

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Magnetolipossomas plasmónicos contendo nanovaras  
de ouro para aplicação em terapia dual do cancro

Ana Margarida Macedo Veloso Barros

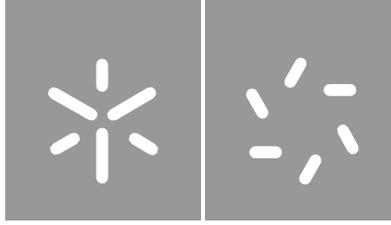
**Magnetolipossomas plasmónicos  
contendo nanovaras de ouro para  
aplicação em terapia dual do cancro**

Ana Margarida Macedo Veloso Barros

UMinho | 2022

Outubro de 2022





Universidade do Minho

Escola de Ciências

Ana Margarida Macedo Veloso Barros

**Magnetolipossomas plasmónicos contendo nanovaras de ouro para aplicação em terapia dual do cancro**

Dissertação de Mestrado em  
Biofísica e  
Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação do(a)  
**Professor Doutor Paulo José Gomes Coutinho**  
**Doutora Ana Rita Oliveira Rodrigues**

## DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

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

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença [abaixo](#) indicada.

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



Atribuição  
CC BY

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

## **Agradecimentos**

No fim de uma etapa tão especial e importante a nível pessoal e académico, começo por agradecer , de forma individual, a todas as pessoas que tornaram este trabalho possível.

Em primeiro lugar, agradecer ao Professor Doutor Paulo Coutinho pela possibilidade de realização deste excelente projeto.

À Doutora Rita Rodrigues, um obrigada especial pela excelente orientação, pelo tempo dedicado, pela paciência e pelos conhecimentos transmitidos. Desejos de, no futuro, me reencontrar contigo.

À Doutora Beatriz Cardoso que me ensinou que as nanopartículas magnéticas não eram feitas apenas de conhecimentos empíricos. Obrigada por me transmitires um amor fascinante, e inigualável, por este mundo “nanométrico”.

Aos meus colegas de laboratório, Mélanie, Rita, Ricardo e Hugo, por me mostrarem que o trabalho, às vezes cansativo e repetitivo, dará sempre frutos no final. Obrigada pela companhia, pelo amparo e, sobretudo, pela experiência.

À minha família, pais e irmão, que serão sempre a razão da minha força diária. A eles que me acalmaram nos dias mais difíceis, que me incentivaram a ser cada dia melhor, e, sobretudo que permitirem continuar a estudar na área que me apaixono todos os dias mais um pouquinho.

Ao João, meu namorado, por ter sido o meu pilar diariamente. Obrigada pela dedicação, pelo carinho e pela compreensão na ausência em alguns momentos.

## DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

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

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

## Resumo

A nanotecnologia tem sido uma área da investigação bastante importante no avanço de novas estratégias para o tratamento do cancro, a principal causa de morte atualmente. As nanopartículas magnéticas são de especial relevância uma vez que permitem o seu direccionamento, quando aplicado um campo magnético externo, podendo adicionalmente ser utilizadas no tratamento do cancro por hipertermia, através da aplicação de um campo magnético alternado.

Neste trabalho desenvolveram-se magnetolipossomas plasmónicos contendo nanopartículas mistas de cálcio e magnésio decoradas com ouro, que tem um efeito hipotérmico através da absorção da luz, para a aplicação na terapia dual do cancro. O efeito combinado de aquecimento local, além de sensibilizar as células, permitirá a libertação controlada de um fármaco a ser transportado pelo sistema em estudo.

Foram preparadas nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio através do método da coprecipitação. Estas nanopartículas foram revestidas com nanopartículas de ouro que diminui a degradação enzimática devendo assim aumentar o tempo de circulação dos nanossistemas in vivo. Posteriormente foram caracterizadas as nanopartículas individualmente e como sistema funcional híbrido. Posteriormente, foram incorporadas em lipossomas obtendo-se assim magnetolipossomas sólidos.

A síntese dos magnetolipossomas sólidos foi conseguida através da técnica de hidratação de um filme lipídico, com algumas alterações (Beatriz D. Cardoso et al., 2021). Foi utilizado para a sua síntese o lípido DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina).

**Palavras chave:** nanopartículas magnéticas, nanopartículas de ouro, terapia fototérmica, nanopartículas híbridas

## **Abstract**

Nanotechnology has been a very important area of research in the development of new strategies for the treatment of cancer, currently the leading cause of death. The magnetic nanoparticles are of special relevance since they allow their targeting, when applied an external magnetic field, and can additionally be used in the treatment of cancer by hyperthermia, through the application of an alternating magnetic field.

In this work, plasmonic magnetoliposomes containing mixed calcium and magnesium nanoparticles decorated with gold, which has a hyperthermal effect through light absorption, have been developed for application in combination cancer therapy. The combined local heating effect, in addition to sensitising the cell, will allow the controlled release of a drug to be transported by the system under study.

Magnetic nanoparticles of mixed calcium-magnesium ferrites were prepared by the coprecipitation method. These nanoparticles were coated with gold nanoparticles which decreases the enzymatic degradation thus should increase the circulation time of the nanosystems in vivo. Subsequently, the nanoparticles were characterised individually and as a hybrid functional system. Subsequently, they were incorporated into liposomes thus obtaining solid magnetoliposomes.

The synthesis of solid magnetoliposomes was achieved through the technique of hydration of a lipid film, with some modifications (Beatriz D. Cardoso et al., 2021). The lipid DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine) was used for its synthesis.

**Key words:** magnetic nanoparticles, gold nanoparticles, Photothermal therapy, hybrid nanoparticles

## Sumário

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Abreviaturas .....	x
Índice de Tabelas .....	xi
1. Introdução e Enquadramento Teórico .....	1
1.1. A importância da Nanotecnologia.....	1
1.2. Nanopartículas Magnéticas.....	2
1.2.1. Nanopartículas de óxido de ferro .....	3
1.2.2. Superparamagnetismo.....	5
1.2.3. Aplicações das nanopartículas magnéticas em nanomedicina.....	7
1.2.4. Hipertermia Magnética.....	8
1.3. Nanopartículas plasmónicas .....	11
1.3.1. Nanovaras de Ouro.....	12
1.3.2. Hipertermia Fototérmica .....	14
1.4. Nanopartículas híbridas .....	15
1.5. Lipossomas.....	16
1.5.1. Composição estrutural .....	16
1.5.2. Classificação estrutural .....	18
1.5.3. Métodos de síntese.....	19
1.6. Lipossomas magneto-plasmónicos.....	20
1.6.1. Lipossomas magneto-plasmónicos como nanossistemas de transporte e libertação controlada .....	21
2. CAPÍTULO II: MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
2.1. Preparação das Nanopartículas Magnéticas .....	23
2.1.1. Síntese de Nanopartículas de Ferrite de Manganês.....	24

2.1.2.	Síntese de Nanopartículas de Ferrite Mista de Cálcio e Magnésio .....	25
2.2.	Síntese de nanovaras de ouro.....	26
2.3.	Acoplamento das nanopartículas magnéticas com as nanovaras de ouro.....	28
2.4.	Magnetolipossomas.....	31
2.5.	Técnicas de Caracterização .....	31
2.5.1.	Espectroscopia de absorção UV-Visível .....	32
2.5.2.	Difusão Dinâmica de Luz .....	32
2.5.3.	Difração de Raios-X.....	33
2.5.4.	Microscopia eletrónica de Transmissão (TEM) .....	34
2.5.5.	Caracterização das propriedades magnéticas .....	34
2.5.6.	Ensaio de Hipertermia Magnética.....	34
2.5.7.	Ensaio de Hipertermia Fototérmica.....	36
3.	CAPÍTULO 3: DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....	37
3.1.	Caracterização das nanopartículas magnéticas .....	37
3.1.1.	Espectroscopia UV-Visível .....	37
3.1.2.	Difração de Raios-X (XRD) .....	39
3.1.3.	Difusão Dinâmica da Luz (DLS).....	41
3.1.4.	Microscopia eletrónica de transmissão (TEM) .....	45
3.1.5.	Propriedades magnéticas.....	48
3.1.6.	Hipertermia Magnética.....	50
3.2.	Caracterização das nanopartículas de ouro .....	51
3.2.1.	Espectroscopia UV-Visível .....	51
3.2.2.	Microscopia eletrónica de transmissão (TEM) .....	52
3.3.	Acoplamento das nanopartículas magnéticas e plasmónicas .....	53
3.3.1.	Ensaio de Hipertermia Fototérmica.....	56
3.4.	Caracterização dos magnetolipossomas plasmónicos.....	58

3.4.1.	Caracterização por difusão dinâmica de luz.....	59
3.4.2.	Ensaio de Hipertermia Fototérmica.....	61
4.	Conclusões e perspectivas futuras .....	62
5.	Bibliografia.....	64

## Lista de Abreviaturas

SPION - nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro

LSP<sub>T</sub>- absorção do plasmão de superfície transversal

LSP<sub>L</sub>- absorção do plasmão de superfície longitudinal

NIR- radiação do infravermelho próximo

DMSO – Dimetilsulfóxido

SAR- taxa de absorção específica

T<sub>m</sub>- temperatura de transição de fase

EPR- efeito de permeabilidade e retenção aumentada

SMLs- magnetolipossomas sólidos

AMLs - magnetolipossomas aquosos

DPPC- dipalmitoilfosfatidilcolina

TEM- microscopia eletrônica de transmissão

XRD- difração raios-X

DLS- difusão dinâmica da luz

SQUID- dispositivo de interferência quântica supercondutor

THF -tetrahidrofurano

CTAB- hexadeciltrimetilamônio

CDI- carbonildiimidazol

ILP- perda de potência intrínseca

PDI - índice de polidispersividade

AMF- campo magnético alternado

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Exemplos de materiais e respectivas aplicações na nanotecnologia nos respectivos setores (Beatriz D. Cardoso et al., 2021).....	2
<b>Tabela 2:</b> Características químicas de diferentes lípidos (Li et al., 2015).....	17
<b>Tabela 3:</b> Massa e concentração final dos precursores metálicos usados na síntese das nanopartículas $MnFe_2O_4$ . ....	24
<b>Tabela 4:</b> Massa e concentração final dos precursores metálicos usados na síntese das nanopartículas de ferrite mista de cálcio e magnésio.....	25
<b>Tabela 5:</b> Concentração e volume dos precursores metálicos usados na síntese das nanopartículas de ouro. ....	27
<b>Tabela 6:</b> Temperatura de reação, tempo de reação e tipo de separação das nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio para cada metodologia.....	30
<b>Tabela 7:</b> Diâmetro hidrodinâmico (DH) e potencial zeta, com os respectivos desvios, obtidos segundo a distribuição de tamanhos por intensidade dos três ensaios realizados.....	43
<b>Tabela 8:</b> Tamanho médio longitudinal e transversal e respectivo desvio padrão das nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio e de ferrites de manganês.....	46
<b>Tabela 9:</b> Tamanho médio das nanopartículas magnéticas obtidos através da técnica de XRD, DLS e TEM. ....	47
<b>Tabela 10:</b> Campo coercivo ( $H_c$ ), magnetização de remanescência ( $M_r$ ), magnetização de saturação ( $M_s$ ), e razão entre a magnetização de remanescência e magnetização de saturação ( $M_r/M_s$ ) para as ferrites $MgCaFe_2O_4$ e $MnFe_2O_4$ . ....	49
<b>Tabela 11:</b> Massa de ouro livre e ligado e a respectiva percentagem de acoplamento para o ensaio A1.....	56
<b>Tabela 12:</b> Compilação dos resultados obtidos dos testes da hipertermia fototérmica. Da esquerda para a direita, temperatura máxima atingida, declive do ajuste linear e a capacidade térmica de aquecimento (SAR).....	58
<b>Tabela 13:</b> Diâmetro hidrodinâmico (DH) e potencial zeta e respectivos desvios obtidos para os SMLs contendo as nanopartículas híbridas.....	60
<b>Tabela 14:</b> Compilação dos resultados obtidos dos testes da hipertermia fototérmica para os magnetolipossomas com nanopartículas híbridas. Da esquerda para a direita, temperatura máxima atingida, declive do ajuste linear e a capacidade térmica de aquecimento (SAR). ....	61

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática da estrutura em espinela. Retirado de (Daniela Sofia Marques Pereira, 2018).....	4
<b>Figura 2:</b> Comportamento magnético de diferentes tipos de materiais.; Ms- Magnetização de Saturação, Mr-Magnetização remanescente e Hc – Coercividade. Retirado de (Daniela Sofia Marques Pereira, 2018).....	6
<b>Figura 3:</b> Concentração do fármaco ao longo do tempo (B) administrado convencionalmente e (A) com sistema de libertação controlada. Retirado de (Pedro Marins Bedê, 2010). ....	8
<b>Figura 4:</b> Efeito da hipertermia moderada na vasculatura tumoral. Adaptado de (Landon, 2011).9	
<b>Figura 5:</b> Valores de SAR para duas soluções de nanopartículas de concentração semelhante (0,5 mg/mL), de forma cúbica e esférica. Retirado de Martinez-Boubeta et al., 2013.....	10
<b>Figura 6:</b> Representação taça de Lycurgus. Imagem da esquerda representa a taça vista na luz transmitida e a da direita a luz refletida. Retirado de (Parveen, 2017a).....	11
<b>Figura 7:</b> Representações do fenómeno de ressonância plasmônica. Retirado de (Daniela José dos Santos Teixeira, 2018).....	12
<b>Figura 8:</b> Representações esquemáticas da célula unitária estrutural do ouro (figuras da esquerda) e da sua malha cristalina (figura da direita). Adaptado de (Estruturas Cristalinas, 2022). ....	12
<b>Figura 9:</b> Espectro de absorção de nanopartículas esféricas de ouro, representado a tracejado, e de nanovaras de ouro, representado a linha cheia. Adaptado de (Parveen, 2017b). ....	13
<b>Figura 10:</b> Ilustração esquemática da hipertermia fototérmica mediada por nanopartículas de ouro. Adaptado de (Kim & Lee, 2018).....	14
<b>Figura 11:</b> A) espectros da densidade ótica das nanovarvas de PEG-ouro (vermelho) e nanoshell de PEG-ouro (azul) em concentrações iguais de ouro e (B) representação esquemática da taxa de aumento de temperatura para soluções. Adaptado de Rozanova & Zhang, 2009.....	15
<b>Figura 12:</b> Representação esquemática de uma nanopartícula magnética revestida por uma camada de ouro A) vista frontal e B) vista transversal. ....	16
<b>Figura 13:</b> Ilustração da estrutura de um fosfolípido. Adaptado de (Vix, 2022). ....	17
<b>Figura 14:</b> Classificação dos lipossomas consoante o seu tamanho e número de lamelas. Adaptado de (Daniela Sofia Marques Pereira, 2018). ....	18
<b>Figura 15:</b> Ilustração do efeito EPR no direcionamento dos magnetolipossomas contendo as nanopartículas magnéticas com aplicação de um campo magnético alternado. Adaptado de (BioRender, 2022).....	19

<b>Figura 16:</b> Representação esquemática do método de hidratação do filme lipídico. Retirado de (Ferreira, 2006).....	20
<b>Figura 17:</b> Representação de SMLs e SMLs. Adaptado de (Veloso et al., 2021).....	21
<b>Figura 18:</b> Ilustração do comportamento do lipossoma DPPC abaixo (fase gel) e acima( fase líquida-cristalina) da temperatura de transição. Adaptado de (Landon, 2011).....	22
<b>Figura 19:</b> Imagem do setup experimental utilizado na síntese de nanopartículas magnéticas. .	23
<b>Figura 20:</b> Processo de lavagem por decantação magnética: (a) após uma lavagem e (b) após três lavagens.....	25
<b>Figura 21:</b> Imagem do esquema de montagem utilizado para a síntese de nanovaras de ouro. 27	
<b>Figura 22:</b> À esquerda o sobrenadante de lavagem após a última centrifugação e à direita o pellet de nanovaras de ouro purificadas, resuspensão em solução de CTAB (2mM). ....	28
<b>Figura 23:</b> Esquema representativo do acoplamento entre as nanopartículas magnéticas de $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ com as nanovaras de ouro.....	29
<b>Figura 24:</b> Esquema experimental das condições do processo de acoplamento. ....	30
<b>Figura 25:</b> Estrutura molecular do lípido DPPC .....	31
<b>Figura 26:</b> Esquema da montagem experimental utilizada para os ensaios de hipertermia fototérmica.....	36
<b>Figura 27:</b> Espectro de absorvância das nanopartículas magnéticas de $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ . ....	37
<b>Figura 28:</b> Gráfico de $\tau_{\text{auc}}$ para as nanopartículas de ferrite mistas de cálcio e magnésio. ....	38
<b>Figura 29:</b> Gráfico de $\tau_{\text{auc}}$ para as nanopartículas de ferrite de manganês.....	39
<b>Figura 30:</b> Difratoograma de XRD obtidos para as nanopartículas de ferrites mistas de cálcio e magnésio. ....	39
<b>Figura 31:</b> Difratoograma de XRD obtidos para as nanopartículas de ferrite de manganês.....	40
<b>Figura 32:</b> Distribuição por intensidade do tamanho das nanopartículas magnéticas de $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ . ....	41
<b>Figura 33:</b> Correlograma das nanopartículas magnéticas de $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ .....	42
<b>Figura 34:</b> Distribuição por intensidade do tamanho das nanopartículas magnéticas de $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ . ....	42
<b>Figura 35 :</b> Correlogramas das nanopartículas magnéticas de $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ . ....	43

<b>Figura 36:</b> Imagem de TEM obtida para as nanopartículas magnéticas de $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ (A). Histograma dos tamanhos, ajustado a uma distribuição Gaussiana, do comprimento transversal (B) comprimento longitudinal (C) e aspect ratio (D) das nanopartículas da imagem A.....	45
<b>Figura 37:</b> Imagem de TEM obtida para as nanopartículas magnéticas de $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ . Histograma de tamanhos, ajustado a uma distribuição Gaussiana (B) das partículas da imagem A. ....	46
<b>Figura 38:</b> Comportamento das nanopartículas de ferrite mistas de cálcio e magnésio (A) e ferrites de manganês (B) com a aplicação de um magneto. ....	48
<b>Figura 39:</b> Ciclo de histerese de magnetização das nanopartículas de $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ , à temperatura ambiente. ....	49
<b>Figura 40:</b> (A) Curva de aquecimento da solução aquosa de nanopartículas de $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e (B) variação da temperatura da mesma solução aquosa, ao longo do tempo. ....	50
<b>Figura 41:</b> Espectros de absorvância das nanopartículas de ouro, em diferentes tempos da reação. ....	51
<b>Figura 42:</b> Imagem de TEM obtida para as nanopartículas de ouro. Histogramas, segundo uma distribuição Gaussiana, do comprimento longitudinal (B) comprimento transversal (C) e aspect ratio (D) das partículas da imagem A. ....	52
<b>Figura 43:</b> Espectros de absorvância das soluções de ouro livre, ouro Total e Nanopartículas híbridas para a metodologia A1, A2 ,B1 e B2. ....	54
<b>Figura 44:</b> Resposta magnéticas das nanopartículas híbridas na (A) presença e (B) ausência do íman. ....	55
<b>Figura 45:</b> Curva de aquecimento e respetivo ajuste linear dos três primeiros minutos de aquecimento, de acordo com o método Initial slope, da solução de nanopartículas de ouro (1), nanopartículas magnéticas totais (2) e nanopartículas híbridas (3). ....	57
<b>Figura 46:</b> Distribuição por intensidade do tamanho dos magnetolipossomas contendo nanopartículas híbridas.....	59
<b>Figura 47:</b> Correlograma dos magnetolipossomas contendo nanopartículas híbridas.....	59
<b>Figura 48:</b> (A) Curva de aquecimento da solução de magnetolipossomas contendo nanopartículas híbridas e (B) Ajuste linear dos três primeiros minutos da curva de aquecimento, de acordo com o método Initial slope. ....	61

## 1. Introdução e Enquadramento Teórico

### 1.1. A importância da Nanotecnologia

O conceito de nanotecnologia surgiu na década de 50, por Richard Feynman, numa palestra denominada por “*There’s plenty of room at the bottom*”, onde questionou o porquê de não se armazenar “enciclopédias” na cabeça de um alfinete. Feynman acreditava na possibilidade de criar elementos pequenos que contivessem elementos ainda mais pequenos. Embora o conceito de nanotecnologia tenha surgido nesta palestra, o seu termo apenas foi só estabelecido em 1974, pelo japonês Norio Taniguchi (1912-1999), aquando da publicação de um artigo que abordava o processo de combinação e separação de átomos e moléculas (Marya Oliveira et al., 2021). Neste trabalho, surge a constatação de que as propriedades físicas e químicas de um material são fortemente influenciadas pelo tamanho do mesmo (Marya Oliveira et al., 2021). Apesar do termo ter surgido, a propagação do conhecimento desta nova área apenas se iniciou em 1986, data de publicação do livro “Engenhos da criação: o advento da era da nanotecnologia” escrito por Eric Drexler (Marya Oliveira et al., 2021).

A palavra nanotecnologia tem origem do grego “nano”, que significa anão. Esta consiste na manipulação, produção e síntese de materiais à escala nanométrica para a criação de novos sistemas funcionais com características diferentes e inovadoras. A esta escala, as propriedades da matéria alteram-se, uma vez que os efeitos da física quântica dominam. Devido às suas propriedades físico-químicas bastante apelativas, a nanotecnologia possui uma vasta gama de aplicabilidade nas mais diversas áreas. A nanotecnologia tem vindo a crescer num campo multidisciplinar, revolucionando as mais diversas áreas. Na **tabela 1** são apresentados alguns exemplos de aplicações atuais da nanotecnologia em diferentes setores (IBERDROLA, 2022).

**Tabela 1:** Exemplos de materiais e respetivas aplicações na nanotecnologia nos respetivos setores (Beatriz D. Cardoso et al., 2021)

Setor	Material	Aplicação
Eletrónica	Nanotubos de carbono; Nanofios quânticos;	Produção de microchips e dispositivos condutores de menores dimensões, mais leves, mais rápidos e eficientes.
Energia	Nanomateriais de dióxido de titânio;	Produção de painéis solares que duplicam a quantidade de luz solar convertida em corrente elétrica.
Biomedicina	Nanovesículas, sensíveis ao pH, como sistemas de entrega de insulina em diabéticos	Ideais para no controlo dos níveis de insulina.
Têxtil	óxido de zinco usado como bloqueadores de radiação UV na composição dos têxteis	desenvolvimento de tecidos inteligentes que não mancham nem amarrutam, assim como de materiais mais resistentes, leves e duradouros.

Neste trabalho experimental, o principal objetivo é o desenvolvimento de um nanossistema multifuncional para o nanoencapsulamento e libertação controlada de fármacos. Este tipo de nanossistemas visa melhorar as terapias convencionais que apresentam falta de especificidade para tecidos doentes. Assim, na terapia oncológica, são ideais para atacar as células cancerígenas sem prejudicar as tecidos saudáveis sendo, portanto, uma ótima alternativa à quimioterapia tradicional.

Apesar de todo o conhecimento adquirido ao longo das últimas décadas no desenvolvimento de nanossistemas para aplicações biológicas, este setor continua a ser um foco de investigação, encontrando-se em permanente expansão. Vários materiais têm sido estudados para o desenvolvimentos de nanossistemas inteligentes. Neste trabalho, iremos focar as nanopartículas magnéticas, plasmónicas e lipossomas.

## 1.2. Nanopartículas Magnéticas

O termo nanopartícula é utilizado para definir partículas que apresentam tamanhos entre os 1-100 nm. Estas têm sido amplamente investigadas e utilizadas na nanomedicina desde os anos 70 (Rogério Mendes Branco, 2013). De entre os diferentes tipos de nanopartículas estudadas, as magnéticas têm sido alvo de grande investigação devido à sua natureza magnética. As

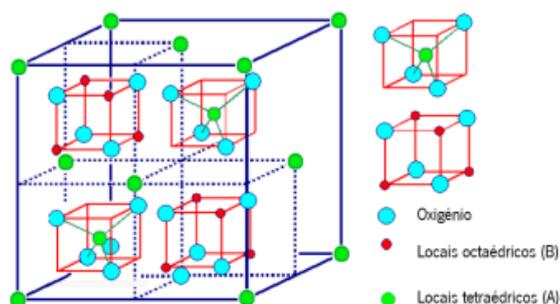
nanopartículas superparamagnéticas podem ser direcionadas através do uso de gradientes magnéticos e, para além disso, têm a capacidade para gerar calor quando submetidas a um campo magnético alternado (Rogério Mendes Branco, 2013). Para além disso, como apresentam remanescência muito pequena, evitam a agregação das nanopartículas magnéticas através de interações dipolo-dipolo.

### 1.2.1. Nanopartículas de óxido de ferro

As nanopartículas magnéticas são compostas por elementos magnéticos (ferro, cobalto, níquel, manganês, etc). Existem duas classes principais de nanopartículas magnéticas: as nanopartículas metálicas e as nanopartículas de óxidos metálicos. As nanopartículas que têm sido mais estudadas e utilizadas na medicina são as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION do inglês, *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*). A magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e a *maghemite* ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) são os óxidos de ferro mais estudados dentro da categoria das SPIONs. As suas propriedades únicas, como elevada biocompatibilidade e estabilidade, são as principais razões da sua utilização. (Agnieszka Włodarczyk et al., 2022). No entanto, estas não podem ser utilizadas como nanosistema no transporte de fármacos uma vez que, sob condições fisiológicas, são instáveis e induzem a formação de radicais (altamente tóxicos). (Elbially et al., 2015).

