



Universidade do Minho
Escola de Ciências

André Vieira Ferreira Fernandes

Magnetolipossomas baseados em nanopartículas magnéticas de tipo flor para aplicação em terapia dual do cancro.





Universidade do Minho

Escola de Ciências

André Vieira Ferreira Fernandes

Magnetolipossomas baseados em nanopartículas magnéticas de tipo flor para aplicação em terapia dual do cancro

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biofísica e Bionanosistemas

Trabalho efetuado sob a orientação de

Professor Doutor Paulo José Gomes Coutinho e da
Doutora Ana Rita Oliveira Rodrigues

Julho de 2021

AGRADECIMENTOS

Ao longo do meu percurso académico, foram muitos aqueles que me apoiaram e incentivaram ao sucesso e aos quais devo um grande agradecimento.

Aos orientadores, Professor Doutor Paulo José Coutinho e em especial à Doutora Ana Rita Oliveira Rodrigues pela paciência, sabedoria e apoio prestado ao longo do trabalho.

Aos demais colegas de laboratório que nunca negaram ajuda em momentos de necessidade.

Aos meus pais e irmã pelas melhores condições que algum adolescente pode ter para triunfar no ensino superior.

Ao meu padrinho, Christian de Faria por ser um exemplo de determinação e um modelo de inspiração no dia a dia.

À Rafaela Malta por me ter dado o apoio sempre que necessário.

Ao Departamento/Centro de Física da universidade do Minho pela cedência do espaço, equipamentos e materiais fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

O meu sincero obrigado.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

RESUMO

O cancro representa uma luta constante na sua prevenção e um equilíbrio entre o bem estar do paciente e a toxicidade dos tratamentos, hoje, aplicados. As terapias convencionais carregam consigo uma enorme carga emocional, psicológica e física sem garantias de tratamento efetivo. Alternativas como o transporte direcionado de sistemas carregados com fármacos e terapias combinadas, como a combinação entre quimioterapia e hipertermia, têm levantado grande interesse na biomedicina.

Nesta tese, foram desenvolvidos magnetolipossomas sólidos (SMLs) para aplicação em terapia dual do cancro (quimioterapia e hipertermia). O seu desenvolvimento contempla a síntese de nanopartículas de ferrites de manganês ($MnFe_2O_4$) do tipo flor através da adição de polissacáridos, carboximetil-dextrano e melamina, definidas como A e B, respetivamente. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas estruturalmente através das técnicas de XRD e SEM e a caracterização magnética foi efetuada por SQUID. As nanopartículas em flor que apresentaram melhores propriedades magnéticas foram as sintetizadas através da adição de melamina, observando-se uma magnetização de saturação de 6,16 emu/g.

O composto usado neste trabalho é uma molécula fluorescente, um derivado de tienopiridina (JR-333) com propriedades antitumorais promissoras. Através de medidas de anisotropia de fluorescência, concluiu-se acerca da sua localização quando encapsulado em SMLs. A fusão entre os SMLs e os modelos de membranas celulares, corroborou a interação entre ambos.

Ademais, foi analisada a libertação do composto JR-333 em SMLs baseados nas nanopartículas B, na ausência e presença de um campo magnético externo. Verificou-se um ligeiro aumento da taxa de libertação quando aplicado o campo, revelando que estes sistemas são promissores para uma libertação controlada do composto JR-333.

ABSTRACT

Cancer represents a constant fight for its prevention and a balance between the patient's well-being and the toxicity of treatments. The current therapies are associated with enormous emotional, psychological, and physical challenges and do not assure an effective treatment. Alternatives such as transport of drug-loaded systems to target sites and combination therapies, as chemotherapy combined with hyperthermia, have gain great interest in biomedicine.

In this thesis, solid magnetoliposomes (SMLs) were developed for application in dual cancer therapy (chemotherapy and hyperthermia). Its development contemplates a synthesis of flower-like manganese ferrites (MnFe_2O_4) nanoparticles, through the addition of polysaccharides, carboxymethyl-dextran and melamine, defined as A and B, respectively. The obtained nanoparticles were structurally characterized using XRD and SEM techniques and the magnetic characterization was performed by SQUID. The best nanoparticles that matched magnetic properties with flower structure were the ones synthesized by melamine addition, presenting a saturation magnetization of 6.16 emu/g.

The compound used in this work is a fluorescent molecule, a thienopyridine-derived fluorescent drug (JR-333), with promising antitumor properties. The fluorescence anisotropy measurements allowed to conclude about its location when encapsulated into SMLs. The fusion between SMLs and cell membrane models corroborated an interaction between these two systems.

Furthermore, the release of the compound JR-333 from SMLs based on nanoparticles B, in the absence and presence of an external magnetic field, was evaluated. A slight increase in the release rate was observed in the presence of the magnetic field, indicating that this system is promising for a controlled release of compound JR-333.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	II
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS.....	XII
1. Introdução	1
1.1 O cancro	1
1.2 Nanotecnologia.....	2
1.3 Nanomedicina.....	4
1.4 Magnetolipossomas e as suas estruturas.....	5
1.4.1 Lipossomas	7
1.4.2 Nanopartículas	9
1.4.3 Composto ativo	12
1.4.4 Magnetolipossomas na terapia do cancro.....	13
2. Técnicas de análise.....	16
2.1 Radiação eletromagnética.....	16
2.2 Espectroscopia molecular	20
2.2.1 Espectroscopia de absorção UV-Visível.....	20
2.2.2 Espectroscopia de fluorescência	22
2.2.3 Rendimento quântico de fluorescência	25
2.3 Difusão Dinâmica de Luz (DLS).....	30
2.4 Microscopia eletrónica de varrimento (MEV).....	31
2.5 Dispositivo de interferência quântica supercondutora (SQUID).....	32
2.6 Difração de raios-X (XRD).....	32
3. Procedimento experimental.....	34
3.1 Síntese de nanopartículas de ferrite de manganês em forma de flor.....	34
3.1.1 Síntese com Carboximetil-dextrano.....	35
3.1.2 Síntese com Melamina.....	36
3.2 Síntese de Magnetolipossomas Sólidos	37
3.2.1 Prova de formação	38
3.2.2 Interação com modelos membranares (GUV's).....	39
3.3 Estudo fotofísico do composto em solução.....	40

3.3.1	Rendimento quântico de fluorescência	40
3.3.2	Estudo fotofísico do composto em vesículas lipídicas	40
3.3.3	Incorporação do composto ativo nos SML's	41
3.3.4	Medidas de anisotropia.....	41
3.3.5	Eficiência de encapsulamento do composto JR-333.....	41
3.4	Curvas de sedimentação.....	42
3.5	Ensaio de libertação do composto.....	42
3.6	Ensaio de hipertermia	43
4.	Resultados e discussão.....	45
4.1	Caracterização das nanopartículas de ferrite de manganês	45
4.1.1	Cinéticas de sedimentação das nanopartículas.....	45
4.1.2	Propriedades magnéticas.....	46
4.1.3	Caracterização por difração de Raios-X	50
4.1.4	Determinação de forma e tamanho por microscopia eletrônica de varrimento (MEV).....	51
4.2	Estudo fotofísico do composto JR-333 em vários solventes	53
4.3	Caracterização dos magnetolipossomas sólidos (SMLs)	56
4.3.1	Cinéticas de sedimentação dos magnetolipossomas sólidos	56
4.3.2	Prova de formação dos magnetolipossomas sólidos por FRET	57
4.3.3	Caracterização do tamanho e polidispersividade.....	59
4.4	Encapsulamento do composto JR-333.....	62
4.4.1	Estudo fotofísico do composto JR-333 em magnetolipossomas sólidos..	62
4.4.2	Eficiência de encapsulamento.....	64
4.5	Ensaio de fusão com modelos de membranas.....	64
4.6	Ensaio de libertação do composto.....	66
4.7	Ensaio de hipertermia	68
5.	Conclusão e perspectivas futuras	71
5.1	Conclusão	71
5.2	Perspectivas futuras	72
6.	Bibliografia	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Ilustração do processo de desenvolvimento de um tumor.	2
Figura 1.2 – Representação esquemática dos parâmetros essenciais na viabilização de veículos biológicos.	6
Figura 1.3 - Ilustração de um magnetolipossoma sólido (SML).....	7
Figura 1.4 – Esquema representativo da composição da camada lipídica do SML e dos seus constituintes (fosfolípidos).....	8
Figura 1.5 – Representação da estrutura química do lípido DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine).....	9
Figura 1.6 - Representação gráfica da estrutura spinel das ferrites.....	10
Figura 1.7 - Ilustração dos momentos magnéticos de nanopartículas magnéticas na presença e ausência de um campo magnético externo.	11
Figura 1.8 - Imagens TEM de nanopartículas de tipo flor. Imagem original de [38]. .	12
Figura 1.9 - Estrutura química do composto sintetizado JR-333 ($m=279,32$ g/mol). 13	
Figura 1.10 - Condução de magnetolipossomas através de um campo magnético e consequente libertação de fármaco antitumoral após o aumento da temperatura local. Imagem editada de [41].	14
Figura 2.1 - Representação esquemática da oscilação da radiação eletromagnética..	16
Figura 2.2 - Esquema representativo das transições entre estados eletrônicos.....	Erro!
Marcador não definido.	
Figura 2.3 - Transições eletrônicas entre orbitais moleculares.....	19
Figura 2.4 - Diagrama de absorção de um feixe de luz atravessando uma cuvette de percurso ótico d	21
Figura 2.5 - Representação esquemática dos componentes de um espectrofotómetro.	22
Figura 2.6 - Diagrama de níveis de energia com a representação dos processos radiativos e não radiativos (diagrama de Jablonski).....	23
Figura 2.7 - Representação gráfica do Desvio de Stokes.....	24
Figura 2.8 - Fotoseleção provocada por excitação com luz polarizada na direção z. 26	
Figura 2.9 - Ilustração da sobreposição dos espectros integrados entre o espectro de emissão do doador e da absorção do aceitante.	27
Figura 2.10 - Representação esquemática de um espectrofluorímetro.....	29
Figura 2.11 - Representação do ângulo entre o segundo monocromador e o detetor num espectrofluorímetro.....	29

Figura 2.12 - Ilustração da difusão dinâmica da luz em duas amostras.	31
Figura 3.1 - Esquema representativo do processo de síntese das nanopartículas em forma de flor com Carboximetil-dextrano.	35
Figura 3.2 - Esquema representativo do processo de síntese das nanopartículas em forma de flor com Melamina.	37
Figura 3.3 - Estrutura química da proflavina.	38
Figura 3.4 - Estrutura química do Nile Red.	38
Figura 4.1 - Espectros de absorvância das NPs A1, A2 e B.	45
Figura 4.2 - Demonstração do comportamento superparamagnético das nanopartículas através da aplicação de um ímã.	47
Figura 4.3 - Curva de histerese das nanopartículas manganês tipo flor A1, A2 e B, à temperatura ambiente. Inserido: Ampliação da zona de baixo campo das curvas de histerese.	48
Figura 4.4 - Difratoograma de XRD de nanopartículas de ferrites de manganês.	50
Figura 4.5 - Imagens obtidas das ferrites de manganês por TEM (1) e imagens MEV das nanopartículas das amostras A1, A2 e B.	52
Figura 4.6 - Imagens MEV da amostra B com diferentes ampliações. A: Identificação manual de várias estruturas em flor e correspondente histograma de tamanhos ajustado à soma de duas Gaussianas. B: Identificação e ampliação de uma estrutura em flor.	53
Figura 4.7 - Espectros de fluorescência normalizados do composto JR-333 ($0,5 \times 10^{-5}$ M) ($\lambda_{exc} = 300$ nm), nos vários solventes. Inserido: Espectros de absorção do composto ($0,5 \times 10^{-5}$ M) em etanol e clorofórmio.	54
Figura 4.8 - Gráfico comparativo dos rendimentos quânticos de fluorescência do composto JR-333 nos vários solventes.	56
Figura 4.9 - Espectros de fluorescência ($\lambda_{exc} = 380$ nm) dos SMLs contendo apenas proflavina ($0,5 \times 10^{-5}$ M), apenas Nile Red ($0,5 \times 10^{-5}$ M) e contendo ambas as sondas.	58
Figura 4.10 - Representação gráfica da distribuição de tamanhos pela intensidade dos SMLs A2.	61
Figura 4.11 - Correlograma da distribuição de tamanhos obtidos para os SMLs baseados nas nanopartículas A2.	61
Figura 4.12 - Imagens MEV de SMLs baseados nas nanopartículas A2.	62

Figura 4.13 - Espectro de emissão de fluorescência do composto JR-333 em SMLs contendo NPs B ($\lambda_{exc} = 300$ nm), à temperatura ambiente (25 °C) e acima da temperatura de transição de fase (55 °C) e do composto JR-333 em etanol.	64
Figura 4.14 - Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 380$ nm) dos SMLs baseados nas nanopartículas A2 com ambas as sondas encapsuladas, antes e depois da fusão com GUVs.	65
Figura 4.15 - Representação da libertação do composto JR-333 ($0,5 \times 10^{-5}$ M) em SMLs com e sem exposição a campo magnético, ao longo do tempo.	66
Figura 4.16 - Perfil de libertação do composto JR-333 encapsulado nos SMLs na presença e ausência de campo magnético aplicado, ajustado ao modelo de Weibull.	67
Figura 4.17 - Variação da temperatura das nanopartículas B, na presença de campos magnéticos alternados de amplitude 17 mT com frequências de 161 kHz e 270 kHz e 16 mT com frequência de 381 kHz.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Valores de GI_{50} (μ M) do composto JR-333 em quatro linhas celulares tumorais. Estes correspondem à média \pm SD de pelo menos três experiências independentes.	13
Tabela 3.1 - Comprimentos de onda de excitação e de emissão sondas proflavina e Nile red.	38
Tabela 4.1 - Taxas de sedimentação (k) calculadas pela função de Becquerel para as nanopartículas A1, A2 e B.	46
Tabela 4.2 - Valores de coercividade, magnetização de remanência, magnetização de saturação e razão entre magnetização de remanência e magnetização de saturação (M_r/M_s), obtidos a partir de curvas de histerese, para as várias nanopartículas.	49
Tabela 4.3 - Parâmetros de Rietveld de análise selecionados.	51
Tabela 4.4 - Comprimento de onda de absorção máximo (λ_{abs}) e coeficiente de absorção molar (ϵ), comprimento de emissão (λ_{em}) e rendimento quântico de fluorescência do composto JR-333 em diferentes solventes.	55
Tabela 4.5 - Taxa de sedimentação (k) calculada pela função de Becquerel dos magnetolipossomas sólidos.	56

Tabela 4.6 - Parâmetros da Transferência de energia de Förster: eficiência de FRET (ϕ_{FRET}), raio de Förster (R_0) e distância doador-aceitante (r) obtidos para os ensaios de SMLs.	59
Tabela 4.7 – Valores médios e desvio padrão de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta dos magnetolipossomas sólidos baseados em nanopartículas de manganês de estrutura em flor, obtidos por DLS.	60
Tabela 4.8 - Valores de anisotropia de fluorescência (r) para o composto JR-333 em SMLs abaixo e acima da temperatura de transição de fase do lípido. O valor de anisotropia de fluorescência do composto em glicerol, à temperatura ambiente, é demonstrado para efeitos de comparação.....	63
Tabela 4.9 – Parâmetros obtidos pelos ajustes dos modelos Korsmeyer-Peppas e Weibull, e respectivo coeficiente de determinação (R^2), aos ensaios de liberação do composto JR-333 encapsulado em SMLs, na presença e ausência de um campo magnético aplicado.....	67
Tabela 4.10 - Valores de SAR e ILP, obtidos a partir das curvas de aquecimento e arrefecimento das nanopartículas B.....	69

LISTA DE ACRÓNIMOS E SIGLAS

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

CDI - N,N'-carbonildiimidazol

CQ-UM – Centro de Química da Universidade do Minho

DPPC – 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DLS – Difusão Dinâmica da Luz (*do inglês, Dynamic Light Scattering*)

DMSO - Sulfóxido de dimetilo

FRET – Transferência de Energia de Förster (*do inglês, Förster Resonance Energy Transfer*)

GI₅₀ – Concentração que inibe 50% de crescimento celular

GUVs – Vesículas Unilamelares Gigantes (*do inglês, Giant Unilamellar Vesicles*)

HOMO – Orbital Molecular de Maior Energia Ocupada (*do inglês, Highest Occupied Molecular Orbital*)

IFMUP - Instituto de Física de Materiais Avançados, Nanotecnologia e Fotónica da Universidade do Porto

LUMO – Orbital Molecular de Menor Energia Ocupada (*do inglês, Lowest Unoccupied Molecular Orbital*)

LUVs – Vesículas Unilamelares Grandes (*do inglês, Large Unilamellar Vesicles*)

MEV – Microscopia Eletrónica de Varrimento

MCF-7 – Adenocarcinoma da mama

MCNPs –Multicore nanoparticles

MLs - Magnetolipossomas

MNPs – Nanopartículas magnéticas

M_r - Magnetização remanescente

M_s - Magnetização de saturação

NPs - Nanopartículas

ODA – Octadecilamina

PEG – Polietilenoglicol

SAR – Taxa de absorção específica

SMLs – Magnetolipossomas sólidos

SUVs – Vesículas Unilamelares Pequenas (*do inglês, Small Unilamellar Vesicles*)

SQUID – Dispositivo Supercondutor de Interferência Quântica (*do inglês, Superconducting Quantum Interference Device*)

TEM – Microscópio Eletrônico de Transmissão (*do inglês, Transmission Electronic Microscopy*)

T_m – Temperatura de transição

XRD – Difração de Raio-X (*do inglês, X-ray diffraction*)

1. Introdução

1.1 O cancro

Segundo a Agência Internacional de Investigação do cancro, em 2018 houve 18,1 milhões de novos casos cancro e quase 10 milhões de mortes relacionadas com a doença. Estima-se que uma em cada 6 mortes é devida ao cancro (1). A realidade desta doença e o peso da mesma no dia-a-dia da sociedade podem ser alteradas com a sua prevenção precoce e tratamento mais eficaz, através da nanomedicina.

A formação de um tumor envolve tanto o crescimento celular descontrolado como também a desregulação de diversos processos fisiológicos. Um tecido normal consegue manter um equilíbrio entre a divisão e a morte celular, o que possibilita a manutenção da função do tecido. Nos tumores este equilíbrio não se verifica, o que impede a regulação dos mecanismos de controlo e faz com que a sua proliferação seja exacerbada e a morte celular reduzida (2). Este fenómeno pode afetar qualquer parte do corpo e, muitas vezes, o crescimento descontrolado das células invade os tecidos circundantes, metastizando para locais mais distantes (3). A metastização é um dos grandes obstáculos da terapia cancerígena. Em muitos casos, o diagnóstico da doença peca por tardio, com várias metástases identificadas no organismo. Nesta realidade, os tratamentos são ainda mais limitados e a cirurgia é uma opção rara. A esperança do paciente é gravemente afetada pelas estatísticas que indicam que, para todos os tipos de cancro, apenas um em cada cinco paciente com metástases, sobrevive mais do que cinco anos (4).

O desenvolvimento de tumores está associado não só a fatores individuais, como a idade, o sexo e a herança genética, mas também a fatores comportamentais e ambientais (5). Dentro dos fatores ambientais, destacam-se a poluição e a exposição à radiação ultravioleta (UV). A primeira engloba agentes carcinogénicos químicos, que aumentam a probabilidade de desenvolvimento de cancro à medida que passam os anos de exposição (por exemplo, produtos resultantes da combustão dos combustíveis), enquanto a segunda pertence a um conjunto de radiações prejudiciais para o ser humano. Tanto as radiações UV como os raios X constituem fontes para a lesão direta do genoma, originando mutações (figura 1.1), ou inibição das defesas que podem levar à formação de tumores (6).

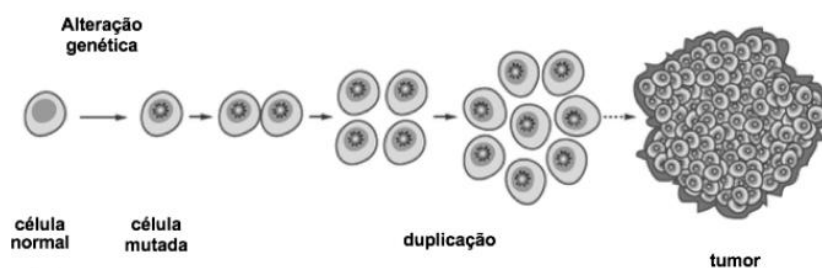


Figura 1.1 - Ilustração do processo de desenvolvimento de um tumor.

A terapêutica convencional para o tratamento do cancro baseia-se essencialmente na remoção do tumor ou na sua destruição, incluindo técnicas como cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A cirurgia é aconselhada quando o tumor está confinado num local e não se encontrando disseminado. A radioterapia é uma técnica terapêutica usada principalmente quando o tumor já se encontra localmente infiltrado e baseia-se na irradiação com raios X ou gama no tumor. A quimioterapia é utilizada quando o tumor já se encontra disseminado e os fármacos utilizados têm como função impedir a divisão celular. Tanto a radioterapia como a quimioterapia atingem não só células cancerígenas, mas também as restantes células saudáveis (7,8). Além disso, os métodos convencionais apresentam eficácia limitada, altos níveis de citotoxicidade e vários efeitos secundários indesejados. Ademais, a natureza da patologia implica hipóteses elevadas de reincidência, estando associada a tumores mais agressivos e resistentes à terapêutica (9,10). A escolha do tratamento vai depender do local no organismo onde a doença está presente, da fase evolutiva da mesma e do grau do tumor.

A terapia dual do cancro é o objetivo da aplicação dos nanosistemas desenvolvidos nesta tese, e foca-se tanto na quimioterapia, através do transporte de um novo composto antitumoral, JR-333, ao local de interesse como na hipertermia magnética possibilitada pelas características magnéticas dos nanotransportadores.

1.2 Nanotecnologia

A nanotecnologia combina a ciência com a engenharia, no desenvolvimento, caracterização e aplicação de materiais e estruturas em dimensões na ordem dos nanómetros, com dimensões muito próximas do tamanho subcelular (1- 1000nm) [11- 13]. Numa perspetiva medicinal e fisiológica, os materiais ou as estruturas, são sintetizadas com o intuito de interagir com os tecidos celulares,

permitindo a conexão da tecnologia com as infraestruturas biológicas, outrora inalcançáveis. Os materiais e consequentes sistemas desenvolvidos na área da nanotecnologia podem ter aplicações em áreas como a medicina e a fisiologia. As suas dimensões possibilitam interações ao nível celular e/ou subcelular com elevada especificidade (13).

Ao nível da nanomedicina, o desenvolvimento da nanotecnologia pode significar um grande avanço numa panóplia de aplicações terapêuticas. Entre os produtos nanotecnológicos clinicamente aprovados, os conjugados de lipossomas com fármacos são uma classe dominante. Estes produtos impulsionam a eficácia dos compostos terapêuticos, permitem diminuir as dosagens utilizadas, em alguns casos, aumentar o tempo de vida de circulação (14).

Através da nanotecnologia, existe um leque de estratégias que podem ser abordadas, tais como (14):

- Transporte à escala molecular, através de:
 - Melhoria no transporte de fármacos pouco solúveis em água;
 - Transporte direcionado de fármacos para células ou tecidos específicos;
 - Entrega de fármacos até locais de ação intracelulares;
 - Co-entrega de dois ou mais fármacos para terapia combinada;
- Transcitose (mecanismos de transporte molecular como a endocitose e exocitose) de fármacos através de barreiras epiteliais e endoteliais estreitas;
- Teranóstica através da agregação da capacidade terapêutica dos sistemas com a visualização dos locais alvo destes, em imagiologia;
- Observação em tempo real da eficácia *in vivo* do agente terapêutico.

Sistemas baseados em nanopartículas magnéticas podem ser aplicados na biomedicina e mudar o panorama atual nesta área. As suas propriedades oferecem vantagens sobre os métodos terapêuticos moleculares convencionais na interação e transporte biológico (15). Sistemas baseados em nanopartículas magnéticas são constantemente documentados e enaltecidos como ferramentas promissoras na imagiologia e no transporte direcionado de fármacos. No que diz respeito à entrega controlada de fármacos, estes nanosistemas potenciam a ação terapêutica dos mesmos através da sua libertação localizada nos tecidos alvo, evitando ações enzimáticas do meio para com o composto ativo. Quando inserido no organismo, a proteção química e

física do sistema à resposta imunológica aumentam a viabilidade do sistema em circulação (16). A versatilidade das modificações possíveis neste tipo de nanopartículas permite a elaboração de estruturas multifuncionais que, depois de produzidas, mantêm a solubilidade e as propriedades coloidais determinantes para a sua aplicação em ambientes orgânicos complexos. A produção destas nanopartículas, em laboratório, é possível com variações na sua composição, revestimento da superfície e nas formas de funcionalização (15).

Na área da aplicação de nanotecnologia com propósitos terapêuticos os sistemas consequentes da mesma podem ser agrupados em quatro grupos: transportadores virais, compostos orgânicos catiónicos, proteínas recombinantes e nanopartículas inorgânicas (16). O tema desta tese foca-se em sistemas lipídicos baseados em nanopartículas inorgânicas (magnetolipossomas).

1.3 Nanomedicina

A Nanomedicina engloba o estudo de abordagens de base nanotecnológica para aplicação na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças. Para tal, esta ciência foca-se no conhecimento e perceção dos processos fisiopatológicos. Nesta área, o grande objetivo é a manipulação de nanomateriais de modo a obter nanoestruturas com a mesma dimensão de biomoléculas para a interação com tecidos humanos evitando as barreiras imunológicas (17). Estes nanomateriais superam a medicina convencional, devido ao grande potencial na condução preferencial de uma ou várias substâncias ativas a locais de interesse ultrapassando o problema da falta de seletividade das terapêuticas atuais. Outras vantagens incluem a combinação de fármacos no ataque a células cancerígenas, a visualização de tumores através de técnicas inovadoras, o aumento do tempo de circulação do fármaco no organismo e a libertação controlada do composto antitumoral (18). Os lipossomas, são um exemplo da aplicação da nanotecnologia, como nanovetores injetáveis para o tratamento de cancro da mama metastático através de nanopartículas proteicas que contêm *paclitaxel*, tendo sido demonstrado a catalisação da inserção do fármaco (4,11,19).

