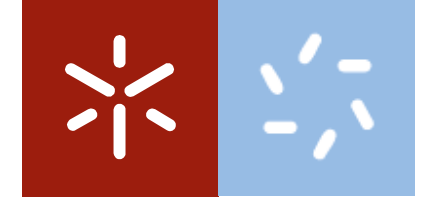


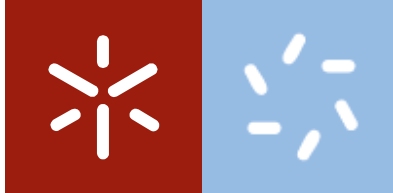


**Magnetolipossomas funcionalizados para
melhoria do potencial terapêutico de
novos fármacos antitumorais**

Beatriz Carvalho Ribeiro

Universidade do Minho
Escola de Ciências





Universidade do Minho

Escola de Ciências

Beatriz Carvalho Ribeiro

**Magnetolipossomas funcionalizados para
melhoria do potencial terapêutico de
novos fármacos antitumorais**

Dissertação de Mestrado
Mestrado Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação de
Professora Doutora Elisabete M. S. Castanheira Coutinho
e de
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

Ao longo de todos estes anos e durante este trabalho, foram muitos aqueles que estiveram ao meu lado e aos quais devo um grande agradecimento.

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Elisabete Maria dos Santos Castanheira Coutinho e Doutora Ana Rita Oliveira Rodrigues, por toda a motivação, paciência, disponibilidade e apoio prestado durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao Professor Paulo Coutinho que, apesar de não ser meu orientador, esteve sempre disponível para ajudar quando necessário.

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

Ao Sérgio Veloso, por toda a ajuda e disponibilidade durante o decorrer de todo o projeto.

Aos meus colegas de laboratório, pela partilha de ideias e pela boa disposição.

Aos meus pais e irmão por todo o apoio demonstrado ao longo da minha vida e por terem sempre uma palavra de incentivo.

Ao Gil, por me fazer sempre sorrir nos momentos de maior ansiedade, por me incentivar a ser sempre melhor e por me mostrar que tudo é possível.

A todos os meus amigos que me acompanharam nesta jornada, pela amizade e carinho, em especial, à Joana e à Sarah por estarem sempre prontas para me ajudar e incentivar a continuar.

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

Agradeço por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente durante este último ano, me desafiaram e contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

A todos vocês, o meu sincero obrigado!

Agradece-se também à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), através do projeto PTDC/QUI-QFI/28020/2017 (POCI-01-0145-FEDER-028020), no qual o trabalho desta dissertação se insere.

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.

Magnetolipossomas funcionalizados para melhoria do potencial terapêutico de novos fármacos antitumorais

RESUMO

O cancro é uma doença com uma enorme taxa de mortalidade, em que a falta de diagnóstico precoce e a citotoxicidade associada às terapias convencionais dificultam o seu tratamento. Os sistemas de transporte direcionado de fármacos têm sido alvo de grande interesse na área biomédica. Deste modo, têm sido desenvolvidos nanotransportadores baseados em nanopartículas magnéticas que permitem o direcionamento do fármaco ao local alvo.

Neste trabalho, desenvolveram-se magnetolipossomas (MLs) funcionalizados com PEG (polietilenoglicol) e uma molécula sensível ao pH, o CHEMS, para aplicação em terapia dual do cancro (quimioterapia e hipertermia magnética). Assim, foram desenvolvidos nanotransportadores magnéticos de fármacos, envolvendo a síntese de nanopartículas de ferrites mistas de manganês e magnésio ($\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$) e ferrites mistas de manganês e cálcio ($\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$), por três métodos de preparação diferentes (coprecipitação, coprecipitação com cobertura de citrato e sol-gel). As nanopartículas obtidas foram caracterizadas estruturalmente pelas técnicas de XRD e SEM, exibindo tamanhos entre 8 nm e 30 nm, e a caracterização magnética foi efetuada por SQUID. As nanopartículas que revelaram melhores propriedades magnéticas foram as de $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ obtidas por coprecipitação com citrato, que apresentam baixa coercividade e elevada magnetização de saturação (53,91 emu/g).

As nanopartículas foram cobertas com diferentes formulações lipídicas ou encapsuladas em lipossomas, contendo PEG (polietilenoglicol) e/ou CHEMS, originando MLs com tamanhos inferiores a 160 nm.

Foram encapsulados nos MLs dois novos potenciais fármacos fluorescentes, derivados de tienopiridina, com atividade antitumoral promissora. A localização dos fármacos nos nanossistemas foi avaliada por medidas de anisotropia de fluorescência em estado estacionário. A interação não específica entre os MLs e vesículas unilamelares gigantes (GUVs) que foram usadas como modelos de membranas celulares, confirmou a interação entre ambos.

Por fim, foram realizados ensaios de libertação dos compostos antitumorais encapsulados nos nanossistemas mais promissores em diferentes condições de pH. Verificou-se que a libertação é mais eficiente para os SMLs e menor para as formulações com PEG, sendo em todos os casos seguido o modelo de Korsmeyer-Pepper com difusão não-*Fickiana*.

ABSTRACT

Cancer is a disease with a high mortality rate, where the lack of early diagnosis and the cytotoxicity of conventional techniques cause difficulties in treatment. Drug delivery systems have been a focus of great interest in the biomedical field. Thus, nanocarriers based on magnetic nanoparticles have been developed because they enable targeting of drugs to tumor sites.

In this work, magnetoliposomes (MLs) functionalized with PEG (polietilenoglicol) and the pH-sensitive molecule CHEMS, aiming at cancer dual therapy (chemotherapy and magnetic hyperthermia) were developed. For that, magnetic drug nanocarriers were prepared, involving the synthesis of magnetic nanoparticles of mixed manganese/magnesium ($\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$) or manganese/calcium ferrites ($\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$), using three preparation methods (co-precipitation, co-precipitation with citrate coating and sol-gel). The structural characterization of the synthesized nanoparticles was carried out by XRD and SEM, revealing sizes between 8 nm and 30 nm, and the magnetic characterization was obtained by SQUID. The $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ nanoparticles synthesized by co-precipitation with citrate have revealed the best magnetic properties, with a low coercivity and high saturation magnetization (53,91 emu/g).

The nanoparticles were covered with lipid bilayers of different formulations or entrapped in liposomes, containing PEG and/or CHEMS, yielding MLs with sizes below 160 nm.

Two new potential fluorescent drugs, thienopyridine derivatives, with promising antitumor activity, were encapsulated into the MLs and their location was studied by steady-state fluorescence anisotropy measurements. The non-specific interaction between the MLs and GUVs (Giant Unilamellar Vesicles), used as models of cell membranes, evidenced the fusion between the two systems.

Finally, the release behavior of the new compounds from loaded MLs of the most promising formulations was studied under different pH conditions. It was observed that the release is more efficient for the SMLs and lower for the PEGylated nanosystems, in all cases being followed the Korsmeyer-Pepper model with non-*Fickian* diffusion.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS	xiv

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Desafios associados à terapia do cancro.....	1
1.2. Importância da nanotecnologia e da nanomedicina no tratamento do cancro	2
1.3. Os lipossomas como transportadores de fármacos antitumorais	3
1.3.1. Compostos antitumorais derivados de tienopiridinas.....	3
1.3.2. Lipossomas	4
1.4. Nanopartículas magnéticas	9
1.4.1. Características estruturais.....	9
1.4.2. Propriedades magnéticas.....	9
1.4.3. Nanopartículas magnéticas para aplicações biomédicas	13
1.4.3.1. Diagnóstico	14
1.4.3.2. Terapia	14
1.4.4. Magnetolipossomas	17
1.4.4.1 Quimioterapia magneticamente controlada	19
1.4.4.2. Tratamento dual e sinérgico por hipertermia e quimioterapia	20
1.5. Referências do Capítulo 1.....	20
Capítulo 2 – Técnicas de Caracterização	25
2.1. Radiação Eletromagnética	25
2.1.1. Espetro eletromagnético	26
2.2. Espectroscopia de absorção UV-Visível	27
2.2.1. Níveis de energia e transições eletrônicas	27
2.2.2. Lei de Lambert-Beer	30
2.2.3. Funcionamento de um Espectrofotómetro.....	32
2.3. Espectroscopia de Fluorescência.....	33
2.3.1. Diagrama de Jablonski.....	33