As ferrites são materiais magnéticos compostos principalmente por óxido de ferro combinados com outros elementos metálicos. Têm a fórmula geral  $\text{MFe}_2\text{O}_4$ , onde M representa o íon metálico divalente, podendo ser  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , entre outros. Tipicamente, as ferrites apresentam estrutura cristalina de espinela. A geometria da estrutura em espinela encontra-se representada na **figura 1**, sendo representada geralmente pela fórmula  $[\text{A}]_{\text{Td}}[\text{B}_2]_{\text{Oh}}\text{O}_4$ , onde Td e Oh se referem aos locais tetraédricos e octaédricos, respetivamente. A distribuição dos íons nas posições Td e Oh é responsável pela magnetização das nanopartículas, e dependendo da sua distribuição as espinelas podem ser normais, invertidas ou parcialmente invertidas. Na estrutura normal, os íons metálicos divalentes  $\text{Me}^{2+}$  ocupam os espaços (A) e os íons de ferro trivalentes  $\text{Fe}^{3+}$  ocupam os espaços (B). Na estrutura espinélio inverso os íons  $\text{Me}^{2+}$  ocupam uma parte dos espaços (B) e  $\text{Fe}^{3+}$  ocupam uma outra parte dos espaços (B) bem como alguns espaços (A). Na estrutura das espinelas parcialmente invertida, os dois íons encontram-se distribuídos entre as duas posições (Rogério Mendes Branco, 2013).

Este trabalho focou-se na síntese de ferrites mistas de cálcio e magnésio ( $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ) e ferrites de manganês ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ). O interesse principal da utilização de nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês é a sua elevada suscetibilidade magnética, que se traduz numa elevada magnetização. Por sua vez, as ferrites mistas de cálcio e magnésio são mais biocompatíveis devido à presença desses mesmos elementos, uma vez que são ambos bastante biocompatíveis.



**Figura 1:** Representação esquemática da estrutura em espinela. Retirado de (Daniela Sofia Marques Pereira, 2018)

O cálcio (Ca) é um elemento químico do grupo 2, de número atômico (Z) 20 e peso atômico 40,078 g/mol. Ferrites de cálcio apresentam características bastante promissoras, como por exemplo, grande estabilidade química (mesmo a altas temperaturas). Para além disso, são biocompatíveis e não são tóxicas para o corpo humano (Pirouz et al., 2015). Por sua vez, o magnésio (Mg) é um elemento químico do grupo 2, de número atômico (Z) 12 e peso atômico 24,305 g/mol (Eduardo Motta Alves Peixoto, 2009). As nanopartículas de ferrite de magnésio possuem várias aplicações, tais como sensores de humidade, agentes de catálise e entrega controlada de fármacos, tal como as nanopartículas de cálcio.

Por fim, o manganês (Mn) é um elemento químico do grupo 7, de número atômico (Z) 25 e peso atômico 54,93 g/mol. As ferrites de manganês são de superior interesse devido à sua elevada suscetibilidade magnética. Estas apresentam boa capacidade de produção de calor e elevado tempo de relaxamento transversal ( $T_2$ ), portanto, são classificadas como excelentes agentes de hipertermia e de contraste para ressonância magnética, respetivamente (Islam et al., 2020).

De acordo com um estudo realizado por Saldívar-Ramírez et al., 2014, que compara a eficiência das nanopartículas de óxido de ferro e de ferrites mistas na hipertermia magnética, as nanopartículas de ferrite de manganês apresentam fortes propriedades magnéticas a temperaturas mais baixas quando comparada com as ferrites mistas de cálcio e magnésio, no

entanto, as ferrites mistas apresentaram valores de coercividade e remanência mais baixos, o que pressupõe um melhor comportamento superparamagnético. Para além disso, os estudos de viabilidade e as curvas de aquecimento apresentaram melhor comportamento. Posto isto, as ferrites mistas de cálcio e magnésio são de grande interesse na aplicação em estudo.

### 1.2.2. Superparamagnetismo

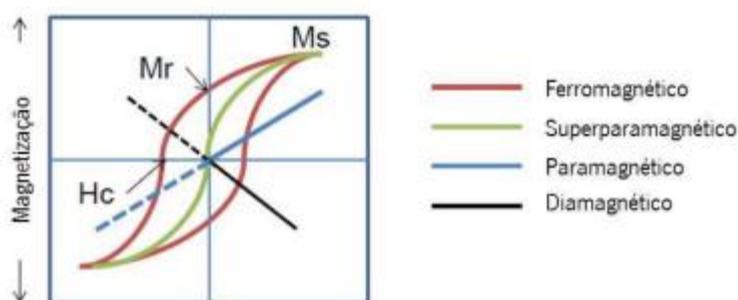
Nas nanopartículas magnéticas, o tipo de magnetismo depende da estrutura molecular e atômica dos materiais, da sua estrutura cristalina e do tamanho, e a classificação do tipo de magnetismo de cada material magnético depende da sua resposta ao campo magnético. De acordo com a esta resposta magnética, os materiais podem ser classificados em diamagnéticos, paramagnéticos ou ferromagnéticos. Os materiais diamagnéticos não apresentam momento magnético na ausência de um campo externo e, na presença de campo, exibem uma ligeira repulsão. Os materiais paramagnéticos apenas apresentam magnetização na presença de um campo magnético, não exibindo magnetização na ausência do mesmo. Já os materiais ferromagnéticos, apresentam magnetização espontânea na ausência de um campo magnético externo aplicado (Daniela Sofia Marques Pereira, 2018). Abaixo de um determinado tamanho, denominado diâmetro crítico, os materiais ferromagnéticos apresentam um comportamento superparamagnético. Este tipo de magnetismo consiste numa elevada magnetização apenas na presença de um campo magnético externo, e, quando este é retirado as partículas perdem a sua magnetização. Assim, um material superparamagnético apresenta um comportamento idêntico ao material paramagnético. No entanto, o superparamagnetismo apresentava uma magnetização de saturação duas ordens de grandeza superior. (Leite, 2013)

Para aplicações biomédicas, nanopartículas que apresentam comportamento superparamagnético são bastante importantes devido a ausência de remanescência magnética e por apresentarem rápidas mudanças no estado magnético quando na presença de campo magnético externo (Rogério Mendes Branco, 2013).

O comportamento superparamagnético foi observado pela primeira vez por Elmore em 1938, porém, o termo superparamagnetismo foi apenas introduzido mais tarde por Bean e Livingston, em 1959. Como já foi referido, este comportamento ocorre em materiais ferromagnético abaixo de um determinado tamanho. Em *bulk*, os materiais ferromagnéticos apresentam uma organização em vários domínios, regiões bem definidas onde os momentos

magnéticos apresentam magnetização espontânea. Estes domínios são separados entre si por paredes de Bloch e, dentro de cada um desses domínios, os momentos magnéticos encontram-se paralelamente alinhados. À medida que o tamanho das partículas diminui, a energia necessária para a formação do domínio aumenta (Ana Rita Oliveira Rodrigues, 2012). Assim, abaixo de um determinado tamanho, a configuração em monodomínio é energeticamente mais favorável e as partículas passam a apresentar um comportamento superparamagnético. Assim, a magnetização das nanopartículas superparamagnéticas resulta da soma dos momentos individuais do monodomínio, apresentado forte momento magnético.

Experimentalmente, a resposta magnética de um material pode ser avaliada através da medição do seu ciclo de histerese. Este mede a dependência da magnetização em função do campo aplicado. Quando se aplica um campo magnético, os spins dos elétrons dos materiais respondem, alinhando-se, ou não, segundo este. Nos materiais superparamagnéticos, os momentos alinham-se com o campo magnético aplicado, sendo que a magnetização máxima do material é atingida quando todos os momentos alinham com o campo. Neste ponto, observa-se a chamada magnetização de saturação ( $M_s$ ). Quando o campo é retirado, a magnetização que se mantém após a remoção do campo é chamada de magnetização remanescente ( $M_r$ ), e o campo coercivo ( $H_c$ ) representa o campo necessário para desmagnetizar completamente o material. Na **figura 2** estão representadas as curvas de histerese de materiais com diferentes comportamentos magnéticos.



**Figura 2:** Comportamento magnético de diferentes tipos de materiais.;  $M_s$ - Magnetização de Saturação,  $M_r$ - Magnetização remanescente e  $H_c$  - Coercividade. Retirado de (Daniela Sofia Marques Pereira, 2018).

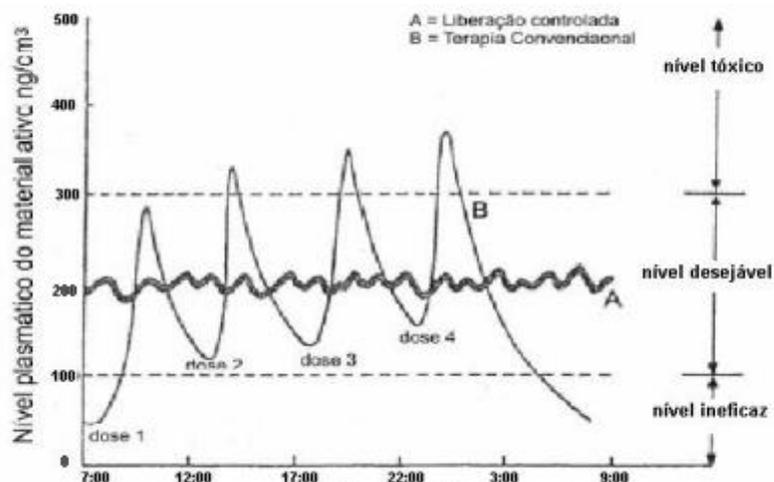
Como observado na figura anterior, ao contrário dos materiais ferromagnéticos (linha vermelha), os materiais superparamagnéticos (linha verde) são caracterizados por não apresentarem histerese. Isto quer dizer, o ciclo de histerese é fechado, apresentando valores de coercividade e remanescência próximos de zero. Assim, as nanopartículas magnéticas, além de possuírem elevada magnetização, são caracterizadas pela ausência de histerese.

### 1.2.3. Aplicações das nanopartículas magnéticas em nanomedicina

Atualmente, as nanopartículas magnéticas são vastamente aplicadas na área da biomedicina, face as características únicas que estas apresentam. O seu potencial é gigante, apresentando capacidade não só para a terapia como também para o diagnóstico. Enquanto agentes terapêuticos, as nanopartículas são promissoras para a entrega controlada de fármacos e para hipertermia magnética. No diagnóstico, apresentam-se como bons agentes de contraste para imagiologia por ressonância magnética. Dentro de cada aplicação, é necessário que cada partícula apresente características específicas para a sua utilização. Para as aplicações abordadas, estas devem apresentar propriedades superparamagnéticas, propriedades químicas e físicas uniformes.

A libertação controlada de fármacos é caracterizada pela libertação dos agentes terapêuticos, encapsulados nos nanossistemas, mediada por estímulos externos. As nanopartículas magnéticas são de elevada importância nesta aplicação uma vez que são conduzidas e retidas em uma região específica do corpo por meio de gradiente de campo magnético externo levando a que a libertação do fármaco ocorra preferencialmente na zona pretendida. Assim, o desenvolvimento de nanossistemas sensíveis a estímulos é uma área de elevado interesse para a libertação controlada de fármacos. (Pedro Marins Bedê, 2010)

Como as nanopartículas magnéticas surgem como alternativa à terapia convencional, por exemplo a quimioterapia, é importante confrontar as mesmas de forma a comparar aspetos negativos e positivos. A **figura 3** confronta estas duas terapias. Neste estudo, relatado por (Pedro Marins Bedê, 2010) , é administrado um fármaco por forma de ingestão, situação B, e outro através de nanopartículas magnéticas, situação A, e é estudada a sua eficácia terapêutica ao longo do tempo.



**Figura 3:** Concentração do fármaco ao longo do tempo (B) administrado convencionalmente e (A) com sistema de libertação controlada. Retirado de (Pedro Marins Bedê, 2010).

Como é observado na figura, a terapia convencional apresenta várias oscilações de concentração ao longo do tempo ao contrário da libertação controlada, que se mantém praticamente constante. Para além disso, a primeira mencionada apresenta, por alguns períodos de tempo, concentrações altas, consideradas tóxicas, ao passo que última mencionada se mantém num nível terapêutico ótimo para tratamento.

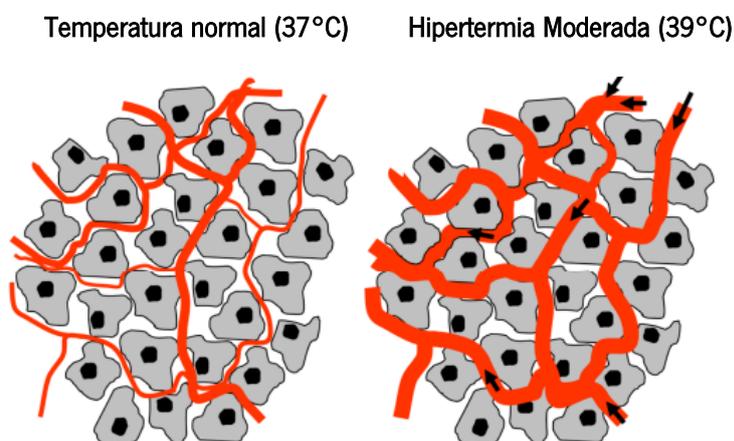
O comportamento evidenciado pela situação B não é o ideal uma vez que se procura uma concentração de fármaco na faixa terapêutica por largos períodos de tempo. (Pedro Marins Bedê, 2010) Em contraste, na situação A, é a ideal na libertação controlada de fármacos.

#### 1.2.4. Hipertermia Magnética

A hipertermia é um tipo de tratamento que se caracteriza pelo aumento da temperatura, no intervalo  $42^{\circ} - 45^{\circ} \text{C}$ , numa área específica. No tratamento oncológico, este tipo de tratamento visa a destruição seletiva das células cancerígenas por ação do calor (Pedro Marins Bedê, 2010). Neste intervalo de temperatura, apenas as células tumorais são sensíveis ao calor, ao passo que as normais não. Isto acontece uma vez que as células tumorais estão inseridas num ambiente hipóxico e ácido e portanto, fatores externos como a temperatura representa um fator de stress para as mesmas (Horsman & Siemann, 2007). Atualmente, este tratamento é usado como terapia adjuvante à radioterapia e quimioterapia, e não de forma isolada.

Além da citotoxicidade provocada pelo sobreaquecimento dos tecidos tumorais, vários estudos têm reportado uma interação sinérgica entre a quimioterapia e a hipertermia, resultando num aumento do efeito citotóxico dos fármacos. Isto tem sido justificado pelo facto de a hipertermia

promover o fluxo sanguíneo no tumor e aumentar a permeabilidade vascular. Como resultado, ocorre um aumento da concentração de fármaco e maior penetração dos mesmos nos tecidos tumorais (figura 4). (Landon, 2011)

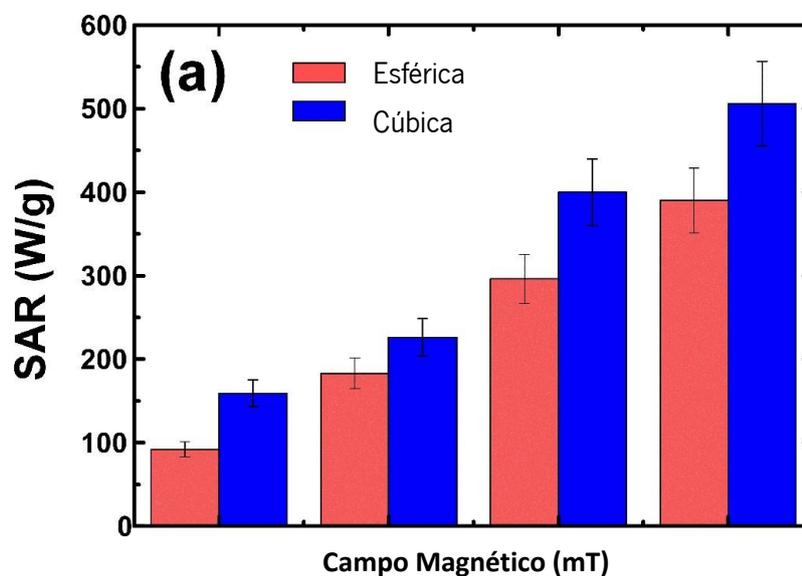


**Figura 4:** Efeito da hipertermia moderada na vasculatura tumoral. Adaptado de (Landon, 2011).

A hipertermia magnética é um tipo de hipertermia que faz uso de nanopartículas magnéticas para geração de calor, na presença de um campo magnético alternado. Neste trabalho, o interesse no uso de nanopartículas como agentes de hipertermia magnética reside no facto de ser possível, através da aplicação de um campo magnético, controlar o direcionamento e a geração de calor no local de interesse (Pereira, 2012).

De acordo com um estudo feito por *Martinez-Boubeta et al., 2013*, a eficiência de aquecimento das nanopartículas magnéticas depende da concentração, tamanho médio e da geometria das mesmas. Ao longo deste são apresentados vários gráficos que esclarecem a relação dos três fatores experimentais em estudo com a capacidade de aquecimento. Para o estudo da influência da concentração, foram sintetizados nanocubos de óxido de ferro de 20 nm em soluções aquosas de dimetilsulfóxido (DMSO) de diferentes concentrações (0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL). Para cada concentração fez-se variar também a intensidade do campo magnético aplicado. Foi observado que para concentrações maiores de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro a capacidade de aquecimento (SAR) diminui. O mesmo foi observado para as várias intensidades de campo magnético aplicado.

Para o estudo da influência da anisotropia, foram preparadas duas soluções de nanopartículas de concentração (0,5 mg/mL), volume e tamanho semelhantes, mas forma diferente (cúbicas e esféricas). Na **figura 5**, foram registados valores de SAR superiores para as nanopartículas cúbicas de 20 nm, evidenciando assim o papel benéfico da anisotropia de superfície no aumento do poder de aquecimento.



**Figura 5:** Valores de SAR para duas soluções de nanopartículas de concentração semelhante (0,5 mg/mL), de forma cúbica e esférica. Retirado de Martinez-Boubeta et al., 2013

Posto isto, é de elevado interesse a exploração da capacidade de aquecimento das nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio e de ferrites de manganês, de forma cúbica, uma vez que demonstram ser bastante promissores como agentes de hipertermia magnética.

A Imagiologia por Ressonância Magnética (IRM) é uma técnica de imagiologia não invasiva de diagnóstico. Esta técnica permite diferenciar o tecido normal do patológico, através das propriedades de relaxação dos átomos de hidrogénio na água. Nas últimas décadas, as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro têm vindo a substituir o complexo de gadolínio, um agente de contraste vastamente utilizado, por apresentar maior biocompatibilidade e possuírem propriedades magnéticas excelentes (Pedro Marins Bedê, 2010). Para além disso, apresentam elevados tempos de relaxamento transversal  $T_2$  e permanecem no tecido por períodos mais longos, em comparação com agentes de contraste comuns. Assim, as nanopartículas supermagnéticas são mais seletivas e mais específicas, permitindo um melhor contraste entre o tecido saudável e patológico (Ana Maria Rodrigues Alves, 2012). Isto traduz-se em melhores imagens com menores doses de agente de contraste.

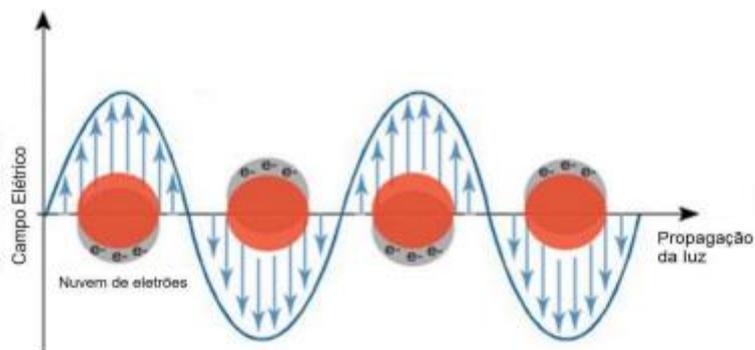
### 1.3. Nanopartículas plasmónicas

As nanopartículas de ouro são o tipo de material plasmónico mais utilizado cuja primeira aplicação conhecida foi verificada num artefato do Império Romano, fabricado há cerca de 1600 anos. Trata-se da taça de Lycurgus (**figura 6**), um objeto decorativo que apresenta uma alternância fascinante de cores do vermelho ao verde. Naquela altura, esta característica tinha apenas um fim decorativo, sendo desconhecida a ciência por detrás da origem das diferentes cores. Atualmente, sabe-se que a variação da cor resulta do facto da taça conter nanopartículas de prata e de ouro, de variados tamanhos, entre 1-100 nm. Tendo em conta a capacidade de absorção e reflexão da luz destas nanopartículas, a taça apresenta cor verde ao refletir luz externa e cor vermelha quando a fonte está em seu interior. (Parveen, 2017)



**Figura 6:** Representação taça de Lycurgus. Imagem da esquerda representa a taça vista na luz transmitida e a da direita a luz refletida. Retirado de (Parveen, 2017a).

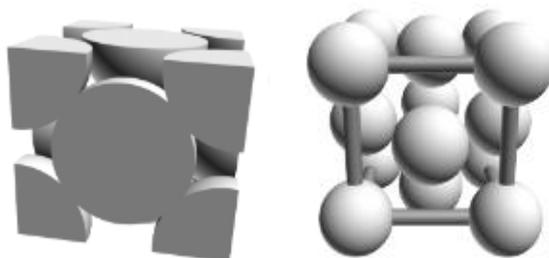
As nanopartículas plasmónicas são um tipo de nanopartículas que apresentam um efeito de ressonância de plasmão de superfície (SPR), representado na **figura 7**. Este fenómeno ocorre quando a frequência de oscilação dos eletrões da superfície apresentam a mesma frequência da radiação incidente. Como resultado, este tipo de nanopartículas pode absorver luz dessa frequência com maior eficiência e, em consequência do seu largo espectro de absorção, são caracterizadas pela capacidade de conversão de luz em calor, através de processos não radiativos. (Daniela José dos Santos Teixeira, 2018)



**Figura 7:** Representações do fenômeno de ressonância plasmônica. Retirado de (Daniela José dos Santos Teixeira, 2018).

### 1.3.1. Nanovaras de Ouro

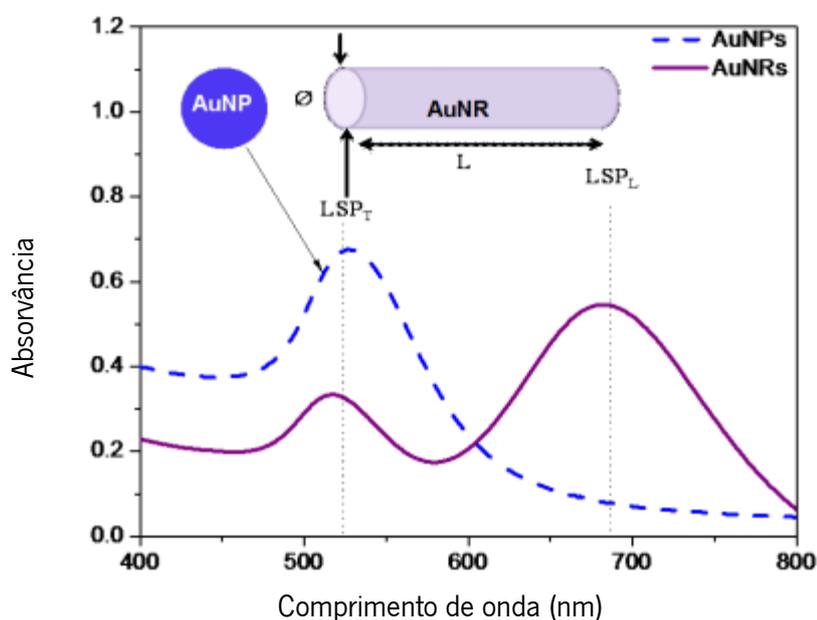
Neste trabalho serão preparadas nanopartículas de ouro, em forma de nanovaras. O ouro é um elemento químico de bastante interesse, uma vez que apresenta características únicas como a baixa toxicidade, baixa reatividade, facilidade de bioconjugação e excelentes propriedades óticas. (Geraldos et al., 2015) À temperatura ambiente, o ouro apresenta uma estrutura cristalina cúbica de face centrada, representada na **figura 8** (*Estruturas Cristalinas*, 2022).



**Figura 8:** Representações esquemáticas da célula unitária estrutural do ouro (figuras da esquerda) e da sua malha cristalina (figura da direita). Adaptado de (*Estruturas Cristalinas*, 2022).

