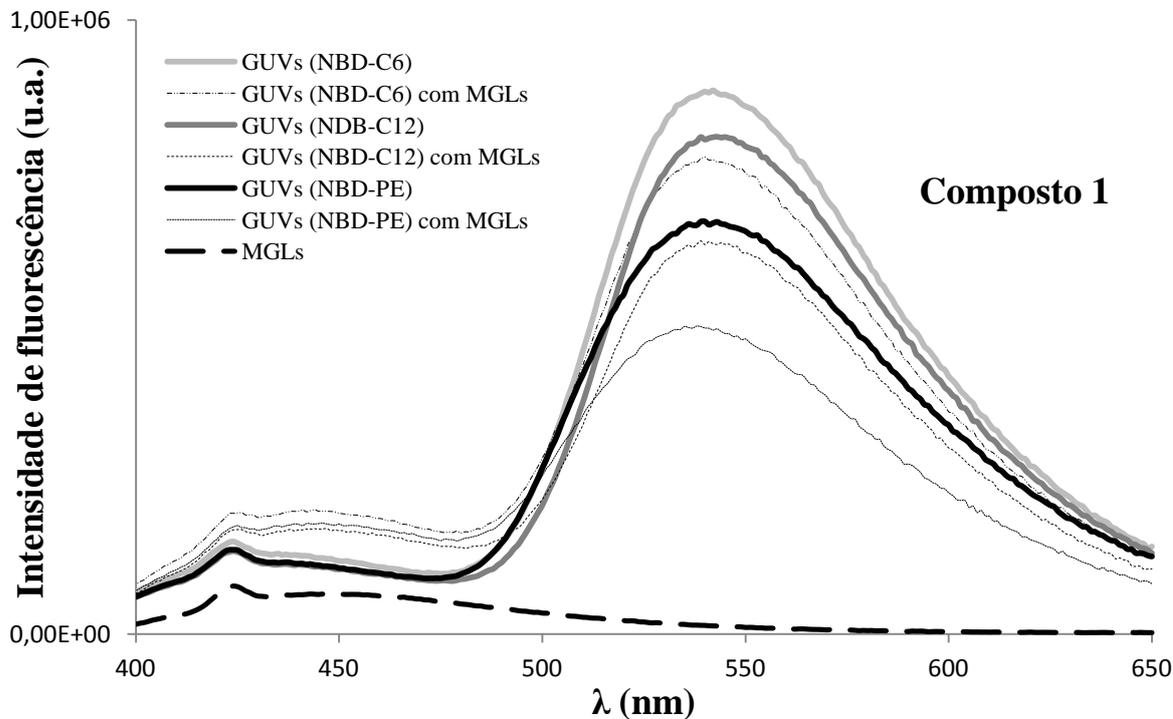


Figura 37 – Espectros de fluorescência ($\lambda_{exc}=370$ nm) do NBD-C₆, NBD-C₁₂ e NBD-PE incorporados em GUVs de lecitina de soja na presença (1250µl GUVs + 500µl MGLs + 250µl H₂O) e ausência (1250µl GUVs + 750µl H₂O) de magnetolipossomas de EGG-PC/4e com composto 1. Para efeitos de comparação é também apresentado o espectro de fluorescência dos MGLs (500µl MGLs + 1500µl H₂O) com composto 1 nas mesmas condições.