2.3.2. Processos moleculares radiativos e não radiativos.....	34
2.3.3. Rendimento quântico de fluorescência	37
2.3.4. Anisotropia de fluorescência.....	37
2.3.5. Transferência de energia de ressonância (FRET)	38
2.3.6. Funcionamento de um Espetrofluorímetro	40
2.4. SQUID	40
2.5. Difração de raios-X (XRD)	41
2.6. Difusão Dinâmica de Luz (DLS)	42
2.7. Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM).....	44
2.8. Referências do Capítulo 2.....	44
Capítulo 3 – Procedimento Experimental	46
3.1. Propriedades fotofísicas dos compostos antitumorais.....	46
3.2. Preparação de nanopartículas magnéticas.....	48
3.2.1. Método de coprecipitação	48
3.2.1.1. Ferrite mista de manganês e magnésio	48
3.2.1.2. Ferrite mista de manganês e cálcio	49
3.2.2. Método de coprecipitação com adição de citrato	49
3.2.3. Método sol-gel	50
3.2.3.1. Ferrite mista de manganês e magnésio	50
3.2.3.2. Ferrite mista de manganês e cálcio	50
3.3. Caracterização estrutural por difração de raios-X.....	51
3.4. Ensaio de sedimentação	51
3.5. Quantificação do ferro nas nanopartículas	52
3.6. Preparação de magnetolipossomas	52
3.6.1. Magnetolipossomas aquosos (AMLs).....	53
3.6.2. Magnetolipossomas sólidos (SMLs).....	53
3.7. Caracterização dos Magnetolipossomas.....	54
3.7.1. Anisotropia de fluorescência.....	54
3.7.2. Ensaio de transferência de energia (FRET).....	54
3.8. Interação com modelos de membranas biológicas.....	55
3.8.1. Preparação dos modelos de membrana	55
3.9. Ensaio de eficiência de encapsulamento dos compostos em AMLs e SMLs.....	56
3.10. Ensaio de liberação dos compostos	56
3.11. Referências do Capítulo 3.....	57

Capítulo 4 – Resultados e Discussão	58
4.1. Caracterização das nanopartículas magnéticas	58
4.1.1. Cinéticas de sedimentação das nanopartículas magnéticas	58
4.1.2. Propriedades magnéticas das nanopartículas	60
4.1.3. Caracterização por difração de Raios-X.....	63
4.1.4. Determinação de forma e tamanho por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).....	66
4.1.5. Quantificação de ferro nas nanopartículas	67
4.2. Estudo fotofísico dos compostos em vários solventes	68
4.3. Caracterização dos magnetolipossomas	71
4.3.1. Cinéticas de sedimentação dos magnetolipossomas aquosos	71
4.3.2. Prova da formação dos magnetolipossomas sólidos por FRET	72
4.3.3. Caracterização do tamanho e polidispersividade.....	73
4.4. Encapsulamento dos compostos	76
4.4.1. Estudo fotofísico dos compostos em magnetolipossomas	76
4.4.2. Eficiências de encapsulamento	79
4.5. Ensaio de fusão com modelos de membranas	79
4.6. Ensaio de libertação dos compostos	83
4.7. Referências do Capítulo 4.....	85
 Capítulo 5 - Conclusão e perspectivas futuras	 87
5.1. Conclusão.....	87
5.2. Perspetivas futuras.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Representação da estrutura dos compostos A e B .	4
Figura 1.2 - Representação esquemática de um lipossoma. Retirado de [16].	5
Figura 1.3 - Representação esquemática da composição estrutural dos fosfolípidos. Adaptado de [19].	5
Figura 1.4 - Figura ilustrativa dos diferentes tipos de lipossomas. Adaptado de [24].	7
Figura 1.5 - Representação esquemática dos momentos dipolares dos diferentes materiais magnéticos, na ausência e presença de campo magnético. Adaptado de [38].	10
Figura 1.6 - A - Representação dos vários domínios de uma nanopartícula e B - Parede de Bloch (B) com a reorientação gradual dos momentos magnéticos entre dois domínios (A) e (C).	11
Figura 1.7 - Representação esquemática da entrega de fármacos direcionada magneticamente. Adaptado de [44].	15
Figura 1.8 - Representação esquemática da acumulação de NP magnéticas no local do tumor e consequente tratamento por hipertermia. Adaptado de [50].	16
Figura 1.9 - Representação esquemática de AMLs e de SMLs. Adaptado de [52]	18
Figura 1.10 - Representação esquemática das diferenças entre quimioterapia convencional e quimioterapia controlada magneticamente. Adaptado de [52].	19
Figura 2.1 - Representação de uma onda eletromagnética, onde E representa o vetor campo elétrico, B o vetor campo magnético e c o vetor da direção de propagação da onda.	25
Figura 2.2 - Representação do espectro da região da luz visível.	26
Figura 2.3 - Representação esquemática de um diagrama de níveis de energia.	27
Figura 2.4 - Representação esquemática dos níveis de energia eletrônica, níveis rotacionais e vibracionais de uma molécula.	28
Figura 2.5 - Esquema representativo da diminuição da intensidade de uma radiação monocromática, após atravessar uma cuvette de comprimento b, que contém uma solução de concentração c, com um coeficiente de absorção molar ϵ .	30
Figura 2.6 - Representação esquemática do diagrama de Jablonski, ilustrando os vários processos radiativos e não radiativos envolvidos na excitação e desexcitação eletrônica. Adaptado de [7]	34
Figura 2.7 - Esquema representativo do mecanismo de fluorescência e fosforescência [8].	36

Figura 2.8 - Esquema representativo do posicionamento das bandas de absorção e emissão do processo de fluorescência, mostrando o desvio de stokes.	36
Figura 2.9 - Representação da sobreposição espectral entre o espectro de emissão do doador e absorção do aceitador. Adaptado de [10].....	39
Figura 2.10 - Ilustração da difusão dinâmica de luz em duas amostras com tamanhos diferentes... 43	
Figura 4.1 - Curva de histerese das nanopartículas de $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ citrato (A), $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ sol-gel (B), $Mn_{0.5}Mg_{0.5}Fe_2O_4$ citrato 2 (C) e $Mn_{0.5}Mg_{0.5}Fe_2O_4$ sol-gel 2 (D), à temperatura ambiente. Inserido: Ampliação da zona de baixo campo da curva de histerese.	61
Figura 4.2 - Difratomogramas de XRD das nanopartículas: A – $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ citrato, B - $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ sol-gel, C - $Mn_{0.5}Mg_{0.5}Fe_2O_4$ sol-gel 2.	64
Figura 4.3 - Difrátograma de XRD das nanopartículas $Mn_{0.5}Mg_{0.5}Fe_2O_4$ citrato 1.....	65
Figura 4.4 - Imagens obtidas por SEM tratadas pelo software ImageJ e os respectivos histogramas da distribuição de tamanhos das nanopartículas: A - $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ citrato, B - $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ sol-gel e C - $Mn_{0.5}Mg_{0.5}Fe_2O_4$ sol-gel2.	66
Figura 4.5 - Espectros de fluorescência normalizados do composto A (10^{-6} M) ($\lambda_{exc}=350$ nm) (A) e B ($\lambda_{exc}=330$ nm) (B), nos vários solventes. Inserido: Espectros de absorção dos compostos A e B (10^{-6} M) em etanol e acetonitrilo.	69
Figura 4.6 - Gráfico comparativo dos rendimentos quânticos de fluorescência dos compostos nos vários solventes.....	70
Figura 4.7 - Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 440$ nm) dos SMLs de DPPC (A) e SMLs DPPC:PEG (B) baseados em NPs de $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ contendo apenas lípido com NBD-C6-HPC (10^{-6} M), apenas lípido com Rh-DOPE (10^{-6} M) e contendo lípidos com ambas as sondas.	72
Figura 4.8 - Correlograma da distribuição de tamanhos obtido para AMLs 100% DPPC baseados em nanopartículas de $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ citrato.	74
Figura 4.9 - Representação da intensidade dos picos da amostra de SMLs retirada do software do equipamento Zetasize.....	75
Figura 4.10 - Imagem de SEM de SMLs 100% DPPC nanopartículas de $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ citrato.	76
Figura 4.11 - Espectros emissão de fluorescência: A - do composto A (10^{-6} M) em AMLs 100% DPPC a 55 °C e B - do composto B (10^{-6} M) em SMLs, DPPC:CHEMS a 25 °C. [condições de análise: A - $\lambda_{exc}=350$ nm e B - $\lambda_{exc}=330$ nm].....	77

Figura 4.12 - Espetros de emissão de fluorescência dos compostos (10^{-6} M) A - A ($\lambda_{exc} = 350\text{nm}$) e B - B ($\lambda_{exc} = 330\text{nm}$) em lipossomas, AMLs e SMLs de DPPC (100 %).	80
Figura 4.13 - Espetros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 350\text{nm}$) do composto A (10^{-6} M) encapsulado em AMLs de DPPC:CHEMS a pH=7,4 (à esquerda) e em SMLs de DPPC:CHEMS:PEG pH 5 (à direita) e em antes e depois da fusão com GUVs.	81
Figura 4.14 - Espetros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 330\text{nm}$) do composto B (10^{-6} M) encapsulado em AMLs de DPPC:CHEMS a pH=5 (à esquerda) e em SMLs de DPPC:CHEMS:PEG a pH=7,4 (à direita) e antes e depois da fusão com GUVs.	81
Figura 4.15 - Representação da libertação do composto B em SMLs 100% DPPC a pH 7,4 ao longo do tempo.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Média e desvio padrão dos valores de GI_{50} dos compostos A e B	4
Tabela 1.2 - Classificação das propriedades dos lípidos utilizados quanto à sua estrutura, carga e temperatura de transição.	6
Tabela 3.1 - Fórmula molecular e massa molar dos compostos A e B em estudo.	47
Tabela 3.2 - Massa molar, constante dielétrica, cut-off e índice de refração dos solventes utilizados no estudo fotofísico dos compostos A e B [2].	47
Tabela 3.3 - Condições para a preparação de soluções padrão de cloreto de ferro (III) (as concentrações correspondem ao cloreto férrico heptahidratado).	52
Tabela 3.4 - Concentrações de lípido, composto, CHEMS e PEG nas diferentes formulações de AMLs.	53
Tabela 4.1 - Taxas de sedimentação (K) calculados pela função de Becquerel para as nanopartículas sintetizadas.	59
Tabela 4.2 - Valores de coercividade, magnetização de remanência, magnetização de saturação e razão entre magnetização de remanência e magnetização de saturação (M_r/M_s), obtidos a partir das curvas de histerese, para as diferentes nanopartículas obtidas.	62
Tabela 4.3 - Tamanhos das nanopartículas calculados pela equação de Scherrer, pureza da amostra e χ^2	65
Tabela 4.4 - Tamanhos médios e respectivos desvios padrão para as nanopartículas selecionadas. ..	67