As propriedades óticas das nanopartículas de ouro estão fortemente relacionadas com o tamanho e forma das mesmas, uma vez que as interações com a radiação eletromagnética (luz) leva a oscilações do campo elétrico local, cuja densidade depende então da forma e tamanho da superfície. Isso traduz-se em absorção e reflexão de luz que depende da forma e tamanho das nanopartículas. (Naiara Teodosio Dos Santos, 2013). Dentro das várias formas, as nanovaras de ouro têm sido os mais utilizados. (Parveen, 2017)

Uma característica das nanovaras de ouro é a presença de duas bandas de absorção (**figura 9**, linha preenchida), ao contrário das esféricas que apresentam apenas uma banda. Como é observável na **figura 9**, a absorção do plasmão de superfície transversal ( $LSP_T$ ) surge da oscilação transversal dos elétrons na região do UV-Vis. Por outro lado, a absorção do plasmão de superfície longitudinal ( $LSP_L$ ) ocorre mais à frente, podendo ser observada na região do Visível ou NIR. A localização da banda  $LSP_L$  depende da proporção entre o comprimento e a largura, conhecido como *aspect ratio*, sofrendo um deslocamento para a região NIR à medida que o *aspect ratio* aumenta. Esta região é de elevada importância uma vez que há uma forte absorvância e assim a penetração do tecido pode ser maximizada (Loo et al., 2005).

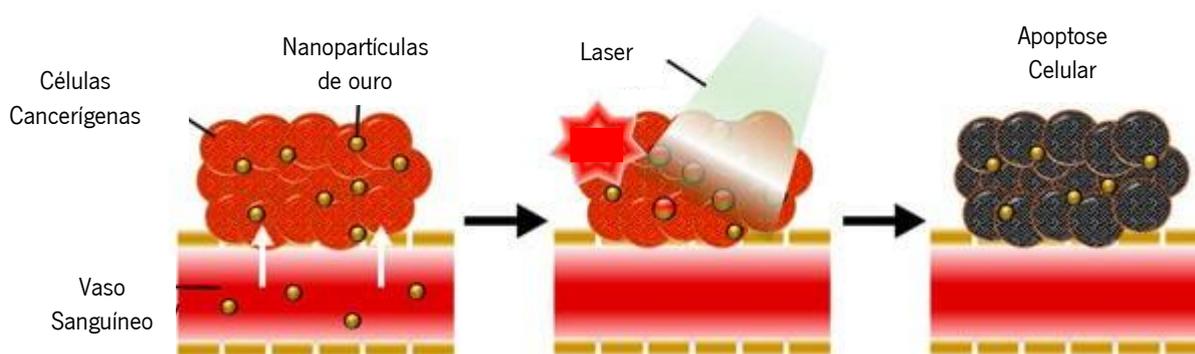


**Figura 9:** Espectro de absorção de nanopartículas esféricas de ouro, representado a tracejado, e de nanovaras de ouro, representado a linha cheia. Adaptado de (Parveen, 2017b).

De acordo com um estudo feito por *Huang et al., 2006*, que retrata a eficiência de aquecimento das nanovaras de ouro, ligadas a um anticorpo -EGFR, a potências de laser diferentes, estas partículas podem ser usados como um agente fototérmico seletivo e eficiente. Com base no mesmo, o valor de SAR mínimo para se verificar qualquer efeito foi de  $10 \text{ W/cm}^2$ . Este valor é menor do que aquele necessário para partículas de ouro shell, o que constitui uma grande vantagem para estas. Essa diferença pode ser justificada pela área de absorção maior na região NIR.

### 1.3.2. Hipertermia Fototérmica

A terapia fototérmica é um tipo de hipertermia que faz uso da capacidade de conversão de luz em calor das nanopartículas plasmônicas, para fins terapêuticos. Assim, este tratamento consiste numa primeira fase de injeção local das nanopartículas no tecido tumoral, seguida da irradiação com fonte luz NIR. Desta forma, é gerado um sobreaquecimento local do tecido tumoral e consequente morte celular (**figura 10**) (Kim & Lee, 2018).

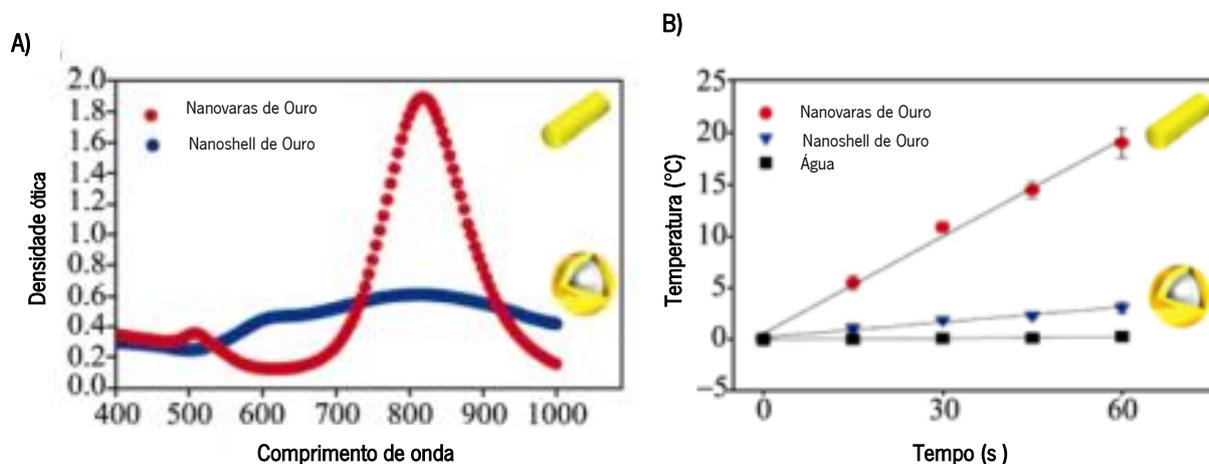


**Figura 10:** Ilustração esquemática da hipertermia fototérmica mediada por nanopartículas de ouro. Adaptado de (Kim & Lee, 2018).

Atualmente existe uma grande variedade de materiais para potencial aplicação enquanto agentes fototérmicos com diferentes composições, estruturas, formas e revestimentos de superfície. Idealmente, os agentes fototérmicos devem apresentar baixa toxicidade e biocompatibilidade, boa capacidade de ser eliminado por vias metabólicas, fácil funcionalização e excelente eficiência de conversão de luz em calor. De acordo com estas características, as nanopartículas de ouro apresentam-se como agentes fototérmicos de excelência, uma vez que possuem alta eficiência de conversão de luz em calor. (Kim & Lee, 2018)

No estudo realizado por Rozanova & Zhang, 2009, foi comparada a eficiência de aquecimento das nanopartículas de ouro em forma de nanovara e nanoshell. Ao longo deste são apresentados vários gráficos, sendo que apenas serão evidenciados aqueles que esclarecem a evidente relação da forma com a absorvância e a capacidade de aquecimento. Para o estudo da eficiência de aquecimento foram preparadas soluções de ouro, nas duas formas estudadas, de concentração igual a 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

De acordo com a **figura 11**, adaptada da **figura 4** do artigo, conclui-se que a densidade óptica das nanovaras é quase 4 vezes maior do que a forma em nanoshell, na região espectral NIR, e que a temperatura aumentou quase 8 vezes mais nas nanovaras.



**Figura 11:** A) espectros da densidade óptica das nanovaras de PEG-ouro (vermelho) e nanoshell de PEG-ouro (azul) em concentrações iguais de ouro e (B) representação esquemática da taxa de aumento de temperatura para soluções. Adaptado de Rozanova & Zhang, 2009.

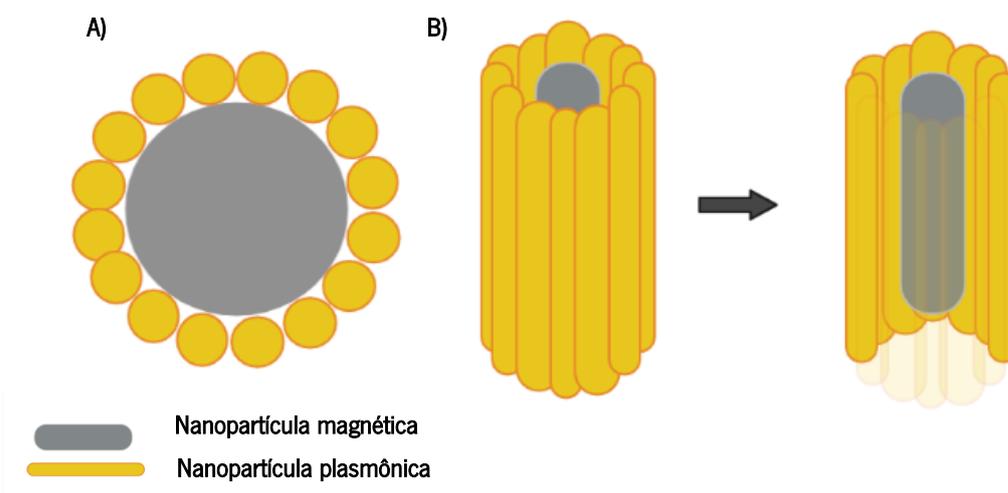
Posto isto, a capacidade de aquecimento das nanovaras é muito superior à dos nanoshells indicando que estes são melhores agentes de fototerapia.

#### 1.4. Nanopartículas híbridas

As nanopartículas híbridas são nanocompósitos constituídos por dois tipos de materiais diferentes que visam a junção de diferentes propriedades num só material, levando a uma combinação ou melhoria das propriedades dos dois nanomateriais. (López-Lorente et al., 2011).

Nos últimos anos, tem sido demonstrado um efeito sinérgico resultante da combinação de nanopartículas magnéticas e plasmónicas, tipicamente constituídas por um núcleo magnético e revestidas por uma camada de ouro. Este tipo de nanoestrutura magneto-plasmónicas permitem a combinação da hipertermia fototérmica com hipertermia magnética, resultando num agente de hipertermia bimodal de elevada eficiência para o tratamento do cancro. Neste tipo de estrutura, além do efeito sinérgico da combinação das propriedades óticas e magnéticas, há ainda um melhoramento da estabilidade química das nanopartículas, uma vez que a camada de ouro atua como uma barreira que evita a oxidação do núcleo e a degradação enzimática. Adicionalmente, devido à facilidade de conjugação do ouro com diversas moléculas, a funcionalização da estrutura híbrida é facilmente assegurada. (López-Lorente et al., 2011)

Neste trabalho foram preparadas nanopartículas híbridas magneto-plasmônicas, para combinação das propriedades magnéticas e óticas num só nanossistema. Assim, tendo em conta as excelentes propriedades óticas das nanovaras de ouro e as propriedades magnéticas das ferrites, foram sintetizadas nanopartículas magnéticas de ferrite revestidas por nanovaras de ouro (figura 12).



**Figura 12:** Representação esquemática de uma nanopartícula magnética revestida por uma camada de ouro A) vista frontal e B) vista transversal.

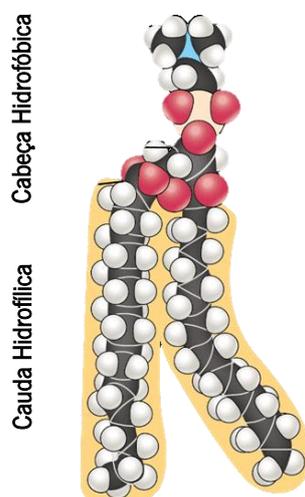
## 1.5. Lipossomas

Os lipossomas foram primeiramente observados por Alec Bangham, em 1965, através da visualização de imagens de fosfolípidos em soluções aquosas. Neste trabalho, foi observado que quando colocados em água os fosfolípidos formavam estruturas fechadas em bicamadas. Desde então, os lipossomas passaram a ser objeto de investigação para numerosas aplicações, nomeadamente enquanto nanossistemas de encapsulamento.

### 1.5.1. Composição estrutural

Os lipossomas são vesículas constituídas por uma, ou mais, bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. As suas unidades estruturais são os fosfolípidos, que podem ser de natureza natural ou sintética, sendo que os primeiros são obtidos através de fontes naturais e os últimos podem ser produzidos a partir dos primeiros. Os fosfolípidos são moléculas anfipáticas, ou anfifílicas. São constituídos por uma cabeça polar que possui um grupo fosfato (extremidade hidrofílica) e cadeias hidrocarbonadas derivadas de ácidos gordos (extremidade hidrofóbica) (figura 13) (Vix, 2022). No desenvolvimento de lipossomas, os

fosfolípidos mais utilizados são a fosfatidilcolina, a fosfatidilserina, o fosfatidilglicerol e a esfingomiéline, que tendem a formar uma bicamada estável em solução aquosa.



**Figura 13:** Ilustração da estrutura de um fosfolípido. Adaptado de (Vix, 2022).

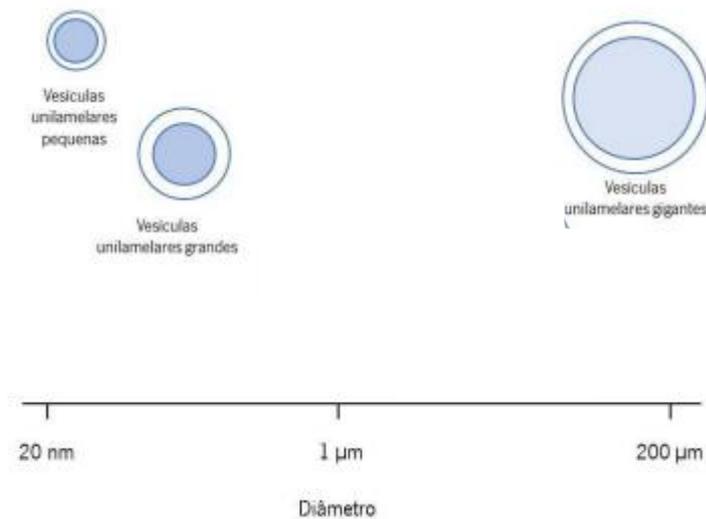
Os fosfolípidos são caracterizados por apresentarem uma temperatura de transição de fase ( $T_m$ ), acima da qual a membrana passa de uma fase gel, onde a cadeia está em estado ordenado, para uma fase de cristal-líquido, onde as moléculas apresentam maior mobilidade e os grupos hidrofílicos se tornam completamente hidratados. A temperatura de transição depende do comprimento das cadeias hidrocarbonadas e do grau de hidratação das mesmas. Portanto, diferentes membranas compostas por lípidos distintos podem exibir diferentes níveis de fluidez na mesma temperatura. (Daniela Sofia Marques Pereira, 2018) No que diz respeito à carga elétrica, os fosfolípidos podem ser classificados como catiónicos (carga positiva), aniônicos (carga negativa) ou zwitteriónicos (possui carga negativa e positiva em diferentes átomos). A classificação dos lípidos utilizados neste projeto encontram-se na **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Características químicas de diferentes lípidos (Li et al., 2015).

	origem	Carga	$T_m$
Egg-PC	Natural	Zwitteriónica	-17°C
DPPC	Sintética	Zwitteriónica	41°C

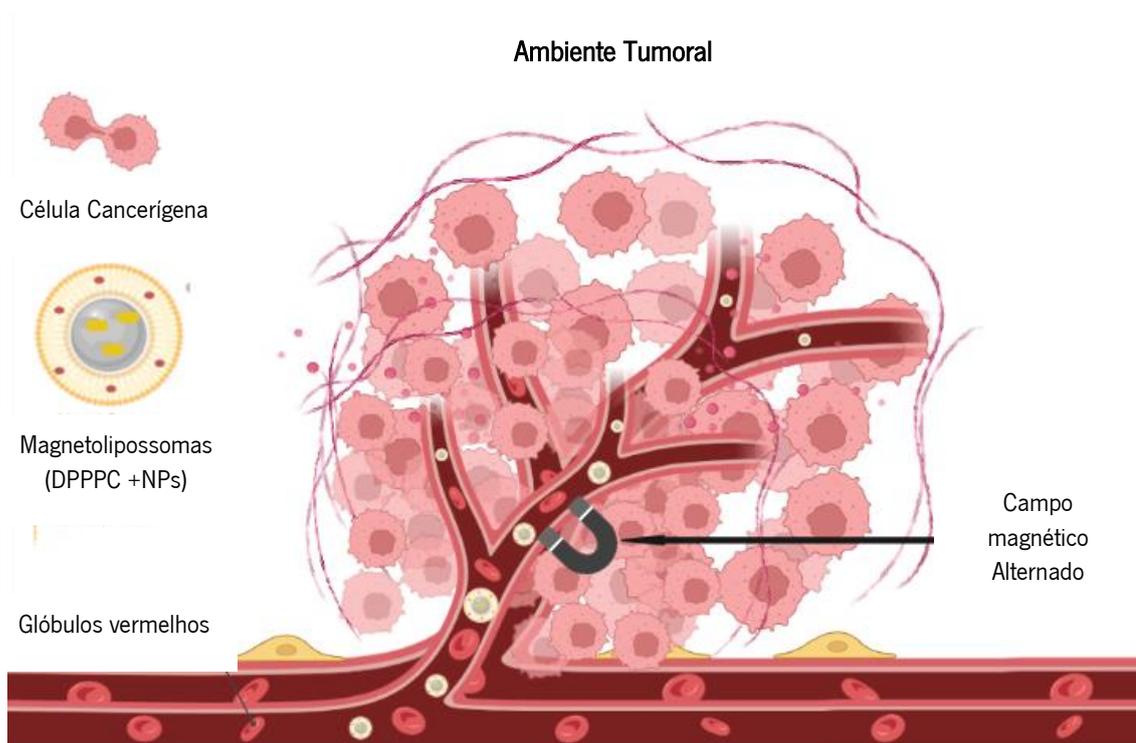
### 1.5.2. Classificação estrutural

Os lipossomas podem ser classificados estruturalmente segundo o seu tamanho e número de bicamadas. Relativamente ao número de bicamadas, são categorizados em unilamelares ou multilamelares. Os primeiros são constituídos apenas por uma bicamada concêntrica e uma cavidade aquosa, os segundos apresentam várias bicamadas concêntricas de menores dimensões. Por sua vez, as vesículas unilamelares podem ainda ser classificadas de acordo ao seu tamanho, em vesículas unilamelares pequenas (<100 nm), vesículas unilamelares grandes (100-1000 nm) e vesículas unilamelares gigantes (>1  $\mu\text{m}$ ) (figura 14).



**Figura 14:** Classificação dos lipossomas consoante o seu tamanho e número de lamelas. Adaptado de (Daniela Sofia Marques Pereira, 2018).

Devido ao seu tamanho e à matriz desorganizada dos tecidos tumorais, os lipossomas apresentam um direcionamento passivo para estes tecidos. Ao fenómeno, que promove o aumento da concentração de fármaco na zona tumoral (Plassat et al., 2011), dá-se o nome de efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR, do inglês, *enhanced permeability and retention effect*) (figura 15) (BioRender, 2022).



**Figura 15:** Ilustração do efeito EPR no direcionamento dos magnetolipossomas contendo as nanopartículas magnéticas com aplicação de um campo magnético alternado. Adaptado de (BioRender, 2022).

### 1.5.3. Métodos de síntese

Existem vários métodos de preparação descritos para a síntese de lipossomas, sendo o mais conhecido a hidratação de filme lipídico. Neste trabalho foi utilizado um protocolo inovador, proposto por Beatriz D. Cardoso et al., (2021).

O processo de hidratação lipídico (**figura 16**) surgiu em 1965, por Alec Bangham (Ferreira, 2006). Neste método, os lípidos são dissolvidos num solvente orgânico, seguido da evaporação sob corrente de um gás inerte. Posteriormente, o filme lipídico é hidratado com água ou uma solução tampão, a uma temperatura superior à  $T_m$  e sob agitação (Ferreira, 2006). Este processo de preparação pode sofrer algumas variações, como por exemplo tempo de secagem do lipido, temperatura ou solvente orgânico utilizado, no entanto, conduz sempre à formação de vesículas multilamelares muito heterogêneas. Quando se pretende obter vesículas unilamelares e de tamanho bem definido, torna-se necessário submeter estes a tratamentos pós-síntese adicionais, como a extrusão ou sonicação. (Velo et al., 2021)



**Figura 16:** Representação esquemática do método de hidratação do filme lipídico. Retirado de (Ferreira, 2006).

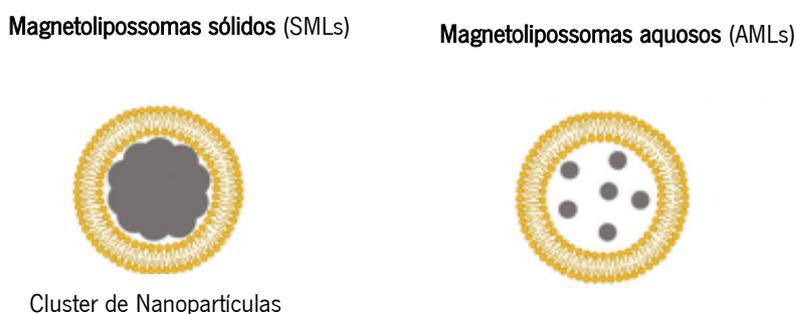
### 1.6. Lipossomas magneto-plasmônicos

Os lipossomas magneto-plasmônicos são nanossistemas multifuncionais de elevado potencial para terapia combinada, através da entrega controlada de fármacos e hipertermia bimodal (magnética e fototérmica). Resultam da combinação dos lipossomas com as nanopartículas híbridas, e pretendem ser uma abordagem terapêutica para ultrapassar os problemas das terapias convencionais.

De acordo com a sua composição estrutural, os lipossomas contendo nanopartículas podem ser classificados em sólidos ou aquosos. Relativamente aos magnetolipossomas aquosos as nanopartículas magnéticas são encapsuladas na fase aquosa interna, já nos magnetolipossomas sólidos existe um aglomerado de nanopartículas magnéticas rodeadas por uma camada lipídica (Irina Soraia Rainho Rio, 2019). Esta definição foi primeiramente estabelecida em 1988, por De Cuyper e Joniau, para definir lipossomas baseados em nanopartículas magnéticas (magnetolipossomas). Assim, os magnetolipossomas foram classificados em duas classes principais (**figura 17**):

- **Magnetolipossomas sólidos** (SMLs do inglês Solid Magnetoliposomes) nos quais não existe núcleo aquoso e há um cluster de nanopartículas rodeado por uma camada lipídica. (Veloso et al., 2021)

- **Magnetolipossomas aquosos** (AMLs em inglês Aqueous Magnetoliposomes), nos quais as nanopartículas magnéticas são dispersas no lúmen aquoso interno dos lipossomas. (Velooso et al., 2021)



**Figura 17:** Representação de SMLs e SMLs. Adaptado de (Velooso et al., 2021).

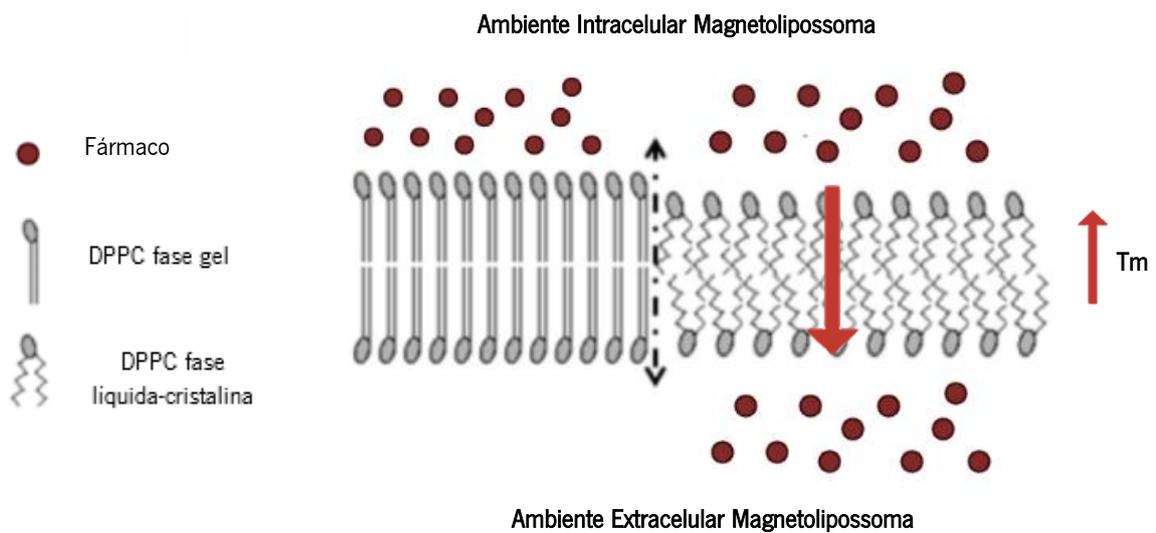
Neste caso, os lipossomas magneto-plasmônicos aquosos são constituídos por lipossomas contendo nanopartículas híbridas magneto-plasmônicas encapsuladas no seu interior aquoso. Por outro lado, nos secos, não existe núcleo aquoso e as nanopartículas estão rodeadas por uma camada lipídica. Dentro dos mencionados, neste projeto foram desenvolvidos os magnetolipossomas sólidos, uma vez que têm melhor resposta magnética.

#### 1.6.1. Lipossomas magneto-plasmônicos como nanossistemas de transporte e libertação controlada

Os lipossomas magneto-plasmônicos são nanossistemas de encapsulamento altamente responsivos a campos magnéticos e irradiação, uma vez que contêm um núcleo magnético e plasmônico. Além disso, permitem o encapsulamento de fármacos antitumorais melhorando a sua solubilidade, estabilidade e performance de libertação.