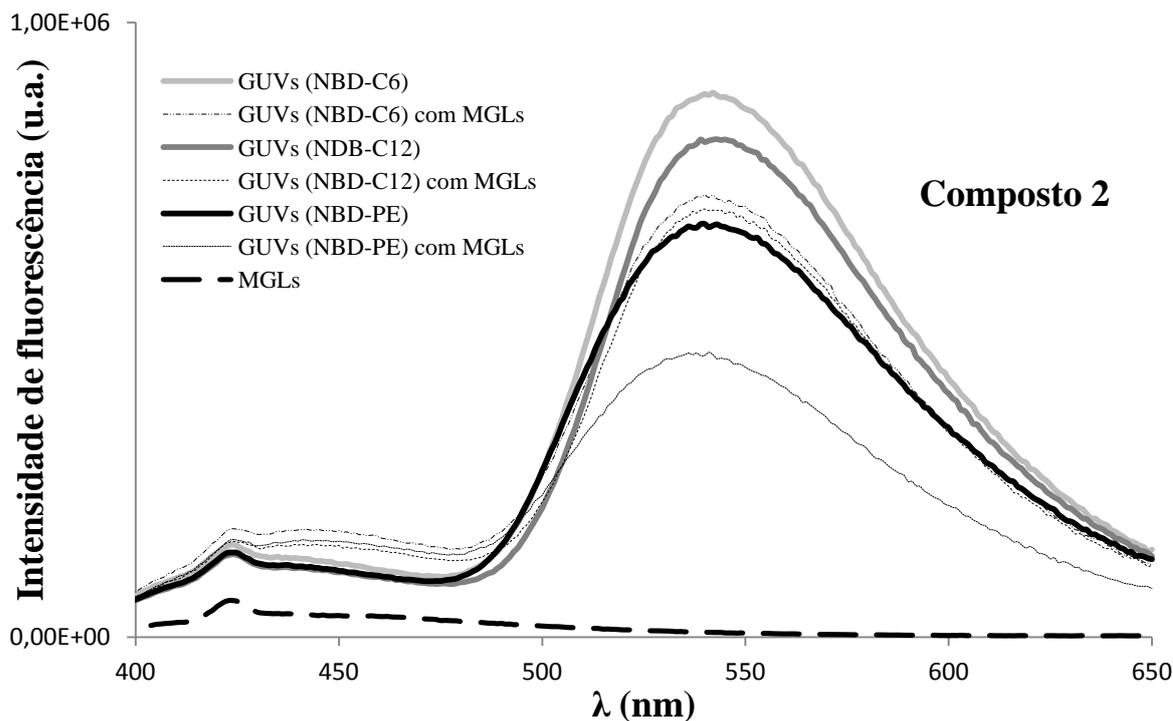


Figura 38 - Espectros de fluorescência ($\lambda_{exc}=370$ nm) do NBD-C₆, NBD-C₁₂ e NBD-PE incorporados em GUVs de lecitina de soja na presença (1250 μ l GUVs + 500 μ l MGLs + 250 μ l H₂O) e ausência (1250 μ l GUVs + 750 μ l H₂O) de magnetolipossomas de EGG-PC/4e com composto 2. Para efeitos de comparação é também apresentado o espectro de fluorescência dos MGLs (500 μ l MGLs + 1500 μ l H₂O) com composto 2 nas mesmas condições.

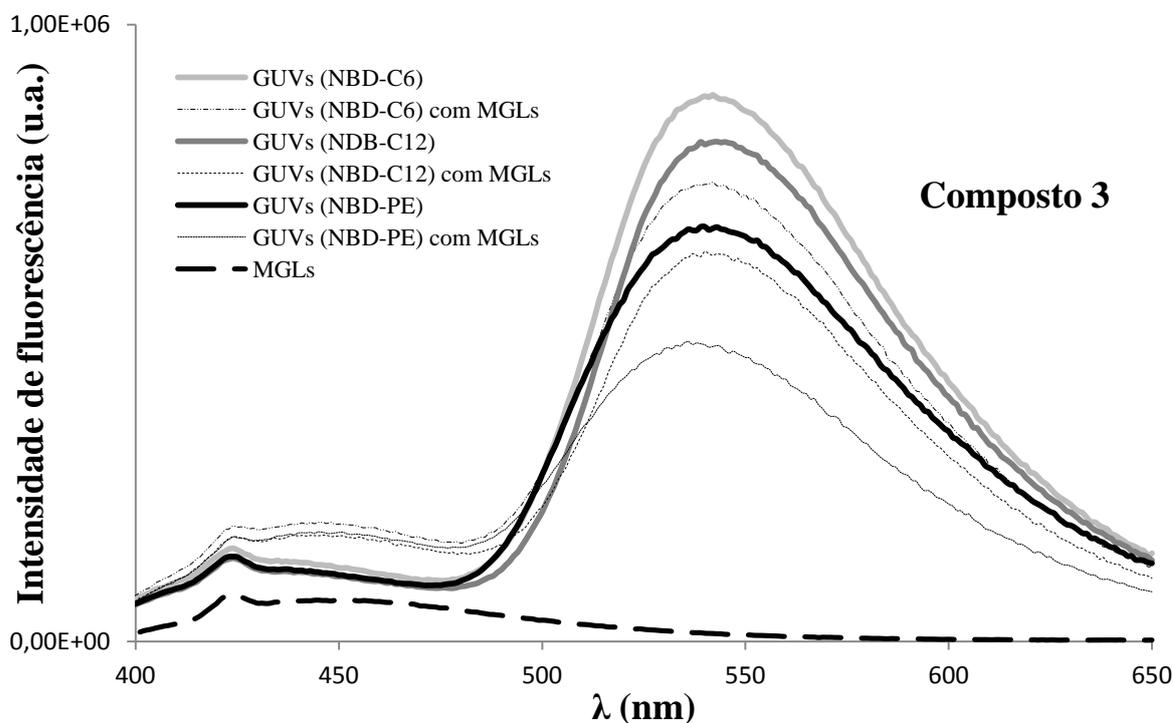


Figura 39 - Espectros de fluorescência ($\lambda_{exc}=370$ nm) do NBD-C₆, NBD-C₁₂ e NBD-PE incorporados em GUVs de lecitina de soja na presença (1250 μ l GUVs + 500 μ l MGLs + 250 μ l H₂O) e ausência (1250 μ l GUVs + 750 μ l H₂O) de magnetolipossomas de EGG-PC/4e com composto 3. Para efeitos de comparação é também apresentado o espectro de fluorescência dos MGLs (500 μ l MGLs + 1500 μ l H₂O) com composto 3 nas mesmas condições.