Tabela 4.5 - Massa experimental de ferro e relação estequiométrica corrigida para as partículas $Mn_{0.5}Mg_{0.5}Fe_2O_4$ 1 e $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ com adição de citrato.	68
Tabela 4.6 - Comprimento de onda de absorção máximo (λ_{abs}) e coeficiente de absorção molar (ϵ), comprimento de onda de emissão máximo (λ_{em}) e rendimento quântico de fluorescência dos compostos A e B em diferentes solventes.	69
Tabela 4.7 - Taxa de sedimentação (K) calculados pela função de Becquerel dos magnetolipossomas aquosos.	71
Tabela 4.8 - Parâmetros da Transferência de energia ressonante de Förster: eficiência de FRET (Φ_{FRET}), raio de Förster (R_0) e distância doador-aceitador (r) obtidos para os ensaios de SMLs baseados em nanopartículas de $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ citrato com e sem PEG.....	73
Tabela 4.9 - Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta dos magnetolipossomas (AMLs e SMLs) baseados em partículas de $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ citrato, obtidos por DLS.	74
Tabela 4.10 - Valores de anisotropia de fluorescência (r) para os compostos A e B em SMLs e AMLs, abaixo (25 °C) e acima (55 °C) da temperatura de transição do DPPC. Os valores de anisotropia dos compostos em glicerol à temperatura ambiente são mostrados para comparação.	78
Tabela 4.11 - Eficiências de encapsulamento dos compostos A e B em AMLs, SMLs e lipossomas 100% DPPC.	79
Tabela 4.12 - Razão da intensidade de fluorescência dos compostos A e B , encapsulados nas diferentes formulações de magnetolipossomas, antes e depois da interação com GUVs, a pH 5 e 7,4.	82
Tabela 4.13 - Valores da taxa de libertação (k), tipo de transporte (n) e coeficiente de determinação (R^2) do ajuste dos ensaios de libertação dos compostos A e B encapsulados em AMLs e SMLs, a pH 7,4 e pH 5.	84

LISTA DE SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS

AMLs - Magnetolipossomas aquosos (do inglês, *Aqueous Magnetoliposomes*)

CA - Corrente Alternada

CHEMS - Hemisuccinato de colesterol (do inglês, *Cholesteryl Hemisuccinate*)

CQ-UM - Centro de Química da Universidade do Minho

D_c - Limite de tamanho critico

DLS - Difusão Dinâmica de Luz (do inglês, *Dynamic Light Scattering*)

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

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

Ds - limite de tamanho para superparamagnetismo

EGG-PC - L- α -fosfatidilcolina

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

GI₅₀ - Concentração que inibe 50% de crescimento celular

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

H_c - Campo de coercividade

HCT-15 - Células de Adenocarcinoma Colorretal

IC - Conversão Interna (do inglês, *Internal Conversion*)

ISC - Conversão Intersistemas (do inglês, *Intersystem Conversion*)

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

MLs - Magnetolipossomas

MLVs - Vesículas Multilamelares (do inglês, *Multilamellar Vesicles*)

M_r - Magnetização Remanescente

MRI - Imagiologia por Ressonância Magnética (do inglês, *Magnetic Resonance Imaging*)

M_s - Magnetização de Saturação

NBD-C₆-HPC - (2-(6-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)amino)Hexanoyl-1-Hexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine)

NCI-H460 - Células não pequenas do cancro do pulmão

NPMs - Nanopartículas Magnéticas

PEG - Polietilenoglicol

Rh-DOPE - *N*-(1-ylssamine Rhodamine B sulfonyl)-1,2-dioleoyl-sn-3-phosphatidyl-ethanolamine

SAR - Taxa de Absorção Específica

SEM - Microscópio Eletrónico de Varrimento (do inglês, *Scanning Electron Microscopy*)

SMLs - Magnetolipossomas sólidos (do inglês, *Solid Magnetoliposomes*)

SPIONs - Partículas de óxido de ferro superparamagnéticas (do inglês, *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*)

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

SUVs - Vesículas unilamelares pequenas (do inglês, *Small Unilamellar Vesicles*)

T_m - Temperatura de transição de fase

UV-Vis - Região do Ultravioleta-visível

VR - Relaxamento vibracional (do inglês, *Vibrational Relaxation*)

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

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Desafios associados à terapia do cancro

O cancro é um grande problema de saúde pública em todo o mundo, sendo atualmente a segunda principal causa de morte. Prevê-se que nos próximos anos se classifique como a principal causa de morte e a maior barreira ao aumento da esperança média de vida, em todos os países do mundo no século XXI [1].

A principal característica que define o cancro é a proliferação anormal de células que crescem além dos seus limites usuais e que podem invadir tecidos adjacentes espalhando-se eventualmente para outros órgãos (metástases). As metástases são uma das principais causas de morte por cancro [2].

O cancro surge da transformação de células normais em células tumorais, num processo de vários estágios que geralmente progride para um tumor maligno. Essas alterações são o resultado da interação entre os fatores genéticos de uma pessoa e diversos agentes externos como, radiação, tabagismo, alimentação ou álcool.

Embora os tratamentos convencionais como a quimioterapia, radioterapia e cirurgia tenham apresentado avanços nas últimas décadas, eles permanecem longe do ideal. Os principais obstáculos na luta contra o cancro devem-se a dificuldades no diagnóstico precoce, citotoxicidade associada aos fármacos antitumorais utilizados na quimioterapia convencional e à falta de terapias mais eficientes. Normalmente, na quimioterapia convencional, apenas 0,1% dos fármacos chegam às células tumorais e os restantes 99,9% atacam os tecidos saudáveis, comprometendo a eficácia do tratamento desde o início [3]. A maioria dos agentes quimioterápicos atuais não consegue diferenciar entre células tumorais e normais, levando à toxicidade sistémica e efeitos adversos. Além disso, a sua rápida eliminação associada à distribuição sistémica em órgãos e tecidos forçam a administração de fármacos em grandes quantidades, o que resulta em toxicidade indesejável e consequente limitação das doses máximas permitidas [4].

Assim, é necessário desenvolver novas abordagens de deteção precoce da doença, assim como estudar novos sistemas de entrega controlada de fármacos que permitam aumentar a concentração de agentes terapêuticos no tumor [5].

De modo a contornar todos os problemas associados às terapias convencionais, a utilização de nanotransportadores de fármacos tem sido amplamente estudada e têm-se mostrado uma alternativa promissora na terapia do cancro, uma vez que podem ser capazes de ser dirigidos especificamente para o local alvo, de modo a potenciar a eliminação das células tumorais de forma mais seletiva e controlada [6].

1.2. Importância da nanotecnologia e da nanomedicina no tratamento do cancro

A nanotecnologia está hoje presente em vários aspetos das nossas vidas. É uma ciência altamente interdisciplinar, envolvendo várias áreas científicas, entre as quais estão a física, a química e a biologia. Diz respeito à compreensão básica das propriedades físicas, químicas e biológicas em escalas atómicas ou quase atómicas e emprega a manipulação controlada dessas propriedades, de forma a criar materiais e sistemas funcionais com capacidades únicas.

As partículas de tamanho nanométrico (<100 nm) apresentam novas propriedades óticas, eletrónicas, estruturais, magnéticas e biológicas, que as torna um grande foco de investigação. Os nanomateriais apresentam características únicas, uma vez que à escala nanométrica são os efeitos quânticos que dominam. Uma das propriedades físicas de grande vantagem das estruturas de dimensão nanométrica é o aumento da área superficial de contacto, que torna estes materiais muito mais reativos [7].