A utilização de formulações lipídicas termosensíveis, com temperaturas de transição acima da temperatura fisiológica, é essencial para a libertação controlada. Neste estudo, utilizou-se o lípido DPPC, uma vez que este apresenta uma temperatura de transição de 41 °C. Assim, o uso de lipossomas termosensíveis permite que, ao serem atingidas temperaturas acima da temperatura de transição ( $T_m$ ) os lípidos apresentem maior mobilidade e passem a estar numa fase desorganizada. Em consequência, a libertação dos fármacos encapsulados é promovida (**figura 18**) (Landon, 2011). Assim, os lipossomas magneto-plasmônicos, carregados com fármacos antitumorais e baseados em formulações termosensíveis, apresentam-se como nanossistemas multifuncionais com diferentes capacidades, nomeadamente:

- (i) direcionamento magnético ao local de interesse, sob ação de gradientes de campos magnéticos;
- (ii) entrega controlada dos fármacos encapsulados, mediada pela geração local de calor (na presença de um campo magnético externo alternado ou na presença de fonte de irradiação NIR);
- (iii) terapia dual e sinérgica, pela combinação da ação local do fármaco quimioterápicos e do sobreaquecimento dos tecidos tumorais.



**Figura 18:** Ilustração do comportamento do lipossoma DPPC abaixo (fase gel) e acima (fase líquida-cristalina) da temperatura de transição. Adaptado de (Landon, 2011).

## CAPÍTULO II: MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os procedimentos utilizados no desenvolvimento dos nanomateriais deste trabalho. Serão ainda descritas, brevemente, as técnicas de caracterização bem como o propósito da sua utilização.

Neste trabalho, de forma muito breve, foram sintetizadas NPs magnéticas de ferrites de manganês e ferrites mistas de cálcio e magnésio, e nanopartículas plasmónicas de ouro em forma de bastonete. De seguida, foi promovido o acoplamento entre as nanopartículas magnéticas e os bastonetes de ouro, para a formação de nanopartículas denominadas como híbridas magneto-plasmónicas. Por fim, estas foram incorporadas em bicamadas lipídicas resultando em lipossomas sólidos (SMLs). Ao longo do trabalho, foram utilizadas várias técnicas para a caracterização estrutural e magnética das diferentes nanoestruturas, entre elas, TEM, XRD, espectroscopia UV-Visível, DLS e SQUID.

### 2.1. Preparação das Nanopartículas Magnéticas

Neste trabalho foram sintetizadas nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês e ferrites mistas de cálcio e magnésio, através de um método solvotérmico adaptado do reportado por Beatriz D. Cardoso et al., 2021. Este método consiste na degradação térmica de precursores metálicos na presença ou não de misturas de surfactantes num solvente de elevado ponto de ebulição. Assim, o uso do ácido oleico e do octadeceno como surfactante/complexante e solvente, respetivamente, permitiu o controlo da forma das NPs para promover a formação das nanopartículas anisotrópicas. Importante salientar a utilização do condensador nesta experiência, uma vez que permite refluxo para um melhor controlo da temperatura de reação. A montagem experimental utilizada está representada na **figura 19**.



**Figura 19:** Imagem do *setup* experimental utilizado na síntese de nanopartículas magnéticas.

### 2.1.1. Síntese de Nanopartículas de Ferrite de Manganês

As nanopartículas de ferrite de manganês ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) foram preparadas utilizando os seguintes reagentes:

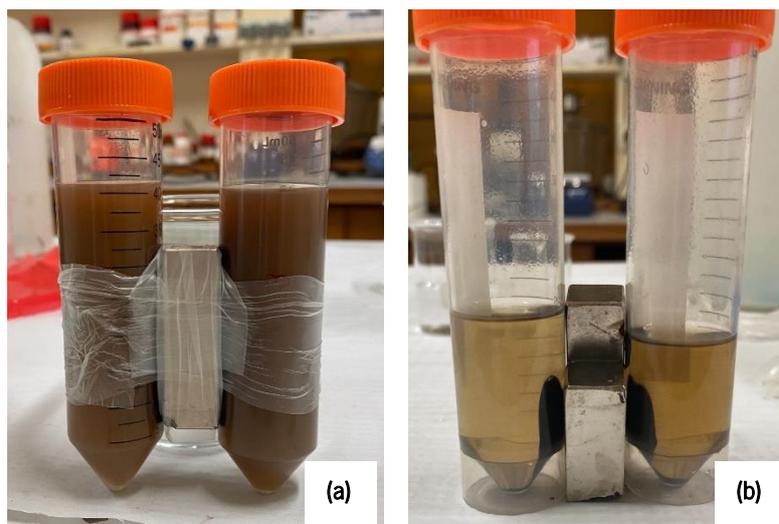
- Sulfato de manganês tetrahidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), massa molar  $169,02 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ;
- Cloreto de ferro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), massa molar  $270,33 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ;
- Ácido oleico ( $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ), massa molar  $282,47 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ;
- Octadeceno ( $\text{C}_{18}\text{H}_{36}$ ), massa molecular  $252,5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

As massas dos precursores metálicos utilizadas na preparação experimental, e as respectivas concentrações finais, estão apresentados na **tabela 3**.

**Tabela 3:** Massa e concentração final dos precursores metálicos usados na síntese das nanopartículas  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ .

	Massa (mg)	Concentração final (mM)
Cloreto de ferro (III) hexahidratado	875,75	2
Sulfato de manganês tetrahidratado	169,01	1

Para tal, num volume de 15 ml de octadeceno, previamente aquecido a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , adicionou-se 525,7 mg de cloreto de ferro III hexahidratado e deixou-se dissolver, durante 20 minutos, sob agitação magnética. De seguida, adicionou-se 169,01 mg de sulfato de manganês tetrahidratado e 875,92 mg de ácido oleico. A reação foi deixada na manta de aquecimento, durante 60 minutos a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente, procedeu-se ao aumento gradual da temperatura em intervalos de  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ , em cada 5 minutos, até ser atingida a temperatura de  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ . Quando atingida esta temperatura, aumentou-se novamente para os  $290 \text{ }^\circ\text{C}$  e a mistura foi deixada, sob agitação magnética, cerca de 1 hora. Após este período, as nanopartículas foram formadas e a solução foi arrefecida à temperatura ambiente. Posteriormente, procedeu-se à purificação das nanopartículas obtidas através de lavagens com tetrahidrofurano (THF) e com uma mistura de água:etanol (1:1), por decantação magnética, de forma a eliminar possíveis restos da reação (**figura 20**). Este passo foi repetido sucessivamente até se obter um resíduo de lavagem transparente. Após o processo de lavagem, as nanopartículas foram colocadas na estufa para secagem e obtenção das mesmas em pó. Por fim, as NPs foram sujeitas a uma ligeira calcinação de 30 minutos a  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob corrente de azoto, de forma a promover a remoção de restos de surfactante da sua superfície.



**Figura 20:** Processo de lavagem por decantação magnética: (a) após uma lavagem e (b) após três lavagens.

### 2.1.2. Síntese de Nanopartículas de Ferrite Mista de Cálcio e Magnésio

De forma semelhante ao descrito para as ferrite de manganês, foram também preparadas nanopartículas magnéticas de ferrite mista de cálcio e magnésio ( $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ), utilizando o mesmo protocolo (Beatriz D. Cardoso et al., 2021). Para o efeito, foram utilizados os seguintes reagentes:

- Acetato de magnésio tetrahidratado ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{MgO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), massa molar  $214,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;
- Acetato de cálcio hidratado ( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ), massa molar  $176,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;
- Cloreto de ferro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), massa molar  $270,33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;
- Ácido oleico ( $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ), massa molar  $282,47 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;
- Octadeceno ( $\text{C}_{18}\text{H}_{36}$ ), massa molar  $252,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Na **tabela 4** estão detalhadas as massas, e respetiva concentração final, dos precursores metálicos utilizados para a síntese destas nanopartículas.

**Tabela 4:** Massa e concentração final dos precursores metálicos usados na síntese das nanopartículas de ferrite mista de cálcio e magnésio.

	Massa (mg)	Concentração final (mM)
Cloreto de ferro (III) hexahidratado	525,92	2
Acetato de cálcio hidratado	39,6	0,25
Acetato de magnésio tetrahidratado	160,5	0,75

O procedimento experimental utilizado é idêntico ao descrito na **secção 2.1.1.** , sendo que a única diferença reside na substituição do precursor cloreto de manganês tetra hidratado pelos precursores acetato de magnésio tetra hidratado e acetato de cálcio hidratado, numa proporção estequiométrica de 0.75:0.25, respetivamente. Assim, de forma breve, a 15 mL de octadeceno previamente aquecidos a 120 °C, foram adicionadas 525,7 mg de cloreto de ferro (III) hexa hidratado. De seguida, procedeu-se à adição de 39,6 mg de acetato de cálcio hidratado, 160,5 mg de acetato de magnésio tetra hidratado e 875,92 mg de ácido oleico. A mistura foi deixada durante 60 minutos a 120 °C. Seguiu-se o aumento gradual da temperatura (5 °C, a cada 5 minutos) até aos 200 °C e, de seguida, aumentou-se diretamente para os 290 °C. A solução foi mantida a esta temperatura durante 1 hora, sob agitação magnética. Após arrefecimento, procedeu-se à lavagem das nanopartículas, por decantação magnética, com THF e uma mistura de etanol:água (1:1) e, por fim, as nanopartículas foram secas na estufa. Finalmente, as nanopartículas de ferrite mista de magnésio e cálcio foram sujeitas a uma calcinação de 30 minutos a 350 °C, sob corrente de azoto, para a remoção de resíduos orgânicos da superfície.

## 2.2. Síntese de nanovaras de ouro

As nanopartículas de ouro em forma de nanovaras foram sintetizadas por um protocolo de redução química , adaptado de (N. A. Salavatova et al., 2018) . Para o efeito, foram utilizados os seguintes reagentes:

- Brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB) ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$ ), massa molar 364,45  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;
- Solução de cloreto de ouro (III) ( $\text{HAuCl}_4$ ), massa molar 339,785  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;
- Nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ ), massa molar 169,87  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;
- Hidroquinona, massa molar 110,11  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ;
- Borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), massa molar 37,83  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,
- Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), massa molar 136,09  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

As condições do procedimento experimental encontram-se descritas na **tabela 5**, e na **figura 21** encontra-se a montagem experimental utilizada na síntese destas nanopartículas.

**Tabela 5:** Concentração e volume dos precursores metálicos usados na síntese das nanopartículas de ouro.

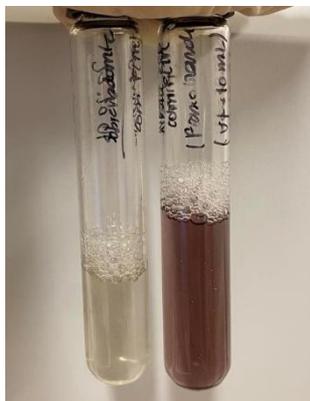
	Concentração inicial (mM)	Concentração final (mM)	Volume inicial ( $\mu\text{L}$ )
Brometo de hexadeciltrimetilamônio	$0,01 \times 10^{-3}$	-	-
H <sub>2</sub> O	-	-	9141
Solução de cloreto de ouro	$0,01 \times 10^{-3}$	0,4	400
Nitrato de Prata	$0,15 \times 10^{-3}$	$0,15 \times 10^{-3}$	75
Hidroquinona	$0,14 \times 10^{-3}$	5,1	364
Borohidreto de sódio	$0,005 \times 10^{-3}$	15	20



**Figura 21:** Imagem do esquema de montagem utilizado para a síntese de nanovaras de ouro.

Inicialmente, foi preparada um solução aquosa de 9141  $\mu\text{L}$  contendo 364,45 mg de CTAB (0,1 M). Esta mistura foi aquecida a uma temperatura de 30-35  $^{\circ}\text{C}$ , em banho maria, sob agitação magnética. Depois da mistura estar bem dissolvida, foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de uma solução mãe de  $\text{HAuCl}_4$  (0,01M), 75  $\mu\text{L}$  de uma solução mãe  $\text{AgNO}_3$  (0,15mM), 364  $\mu\text{L}$  de uma solução mãe HQ (0,14M) e 20  $\mu\text{L}$  de uma solução mãe  $\text{NaBH}_4$  (0,005M). Todas as adições foram realizadas sucessivamente com intervalos de 5 minutos entre elas. Durante cada intervalo, procedeu-se à preparação da solução seguinte a adicionar, de forma a utilizar sempre soluções frescas. Passados 30 segundos após a última adição, o agitador magnético foi retirado e a solução foi mantida a 35  $^{\circ}\text{C}$ , durante 3 horas. No final da reação, as nanopartículas foram lavadas com uma solução de CTAB (2 mM), por centrifugações de 10000 rpm, durante 30 minutos. Durante as lavagens, e de forma a promover a deposição das nanovaras de ouro, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$

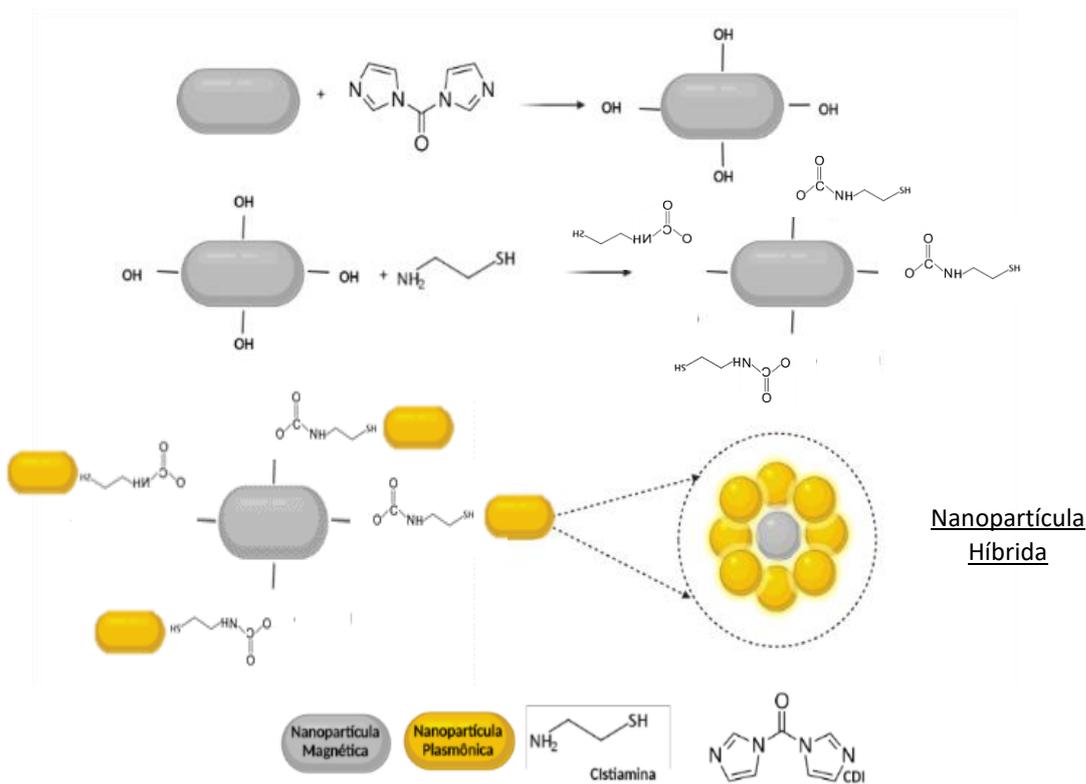
de uma solução de fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), de concentração 1 M (figura 22). Por fim, as nanopartículas purificadas foram dispersas numa solução de CTAB de concentração 2 mM, para futuras utilizações.



**Figura 22:** À esquerda o sobrenadante de lavagem após a última centrifugação e à direita o pellet de nanovaras de ouro purificadas, resuspenso em solução de CTAB (2mM).

### 2.3. Acoplamento das nanopartículas magnéticas com as nanovaras de ouro

A síntese das nanopartículas híbridas magneto-plasmónicas foi promovida pelo acoplamento entre as ferrites magnéticas com as nanovaras de ouro. Para tal, foi utilizada cisteamina como ponte entre os dois tipos de nanopartículas. A cisteamina possui em sua estrutura um grupo tiol ( $-\text{SH}$ ) que possibilita o estabelecimento de interações covalentes com as nanopartículas de ouro ( $\text{Au-SH}$ ), e um grupo amina ( $\text{NH}_2$ ) que permite a ligação às nanopartículas de ferrite através dos seus grupo  $-\text{OH}$  previamente ativados com CDI (carbodiimidazole). A massas de CDI, cisteamina e imidazole utilizadas correspondem a 5 vezes o número de moles da solução mãe de nanopartículas magnéticas ( $2,258 \times 10^{-3} \times 2$  moles em Fe). Na figura 23 encontra-se representado um esquema do acoplamento entre as nanopartículas magnéticas de  $\text{MgCaFe}_2\text{O}_4$  com as nanovaras de ouro.

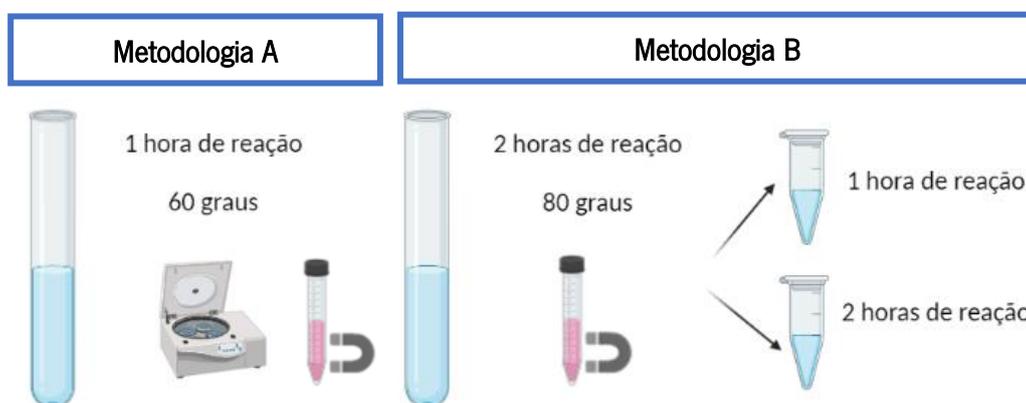


**Figura 23:** Esquema representativo do acoplamento entre as nanopartículas magnéticas de  $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$  com as nanovarvas de ouro.

Primeiro, procedeu-se à preparação de uma solução mãe de 0,144 mg/ml de  $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ , em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) seco. Desta foram retirados 32  $\mu\text{L}$  tendo sido posteriormente adicionadas 3,14 mg de carbonildiimidazol (CDI) e colocada a mesma num banho maria a 60 °C. Nesta fase, o CDI foi fundamental para a ativação dos grupos -OH da superfície das nanopartículas de  $\text{MgCaFe}_2\text{O}_4$ . Esta solução foi deixada a reagir durante a noite, tendo sido possível verificar uma mudança de cor transparente para castanho. Esta mudança de cor indica que as partículas se dissolveram bem no solvente DMSO, o que permite uma melhor reação com o CDI. De seguida, a mistura foi sujeita a sucessivas lavagens com uma mistura de etanol e água (1:1), por decantação magnética, de forma a retirar todo o excesso de CDI. Posteriormente, foram acrescentadas 2,20 mg de cistamina e 2,02 mg de imidazole-HCl que foi utilizado como catalisador da reação. A mistura foi deixada a reagir durante 1 hora, à mesma temperatura. De seguida, repetiram-se os passos de lavagem por decantação magnética e adicionou-se 1,098 mL de solução das nanovarvas de ouro (numa proporção de 20 vezes superior à concentração de nanopartículas magnéticas), tendo-se mantido a reação durante 1 hora. Por fim, procedeu-se a nova lavagem, por decantação

magnética, de forma a remover todas as nanovaras de ouro que não ficaram acopladas às nanopartículas magnéticas.

Neste procedimento experimental foram testadas diferentes condições experimentais e métodos de lavagem. As duas metodologias, com diferentes temperaturas e tempos e temperaturas de reação, denominadas como A e B estão representadas esquematicamente na **figura 24**. No método A, correspondente ao protocolo descrito acima, foi utilizada uma temperatura de 60 °C e 1 hora de reação. Já no método B foi testada a temperatura de 80 °C, durante 1 hora e 2 horas. Também foram testadas duas metodologia de lavagens para separar o ouro não ligados das nanopartículas híbridas, sendo elas a técnica de centrifugação e decantação magnética.



**Figura 24:** Esquema experimental das condições do processo de acoplamento.

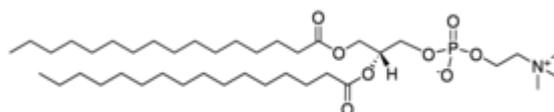
A nomenclatura para cada metodologia, temperatura de reação, tempo de reação e tipo de separação das nanopartículas encontra-se representada na **tabela 6**.

**Tabela 6:** Temperatura de reação, tempo de reação e tipo de separação das nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio para cada metodologia.

Metodologia	Temperatura de reação (°C)	Tempo de reação (h)	Tipo de separação
A1	60	1	Centrifugação
A2			Decantação magnética
B1	80	1	Decantação magnética
B2			2

## 2.4. Magnetolipossomas

As nanopartículas híbridas magneto-plasmónicas foram incorporadas em bicamadas lipídicas, de forma a obter magnetolipossomas sólidos (SMLs, do inglês solid magnetoliposomes). Foi utilizado o lípido DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina, massa molar 734,039 g/mol), devido ao interesse biológico da sua temperatura de transição ( $T_c = 41\text{ }^\circ\text{C}$  (Pentak, 2014)). Assim, foi preparada uma solução mãe de DPPC em clorofórmio, de concentração de  $20 \times 10^{-3}\text{ M}$ . A estrutura química do lípido DPPC encontra-se representada na **figura 25**.



**Figura 25:** Estrutura molecular do lípido DPPC .

Para esta preparação recorreu-se a um protocolo inovador, baseado na técnica de filme lipídico (Beatriz D. Cardoso et al., 2021). Assim, adicionou-se 150  $\mu\text{l}$  de uma solução de 20 mM de DPPC, em clorofórmio, a nanopartículas híbridas secas, resultantes de uma solução de 5 mL de nanopartículas híbridas previamente centrifugadas (7000rpm/30 min) e secas em corrente de azoto. Esta mistura foi seca com uma corrente de azoto, até se obter um filme lipídico contendo as NPs. Adicionou-se 3 mL de heptano e a mistura foi ultrasonicada em ciclos de 5 minutos a 90 W, de forma a promover a formação de micelas invertidas contendo as nanopartículas. De seguida, foi realizada uma centrifugação, durante 5 minutos a 7000 rpm, removeu-se o heptano e secou-se o pellet com azoto para retirar vestígios do solvente que pudessem ter ficado. O pellet foi ressuspenso em 3 mL de água ultrapura e a solução foi aquecida a  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , para posterior injeção etanólica de 150  $\mu\text{L}$  de 20 mM de DPPC. Desta forma, promoveu-se a formação da segunda bicamada lipídica dando origem aos SMLs. Finalmente, foram realizados ciclos de 1 minuto no ultrasonicador, a 90 W e 10 minutos no sonicador, para uniformização dos tamanhos.

## 2.5. Técnicas de Caracterização

Para a caracterização estrutural das nanopartículas foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de absorção UV-Visível, Difração de Raios-X, Difusão Dinâmica de Luz e Microscopia Eletrónica de Transmissão. As propriedades magnéticas foram avaliadas num magnetómetro

SQUID (do inglês, *Superconducting Quantum Interference Device*) e os valores de SAR (do inglês, *Specific Absorption Rate*) foram obtidos por ensaios de hipertermia magnética e fototérmica.

### 2.5.1. Espectroscopia de absorção UV-Visível

As medições de absorção foram realizadas num espectrofotómetro UV-VIS-NIR Shimadzu, modelo UV-3600. Os espectros foram traçados numa gama de intervalos de onda entre os 420-850 nm e 200-1200 nm, para as nanopartículas magnéticas e nanopartículas de ouro, respetivamente.

A base desta técnica assenta na lei de Lambert Beer, e, que relaciona a absorção de radiação monocromática com as propriedades do material que esta atravessa através da **equação 1**:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} b C \quad \text{Equação 1}$$

Onde  $A_{\lambda}$  é a absorvância ao comprimento de onda ( $\lambda$ ),  $\varepsilon_{\lambda}$  é o coeficiente de absorção molar da espécie absorvente a esse comprimento de onda (medida da intensidade da banda de absorção), expressa em  $M^{-1}cm^{-1}$ ,  $b$  representa o comprimento do percurso ótico, em  $cm$  e  $C$  é a concentração, em  $M(mol. L^{-1})$

### 2.5.2. Difusão Dinâmica de Luz

A técnica de DLS/ELS (do inglês, Dynamic Light Scattering/Electrophoretic Light Scattering) permite a determinação do diâmetro hidrodinâmico, distribuição de tamanhos e potencial zeta de partículas em solução. Esta técnica baseia-se no movimento browniano das nanopartículas dispersas num solvente e consiste na incidência de um feixe de luz na amostra, seguida de uma análise das flutuações da intensidade da luz espalhada ao longo do tempo. (*LS Instruments, 2022*)

Experimentalmente, para nanopartículas esféricas, o coeficiente de difusão das nanopartículas ( $D_C$ ) é calculado ajustando a função de correlação, que se obtém através das flutuações de intensidade de luz dispersa e relaciona o tempo de decaimento com o coeficiente de difusão das partículas, e este relaciona-se com o raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) através da equação de Stokes Einstein (**equação 2**) :

$$D_C = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_h} \quad \text{Equação 2}$$

onde  $K_B$  é a constante de Boltzman,  $T$  a temperatura e  $\eta$  a viscosidade do solvente.