Nas figuras 37, 38 e 39, são apresentados os espectros de fluorescência de soluções de magnetolipossomas contendo os compostos, de soluções de GUVs contendo o marcador fluorescente NBD e de misturas de soluções de magnetolipossomas e GUVs. Foram feitas diluições iguais para todas as soluções para que as emissões de fluorescência possam ser comparáveis.

Pela análise dos resultados obtidos, não é possível verificar a ocorrência de FRET na mistura de MGLs e GUVs contendo os fluoróforos. Pelo contrário, em todos os casos, verificou-se uma redução considerável da emissão de fluorescência do NBD, aquando da adição dos magnetolipossomas contendo os compostos. Este resultado pode ser explicado pela inibição de fluorescência provocada pelas nanopartículas incorporadas nos magnetolipossomas. Assim sendo, parece ocorrer uma interação entre os magnetolipossomas e os GUVs, uma vez que as nanopartículas devem estar próximas das moléculas de NBD para que ocorra transferência de energia para as nanopartículas, o que se traduz no *quenching* de fluorescência observado. Para além disso, o *quenching* provocado pelas nanopartículas pode estar a mascarar a observação da ocorrência de FRET entre os compostos e os lípidos marcados com NBD, pelo que essa hipótese não pode ser eliminada.

A inibição de fluorescência poderia também ser explicada pela presença de nanopartículas dispersas em solução. No entanto, essa hipótese pode ser descartada devido ao facto de ter sido feita uma separação magnética das nanopartículas, pelo que a quantidade de nanopartículas dispersas (não incorporadas) na solução de magnetolipossomas deve ser ínfima.

No futuro seria interessante medir a emissão de fluorescência de uma solução contendo os GUVs com NBD incorporado e nanopartículas magnéticas dispersas, de forma a verificar definitivamente a análise dos resultados.

Apesar de tudo, estes resultados indicam uma interação entre os MGLs e os GUVs. Portanto, estes sistemas apresentam potencialidade de aplicação em hipertermia intracelular e entrega controlada de fármacos, promovendo a entrada dos fármacos e das nanopartículas nas células.

5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

No âmbito deste trabalho, foram produzidos, com sucesso, magnetolipossomas incorporando nanopartículas magnéticas de magnetite e compostos potencialmente antitumorais estudados fotofísicamente.

Os compostos demonstraram emissão de fluorescência razoável em vários solventes e incorporados em membranas lipídicas. A emissão de fluorescência dos compostos apresenta sensibilidade ao ambiente vizinho e, por isso, os compostos podem ser usados como sondas solvatocrômicas no estudo da fluidez de bicamadas lipídicas.

Pelos estudos espectroscópicos foi possível verificar que os compostos podem ser incorporados e transportados na bicamada lipídica de magnetolipossomas e, desta forma, é possível controlar a biodistribuição dos fármacos no organismo por ação de um campo magnético externo.

Com o objetivo de obter magnetolipossomas foram produzidas nanopartículas magnéticas de magnetite com tamanho inferior a 20 nm, com baixa polidispersividade e baixa coercividade ($H_C \approx 10$ Oe), sendo que as propriedades das nanopartículas sintetizadas são dependentes dos métodos e condições de preparação.

Algumas nanopartículas sintetizadas foram incorporadas em lipossomas obtendo-se magnetolipossomas, o que ficou comprovado pelos estudos de fluorescência dos compostos nesses sistemas.

Por fim, foram realizados ensaios de FRET de forma a estudar a interação não específica magnetolipossoma-célula. Apesar do processo de FRET não ter sido observado, o quenching de fluorescência do NBD presente nos modelos de membrana pelas nanopartículas presentes nos lipossomas é indicativo da interação entre os dois sistemas, provavelmente por ocorrência de fusão membranar.

Os sistemas desenvolvidos neste trabalho têm potencialidade de aplicação em entrega controlada de fármacos, em hipertermia intracelular e em MRI, por aplicação de um campo magnético externo. Dependendo da aplicação para a qual os magnetolipossomas são produzidos, podem ser incorporadas nanopartículas com diferentes propriedades, otimizando, desta forma, a sua eficiência.

Apesar de todo o trabalho científico nesta área e dos resultados aqui obtidos, continua a ser necessário investigação futura. Como continuação do trabalho desenvolvido no âmbito desta tese de mestrado sugerem-se:

- Testes de reprodutibilidade dos métodos de síntese das nanopartículas.
- Caracterização estrutural das nanopartículas sintetizadas por técnicas mais poderosas, como difração de raios X (XDR), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia de força atômica (AFM).
- Caracterização das propriedades magnéticas de todas as nanopartículas sintetizadas pela determinação da suscetibilidade magnética e coercividade por SQUID.
- Avaliação da taxa de absorção específica (SAR) das nanopartículas sintetizadas.
- Realização de estudos adicionais para verificar a interação não específica magnetolipossoma-célula. Neste sentido, seria importante reproduzir as experiências de FRET, na ausência de nanopartículas, usando lipossomas em vez de magnetolipossomas.
- Funcionalização dos magnetolipossomas com moléculas com afinidade para marcadores cancerígenos com o objetivo de torná-los específicos para as células tumorais. Algumas das moléculas usadas para esse fim são os anticorpos monoclonais e o ácido fólico [117].
- Caracterização estrutural dos magnetolipossomas por DLS e cryo-TEM.
- Avaliação da atividade antitumoral dos compostos incorporados em magnetolipossomas em linhas celulares tumorais *in vitro*.