A nanotecnologia está, cada vez mais, a tornar-se na força motriz crucial por detrás das inovações na medicina e na saúde. Apesar das inúmeras aplicações da nanotecnologia, há um grande foco na investigação das suas aplicações na prevenção, deteção, monitorização e tratamento do cancro. A nanomedicina visa usar as propriedades e características físicas dos nanomateriais para o diagnóstico e tratamento de doenças a nível molecular [8]. Atualmente, a nanomedicina já é usada em todo o mundo para melhorar a qualidade de vida de pacientes numa série de doenças, uma vez que permite uma abordagem única através de um diagnóstico precoce, prevenção e terapia personalizada. No tratamento do cancro mostra-se vantajosa em relação à medicina convencional (cirurgia, radiação e quimioterapia), uma vez que faz uso de abordagens mais sofisticadas para matar células específicas ou repará-las [9]. Atualmente, já é possível observar imensos avanços, nomeadamente através do desenvolvimento de biossensores, sistemas de entrega de fármacos e técnicas de imagiologia [10].

Como referido anteriormente, as terapias convencionais levam à toxicidade sistémica e efeitos adversos sendo necessário desenvolver novas estratégias que permitam aumentar a eficácia dos tratamentos e, simultaneamente, reduzir os efeitos colaterais associados à quimioterapia [11]. Uma das grandes classes de nanomateriais mais estudados atualmente para fazer face a este problema são os sistemas transportadores de fármacos, nos quais se encontram vários nanossistemas como os lipossomas e hidrogéis [12].

Estes nanotransportadores podem ser conjugados com várias moléculas funcionais simultaneamente, incluindo, ligandos específicos de tumores, anticorpos, fármacos antitumorais e sondas de imagiologia. Assim, estes dispositivos podem funcionar como veículos de distribuição de fármacos direcionáveis e personalizáveis, capazes de transportar agentes quimioterápicos para as células malignas, enquanto as células saudáveis não são afetadas. É possível encapsular vários fármacos para uma terapia combinada, enquanto se aumenta a sua biodisponibilidade, permitindo alcançar uma melhor distribuição de fármacos pouco solúveis em água e realizar uma entrega direcionada para células e tecidos específicos [13]. A eficácia destes sistemas de transporte de fármacos é atribuída ao seu tamanho pequeno, à redução da toxicidade dos fármacos encapsulados e à sua libertação direcionada e controlada. Desta forma, os nanodispositivos multifuncionais oferecem a possibilidade de mudar radicalmente a prática clínica da oncologia, permitindo uma melhor deteção e terapêutica em estágios iniciais da doença [4].

1.3. Os lipossomas como transportadores de fármacos antitumorais

1.3.1. Compostos antitumorais derivados de tienopiridinas

Os derivados de tienopiridinas apresentam grande interesse devido à sua ampla gama de atividades biológicas, sendo bastantes promissores para a indústria farmacêutica. O esqueleto de tienopiridina apresenta atividades antiangiogénicas, antitumorais ou ambas [14,15].

No âmbito deste trabalho foram estudados dois novos derivados de tienopiridinas (figura 1.1), o composto **A** e o composto **B**. Estes potenciais fármacos antitumorais foram sintetizados no Centro de Química da Universidade do Minho (CQ-UM).

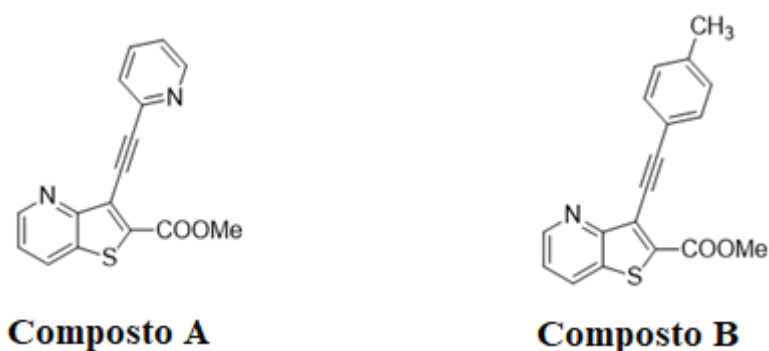


Figura 1.1 - Representação da estrutura dos compostos **A** e **B**.

A atividade inibitória do crescimento de células tumorais foi previamente testada para os compostos **A** e **B** em duas linhas celulares tumorais humanas, especificamente, HCT-15 (Adenocarcinoma colorretal) e NCI-H460 (câncer do pulmão de células não pequenas). Este ensaio consiste na determinação dos valores de GI_{50} , correspondente às concentrações que inibem 50% do crescimento celular. Os valores mostram-se bastante baixos, revelando que os compostos **A** e **B** apresentam uma promissora atividade antitumoral (tabela 1.1). Na tabela 1.1 são também apresentados também os valores da atividade da doxorubicina, usada como controle positivo, para comparação.

Tabela 1.1 - Média e desvio padrão dos valores de GI_{50} dos compostos **A** e **B**.

	HCT-15 (nM)	NCI-H460 (nM)
Composto A	$5,6 \pm 0,6$	>75
Composto B	$10,8 \pm 1,1$	$17,0 \pm 1,2$
Doxorubicina	$353,3 \pm 24,2$	$25 \pm 0,8$

1.3.2. Lipossomas

Os lipossomas são estruturas esféricas formadas por uma ou várias bicamadas lipídicas concêntricas, com uma fase aquosa no interior e entre as várias bicamadas lipídicas, se for o caso (figura 1.2).

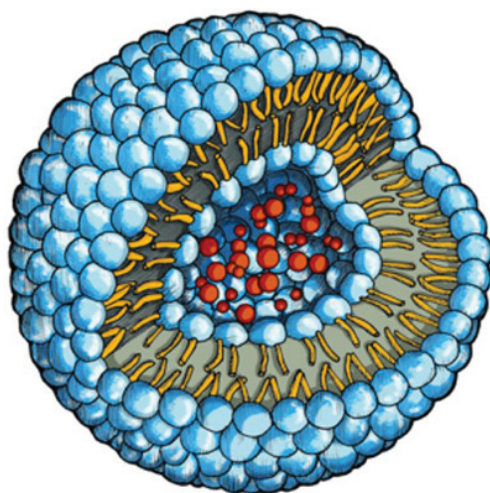


Figura 1.2 - Representação esquemática de um lipossoma. Retirado de [16].

Os lipossomas têm sido amplamente estudados devido às suas aplicações como modelos de membranas celulares no estudo da bioquímica e biologia molecular, bem como nanotransportadores enquanto sistemas de entrega de fármacos [17]. Em seguida, serão abordadas as suas características, bem como as propriedades que os tornam excepcionais como sistemas de nanoencapsulamento.

As unidades estruturais dos lipossomas são os fosfolípidos. Estes são moléculas anfífilas, que possuem uma cabeça polar hidrofílica, constituída por um grupo fosfato ligado a um glicerol, e uma cauda apolar hidrofóbica constituída por duas cadeias de ácidos gordos (figura 1.3). Quando os fosfolípidos são colocados em meio aquoso, devido à interação dos grupos da cabeça hidrofílica dos lípidos com a água, dá-se a auto-organização dos fosfolípidos, que resulta na formação espontânea de vesículas [18].

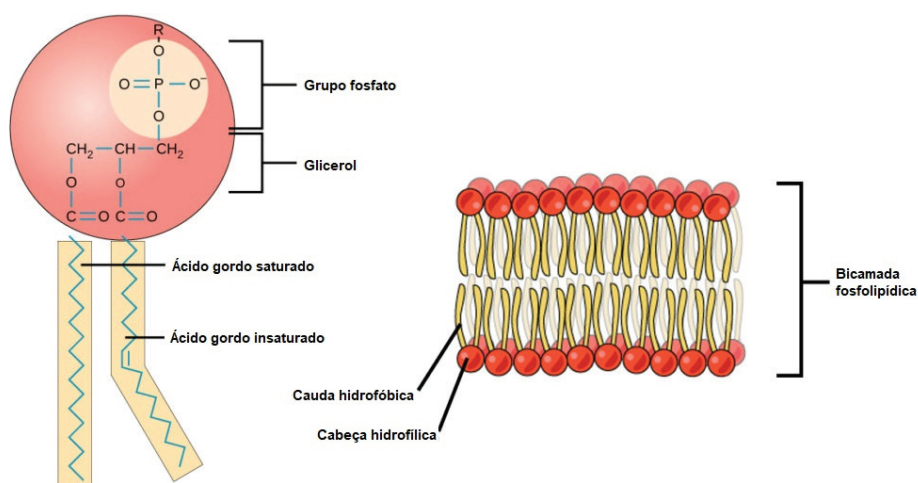
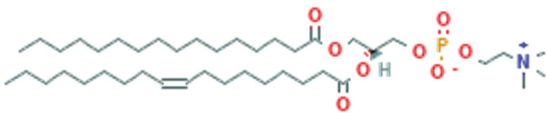
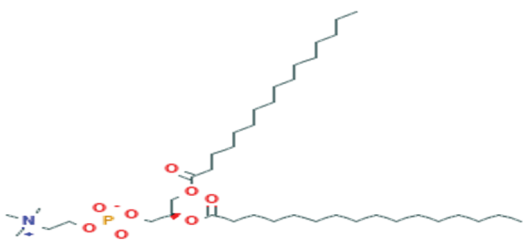


Figura 1.3 - Representação esquemática da composição estrutural dos fosfolípidos. Adaptado de [19].