Quando se consideram nanosistemas para transporte de fármacos, existem vários aspetos a considerar. De acordo com a sua aplicação terapêutica, o nanoproducto em desenvolvimento deve ser otimizado tendo em conta a dosagem provável, a via de administração e frequência de administração (17).

A utilização de lipossomas ativos, carregados com ferrites magnéticas superparamagnéticas, podem ser guiada através de campos magnéticos externos, aos locais de interesse terapêutico numa tentativa de combater o cancro e a sua metastização (20,21).

1.4 Magnetolipossomas e as suas estruturas

Em 1960, foi estudada pela primeira vez a agregação controlada dos lipossomas e proposto em 1970 como potenciais sistemas transportadores de fármacos (22). A interação de moléculas lipídicas anfifílicas com as moléculas de água provoca um fenómeno de auto organização, originado pelas forças hidrofóbicas que obrigam à segregação das caudas hidrofóbicas (23,24). Na interface água-lípido são estabelecidas pontes de hidrogénio entre as moléculas da água e os grupos fosfato e carbono das moléculas lipídicas. Este mecanismo é dependente da estrutura química do lípido e do pH e força iónica do meio inserido. O contacto na interface faz com que as moléculas de água alinhem de acordo com o campo elétrico formado pelos grupos da cabeça polar dos lípidos. Mesmo em lípidos zwitteriónicos, com carga neutra, observa-se tal fenómeno onde as moléculas do meio encontram-se orientadas com os seus átomos de hidrogénio direcionados para as cadeias alcalinas do lípido. A partir deste fenómeno de auto organização, simples, intuitivo e de baixo custo energético que tira partido de ligações fracas como as de hidrogénio e forças de van der Waals, são desenvolvidos sistemas lipídicos com controlo no tamanho, forma e função para o transporte direcionado de compostos ativos (23,25,26).

Os magnetolipossomas (MLs), por sua vez, foram introduzidos em 1988, e a partir daí têm sido alvo de grande estudo para várias aplicações. Estes resultam do encapsulamento de nanopartículas magnéticas em lipossomas (27). Estas estruturas, são bastante promissoras pois conseguem preservar as propriedades das estruturas encapsuladas, nomeadamente o magnetismo das nanopartículas (27).

Veículos biológicos como os MLs devem albergar certos parâmetros que viabilizem a sua aplicação (14). Estes encontram-se representados em esquema para melhor compreensão (figura 1.2).

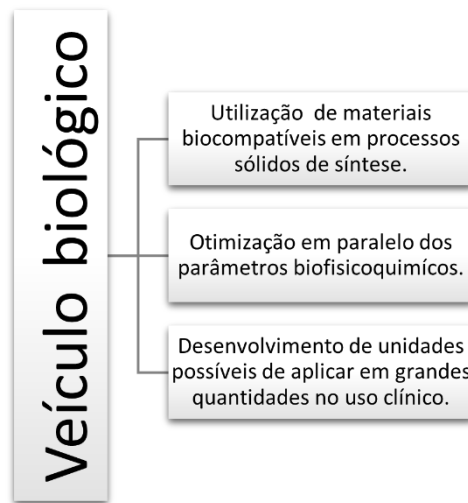


Figura 1.2 – Representação esquemática dos parâmetros essenciais na viabilização de veículos biológicos.

O transporte de fármacos mediado por lipossomas é um método biomédico promissor visto que possibilita a entrega controlada de fármaco num determinado tecido ou células através de perturbação da camada lipídica, que podem ser estimuladas externamente (28). Os benefícios destes nanotransportadores são vários, tais como:

- Encapsulamento estável e eficiente de fármacos;
- Solubilização de fármacos;
- Proteção dos fármacos contra a degradação;
- Aumento da biocompatibilidade;
- Flexibilidade em composição e tamanho;
- Circulação prolongada *in vivo*.

Para uma melhor eficácia no transporte de fármacos, no que diz respeito ao tamanho, os lipossomas podem ser divididos em: pequenos (20-50 nm), grandes (50-100 nm) ou gigantes (10-100 μm) onde são abreviadas por SUVs (do inglês, *small unilamellar vesicles*), LUVs (do inglês, *large unilamellar vesicles*) e GUVs (do inglês, *giant unilamellar vesicles*), respetivamente (29). Os constituintes dos lipossomas enfrentam o desafio de manutenção das suas características físico químicas, em

circulação, excetuando no momento de libertação do fármaco. Para tal, podem ser usados lípidos cuja composição permite variações na permeabilidade da membrana, em função de estímulos externos como temperatura e/ou pH (22).

Uma vez no organismo, os MLs podem ser conduzidos até ao local de interesse através da interação física de um gradiente de campo magnético externo e o cluster de nanopartículas (NPs) encapsulado no sistema lipídico. Assim, o transporte de fármacos (encapsulados nos MLs) até ao local de interesse, sob ação de um campo magnético, é uma abordagem terapêutica de elevado potencial como estratégia de combate a doenças como o cancro (16). Além disto, na presença de um campo magnético alternado as NPs podem gerar calor e provocar um aumento local da temperatura, originando o fenómeno de hipertermia, que culmina no sobre aquecimento dos tecidos e células (28).

Neste trabalho, foram sintetizados magnetolipossomas do tipo sólido (SMLs). Este tipo de estrutura consiste num cluster de nanopartículas de ferrite de manganês de tipo flor rodeado de uma bicamada lipídica (figura 1.3). Espera-se que esta ofereça melhores resultados em processos de transporte molecular mediado por magnetismo e no fenómeno de hipertermia ligado às características das NPs nele inserido. Estes pontos influenciaram a escolha do tipo de MLs sintetizados pois não só preservam como potenciam as características das NPs utilizadas.

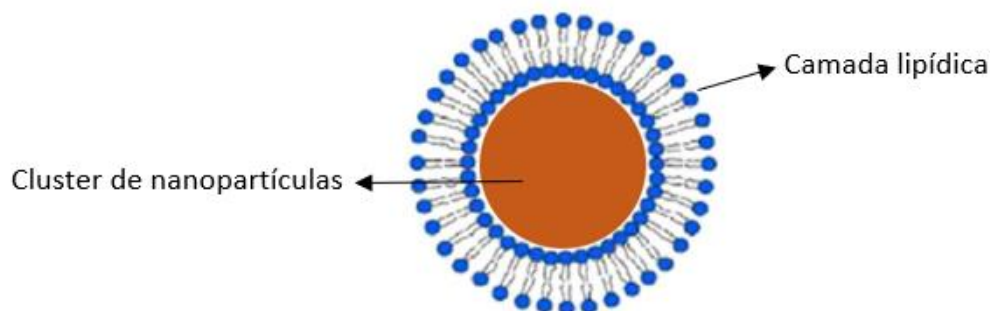


Figura 1.3 - Ilustração de um magnetolipossoma sólido (SML).

1.4.1 Lipossomas

Foi em 1965 que se deu o primeiro passo no estudo da aplicação de lipossomas como transportadores biológicos de compostos. Bangham A., verificou que a formação de bicamadas constituídas por moléculas anfifílicas, em água, era um fenómeno

espontâneo e a utilização destes sistemas para encapsular fármacos começou a receber mais atenção por parte da comunidade científica (30).

As bicamadas lipídicas que compõem as membranas biológicas baseiam-se em inúmeras moléculas lipídicas anfifílicas que se auto-organizam devido a ligações hidrofóbicas e fenômenos eletrostáticos (29). As moléculas podem ser agrupadas pela sua estrutura química em fosfolípidos, esfingolípidos e colesterol. Destes, os fosfolípidos subagrupam-se ainda em fosfatidilcolina, fosfatidiletamina e fosfatidilserina, dependendo do tipo de grupos hidrofílicos da cabeça polar (29,30).

Os fosfolípidos são moléculas constituídas por cabeça hidrofílica e cauda hidrofóbica (figura 1.4) (30).

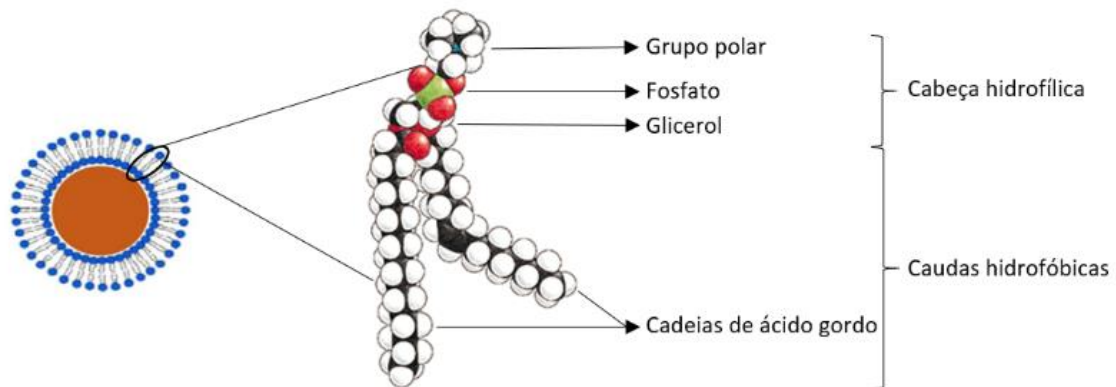


Figura 1.4 – Esquema representativo da composição da camada lipídica do SML e dos seus constituintes (fosfolípidos).

A cabeça do fosfolípido pode ser distinguida de acordo com a sua carga como catiónica, aniónica ou neutra. Moléculas lipídicas que possuem a cabeça com carga positiva permitem uma melhor ligação com as membranas celulares carregadas negativamente e conseqüentemente uma taxa de incorporação celular mais efetiva.

As características físico-químicas dos fosfolípidos são de extrema importância nos mecanismos de libertação. Além da densidade de carga, a fluidez da membrana e permeabilidade são determinantes na interação com os tecidos alvo após a aplicação na corrente sistémica (24).

Dada a biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade dos lípidos, os lipossomas possuem os parâmetros ideais de um ótimo nanotransportador biológico (31). Estes são formados por moléculas anfifílicas

lipídicas naturais (fosfolípidos) ou sintéticas e podem ainda fazer parte deles constituintes como colesterol e polímeros hidrofílicos (24).

Os lipossomas podem reagir a diferentes estímulos, como temperatura, sofrendo alterações na permeabilidade e mobilidade da sua bicamada lipídica. Uma membrana lipídica pode ter duas fases: líquida e gel. A primeira caracteriza-se pela cadeia lipídica numa fase líquida cristalina com grande mobilidade lateral, enquanto que, na segunda, acontece o oposto resultando numa membrana rígida, viscosa e organizada (22,25). Pode-se definir a temperatura que separa estes dois estados físicos como temperatura de transição (T_m). Lipossomas sensíveis à temperatura são caracterizados por ter uma T_m acima da temperatura corporal. Aqueles que possuem o T_m a valores próximos desta temperatura não conseguem manter a estrutura estável até ao local de ação. Desta maneira, a escolha dos lípidos para a composição da bicamada lipídica é de extrema importância na aplicação de nanotransportadores no organismo. Além disto, é preciso ter em conta que o encapsulamento de compostos no sistema lipídico pode provocar mudanças estruturais e alterar o ponto de transição de fase (32,33).

Neste trabalho, o lípido selecionado para a síntese dos SMLs foi o DPPC (*1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), um lípido zwitteriônico, com a fórmula química $C_{40}H_{80}NO_8P$, abaixo representado na figura 1.5. Este lípido apresenta uma T_m para uma bicamada lipídica de 41°C (33).

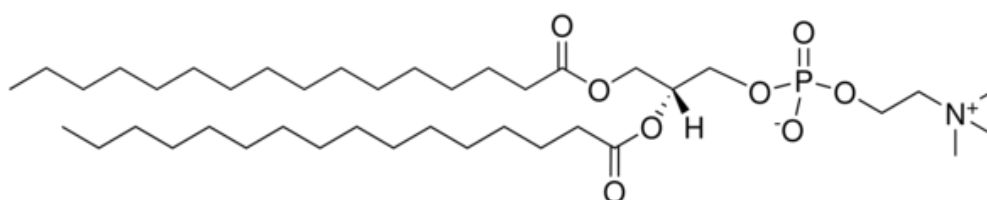


Figura 1.5 – Representação da estrutura química do lípido DPPC (*1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*).

1.4.2 Nanopartículas

Para a aplicação biológica, às nanopartículas a encapsular nos magnetolipossomas são exigidas características que proporcionem efetividade ao sistema quando aplicado. Desta maneira, a estabilidade química e a biocompatibilidade das NPs são fundamentais na sua viabilidade enquanto parte integrante de um veículo

biológico, assim como as características físicas dependentes do tamanho, como o grande rácio de superfície face ao volume e o confinamento bem como propriedades magnéticas adequadas. Assim, as nano ferrites magnéticas são boas candidatas. Este tipo de ferrites magnéticas de metais de transição (MFe_2O_4 , $M = Mn, Co, Ni, etc.$) possuem tipicamente estrutura em espinela (20,21,34), conforme apresentado na figura 1.6. Estes materiais apresentam uma estrutura geral do tipo AB_2O_4 , onde A e B representam os sítios de catiões tetraédricos e octaédricos respetivamente, e O o local do anião oxigénio (20,21,34) (figura 1.6).

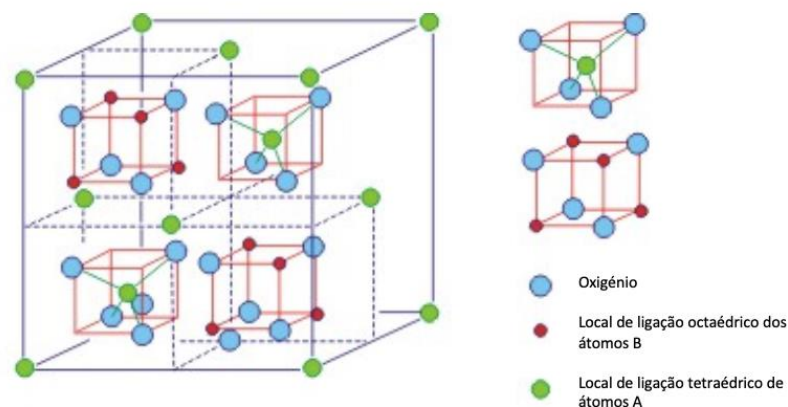


Figura 1.6 - Representação gráfica da estrutura spinel das ferrites.

Na aplicação dos magnetolipossomas enquanto nanotransportadores de fármacos com capacidade de direcionamento, as NPs são de extrema importância pois são elas as responsáveis pela condução magnética dos magnetolipossomas em circulação.

O movimento de eletrões à escala microscópica define as propriedades magnéticas, convergindo num dipolo magnético. O domínio magnético de um material ferromagnético consiste numa região em que todos os momentos magnéticos se encontram alinhados numa mesma direção. A estrutura e a dimensão destes é determinante no seu comportamento magnético em que, é estabelecido um valor crítico, abaixo do qual, passa a ser mais favorável exibir apenas um domínio no momento magnético (10,35).

As nanopartículas de ferrite de manganês utilizadas neste projeto, são materiais com comportamento superparamagnético. Ou seja, através da aplicação de um campo magnético, os momentos magnéticos das partículas interagem com este e com as

partículas vizinhas de maneira a ficarem alinhadas com o campo magnético aplicado (10,36,37), dando origem a uma elevada magnetização. No entanto, devido ao seu carácter superparamagnético, quando o campo externo é removido as partículas perdem toda a sua magnetização (figura 1.7). Esta particularidade permite que as nanopartículas magnéticas mantenham uma boa estabilidade coloidal e evitem a aglomeração, características essenciais para aplicações biomédicas (36,37).

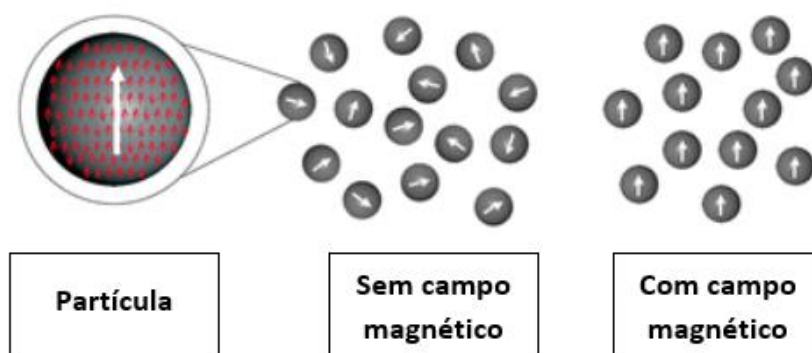


Figura 1.7 - Ilustração dos momentos magnéticos de nanopartículas magnéticas na presença e ausência de um campo magnético externo.

As ferrites de manganês já demonstraram importância em várias aplicações magnéticas como imagiologia, biossensores e transporte de fármacos. A sua alta suscetibilidade magnética, biocompatibilidade e toxicidade baixa fazem das ferrites de manganês uma escolha apropriada para a aplicação no direcionamento magnético de fármacos (20,34).

Neste projeto, foram preparadas nanopartículas de manganês com estrutura em multi-núcleo (MCNPs, do inglês *multicore nanoparticles*), tipo “flor”. As dimensões típicas das partículas constituintes das MCNPs rondam os 10 nm, formando agregados de 20 a 80 nm (figura 1.8). Isto traduz-se numa magnetização fraca (mais baixa que a das partículas que constituem o agregado) e numa consequente baixa tendência para formar aglomerados de maiores dimensões, uma característica importante para aplicações médicas. Este tipo de nanopartículas têm sido especialmente usadas em aplicações baseadas em atração magnética, sejam elas biosseparação ou direcionamento de fármacos, e em perdas de energia magnética como na hipertermia. Para uma melhor eficácia na entrega direcionada de fármacos, a área de superfície dos magnetolipossomas pode ser funcionalizada (como por exemplo, magnetolipossomas

marcados com PEG), que aliado à capacidade de direcionamento magnético das partículas, permite uma maior resistência à opsonização. Estas partículas exibem o seu potencial máximo na hipertermia, existindo estudos que o corroboram, demonstrando que a geração de calor das MCNPs é adequada para a terapia hipertérmica baseada na aplicação de campos magnéticos (38). Quando exposto a um AMF (do inglês *alternating magnetic field*) as interações entre as partículas do núcleo conferem um fenómeno de histerese essencial na formação e manutenção de calor, contudo demonstram uma remanescência muito baixa num campo zero, devido à orientação aleatória dos momentos magnéticos.

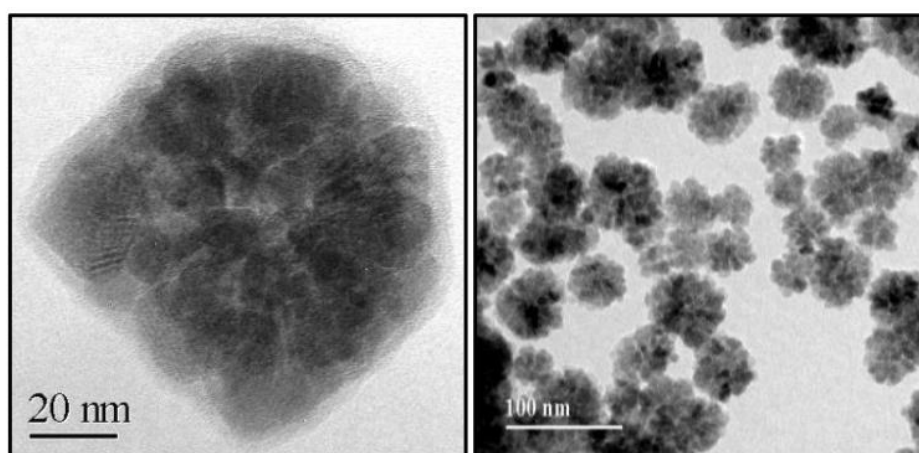


Figura 1.8 - Imagens TEM de nanopartículas de tipo flor. Imagem original de [38].

1.4.3 Composto ativo

A par da evolução da nanotecnologia, têm surgido esforços na indústria farmacêutica na procura e desenvolvimento de vários compostos promissores no tratamento de muitas doenças.

O composto utilizado nesta tese resultou de um trabalho de investigação do Centro de Química da Universidade do Minho (CQ/UM) que incluiu a síntese e estudo do potencial antitumoral de várias moléculas ureia derivada de tienopiridinas. Os derivados de tienopiridinas são moléculas biologicamente ativas de bastante interesse, uma vez que possuem diferentes potencialidades biológicas, como antiangiogénicas e/ou antitumorais (39,40). Dos vários compostos deste estudo, foi selecionado o que apresentou melhores valores de inibição de crescimento em 50% (GI₅₀) em quatro linhas celulares tumorais, HeLa (carcinoma cervical), MCF-7 (adenocarcinoma da

mama), NCI-H460 (células de carcinoma do pulmão), HepG2 (carcinoma hepatocelular) e numa linha não tumoral, PLP2 (células primárias de fígado de porco) (tabela 1.1) (40). O composto selecionado para este projeto foi batizado de JR-333 (figura 1.9) e tem um peso molecular de 279,32 g/mol.

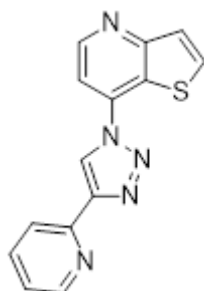


Figura 1.9 - Estrutura química do composto sintetizado JR-333 ($m=279,32$ g/mol) [40].

Este, através dos estudos de atividade anticancerígena, foi dos que apresentou melhores valores de GI_{50} em quatro linhas celulares tumorais, HeLa (carcinoma cervical), MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (células de carcinoma do pulmão), HepG2 (carcinoma hepatocelular) e mostrou menor toxicidade numa linha não tumoral, PLP2 (células primárias de fígado de porco) (tabela 1.1) (40).

Tabela 1.1 - Valores de GI_{50} (μM) do composto JR-333 em quatro linhas celulares tumorais. Estes correspondem à média \pm SD de pelo menos três experiências independentes.

HeLa	MCF-7	NCI-H460	HepG2	PLP2
12.99 ± 0.58	15.13 ± 0.59	12.60 ± 0.8	7.51 ± 0.48	91.94 ± 5.23

1.4.4 Magnetolipossomas na terapia do cancro

O encapsulamento de nanopartículas magnéticas com estrutura em flor em lipossomas tem elevado potencial para aplicação terapêutica no cancro. Devido à sua composição, estes magnetolipossomas podem ser usados numa abordagem de terapia dual, através da entrega controlada de fármacos e, simultaneamente, hipertermia magnética. Nesta abordagem, em primeiro lugar os magnetolipossomas são

conduzidos por um gradiente de campo magnético, sendo atraídos para o local terapêutico alvo. De seguida, através da aplicação de um AMF, há um aquecimento local que por um lado faz com que temperatura de transição dos lípidos seja atingida, ocorrendo a libertação dos fármacos no local desejado. Por outro lado, ocorre o sobreaquecimento das células tumorais (figura 1.10), que sendo mais sensíveis ao aumento da temperatura do que as restantes células saudáveis são atacadas de forma seletiva (36). A eficiência das várias nanopartículas magnéticas em aplicações de transporte de fármacos e hipertermia depende do seu comportamento quando inseridas no organismo e este é dependente de propriedades como o tamanho médio, anisotropia magnética (forma) e saturação magnética, e também a amplitude e frequência do AMF.

A hipertermia magnética baseia-se na interação entre um campo AMF e as nanopartículas. Os fenómenos de produção de calor ocorrem devido a perdas de histerese, relaxamento de Néel e Browniano.

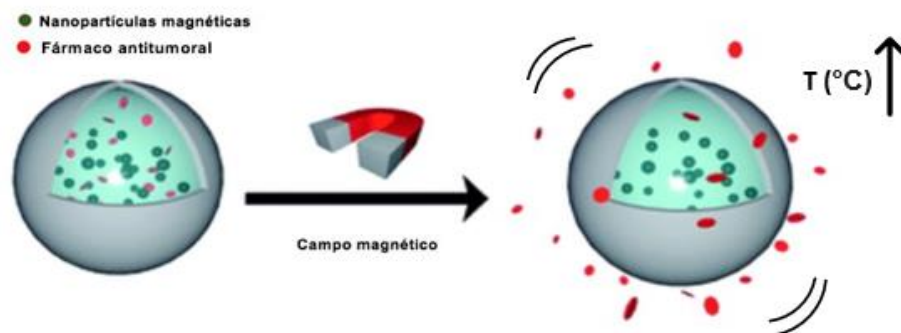


Figura 1.10 - Condução de magnetolipossomas através de um campo magnético e consequente libertação de fármaco antitumoral após o aumento da temperatura local. Imagem editada de [41].

Este último define-se como o movimento e rotações aleatórias das nanopartículas e desempenha um papel fundamental na taxa de absorção específica (SAR) das mesmas. O valor de SAR é dependente da frequência do campo aplicado sendo originada uma perda máxima de potência à frequência de ressonância, $f = 1/(2\pi\tau)$, onde τ é o tempo de relaxação efetivo (37). Quando as nanopartículas magnéticas aplicadas têm uma taxa de absorção específica (SAR) elevada, revelam-se excelentes materiais para

hipertermia. Esta característica é dependente do seu tamanho, forma, composição, interação magnética, concentração e das características do AMF. Este último é produzido por uma bobina e o campo magnético gerado atravessa os tecidos orgânicos, perturbando tanto os saudáveis como os cancerosos. Dado que as correntes produzidas podem ser prejudiciais para tecidos saudáveis isto impõe uma limitação à terapia hipertérmica no que diz respeito à força e frequência do AMF, apesar de que apenas é esperado um aumento considerável da temperatura nos locais em que as nanopartículas magnéticas (MNPs) estejam presentes (37).