O potencial zeta é um parâmetro importante que mede a carga superficial das nanopartículas e permite avaliar a sua estabilidade coloidal. Em geral, partículas com potenciais zeta mais positivo que + 30 mV ou mais negativo que – 30 mV são considerados estáveis (Joana Daniela da Silva Costa, 2015).

Para determinar o tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersividade das nanopartículas preparadas, utilizou-se um equipamento DLS da Anton Paar, modelo Litesizer 500, equipado com um laser de 648 nm e 40 mW. Para cada medida foi realizada uma série de 3 réplicas, a 25 °C, usando o ângulo de detecção *backscatter* (175°). Todas as medições foram realizadas em água, sendo que para as nanopartículas magnéticas foi preparada uma solução concentração 0,04 mg/ml, a partir de uma solução mãe previamente preparada de 4 mg/ml. Para as nanopartículas de ouro, foram preparadas soluções em CTAB, a 2 mM, de forma a manter a sua estabilidade coloidal.

### 2.5.3. Difração de Raios-X

Os dados de difração de raio-X das partículas magnéticas foram obtidos na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, num difractómetro PAN'alytical X'Pert PRO (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK), a operar com radiação  $\text{CuK}\alpha$ , em configuração Bragg-Brentano.

A técnica de difração de raios-X utiliza o fenómeno de difração por cristais, para obter informações sobre estrutura cristalina, fase, orientação preferencial e tamanho do cristal. É bastante utilizada, uma vez que é não invasiva e não necessita de uma preparação prévia das amostras. Baseada em fenómenos de interferência entre raios-X refletidos pelos vários planos cristalinos da amostra. Desta interação resulta uma interferência construtiva que se traduz pela Lei de Bragg (**equação 3**):

$$n\lambda = 2d \sin\theta \qquad \text{Equação 3}$$

onde  $n$  é um número inteiro,  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação incidente,  $d$  é a distância entre os planos paralelos sucessivos na estrutura cristalina, e  $\theta$  é o ângulo de incidência.

#### **2.5.4. Microscopia eletrónica de Transmissão (TEM)**

As imagens das nanopartículas magnéticas e plasmónicas de ouro foram obtidas através da técnica de Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM, do inglês *transmission electron microscopy*) Os dados foram adquiridos num microscópio JEOL JEM 1010, a operar a 100 kV, do Centro de Investigações Biomédicas (CINBIO), da Universidade de Vigo.

A análise das imagens foi realizada no software *ImageJ* que permitiu a identificação das nanopartículas em estudo para uma contagem manual e posterior conversão das áreas obtidas em diâmetros. Os histogramas resultantes dos tamanhos foram ajustado a uma distribuição Gaussiana, de forma a obter a média e desvio padrão.

#### **2.5.5. Caracterização das propriedades magnéticas**

A caracterização das propriedades magnéticas das nanopartículas foi realizada num dispositivo de interferência quântica supercondutor SQUID (do inglês, *superconducting quantum interference device*), modelo Quantum Design's MPMS 3, do Instituto de Física dos Materiais da Universidade do Porto.

O SQUID é um magnetómetro muito sensível que permite a medição da magnetização, ou momento magnético, de uma amostra. Através da medição de curvas de histerese, em que é medida a dependência do momento magnético a um campo aplicado, é possível o estudo de parâmetros como a coercividade, magnetização de saturação e remanescente. Estes ajudam a determinar a tipo comportamento magnético da amostra. O seu princípio de funcionamento assenta no efeito *Josephson*, permitindo detetar até campos magnéticos extremamente fracos. Este efeito é caracterizado pela medição de uma corrente elétrica que flui através de dois supercondutores interligados, separados por uma barreira isolante muito fina (*Josephson Junction*), a temperaturas criogénicas. (Marconi B. S. Costa, 2013)

#### **2.5.6. Ensaio de Hipertermia Magnética**

Os ensaios hipertermia magnética foram realizados na Faculdade de Engenharia do Porto com o intuito de estudar a capacidade de aquecimento das nanopartículas quando sujeitas à aplicação de um campo magnético alternado. Para tal, foi preparada uma solução aquosa de 25 mg/ml de nanopartículas magnéticas. As medidas foram realizadas com um campo magnético de 8,5 kA/m e frequência de 155 kHz.

A capacidade de aquecimento pode ser quantificada através da figura de mérito taxa de absorção específica de energia SAR , definida como a quantidade de energia convertida em calor, por tempo e massa e exprime-se em watts por grama ( $\frac{W}{g}$ ). (Beatriz D. Cardoso et al., 2021) A capacidade térmica máxima foi calculada através da **equação 4** :

$$SAR = Cs \cdot \frac{dT}{dt} \cdot \frac{m_s}{m_g} \quad \text{Equação 4}$$

em que o valor de  $\frac{dT}{dt}$  foi determinado pelo declive do ajuste linear dos pontos correspondentes aos primeiros 3 minutos (180 segundos) de aquecimento,  $m_s$  é a massa total do solvente aquoso,  $Cs$  é o calor específico da água ( $4,18 \frac{J}{g \cdot ^\circ C}$ ), e  $m_g$  é a massa total do material magnético.

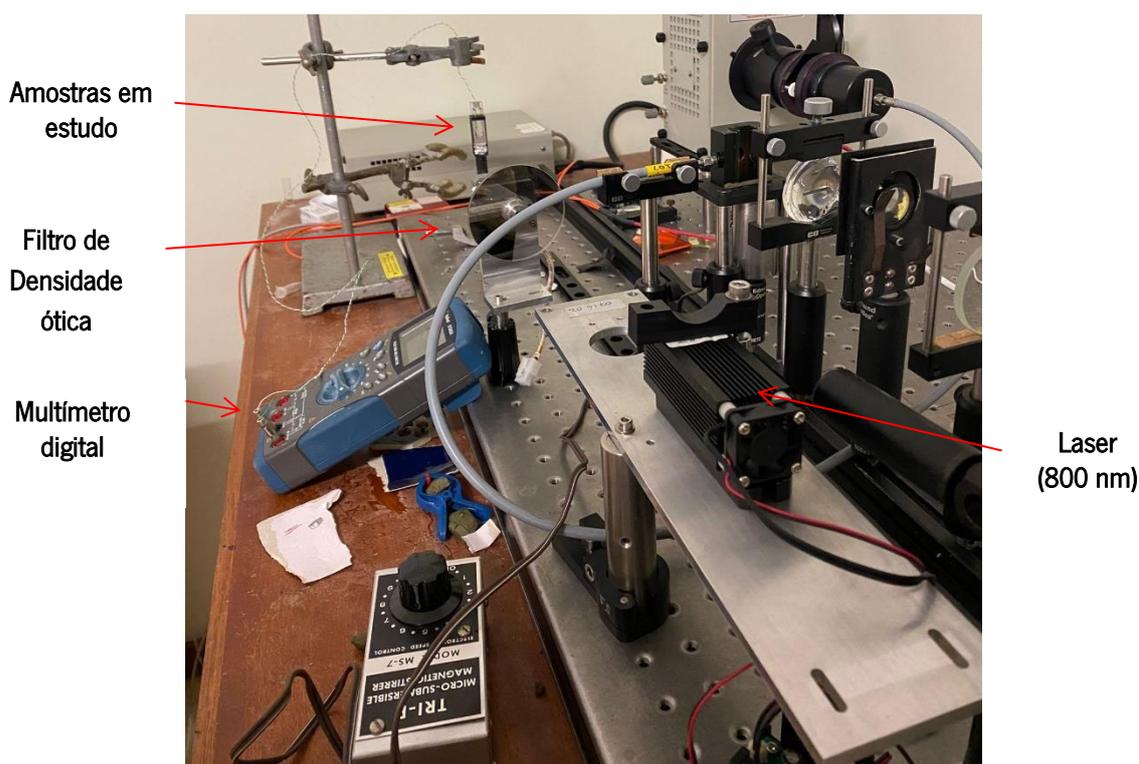
O conceito de perda de potência intrínseca ILP (do inglês, *intrinsic loss power*), relaciona o valor de SAR com a magnitude e frequência do campo aplicado, através da **equação 5**:

$$ILP = \frac{SAR}{H^2 f} \quad \text{Equação 5}$$

Onde H é a força de campo aplicado (kA/m) e f é a frequência (kHz). Desta forma, o ILP permite uma melhor comparação de resultados da capacidade de aquecimento das nanopartículas em diferentes condições experimentais. No entanto, este parâmetro depende de muitos outros fatores, tais como o tamanho, forma, composição de fase, química da superfície e momento magnético. (Gawali et al., 2021)

### 2.5.7. Ensaios de Hipertermia Fototérmica

Os ensaios de fototermia foram realizados com o objetivo de aferir acerca da capacidade de aquecimento das amostras quando sujeitas a irradiação. A montagem experimental utilizada encontra-se representada na **figura 26**, e é constituída por um porta-amostras, uma fonte de luz laser com um comprimento de onda de 808 nm e 1W de potência, um filtro de densidade ótica, e um termopar do tipo T ligado a um multímetro digital (Agilent U1242A) para medição da temperatura.



**Figura 26:** Esquema da montagem experimental utilizada para os ensaios de hipertermia fototérmica.

Neste estudo, foram avaliadas várias amostras com o objetivo de compreender e comparar o efeito fototérmico das diferentes nanoestruturas preparadas ao longo do trabalho. Desta forma, torna-se possível perceber a diferença da capacidade de aquecimento das nanopartículas sozinhas e acopladas. Assim, foram preparadas e avaliadas as seguintes amostras em água:

- i. Nanopartículas magnéticas (1 mg/mL);
- ii. Nanopartículas de ouro (1 mg/mL);
- iii. Nanopartículas híbridas (concentração determinada na discussão de resultados);

Foi ainda medido o aquecimento de uma amostra composta apenas por água, para comparação.

## CAPÍTULO 3: DISCUSSÃO DE RESULTADOS

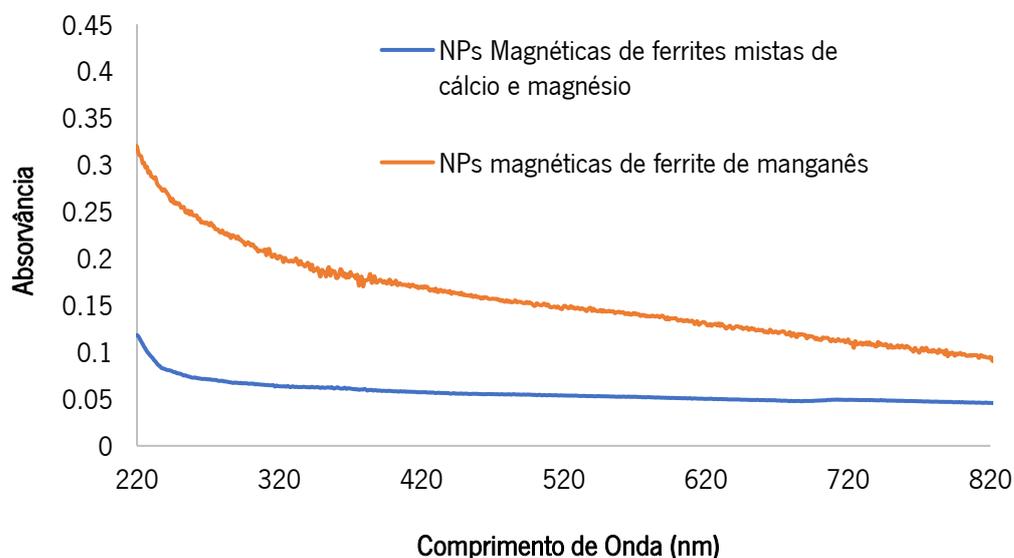
Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos ao longo deste trabalho. Durante a discussão, além da apresentação dos resultados, serão também enumeradas as tentativas de síntese das diferentes nanoestruturas e discutidos os procedimentos de otimização até à obtenção dos produtos finais.

### 3.1. Caracterização das nanopartículas magnéticas

Neste trabalho foram desenvolvidas nanopartículas magnéticas de ferrite mista de cálcio e magnésio ( $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ) e ferrites de manganês ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ).

#### 3.1.1. Espectroscopia UV-Visível

As propriedades óticas dos dois tipos de nanopartículas magnéticas foram estudadas por espectroscopia UV-Visível. Assim, foram traçados os espectros de absorção de soluções aquosas das nanopartículas de ferrite de manganês e ferrites mistas de cálcio e magnésio. Os resultados obtidos são apresentados na **figura 28**.



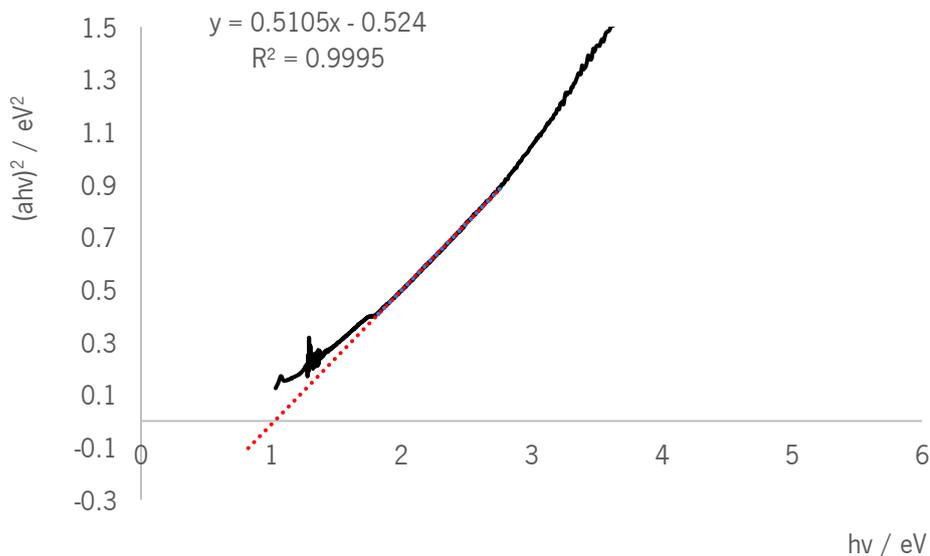
**Figura 27:** Espectro de absorvância das nanopartículas magnéticas de  $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$  e  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ .

Como se pode verificar na **figura 27**, as nanopartículas não apresentam um pico bem definido de absorvância. No entanto, é possível observar uma larga banda de absorção em todo o espectro, característica deste tipo de ferrites. Através do espectro de absorção das nanopartículas, foi

possível estimar o hiato de energia, através da construção de um gráfico de tipo *Tauc plot*, pela equação 6,

$$(\alpha h\nu)^n \sim (h\nu - E_g) \quad \text{Equação 6}$$

onde  $\alpha$  é o coeficiente de absorção (proporcional à absorvância),  $n$  é um expoente que depende da natureza da transição (sendo  $n = 2$  para um semicondutor direto e  $n = 1/2$  para um semicondutor indireto), e  $E_g$  é o valor do hiato de energia. Para as nanopartículas magnéticas  $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ , obteve-se uma relação linear para  $n = 1/2$  (**figura 28**) o que indica que este tipo de ferrite apresenta propriedades de um semicondutor indireto. O band gap das nanopartículas foi estimado a partir da intercetação de  $(\alpha h\nu)^{1/2}$  com o eixo das ordenadas, resultando no valor de 1,03 eV, valor um pouco diferente do já relatado por (Beatriz D. Cardoso et al., 2021)) de 1,29 eV.



**Figura 28:** Gráfico de *Tauc* para as nanopartículas de ferrite mistas de cálcio e magnésio.

Para as nanopartículas magnéticas de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ , obteve-se uma relação linear melhor quando  $n = 1/2$  (**figura 29**), o que indica que este tipo de ferrite também apresenta propriedades de um semicondutor indireto. O band gap destas nanopartículas foi estimado no valor de 1,52 eV, valor abaixo do relatado por (C. Devi & Soibam, 2017) de 2,05 eV.

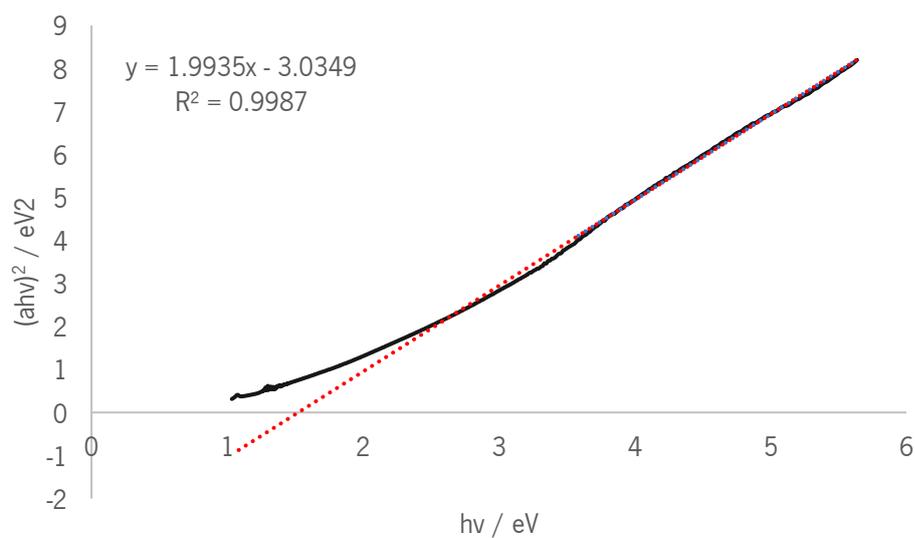


Figura 29: Gráfico de *Tauc* para as nanopartículas de ferrite de manganês.

### 3.1.2. Difração de Raios-X (XRD)

Através da análise XRD, foi possível confirmar a formação das nanopartículas de ferrites mistas de cálcio e magnésio e ferrites de manganês. Na **figura 30** e **31** encontram-se representados os difratogramas das nanopartículas de  $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$  e  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ , respectivamente. Para a análise dos padrões de raios-X, recorreu-se à ferramenta Rietveld no software Match!.

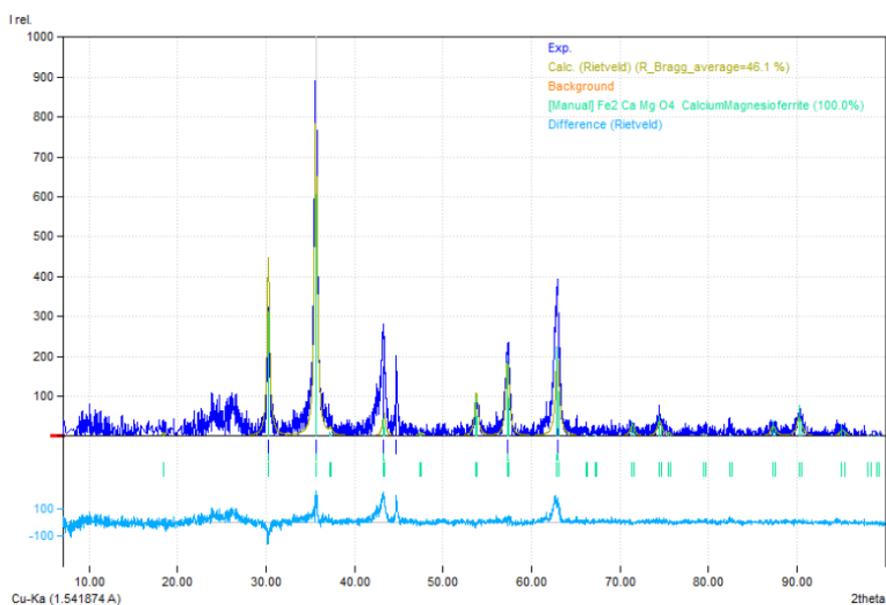
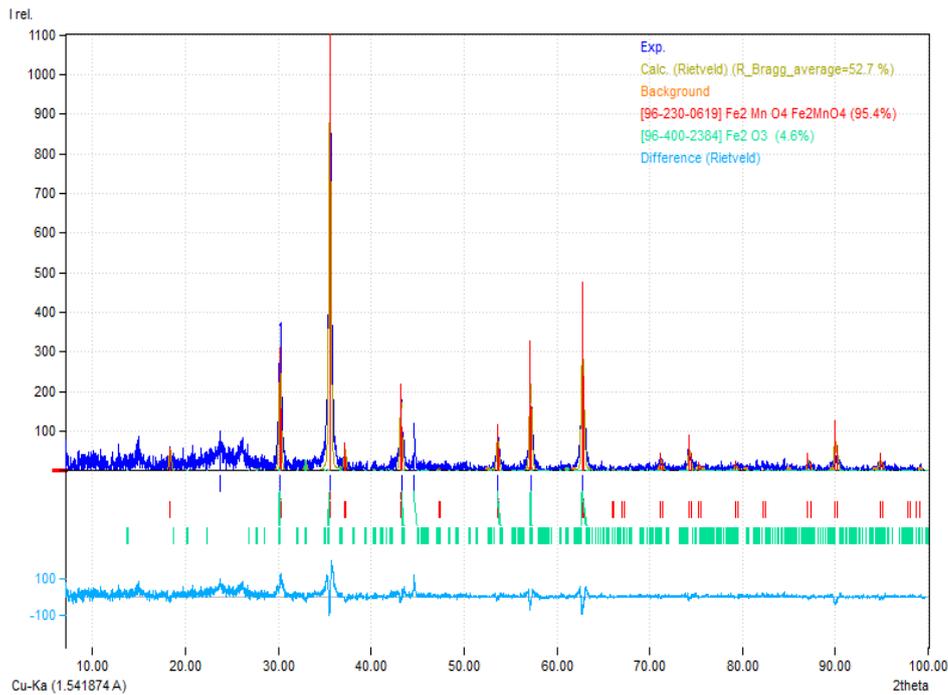


Figura 30: Difratograma de XRD obtidos para as nanopartículas de ferrites mistas de cálcio e magnésio.



**Figura 31:** Difratoograma de XRD obtidos para as nanopartículas de ferrite de manganês.

Para as ambas as ferrites, foi possível verificar a presença de picos característicos da existência de fases cristalinas. No entanto, observaram-se também alguns picos mais alargados que podem estar associados a fatores instrumentais e à presença de fases amorfas nas amostras.

Para as ferrites mistas de cálcio e magnésio, o ficheiro CIF 9003773, correspondente a ferrites de magnésio ( $\text{MgFe}_2\text{O}_4$ , space group Fd-3m), foi importado e manipulado de forma a que na sua composição um quarto das posições dos iões de magnésio fossem substituídas por iões de cálcio. Após esta alteração, foi possível identificar uma fase cristalina de ferrite mista de cálcio e magnésio, através da indexação de todos os picos típicos desta fase, confirmando a síntese das mesmas. A otimização de Rietveld resultou em um ajuste razoável com  $\chi^2 = 8,4$ . Para as ferrites de manganês foram identificados, além dos picos correspondentes à fase cristalina cúbica de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ , picos adicionais, os quais foram indexados com uma fase ortorrômbica de óxido de ferro (que é uma fase caracterizada por apresentar baixa magnetização). A otimização de Rietveld resultou num valor de  $\chi^2$  um pouco alto e valor igual a 10,6.

Para o cálculo do tamanho das cristalites, recorreu-se à equação de *Scherrer*, equação 7:

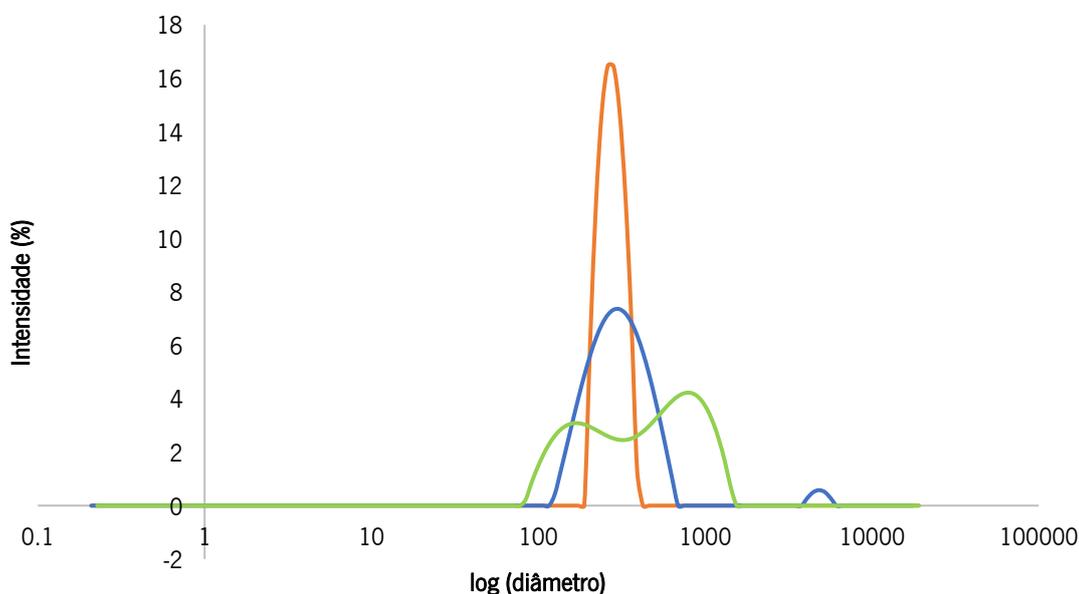
$$\tau = \frac{k \lambda}{\beta \cos\theta} \quad \text{Equação 7}$$

onde  $\tau$  corresponde ao tamanho da cristalite,  $k$  à constante da forma geométrica ( $k = 0,9$ , para nanopartículas esféricas),  $\lambda$  o comprimento de onda dos raios-X do equipamento ( $\lambda = 0,1541874$  nm),  $\beta$  é a largura a meia altura do pico de intensidade máxima, e  $\theta$  é o ângulo de difração. Assim, para  $2\theta = 35,65^\circ$  e  $2\theta = 23,79^\circ$ , foram obtidos tamanhos de 23,31 nm e 35,64 nm, para as cristalites de  $\text{CaMgFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ , respetivamente.