Os fosfolípidos podem ser de origem natural ou sintética, sendo que os segundos são mais estáveis que os primeiros. Para além de poderem ser caracterizados quanto à sua origem, os fosfolípidos podem também ser caracterizados quanto às ligações entre os átomos de carbono nas cadeias hidrocarbonadas, podendo, assim, ser saturados ou insaturados. Os fosfolípidos saturados apresentam apenas ligações simples entre os átomos de carbono (C-C), enquanto os insaturados apresentam uma ou mais ligações duplas (C=C). O grau de saturação das cadeias lipídicas tem influência na temperatura de transição, temperatura à qual as membranas passam da fase ordenada para a fase fluida. A temperatura de transição aumenta com o grau de saturação das membranas lipídicas [20]. Os fosfolípidos podem ainda ser caracterizados quanto à sua carga iónica, dividindo-se em iónicos (catiónicos ou aniónicos), não iónicos (neutros) ou zwitteriónicos (neutros, com cargas opostas em átomos diferentes).

Neste trabalho foram usados dois tipos de fosfolípidos para a formação dos magnetolipossomas, estando as suas características e estrutura descritos na tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Classificação das propriedades dos lípidos utilizados quanto à sua estrutura, carga e temperatura de transição.

FOSFOLÍPIDO	ESTRUTURA	CARGA	TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO DE FASE
EGG-PC (L- α -fosfatidilcolina)		Zwiteriónica	Muito baixa
DPPC (1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina)		Zwiteriónica	41°C [21]

Em meio aquoso, os fosfolípidos são obrigados a formar estruturas fechadas, devido às interações hidrofílicas/hidrofóbicas, eletrostáticas e de van der Waals [22]. Uma vez que as cabeças são

polares estas preferem interagir com o ambiente aquoso, enquanto as caudas apolares promovem a interação entre si de forma a evitar o contacto com a água [23].

Dependendo das propriedades físicas e químicas das cabeças e das caudas das moléculas, elas vão-se organizar de formas diferentes e formar diferentes tipos de estruturas organizadas, tais como micelas, bicamadas lipídicas e lipossomas. Dentro da categoria dos lipossomas, os mesmos podem ainda ser classificados em diversos tipos, dependendo do tamanho e número de lamelas que os constituem (figura 1.4), tais como:

- Vesículas multilamelares (MLVs, do inglês, *multilamellar vesicles*) - estruturas que possuem no seu interior várias bicamadas lipídicas de menores dimensões, separadas por água;
- Vesículas unilamelares, estruturas que possuem uma bicamada lipídica, com água no seu interior, que se dividem em:
 - Pequenas (SUVs - do inglês, *small unilamellar vesicles*), que apresentam tamanhos < 100 nm;
 - Grandes (LUVs - do inglês, *large unilamellar vesicles*), com tamanhos > 100 nm;

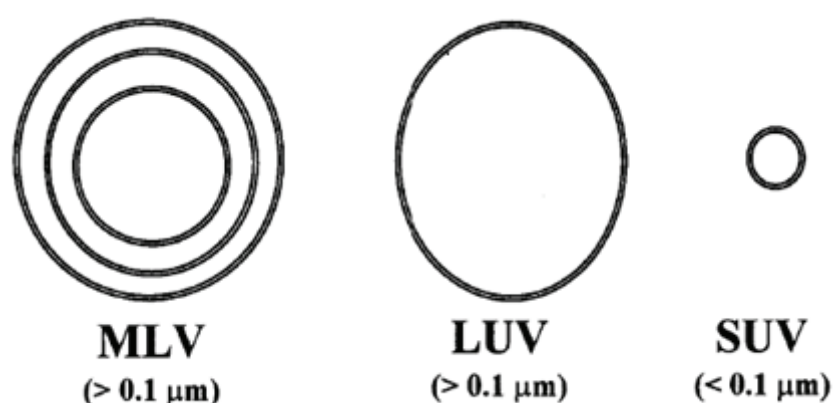


Figura 1.4 - Figura ilustrativa dos diferentes tipos de lipossomas. Adaptado de [24].

Os lipossomas apresentam grande relevância como sistemas de nanoencapsulamento, devido a serem biocompatíveis e biodegradáveis, à sua baixa toxicidade e ainda à capacidade de incorporação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos [23].

Perante todas as vantagens e características apresentadas, os lipossomas são sistemas de eleição para o transporte de fármacos na terapia do cancro, uma vez que diminuem a toxicidade

sistêmica do fármaco nos tecidos saudáveis, aumentam a estabilidade do agente encapsulado e potenciam o índice terapêutico do agente encapsulado no local alvo [25].

Apesar de melhorarem a farmacocinética dos compostos e reduzirem a sua toxicidade nos tecidos saudáveis, os lipossomas não possuem capacidade intrínseca de direcionamento às células tumorais. Desta forma, o tempo de circulação dos lipossomas na corrente sanguínea é determinante, uma vez que podem ser facilmente reconhecidos e fagocitados pelo sistema imunitário antes de chegar ao local alvo. Assim, podem ser feitas modificações na sua estrutura de forma a minimizar interações indesejáveis com proteínas plasmáticas e membranas celulares, aumentando o seu tempo de circulação e favorecendo a entrega dos compostos no local alvo [26]. Têm sido, então, desenvolvidos lipossomas que apresentam características que visam aumentar o tempo de circulação e, ao mesmo tempo, permitir um direcionamento para as células cancerígenas [27].

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero biocompatível, solúvel em meios aquosos e orgânicos que possui baixa toxicidade, imunogenicidade e antigenicidade, o que o torna muito interessante para várias aplicações na nanomedicina. Tem a capacidade de proteger os lipossomas do sistema fagocítico, impedir a sua interação com outras moléculas e a sua agregação, favorecendo a formação de partículas monodispersas e aumentando o tempo de circulação [23].

Os tecidos tumorais apresentam geralmente um microambiente diferente dos tecidos saudáveis, sendo esta uma vantagem para o desenvolvimento de sistemas de libertação com especificidade para estes tecidos. O microambiente tumoral apresenta um pH abaixo de 7. Assim, o desenvolvimento de lipossomas sensíveis ao pH, que sejam estáveis ao pH do sangue (cerca de 7,4) e desestabilizados a um pH mais baixo como se verifica no local do tumor ($\text{pH} < 6$), é uma abordagem que permite promover a fusão dos lipossomas com membranas celulares e a consequente libertação do seu conteúdo no tecido tumoral [28]. Sabe-se ainda que as células tumorais apresentam uma sobreexpressão de recetores de folato, assim, a funcionalização de lipossomas direcionados aos recetores de folato tem-se apresentado uma abordagem promissora que permite aumentar significativamente a interação destes lipossomas com células tumorais [29].

Neste trabalho iremos explorar a funcionalização de lipossomas através do desenvolvimento de formulações que permitam aumentar o tempo de circulação e entrega controlada de fármacos, através da inclusão de PEG e de moléculas sensíveis ao pH (especificamente usando hemisuccinato de colesterol, CHEMS).

1.4. Nanopartículas magnéticas

1.4.1. Características estruturais

As nanopartículas magnéticas (NPMs) têm sido exploradas para várias aplicações biomédicas, quer no diagnóstico enquanto agentes de marcação e separação celular e de contraste em ressonância magnética, quer na terapia, enquanto agentes de hipertermia e no direcionamento e libertação controlada de fármacos [27-29].

As NPMs são comumente baseadas em elementos químicos que apresentam propriedades magnéticas como o ferro, níquel, cobalto e manganês. O óxido de ferro é o material mais utilizado devido às suas excelentes propriedades magnéticas [30]. As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs, do inglês *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*), têm-se mostrado de grande interesse; no entanto, quanto ao seu perfil de toxicidade, atualmente, ainda há algum debate. Alguns estudos demonstram que os óxidos de ferro produzem espécies reativas de oxigénio em células de mamíferos, levando à indução de quebras nas cadeias de DNA por meio de danos oxidativos [31]. Deste modo, neste trabalho foram selecionadas ferrites mistas de manganês/cálcio e manganês/magnésio, em vez de óxidos de ferro, uma vez que se demonstraram pouco tóxicas em diversos estudos [32-34].

Para aplicação de NPMs em biotecnologia é necessário ter em conta as suas características e propriedades físico-químicas, tais como a composição química, propriedades de adsorção, estrutura superficial, solubilidade, toxicidade e tamanho [35].

1.4.2. Propriedades magnéticas

A origem das propriedades magnéticas a nível microscópico reside no movimento dos eletrões e tem origem no momento angular orbital (movimento dos eletrões em torno dos átomos) e no momento angular de spin (movimento dos eletrões em torno de si mesmos).