No que diz respeito ao transporte direcionado de fármacos antitumorais, o objetivo passa por aumentar a concentração de fármaco no local alvo para atingir níveis terapêuticos sem originar repercussões nos tecidos vizinhos (41). Na presença de um gradiente de campo magnético, uma força translacional vai atrair o complexo lipídico/partícula na sua direção, até à origem da força magnética. Esta força magnética é dada pela seguinte equação:

$$F_{mag} = (X_2 - X_1)V \frac{1}{\mu_0} B(\nabla B) \quad (1.1)$$

onde B é o campo magnético; ∇B é o gradiente do campo; μ_0 é uma constante; X_2 é a suscetibilidade magnética da partícula; X_1 é a suscetibilidade magnética do meio (que é bastante mais pequena que X_2 e pode ser ignorada aquando em sistemas biológicos) (42).

2. Técnicas de análise

2.1 Radiação eletromagnética

A radiação eletromagnética pode-se entender como o fluxo de energia à velocidade da luz no vácuo ou num meio material, na forma de ondas eletromagnéticas. Estas, deslocam-se no meio, através de campos magnéticos e elétricos que são perpendiculares entre si e que se deslocam numa direção perpendicular às duas primeiras. A oscilação dos vetores campo magnético, \vec{B} , e elétrico, \vec{E} , está representada na figura 2.1. Esta relação foi postulada pelo físico James Clerk Maxwell, em 1873. Até à data, pensava-se que estas duas forças fossem independentes uma da outra (43,44).

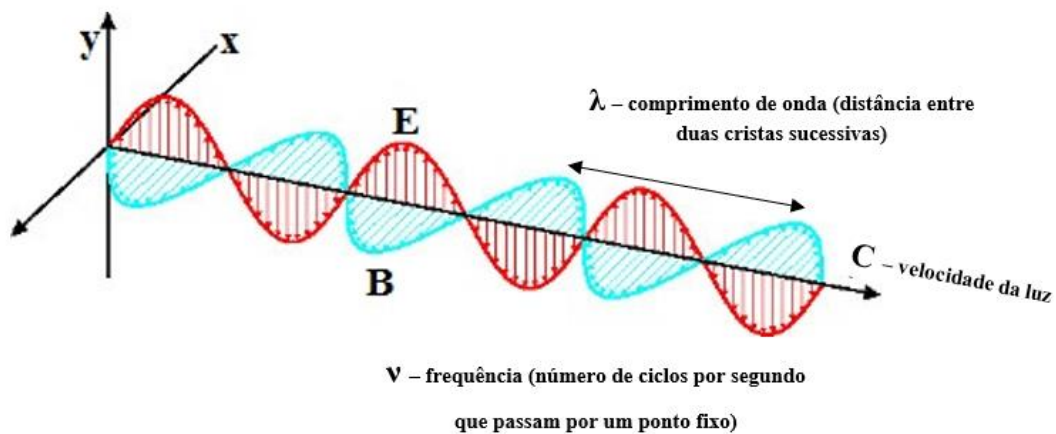


Figura 2.1- Representação esquemática da oscilação da radiação eletromagnética.

Uma onda eletromagnética é caracterizada pela seu comprimento de onda, velocidade de propagação, amplitude e frequência. A frequência e o comprimento de onda relacionam-se de acordo à seguinte equação (2.1):

$$\lambda \nu = c \quad (2.1)$$

onde c é a velocidade da luz, ν a frequência e λ o comprimento de onda.

Atualmente, a teoria quântica explica a radiação eletromagnética através do fluxo de fótons pelo espaço à velocidade da luz. Admite-se que esta forma de energia se propaga com comportamentos ondulatórios e corpusculares que explicam fenómenos causados pela radiação eletromagnética. Os fenómenos óticos como a difração, polarização ou refração corroboram o comportamento ondulatório enquanto, fenómenos ligados à transferência de energia tais como a absorção e emissão são responsáveis pelo comportamento corpuscular. Este último, assenta na constituição da

radiação eletromagnética por partículas de energia, denominadas de fótons. As energias destes podem ser quantificadas pela equação:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.2)$$

onde h representa a constante de Planck ($6,6256 \times 10^{-34}$ J.s), o valor de ν para a frequência da onda, λ o comprimento de onda absorvida e c a velocidade de luz no vácuo (45).

A absorção de energia de luz incidente por parte dos átomos de matéria ou meio depende das características físicas do material e da sua composição química e da radiação incidente. A radiação incidente é absorvida através de processos inelásticos entre os fótons da mesma e os átomos incididos (43,45,46).

Este fenómeno provoca um aumento de energia que, quando suficiente, implica a passagem do estado eletrónico fundamental para estados eletrónicos de energia superior. A energia de absorção pode ser quantificada como a diferença entre os estados eletrónicos excitados e fundamental dos átomos, de acordo à seguinte equação:

$$E_{est.excitado} - E_{est.fundamental} = h\nu \quad (2.3)$$

As moléculas possuem, além de energia eletrónica, energia rotacional e vibracional quantificadas (figura 2.2). A energia rotacional corresponde à rotação da molécula em torno do seu eixo de gravidade enquanto que a vibracional é dependente da vibração dos átomos constituintes da matéria (45,47). As transições entre os estados eletrónicos dos átomos originam, também, alterações nas energias rotacionais e vibracionais das moléculas. Estas transições podem ser observadas através de espetros de absorção onde os picos que compõem as bandas de absorção representam as transições entre os diferentes níveis vibracionais e rotacionais das moléculas (figura 2.2). A absorção de fótons e as respetivas transições eletrónicas do estado fundamental para o estado excitado são traduzidos em espetros de absorção em forma de banda que podem apresentar picos derivados do facto das moléculas terem, para um mesmo estado eletrónico, vários níveis de energia rotacional e vibracional. No seu estado fundamental e livre de perturbações, as moléculas encontram-se no nível vibracional mais baixo do estado fundamental. Desta maneira, as bandas de absorção

resultam do conjunto das transições desde o estado fundamental para estados eletrônicos de energia superior (45,47).

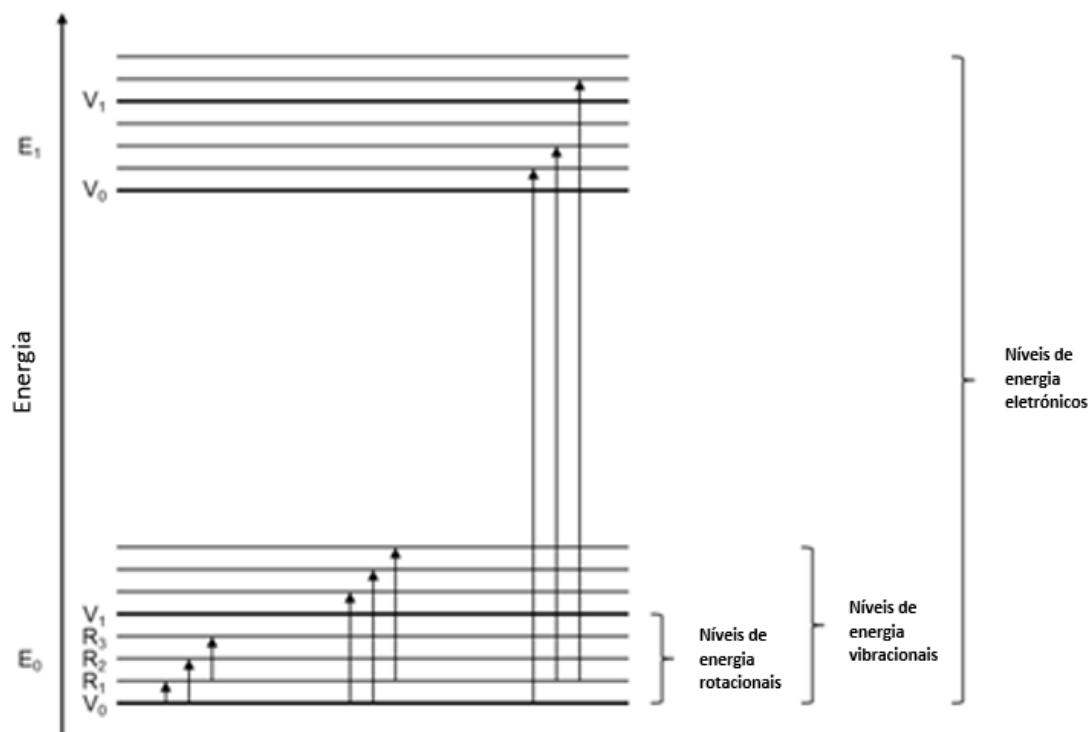


Figura 2.2 - Esquema representativo das transições entre estados eletrônicos.

À escala molecular, as transições entre estados eletrônicos ocorrem nas orbitais através de “saltos energéticos” de elétrons. À orbital molecular ocupada de menor energia dá-se o nome de HOMO (do inglês Highest Occupied Molecular Orbitals) e à orbital de mais baixa energia desocupada dá-se o nome de LUMO (do inglês Lowest Unoccupied Molecular Orbitals) (48).

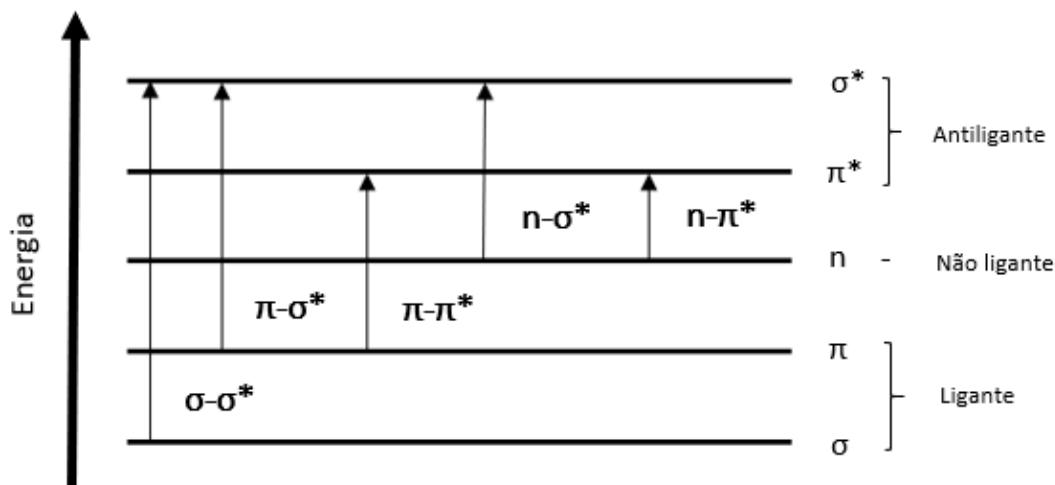


Figura 2.3 - Transições eletrônicas entre orbitais moleculares.

Com a sobreposição de orbitais atômicas, podem ser criadas orbitais moleculares do tipo σ e π (ligantes), n (não ligantes) e σ^* e π^* (antiligantes). A transição resultante da absorção de energia numa molécula está relacionada energeticamente de acordo a figura 2.3 (48). Estas transições, como já descrito, correspondem a bandas de absorção com picos a vários comprimentos de onda, que correspondem à absorção de radiação na região do UV-visível ($\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$) e na região do ultravioleta de vácuo ($\sigma \rightarrow \sigma^*$ e $\pi \rightarrow \sigma^*$).

As transições eletrônicas variam de probabilidade com a sobreposição espacial das orbitais envolvidas. As transições denominadas permitidas, as mais prováveis, contemplam sobreposição espacial das orbitais envolvidas e, ocorrem entre orbitais do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ enquanto que as transições $n \rightarrow \pi^*$ se definem como proibidas (menos prováveis), uma vez que as orbitais envolvidas têm diferente simetria.

Ademais, os elétrons possuem número quântico de spin que, quando quantificado define a multiplicidade dos estados eletrônicos. Esta é definida pela expressão $2S+1$ onde S é a soma dos números quânticos de spin dos elétrons em que $S = \sum s_i$ com $s_i = \pm 1/2$ (48).

A multiplicidade dos estados eletrônicos pode ser definida como singlete, quando os elétrons se encontram emparelhados e a soma do spin conseqüente é zero ou tripleto quando há uma transição eletrônica com inversão de spin que resulta na soma de números quânticos de spin igual a 1 e, portanto, multiplicidade igual a 3 (48).

2.2 Espectroscopia molecular

2.2.1 Espectroscopia de absorção UV-Visível

Dentro do espectro de radiação eletromagnética, a espectroscopia de absorção da região visível e ultravioleta (UV-Vis) está confinada a uma pequena região do comprimento de ondas, entre os 200 e os 700 nm. As transições eletrônicas ocorrem quando um feixe proveniente de uma fonte de luz de radiação eletromagnética incide numa amostra e a técnica assenta no registo da intensidade do feixe de luz antes e depois de interagir com a amostra (49).

As bandas de absorção registadas podem sofrer alterações consoante as condições do meio de amostra. A polaridade e/ou o pH do mesmo condicionam a energia de transições eletrônicas.

2.2.1.1 Lei de Lambert-Beer

Em espectroscopia de absorção UV-Visível, a relação entre a absorvância e a concentração da amostra é linear e assenta num princípio físico chamado a Lei de Lambert-Beer. Esta lei, define a base matemática e física das medidas de absorção de luz na região do UV-Visível, em amostras líquidas e gasosas e onde a absorvância A_ν é definida pela seguinte equação (49):

$$A_\nu = \varepsilon_\nu \cdot c \cdot d \quad (2.4)$$

onde, ε_ν é o coeficiente de absorção (cm^{-1}), c a concentração da espécie absorvente, d a espessura do meio absorvente (em cm) e ν a frequência da luz. O coeficiente de absorção molar é uma medida de intensidade da banda de absorção. A Lei de Lambert-Beer pode ser expressa em equações matemáticas referentes aos fenómenos físicos interligados absorvância (A_ν) e transmitância (T_ν) que podem ser definidos como:

- $A_\nu = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)_\nu \quad (2.5)$

- $T_\nu = \frac{I}{I_0} \cdot 100, \quad \text{em } \%$ (2.6)

onde I_0 se refere à intensidade do feixe de luz incidente e I à intensidade do feixe de luz transmitido. À fração da luz incidente, com um comprimento de onda específico que atravessa uma amostra, dá-se o nome de transmitância e está relacionada diretamente com a absorvância. Através da relação matemática $A_\nu = -\log_{10}T_\nu$, pode-se obter a absorvância através da transmitância (45,49).

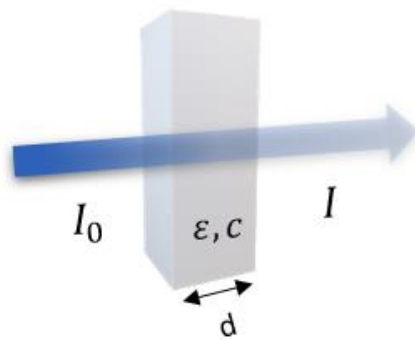


Figura 2.4 - Diagrama de absorção de um feixe de luz atravessando uma cuvette de percurso óptico d .

Desta maneira, a lei de Lambert-Beer estipula uma relação direta entre a absorvância e a concentração em condições diluídas onde se verifica apenas um composto absorvente. Na presença de vários compostos, a absorção passa a ser a soma das absorvâncias correspondentes. Para a efetividade desta lei são necessários alguns requisitos na medição da absorvância, entre os quais:

- Luz monocromática;
- Distribuição homogênea das moléculas;
- Ausência de reações fotoquímicas secundárias e *scattering* de luz;
- Perda de luz pelo fenômeno de fluorescência (50).

Adicionalmente, para evitar interferência do solvente na medição da absorvância da amostra, é preciso ter em conta o seu espectro de absorção do próprio solvente (45,49).

2.2.1.2 Espectrofotômetro

Estes equipamentos são compostos por uma fonte de radiação, um monocromador, os porta-amostras, o fotomultiplicador e ainda uma unidade de processamento e aquisição de informação (figura 2.7) (49).

A tipologia do equipamento define a quantidade de porta-amostras que este possui. Os espectrofotômetros de feixe simples, possuem apenas um porta-amostras pois a medição é obtida com apenas um único feixe de luz a atravessar a amostra. No espectrofotômetro de feixe duplo, na medição da absorvância, são utilizados dois feixes de luz paralelos que incidem em duas células inseridas em porta-amostras diferentes, em que um é utilizado como referência, I_0 , (possui apenas o solvente), e o outro possui

a amostra a ser analisada I . A comparação entre I_0 e I permite obter a transmitância e, subsequentemente a absorvância.

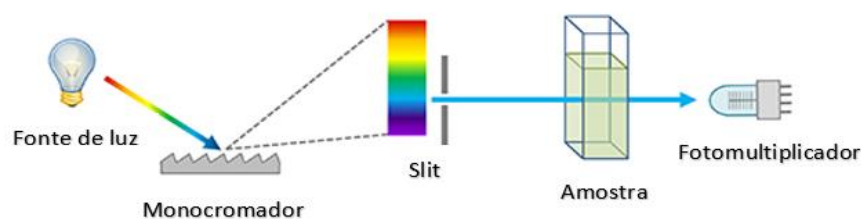


Figura 2.5 - Representação esquemática dos componentes de um espectrofotômetro.

2.2.2 Espectroscopia de fluorescência

Após excitação, a perda do excesso de energia eletrônica para retorno ao estado fundamental pode-se dar através de processos radiativos ou não radiativos. Os processos radiativos baseiam-se na emissão de fótons enquanto que, os segundos, perdem a energia através de processos intramoleculares sem emissão de luz.

Distintamente da espectroscopia de absorção, a espectroscopia de fluorescência reflete então o estudo da perda de energia por moléculas previamente excitadas. A emissão de radiação eletromagnética ocorre na região visível, podendo correr também na região do ultravioleta e infravermelho. A espectroscopia de fluorescência é uma técnica muito sensível que é frequentemente usada no estudo de mudanças conformacionais, interações moleculares e localização de compostos em diferentes ambientes (51).

Os processos radiativos contemplam dois fenômenos de luminescência, sendo eles a fluorescência e fosforescência, existindo para cada um destes, uma técnica específica de espectroscopia. Considerando os dois mecanismos capazes de emitir radiação, a fluorescência e a fosforescência, definem-se transições entre estados de igual e de diferente multiplicidade, sendo estes, a base de distinção entre os dois mecanismos (45,52). A fluorescência depende de uma transição entre estados da mesma multiplicidade (singleto), onde ocorre sempre de uma transição do primeiro estado excitado para o estado fundamental.

Estes fenômenos de luminescência diferenciam-se entre si nos seus tempos de vida do estado excitado (intervalo de tempo médio em que as moléculas permanecem no estado excitado), sendo que a fluorescência apresenta um tempo de cerca de 10^{-9} s após excitação. No caso de fosforescência, este tempo é mais longo, devido à passagem

“proibida” do estado tripleto excitado para o estado fundamental singlete, e pode ir dos milissegundos a minutos.

A presença de espécies como o oxigênio em solução, promove mecanismos de desexcitação não radioativo como o cruzamento intersistemas, inibindo assim a processo de fluorescência (em inglês, quenching) (45).

De forma geral, os mecanismos não radiativos como a relaxação vibracional e conversão interna, que aconteçam mais rapidamente, limitam a origem da emissão de luz ao nível vibracional fundamental do 1º estado excitado (45).

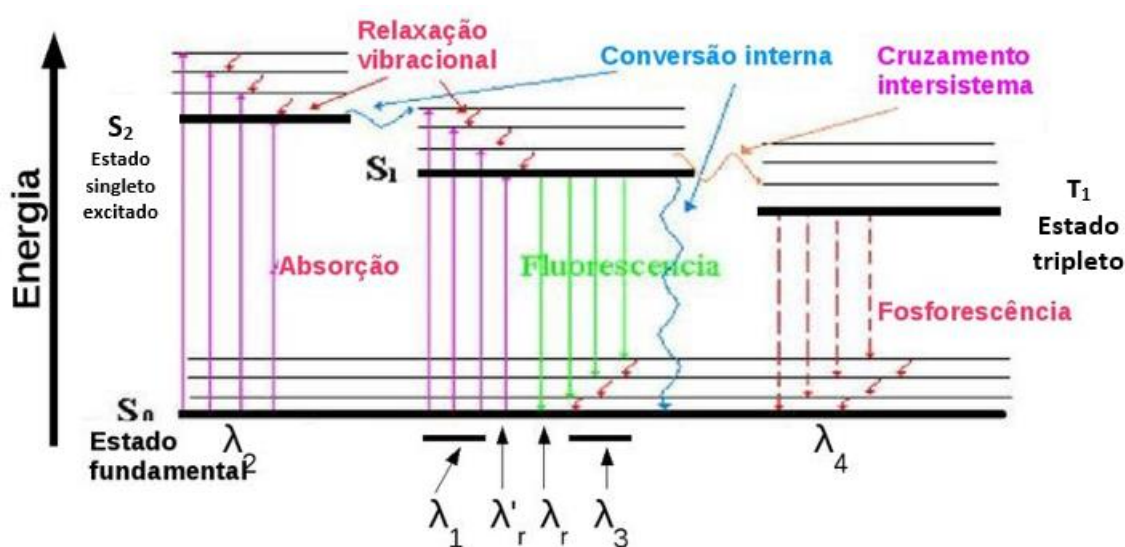


Figura 2.6 - Diagrama de níveis de energia com a representação dos processos radiativos e não radiativos (diagrama de Jablonski).

O relaxamento vibracional acontece em intervalos de 10^{-12} a 10^{-10} segundos, tempo em que, se dá a reorientação do solvente origina a relaxação do estado excitado com diminuição da energia eletrônica da molécula. A colisão molecular soluto-solvente provoca a transferência do excesso de energia sob a forma de calor, aumentando a temperatura do meio. Temperaturas mais baixas diminuem estas colisões na medida em que face ao menor movimento e energia das moléculas, as interações são menos prováveis. A eficiência do relaxamento vibracional provoca o deslocamento das bandas de fluorescência relativamente à correspondente transição eletrônica no espectro de absorção, para maiores comprimentos de onda. Isto é conhecido como o Desvio de Stokes (figura 2.9) (45).

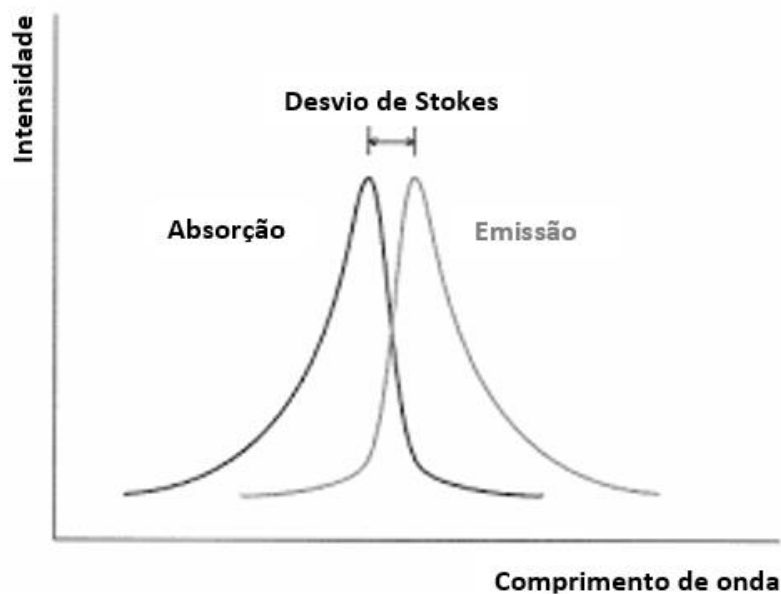


Figura 2.7 - Representação gráfica do Desvio de Stokes.

A conversão interna também ocorre em intervalos de tempo muito curtos, cerca de 10^{-11} a 10^{-13} segundos, e surge quando há uma proximidade de níveis vibracionais de diferentes estados eletrônicos com a mesma multiplicidade havendo transição de energia entre eles. Por exemplo, a energia do nível vibracional mais baixo de S_2 corresponde à energia do nível mais alto de S_1 , como representado na figura 2.7 (45).

O fenômeno de cruzamento intersistemas, acontece numa transição entre o nível de energia de um estado singleto (S_1) para um estado tripleto (T), ou seja, entre estados de multiplicidade diferente. Transições desta natureza são definidas como “proibidas por spin”, onde há a inversão do sentido do spin. Apesar da denominação, este tipo de transição é possível de ocorrer, contudo, a sua probabilidade é reduzida. Derivado da complexidade da transição, o tempo de vida é mais longo, entre 10^{-2} a 10^{-8} segundos. Uma vez no estado tripleto, as moléculas libertam energia via relaxação vibracional podendo, após atingir o nível vibracional mais baixo, emitir um fóton com igual energia à disparidade entre os diferentes estados envolvidos (fosforescência) ou, perder energia através de processos de cruzamento intersistemas (45).

Quanto maior forem as distâncias entre os níveis dos estados eletrônicos envolvidos nas transições, quer sejam eles S-S ou T-S, maior será a diferença energética. Com isto, a eficiência das transições diminui a par da conversão de energia via mecanismos não radiativos, como a conversão interna e intersistemas (45).

2.2.3 Rendimento quântico de fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência é um parâmetro físico importante no estudo de fluoróforos. Este, baseia-se na medida direta da conversão de fótons absorvidos em emitidos e é dado pela seguinte equação (52,53):

$$\varphi_F = \frac{N^\circ \text{ de fótons emitidos}}{N^\circ \text{ de fótons absorvidos}} \quad (2.7)$$

Os valores de rendimento quântico de fluorescência, φ_F , permitem então determinar a eficiência da emissão radiativa e podem ser usados no desenvolvimento de fluoróforos na área medicinal e bioanalítica. Este parâmetro não depende da intensidade da luz de excitação, mas pode variar com o microambiente onde o fluoróforo está inserido. Por exemplo, condições que contrariem mecanismos não radiativos aumentam a eficiência do φ_F , como a diminuição da temperatura (52,53).