### 3.1.3. Difusão Dinâmica da Luz (DLS)

Através desta técnica, foi possível caracterizar estruturalmente as nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio e as ferrites de manganês quando dispersas num meio aquoso. Para ambas foram realizados três ensaios com o intuito de estudar a estabilidade das nanopartículas magnéticas, sendo que o primeiro se encontra representado a laranja, o segundo a azul e o terceiro a verde.

Na **figura 32 e 33** encontra-se representado o gráfico da distribuição por intensidade do tamanho e o correlograma dos três ensaios das nanopartículas magnéticas de  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{0,75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ . Foram realizadas três réplicas, sendo que a representada a verde e a laranja apresentam apenas uma população ao contrário da representada a azul, que apresenta duas populações. Estes tamanhos médios registados podem ser uma consequência da aglomeração das nanopartículas e da sua evolução ao longo do tempo.



**Figura 32:** Distribuição por intensidade do tamanho das nanopartículas magnéticas de  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{0,75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ .

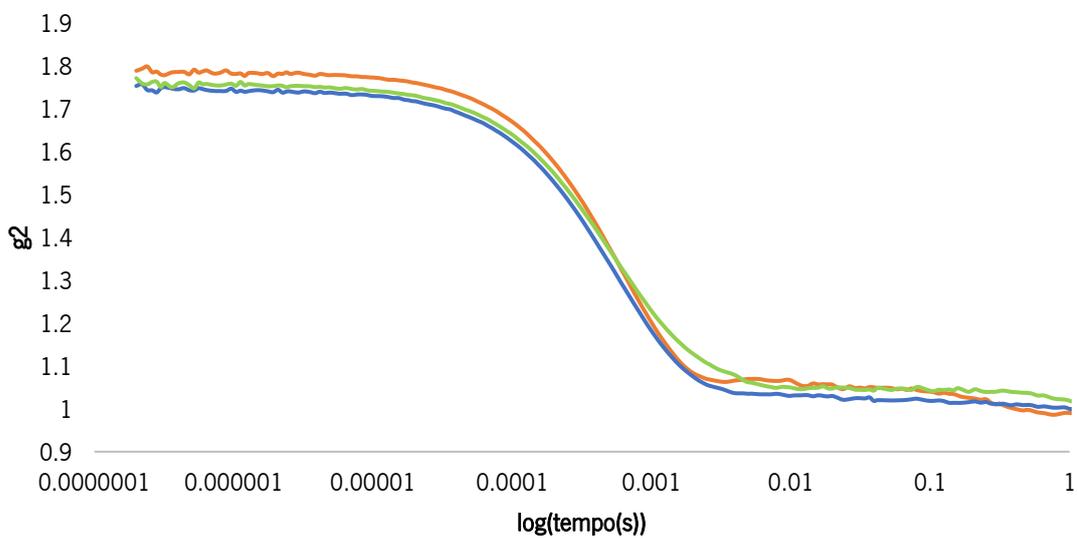


Figura 33: Correlograma das nanopartículas magnéticas de  $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ .

Na figura 34 e 35 encontra-se representado o gráfico da distribuição por intensidade e o correlograma das nanopartículas magnéticas de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ , respetivamente.

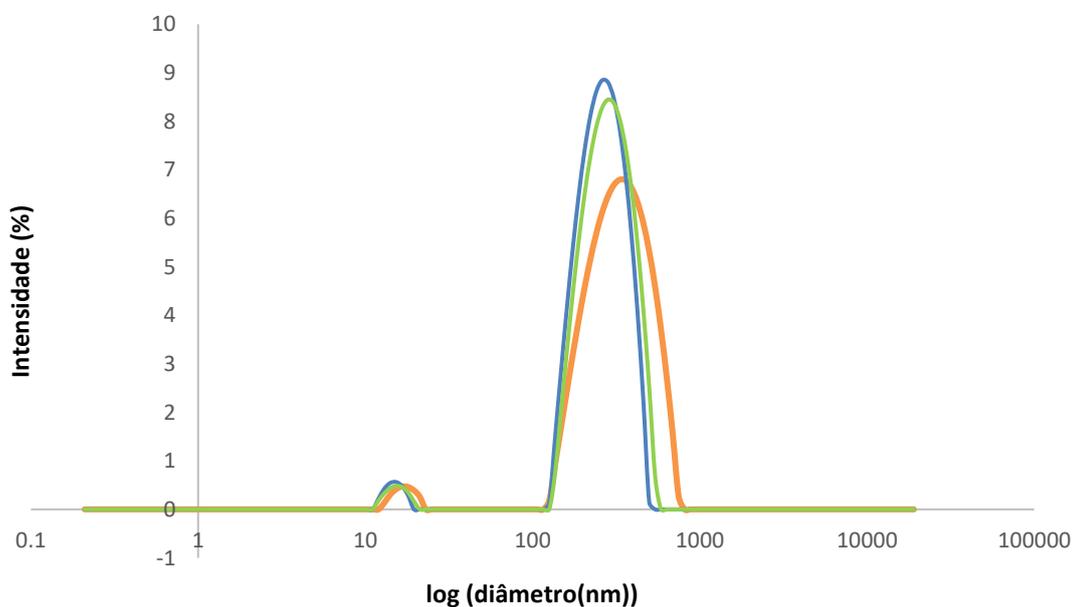


Figura 34: Distribuição por intensidade do tamanho das nanopartículas magnéticas de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ .

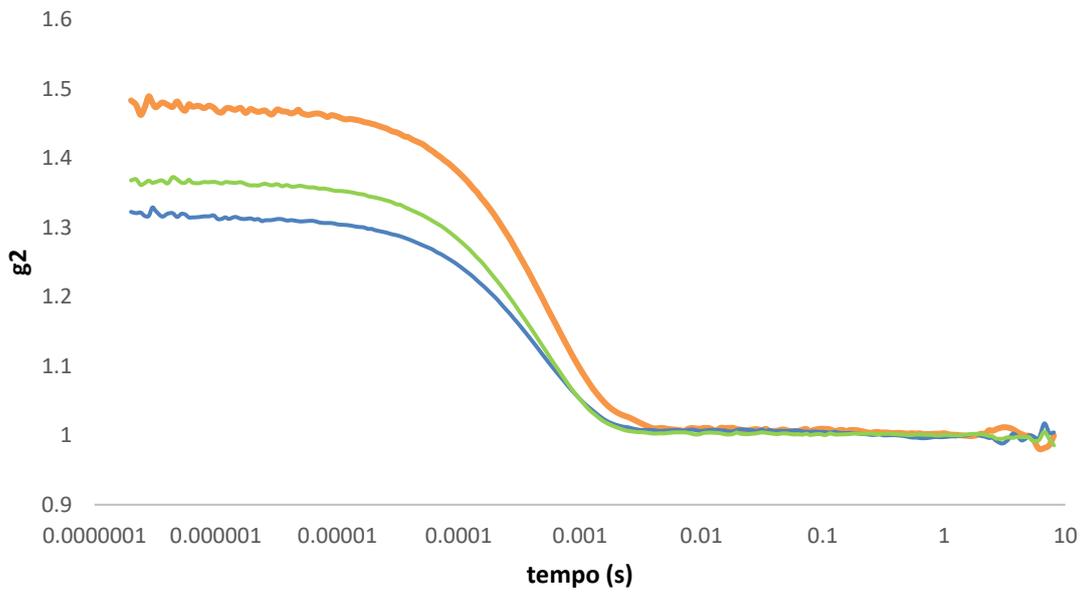


Figura 35 : Correlogramas das nanopartículas magnéticas de MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

Os valores do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta obtidos encontram-se apresentados na tabela 7, para ambas as nanopartículas magnéticas.

Tabela 7: Diâmetro hidrodinâmico (DH) e potencial zeta, com os respectivos desvios, obtidos segundo a distribuição de tamanhos por intensidade dos três ensaios realizados.

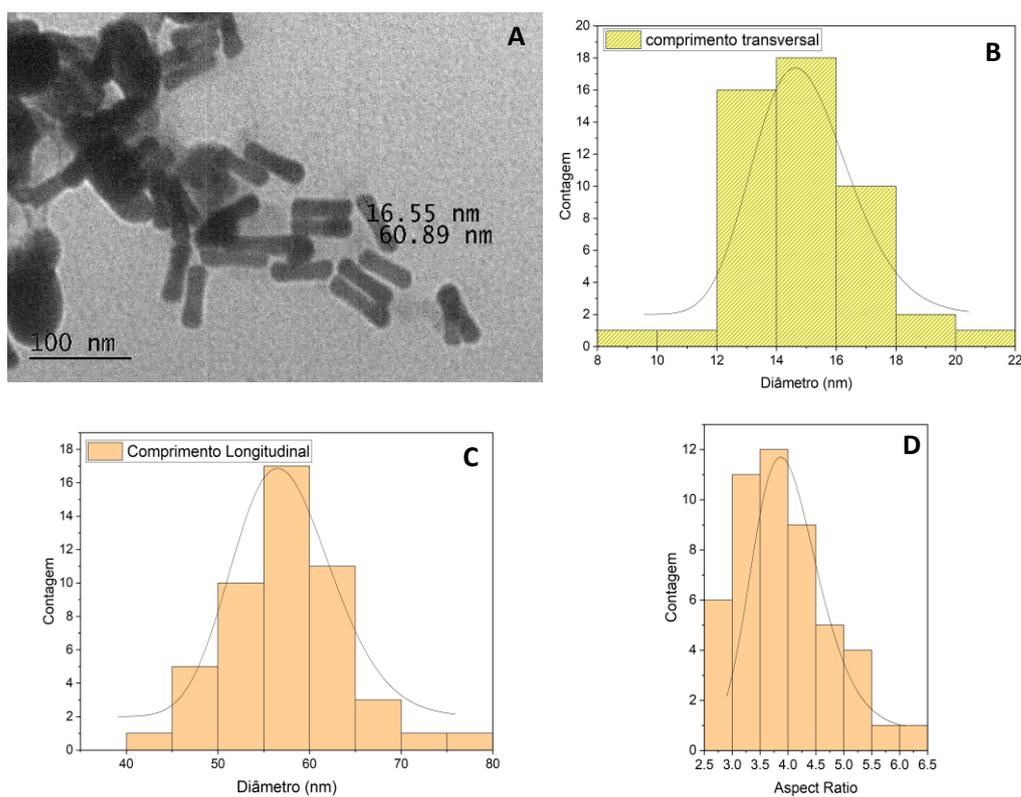
Picos	DH ± Desvio (nm)	Potencial Zeta ± Desvio (mV)	DH ± Desvio (nm)	Potencial Zeta ± Desvio (mV)	DH ± Desvio (nm)	Potencial Zeta ± Desvio (mV)	
	Ensaio 1 (laranja)		Ensaio 2 (azul)		Ensaio 3 (verde)		
Ca <sub>0,25</sub> Mg <sub>0,75</sub> Fe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	1	277,73±42,81	-15,47±0,65	339,98±126,56	-13,69±0,53	728,49±321,49	-15,90±0,27
	2	-	-	520,07±520,81	-	185,66±60,18	-
MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	1	17,08±2,31	-14,60±0,93	14,92±1,83	-11,81±0,87	15,46±2,08	-9,83±0,47
	2	348,49±135,67	-	270,47±80,41	-	291,85±91,85	-

De acordo com os dados da tabela, verificou-se que a análise por intensidade progrediu da presença de apenas um pico para dois picos, relativamente às nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio. Este facto pressupõe que se evolui para populações constituídas por agregados de partículas e, desta forma, não faria sentido a análise das mesmas. Assim, para as nanopartículas de ferrites mistas de cálcio e magnésio assumiu-se que estas teriam um tamanho de  $277,73 \pm 42,81$ . Para as partículas magnéticas de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  analisou-se da mesma forma, sendo que qualquer dos tamanhos do primeiro pico poderão corresponder ao tamanho das mesmas. Desta forma, o tamanho médio destas nanopartículas ronda os 15,82 nm. Estes são valores um pouco acima do que seria de esperar para este tipo de nanopartículas. No entanto, tendo em conta que as medições são feitas em solução e que o valor que se está a medir corresponde ao diâmetro hidrodinâmico, é de se esperar que os valores estimados sejam ligeiramente maiores devido à camada de solvatação.

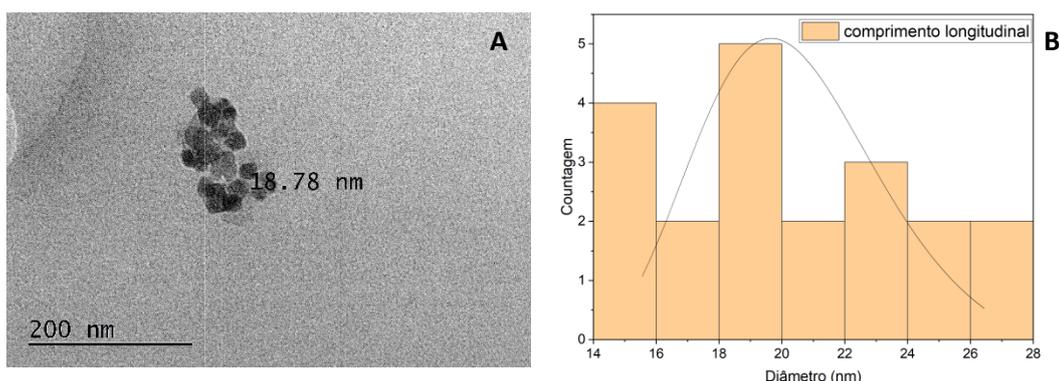
Com base nos valores obtidos da carga superficial neutra, ambas as soluções de partículas magnéticas não apresentam grande estabilidade, o que confirma a elevada agregação das partículas.

### 3.1.4. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para obter informações acerca do tamanho e morfologia das partículas magnéticas. Os tamanhos das nanopartículas foram obtidos no *software* ImageJ e a sua distribuição foi determinada pelo ajuste do histograma dos tamanhos a uma distribuição gaussiana, utilizando o *software* OriginPro 7,5. As imagens obtidas das nanopartículas de ferrite mista de magnésio e cálcio e ferrites de manganês, estão presentes na figura 36 e 37.



**Figura 36:** Imagem de TEM obtida para as nanopartículas magnéticas de  $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$  (A). Histograma dos tamanhos, ajustado a uma distribuição Gaussiana, do comprimento transversal (B) comprimento longitudinal (C) e aspect ratio (D) das nanopartículas da imagem A.



**Figura 37:** Imagem de TEM obtida para as nanopartículas magnéticas de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ . Histograma de tamanhos, ajustado a uma distribuição Gaussiana (B) das partículas da imagem A.

Na **tabela 8** são apresentados os resultados obtidos.

**Tabela 8:** Tamanho médio longitudinal e transversal e respetivo desvio padrão das nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio e de ferrites de manganês.

	Tamanho Médio Longitudinal (nm) $\pm \sigma$	Tamanho Médio Transversal (nm) $\pm \sigma$
NPs $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$	$57,4 \pm 6,62$	$14,9 \pm 2,05$
NPs $\text{MnFe}_2\text{O}_4$	$20,37 \pm 3,93$	-

Desta análise foi possível observar a formação de nanopartículas de ferrite de manganês de forma cúbica, e nanopartículas de ferrite mista de cálcio e magnésio em forma de nanovara. Assim, para as ferrites mistas de cálcio e magnésio, foi possível determinar o seu tamanho longitudinal e transversal, tendo sido obtidos valores de tamanho médio  $57,4 \text{ nm} \pm 6,62$ , e  $14,9 \text{ nm} \pm 2,05$ , respetivamente **figura 36 (B) e (C)**. A razão entre a largura longitudinal e transversal das NPs foi também estimada, tendo sido obtido valores de  $3,92 \pm 0,8 \text{ nm}$ , para os bastonetes **figura 36 (D)**.

Para as ferrites de manganês, obteve-se uma distribuição de tamanhos de  $20,37 \pm 3,93 \text{ nm}$ , representado na **figura 37 (B)**.

Para fazer a comparação de do tamanho das nanopartículas magnéticas, construiu-se a **tabela 9**.

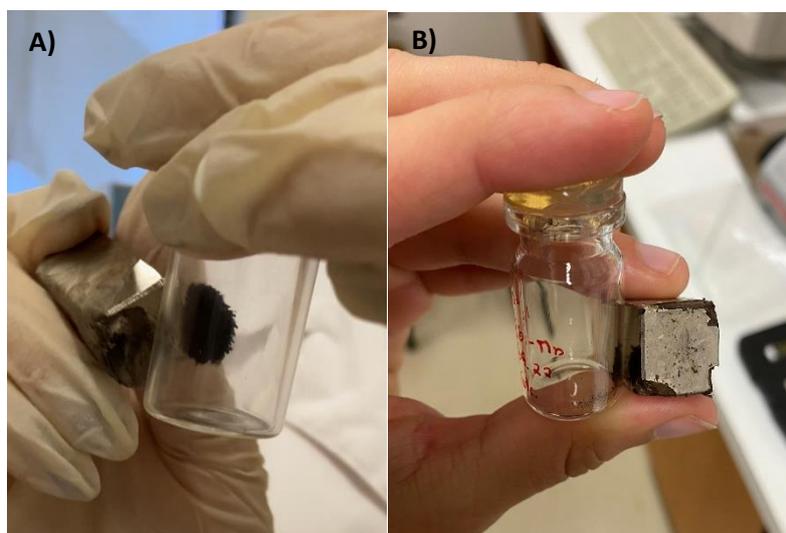
**Tabela 9:** Tamanho médio das nanopartículas magnéticas obtidos através da técnica de XRD, DLS e TEM.

Nanopartículas	Técnica de caracterização			
	XRD (nm)	DLS (nm)	TEM (nm)	
			Tamanho Médio Longitudinal (nm) $\pm \sigma$	Tamanho Médio Transversal (nm) $\pm \sigma$
<b>Ca<sub>0.25</sub>Mg<sub>0.75</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	23,31	277,73	57,4 $\pm$ 6,62	14,9 $\pm$ 2,05
<b>MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	35,64	15,82	20,37 $\pm$ 3,93	-

De acordo com a tabela representada, é possível observar que existe pouca uniformização de tamanhos para as várias técnicas, havendo maior discrepância nas nanopartículas de Ca<sub>0.25</sub>Mg<sub>0.75</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, foi verificado que as nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio apresentavam forma de nanovaras e, portanto, foi importante determinar o tamanho médio longitudinal e transversal das mesmas. Como tal foi observado, os tamanhos obtidos para estas partículas são bastante diferentes com os obtidos pela técnica de XRD e DLS uma vez que são técnicas de análise que assentam num modelo esférico de nanopartículas. Assim, o tamanho obtido pela técnica TEM é o mais fiável. O mesmo se aplica para as nanopartículas magnéticas de ferrites de manganês. No entanto, como se tratam de nanopartículas cúbicas, os valores já apresentam maior uniformização.

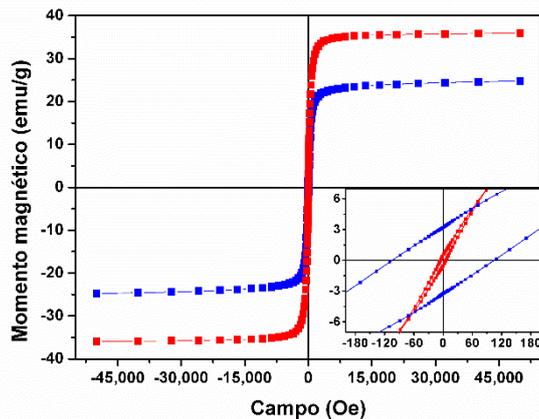
### 3.1.5. Propriedades magnéticas

A determinação da resposta magnética das nanopartículas magnéticas é bastante importante para objetivo deste trabalho. Posto isto, o comportamento magnético das nanopartículas foi primeiramente observado pela sua resposta à aplicação de um magneto. Através desta análise preliminar, foi possível observar a resposta imediata das nanopartículas à presença de campo, e a posterior perda da mesma magnetização após a remoção do campo aplicado (**figura 38**). Desta forma, foi possível prever um comportamento superparamagnético. No entanto, para as partículas magnéticas de ferrite de manganês observou-se uma resposta mais fraca.



**Figura 38:** Comportamento das nanopartículas de ferrite mistas de cálcio e magnésio (A) e ferrites de manganês (B) com a aplicação de um magneto.

Para determinar efetivamente o tipo de magnetismo das nanopartículas obtidas, a dependência da magnetização a um campo aplicado foi medida num SQUID. A **figura 39** mostra os ciclos de histerese de ambas as ferrites (azul para  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  e vermelho para  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{0,75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ), mostrando a relação entre o momento magnético induzido e o campo magnético aplicado, à temperatura ambiente. Na imagem, encontra-se inserido uma ampliação de baixo campo. Os valores de magnetização de saturação, magnetização de remanescência, campo de coercividade e razão entre a remanescência e saturação, encontram-se resumidos na **tabela 10**.



**Figura 39:** Ciclo de histerese de magnetização das nanopartículas de  $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$  e  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ , à temperatura ambiente.

**Tabela 10:** Campo coercivo ( $H_c$ ), magnetização de remanescência ( $M_r$ ), magnetização de saturação ( $M_s$ ), e razão entre a magnetização de remanescência e magnetização de saturação ( $M_r/M_s$ ) para as ferrites  $\text{MgCaFe}_2\text{O}_4$  e  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ .

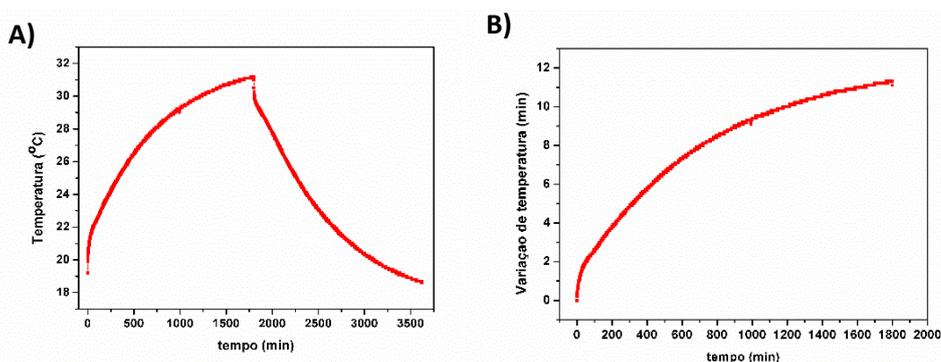
Nanopartículas	$H_c$ (Oe)	$M_s$ (emu/g)	$M_r$ (emu/g)	$M_r/M_s$
$\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$	5,74	35,82	0,51	0,014
$\text{MnFe}_2\text{O}_4$	103,44	24,88	3,17	0,127

Com base nessa tabela, os valores de magnetização de saturação das nanopartículas magnéticas de ferrite mistas de cálcio e magnésio são maiores quando comparadas com as ferrites de manganês. Posto isto, as primeiras mencionadas são mais promissoras para aplicações em hipertermia e para a sua manipulação através de campos magnéticos externos. Ambas as nanopartículas apresentaram um ciclo de histerese fechado, com valores baixos de coercividade e remanescência, indicando um comportamento superparamagnético das mesmas. Este comportamento pode ser avaliado através da razão entre a magnetização de remanescência com a magnetização de saturação. Se este valor for abaixo de 0,1, indica que mais de 90% da magnetização é perdida com a remoção do campo magnético aplicado e as nanopartículas são consideradas superparamagnéticas. Com esta informação, é possível verificar que as nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio apresentam um valor de  $M_r/M_s$  inferior a 0,1, corroborando o comportamento superparamagnético. Este valor é inferior ao reportado por (Beatriz D. Cardoso et al., 2021) de 0,03. Já as nanopartículas magnéticas de ferrites de manganês apresentam um valor  $M_r/M_s$  de 0,127 pelo que se pode dizer que estão no

limite para um comportamento superparamagnético. Este valor é inferior ao reportado por (Mathubala et al., 2016) de 0,19.