6. REFERÊNCIAS

- [1] A. Jemal, F. Bray, M. Melissa, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global Cancer Statistics, *CA Cancer J Clin*, 61 (2011) 69-90.
- [2] R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal, Cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 62 (2012) 10–29.
- [3] O. C. Farokhzad, Nanotechnology for drug delivery: The perfect partnership, *Expert Opin Drug Deliv*, 5 (2008) 927–929.
- [4] I. A. Siddiqui, V. M. Adhami, J. C. Chamcheu, H. Mukhtar, Impact of nanotechnology in cancer: emphasis on nanochemoprevention, *Int J Nanomedicine* 7 (2012) 591-605.
- [5] C. Medina, M. J. Santos-Martinez, A. Radomski, O. I. Corrigan, M. W. Radomski, Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance, *Br J Pharmacol* 150 (2007) 552-8.
- [6] European Science Foundation's Forward Look on Nanomedicine, *Consensus Conference*, Le Bischenberg, (2004) 8-10.
- [7] K. K. Jain, Advances in the field of nanooncology, *BMC Medicine* (2010) 8:83.
- [8] V. P. Litvinov, V. V. Dotsenko, S. G. Krivokolysko, Thienopyridines: synthesis, properties, and biological activity, *Chemical Bulletin* 54 (2005) 864-904.
- [9] M. J. Queiroz, D. Peixoto, A. R. Rodrigues, P. Mendes, C. Costa, P. Coutinho, E. Coutinho: 1,3-diarylureas linked by C-C Suzuki coupling to the methyl 3-aminothieno[3,2-*b*]pyridine-2-carboxylate moiety: Synthesis and fluorescence studies in solution and in lipid membranes, *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemistry* 255 (2013) 27-35.
- [10] M. L. Curtin, R. R. Frey, H. R. Heyman, N. B. Soni, P. A. Marcotte, L. J. Pease, K. B. Glaser, T. J. Magoc, P. Tapang, D. H. Albert, D. J. Osterling, A. M. Olson, J. J. Bouska, Z. Guan, L. C. Preusser, J. S. Polakowski, K. D. Stewart, C. Tse, S. K. Davidsen, M. R. Michaelides, Thienopyridine ureas as dual inhibitors of the VEGF and Aurora kinase families, *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 22 (2012) 3208-3212.
- [11] H. R. Heyman, R. R. Frey, P. F. Bousquet, G. A. Cunha, M. D. Moskey, A. A. Ahmed, N. B. Soni, P. A. Marcotte, L. J. Pease, K. B. Glaser, M. Yates, J. J. Bouska, D. H. Albert, C. L. Black-Schaefer, P. J. Dandliker, K. D. Stewart, P. Rafferty, S. K. Davidsen, M. R. Michaelides, M. L. Curtin, Discovery of N-(4-(3-amino-1H-indazol-4-yl)phenyl)-N'-(2-fluoro-5-methylphenyl)urea (ABT-869), a 3-aminoindazole-based orally active multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor, *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 17 (2007) 1246-1249.
- [12] - S. Claridge, F. Raepfel, M. C. Granger, N. Bernstein, O. Saavedra, L. Zhan, D. Llewellyn, A. Wahhab, R. Deziel, J. Rahil, N. Beaulieu, H. Nguyen, I. Dupont, A. Barsalou, C. Beaulieu, I.