Em situações em que não existam agentes inibidores de fluorescência, pode-se definir o rendimento quântico de fluorescência como a razão entre as constantes de velocidade dos processos radiativos e não radiativos dos mecanismos de perda de energia, de acordo à equação abaixo:

$$\varphi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (2.8)$$

onde, k_F é a constante de velocidade do processo de fluorescência, k_{IC} a constante de velocidade mecanismo de conversão interna e k_{ISC} a constante de velocidade do mecanismo de cruzamento intersistemas (52,53).

2.2.3.1 Anisotropia

Não se pode definir a anisotropia sem antes introduzir o conceito de polarização da luz. A luz é composta por campos magnéticos e elétricos, ortogonais entre si, que oscilam perpendicularmente à direção de propagação da mesma, em vários planos. Através de polarizadores óticos, certos planos de oscilação podem ser bloqueados de forma a obter-se um feixe de luz polarizado, em que, a oscilação de luz se dá num plano apenas (54–56).

Considerando um eixo de três coordenadas em que, na origem se encontra uma solução de fluoróforos e um feixe de luz polarizado que atravessa a solução, apenas as moléculas que se encontram alinhadas com o plano de polarização da luz absorvem fótons. A este processo dá-se o nome de fotoseleção (54–56).

Apesar de a absorção de luz polarizada desencadear a emissão de luz polarizada, esta poderá não ocorrer no mesmo plano de polarização que o de excitação (momentos dipolares de transição diferentes na absorção e emissão). Mas se as moléculas tiverem liberdade para rodar, influenciadas pela natureza do meio, a fotoseleção inicial é gradualmente perdida assim como os planos preferenciais de oscilação da luz emitida. (54–56).

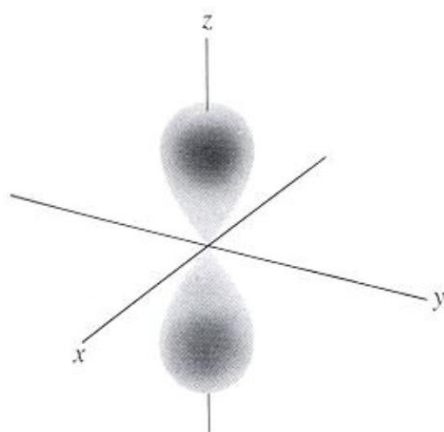


Figura 2.8 - Fotoseleção provocada por excitação com luz polarizada na direção z.

Com base no exposto, a anisotropia de fluorescência é uma técnica capaz de medir a difusão rotacional de uma molécula. As medidas de anisotropia de fluorescência, r , podem dar informações acerca da localização de fluoróforos em estruturas moleculares. Experimentalmente, a anisotropia pode ser calculada através da seguinte razão:

$$r = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + 2 G I_{VH}} \quad (2.9)$$

onde I_{VV} e I_{VH} são as intensidades de fluorescência obtidas com polarização vertical e horizontal (para luz de excitação polarizada verticalmente), respetivamente e $G = I_{HV}/I_{HH}$ é o fator de correção instrumental, onde I_{HV} e I_{HH} são as intensidades de fluorescência obtidas com polarização vertical e horizontal (para luz de excitação polarizada horizontalmente).

Na ausência de difusão, a anisotropia assume valores entre 0,4 e -0,2, para a emissão de fótons com momentos de transição paralelos ou perpendiculares ao plano de polarização da luz de excitação, respetivamente (57).

A extensão da rotação da molécula vai depender do quão rápido esta vai rodar antes de emitir um fóton. Assim, o tamanho das moléculas e o tempo de vida do estado excitado são variáveis cruciais na análise da anisotropia de fluorescência (54–56).

Desta maneira, é estabelecida uma relação matemática entre a anisotropia e o tempo de correlação rotacional da molécula fluorescente e o tempo de vida do estado excitado. Esta define-se como:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c}\right) \quad (2.10)$$

onde r_0 é a anisotropia fundamental, τ o tempo de vida do estado excitado e τ_c o tempo de correlação rotacional dado por: $\tau_c = \frac{V_h \eta}{k_B T}$ sendo, V_h o volume hidrodinâmico da molécula, η a viscosidade do meio, k_B a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta (57).

2.2.3.2 Transferência de energia de ressonância (FRET)

A transferência de energia de ressonância Förster (FRET, do inglês *Förster Resonance Energy Transfer*), é uma técnica baseada na transferência de energia através de interações dipolo-dipolo não radioativas entre uma molécula no estado excitado (doador) e uma molécula vizinha (aceitante) em que, para que se verifique, o espectro de absorção da molécula aceitante tem de se sobrepor, em algum grau, com o espectro de emissão do doador (figura 2.9).

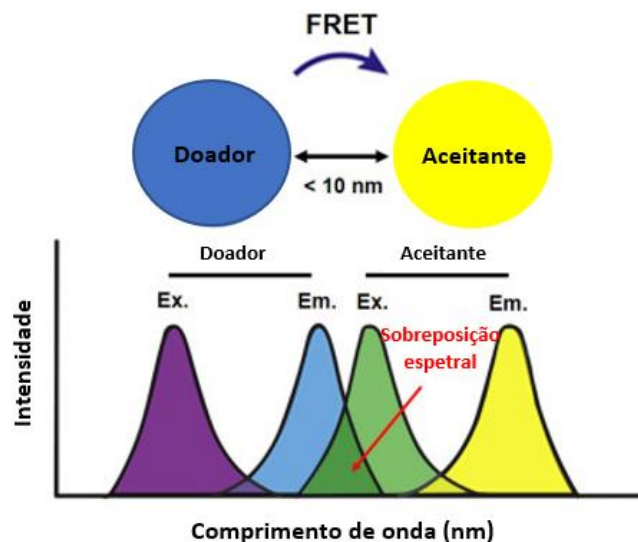


Figura 2.9 - Ilustração da sobreposição dos espectros integrados entre o espectro de emissão do doador e da absorção do aceitante.

Este fenômeno é também dependente da distância entre as duas moléculas, (entre 1 e 10 nm) e do tempo de vida do estado excitado do doador, o qual deve ser suficiente longo para que a transferência de energia tenha tempo para ocorrer. Para que ocorra FRET, é ainda necessário que as orientações do dipolo doador e aceitante sejam aproximadamente paralelas. A transferência de energia é demonstrada pela inibição de fluorescência do doador e conseqüente aumento de emissão de fluorescência do aceitante (58,59).

A eficiência de FRET (ϕ_{FRET}) pode ser expressa pela seguinte equação:

$$\phi_{FRET} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (2.11)$$

onde I_{DA} e I_D são as intensidades de emissão do doador na presença e ausência do aceitador, respetivamente. A eficiência de FRET relaciona-se com a distância entre os fluoróforos (R_{DA}) pela seguinte equação:

$$\phi_{FRET} = \frac{1}{1 + (\frac{R_{DA}}{R_0})^6} \quad (2.12)$$

sendo R_0 o raio de Förster a distância crítica à qual a eficiência de FRET é 50%. Este valor pode ser determinado através das seguintes equações:

$$R_0 = 0.2108[k^2\phi_D n^{-4}J(\lambda)]^{1/6} \quad (2.13)$$

$$J(\lambda) = \int_0^\infty I_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad (2.14)$$

em que k^2 é o fator orientacional que toma o valor de 2/3, admitindo uma orientação aleatória das moléculas, ϕ_D é o rendimento quântico do doador na ausência de aceitador e n é o índice de refração do meio. A sobreposição espectral entre a emissão do doador e a absorção do aceitante $J(\lambda)$, é obtida pela equação 2.14, onde $I_D(\lambda)$ é o espectro de fluorescência do doador normalizado, de forma que $\int_0^\infty I_D(\lambda)d\lambda = 1$ e $\epsilon_A(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar do aceitador (60).

2.2.3.3 Espectrofluorímetro

Os espectrofluorímetros são aparelhos utilizados frequentemente na análise analítica de processos fotoluminescentes. São compostos geralmente por uma fonte de radiação, dois monocromadores, um de excitação e um de emissão, e um detetor (figura 2.12) (61).

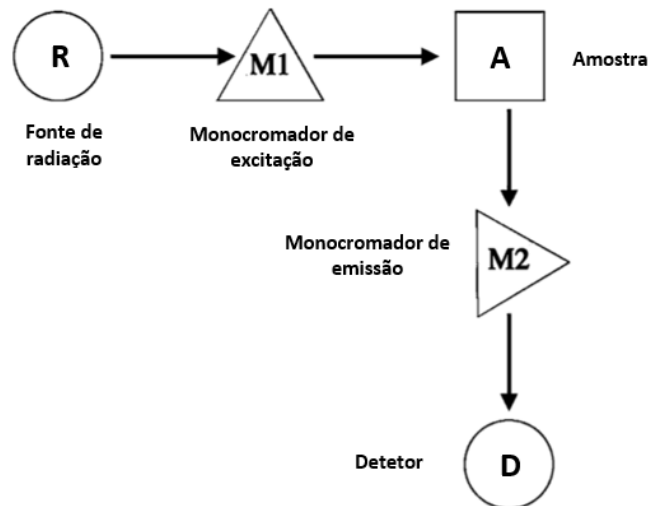


Figura 2.10 - Representação esquemática de um espectrofluorímetro.

A posição dos monocromadores entre a fonte de luz e a amostra e entre a amostra e o detetor permitem uma seleção do comprimento de onda da radiação que atinge a amostra e da radiação emitida pela mesma. Com a possibilidade de definir os comprimentos de onda de excitação e/ou de emissão específicos é possível obter espectros de emissão e/ou de excitação de uma dada amostra. De maneira a limitar a detecção de luz no detetor, o ângulo entre o segundo monocromador e o detetor é de 90° (figura 2.13). Desta maneira, limita-se a detecção de luz à radiação de interesse emitida pela amostra evitando excedentes de radiação proveniente da luz de excitação (61).

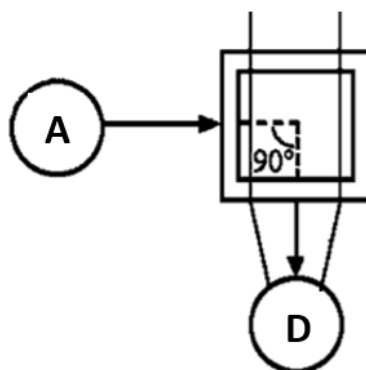


Figura 2.11 - Representação do ângulo entre o segundo monocromador e o detetor num espectrofluorímetro.

Geralmente, a fonte de radiação é uma lâmpada de xénon, permitindo excitação no ultravioleta e visível. Normalmente, possuem uma ótica de feixe duplo de maneira a compensar flutuações da intensidade da lâmpada à medida que percorre os comprimentos de onda (61). Esta compensação é usualmente feita através da resposta de um fotodíodo para onde +e direcionada parte da luz de excitação.

A intensidade de fluorescência, no espectralfluorímetro, pode ser definida através da seguinte equação:

$$I_F(\lambda_{em}) = I_0(\lambda_{exc}) (1 - 10^{-\varepsilon(\lambda_{exc})bc}) \varphi_F G \quad (2.15)$$

onde I_0 representa a intensidade da radiação incidente, $1 - 10^{-\varepsilon(\lambda_{exc})bc}$ a fração da radiação absorvida, em que b é o comprimento da amostra (cuvete) e c é a concentração da amostra, φ_F o rendimento quântico, G um fator de geometria que define a fração de luz detetada, λ_{em} o comprimento de onda de emissão, λ_{exc} o comprimento de excitação.

2.3 Difusão Dinâmica de Luz (DLS)

A difusão dinâmica de luz é uma técnica que consiste na incidência de um feixe de luz monocromático numa amostra e na deteção da luz dispersa a um dado ângulo por um detetor específico. A sigla DLS resume a definição em inglês, *Dynamic Light Scattering*. Esta técnica permite o estudo de várias características da amostra como o tamanho médio, a distribuição de tamanhos, a polidispersividade da amostra e o potencial zeta.

Em DLS, quando o feixe de luz monocromático incide na amostra, este interage com as partículas, resultando numa difusão da luz em todas as direções em função do tamanho e forma das partículas. Esta técnica assenta em dois processos físicos de interação partícula-luz: movimento Browniano e difusão de Rayleigh. A interação luz-partícula não representa ganho ou perda de energia (difusão de Rayleigh) e o movimento aleatório das partículas em solução (movimento Browniano) faz com que a intensidade de luz detetada sofra variações em função do tempo.

Visto que partículas mais pequenas difusionalmente se movem mais rápido que as grandes, pode-se definir uma relação entre o movimento das mesmas e a rapidez das resultantes variações temporais da luz dispersa. É assim medido o valor do coeficiente de difusão, D_T , que está diretamente relacionado com o tamanho hidrodinâmico das partículas. Este coeficiente é influenciado pelo tamanho das partículas, viscosidade e temperatura do meio (62,63).

Neste projeto, este equipamento foi utilizado na análise dos tamanhos das partículas e da carga superficial dos lipossomas em solução.

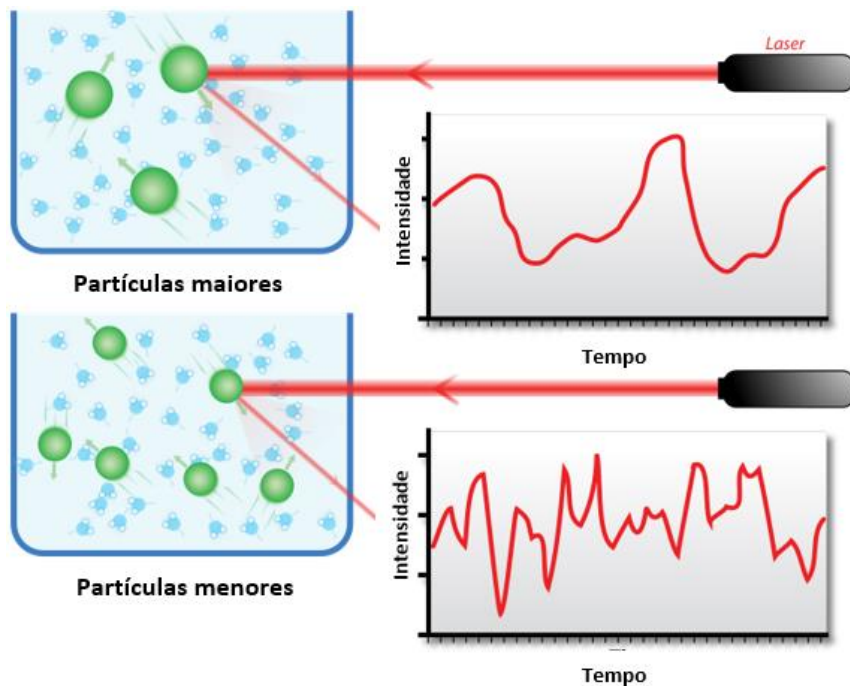


Figura 2.12 - Ilustração da difusão dinâmica da luz em duas amostras.

2.4 Microscopia eletrônica de varrimento (MEV)

O microscópio eletrônico de varrimento permite o estudo e caracterização estrutural de materiais à escala nanométrica. O equipamento baseia-se na interação eletrônica entre um feixe de elétrons e uma amostra. Para tal ocorrer, os materiais em análise, necessitam de ter propriedades de condução de elétrons. Assim, este tipo de equipamento permite a análise de materiais condutores e semicondutores e ainda de não condutores, desde que estes sejam sujeitos a um tratamento prévio. Este tratamento pode passar pela desidratação, no caso de amostras biológicas, e da aplicação de materiais condutores, como por exemplo o ouro, na superfície das amostras (64,65).

Este aparelho opera em vácuo e a análise resulta da incidência de um feixe de elétrons (acelerado por aplicação de energia) na amostra e posterior detecção dos elétrons secundários emitidos pela mesma. O feixe de elétrons incide na amostra como um feixe monocromático, obtido através da ação de elementos óticos eletromagnéticos e *slits* metálicos que o confinam a um diâmetro de 100 nm ou menos. Apesar da ocorrência de vários fenômenos após a incidência do feixe da amostra, grande parte

dos equipamentos MEV apenas possuem o detetor de elétrons secundários. Estes, são os que permitem a obtenção da imagem final da superfície da amostra. Outros fenômenos como a emissão de elétrons refletidos, fótons e luz visível também ocorrem dentro do equipamento (64,65).

A utilização deste equipamento e a informação obtida pela análise microscópica, permite o estudo morfológico e topográfico da amostra revelando-se essencial na caracterização estrutural dos materiais desenvolvidos neste trabalho (64,65).

2.5 Dispositivo de interferência quântica supercondutora (SQUID)

O dispositivo de interferência quântica supercondutora, SQUID, sigla que define o termo em inglês, *superconducting quantum interference device*, é um equipamento altamente sensível na análise de propriedades magnéticas. Este equipamento é formado por um anel supercondutor interrompido por uma ou duas junções Josephson. Ao submetemos este equipamento a um campo externo perpendicular, é-se possível verificar e quantificar a dinâmica de fluxo magnético no anel e converter este sinal em voltagem elétrica.

Assim, a base do equipamento assenta em dois fenômenos físicos: quantificação de fluxo e junções de Josephson (66,67). A junção de Josephson é constituída por dois supercondutores separados por uma barreira isolante, em que, é possível a passagem de corrente elétrica, detetando-se desta maneira as variações da mesma (66,67).

Existem dois tipos de equipamentos SQUID: dc SQUID e rf SQUID. O primeiro é definido pelo uso de corrente constante e é constituído por duas junções Josephson paralelas num loop supercondutor. A determinação do segundo equipamento, "rf", advém da utilização de radiofrequência. Ademais, o rf SQUID, consiste apenas numa junção Josephson num loop supercondutor (66,67). Desta maneira, e na presença de um campo externo é possível quantificar o fluxo magnético no loop supercondutor [67– 69].

2.6 Difração de raios-X (XRD)

A técnica de difração de raios-X é fundamental na caracterização estrutural de materiais cristalinos. Através da incidência de raios-X numa determinada estrutura cristalina e da monitorização da sua interferência construtiva, é possível obter uma série de informações quanto à estrutura, fase cristalina, orientação de cristais e até o tamanho médio de grãos do material analisado. Aquando da interação com a luz, o padrão regular dos átomos nas redes cristalinas, origina raios difratados em que, em

determinadas direções desencadeia uma interferência construtiva quando contempla as condições definidas pela lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (2.16)$$

em que n é um número inteiro, λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d é a distância entre planos atômicos e θ é o ângulo de incidência em relação ao plano considerado (70). Desta maneira estabelece-se uma relação entre o comprimento de onda de radiação eletromagnética com o ângulo de difração e o padrão da rede da estrutura cristalina. A técnica assenta na incidência de radiação monocromática na amostra, em vários ângulos, com o intuito de atingir todas as direções da rede. Quando ocorre interferência construtiva, ou seja, a incidência dos raios-X correspondem à lei de Bragg, é evidenciado um pico de intensidade característico. A identificação do material é feita através da comparação a um padrão de referência, convertendo os de picos de difração em espaçamento (d) (71,72).

3. Procedimento experimental

O procedimento experimental ao longo do trabalho laboratorial é denso e repartido em várias etapas. De maneira a simplificar a sua perceção, é feita uma síntese introdutória neste capítulo com ligação ao anterior. As várias etapas que compõe o procedimento experimental associam-se à análise e caracterização dos materiais obtidos através das técnicas descritas no capítulo antecedente.

Derivado do uso de técnicas sensíveis na análise das amostras, estas foram preparadas com o maior dos cuidados. Para o efeito, as preparações foram obtidas com recurso a solventes de grau espectroscópico e água ultrapura, cedida pelo Departamento de Ciências da Terra.

O procedimento experimental foi realizado em grande parte no Laboratório de Fotofísica do Centro de Física da Universidade do Minho. Aqui foram preparadas todas as amostras e medidas de absorção e fluorescência. O laboratório é equipado com um espectrofotómetro UV-Vis-NIR Shimadzu, modelo UV-3101PC e um espectrofluorímetro Fluorolog 3. Estes equipamentos foram usados para obter os espectros de absorção e de fluorescência respetivamente. Nestes estudos as amostras foram analisadas em compartimentos específicos como as *cuvettes* de absorção e fluorescência de quartzo com 10 mm de percurso ótico.

O Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho permitiu a utilização do equipamento de difusão dinâmica de luz da marca Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS. Foram utilizadas *cuvettes* de polistireno, com percurso ótico de 10 mm, na análise das amostras.

As imagens de microscopia eletrónica foram obtidas através do Microscópio Eletrónico de Varrimento localizado no laboratório de serviços de Caracterização de Materiais da Universidade do Minho (SEMAT) (73).

Através da colaboração com o Instituto de Física de Materiais Avançados, Nanotecnologia e Fotónica da Universidade do Porto (IFMUP), foi possível analisar as propriedades magnéticas das amostras através da técnica de SQUID.

3.1 Síntese de nanopartículas de ferrite de manganês em forma de flor

A síntese de nanopartículas em forma de flor remete para um tipo de estrutura de agregados de nanopartículas. O desenvolvimento deste tipo de estruturas é uma área relativamente recente, sendo que a maioria dos procedimentos descritos correspondem a nanopartículas de magnetite. Numa tentativa de inovar e aplicar estes

procedimentos a nanopartículas de manganês foram realizados vários procedimentos nesta tese.

Procedeu-se à preparação de nanopartículas de ferrite de manganês com a inclusão de compostos orgânicos sendo estes, o carboximetil-dextrano e a melamina, de forma a originar agregados multinucleares.

3.1.1 Síntese com Carboximetil-dextrano

Foram sintetizadas dois tipos de nanopartículas com Carboximetil-dextrano. O processo de síntese contempla duas etapas que correspondem à produção das nanopartículas de ferrite de manganês e à formação da estrutura multinuclear pela presença de um polissacárido. Com isto, os métodos de síntese diferenciam apenas no momento de inclusão do polissacárido, sendo para A1 depois da síntese das nanopartículas e para A2 antes da síntese das nanopartículas (figura 3.1).

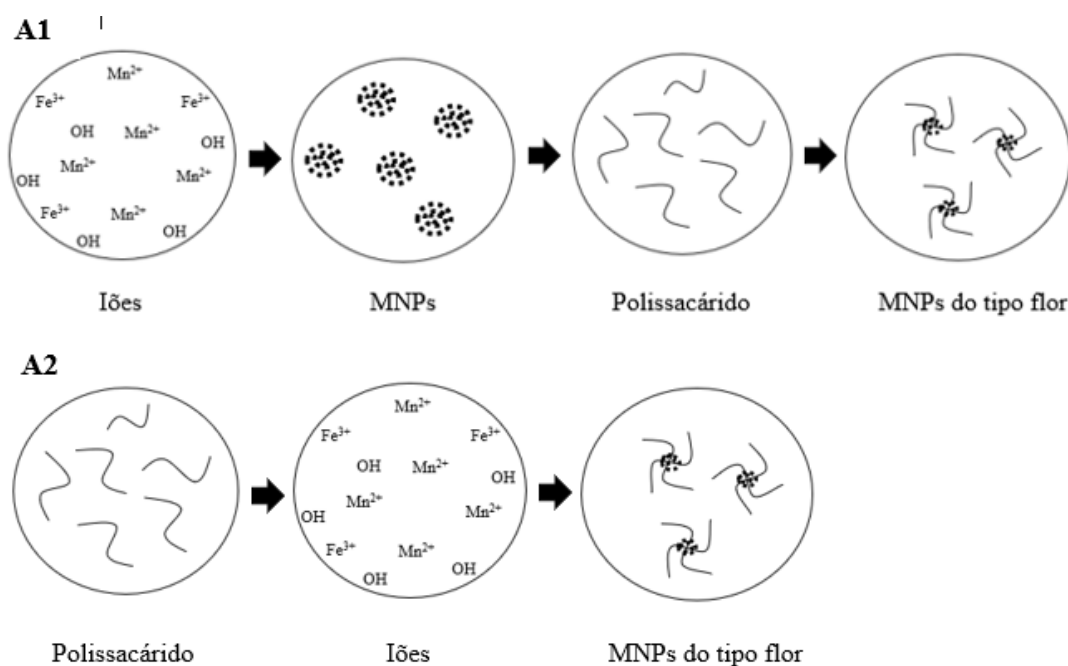


Figura 3.1 - Esquema representativo do processo de síntese das nanopartículas em forma de flor com Carboximetil-dextrano.

Os precursores metálicos usados na síntese das ferrites de manganês foram o cloreto de ferro (III) ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) com massa molar de 270,33 g/mol, e sulfato de manganês ($MnSO_4 \cdot H_2O$) com massa molar de 169,02 g/mol, ambos da SigmaAldrich. O agente hidroxilante utilizado foi o hidróxido de sódio (NaOH, 50% em água) e o Carboximetil-dextrano como agente aglutinador das nanopartículas.

Primeiro aqueceu-se uma solução aquosa de 19 ml contendo 8 mmol de NaOH a 100°C, num balão volumétrico. Para A1, foram adicionados, sob agitação magnética, os precursores metálicos numa proporção de 2:1, correspondentes a uma quantidade de 1,4 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,7 mmol de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em 1 ml de água desionizada. Após 15 minutos, foram adicionadas 100 mg de carboximetil-dextrano. A solução foi mantida estável a 100°C durante duas horas, sob agitação magnética. Para A2, a adição de 100 mg carboximetil-dextrano ocorre antes da adição dos precursores, sob as mesmas medidas estequiométricas. Por último procedeu-se à lavagem das nanopartículas obtidas com etanol em várias repetições de decantação magnética.