A classificação das propriedades magnéticas de um material é baseada na sua suscetibilidade magnética (χ), uma grandeza adimensional que indica o grau de magnetização (M) do material em resposta a um campo magnético aplicado (H) [36]. Existem vários tipos de materiais magnéticos, tais como (figura 1.5):

- **Diamagnéticos:** nestes materiais, os níveis de energia estão completos e os elétrons estão todos emparelhados, de tal forma que todos os momentos se cancelam. Logo, na ausência de campo externo não há momento magnético. Na presença de um campo magnético, o momento magnético é antiparalelo, resultando em suscetibilidades negativas e muito pequenas. Estes materiais não retêm as propriedades magnéticas quando o campo externo é removido.
- **Paramagnéticos:** nestes materiais, os níveis de energia estão parcialmente completos. Ou seja, há elétrons desemparelhados que conferem um pequeno momento magnético ao material e o seu magnetismo é caracterizado por uma suscetibilidade positiva fraca. Na presença de um campo magnético externo, pequenos momentos tendem a alinhar-se dando origem a um campo magnético. Contudo, quando este campo é retirado os dipolos voltam a alinhar-se de forma aleatória e a magnetização é perdida.
- **Ferromagnéticos:** estes materiais apresentam níveis de energia parcialmente cheios e muitos elétrons desemparelhados que produzem fortes momentos magnéticos e, por isso, são caracterizados por uma grande suscetibilidade positiva. Na presença de um campo magnético, os momentos magnéticos alinham-se permanentemente, resultando numa magnetização permanente do material [37].

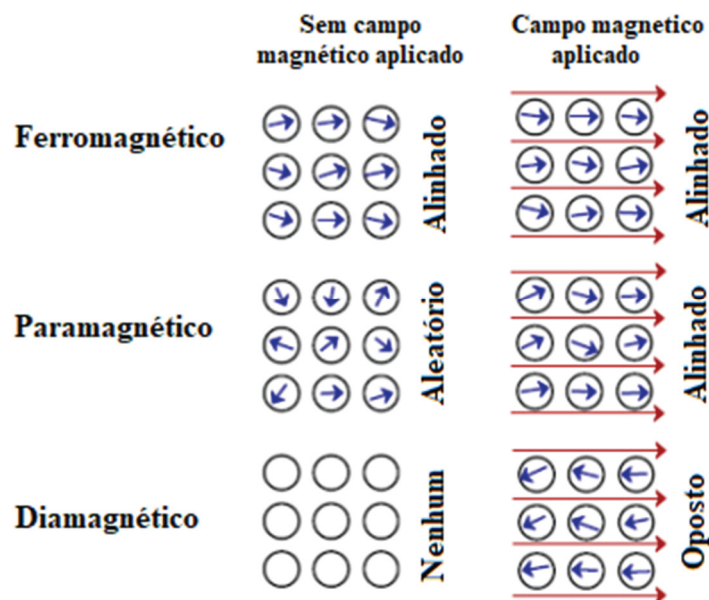


Figura 1.5 - Representação esquemática dos momentos dipolares dos diferentes materiais magnéticos, na ausência e presença de campo magnético. Adaptado de [38].

À nanoescala, os materiais ferromagnéticos apresentam um comportamento superparamagnético, tornando-se materiais de elevado interesse para aplicações biomédicas. Em seguida, irão ser abordadas em maior detalhe as características e propriedades deste tipo de comportamento magnético.

No estado *bulk*, o comportamento magnético dos materiais ferromagnéticos, surge de estruturas de vários domínios magnéticos. Domínios magnéticos são regiões de magnetização uniforme onde momentos magnéticos individuais se alinham espontaneamente na mesma direção, de forma a reduzir a energia magnetostática [37]. A interface que separa os domínios magnéticos é chamada de parede de Bloch e a sua espessura é limitada pela anisotropia do material. Na parede de Bloch, a magnetização gira coerentemente do momento num domínio para o domínio vizinho, como podemos ver na figura 1.6 B.

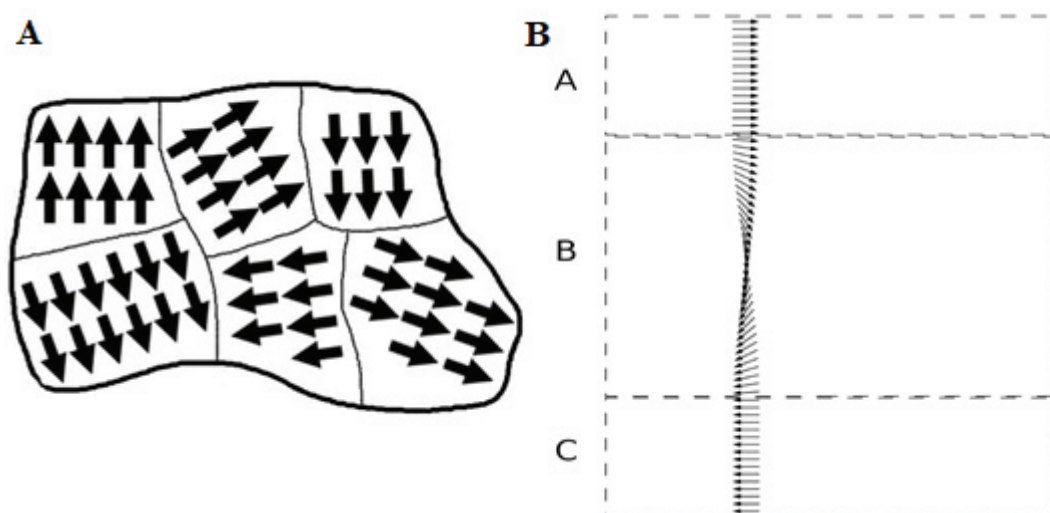


Figura 1.6 - A - Representação dos vários domínios de uma nanopartícula e B - Parede de Bloch (B) com a reorientação gradual dos momentos magnéticos entre dois domínios (A) e (C).

Quando o tamanho de um material ferromagnético diminui, a energia necessária para a formação de um domínio aumenta e, abaixo de um diâmetro crítico, a formação dos domínios torna-se energeticamente desfavorável. Assim, abaixo deste diâmetro crítico, é energeticamente menos favorável formar uma parede de domínio do que suportar a energia magnetostática de um sistema de domínio único. Nesse estado, a magnetização das nanopartículas é aproximada como um momento gigante, pela soma dos momentos magnéticos individuais (μ) de cada átomo constituinte e as partículas passam a ter

um comportamento superparamagnético. Esta aproximação é chamada de “aproximação macro-spin” e é responsável pelo forte momento magnético em nanopartículas superparamagnéticas [39].

O diâmetro crítico (D_c) para uma partícula magnética atingir o limite de domínio único é igual a:

$$D_c = \frac{36\sqrt{AK}}{\mu_0 M_s^2} \quad \text{Equação 1.1}$$

onde A é a constante de troca, K a constante de anisotropia efetiva, μ_0 é a constante magnética ($4\pi \times 10^{-7} \text{NA}^{-2}$) e M_s a magnetização de saturação [40].

Para identificar este tipo de comportamento é necessário primeiro considerar as propriedades intrínsecas dos nanomateriais magnéticos, nomeadamente, a magnetização de saturação, a remanência e a coercividade. As nanopartículas magnéticas possuem uma magnetização máxima chamada de magnetização de saturação (M_s) que é a situação em que todos os momentos magnéticos estão alinhados na presença de um campo magnético externo, uma magnetização remanescente (M_r) que é a magnetização que permanece depois da remoção do campo magnético e a coercividade (H_c) que é a intensidade de um campo externo necessária para forçar a magnetização a zero.

Quando o tamanho de partículas de domínio único diminui abaixo de um diâmetro crítico, estas passam a não apresentar histerese (tendência das nanopartículas conservarem o magnetismo na ausência do campo magnético que o gerou) e essas partículas tornam-se superparamagnéticas. Nas partículas superparamagnéticas, as flutuações térmicas são fortes o suficiente para desmagnetizar espontaneamente um conjunto previamente saturado, após a remoção do campo aplicado. Assim, estas partículas não apresentam coercividade nem remanescência no seu ciclo de histerese [37].

Para uma partícula de domínio único, a quantidade de energia necessária para reverter a magnetização de uma configuração magnética estável para a outra é proporcional a $KV/k_B T$, onde V é o volume da partícula, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura. Se a energia térmica for grande o suficiente para superar a energia da anisotropia, a magnetização não é mais estável e a partícula é dita superparamagnética.

Diminuindo o tamanho das partículas, a energia anisotrópica (KV), que é a energia que separa as duas direções de magnetização energeticamente equivalentes, diminui até que a energia térmica ($k_B T$) causa flutuações de todos os momentos magnéticos. Nessa situação, as flutuações térmicas podem afetar a orientação da magnetização se forem grandes o suficiente para superar a barreira de anisotropia

magnética. Assim, a anisotropia magnética funciona como uma barreira de energia que bloqueia os momentos magnéticos. Se a temperatura estiver acima da chamada temperatura de bloqueio (T_B), que é a temperatura acima da qual as flutuações térmicas são ativadas, a energia é alta o suficiente para superar a barreira de energia da anisotropia e os momentos magnéticos são desbloqueados, resultando na perda de magnetização. A temperatura de bloqueio depende do tamanho da partícula, da constante a anisotropia efetiva, do campo magnético aplicado e do tempo e é dada por:

$$T_B = \frac{KV}{k_B \ln\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right)} \quad \text{Equação 1.2}$$

onde K_B a constante de Boltzmann, K é a densidade de energia de anisotropia magnética da partícula, V o volume e τ é o tempo.