- Chute, S. Gravel, M. F. Robert, S. Lefebvre, M. Dubay, R. Pascal, J. Gillespie, Z. Jin, J. Wang, J. M. Besterman, A.R. MacLeod, A. Vaisburg, Discovery of a novel and potent series of thieno[3,2-b]pyridine-based inhibitors of c-Met and VEGFR2 tyrosine kinases, *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 18 (2008) 2793-2798.
- [13] M. J. Queiroz, R. C. Calhelha, L. A. Vale Silva, E. Pinto, R. T. Lima, M. H. Vasconcelos, Efficient synthesis of 6-(hetero)arylthieno[3,2-b]pyridines by Suzuki-Miyaura coupling. Evaluation of growth inhibition on human tumor cell lines, SARs and effects on the cell cycle, *Eur J Med Chem.* 45 (2010) 5628-34.
- [14] D. D. Lasic, Liposomes: from physics to applications, *Elsevier* (1995).
- [15] D. D. Lasic, Novel applications of liposomes, *TIBTECH*, 16 (1998) 220-227.
- [16] A. Sharma, Liposomes in drug delivery: Progresses and limitations, *International Journal of Pharmaceutics*, 154 (1997) 123-140
- [17] D. D. Lasic, Liposomes, *Am. Sci.* 80 (1992) 20-31.
- [18] D. D. Lasic, Liposomes: from physics to applications, Handbook of Biological Physics, Volume 1, *Elsevier Science B. V.*, (1995)
- [19] D. D. Lasic, D. Papahadjopoulos, Liposomes revised, *Science*, 267 (1995) 1275-1276.
- [20] H. Harashima, K. Sakata, K. Funato, H. Kiwada, Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharm. Res.* 11 (1994) 402-406.
- [21] A. Gabizon, D. Papahadjopoulos, Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 (1988) 6949-6953.
- [22] F. Frézard, D. A. Schettini, O. G. F. Rocha, C. Demicheli, Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy, *Quím. Nova*, 28 (2005) 511-518.
- [23] A. Sharma, R. M. Straubinger, Novel taxol formulations: preparation and characterization of taxol-containing liposomes, *Pharm. Res.*, 11 (1994) 889-896.
- [24] A. Sharma, N. L. Straubinger, R. M. Straubinger, Modulation of human ovarian tumor cell sensitivity to N-(phosphonacetyl)-L-aspartate (PALA) by liposome drug carriers, *Pharm. Res.*, 10 (1993) 1434-1441.
- [25] R. M. Straubinger, K. Hong, D. S. Friend, D. Papahadjopoulos, Endocytosis of liposomes and intracellular fate of encapsulated molecules: encounter with a low pH compartment after internalization in coated vesicles, *Cell*, 32 (1983) 1069-1079.
- [26] P. L. Felgner, R. H. Zaugg, J. A. Norman, Synthetic recombinant DNA delivery for cancer therapeutics, *Cancer Gene Ther.* 2 (1995) 61-65.

- [27] M. A. Willard, L. K. Kurihara, E. E. Carpenter, S. Calvin, V. G. Harris, Chemically prepared magnetic nanoparticles, *International Materials Reviews*, 49 (2004) 125-170.
- [28] R. H. Kodama, Magnetic nanoparticles, *Journal of magnetism and Magnetic Materials*, 200 (1999) 359-372.
- [29] Q. A. Pankhurst, N. K. T. Thanh, S. K. Jones, J. Dobson, Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *Journal of Physics D: Applied Physics* 42 (2009) 224001 (15pp).
- [30] M. Walker, C. Diebel, C. Haugh, P. Pankhurst, J. Montgomery, C. Green, Structure and function of the vertebrate magnetic sense, *Nature*, 390 (1997) 371-376.
- [31] R. J. Harrison, R. E. Dunin-Borkowski, A. Putnis, Direct imaging of nanoscale magnetic interactions in minerals, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 26 (2002) 16556–16561.
- [32] P. Tartaj, M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. González-Carreño, C. J. Serna, The preparation of magnetic nanoparticle for application in biomedicine, *Journal of Physics D: Applied Physics* 36 (2003) 182-197.
- [33] T. Sugimoto, Fine Particles: Synthesis, Characterization and Mechanism of Growth, *New York: Marcel Dekker*, 92 (2000).
- [34] U. Schwertmann, R. M. Cornell, Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization. *Weinheim, VCH*, (1991).
- [35] M. Babincova, P. Babinec, Magnetic Drug Delivery and Targeting: Principles and Applications, *Biomedical Papers*, 153 (2009) 243–250.
- [36] R. Massart, V. Cabuil, Effect of some parameters on the formation of colloidal magnetite in alkaline medium: yield and particle size control, *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 84 (1987) 967-973.
- [37] J. P. Jolivet, Metal oxide chemistry and Synthesis: from solutions to solid state, *John Wiley & Sons, West Sussex*, U.K. (2003).
- [38] M. Boutonnet, J. Kitzling, P. Stenius, The preparation of monodisperse colloidal metal particles from microemulsions, *Colloids and Surfaces*, 5 (1982) 209-225.
- [39] K. Kimijima, T. Sugimoto, Effects of water content on the growth rate of AgCl nanoparticles in a reversed micelle system, *Journal of Colloid and Interface Science*, 286 (2005) 520-525.
- [40] A. S. Bommaris, J. F. Holzwarth, D. I. C. Wang, T. A. Hatton, Coalescence and solubilization exchange in a cationic four-component reversed micellar system, *Journal of Physical Chemistry* 94 (1990) 7232-7239.