3.1.2 Síntese com Melamina

Apesar deste processo de síntese ser semelhante ao anterior na ideologia de etapas, neste método a superfície das nanopartículas de manganês foi ativada antes da adição do agente aglutinador, de forma a promover a formação dos agregados. Para tal, foram usados os reagentes N,N'-carbonildiimidazol (CDI) com massa molar de 162,152 g/mol, da FluoroChem, o composto orgânico Melamina com massa molar de 126,12 g/mol e o Imidazole com massa molar de 104,54 g/mol, ambos da SigmaAldrich.

Neste procedimento, foram sintetizadas as nanopartículas de ferrite de manganês usando o processo descrito anteriormente.

O procedimento de acoplamento do composto orgânico foi realizado sob sonicação. Desta maneira, as nanopartículas de ferrite de manganês previamente obtidas foram dispersas em 7 ml de sulfóxido de dimetilo (DMSO) seco, adicionou-se o CDI e a solução foi mantida a 60° C durante 2 horas. Aqui, foi usada uma proporção de moles de 5:1 de CDI para as nanopartículas de manganês, correspondente a $2,2 \times 10^{-4}$ mol de CDI para $4,3 \times 10^{-5}$ mol de nanopartículas. Após duas horas, foi adicionada água desionizada, para eliminar o CDI em excesso, na proporção de 2:1 face ao número de moles do CDI e decorridos 15 minutos foram adicionadas $4,3 \times 10^{-5}$ mol de melamina. Por fim, juntou-se $4,3 \times 10^{-5}$ mol de Imidazole e a reação foi mantida a 60° C durante duas horas, sob sonicação. A utilização do Imidazole permite acelerar o acoplamento dos grupos NH_2 da melamina aos grupos OH na superfície das NPs que foram ativados pelo CDI no passo anterior (figura 3.2) (74).

Nanopartículas ativadas com CDI

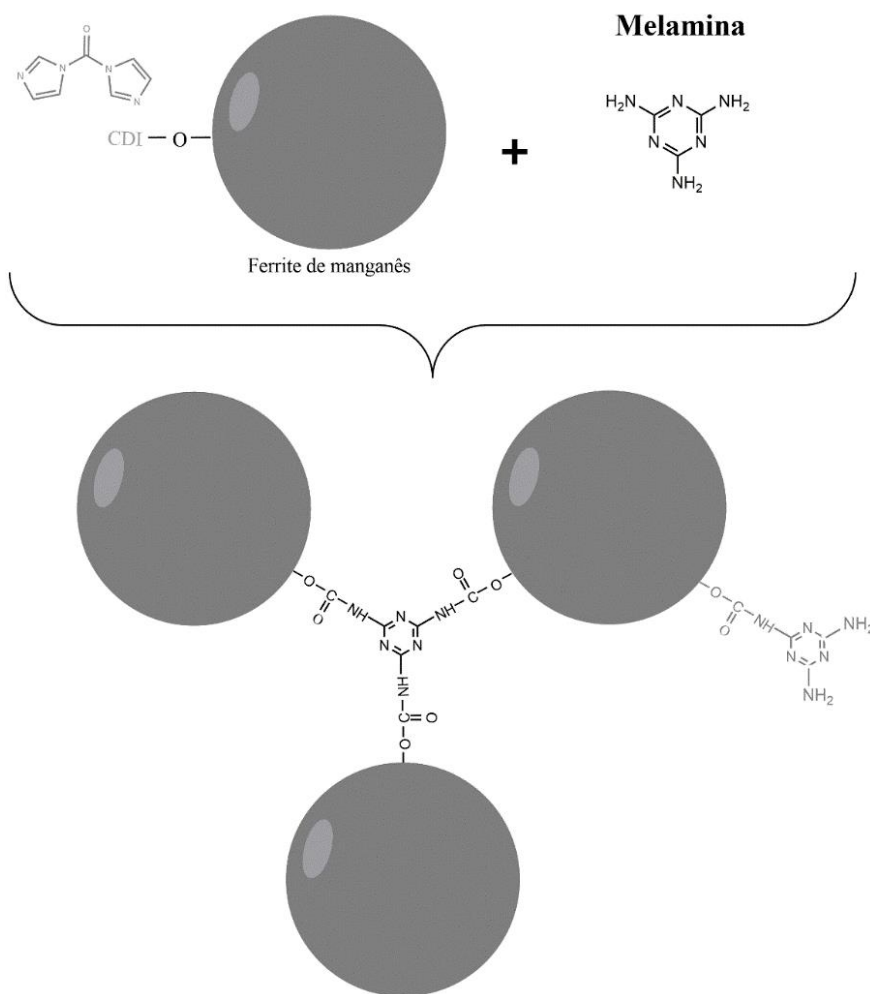


Figura 3.2 - Esquema representativo do processo de síntese das nanopartículas em forma de flor com Melamina.

3.2 Síntese de Magnetolipossomas Sólidos

O encapsulamento das nanopartículas em magnetolipossomas sólidos foi realizado admitindo que os agregados de nanopartículas apresentam no seu exterior, componentes moleculares com algum grau de hidrofobicidade como sejam os anéis benzênicos na melamina ou as cadeias de polissacáridos. Assim, para a formação de uma camada à volta dos agregados das nanopartículas, foi-lhes adicionada, em água, uma segunda camada lipídica de DPPC na concentração de 1×10^{-3} M, através do método de injeção etanólica, com agitação vigorosa em vórtex. O excesso de lípido foi retirado através de sucessivas lavagens com água.

Para o encapsulamento do composto e de sondas fluorescentes nos SMLs, procedeu-se à funcionalização da superfície das nanopartículas através da amina octadecilamina,

descrito no capítulo 3.2.1, derivado da estrutura em flor e da presença de compostos orgânicos nas nanopartículas.

3.2.1 Prova de formação

A prova de formação da bicamada lípido-agregado foi realizada através da marcação com sondas fluorescentes em cada uma das camadas e recorrendo à técnica de transferência de energia por ressonância de Förster (FRET). A camada do agregado foi marcada com sonda proflavina (atua como doador) com massa molar de 245.71 g/mol e a segunda camada marcada com Nile-Red (atua como aceitante) com a massa molar de 318.4 g/mol. Ambos os compostos foram adquiridos da empresa SigmaAldrich.

Tabela 3.1 - Comprimentos de onda de excitação e de emissão sondas proflavina e nile red.

Sondas fluorescentes	Comprimento de onda de excitação/emissão
Proflavina	430/510 nm
Nile-Red	520/600 nm

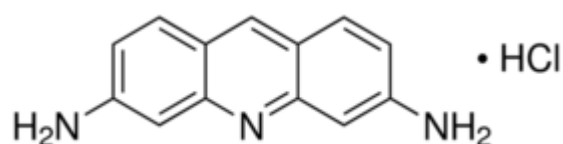


Figura 3.3 - Estrutura química da proflavina.

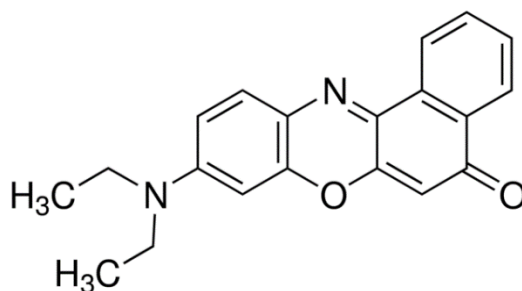


Figura 3.4 - Estrutura química do nile red.

Para o ensaio de prova de formação da bicamada, primeiro procedeu-se ao acoplamento da sonda proflavina à superfície das nanopartículas em forma de flor. Para tal, uma solução contendo 1×10^{-6} mol de nanopartículas em 5 ml de água desionizada foi colocada num banho de gelo, a aproximadamente 0°C e sob agitação magnética. De seguida, adicionou-se $1,2 \times 10^{-6}$ mol de CDI e após 5 minutos $1,2 \times 10^{-6}$ mol de proflavina (75).

Desta solução, foram retirados 100 μl de nanopartículas e procedeu-se à decantação magnética durante uma hora e trinta minutos. O sobrenadante foi descartado, de forma a descartar a proflavina livre e as nanopartículas decantadas foram dispersas em 3 ml de etanol. Esta solução foi aquecida a 60°C para posterior adição de $5,9 \times 10^{-6}$ mol de octadecilamina (ODA), numa proporção de 5:1 face ao número de moles de nanopartículas. Após uma hora de reação, procedeu-se a nova decantação magnética, de forma a retirar o excesso de ODA não ligada, e o solvente foi substituído por água desionizada. Esta solução foi aquecida a 60°C e logo após forte agitação foram injetadas as soluções etanólica de 16,4 μl da sonda hidrofóbica Nile Red, com uma concentração final de 2×10^{-6} M, e 150 μl do lípido DPPC com uma concentração final de 1×10^{-3} M. Foi realizada uma decantação magnética para remover o excedente DPPC que não se tenha ligado.

3.2.2 Interação com modelos membranares (GUV's)

O estudo da interação dos magnetolipossomas com modelos membranares foi executado através da análise da fusão de SML's, sintetizados de acordo o capítulo 3.2, com vesículas unilamelares gigantes (GUVs), enquanto modelos membranares.

Os modelos membranares foram sintetizados com lecitina de soja com massa molar de 776 g/mol.

Primeiro foi feita a evaporação de 300 μl de lecitina de soja com uma concentração final de 0,001 M com corrente de azoto, até se obter um filme. De seguida, foi feita uma pré hidratação do filme com 80 μl de água desionizada e incubação a 45°C durante trinta minutos. Após este período, adicionou-se 6 ml de uma solução aquosa de água desionizada de 6×10^{-4} mol de glucose e procedeu-se à incubação a 37°C por duas horas. Por fim, a solução foi centrifugada durante 30 minutos a 10000 rpm e recolheu-se o sobrenadante, descartando-se o pellet para desprezar restos de agregados lipídicos.

3.3 Estudo fotofísico do composto em solução

As propriedades de absorção e fluorescência do composto JR-333 foram estudadas em vários solventes de maneira a perceber o comportamento do composto em solução. Os solventes utilizados foram o Acetonitrilo, Acetato de etilo, Clorofórmio e Etanol. As soluções nos diferentes solventes foram preparadas com a mesma concentração de composto de $0,5 \times 10^{-5}$ M, de forma permitir a comparação direta.

Antes de medir os espectros, as soluções foram desarejadas por uma corrente de azoto ultrapuro comprimido, durante um período de cerca de quinze minutos. Desta forma o fenómeno de inibição de fluorescência (em inglês, *quenching*) por parte do oxigénio livre nas soluções é evitado.

3.3.1 Rendimento quântico de fluorescência

Os rendimentos quânticos de fluorescência do composto JR-333 foram determinados através da comparação entre a área espectral deste com a de uma referência padrão cujo rendimento quântico é conhecido (76,77).

Este procedimento denomina-se por método do padrão e o valor do rendimento quântico é obtido pela seguinte equação:

$$\phi_s = [(A_r F_s n_r^2) / (A_s F_r n_r^2)] \phi_r \quad (3.1)$$

em que A é o valor da absorvância no comprimento de onda de excitação, F é a área de emissão integrada e n é o índice de refração do solvente utilizado. O subscrito r refere-se ao padrão de referência e o subscrito s refere-se à amostra (do inglês, *sample*). Como padrão foi utilizada uma solução de sulfato de quinino em ácido sulfúrico 0,05 M, de concentração de 1 ppm (partes por milhão).

O rendimento quântico de fluorescência do sulfato de quinino é $\phi_r = 0,546$ a 25°C (78).

3.3.2 Estudo fotofísico do composto em vesículas lipídicas

Foi também feito o estudo dos compostos encapsulados em vesículas lipídicas. O lípido usado na síntese destes lipossomas foi o DPPC numa concentração de 10^{-3} M que foi co-injetado com o composto JR-333 numa concentração de $0,5 \times 10^{-5}$ M, ambos em etanol, em 3 ml de água desionizada. O processo de co-injeção da mistura de lípido e composto em água previamente aquecida a 55°C (acima da temperatura de transição do DPPC), foi realizado gota-a-gota, sob vórtex.

3.3.3 Incorporação do composto ativo nos SML's

O processo utilizado para encapsulamento do composto JR-333 nos SMLs é semelhante ao descrito no capítulo 3.2.2 para a formação dos sistemas. A diferença entre o processo descrito e a incorporação do composto assenta na substituição da sonda Nile Red pelo composto JR-333, numa concentração de $0,5 \times 10^{-5}$ M.

3.3.4 Medidas de anisotropia

A análise da anisotropia engloba a medição de espectros de emissão de fluorescência com polarizadores na vertical e horizontal, nos canais óticos de excitação e de emissão. Os espectros foram traçados acima e abaixo da temperatura de transição de fase do lípido DPPC (41 °C) (33).

Desta maneira, é analisado o comportamento fluorescente do composto ativo em ambientes lipídicos com diferentes arranjos estruturais. Os espectros foram medidos com o lípido na fase gel, abaixo da T_m (≈ 25 °C) e na fase cristalina, acima da T_m (≈ 50 °C).

Foi, ainda, estudado o comportamento do composto JR-333, em glicerol para a determinação da anisotropia intrínseca r_0 da sonda permitindo uma conclusão mais fidedigna acerca da localização do composto nos SML's.

3.3.5 Eficiência de encapsulamento do composto JR-333

A eficiência de encapsulamento do composto JR-333 nos magnetolipossomas foi analisada através do uso de filtros de tipo AMICON®, da empresa SigmaAldrich. Estes possibilitam uma separação de compostos em solução (não encapsulado) do composto encapsulado nos lipossomas e magnetolipossomas através de uma membrana permeável com poros de tamanho controlado.

Sabendo de antemão que os lipossomas são grandes o suficiente para serem bloqueados pela barreira porosa, apenas o composto não encapsulado atravessará a membrana quando sujeito a centrifugação. Assim, após centrifugação a 10 000 rpm durante trinta minutos, foram recolhidas as duas frações da amostra (encapsulado e não encapsulado) para posterior medição dos espectros de emissão de fluorescência.

Como complemento ao estudo de eficiência de encapsulação do composto foi realizada uma reta de calibração do composto JR-333 em SUVs, para posterior interpolação da intensidade de fluorescência da fração de composto não encapsulada

e determinação da respetiva concentração. Foram preparadas cinco soluções de composto a diferentes concentrações e volume final de 3 ml.

As concentrações finais de composto selecionadas foram:

- 1×10^{-6} M;
- $0,8 \times 10^{-6}$ M;
- $0,5 \times 10^{-6}$ M;
- $0,3 \times 10^{-6}$ M;
- $0,1 \times 10^{-6}$ M.

Foram traçados os espectros de emissão de fluorescência das várias soluções, com um comprimento de onda excitação de 360 nm. A partir destes espectros foi traçado um gráfico da intensidade de fluorescência máxima em função da concentração de composto. De seguida foi ajustada uma reta linear entre todos os pontos e obtida a respetiva equação.

3.4 Curvas de sedimentação

Para estudar a estabilidade dos SMLs em solução, foram medidos espectros de absorção dos sistemas em solução ao longo do tempo. Para tal, a estabilidade dos sistemas foi comparada com a estabilidade das nanopartículas. No caso dos SMLs, a síntese dos sistemas é feita de forma semelhante ao descrito no primeiro parágrafo do capítulo 3.2.

Para estes ensaios, foram preparadas soluções de diferentes concentrações para os sistemas e nanopartículas, com concentrações de 0,2%, 0,05% e 0,025% (% m/v).

O processo inicial de sedimentação das NPs descreve uma cinética de primeira ordem seguida de uma diminuição de velocidade de deposição. Os espectros de absorção foram medidos em intervalos de quinze em quinze minutos, durante três horas. Desta maneira, determinou-se a taxa de deposição das NPs através do ajuste dos dados obtidos à função de Becquerel, de acordo com a seguinte equação:

$$I(t) = \frac{1}{[1+(1-\beta)\frac{t}{\tau_0}]^{1/(1-\beta)}} \quad (3.2)$$

onde t é o tempo decorrido na experiência, β é um parâmetro de controlo que varia entre 0 e 1 e τ_0 é uma constante de decaimento.

3.5 Ensaio de libertação do composto

Foram realizados ensaios de libertação do composto JR-333 ao longo do tempo, com e sem aplicação de campo magnético. Neste ensaio, os magnetolipossomas

sólidos carregados com composto foram inoculados na parte superior de eppendorfs delimitados por membranas porosas em contacto com uma solução de SUVs na parte inferior. Foram recolhidos alíquotas de 200 ul da parte inferior dos eppendorfs durante intervalos de 5 minutos na primeira meia hora, de 30 em 30 minutos na seguinte hora de ensaio e de 1 em 1 hora até às 8 horas de ensaio. Um dos ensaios foi realizado na presença de um campo magnético de 0,0024 Tesla e com frequência de 1 MHz. O valor do produto destes parâmetros é de $1,9 \times 10^9 \text{ A.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Este valor, ao qual os sistemas estiveram sujeitos durante os 2 minutos prévios à recolha das alíquotas, está abaixo do limite definido como seguro para aplicações biológicas ($5 \times 10^9 \text{ A.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$) (79). O outro ensaio funcionou como controlo, sem qualquer variável aplicável. Foi medida a intensidade de fluorescência de todas as alíquotas e a cinética de libertação foi ajustada ao modelo de Korsmeyer-Peppas (80) e Weibull, de acordo com as expressões 3.3 e 3.4, respetivamente.

$$\frac{C_t}{C_0} = K t^n \quad (3.3)$$

onde C_t e C_0 são as concentrações no tempo t e 0 , respetivamente, K a taxa de libertação, t o tempo e n é o expoente de transporte. O mecanismo de libertação depende do valor do expoente de transporte e está definido por difusão quando $n < 0,45$; se $0,45 < n < 0,89$, a libertação é controlada por relaxamento; e quando $n > 1$ esta é controlada por inchamento e relaxamento do sistema (81).

$$m = 1 - \exp\left[-\frac{(t-T_i)^b}{a}\right] \quad (3.4)$$

onde a é um parâmetro que define a escala temporal do processo, T_i um parâmetro de localização representando o tempo de latência do mecanismo de libertação (considerado zero muitas vezes), t o tempo e b denota o parâmetro de forma do tipo de curva. De acordo ao reportado para este modelo, de $b > 1$ o mecanismo de libertação é complexo; se $b \leq 0,75$ indica um tipo de transporte por difusão fickiana, e se $0,75 < b < 1$, corresponde a um mecanismo combinado (difusão fickiana e transporte tipo II) (82).

3.6 Ensaio de hipertermia

Os ensaios de hipertermia foram realizados no CINBIO (El Centro de Investigaciones Biomédicas) da Universidade de Vigo.

Estes ensaios permitiram o cálculo da taxa de absorção específica (SAR) e da perda de potência intrínseca (ILP), dois parâmetros que indicam a capacidade que as nanopartículas têm de gerar calor na presença de um campo magnético externo. O SAR

é definido como a quantidade de energia absorvida pela amostra, por unidade de massa (W/g) e pode ser obtido pela equação 3.5 (83).

$$SAR = \left(\frac{C_{pH_2O}}{m_{MnFe_2O_4}} \right) \cdot \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right) \quad (3.5)$$

onde $m_{MnFe_2O_4}$ é a concentração de nanopartículas de ferrites de mangês em flor (em g/L), C_{pH_2O} a capacidade calorífica específica da água e $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ o declive da parte linear da curva de aquecimento.

No entanto, o SAR nem sempre permite a comparação de valores obtidos de diferentes equipamentos uma vez que é um valor intrínseco ao equipamento utilizado e que depende da intensidade e frequência do campo magnético aplicado. De forma a utilizar um valor independente destes parâmetros, foi introduzido o conceito de perda de potência intrínseca (ILP) que pode ser calculado pela expressão 3.6 (83).

$$ILP = \frac{SAR}{H^2 \cdot f} \quad (3.6)$$

em que H (kA/m) e f (kHz) são a intensidade e frequência de campo magnético, respetivamente.

4. Resultados e discussão

4.1 Caracterização das nanopartículas de ferrite de manganês

As nanopartículas produzidas foram caracterizadas por diferentes técnicas para avaliação do seu tamanho, forma, cristalinidade, estabilidade e propriedades magnéticas. Para uma melhor compreensão dos resultados, as nanopartículas foram distinguidas de acordo com o composto orgânico utilizado na sua síntese. Assim, categorizou-se as nanopartículas sintetizadas com carboximetil-dextrano como A1 (adicionado depois da síntese das nanopartículas) e A2 (adicionado antes da síntese das nanopartículas) e as nanopartículas sintetizadas com melamina como B, de acordo com o capítulo 3.1.1.

Foi traçado o espectro de absorção no UV-Visível de uma dispersão das nanopartículas para cada uma das amostras preparadas e os resultados estão apresentados do gráfico 4.1. Observou-se um largo espectro de absorção para todos os tipos de nanopartículas, sendo visível uma banda entre os 350 e os 450 nm, característica de óxidos metálicos que confirmou a síntese das nanopartículas.

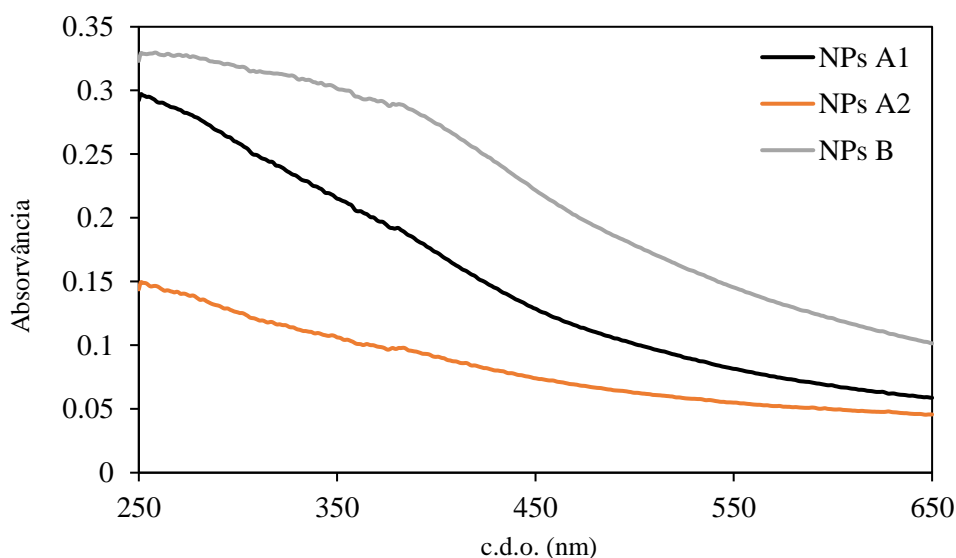


Figura 4.1 - Espectros de absorvância das NPs A1, A2 e B.

4.1.1 Cinéticas de sedimentação das nanopartículas

A avaliação da cinética de sedimentação das nanopartículas permitiu concluir acerca da estabilidade das mesmas em solução aquosa. A sedimentação das nanopartículas rege-se por uma cinética de primeiro grau inicial, seguida de uma

diminuição da velocidade de deposição. Desta maneira, e como já foi referido no capítulo 3.3, as taxas de sedimentação (k) das nanopartículas foram obtidas através do ajuste da função de Becquerel (equação 3.2) aos dados experimentais. Este estudo foi realizado para quatro concentrações distintas de nanopartículas, nomeadamente, 0,025 % (m/v), 0,05 % (m/v) e 0,2 % (m/v) e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Taxas de sedimentação (k) calculadas pela função de Becquerel para as nanopartículas A1, A2 e B.

Concentração % (m/v)	k (min ⁻¹)		
	A1	A2	B
0,025	0,0011	0,0008	0,0017
0,05	0,0016	0,0008	0,0017
0,2	0,0034	0,0009	0,0021

Observou-se que para todas as amostras, a taxa de sedimentação aumenta para valores mais altos da concentração de NPs. Ademais, em geral, as nanopartículas A são mais estáveis, apresentando uma taxa de sedimentação menor do que as B. Entre as nanopartículas sintetizadas com carboximetil-dextrano, observa-se uma menor taxa de sedimentação na amostra A2, o que indica que a adição do composto orgânico antes da síntese das ferrites permite obter nanopartículas mais estáveis, como é possível verificar pelos baixos valores de taxas de sedimentação obtidos para as várias concentrações analisadas. Dado que ambos os compostos orgânicos utilizados são neutros relativamente à sua carga, o tipo de estruturas flor obtidas a partir dos diferentes métodos pode ser o fator determinante para a estabilidade coloidal.

4.1.2 Propriedades magnéticas

A apresentação de um comportamento superparamagnético das nanopartículas sintetizadas é fulcral para o objetivo deste trabalho. Numa fase inicial do trabalho, o comportamento magnético das NPs sintetizadas foi avaliado pela aplicação e remoção de um campo magnético recorrendo a um íman. Nesta fase, foi possível observar que na presença do campo magnético externo, todas as nanopartículas demonstraram

resposta ao mesmo. Adicionalmente, foi ainda possível verificar que a resposta magnética por parte das nanopartículas desaparece quando o campo é retirado (figura 4.1). Estes comportamentos podem indicar um comportamento superparamagnético.



Figura 4.2 - Demonstração do comportamento superparamagnético das nanopartículas através da aplicação de um íman.

As propriedades magnéticas das nanopartículas A1, A2 e B foram avaliadas num equipamento SQUID. Esta técnica permite-nos estudar a dependência do momento magnético em função de um campo aplicado através de curvas de histerese. Na figura 4.2 podemos observar as curvas de histerese das três nanopartículas sintetizadas.

Através destas curvas é possível obter parâmetros importantes para a avaliação do comportamento magnético das nanopartículas. Nomeadamente, os valores de coercividade, magnetização de remanência, magnetização de saturação e ainda calcular a razão entre a remanência e a saturação. A coercividade define o valor do campo magnético inverso necessário para o retorno do fluxo magnético a zero. A magnetização de remanência corresponde à magnetização residual que permanece após a eliminação do campo magnético aplicado e a magnetização de saturação indica o valor máximo de magnetização da amostra. O cálculo da razão entre a magnetização de remanência e a saturação permite avaliar o tipo de comportamento superparamagnético. Os valores obtidos para os parâmetros descritos estão resumidos na tabela 4.2 de forma a uma melhor compreensão e comparação entre os diferentes tipos de nanopartículas preparadas.