O comportamento superparamagnético é, então, caracterizado pela elevada magnetização, apenas na presença de um campo magnético externo, ou seja, depois da remoção do campo magnético, a magnetização retorna a zero como resultado de flutuações térmicas. A perda de magnetização remanescente, após remoção do campo, permite que as partículas mantenham a sua estabilidade coloidal e que a sua aglomeração seja evitada. Além disso, a elevada magnetização deste tipo de partículas é de interesse para aplicações biomédicas de entrega direcionada de fármacos, uma vez que o uso destes materiais permite um maior controlo externo sobre a sua localização [41].

Perante todas as características apresentadas anteriormente é possível concluir que as partículas magnéticas, nomeadamente as superparamagnéticas, são de elevado interesse para aplicações biomédicas.

1.4.3. Nanopartículas magnéticas para aplicações biomédicas

As nanopartículas magnéticas, devido às suas propriedades únicas, têm sido amplamente investigadas para novas aplicações em biomedicina, tais como em ressonância magnética, biossensores, entrega direcionada de fármacos e hipertermia magnética. Assim, é necessário ter em conta alguns critérios para o sucesso na utilização destas partículas, tais como [35]:

- Tamanho da partícula: as partículas não podem apresentar tamanho superior a 100 nm para facilitar a sua difusão nos tecidos, mas por outro lado também não podem apresentar

um tamanho demasiado pequeno, uma vez que poderão apresentar problemas de toxicidade indesejada;

- Características de superfície: é necessário que as nanopartículas magnéticas apresentem elevada estabilidade de modo a evitar grandes agregados e serem passíveis de biodegradação;
- Resposta magnética: as partículas precisam apresentar superparamagnetismo para que percam a magnetização após remoção do campo magnético externo, bem como apresentarem alta suscetibilidade magnética.

1.4.3.1. Diagnóstico

A ressonância magnética é uma das técnicas de imagem mais usadas atualmente. É uma técnica não invasiva, não destrutiva, capaz de reconstruir imagens 3D de uma estrutura interna do corpo humano. Isto permite que a ressonância magnética seja uma técnica muito valiosa para o diagnóstico do cancro.

A intensidade do sinal de ressonância magnética está relacionada com os tempos de relaxação de prótons da água *in vivo* (T1 e T2). O tempo de relaxação T1 diz respeito à rapidez com que a magnetização paralela ao campo magnético recupera após uma perturbação aplicada ao sistema, já o tempo de relaxação T2 refere-se à rapidez com que a magnetização no plano perpendicular ao campo magnético é perdida [42]. Apesar de ser uma técnica muito utilizada, a resolução da imagem muitas vezes não é suficientemente boa, e para melhorar essa problemática são usados os chamados agentes de contraste. Estes têm como função aperfeiçoar o contraste das imagens através da diminuição dos tempos de relaxação dos prótons da água presentes nos tecidos. As nanopartículas magnéticas têm sido utilizadas como agentes de contraste em imagiologia de ressonância magnética, uma vez que diminuem os tempos de relaxação dos prótons circundantes resultando num contraste negativo aprimorado [44].

1.4.3.2. Terapia

A utilização de nanopartículas magnéticas na entrega de fármacos tem-se mostrado bastante promissora, uma vez que ao serem direcionadas permitem realizar a ação terapêutica no local alvo.

Desta forma, esta abordagem permite reduzir a distribuição sistêmica de fármacos e aumentar a captação no local alvo, podendo resultar em tratamentos com dosagens mais reduzidas (figura 1.7) [43].

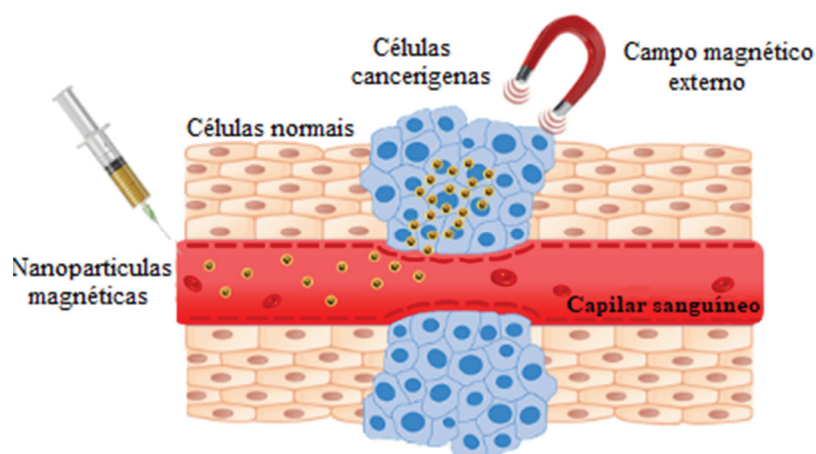


Figura 1.7 - Representação esquemática da entrega de fármacos direcionada magneticamente. Adaptado de [44].

Perante todas as limitações da terapia do cancro apresentadas nos capítulos anteriores, podemos concluir que direcionamento magnético pode ser o futuro para ultrapassar vários obstáculos das terapias convencionais. A hipertermia magnética resulta do aumento da temperatura local onde se acumulam as nanopartículas magnéticas, levando à morte celular seletiva nos tecidos tumorais [45]. Esta abordagem baseia-se no facto das células tumorais serem mais sensíveis ao aumento de temperatura do que as células saudáveis, e assim, quando sobreaquecidas acabam por ser destruídas ou danificadas [46,47,48].

Neste tipo de abordagem terapêutica, as nanopartículas magnéticas acumuladas no tumor são expostas a um campo magnético de corrente alternada (CA), absorvendo essa energia e convertendo-a em calor pelo relaxamento dos momentos magnéticos rotativos induzidos pelo CA (figura 1.8) [49].

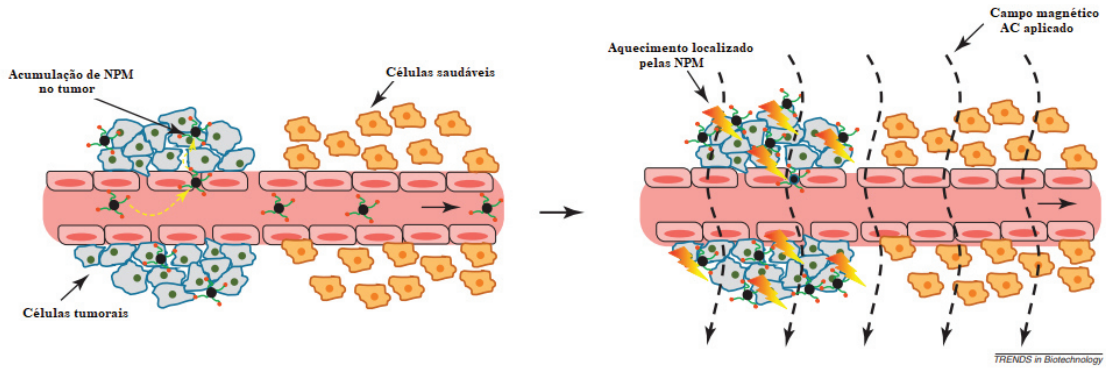


Figura 1.8 - Representação esquemática da acumulação de NP magnéticas no local do tumor e consequente tratamento por hipertermia. Adaptado de [50].

Para produção de calor eficaz nos tecidos tumorais, tem de se contemplar a contribuição da propagação do calor na matéria viva que inclui a resposta do sistema ao aquecimento local através da circulação sanguínea que atua como um sistema de refrigeração eficiente em tumores altamente vascularizados. Assim, a temperatura (T) nos tecidos próximos pode ser estimada pela equação de Pennes [51]:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \frac{1}{\rho_t c_t} \{k_t \nabla^2 T - w_b c_b (T - T_\alpha) + Q\} \quad \text{Equação 1.3}$$

onde ρ_t e C_t são a densidade e a capacidade de calorífica específica do tecido, respetivamente, k_t é a condutividade térmica, Q é a densidade da taxa de produção de calor, T_α é a temperatura a distâncias infinitas e w_b , c_b são a taxa de perfusão e a capacidade de calor específica do sangue, respetivamente.

A capacidade de aquecimento de um material magnético é quantificada por meio da taxa de absorção específica (SAR), definida como a quantidade de energia convertida em calor por tempo e massa (expresso em Watt por quilograma). Em termos experimentais, a taxa de absorção específica, por unidade de massa, é obtida a partir do declive do aumento inicial da temperatura ($\Delta T/\Delta t$) da curvas de aquecimento, através da equação [58]:

$$SAR = C_s \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad \text{Equação 1.4}$$

onde C_s é a capacidade calorífica específica do material, calculada como [51]:

$$C_s = \frac{m_{Fe}c_{Fe} + m_l c_l}{m_{Fe} + m_l} \quad \text{Equação 1.5}$$

com c_{Fe} , m_{Fe} e c_l , m_l sendo as capacidades de caloríficas específicas e as massas do material magnético e do solvente, respetivamente.