- [41] P. D. I. Fletcher, A. M. Howe, B. H. Robinson, The kinetics of solubilize exchange between water droplets of a water-in-oil microemulsion, *Journal of Chemical Society Faraday Transactions I*, 83 (1987) 985-100.
- [42] L. Li, W. Qing-Sheng, D. Ya-Ping, W. Pei-Ming, Control synthesis of semiconductor ZnSe quasi-nanospheres by reverse micelles soft template, *Material Letters*, 59 (2005) 1623-1626.
- [43] K. Inouye, R. Endo, Y. Otsuka, K. Miyashiro, K. Kaneko, T. Ishikawa, Oxidation of ferrous ions in reversed microemulsion, *Journal of Physical Chemistry*, 86 (1982) 1465–1469.
- [44] P. Ayyub, A. Maitra, D. O. Shah, Microstructure of the CTAB-Butanol-Ocatne-Water microemulsion system: Effect of dissolved salts, *Journal of Chemical Society Faraday Transaction*, 89 (1993) 3585–3589.
- [45] M. M. Stecker, G. B. Benedek, Theory of multicomponent micelles and microemulsions, *Journal of Physical Chemistry*, 88 (1984) 6519–6544.
- [46] CB. Murray, SH. Sun, H. Doyle, T. Betley, Monodisperse 3d transition-metal (Co, Ni, Fe) nanoparticles and their assembly into nanoparticle superlattices, *MRS Bulletin*, 26 (2001) 985-991.
- [47] Y. Jun, J. Choi, J. Cheon, Heterostructured magnetic nanoparticles: Their versatility and high performance capabilities, *Chemical Communications* (2007) 1203-1214.
- [48] M. A. Hayes, N. A. Polson, N. A. Phayre, A. A. Garcia, Flow-based microimmunoassay. *Anal. Chem.* (2001) 5896–5902.
- [49] J. Cheon, N. J. Kang, S. M. Lee, J. H. Yoon, S. J. Oh, Shape evolution of single-crystalline iron oxide nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 1950–1951.
- [50] J. Choi, S. J. Oh, H. Ju, J. Cheon, Massive fabrication of free-standing one dimensional Co/Pt nanostructures and modulation of ferromagnetism via a programmable barcode layer effect, *Nano Lett.* 5 (2005) 2179–2183.
- [51] A. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth, Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization and application, *Angewandte Chemi*, 46 (2007) 1222-1244.
- [52] D. Ma, J. Guan, F. Normandin, S. Denommee, G. Enright, T. Veres, B. Simard, Multifunctional nano-architecture for biomedical applications, *Chemistry of Materials*, 18 (2006) 1920-1927
- [53] A. Ulman, Formation and structure of self-assembled mmonolayers, *Chem. Rev.*, 96 (1996) 1533.
- [54] J. W. M. Bulte, L. D. Ma, R. L. Magin, R. L. Kamman, C. E. Hulstaert, K. G. Go, T. H. The, L. Deleij, Selective MR imaging of labeled human peripheral-blood mononuclear-cells by liposome mediated incorporation of dextran-magnetite particles, *Magnetic Resonance in Medicine*, (1993) 32-37.

- [55] M. Decuyper, M. Joniau, Magnetoliposomes: formation and structural characterization, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 15 (1988) 311-319.
- [56] W. J. M. Mulder, G. J. Strijkers, G. A. F. van Tilborg, A. W. Griffioen, K. Nicolay, Lipid-based nanoparticles for contrast-enhanced MRI and molecular imaging, *NMR in Biomedicine*, 19 (2006) 142-164.
- [57] J. A. Dagata, N. Farkas, C. L. Dennis, R. D. Shull, V. A. Hackley, C. Yang, K. F. Pirollo, E. H. Chang, Physical characterization methods for iron oxide contrast agents encapsulated within a targeted liposome based delivery system, *Nanotechnology*, 19 (2008).
- [58] M. Shinkai, Functional Magnetic Particles for medical application, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94 (2002) 606-613.
- [59] A. S. Gupta, G. Curtis, Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors, *Biomaterials*, 25 (2004) 3029–3040.
- [60] M. Babic, D. Horák, M. Trchová, P. Jendelová, K. Glogarová, P. Lesný, V. Herynek, M. Hájek, E. Syková, Poly(l-lysine)-Modified Iron Oxide Nanoparticles for Stem Cell Labeling, *Bioconjug Chem.* 19 (2008) 740-750.
- [61] L. E. Euliss, S. G. Grancharov, S. O'Brien, T. J. Deming, G. D. Stucky, C. B. Murray, G. A. Held, Cooperative Assembly of Magnetic Nanoparticles and Block Copolypeptides in Aqueous Media, *Nano Lett.* 3 (2003) 1489–1493.
- [62] MG. Harisinghani, J. Barentsz, PF. Hahn, WM. Deserno, S. Tabatabaei, CH. van de Kaa, J. Rosette, R. Weissleder, Noninvasive detection of clinically occult lymphnode metastases in prostate cancer, *N Engl J Med.* 348 (2003) 2491-2499.
- [63] A. Ito, M. Shinkai, H. Honda, T. Kobayashi, Medical applications of functionalized magnetic nanoparticles, *J Biosci Bioeng*, 100 (2005) 1-11.
- [64] S. Takemori, K. Tazana, H. Nagae, I. Yamashita, H. Kato, T. Kasagi, M. Maeda, T. Honda, M. Fujimaki, A study of DDS in hyperthermia: inductive heating with use of dextran magnetite (DM), *Drug Deliv. Syst.*, 6 (1991) 465-470.
- [65] A. Jordan, P. Wust, H. Fähling, W. John, A. Hinz, R. Felix, Inductive heating of ferromagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia, *Int. J. Hyperthermia*, 9 (1993) 51-68.
- [66] R. T. Gordon, J. R. Hines, D. Gordon, Intracellular hyperthermia: A biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations, *Med. Hypothesis*, 5 (1979) 83-102.
- [67] M. Shinkai, M. Matsui, T. Kobayashi, Heat properties of magnetoliposomes for local hyperthermia. *Jpn. J. Hyperthermic Oncol*, 10 (1994) 168-177.