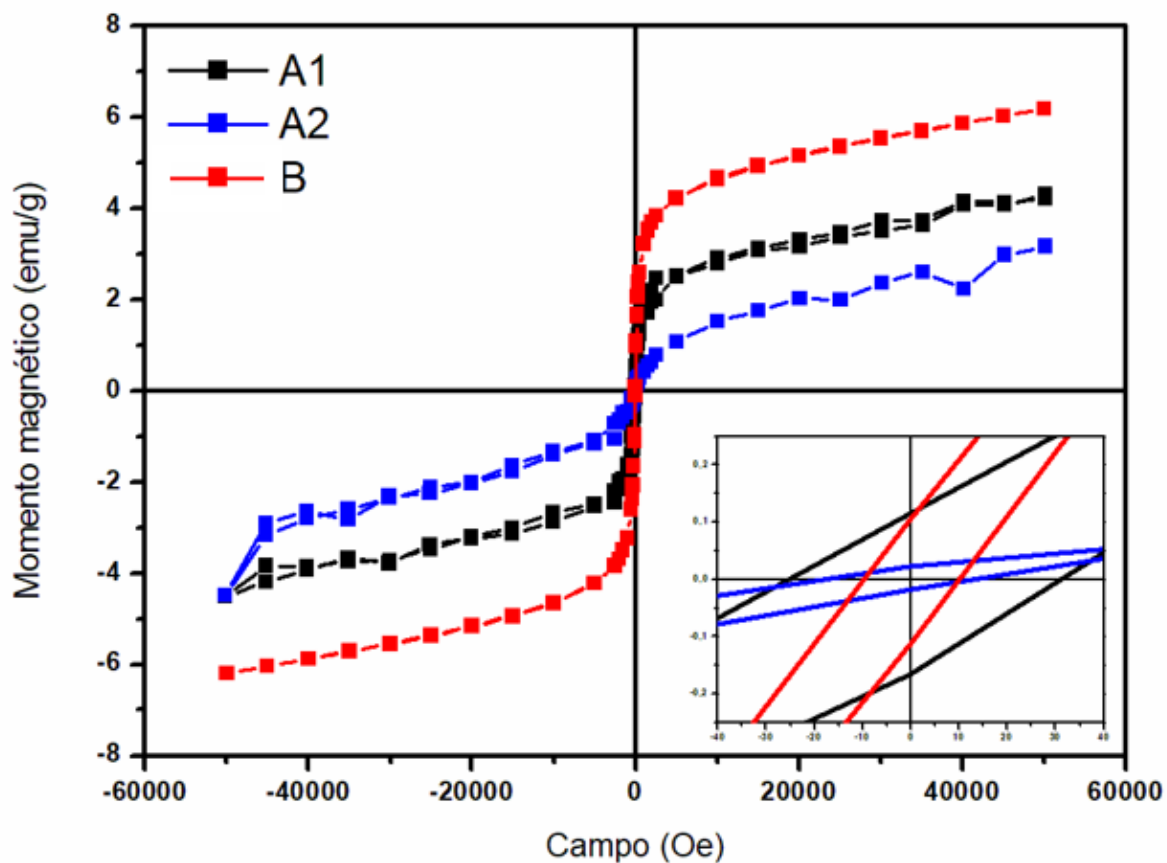


Figura 4.3 - Curva de histerese das nanopartículas manganês tipo flor A1, A2 e B, à temperatura ambiente. Inserido: Ampliação da zona de baixo campo das curvas de histerese.

Tabela 4.2 - Valores de coercividade, magnetização de remanência, magnetização de saturação e razão entre magnetização de remanência e magnetização de saturação (M_r/M_s), obtidos a partir de curvas de histerese, para as várias nanopartículas.

	Coercividade (Oe)	Magnetização de remanência (emu/g)	Magnetização de saturação (emu/g)	M_r/M_s
A1	16,23	0,12	4,30	0,03
A2	9,34	0,02	3,20	0,01
B	25,16	0,11	6,16	0,02

Para todas as nanopartículas preparadas foi possível verificar que os valores da razão entre a magnetização de remanência e de saturação corroboram o comportamento superparamagnético das NPs, apresentando valores abaixo de 0,1 que indicam a perda de mais de 90 % da magnetização após remoção do campo aplicado (84).

Os parâmetros obtidos a partir das curvas de histerese das nanopartículas A1, A2 e B demonstram que as nanopartículas analisadas possuem propriedades magnéticas relativamente semelhantes. As nanopartículas A apresentaram valores de magnetização semelhantes de 4,30 emu/g e 3,20 emu/g para as A1 e A2, respectivamente. No entanto, as nanopartículas A1 apresentam histerese superior, com valores de coercividade e remanescência maiores relativamente aos obtidos para as nanopartículas A2. No geral, as nanopartículas B apresentaram o valor de magnetização mais elevado de 6,16 emu/g.

Os baixos valores de magnetização de saturação obtidos para todas as partículas são comuns neste tipo de estrutura em flor (85).

De acordo com o artigo *“Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs”* as nanopartículas esféricas de ferrite de manganês apresentam valores de coercividade de 6,3 Oe e de 36 emu/g na magnetização de saturação (20). Neste trabalho, os valores de magnetização de saturação estão compreendidos entre 3,20 e 6,36 emu/g, revelando-se

substancialmente mais baixos, o que pode ser um indicativo da estrutura em flor das NPs sintetizadas.

4.1.3 Caracterização por difração de Raios-X

A análise XRD permitiu fazer a caracterização estrutural das nanopartículas de ferrite de manganês antes da formação das estruturas em flor. Na figura 4.3, todos os picos característicos de uma fase cristalina pura de ferrite de manganês estão marcados pelos seus índices de Miller (86). Assim, o Difratoograma obtido na figura 4.3 revelou uma fase cristalina das nanopartículas sintetizadas, confirmando a síntese das ferrites de manganês.

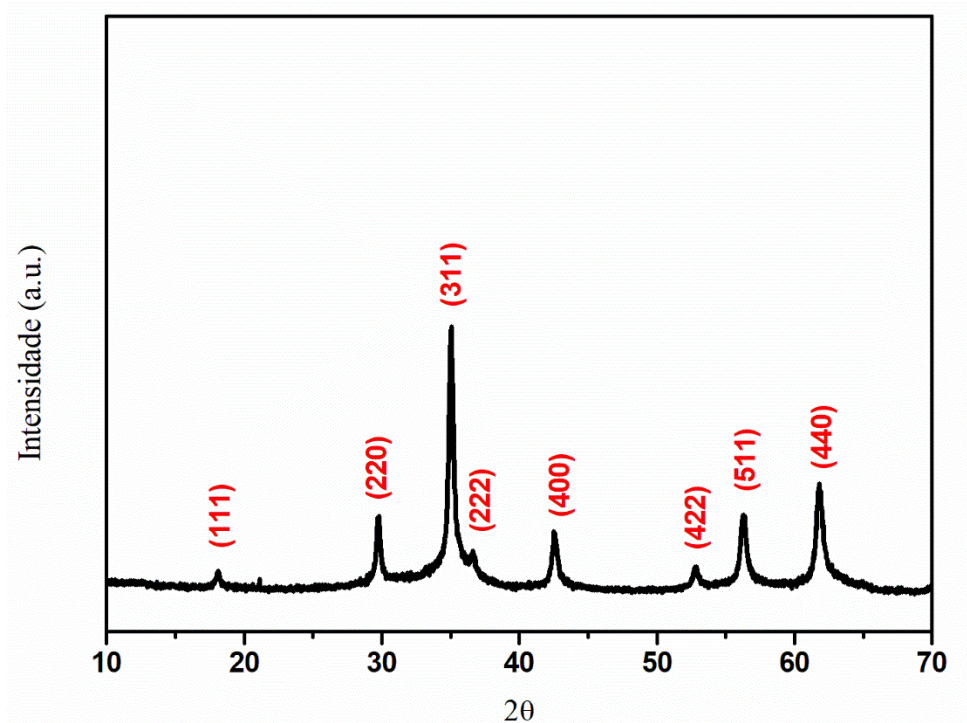


Figura 4.4 - Difratoograma de XRD de nanopartículas de ferrites de manganês.

Foi feita uma análise Rietveld, usando o programa FullProf através do ajuste do fundo por interpolação linear entre pontos com ângulos de *scattering* constantes, mas com intensidades ajustadas. Este ajuste, permitiu estimar a composição e o tamanho das NPs. Os dados obtidos estão sintetizados na tabela 4.3. O valor reduzido de X^2 de 1,69 indica um excelente ajuste. Esta análise revelou uma amostra pura de nanopartículas de ferrite de manganês com tamanhos reduzidos de 16,5 nm. Os tamanhos obtidos indicam que estas NPs são ideais para a formação de estruturas em flor para aplicação biológica.

Tabela 4.3 – Parâmetros de Rietveld de análise selecionados.

Tamanho (nm)	Pureza (%)	χ^2
16,5	100	1,69

4.1.4 Determinação de forma e tamanho por microscopia eletrônica de varrimento (MEV)

A determinação da forma e do tamanho das nanopartículas de ferrite de manganês em estrutura em flor foi realizada pela técnica de MEV. Esta técnica permite observar a distribuição de tamanhos de cada amostra de nanopartículas através de imagens de contraste. Apesar da aglomeração das nanopartículas, é possível observar a forma redonda das nanopartículas.

As nanopartículas de ferrite de manganês, antes da adição do composto orgânico foram previamente observadas por TEM e a imagem obtida está apresentada na figura 4.5 (87). Neste imagem é possível observar que as nanopartículas sintetizadas apresentam tamanhos pequenos, com forma esférica, sendo possível observar alguma partículas de tamanhos maiores. A partir da imagem apresentada foi possível obter uma distribuição de tamanhos de 26 ± 7 nm.

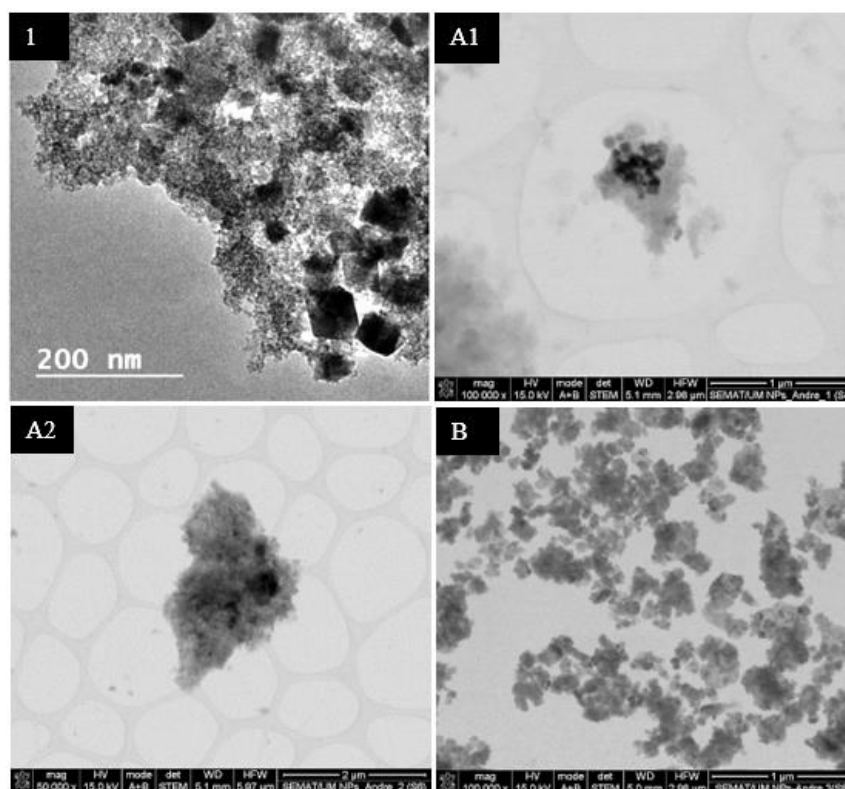


Figura 4.5- Imagens obtidas das ferrites de manganês por TEM (1) e imagens MEV das nanopartículas das amostras A1, A2 e B.

Relativamente às imagens obtidas para as nanopartículas A1, A2 e B, foi possível verificar a forma das nanopartículas e avaliar a capacidade de aglomeração das mesmas em estruturas do tipo flor para os diferentes métodos utilizados. A análise por microscopia permitiu concluir que não houve formação de estruturas em flor para as nanopartículas A1 e A2. No entanto, a utilização de carboximetil-dextrano para a formação deste tipo de estrutura foi já reportada para nanopartículas de estruturas cristalinas com tamanhos de 2 a 5 nm e agregados de 20 a 30 nm (37,88).

Por outro lado, a amostra B revelou estruturas aproximadas ao tipo flor apresentadas na literatura. A partir da figura 4.5 é possível observar aglomerados bem definidos, resultantes da adição da melamina às nanopartículas esféricas de ferrite de manganês. A figura 4.5 foi analisada com o software ImageJ, tendo sido feito uma contagem manual de estruturas em flor selecionadas (35 contagens). As áreas obtidas foram convertidas em diâmetros, e os resultados ajustados à soma de duas Gaussianas, permitindo obter a distribuição de tamanhos da amostra. Foram obtidas duas populações $203,5 \pm 36,84$ nm e $311,2 \pm 34,57$ nm e um coeficiente de correlação de 0,99 que indica um bom ajuste.

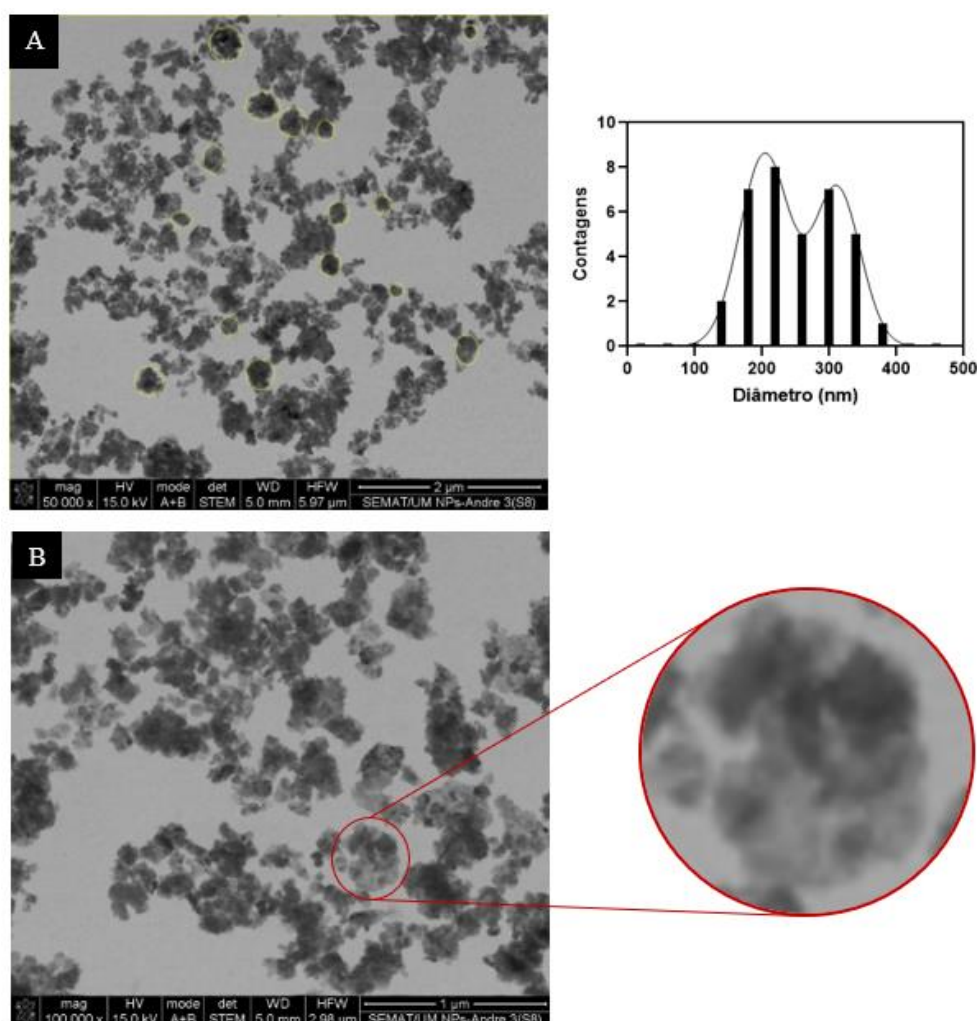


Figura 4.6 - Imagens MEV da amostra B com diferentes ampliações. A: Identificação manual de várias estruturas em flor e correspondente histograma de tamanhos ajustado à soma de duas Gaussinas. B: Identificação e ampliação de uma estrutura em flor.

4.2 Estudo fotofísico do composto JR-333 em vários solventes

O potencial antitumoral do composto JR-333 foi essencial na sua escolha como composto ativo para ser encapsulado nos magnetolipossomas sólidos desenvolvidos. O composto JR-333 é uma molécula fluorescente que foi sintetizada no Centro de Química da Universidade do Minho (CQ-UM). As propriedades fotofísicas de absorção UV-Visível e fluorescência do composto JR-333 foram estudadas em quatro solventes com diferentes polaridades:

- Acetato de etilo;
- Acetonitrilo;
- Clorofórmio;
- Etanol.

Os espectros de fluorescência normalizados do composto JR-333 nos diferentes solventes são apresentados na figura 4.7. São também apresentados os espectros de absorção em etanol e acetonitrilo, inseridos na figura, a título de exemplo.

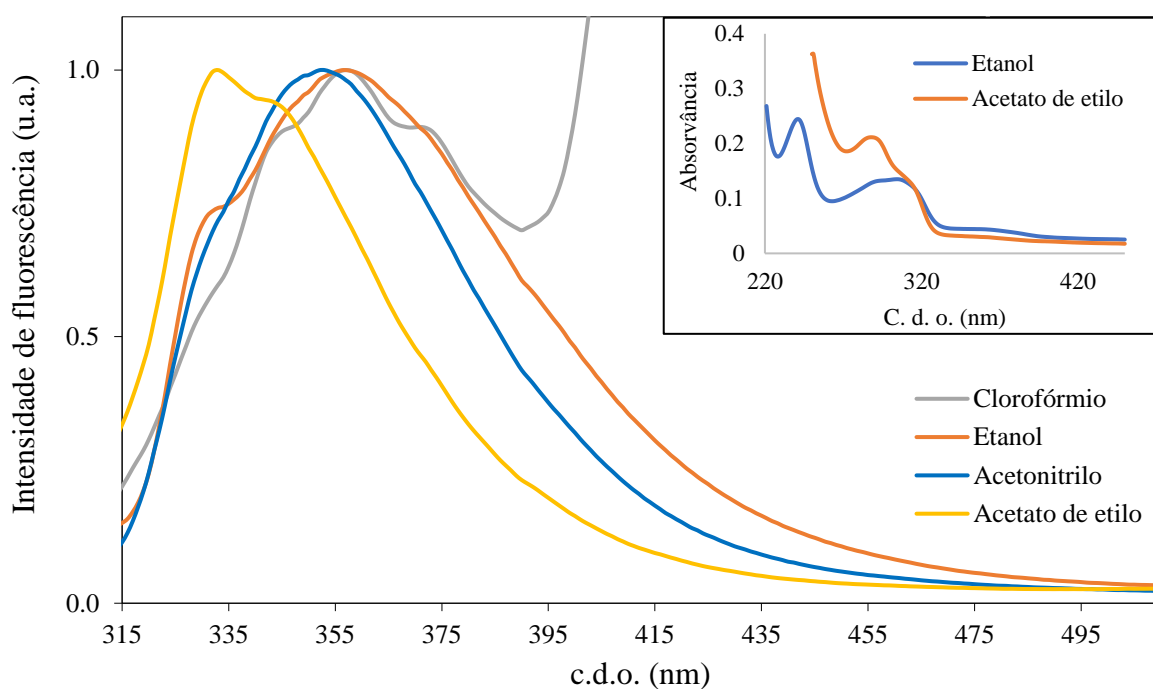


Figura 4.7 - Espectros de fluorescência normalizados do composto JR-333 ($0,5 \times 10^{-5}$ M) ($\lambda_{exc}=300$ nm), nos vários solventes. Inserido: Espectros de absorção do composto ($0,5 \times 10^{-5}$ M) em etanol e clorofórmio.

O composto JR-333 demonstra fluorescência razoável em todos os solventes, com uma banda larga sem estrutura vibracional. Verificam-se ligeiros desvios para o vermelho da banda de emissão à medida que a polaridade do meio aumenta, o que pode ser explicado pelas interações soluto-solvente que alteram o comportamento fluorescente do composto. As pontes de hidrogénio estabelecidas com os prótons do solvente e consequente protonação do átomo N do anel da piridina, podem estar na origem do desvio em etanol. Verifica-se também o alargamento da banda em ambiente

mais polares o que está normalmente associado a mecanismos de transferências de carga intramoleculares e/ou às interações com o solvente (89,90).

Os comprimentos de onda de absorção máximos, coeficientes de absorção molar, comprimentos de emissão e os rendimentos quântico de fluorescência do composto estão dispostos na tabela 4.4. Os rendimentos quânticos de fluorescência foram calculados relativamente ao sulfato de quinino em H₂SO₄ (0,05 M), com $\Phi_F = 0,546$ a 25 °C. A partir da Lei de Lambert-Beer, e tendo em conta que foram utilizadas células de 1 cm na medição destes espectros, foi possível calcular o coeficiente de absorção molar (ϵ), através da razão entre o valor de absorvância máxima do composto e a sua concentração.

Tabela 4.4 - Comprimento de onda de absorção máximo (λ_{abs}) e coeficiente de absorção molar (ϵ), comprimento de emissão (λ_{em}) e rendimento quântico de fluorescência do composto JR-333 em diferentes solventes.

Solvente	λ_{abs}/nm ($\epsilon/10^5M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{em} (nm)	Φ_F
Acetato de etilo	288 (0,11)	333	0,04
Acetonitrilo	301 (0,07)	353	0,03
Clorofórmio	274 (1,23)	336	0,01
Etanol	305 (0,07)	357	0,03

Estudos relativos a outras tienopiridinas estudadas anteriormente em vários solventes revelaram uma diminuição ou inibição completa de fluorescência em ambientes protonados, como o etanol (89). Neste estudo, o composto JR-333 destaca-se por demonstrar um rendimento quântico de fluorescência mais alto em acetato de etilo

(0,04), do que nos restantes solventes. Por outro lado, o composto JR-333 revelou um rendimento quântico de 1 % em clorofórmio.

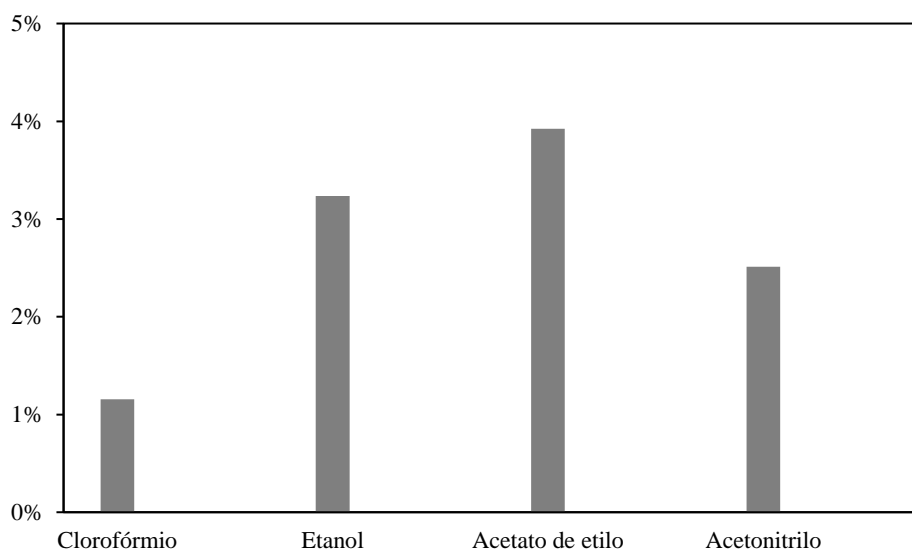


Figura 4.8 - Gráfico comparativo dos rendimentos quânticos de fluorescência do composto JR-333 nos vários solventes.

4.3 Caracterização dos magnetolipossomas sólidos (SMLs)

4.3.1 Cinéticas de sedimentação dos magnetolipossomas sólidos

As nanopartículas sintetizadas foram encapsuladas em lipossomas, formando magnetolipossomas sólidos. As taxas de sedimentação dos sistemas com nanopartículas A2 e B foram obtidas de forma semelhante ao descrito na secção 3.4 e os valores obtidos foram comparados com as taxas de deposição das respetivas nanopartículas isoladas, para a mesma concentração.

Tabela 4.5 - Taxa de sedimentação (k) calculada pela função de Becquerel dos magnetolipossomas sólidos.

	Concentração % (m/v)	k (min ⁻¹)	
		A2	B
SMLs	0,025	0,0023	0,0014
NPs		0,0008	0,0017

Os SMLs baseados nas nanopartículas do tipo A2 revelaram um aumento das taxas de sedimentação relativamente às NPs sozinhas. Por outro lado, os SMLs baseados nas nanopartículas B revelaram uma ligeira diminuição, podendo-se afirmar que o encapsulamento destas NPs nos lipossomas aumenta a sua estabilidade. Assim é possível concluir a formação de estruturas em flor bem definidas, como as NPs B, permite o desenvolvimento de nanossistemas estáveis.