### 3.1.6. Hipertermia Magnética

Tendo em conta o melhor comportamento magnéticos das ferrites mistas de cálcio e magnésio, estas foram seleccionadas para avaliação da sua capacidade de produção de calor, na presença de uma campo magnético alternado (AMF). Para este ensaio foi utilizado um campo magnético de frequência e intensidade de campo de 155 kHz e 8,5 kA/m, respetivamente. Para efetuar a análise foi preparada uma solução aquosa de nanopartículas  $\text{CaMgFe}_2\text{O}_4$  de concentração 23 mg/mL. Os dados adquiridos incluem o aquecimento e arrefecimento, durante 30 minutos cada (figura 40 (A)). A figura 40 (B) mostra a variação da temperatura da solução em função do tempo, em minutos, sob a aplicação do campo magnético descrito.



**Figura 40:** (A) Curva de aquecimento da solução aquosa de nanopartículas de  $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$  e (B) variação da temperatura da mesma solução aquosa, ao longo do tempo.

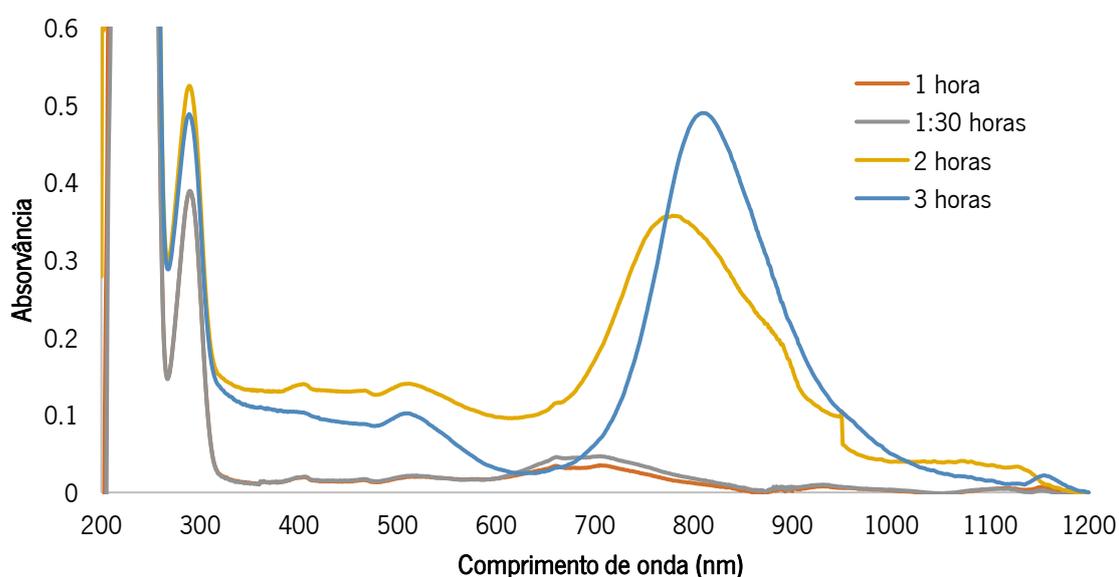
Após 30 minutos de aplicação do campo, foi registada variação máxima de temperatura de 12 °C, correspondente a uma temperatura máxima de 31 °C. Para o cálculo do SAR, foi utilizado o método *IAM* (do inglês *Incremental Analysis Method*) e o modelo Box-Lucas, tendo sido obtidos valores de  $4,98 \pm 1,4\text{W/g}$  e  $3,2\text{ W/g}$ , respetivamente. O ILP, que representa a perda de potência intrínseca, foi também calculado, tendo apresentado um valor de  $0,47 \pm 0,12\text{ nHm}^2/\text{K}$ . Os valores de ILP obtidos encontram-se dentro do intervalo de valores típico de nanopartículas magnéticas para hipertermia disponíveis comercialmente (que variam entre 0,15 a 3,12 nH m<sup>2</sup>/kg) (Kallumadil et al., 2009), o que confirma o potencial destas nanopartículas como agentes de hipertermia.

### 3.2. Caracterização das nanopartículas de ouro

Para a síntese das nanopartículas de ouro em forma de nanovaras, foram testados vários métodos de preparação, incluindo o método por sementes. No entanto, verificou-se que este não apresentava reprodutibilidade, pelo que foi descartado. Assim, após várias etapas de otimização, as nanopartículas de ouro foram preparadas conforme o descrito na **secção 2.2**.

#### 3.2.1. Espectroscopia UV-Visível

A técnica permitiu concluir a síntese das nanovaras de ouro e obter informações sobre o seu tamanho, forma, agregação e concentração. Assim, a mistura reacional foi seguida através da medição de espectros de absorção traçados em diferentes intervalos de tempo (**figura 41**).



**Figura 41:** Espectros de absorvância das nanopartículas de ouro, em diferentes tempos da reação.

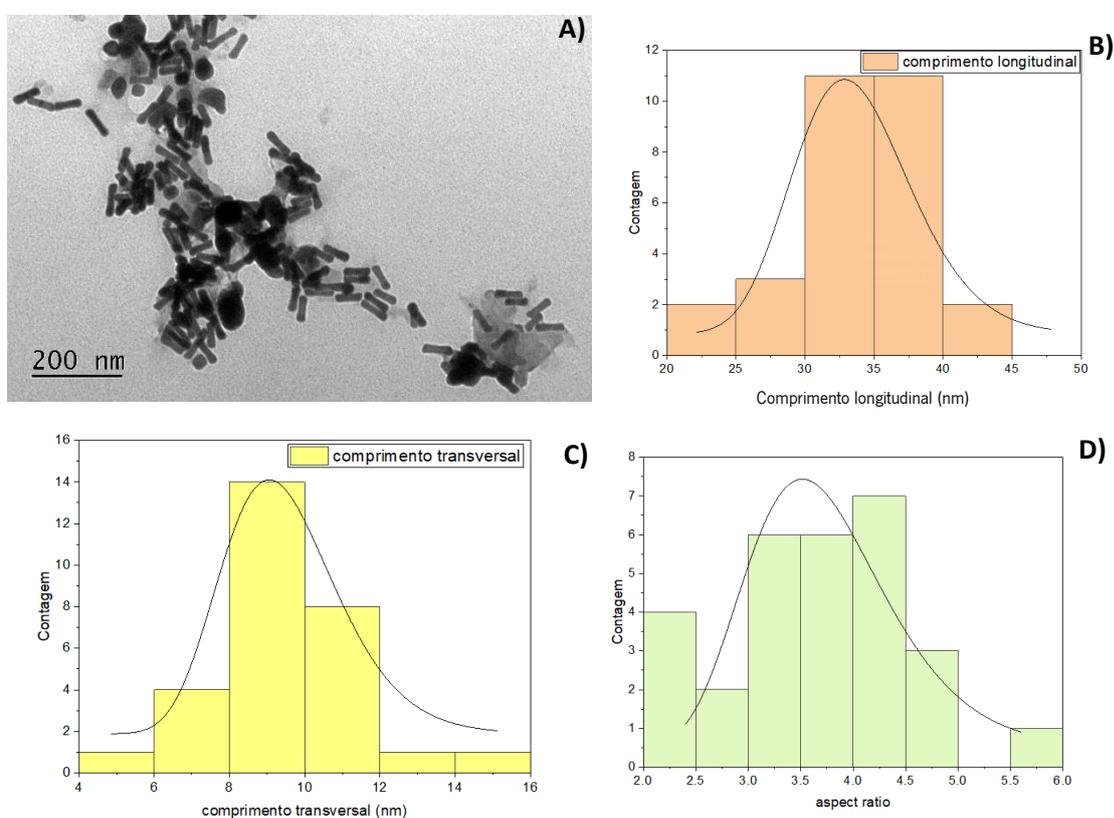
Através dos espectros de absorção obtidos, é possível verificar a formação das nanovaras a partir das 2 h de reação, uma vez que só a partir deste tempo é possível observar os dois picos respetivos ao plasmão de superfície longitudinal (perto dos 800 nm) e transversal (à volta dos 500-550 nm). É perceptível também que a intensidade das bandas não é proporcional ao tempo de reação, no entanto, é possível verificar a formação de plasmões mais bem definidos ao longo do tempo.

De acordo com a tabela 1 do artigo (N. A. Salavatova et al., 2018), estas nanopartículas devem apresentar um diâmetro de 8,9 nm e um comprimento de 31 nm. A partir destes valores,

é expectável obter nanovaras com uma razão entre o comprimento e diâmetro de 3,48, ideais para aplicações fototérmicas uma vez que, de acordo com a literatura, a proporção ideal é tipicamente de 3,8 a 6 para uma terapia fototérmica mais eficaz (Khan et al., 2021).

### 3.2.2. Microscopia eletrónica de transmissão (TEM)

A confirmação da formação das nanovaras de ouro e a determinação do seu tamanho é essencial para este trabalho. As imagens obtidas por microscopia eletrónica de transmissão estão representadas na **figura 42**. Os tamanhos das nanopartículas foram obtidos no *software* ImageJ e as distribuições determinadas pelo ajuste dos histogramas dos tamanhos a uma distribuição gaussiana, utilizando o *software* OriginPro 7,5.



**Figura 42:** Imagem de TEM obtida para as nanopartículas de ouro. Histogramas, segundo uma distribuição Gaussiana, do comprimento longitudinal (B) comprimento transversal (C) e aspetc ratio (D) das partículas da imagem A.

As imagens obtidas permitiram confirmar a formação de nanopartículas ouro em forma de nanovara. A partir da **figura 42**, foram estimadas as distribuições dos tamanho longitudinal e transversal das nanovaras. Obtiveram-se distribuições de tamanho longitudinal e transversal, de

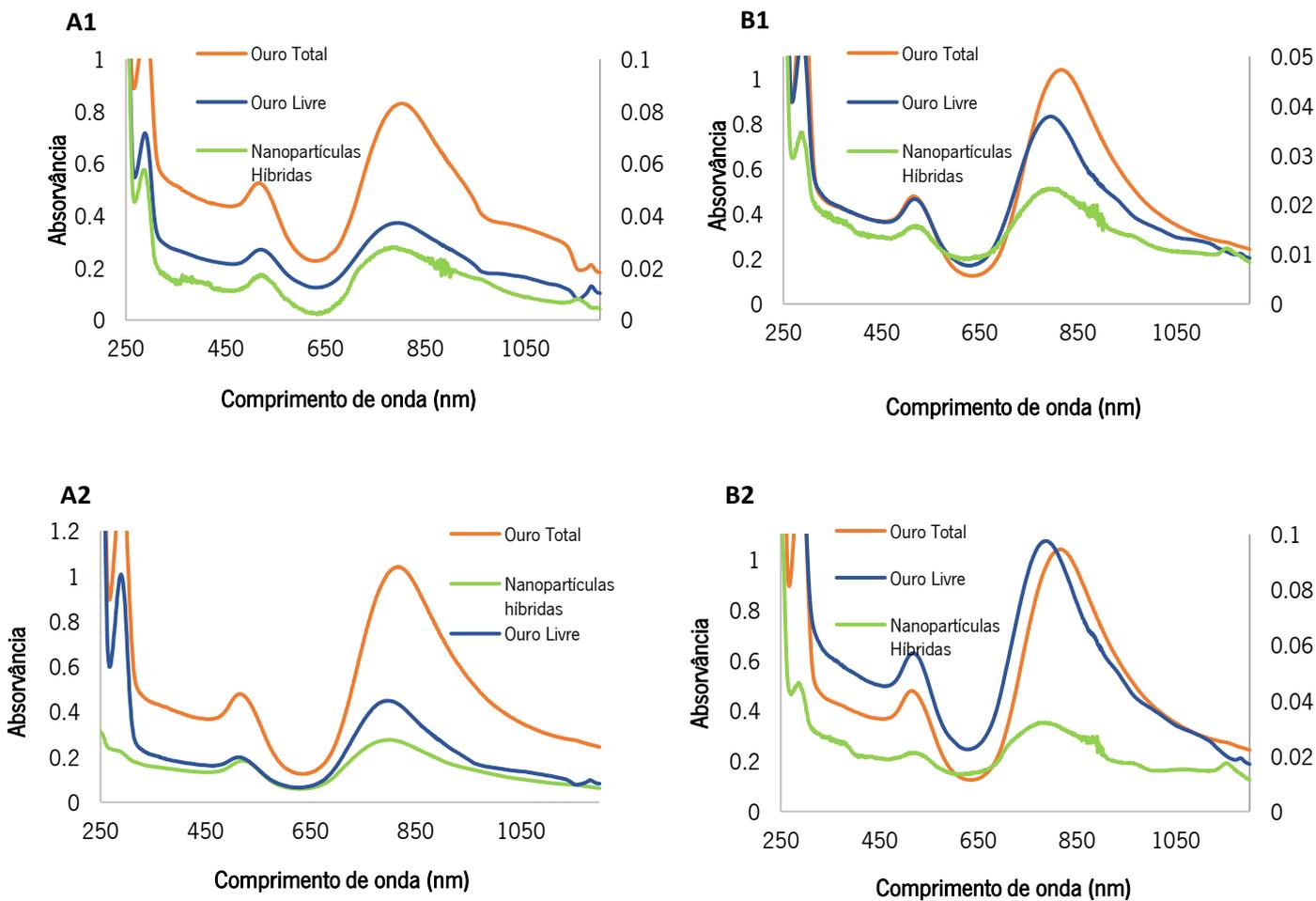
33,60 ± 4,74 e 9,42 nm ± 1,82, respectivamente. Assim, foram estimados valores de proporção de 3,69 ± 0,85 nm. De acordo com o referido anteriormente, seria esperada a formação de nanopartículas com diâmetro de 8,9 nm e um comprimento de 31 nm, o que está de acordo com os valores de tamanhos obtidos aqui.

### 3.3. Acoplamento das nanopartículas magnéticas e plasmónicas

Para a realização do acoplamento entra as nanopartículas magnéticas e plasmónicas foi essencial refletir sobre os resultados obtidos na caracterização de ambas as nanopartículas. Assim, foram tidos em conta dois fatores cruciais para o sucesso do acoplamento; as propriedades magnéticas das ferrites preparadas e a forma de encaixe geométrico das nanopartículas magnéticas com as plasmónicas. De acordo com os resultados obtidos por TEM, foi possível concluir que apenas a forma e tamanho das nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio é viável para o acoplamento com as nanovaras de ouro. Adicionalmente, tendo em conta as melhores propriedades magnéticas das nanopartículas magnéticas de  $\text{CaMgFe}_2\text{O}_4$ , foi determinada a sua utilização para o acoplamento com as nanovaras de ouro.

O processo de acoplamento de nanovaras de ouro nas nanopartículas de  $\text{CaMgFe}_2\text{O}_4$  foi monitorizado através de espectroscopia UV-Visível, numa gama de comprimentos de onda entre os 250 e os 1200 nm. Como foi descrito no procedimento experimental, foram testadas duas metodologias de síntese e dois processos de separação, de acordo ao descrito na **tabela 6** do **capítulo 2.3**.

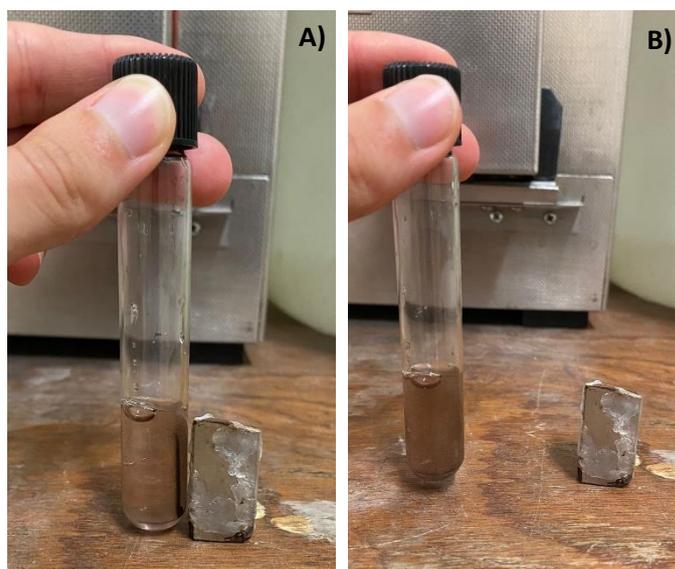
Na **figura 43** são apresentados os espectros do processo de acoplamento das metodologias A1, A2, B1 e B2. Em cada gráfico são apresentados três espectros: (i) nanopartículas de ouro antes de processo de acoplamento, denominado ouro total, (ii) nanopartículas híbridas, e (iii) ouro livre, que representa o ouro não ligado.



**Figura 43:** Espectros de absorvância das soluções de ouro livre, ouro Total e Nanopartículas híbridas para a metodologia A1, A2 ,B1 e B2.

A experiência das metodologias A1 e A2 permitiram aferir acerca da melhor forma de separação das nanovaras de ouro não acopladas das nanopartículas híbridas. Assim, foi possível verificar que a decantação magnética (A1) é mais eficaz na purificação das nanopartículas híbridas, apesar de se observar uma menor intensidade de absorção de nanopartículas híbridas quando

comparado com o método A2. Concluiu-se que o processo de centrifugação promove a precipitação de ambas as nanopartículas (nanovaras não acopladas e nanopartículas híbridas), pelo que não é um procedimento eficaz para a sua separação. Desta forma, a decantação magnética passou a ser a forma de separação adotada para purificação das nanopartículas híbridas nos ensaios B1 e B2, nos quais foi possível estudar a diferença entre as metodologias a 80 °C, com diferentes tempos de reação. Na **figura 44** está representada o comportamento das nanopartículas híbridas na presença e ausência de um íman, sendo possível observar a resposta magnética destas nanoestruturas que permitiu a sua purificação.



**Figura 44:** Resposta magnéticas das nanopartículas híbridas na (A) presença e (B) ausência do íman.

Neste ensaio, verificou-se uma maior diferença de intensidade entre os espectros de ouro ligado e ouro livre para a amostra B1, pressupondo uma maior ligação das nanopartículas de ouro às nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio à 1h. No entanto, o ensaio a 60 °C com 1 hora de tempo de reação (A1), continuou a apresentar melhor eficácia de acoplamento. Assim, concluiu-se que o aumento da temperatura de reação não promoveu a eficácia de acoplamento. Posto isto, foi prosseguido o trabalho de tese com o acoplamento das nanopartículas de  $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$  com as nanovaras de ouro, nas condições experimentais método A1.

A massa de ouro ligado, do ensaio A1 representado na figura 43, foi conseguida através do cálculo da percentagem de perda de absorvância do plasmão longitudinal, como demonstra a equação 8:

$$\frac{\text{Absorv\~{a}ncia (Ouro total)} - \text{Absorv\~{a}ncia(Ouro Livre)}}{\text{Absorv\~{a}ncia (Ouro total)}} \times 1,098 \text{ mg}$$

**Equa\~{c}\~{a}o 8**

Na **tabela 11** \u00e9 apresentada a concentra\~{c}\~{a}o de ouro livre e ouro ligado e a percentagem de acoplamento para o ensaio A1.

**Tabela 11:** Massa de ouro livre e ligado e a respetiva percentagem de acoplamento para o ensaio A1.

	Massa de Ouro Livre (mg)	Massa de Ouro Ligado (mg)	% Ouro Ligado
A1	0,49	0,60	55,10

### 3.3.1. Ensaio de Hipertermia Fotot\u00e9rmica

O potencial de gera\~{c}\~{a}o de calor das nanop\u00e1rticulas h\u00edbridas foi avaliado na presen\u00e7a de irradia\~{c}\~{a}o NIR. Para compara\~{c}\~{a}o, foram tamb\u00e9m realizados ensaios de fototermia para as nanop\u00e1rticulas de ouro e magn\u00e9ticas, antes do acoplamento. Assim, foram preparadas duas solu\~{c}\~{o}es aquosas de 1 mg/ml de nanop\u00e1rticulas de  $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$  e de nanovaras de ouro, e uma terceira de nanop\u00e1rticulas h\u00edbridas com uma concentra\~{c}\~{a}o de ouro de 1 mg/ml. A capacidade de aquecimento das tr\u00eas amostras foi avaliada com um laser cont\u00ednuo de 808 nm e uma densidade de fluxo energ\u00e9tico de 1 W/cm<sup>2</sup>. As curvas de aquecimento e arrefecimento bem como o ajuste linear dos primeiros minutos de aquecimento encontram-se na **figura 45**. Os valores de SAR foram obtidos pelo m\u00e9todo *Initial Slope*. Para tal, foi realizado um ajuste linear aos 3 primeiros minutos de aquecimento. Esta zona linear da curva abrange o tempo em que o processo de aquecimento ocorre efetivamente, sem qualquer perda/troca de calor com o ambiente, sendo poss\u00edvel extrair a temperatura real de aumento causada pela irradia\~{c}\~{a}o do laser nas nanop\u00e1rticulas. Os resultados obtidos, est\u00e3o sumarizados na **tabela 12**.

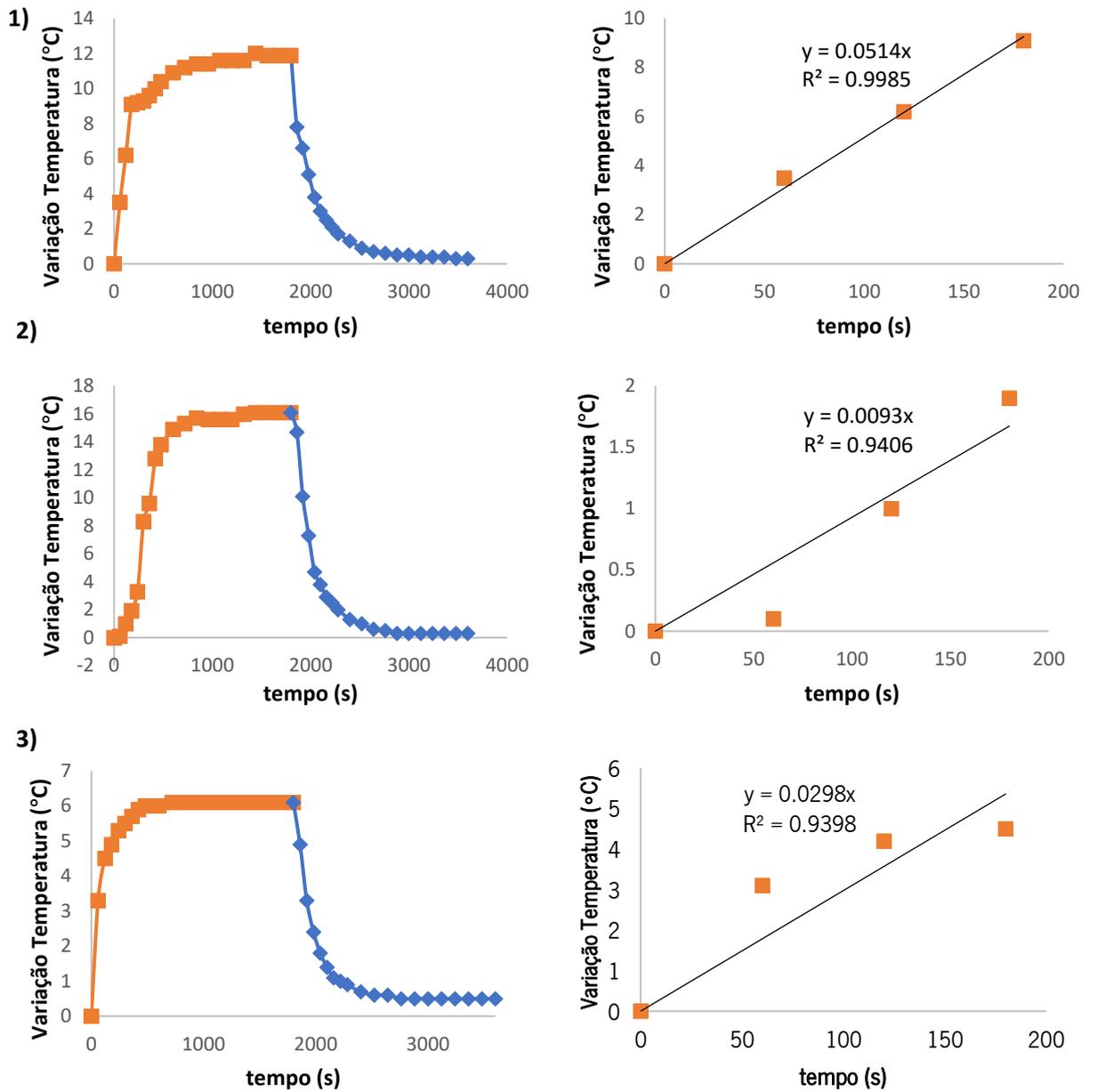


Figura 45: Curva de aquecimento e respetivo ajuste linear dos três primeiros minutos aquecimento, de acordo com o método *Initial slope*, da solução de nanopartículas de ouro (1), nanopartículas magnéticas totais (2) e nanopartículas híbridas (3).

**Tabela 12:** Compilação dos resultados obtidos dos testes da hipertermia fototérmica. Da esquerda para a direita, temperatura máxima atingida, declive do ajuste linear e a capacidade térmica de aquecimento (SAR).