- [68] M. Shinkai, M. Yanase, H. Honda, T. Wakabayashi, J. Yoshida, T. Kobayashi, Intracellular hyperthermia for cancer using cationic liposomes: *in vitro* study, *Jpn J Cancer Res*, 87 (1996) 1179-1183.
- [69] M. Yanase, M. Shinkai, H. Honda, T. Wakabayashi, J. Yoshida, T. Kobayashi, Intracellular hyperthermia for cancer using magnetic cationic liposomes: an *in vivo* study, *Jpn J Cancer Res.*, 89 (1998) 463-469.
- [70] I. Safarík, M.Safaríková, Magnetic nanoparticles and biosciences, *Monatshefte für Chemie*, 133 (2002) 737-759.
- [71] K. J. Widder, A. E. Senyei, Magnetic microspheres: a vehicle for selective targeting of drugs, *Pharmacol. Therap.*, 20 (1983) 377–395.
- [72] V. P. Torchilin, Drug targeting, *Eur J Pharm Sci*, 11 (2000) 81-91.
- [73] M. Suzuki, M. Shinkai, M. Yanase, A. Ito, H. Honda, T. Kobayashi, Enhancement of uptake or magnetoliposomes by magnetic force and hyperthermic effect on tumor, *Jpn. J. Hyperthermic Oncol.*, 15 (1999) 79-87.
- [74] U. Hafeli, W. Scutt, J. Teller, M. Zborowski, Scientific and Clinical Applications of magnetic carriers *Libraty of congress cataloging-in-publication data*, (1997).
- [75] E. Viroonchatapan, H. Sato, M. Ueno, I. adachi, K. Tazawa, I. Horikoshi, Release of 5-fluorouracil from thermosensitive magnetoliposomes induced by an electromagnetic field, *Journal or Controlled Release*, 46 (1997) 263-271
- [76] M. A. Dobrovolskaia, P. Aggarwal, J. B. Hall, S.E. McNeil, Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution, *Molecular Pharmaceutics* 5 (2008) 487–495.
- [77] C. Chouly, D. Pouliquen, I. Lucet, J. J. Jeune, P. Jallet, Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: Effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution, *Journal of Microencapsulation*, 13 (1996) 245–255.
- [78] P. Decuzzi, S. Lee, B. Bhushan, M. Ferrari, A theoretical model for the margination of particles within blood vessels, *Annals Of Biomedical Engineering*, 33 (2005) 179–190.
- [79] P. Decuzzi, F. Causa, M. Ferrari, P.A. Netti, The effective dispersion of nanovectors within the tumor microvasculature, *Annals Of Biomedical Engineering*, 34 (2006) 633–641.
- [80] S. M. Moghimi, Exploiting bone-marrow microvascular structure for drug-delivery and future therapies, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17 (1995) 61–73.
- [81] T. Banerjee, S. Mitra, A. K. Singh, R. K. Sharma, A. Maitra, Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 243 (2002) 93–105.

- [82] S. M. Moghimi, Mechanisms of splenic clearance of blood-cells and particles towards development of new splenotropic agents, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17 (1995) 103–115.
- [83] M. D. Chavanpatil, A. Khdair, J. Panyam, Nanoparticles for cellular drug delivery: Mechanisms and factors influencing delivery, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6 (2006) 2651–2663.
- [84] G. Sonavane, K. Tomoda, K. Makino, Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 66 (2008) 274–280.
- [85] Z. Liu, W. B. Cai, L. N. He, N. Nakayama, K. Chen, X. M. Sun, X. Y. Chen, H. J. Dai, In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice, *Nature Nanotechnology*, 2 (2007) 47–52.
- [86] J. M. Harris, R. B. Chess, Effect of pegylation on pharmaceuticals, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2 (2003) 214–221.
- [87] T. Owen, Fundamentals of UV-vis Spectroscopy, *Aligent Technologies*, (2000).
- [88] J. R. Albani, Principles and applications of fluorescence spectroscopy, *Blackwell*, (2007).
- [89] B. Valeur, Molecular Fluorescence: Principles and Applications, *Weinheim Wiley-VCH*, (2002).
- [90] M. Sauer, J. Hofkens, J. Enderlein, Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging, *Weinheim Wiley-VCH*, (2011)
- [91] F. A. Settle, Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry, *Prentice Hall PTR*, (1997)
- [92] U. Nobbmann, M. Connah, B. Fish, P. Varley, C. Gee, S. Mulot, J. Chen, L Zhou, Y. Lu, F. Shen, J. Yi, S. E. Harding, Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies, *Biotechnol Genet Eng Rev*, 24 (2007) 117-128.
- [93] Zetasizer nano series: User manual, *Malvern Instruments*, (2004)
- [94] B. Vouton, E. Stefanaki, Electron microscopy: The basics, *Physics of Advanced Materials Winter School*, (2008)
- [95] S. A. Macintyre, Magnetic field measurements, *CRC Press LLC*, (2000).
- [96] S. R. Meech, D. Phillips, Photophysics of some common fluorescence standards, *J. Photochem* 23 (1983) 193-217.
- [97] B. Seantier, C. Breffa, O. Felix, G. Decher, In situ investigations of the formation of mixed supported lipid bilayers close to the phase transition temperature, *Nano Letters*, 4 (2004) 5-10.