4.3.2 Prova de formação dos magnetolipossomas sólidos por FRET

O fenómeno de transferência de energia por ressonância de Förster (FRET) permitiu estudar a formação da dupla camada dos SMLs. Assim, foram preparados três sistemas de SMLs com as seguintes marcações:

- SMLs com a primeira camada marcada com proflavina, que atuou como doador de energia;
- SMLs marcado com Nile Red, que atuou como aceitador de energia;
- SMLs com ambas as camadas marcadas, com a proflavina (na primeira camada) e com o Nile Red.

Foram traçados os espectros das três amostras, excitando apenas o doador, e pela comparação dos espectros de fluorescência dos três sistemas, foi possível observar o fenómeno de FRET nos magnetolipossomas marcados com ambas as sondas (figura 4.9).

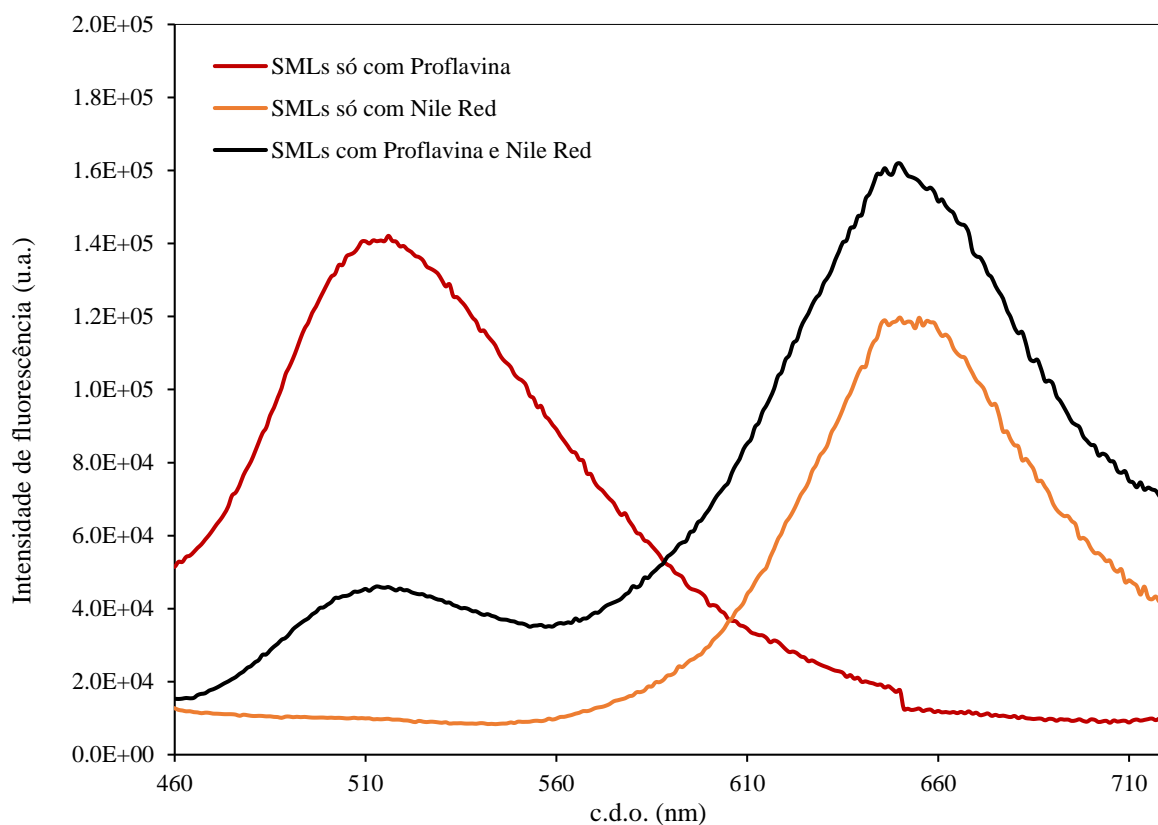


Figura 4.9 - Espectros de fluorescência ($\lambda_{exc} = 380 \text{ nm}$) dos SMLs contendo apenas proflavina ($0,5 \times 10^{-5} \text{ M}$), apenas Nile Red ($0,5 \times 10^{-5} \text{ M}$) e contendo ambas as sondas.

Comparando o espectro dos SMLs só com proflavina com o espectro dos sistemas contendo as duas sondas, é também possível observar uma diminuição da banda do doador para os sistemas contendo o aceitador. Assim, o aumento de intensidade de fluorescência da banda do aceitador e a consequente diminuição da intensidade de fluorescência do doador (proflavina), confirma a existência de FRET entre sondas. Tendo em conta que o FRET só se verifica para distâncias inferiores a 10 nm, é possível confirmar a formação da bicamada à volta das nanopartículas e consequentemente a síntese dos magnetolipossomas sólidos.

Este estudo permitiu calcular a eficiência de FRET, o raio de Förster e a distância entre o complexo doador-aceitante. Os valores destes parâmetros foram calculados a partir das equações 2.12, 2.12 e 2.14 e de acordo ao descrito na secção 2.2.3.2. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Parâmetros da Transferência de energia de Förster: eficiência de FRET (ϕ FRET), raio de Förster (R_0) e distância doador-aceitante (r) obtidos para os ensaios de SMLs.

	ϕ FRET (%)	R_0 (Å)	r (nm)
SMLs	68	13,6	12

Foi calculada uma elevada eficiência de FRET de 68%, com uma distância entre o complexo doador-aceitador correspondente de 12 nm. Dado que a sonda doadora se encontra ligada à superfície das estruturas em flor (juntamente com os anéis benzênicos ou as cadeias de polissacáridos que podem apresentar tamanhos variados) e que a sonda aceitadora é adicionada imediatamente antes da segunda camada lipídica formada por DPPC que possui um tamanho típico de cerca de 3,9 nm, a distância obtida corrobora a formação de uma bicamada à volta das nanopartículas em forma de flor (91). Assim, verifica-se o eficiente encapsulamento das nanopartículas de manganês do tipo flor, culminando na síntese de SMLs.

4.3.3 Caracterização do tamanho e polidispersividade

Para a caracterização do tamanho e polidispersividade dos magnetolipossomas sólidos sintetizados, utilizaram-se as técnicas de difusão dinâmica de luz (DLS) e microscopia MEV. A técnica de DLS permite aferir acerca do tamanho das partículas em solução aquosa através do seu movimento Browniano. Contudo, a técnica de DLS não faz distinção entre os vários tipos de partículas reportando apenas o seu tamanho efetivo. De maneira a garantir bons resultados, a curva de autocorrelação deve ter boas características e o índice de polidispersividade deve ser inferior a 0,3 (92). Foram analisadas três réplicas de cada amostra de SMLs baseados nas nanopartículas A1, A2 e B e os seus valores médios de diâmetro hidrodinâmico, polidispersividade e potencial zeta estão sumarizados na tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Valores médios e desvio padrão de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta dos magnetolipossomas sólidos baseados em nanopartículas de manganês de estrutura em flor, obtidos por DLS.

	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
SMLs A1	242,4 ± 40,0	0,2 ± 0,03	-11 ± 0,70
SMLs A2	330,1 ± 18,2	0,1 ± 0,02	-0,5 ± 0,45
SMLs B	388,4 ± 22,3	0,2 ± 0,11	-2,4 ± 7,42

Pela análise do diâmetro hidrodinâmico, verificam-se tamanhos compreendidos entre os 242 e 388 nm, sendo que os SMLs B apresentaram os valores maiores. Este resultado pode ser justificado pelas estruturas em flor das nanopartículas B, conforme confirmado pela análise MEV apresentada no capítulo 4.1.4. A título de exemplo, na figura 4.10, é apresentado o correlograma da distribuição de tamanhos de SMLs baseados nas nanopartículas A2, mostrando ajustes mais ou menos razoáveis. Assim, verificou-se que o tamanho dos SMLs contendo as nanopartículas B é compatível com os valores obtidos por MEV, para as nanopartículas em flor. Os valores de índice de polidispersividade inferiores a 0,3 para todas as amostras indicam populações mais ou menos homogêneas para os SMLs desenvolvidos. Relativamente à carga superficial, à exceção das nanopartículas A1, os nanossistemas revelaram um potencial zeta neutro, sendo que os SMLs baseados nas nanopartículas A1 apresentaram o valor mais negativo de -11 mV. O lípido constituinte da camada externa dos SMLs, o DPPC, é um lípido zwitteriônico. Assim, o potencial zeta dos magnetolipossomas vai de encontro ao esperado dado à carga neutra do lípido.

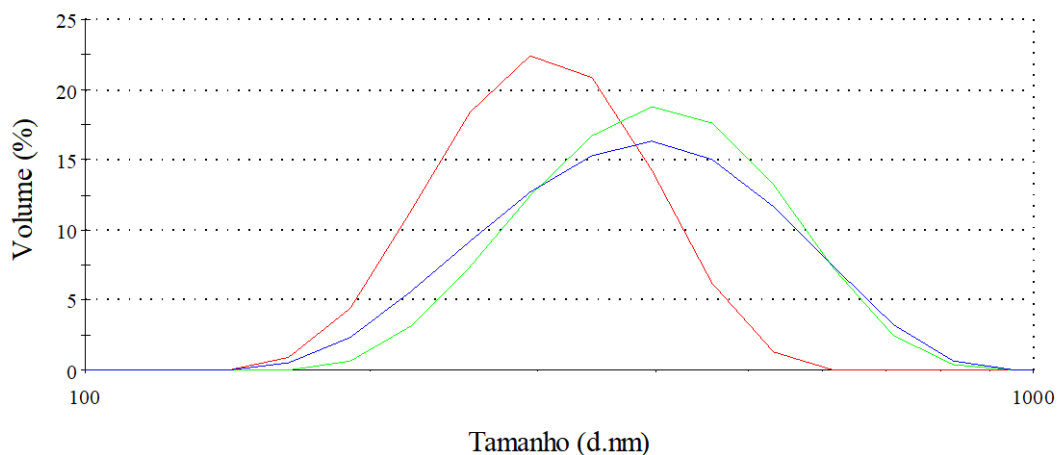


Figura 4.11 - Representação gráfica da distribuição de tamanhos pela intensidade dos SMLs A2.

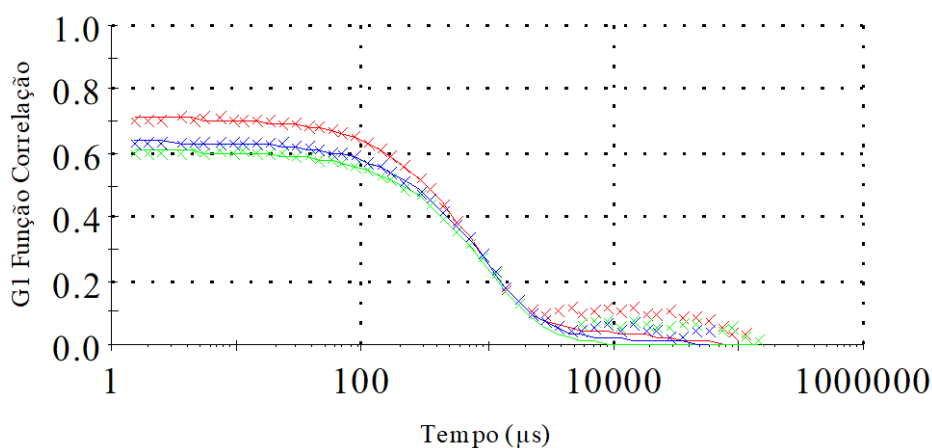


Figura 4.10 - Correlograma da distribuição de tamanhos obtidos para os SMLs baseados nas nanopartículas A2.

A caracterização dos tamanhos e forma dos SMLs preparados foi ainda avaliada por MEV (figura 4.11). Apesar da estrutura dos SMLs poder ser perturbada pela ação do vácuo na preparação da análise MEV, é possível observar SMLs de forma mais ou menos esférica. No geral, os resultados MEV corroboram os dados obtidos pela técnica de DLS, tendo-se medido tamanhos entre os 243 e os 441 nm para os SMLs baseados em nanopartículas A2.

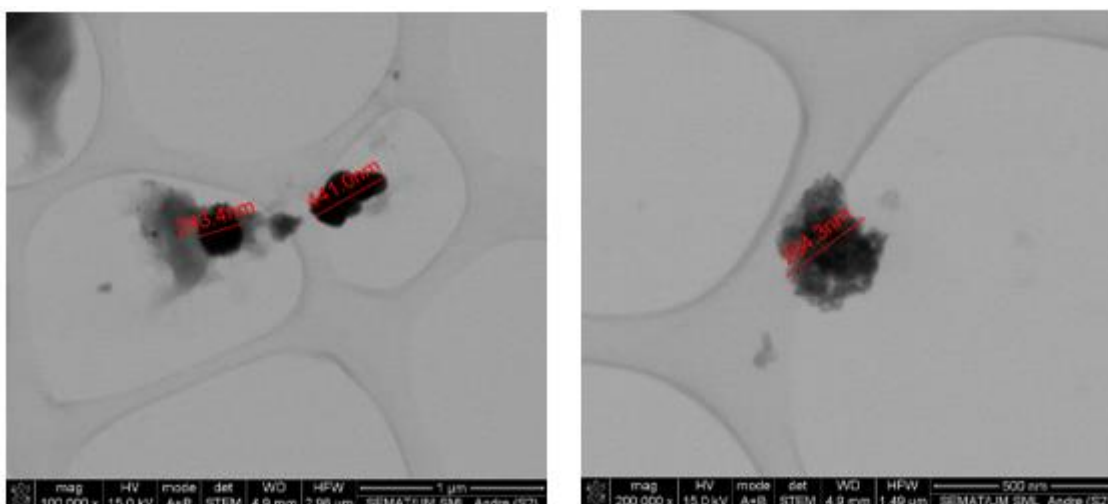


Figura 4.12 - Imagens MEV de SMLs baseados nas nanopartículas A2.

4.4 Encapsulamento do composto JR-333

4.4.1 Estudo fotofísico do composto JR-333 em magnetolipossomas sólidos

É determinante estudar as propriedades fotofísicas do composto JR-333 encapsulado em magnetolipossomas. Este estudo permitiu perceber o seu comportamento em ambientes diferentes e aferir a cerca da sua localização nos nanossistemas. Para tal, procedeu-se à medição da anisotropia de fluorescência (r) que permite correlacionar a anisotropia com a viscosidade do meio. Esta relação define-se pelo aumento do valor de anisotropia com o tempo de correlação rotacional da molécula fluorescente, definido pela equação 2.10 (57).

Dado que viscosidade do meio é dependente da temperatura local, isto permite-nos alterá-la consoante a temperatura local e, conseqüentemente, estudar o comportamento do composto nas diferentes fases estruturais do lípido. O lípido utilizado (DPPC) apresenta uma temperatura de transição de fase de 41 °C (33). Assim, este estudo, foi realizado à temperatura ambiente (25 °C) e acima da temperatura de transição de fase (55 °C). A viscosidade do meio onde o composto se encontra é determinante no valor da anisotropia de fluorescência. Assim, para comparação foram realizadas medidas de anisotropia do composto em glicerol. Este apresenta uma viscosidade de aproximadamente 1000 cP à temperatura ambiente, um valor elevado quando comparado ao intervalo de valores das membranas lipídicas de 100 a 200 cP.

Assim, espera-se que os valores de anisotropia para o composto em glicerol sejam mais elevados do que os valores do mesmo em SMLs.

Os valores de anisotropia de fluorescência do composto JR-333 encapsulado nos SMLs e em glicerol estão apresentados na tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Valores de anisotropia de fluorescência (r) para o composto JR-333 em SMLs abaixo e acima da temperatura de transição de fase do lípido. O valor de anisotropia de fluorescência do composto em glicerol, à temperatura ambiente, é demonstrado para efeitos de comparação.

Formulações	T (°C)	λ_{em} (nm)	r
SML's A1	25 °C	407	0,06
	55 °C	414	0,05
SML's A2	25 °C	385	0,08
	55 °C	351	0,06
SML's B	25 °C	373	0,06
	55 °C	360	0,05
Glicerol	25 °C	331	0,30

Os valores de anisotropia permitiram concluir que o composto JR-333 pode ser transportado na membrana lipídica dos SMLs. Observa-se uma diminuição da anisotropia do composto, em todos os sistemas à temperatura de 55°C. O aumento da temperatura altera a viscosidade da membrana, que por sua vez influencia o tempo de correlação rotacional do fluoróforo (composto). Desta forma, é possível concluir que o composto JR-333 está localizado maioritariamente na membrana dos SMLs, uma vez que foi possível observar a transição de fase do DPPC, constituinte principal dos SMLs. Adicionalmente, é possível ainda concluir que o composto se encontra na parte mais interna da membrana lipídica, visto que os valores de anisotropia são relativamente baixos nos magnetolipossomas sólidos, e a viscosidade da membrana diminui de fora para dentro (93).

A diminuição da viscosidade da bicamada por aquecimento permite a inserção mais profunda do composto em áreas hidrofóbicas do magnetolipossoma, ou seja, áreas internas da camada lipídica.

Pelo estudo realizado no capítulo 4.2, verifica-se que o composto emite uma fluorescência razoável em vários solventes, incluindo o etanol. No gráfico 4.13, a título de exemplo, verifica-se um desvio da banda de emissão do composto para o azul quando encapsulado nos SMLs, o que poderá estar de acordo com uma maior penetração da sonda na camada lipídica.

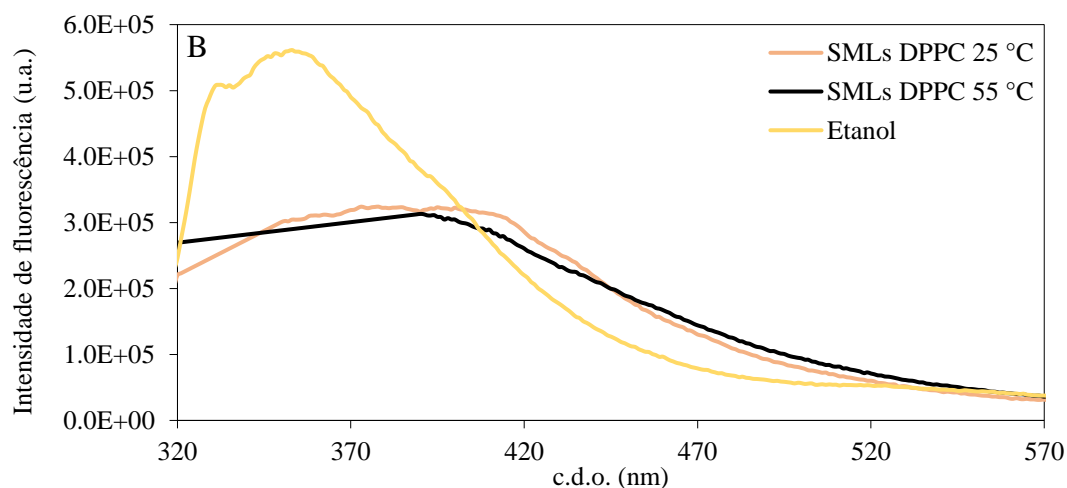


Figura 4.13 - Espectro de emissão de fluorescência do composto JR-333 em SMLs contendo NPs B ($\lambda_{exc} = 300$ nm), à temperatura ambiente (25 °C) e acima da temperatura de transição de fase (55 °C) e do composto JR-333 em etanol.

4.4.2 Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento é um fator fundamental no desenvolvimento de um nanossistema de transporte. Desta maneira, a eficiência de encapsulamento do composto JR-333 nos SMLs desenvolvidos foi calculada. Neste estudo foram feitas três réplicas independentes para cada sistema.

Obteve-se uma taxa de encapsulamento extremamente elevada, de 98 %. Este resultado indica os SMLs como excelentes sistemas de encapsulamento para o transporte magneticamente guiado do composto JR-333. Desta forma, estes SMLs são promissores para a terapia oncológica enquanto agentes terapêuticos por quimioterapia e hipertermia.

4.5 Ensaio de fusão com modelos de membranas

O estudo da interação dos magnetolipossomas com modelos de membrana celular é essencial para avaliar a sua capacidade de fusão. Neste estudo, os GUVs foram

usados como modelos de membrana celular e os SMLs foram carregados com as sondas proflavina e Nile red, à semelhança do capítulo 4.3.2. Este estudo baseou-se no fenômeno de *quenching* das sondas fluorescentes derivado da proximidade entre o fluoróforo e as NPs magnéticas. Estes processos podem ser transferência eletrônica fotoinduzida, ou aumento do ISC por efeito de átomo pesado ou ainda transferência de energia para as nanopartículas.

Foram realizados ensaios de fusão para todos os magnetolipossomas sólidos baseados nas nanopartículas A1, A2 e B. A título de exemplo, são apresentados os espectros dos magnetolipossomas sólidos baseados nas nanopartículas A2, antes e após a interação dos GUVs.

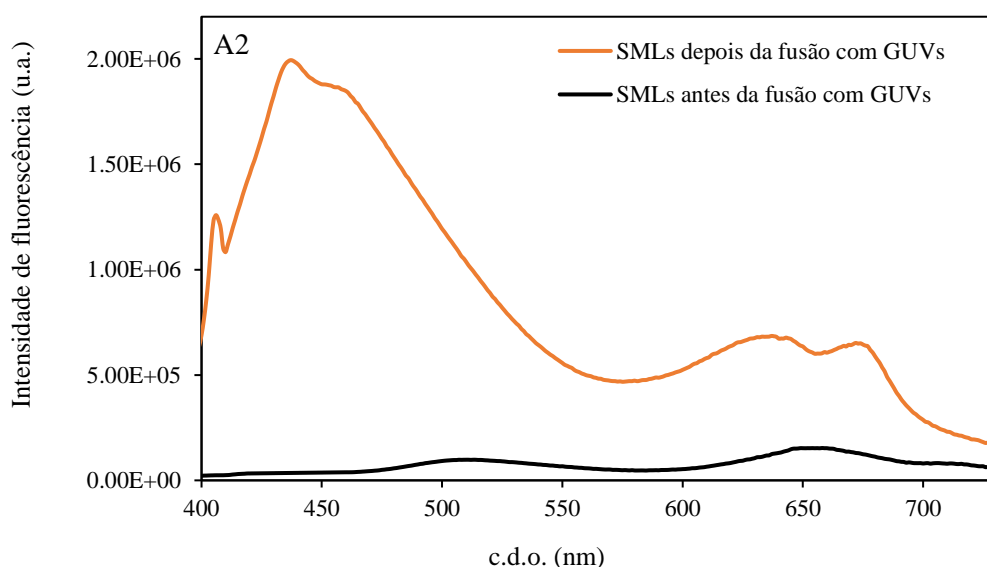


Figura 4.14 - Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 380$ nm) dos SMLs baseados nas nanopartículas A2 com ambas as sondas encapsuladas, antes e depois da fusão com GUVs.

Pela análise do gráfico pode-se observar o aumento de emissão de ambas as sondas após a fusão com GUVs. O aumento da emissão de Nile red dá-se pela diminuição do fenômeno de *quenching* das NPs à medida que a distância entre o fluoróforo e o núcleo dos SMLs aumenta. No caso da proflavina seriam esperados valores equivalentes à da sua emissão em SMLs apenas com proflavina, representado na figura 4.9. Contudo, após fusão com GUVs, verificou-se um aumento de 10 vezes, podendo ser explicado pela possível fuga do fluoróforo para os GUVs, culminando num fenômeno de *unquenching*. Apesar de indicar que o acoplamento da proflavina não é 100 % eficaz,

o fenômeno de *unquenching* corrobora a fusão com modelos membranares, o que comprova a promissora aplicação destes sistemas de transporte no organismo.

4.6 Ensaios de liberação do composto

Os ensaios de liberação do composto JR-333 dos SMLs foram realizados na presença e ausência de um campo magnético, de acordo ao descrito no capítulo 3.5, de forma a avaliar a capacidade de liberação controlada dos sistemas desenvolvidos. Os resultados da liberação cumulativa de composto JR-333 dos SMLs ao longo do tempo estão apresentados na figura 4.15.

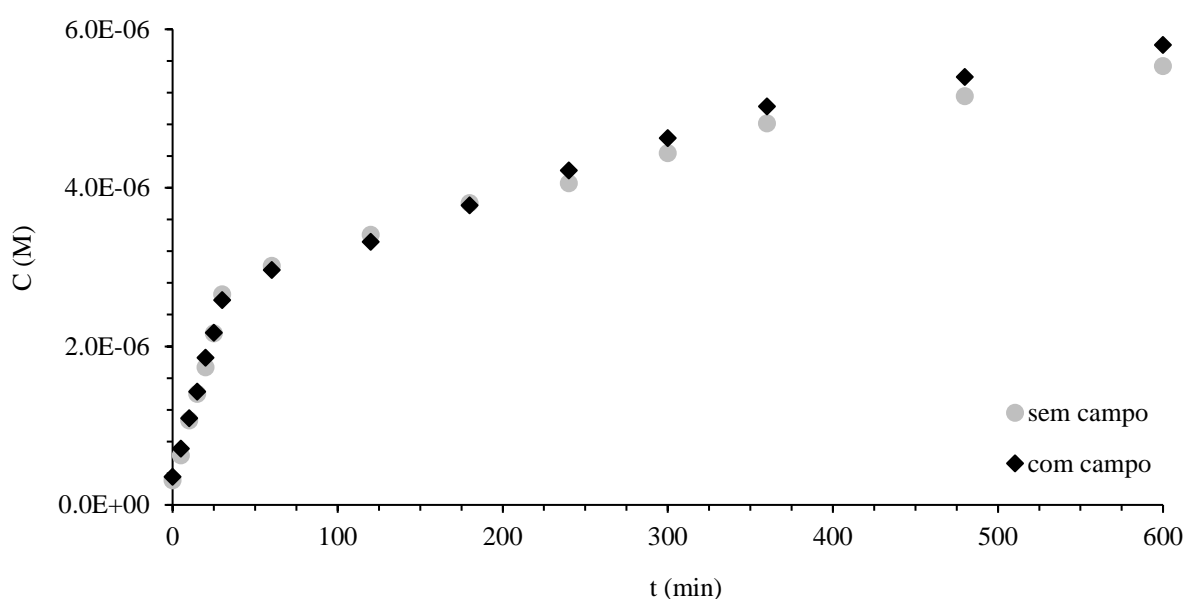


Figura 4.15 -Representação da liberação do composto JR-333 ($4,99 \times 10^{-5}$ M) em SMLs com e sem exposição a campo magnético, ao longo do tempo.