	$\Delta T_{\text{máx}}$ (°C)	Declive ajuste linear	SAR (W/g)
Nanovaras de Ouro	11,9	0,0514	214,85
NPs de $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$	16,1	0,0093	38,87
Nanopartículas híbridas	6,1	0,0298	117,91

Como era expectável, as nanovaras de ouro apresentaram melhor capacidade de aquecimento em relação às nanopartículas magnéticas. Obtiveram-se variações de temperatura máxima de 11,9 °C e de 16,1 °C, com valores correspondentes de SAR de 214,85 W/g e 38,87 W/g, para as nanovaras de ouro e as NPs de  $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ , respetivamente. Por outro lado, as nanopartículas híbridas apresentaram uma variação de temperatura máxima menor, no valor de 6,1 °C. Relativamente às nanopartículas híbridas, estas apresentam um valor de SAR mais baixo, nomeadamente 117,91 W/g uma vez que a interação “direta” das nanopartículas magnéticas com as nanopartículas plasmónicas provoca uma diminuição da absorvância do plasmão longitudinal, provocando uma diminuição da capacidade de aquecimento destas, quando comparadas com as nanopartículas plasmónicas individuais. Também a variação máxima de temperatura, no valor de 6,1 °C, é suficiente para a ação terapêutica uma vez que à temperatura fisiológica atinge-se a temperatura da hipertermia fototérmica.

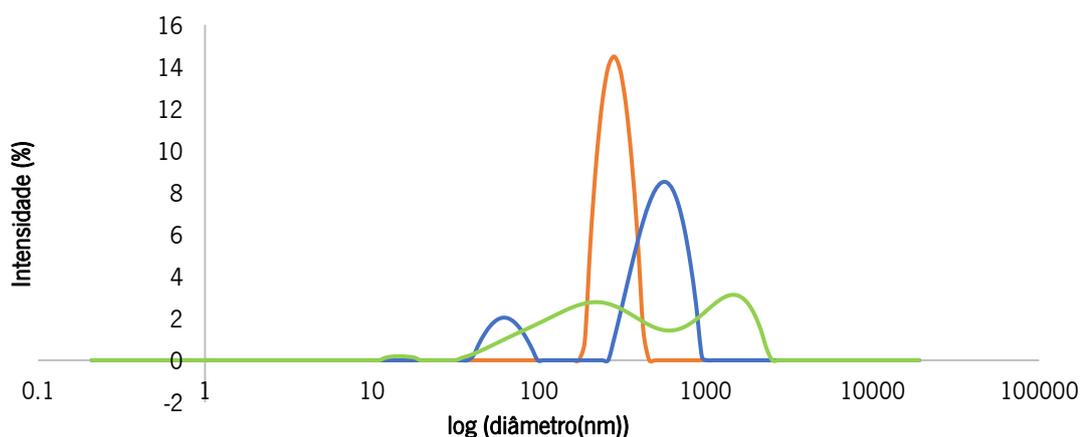
O valor de massa de nanopartículas para o cálculo do SAR das nanopartículas híbridas foi conseguido através do cálculo da percentagem de perda da absorvância no plasmão longitudinal que permitiu obter a massa de partículas de ouro acopladas, nomeadamente 0,60. Desta forma, foi calculado o valor de massa total presente no acoplamento, correspondente à massa de nanopartículas magnéticas e plasmónicas. Importante referir que se fez um desconto do aumento da temperatura da água nos três sistemas estudados.

### 3.4. Caracterização dos magnetolipossomas plasmónicos

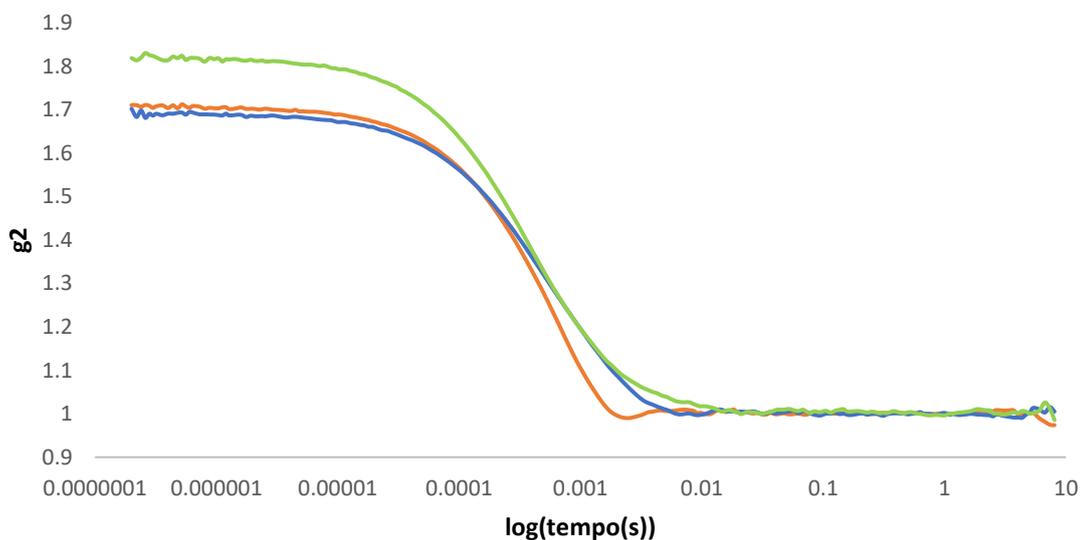
Tendo em vista o potencial das NPs híbridas para terapia multimodal, por hipertermia dual e quimioterapia, foram preparados lipossomas sólidos baseados nas NPs magneto-plasmónicas obtidas. A caracterização estrutural dos magnetolipossomas plasmónicos obtidos foi efetuada por DLS e a capacidade de aquecimento avaliada num ensaio preliminar de fototermia.

### 3.4.1. Caracterização por difusão dinâmica de luz

A distribuição de tamanhos e carga superficial dos lipossomas influenciam fortemente a sua interação com outras estruturas celulares. Assim, é de elevada importância determinar o tamanho hidrodinâmico, a distribuição de tamanhos e o potencial zeta dos nanossistemas obtidos. Na **figura 46 e 47** são apresentadas três réplicas da distribuição de tamanhos por intensidade e o correlograma, respetivamente. A primeira, segunda e terceira réplica estão representadas a laranja, azul e verde, respetivamente.



**Figura 46:** Distribuição por intensidade do tamanho dos magnetolipossomas contendo nanopartículas híbridas.



**Figura 47:** Correlograma dos magnetolipossomas contendo nanopartículas híbridas.

Na **tabela 13** estão resumidos os valores de diâmetro e potencial zeta obtidos.

**Tabela 13:** Diâmetro hidrodinâmico (DH) e potencial zeta e respectivos desvios obtidos para os SMLs contendo as nanopartículas híbridas.

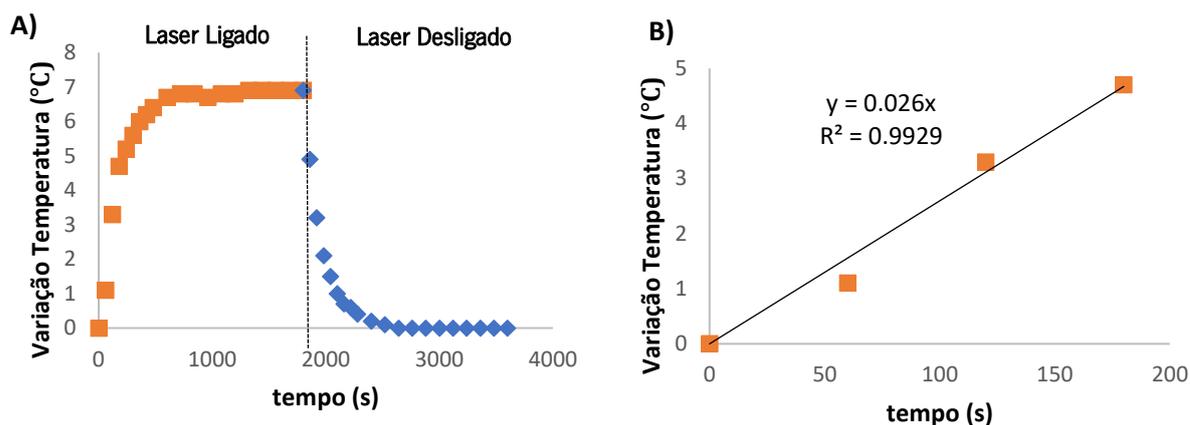
	Picos	DH ±	Potencial	DH ±	Potencial	DH ±	Potencial
		Desvio (nm)	zeta ±	Desvio (nm)	zeta ±	Desvio (nm)	zeta ±
			Desvio (mV)		Desvio (mV)		Desvio (mV)
		Ensaio 1(laranja)		Ensaio 2 (azul)		Ensaio 3 (verde)	
SMLs contendo nanopartículas híbridas	1	288,87± 53,64		551,86± 166,06		1286,42± 532,63	
	2	-	-1,43± 0,33	63,33± 12,27	-1± 0,31	218,65± 152,19	-0,5± 0,33
	3	-		-		14,86± 1,81	

Como demonstrado na tabela anterior, foram obtidos valores de diâmetro hidrodinâmico bastante variados para os vários ensaios, sendo que progrediu-se para amostras com maior número de picos o que pressupõe que ao longo do tempo se foram formando agregados. Desta forma, o ensaio 1, apresenta o resultado mais fiável. Assim, de acordo com esta análise, registou-se um valor de  $288,87 \pm 53,64$  nm para o tamanho dos magnetolipossomas. No entanto, tendo em conta que as medições são feitas em solução e que o valor que se está a medir corresponde ao diâmetro hidrodinâmico, é de se esperar que os valores estimados sejam ligeiramente maiores devido à camada de solvatação. Com base no descrito, os valores encontram-se acima do valor ideal para aplicações biomédicas, que seria abaixo dos 200 nm.

Por fim, os valores obtidos da carga superficial neutra estão de acordo com o valor esperado, dada a carga zwitteriônica do lípido externo DPPC. No entanto, os magnetolipossomas não apresentam grande estabilidade, sustentando a elevada agregação dos mesmos.

### 3.4.2. Ensaios de Hipertermia Fototérmica

Por fim, foi realizado um ensaio preliminar de fototermia dos magnetolipossomas preparados, de forma a estudar a sua capacidade de geração de calor. A curva de aquecimento e arrefecimento encontra-se representada na **figura 48** e os valores de temperatura máxima registada e SAR estão reunidos na **tabela 14**.



**Figura 48:** (A) Curva de aquecimento da solução de magnetolipossomas contendo nanopartículas híbridas e (B) Ajuste linear dos três primeiros minutos da curva de aquecimento, de acordo com o método *Initial slope*.

**Tabela 14:** Compilação dos resultados obtidos dos testes da hipertermia fototérmica para os magnetolipossomas com nanopartículas híbridas. Da esquerda para a direita, temperatura máxima atingida, declive do ajuste linear e a capacidade térmica de aquecimento (SAR).

$\Delta T_{\text{máx}}$ (°C)	Declive ajuste linear	SAR (W/g)
6,9	0,026	303,31

Registou-se uma variação de temperatura máxima de 6,9 °C, e obteve-se um valor de SAR igual a 303,31 W/g, bastante razoável para a aplicação biomédica discutida.

Relativamente à variação de temperatura máxima, esta é suficiente para a ação terapêutica uma vez que, tendo em conta a temperatura fisiológica, facilmente se atingem os 41-43 °C característicos desta terapia.

Por último, sobre a sensibilidade térmica dos lipossomas, estes são ótimos para esta ação terapêutica uma vez que ao atingirem uma temperatura maior a 41 (temperatura de transição do lípido DPPC) estes tornam-se mais fluidos e promovem a libertação de fármacos encapsulados. Assim, são também bastante importantes para a libertação libertada de fármacos.

#### **4. Conclusões e perspectivas futuras**

Este trabalho experimental permitiu a síntese de nanopartículas magnéticas mistas de ferrites de cálcio e magnésio com forma de nanovaras de tamanho longitudinal e transversal médio 57,4 nm e 14,9 nm. Também foram sintetizadas nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês, de forma cúbica, de tamanho médio 20,37 nm. Tendo em conta o comportamento magnético de ambas, foi prosseguido o estudo com as nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio uma vez que estas apresentam um valor de quadratura magnética de 0,014, ao passo que as ferrites de manganês apresentam um valor superior, nomeadamente 0,127. Após estudos de hipertermia magnética, foi possível concluir que as partículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio são ótimas para a aplicabilidade da mesma, uma vez que os valores obtidos se encontram no intervalo de valores das nanopartículas magnéticas para hipertermia disponíveis comercialmente.

Também foi possível a síntese de nanopartículas de ouro, em forma de nanovaras, com posição espectral longitudinal perto dos 800 nm e transversal à volta dos 500-550 nm. De acordo com a análise através da microscopia eletrónica de transmissão, estas nanovaras apresentam tamanho longitudinal e transversal, de 33,60, e 9,42 nm, respetivamente, o que faz destas excelentes agentes de hipertermia fototérmica.

Posto isto, foi possível sintetizar e caracterizar as nanopartículas magnéticas e plasmónicas e posteriormente proceder à sua hibridização. Esta foi confirmada através da técnica de espectroscopia UV-Visível. Após estudos de hipertermia fototérmica, as nanopartículas híbridas apresentam uma menor capacidade de aquecimento quando comparadas com as nanopartículas nanopartículas plasmónicas individuais, uma vez que a interação deste tipo de nanopartículas provoca uma diminuição da absorvância do plasmão longitudinal. Por fim, foi possível a síntese de magnetolipossomas sólidos (SMLs) com nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de cálcio e magnésio.

Estes magnetolipossomas foram utilizados em ensaios de hipertermia magnética, tendo se concluído que apresentam um valor de SAR e variação de temperatura máxima bastante razoáveis para a aplicação em hipertermia. Para além disso, conclui-se que o lípido DPPC é bastante importante para a libertação libertada de fármacos.

Num trabalho experimental futuro, poderão ser incluídos :

- Estudos de fusão dos magnetolipossomas com modelos de células através do *unquenching* de fluoróforos neles incluídos
- Avaliação por SQUID dos magnetolipossomas produzidos;
- Caracterização por TEM dos magnetolipossomas produzidos;
- Avaliação da citotoxicidade das diferentes nanopartículas produzidas e dos magnetolipossomas.
- Estudos da taxa de encapsulamento de um fármaco nos magnetolipossomas sólidos.

## 5. Bibliografia

Agnieszka Włodarczyk, Szymon Gorgo, Adrian Rado, & Karolina Bajdak-Rusinek. (2022).

*Magnetite Nanoparticles in Magnetic Hyperthermia and Cancer Therapies: Challenges and Perspectives*. 23. <https://doi.org/10.3390/nano12111807>

Ana Maria Rodrigues Alves. (2012). *Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas para tratamento de cancro: Estudo da síntese e estabilização das soluções coloidais de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>* [nova lisboa]. [https://run.unl.pt/bitstream/10362/8529/1/Alves\\_2012.pdf](https://run.unl.pt/bitstream/10362/8529/1/Alves_2012.pdf)

Beatriz D. Cardoso, A. Rita O. Rodrigues, Manuel Bañobre-López, Bernardo G. Almeida, Carlos O. Amorim, Vítor S. Amaral, Paulo J. G. Coutinho, & Elisabete Castanheira. (2021). *Novel magnetoliposomes based on shape-anisotropic nanoparticles for combined chemotherapy and magnetic hyperthermia*. 34.

BioRender. (2022, outubro 1).

<https://app.biorender.com/illustrations/5fdb63ba93103c00a912dbb9>

C. Devi, E., & Soibam, I. (2017). Structural and optical characterization of MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *Advanced Materials Proceedings*, 2(2), 93–96.

<https://doi.org/10.5185/amp.2017/206>

Daniela José dos Santos Teixeira. (2018). *SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA APLICAÇÃO EM BIOMEDICINA* [INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA].

<https://repositorio.ipl.pt/bitstream/10400.21/12392/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf>

Daniela Sofia Marques Pereira. (2018). *Nanotransportadores magnéticos de fármacos para aplicação terapêutica no cancro da mama* [universidade do Minho].

[http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/55559/1/TESE\\_Final\\_DanielaPereira.pdf](http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/55559/1/TESE_Final_DanielaPereira.pdf)

Eduardo Motta Alves Peixoto. (2009). Magnésio. *Tabela Periódica*.

<https://www.tabelaperiodica.org/magnesio/>

- Elbially, N. S., Fathy, M. M., & Khalil, W. M. (2015). Doxorubicin loaded magnetic gold nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 490(1–2), 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.032>
- Estruturas Cristalinas*. (2022, outubro 27). Silo Tips. <https://silo.tips/download/estruturas-cristalinas-1>
- Ferreira, H. S. da C. M. (2006). *Utilização de lipossomas como modelos de biomembranas na avaliação e quantificação da actividade de anti-inflamatórios* [Universidade do Porto]. <https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/64018>
- Gawali, S. L., Shelar, S. B., Gupta, J., Barick, K. C., & Hassan, P. A. (2021). Immobilization of protein on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for magnetic hyperthermia application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 851–860. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.241>
- Geraldes, A. N., Oliveira, M. J. A., Batista, J. G. S., & Lugão, A. B. (2015). *SÍNTESE DE NANOPARTICULAS DE OURO ESTABILIZADAS POR QUITOSANA*. 5.
- Horsman, M., & Siemann, D. (2007). Pathophysiologic Effects of Vascular-Targeting Agents and the Implications for Combination with Conventional Therapies. *Cancer research*, 66, 11520–11539. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2848>
- Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W., & El-Sayed, M. A. (2006). Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *Journal of the American Chemical Society*, 128(6), 2115–2120. <https://doi.org/10.1021/ja057254a>
- IBERDROLA. (2022). *Nanotecnologia: Uma pequena solução para grandes problemas*. Iberdrola. <https://www.iberdrola.com/inovacao/aplicacoes-da-nanotecnologia>
- Irina Soraia Rainho Rio. (2019). *Magnetolipossomas multifuncionais contendo nanopartículas magnéticas/plasmónicas para aplicação em terapia dual* [Universidade do Minho].

- <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/65183/1/10%2bDissertacao%2b31414.pdf>
- Islam, K., Haque, M., Kumar, A., Hoq, A., Hyder, F., & Hoque, S. M. (2020). Manganese Ferrite Nanoparticles (MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>): Size Dependence for Hyperthermia and Negative/Positive Contrast Enhancement in MRI. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, *10*(11), E2297. <https://doi.org/10.3390/nano10112297>
- Joana Daniela da Silva Costa. (2015). *Síntese e caracterização toxicológica de diferentes tipos de nanopartículas de ouro* [Faculdade Farmácia do Porto]. <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/80833/2/36853.pdf>
- Kallumadil, M., Tada, M., Nakagawa, T., Abe, M., Southern, P., & Pankhurst, Q. A. (2009). Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, *321*(10), 1509–1513. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2009.02.075>
- Khan, N. U., Lin, J., Younas, M. R., Liu, X., & Shen, L. (2021). Synthesis of gold nanorods and their performance in the field of cancer cell imaging and photothermal therapy. *Cancer Nanotechnology*, *12*(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12645-021-00092-w>
- Kim, H. S., & Lee, D. Y. (2018). Near-Infrared-Responsive Cancer Photothermal and Photodynamic Therapy Using Gold Nanoparticles. *Polymers*, *10*(9), Art. 9. <https://doi.org/10.3390/polym10090961>
- Landon, C. D. (2011). Nanoscale Drug Delivery and Hyperthermia: The Materials Design and Preclinical and Clinical Testing of Low Temperature-Sensitive Liposomes Used in Combination with Mild Hyperthermia in the Treatment of Local Cancer. *The Open Nanomedicine Journal*, *3*(1), 24–37. <https://doi.org/10.2174/1875933501103010038>
- Leite, E. S. (2013). *ESTUDO DAS PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA DISPERSAS EM ÓLEOS MAGNÉTICOS ISOLANTES*. 149.

Loo, C., Lowery, A., Halas, N., West, J., & Drezek, R. (2005). Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano Letters*, 5(4), 709–711.

<https://doi.org/10.1021/nl050127s>

López-Lorente, A. I., Simonet, B. M., & Valcárcel, M. (2011). Analytical potential of hybrid nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(1), 43–54.

<https://doi.org/10.1007/s00216-010-4110-0>

LS Instruments. (2022). Dispersão de Luz Dinâmica (DLS).

<https://lsinstruments.ch/en/theory/dynamic-light-scattering-dls/introduction>

Marconi B. S. Costa. (2013, agosto 2). *Supercondutividade: Aplicações dos supercondutores (applications of superconductors)*. Supercondutividade.

<https://supercondutividade.blogspot.com/2013/08/aplicacoes-dos-supercondutores.html>

Martinez-Boubeta, C., Simeonidis, K., Makridis, A., Angelakeris, M., Iglesias, O., Guardia, P., Cabot, A., Yedra, L., Estradé, S., Peiró, F., Saghi, Z., Midgley, P. A., Conde-Leborán, I., Serantes, D., & Baldomir, D. (2013). Learning from Nature to Improve the Heat Generation of Iron-Oxide Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Applications.

*Scientific Reports*, 3(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/srep01652>

Marya Oliveira, Maiara Santos Sales, Ana Paula Bernardo dos Santos, & Livia Tenório Vilela Cerqueira Crespo. (2021). *Origem da nanotecnologia*. química supramolecular, nanociencia e nanotecnologia.

<https://petnanoifrj.wixsite.com/petnanoifrj/origemdananotecnologia>

Mathubala, G., Manikandan, A., Arul Antony, S., & Ramar, P. (2016). Photocatalytic degradation of methylene blue dye and magneto-optical studies of magnetically recyclable spinel  $\text{Ni}_x\text{Mn}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4$  ( $x = 0.0\text{--}1.0$ ) nanoparticles. *Journal of Molecular Structure*, 1113, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.02.032>

- N. A. Salavatova, A. I. Mikhailichenkob, V. M. Rudoya, & O.V. Dement'eva. (2018). *Some Aspects of Seedless Synthesis of Gold Nanorods*. 9.  
<https://doi.org/10.1134/S1061933X18050149>
- Naiara Teodosio Dos Santos. (2013). *Nanopartículas de ouro como sistema de liberação de droga associada a Berberina: Síntese e caracterização*. [Universidade de Brasília].  
[https://bdm.unb.br/bitstream/10483/13865/1/2013\\_NaiaraTeodosiosSantos.pdf](https://bdm.unb.br/bitstream/10483/13865/1/2013_NaiaraTeodosiosSantos.pdf).  
[https://bdm.unb.br/bitstream/10483/13865/1/2013\\_NaiaraTeodosiosSantos.pdf](https://bdm.unb.br/bitstream/10483/13865/1/2013_NaiaraTeodosiosSantos.pdf)
- Parveen, R. (2017). *Síntese de nanopartículas de ouro com forma e tamanho controlados utilizando glicerol como um agente de redução e estabilização ecológico e de baixo custo* [Doutorado em Química Analítica e Inorgânica, Universidade de São Paulo].  
<https://doi.org/10.11606/T.75.2017.tde-23082017-170833>
- Pedro Marins Bedê. (2010). *MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO SECRETARIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS* [INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA].  
[http://www.ime.eb.mil.br/arquivos/teses/se4/cm/Pedro\\_B\\_Dissert.pdf](http://www.ime.eb.mil.br/arquivos/teses/se4/cm/Pedro_B_Dissert.pdf)
- Pentak, D. (2014). Alternative methods of determining phase transition temperatures of phospholipids that constitute liposomes on the example of DPPC and DMPC. *Thermochimica Acta*, 584, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2014.03.020>
- Pereira, N. M. S. (2012). *Desenvolvimento de Nanopartículas Magnéticas para Aplicações Biomédicas* (p. 127). Escola Superior de Tecnologia e Gestão Instituto Politécnico de Bragança. [https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/8218/1/Pereira\\_Nuno.pdf](https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/8218/1/Pereira_Nuno.pdf)
- Pirouz, M. J., Beyki, M. H., & Shemirani, F. (2015). Anhydride functionalised calcium ferrite nanoparticles: A new selective magnetic material for enrichment of lead ions from water and food samples. *Food Chemistry*, 170, 131–137.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.046>

- Plassat, V., Wilhelm, C., Marsaud, V., Ménager, C., Gazeau, F., Renoir, J.-M., & Lesieur, S. (2011). Anti-Estrogen-Loaded Superparamagnetic Liposomes for Intracellular Magnetic Targeting and Treatment of Breast Cancer Tumors. *Advanced Functional Materials*, 21(1), 83–92. <https://doi.org/10.1002/adfm.201001450>
- Rogério Mendes Branco. (2013). *Nanopartículas magnéticas obtidas por coprecipitação homogênea sonoquimicamente assistida*. 114.
- Rozanova, N., & Zhang, J. (2009). Photothermal ablation therapy for cancer based on metal nanostructures. *Science in China Series B: Chemistry*, 52(10), 1559–1575. <https://doi.org/10.1007/s11426-009-0247-0>
- Saldívar-Ramírez, M. M. G., Sánchez-Torres, C. G., Cortés-Hernández, D. A., Escobedo-Bocardo, J. C., Almanza-Robles, J. M., Larson, A., Reséndiz-Hernández, P. J., & Acuña-Gutiérrez, I. O. (2014). Study on the efficiency of nanosized magnetite and mixed ferrites in magnetic hyperthermia. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(10), 2229–2236. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5187-3>
- Veloso, S. R. S., Andrade, R. G. D., & Castanheira, E. M. S. (2021). Magnetoliposomes: Recent advances in the field of controlled drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 18(10), 1323–1334. <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1915983>
- Vix. (2022). *Phospholipid—Definition and Examples—Biology Online Dictionary*. Biology Articles, Tutorials & Dictionary Online. <https://www.biologyonline.com/dictionary/phospholipid>