- [98] R. Hanpft, K. Mohr, Influence of cationic amphiphilic drugs on the phase-transition temperature of phospholipids with different polar headgroups, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 814 (1985) 156-162.
- [99] M. Jung, D. H. W. Hubert, E. van Veldhoven, P. M. Frederik, M. J. Blandamer, B. Briggs, P. M. Visser, A. M. van Herk, A. L. German, Interaction of Styrene with DODAB bilayer vesicles: influence on vesicle morphology and bilayer properties, *American Chemical Society, Langmuir*, 16 (2000) 968-979
- [100] W. Q. Sun, A. C. Leopold, L. M. Crowe, J. H. Crowe, Stability of Dry Liposomes in Sugar Glasses, *Biophysical Journal*, 70 (1996) 1769-1776.
- [101] M. Mera, M. E. Pesqueira, R. P. Hernández, J. A. Alatorre, Synthesis of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles without surfactants at room temperature, *Materials Letters*, 61 (2007) 4447-4451.
- [102] D. H. Chen, C. H. Hsieh, Synthesis of nickel nanoparticles in aqueous surfactant solutions, *J. Mater. Chem.* 12 (2002) 2412-2415.
- [103] N. Mahmed, O. Heczko, O. Söderberg, S. P. Hannula, Room Temperature Synthesis of Magnetite ($\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$) Nanoparticles by a Simple Reverse Co-Precipitation Method, *Materials Science and Engineering*, 18 (2011) 032020
- [104] S. Santra, R. Tapeç, N. Theodoropoulou, J. Dobson, A. Hebard, W. Tan, Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: The effect of nonionic surfactants, *Langmuir*, 17 (2001) 2900-2906.
- [105] D. H. Chen, S. H. Wu, Synthesis of nickel nanoparticles in water-in-oil microemulsions, *Chemistry of Materials*, 12 (2000) 1354-1360.
- [106] C. J. Meledandri, T. Ninjbadgar, D. F. Brougham, Size controlled magnetoliposomes with tunable magnetic resonance relaxation enhancements, *Journal of Materials Chemistry*, 21 (2011) 214.
- [107] Y. Tamba, H. Terashima, M. Yamazaki, A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles, *Chemistry and Physics of Lipids*, 164 (2011) 351-358.
- [108] 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, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 238 (2012) 71-80.
- [109] K. C. James, P. R. Noyce, Hydrogen bonding between testosterone propionate and solvent in chloroform-cyclohexane solutions, *Spectrochim. Acta A*, 27 (1971) 691-696.

- [110] C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, V. Monaco, C. Goulard, S. Rebuffat, B. Bodo, Effect of N^α -acyl chain length on the membrane-modifying properties of synthetic analogs of the lipopeptaibol trichogin GA IV, *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (1996) 4952-4958.
- [111] M. Crisma, A. Barazza, F. Formaggio, B. Kaptein, B. Q. Broxterman, J. Kamphuis, C. Toniolo, Peptaibolin: synthesis, 3D-structure, and membrane modifying properties of the natural antibiotic and selected analogues, *Tetrahedron* 57 (2001) 2813-2825.
- [112] C. J. Chen, H. I. Lai, C. C. Lin, J. S. Wang, R. K. Chiang, Preparation of Monodisperse Iron Oxide Nanoparticles via the Synthesis and Decomposition of Iron Fatty Acid Complexes, *Nanoscale Res Lett* 4 (2009) 1343-1350.
- [113] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. V. Elst, R. N. Muller, Magnetic iron oxide nanoparticles – synthesis, stabilization, vectorization and biological applications, *Chem Rev*, 108 (2008) 2064-2110.
- [114] Z. Li-Ying, D. Yong-Hua, Z. Ling, G. Hong-Chen, Magnetic behavior and heating effect of Fe_3O_4 ferrofluids composed of monodisperse nanoparticles, *Chinese Phys. Lett.* 24 (2010) 483.
- [115] G. Yuqing, Z. Yu, H. Shiyang, N. Fang, T. Gaojun, G. Ning, Fluorescence Modified Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles for High-Efficient Cellular Imaging, *Nanoscale Res Lett*, 4 (2009) 287-295.
- [116] P. Bi-Feng, G. Feng, A. Li-Mei, Investigation of interactions between dendrimer-coated magnetite nanoparticles and bovine serum albumin, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293 (2005) 252-258.
- [117] X. H. Peng, X. Qian, H. Mao, A. Y. Wang, Z. G. Chen, S. Nie, D. M. Shin, Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy, *Int J Nanomedicine*, 3 (2008) 311-321.