Verificou-se um padrão de liberação semelhante em ambos os ensaios com uma liberação total de cerca de 11,1 % e 11,6 % em 10 horas, para o ensaios na ausência e presença de campo magnético externo, respetivamente. No geral, é possível observar uma liberação acentuada nos primeiros trinta minutos seguida de uma liberação mais lenta até ao fim do ensaio. As liberações obtidas são bastantes semelhantes para os dois ensaios sendo ligeiramente superior na presença de campo externo (figura 4.15). No entanto, a aplicação do campo magnético não teve o impacto esperado, o que pode estar relacionado com a quantidade de NPs usada no ensaio ou nos parâmetros de campo utilizados. Além disso, a própria rigidez do sistema e natureza do composto

JR- 333 podem influenciar a baixa liberação do composto, na presença e ausência de campo externo.

Os resultados obtidos foram ajustados ao modelos de Korsmeyer-Peppas (equação 3.3) e Weibull (equação 3.4), de forma a obter mais informação sobre o tipo de liberação obtida. A título de exemplo, está apresentado na figura 4.16 o perfil de liberação do composto JR-333 ajustado ao modelo de Weibull.

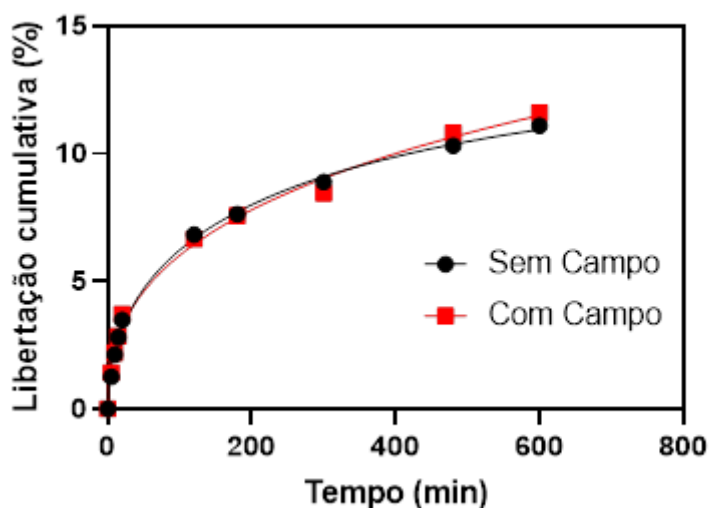


Figura 4.16 - Perfil de liberação do composto JR-333 encapsulado nos SMLs na presença e ausência de campo magnético aplicado, ajustado ao modelo de Weibull.

Os valores constantes e coeficiente de correlação (R^2) foram obtidos para cada modelo estão resumidos na tabela 4.9.

Tabela 4.9 - – Parâmetros obtidos pelos ajustes dos modelos Korsmeyer-Peppas e Weibull, e respectivo coeficiente de determinação (R^2), aos ensaios de liberação do composto JR-333 encapsulado em SMLs, na presença e ausência de um campo magnético aplicado.

	Korsmeyer-Peppas			Weibull			
	k (min^{-1})	n	R^2	$V_{\text{máx}}$	a	b	R^2
Sem campo	0,012	0,34	0,979	14,27	0,052	0,52	0,997
Com campo	0,013	0,35	0,975	31,85	0,029	0,42	0,994

Os valores de coeficiente de correlação para os ajustes Korsmeyer-Peppas e Weibull indicam bons ajustes para ambos os modelos. No entanto, coeficientes de correlação mais elevados foram obtidos para o modelo Weibull o que pressupõe um melhor ajuste deste modelo.

Do ajuste do modelo Korsmeyer-Peppas foram obtidas taxas de libertação bastante semelhantes nos dois ensaios, sendo ligeiramente superior na presença de campo magnético externo. Na tipologia de transporte, ambos os ensaios enquadram-se num transporte por difusão ($n < 0,45$). Também para o modelo de Weibull foi observado um mecanismo de transporte por difusão, com valores do parâmetro b inferiores a 0,75. Para este modelo foi ainda possível estimar uma libertação máxima de 31,85 % na presença de campo, cerca duas vezes superior do que na ausência de campo magnético. Assim, os magnetolipossomas desenvolvidos são um nanosistema promissor para a libertação otimizada do composto JR-333 na presença de um campo magnético externo.

4.7 Ensaios de hipertermia

As curvas de aquecimento e arrefecimento foram obtidas no equipamento magneTherm da nanoTherics, tendo sido usadas três frequências diferentes ($f = 161$ kHz, 270 kHz e 381 kHz) e duas amplitudes de campo ($H = 16$ mT e 17 mT). Antes de iniciar a medição, a temperatura da amostra foi estabilizada e de seguida foi aplicado o campo alternado tendo-se registado a temperatura durante um período de 30 minutos. De seguida, desligou-se o campo aplicado e o arrefecimento da amostras foi registado durante 30 minutos. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 4.17.

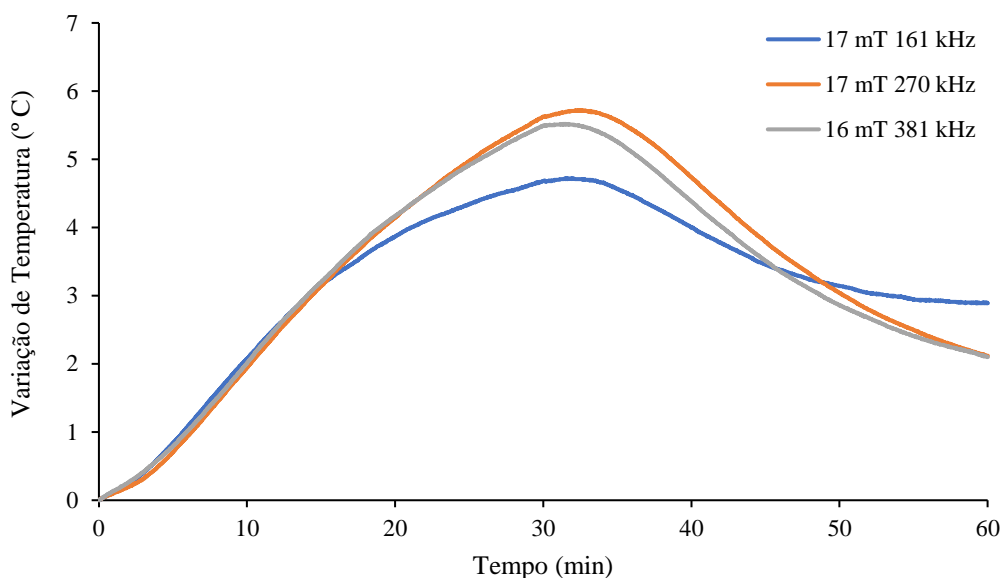


Figura 4.17 - Variação da temperatura das nanopartículas B, na presença de campos magnéticos alternados de amplitude 17 mT com frequências de 161 kHz e 270 kHz e 16 mT com frequência de 381 kHz.

A partir das curvas obtidas, verifica-se um aumento de entre 4 a 6 °C, em 30 minutos, para as várias condições experimentais. O maior aquecimento foi observado para o campo de 17 mT com uma frequência de 270 kHz e as condições de campo 17 mT e 161 kHz revelaram um arrefecimento mais lento.

Na tabela 4.10 estão apresentados os valores de SAR e ILP calculados para as 3 condições experimentais.

Tabela 4.10 - Valores de SAR e ILP, obtidos a partir das curvas de aquecimento e arrefecimento das nanopartículas B.

	17 mT e 161 kHz	17 mT e 270 kHz	16 mT e 381 kHz
SAR ($W g_{MnFe2O4}^{-1}$)	0,12	0,10	0,14
ILP ($nH.m^2/Kg$)	0,46	0,20	0,22

Os valores de SAR obtidos indicam um maior valor de SAR de $0,14 W g_{MnFe2O4}^{-1}$ para o campo de 16 mT com frequência 381 kHz. Por outro lado, um ILP mais elevado foi obtido para o campo de 17 mT e 161 kHz. Valores de ILP entre 0,1 e 0,58 foram reportados para ferrites esféricas dopadas com manganês (94). Assim, os valores

obtidos estão dentro do esperado para este tipo de partículas. No entanto, para avaliar a capacidade de maior geração de calor entre as nanopartículas esféricas e as nanopartículas em forma de flor, no futuro terão de ser feitas curvas de aquecimento para as nanopartículas esféricas (antes da organização em estruturas em forma de flor). Desta maneira, estes dados indicam que, apesar do baixo valor de magnetização de saturação, as NPs obtidas possuem uma boa capacidade de aquecimento devido à sua estrutura em flor. Conclui-se assim, que as NPs produzidas contemplam as características ideais para aplicação em hipertermia e condução guiada de compostos a locais alvos.

5. Conclusão e perspectivas futuras

5.1 Conclusão

Neste trabalho foi possível sintetizar nanopartículas magnéticas de ferrites de manganês do tipo flor usando o composto orgânico melamina. A sua caracterização estrutural permitiu confirmar a sua estrutura em flor com tamanhos de $203,5 \pm 36,84$ nm e $311,2 \pm 34,57$ nm e as medidas magnéticas confirmaram um comportamento superparamagnético. No geral, as NPs B apresentaram os melhores resultados sendo as mais promissoras para o encapsulamento em SMLs. Os ensaios de FRET confirmaram a síntese dos SMLs. Verificaram-se tamanhos, em média, de 388 nm, para os SMLs sintetizados, através da técnica de DLS.

O estudo fotofísico do composto JR-333 revelou que este apresenta emissão de fluorescência que depende do ambiente envolvente. O composto JR-333 foi encapsulado com elevada eficiência de encapsulamento nos SMLs e os estudos de anisotropia de fluorescência revelaram que o composto pode ser transportado na membrana destes sistemas. O estudo de interação com os modelos de membranas confirmou a capacidade de fusão dos SMLs e os ensaios de libertação mostraram que os magnetolipossomas são um nanossistema potencial para a libertação controlada do composto JR-333.

5.2 Perspetivas futuras

Os trabalhos desenvolvidos nesta tese ajudaram na compreensão do comportamento de nanopartículas de tipo flor em sistemas lipídicos. Os resultados são importantes no âmbito do desenvolvimento de nanosistemas de transportes de compostos antitumorais para aplicação em terapia dual do cancro por quimioterapia e hipertermia. Assim, os SMLs devem prolongar o tempo de circulação do fármaco e reduzir os efeitos secundários indesejados.

Como desenvolvimento futuro desta tese, podem ser definidas as seguintes sugestões:

- Ensaios em linhas celulares normais e tumorais dos SMLs com o composto JR-333 encapsulado, de forma a avaliar o seu potencial na terapia do cancro.
- Estudo da citotoxicidade das NPs e dos SMLs.
- Realizar novos estudos de avaliação de libertação do composto sob a influência de campos magnéticos com diferentes parâmetros de amplitude do campo magnético e da sua frequência;
- A análise dos SMLs B através da técnica de MEV seria mais elucidativa acerca dos resultados obtidos por ambas as técnicas. Isto forneceria uma conclusão mais esclarecedora acerca do tamanho dos SMLs visto que as nanopartículas B são as que demonstram estrutura em flor mais satisfatória.

6. Bibliografia

1. World Health Organization (WHO). WHO | Cancer. Who. World Health Organization. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
2. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001.
3. Brú A, Albertos S, Subiza JL, García-Asenjo JL, Brú I. The Universal Dynamics of Tumor Growth. *Biophys J*. 2003.
4. Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, Dahlman JE, Pratt GW, Langer R, et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature Reviews Cancer*. 2012.
5. Baena Ruiz R, Salinas Hernández P. Diet and cancer: Risk factors and epidemiological evidence. *Maturitas*. 2014.
6. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJL, Ezzati M. Causes of cancer in the world: Comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 2005.
7. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med Sci*. 2012.
8. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P, et al. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2016.
9. Vuletic V. Therapies Exposed. *Cancer Cell*. 2001.
10. Mollaoğlu M, Erdoğan G. Effect on symptom control of structured information given to patients receiving chemotherapy. *Eur J Oncol Nurs*. 2014.
11. Ferrari M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. 2005.
12. Ramsden JJ. The nanoscale. In: *Nanotechnology*. Elsevier. 2016.
13. Silva GA. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surg Neurol*. 2004.
14. Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*. 2009.

15. Doane TL, Burda C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. *Chem Soc Rev.* 2012.
16. Carvalho De Jesus PDC, Pellosi DS, Tedesco AC. Magnetic nanoparticles: Applications in biomedical processes as synergic drug-delivery systems. In: *Materials for Biomedical Engineering: Nanomaterials-based Drug Delivery.* Elsevier. 2019.
17. Maria Clara, Sousa DDE, Brochado C. NANOTECNOLOGIA E A SUA APLICAÇÃO À TERAPÊUTICA ONCOLÓGICA Orientadora: Professora Doutora Catarina Pinto Reis. Univ Lusófona Humanidades e Technol. 2013.
18. Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews Clinical Oncology.* 2010.
19. Patient & Caregiver Website | ABRAXANE® (paclitaxel protein-bound particles for injectable suspension) (albumin-bound). Disponível em: <https://www.abraxane.com/>.
20. Rodrigues ARO, Ramos JMF, Gomes IT, Almeida BG, Araújo JP, Queiroz MJRP, et al. Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs. *RSC Adv.* 2016.
21. Rodrigues ARO, Almeida BG, Rodrigues JM, Queiroz MJRP, Calhêha RC, Ferreira ICFR, et al. Magnetoliposomes as carriers for promising antitumor thieno[3,2-b]pyridin-7-arylamines: photophysical and biological studies. *RSC Adv.* 2017.
22. Shirmardi Shaghasemi B, Virk MM, Reimhult E. Optimization of Magneto-thermally Controlled Release Kinetics by Tuning of Magnetoliposome Composition and Structure. *Sci Rep.* 2017.
23. Dreier LB, Wolde-Kidan A, Bonthuis DJ, Netz RR, Backus EHG, Bonn M. Unraveling the Origin of the Apparent Charge of Zwitterionic Lipid Layers. *J Phys Chem Lett.* 2019.
24. Sharma A. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Int J Pharm.* 1997.
25. Salvatore A, Montis C, Berti D, Baglioni P. Multifunctional Magnetoliposomes for Sequential Controlled Release. *ACS Nano.* 2016.

26. Magri A, Petriccione M, Cerqueira MA, Gutiérrez TJ. Self-assembled lipids for food applications: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier. 2020.
27. Chen Y, Bose A, Bothun GD. Controlled Release from Bilayer-Decorated Magnetoliposomes via Electromagnetic Heating. *ACS Nano*. 2010.
28. Nappini S, Bonini M, Bombelli FB, Pineider F, Sangregorio C, Baglioni P, et al. Controlled drug release under a low frequency magnetic field: Effect of the citrate coating on magnetoliposomes stability. *Soft Matter*. 2011.
29. Peetla C, Stine A, Labhasetwar V. Biophysical interactions with model lipid membranes: Applications in drug discovery and drug delivery. In: *Molecular Pharmaceutics*. ACS Publications. 2009.
30. Li M, Du C, Guo N, Teng Y, Meng X, Sun H, et al. Composition design and medical application of liposomes. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier. 2019.
31. Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett*. 1990.
32. Zheng J, Bai C, Peng H, Zhao L, Xiong H. Thermosensitive magnetoliposome – Novel carrier for targeted delivery and triggered release of coix seed oil. *J Magn Magn Mater*. 2020.
33. Burirov V, Garipova R, Sultanova E, Mironova D, Grigoryev I, Solovieva S, et al. New amphiphilic imidazolium/benzimidazolium calixarene derivatives: Synthesis, aggregation behavior and decoration of DPPC vesicles for suzuki coupling in aqueous media. *Nanomaterials*. 2020.
34. Goodarz Naseri M, Saion E Bin, Ahangar HA, Hashim M, Shaari AH. Synthesis and characterization of manganese ferrite nanoparticles by thermal treatment method. *J Magn Magn Mater*. 2011.
35. Rodrigues ARO, Coutinho PJG, Castanheira EMS. Magnetic Lipid-Based Nanosystems for Combined Therapy of Cancer. *RSC Ad*. 2021.
36. LE B, SHINKAI M, KITADE T, HONDA H, YOSHIDA J, WAKABAYASHI T, et al. Preparation of Tumor-Specific Magnetoliposomes and Their Application for Hyperthermia. *J Chem Eng*. 2001.

37. Shubitidze F, Kekalo K, Stigliano R, Baker I. Magnetic nanoparticles with high specific absorption rate of electromagnetic energy at low field strength for hyperthermia therapy. *J Appl Phys*. 2015.
38. Dutz S. Are Magnetic Multicore Nanoparticles Promising Candidates for Biomedical Applications? *IEEE Trans Magn*. 2016.
39. Andresen TL, Jensen SS, Jørgensen K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Progress in Lipid Research*. Elsevier. 2005.
40. Rodrigues JM, Calhelha RC, Ferreira ICFR, Queiroz MJRP. Application of PEG400 in the one-pot synthesis of 7-[4-alkyl- or (hetero)aryl-1H-1,2,3-triazol-1-yl]thieno[3,2-b]pyridines via SNAr and Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition and preliminary evaluation of their anti-tumour activity. *Tetrahedron Lett*. 2020.
41. Jain RK. Barriers to Drug Delivery in Solid Tumors. *Sci Am*. 1994.
42. Dobson J. *Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery*. Wiley. 2006.
43. Phillips M, Fritzsche H. Electromagnetic radiation. *Encycl Br*. 2020.
44. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch. *Principles of Instrumental Analysis*. Cengage. 2018.
45. Mark F. Vitha. *Spectroscopy: Principles and Instrumentation*. Wiley. 2018.
46. Tsang L, Kong JA, Ding K-H. *Scattering of Electromagnetic Waves: Theories and Applications*. Scattering of Electromagnetic Waves: Theories and Applications. 2002.
47. Straughan BP, Walker S. *Spectroscopy*. Science Paperbacks. 1976.
48. H. Förster. *UV/VIS Spectroscopy*. Molecular Sieves – Science and Technology. Springer Berlin Heidelberg. 2004.
49. Perkampus H-H. *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*. UV-VIS Spectroscopy and Its Applications. Springer Berlin Heidelberg. 1992.
50. Mäntele W, Deniz E. UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Elsevier. 2017.
51. Penner MH. *Ultraviolet, Visible, and Fluorescence Spectroscopy*. Springer. 2017.

52. Valeur B. Molecular Fluorescence. In: digital Encyclopedia of Applied Physics. Wiley. 2009.
53. Würth C, Grabolle M, Pauli J, Spieles M, Resch-Genger U. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples. Nat Protoc. 2013.
54. Jameson DM, Ross JA. Fluorescence polarization/anisotropy in diagnostics and imaging. Chem Rev. 2010.
55. Jaehrig F. Structural order of lipids and proteins in membranes: Evaluation of fluorescence anisotropy data. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979.
56. Steiner RF. Fluorescence Anisotropy: Theory and Applications. In: Topics in Fluorescence Spectroscopy. Kluwer Academic Publishers; 2006.
57. Valeur B, Berberan-Santos MN. Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Second Edition. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Wiley. 2012.
58. Loura LMS, Fedorov A, Prieto M. Partition of membrane probes in a gel/fluid two-component lipid system: A fluorescence resonance energy transfer study. Biochim Biophys Acta - Biomembr. 2000.
59. Chen T, He B, Tao J, He Y, Deng H, Wang X, et al. Application of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) technique to elucidate intracellular and In Vivo biofate of nanomedicines. Advanced Drug Delivery Reviews. Elsevier. 2019.
60. Menezes F, Fedorov A, Baleizão C, Valeur B, Berberan-Santos MN. Methods for the analysis of complex fluorescence decays: Sum of Becquerel functions versus sum of exponentials. Methods Appl Fluoresc. 2013.
61. Prodi L, Credi A. Spectrofluorimetry. 2012.
62. S. Schmitz K. Introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules. Elsevier. 1990.
63. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. Biophysical Reviews. 2016.
64. Ian M. Watt. The Principles and Practice of Electron Microscopy. Cambridge University Press. 2012.

65. Akhtar K, Khan SA, Khan SB, Asiri AM. Scanning electron microscopy: Principle and applications in nanomaterials characterization. In: Handbook of Materials Characterization. Springer. 2018.
66. Clarke J, Braginski AI. The SQUID Handbook. Wiley. 2005.
67. Drung D, Aßmann C, Beyer J, Kirste A, Peters M, Ruede F, et al. Highly sensitive and easy-to-use SQUID sensors. In: Transactions on Applied Superconductivity. Institute of Electrical and Electronics Engineers. 2007.
68. Clarke J. Squid Fundamentals. In: SQUID Sensors: Fundamentals, Fabrication and Applications. Springer Netherlands. 1996.
69. Weinstock H, editor. SQUID Sensors: Fundamentals, Fabrication and Applications. SQUID Sensors: Fundamentals, Fabrication and Applications. Springer Netherlands. 1996.
70. Elton LRB, Jackson DF. X-Ray Diffraction and the Bragg Law. Am J Phys. 1966.
71. Warren BE. X-ray diffraction methods. J Appl Phys. 1941.
72. Bunaciu AA, Udriştioiu E gabriela, Aboul-Enein HY. X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. Crit Rev Anal Chem. 2015.
73. SEMAT. Disponível em: <http://www.semat.lab.uminho.pt/>.
74. Woodman EK, Chaffey JGK, Hopes PA, Hose DRJ, Gilday JP. N,N-carbonyldiimidazole-mediated amide coupling: Significant rate enhancement achieved by acid catalysis with imidazole - HCl. Org Process Res Dev. 2009.
75. Padiya KJ, Gavade S, Kardile B, Tiwari M, Bajare S, Mane M, et al. Unprecedented “in water” imidazole carbonylation: Paradigm shift for preparation of urea and carbamate. Org Lett. 2012.
76. Demas JN, Crosby GA. The measurement of photoluminescence quantum yields. A review. J Phys Chem. 1971.
77. Fery-Forgues S, Lavabre D. Are fluorescence quantum yields so tricky to measure? A demonstration using familiar stationary products. J Chem Educ. 1999.
78. Eastman JW. QUANTITATIVE SPECTROFLUORIMETRY-THE FLUORESCENCE QUANTUM YIELD OF QUININE SULFATE. Photochem Photobiol. 1967.

79. Muela A, Muñoz D, Martín-Rodríguez R, Orue I, Garaio E, Abad Díaz De Cerio A, et al. Optimal Parameters for Hyperthermia Treatment Using Biomineralized Magnetite Nanoparticles: Theoretical and Experimental Approach. *J Phys Chem C*. 2016.
80. Tamba Y, Terashima H, Yamazaki M. A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles. *Chem Phys Lipids*. 2011.
81. Cardoso BD, Rodrigues ARO, Almeida BG, Amorim CO, Amaral VS, Castanheira EMS, et al. Stealth magnetoliposomes based on calcium-substituted magnesium ferrite nanoparticles for curcumin transport and release. *Int J Mol Sci*. 2020.
82. Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M, Macheras P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int J Pharm*. 2006.
83. Kallumadil M, Tada M, Nakagawa T, Abe M, Southern P, Pankhurst QA. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. *J Magn Mater*. 2009.
84. Khanna L, Verma NK. Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity study of calcium ferrite nanoparticles. *Mater Sci Semicond Process*. 2013.
85. Lu HM, Zheng WT, Jiang Q. Saturation magnetization of ferromagnetic and ferrimagnetic nanocrystals at room temperature. *J Phys D Appl Phys*. 2007.
86. Dong C, Wang G, Shi L, Guo D, Jiang C, Xue D. Investigation of the thermal stability of Mn ferrite particles synthesized by a modified co-precipitation method. *Sci China Physics, Mech Astron*. 2013.
87. Rodrigues ARO, Ramos JMF, Gomes IT, Almeida BG, Araújo JP, Queiroz MJRP, et al. Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs. *RSC Adv*. 2016.
88. Kekalo K, Baker I, Meyers R, Shyong J. Magnetic Nanoparticles with High Specific Absorption Rate at Low Alternating Magnetic Field. *Nano Life*. 2015.
89. Queiroz MJRP, Dias S, Peixoto D, Rodrigues ARO, Oliveira ADS, Coutinho PJG, et al. New potential antitumoral di(hetero)arylether derivatives in the thieno[3,2-b]pyridine series: Synthesis and fluorescence studies in solution and in nanoliposomes. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2012.
90. Rodrigues ARO, Almeida BG, Rodrigues JM, Queiroz MJRP, Calhelha RC, Ferreira ICFR, et al. Magnetoliposomes as carriers for promising antitumor thieno[3,2-b]pyridin-7-arylamines: photophysical and biological studies. *RSC Adv*. 2017.

91. Needham D. Reverse engineering of the low temperature-sensitive liposome (LTSL) for treating cancer. *Biomater Cancer Ther Diagnosis, Prev Ther.* 2013.
92. Kashanian S, Azandaryani AH, Derakhshandeh K. New surface-modified solid lipid nanoparticles using N-glutaryl phosphatidylethanolamine as the outer shell. *Nanomedicine.* 2011.
93. Bahri MA, Heyne BJ, Hans P, Seret AE, Mouithys-Mickalad AA, Hoebeke MD. Quantification of lipid bilayer effective microviscosity and fluidity effect induced by propofol. *Biophys Chem.* 2005.
94. Gupta R, Tomar R, Chakraverty S, Sharma D. Effect of manganese doping on the hyperthermic profile of ferrite nanoparticles using response surface methodology. *RSC Adv.* 2021.