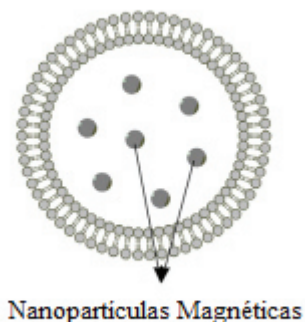
A grande vantagem da hipertermia magnética é o facto desta técnica permitir que o aquecimento seja restrito à área do tumor, garantindo que as células saudáveis não são afetadas. Além disso, o uso de partículas de tamanhos nanométricos permite uma melhor produção de calor na presença de campos de corrente alternada [37].

A hipertermia tem sido empregue como uma abordagem terapêutica adjuvante de outras terapias, como a quimioterapia, com o intuito de melhorar o efeito terapêutico do tratamento. A sinergia entre as duas técnicas permite um tratamento mais seguro e eficaz, quando comparado com a utilização individual das técnicas.

1.4.4. Magnetolipossomas

Os magnetolipossomas são um grupo particular de sistemas de lipossomas, que se baseiam num núcleo contendo nanopartículas magnéticas rodeado por uma bicamada fosfolipídica. Dividem-se em dois tipos (figura 1.9), os magnetolipossomas aquosos (AMLs), onde as nanopartículas magnéticas estão dispersas na fase aquosa do lipossoma, e os magnetolipossomas sólidos (SMLs), constituídos por um *cluster* de nanopartículas magnéticas rodeado pela bicamada lipídica. Os magnetolipossomas são sistemas flexíveis e biocompatíveis que oferecem a possibilidade de funcionalização da superfície para melhorar a entrega de fármacos.

Magnetolipossomas Aquosos



Magnetolipossomas Sólidos

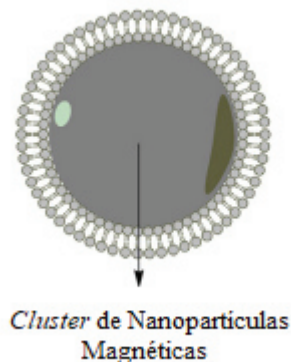


Figura 1.9 - Representação esquemática de AMLs e de SMLs. Adaptado de [52]

Uma vez que os magnetolipossomas juntam as características dos lipossomas e das nanopartículas magnéticas num só sistema, eles representam, então, um sistema ideal que pode ser utilizado em várias aplicações biomédicas, sejam elas de diagnóstico ou de terapia. Apesar de serem várias as suas aplicações, as que merecem maior destaque são as de administração magneticamente guiada de fármacos e a hipertermia, no ramo da terapêutica. Por outro lado, no que diz respeito ao diagnóstico, os magnetolipossomas são promissores enquanto agentes de contraste em ressonância magnética [18,53]. O direcionamento magnético de fármacos, através de magnetolipossomas para tratamento do cancro, tem sido intensivamente estudado uma vez que as vantagens da utilização destes sistemas são inúmeras.

Estes sistemas baseados em nanopartículas magnéticas, diferenciam-se de outros nanossistemas usados nas terapias atuais baseados em lipossomas, uma vez que podem fornecer uma abordagem terapêutica dual, combinando a capacidade de hipertermia magnética e quimioterapia localizada num único bionanossistema, melhorando o tratamento desde o início [54]. Isto é demonstrado num estudo levado a cabo por K. Hayashi e colaboradores em 2014, onde foi observada uma melhor eficácia terapêutica *in vivo* no tratamento de mieloma múltiplo resultante da combinação de hipertermia e quimioterapia com nanotransportadores inteligentes baseados em NP magnéticas carregados com doxorubicina [55].

Neste trabalho irão ser produzidos magnetolipossomas como sistemas de entrega controlada de potenciais fármacos antitumorais.

1.4.4.1. Quimioterapia magneticamente controlada

Os magnetolipossomas são sistemas com potencial para revolucionar o tratamento do cancro, uma vez que permitem ultrapassar desafios associados às terapias convencionais. Sabe-se que a maioria dos fármacos anticancerígenos usados são extremamente tóxicos e causam efeitos colaterais sistêmicos. A administração de fármacos encapsulados em magnetolipossomas veio contornar esta toxicidade protegendo e transportando os fármacos para os locais de interesse através de campos magnéticos externos, resultando numa melhor distribuição dos mesmos (Figura 1.10) [56,57].

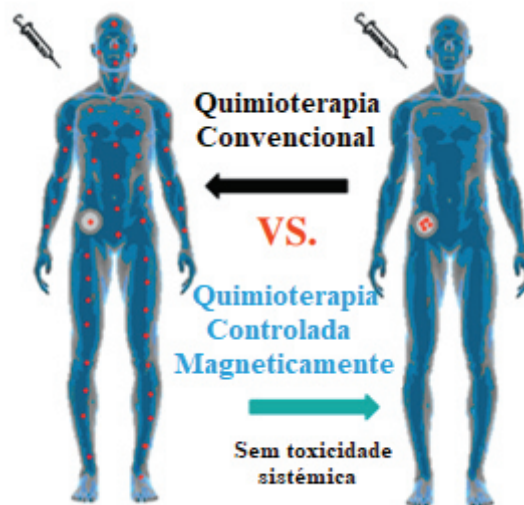


Figura 1.10 - Representação esquemática das diferenças entre quimioterapia convencional e quimioterapia controlada magneticamente. Adaptado de [52].

Para além da redução da toxicidade sistêmica, outras vantagens advêm da utilização destes nanossistemas, tais como:

- Redução da quantidade de fármacos necessária para atingir uma determinada concentração específica no tumor [58];
- Possibilidade de biofuncionalizações para controlo remoto dos sistemas, como por exemplo, os magnetolipossomas termosensíveis.

Esta nova abordagem visa substituir os tratamentos de quimioterapia convencionais uma vez que contorna os seus grandes problemas de altas dosagens, baixa eficácia e efeitos colaterais significativos, que geralmente resultam em grandes problemas nos pacientes.

1.4.4.2. Tratamento dual e sinérgico por hipertermia e quimioterapia

As potencialidades das nanopartículas magnéticas em conjunto com as dos lipossomas permitem otimizar todo o processo de distribuição de fármacos. O facto de existir um núcleo magnético faz com que os magnetolipossomas sejam sistemas que respondem a estímulos por diferentes campos magnéticos externos aplicados permitindo modular o transporte e acumulação do sistema no local alvo, a libertação controlada do fármaco e uma terapia dual, que combina a libertação do fármaco com o aquecimento local por hipertermia [59]. Uma vez direccionados para o local alvo, é necessário induzir a libertação do fármaco. A libertação pode ser induzida através da aplicação de um campo magnético alternado, que leva ao aquecimento local, e, usando formulações lipídicas termosensíveis permite induzir a libertação controlada dos fármacos encapsulados nos magnetolipossomas. Para tal, é necessário que a temperatura local seja superior à temperatura de transição de fase do lípido, permitindo uma diminuição das interações hidrofóbicas entre as cadeias lipídicas, e consequente aumento da fluidez da membrana.

Vários estudos têm demonstrado que as taxas de crescimento de tumores, tratados apenas com hipertermia ou apenas com quimioterapia, não apresentam reduções significativas. No entanto, quando estes dois tratamentos são aplicados simultaneamente observa-se uma diminuição considerável na taxa de crescimento tumoral como consequência da sinergia entre os dois tratamentos [60].

Os magnetolipossomas são um nanossistema flexível e biocompatível, promissor para a entrega controlada de fármacos e hipertermia magnética. Assim, este tipo de sistemas é ideal para uma abordagem terapêutica dual e sinérgica por quimioterapia e hipertermia. Para além disso, apresentam-se como sistemas de tratamento menos invasivos que os tradicionais, melhorando a eficácia terapêutica [61,62].

1.5. Referências do Capítulo 1

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018 Nov;68(6):394–424.
2. World Health Organization - Cancer. [visitado a 1 Abril 2020]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
3. Timko BP, Whitehead K, Gao W, Kohane DS, Farokhzad O, Anderson D, et al. Advances in Drug Delivery. *Annual Review of Materials Research*. 2011 Aug;41(1):1–20.
4. Sinha R. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006 Aug 1;5(8):1909–17.

5. Gindy ME, Prud'homme RK. Multifunctional nanoparticles for imaging, delivery and targeting in cancer therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2009 Aug 28;6(8):865–78.
6. Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials*. 2013 Nov 23;12(11):991–1003.
7. Tay CY, Setyawati MI, Xie J, Parak WJ, Leong DT. Back to Basics: Exploiting the Innate Physico-chemical Characteristics of Nanomaterials for Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials*. 2014 Oct;24(38):5936–55.
8. Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanomedicine. *New England Journal of Medicine*. 2010 Dec 16;363(25):2434–43.
9. Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H. Nanomedicine-Challenge and Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition*. 2009 Jan 19;48(5):872–97.
10. Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under the Microscope. *Molecular Pharmaceutics*. 2011 Dec 5;8(6):2101–41.
11. Heath JR, Davis ME. Nanotechnology and Cancer. *Annual Review of Medicine*. 2008 Feb;59(1):251–65
12. Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2006;29(9):1790–8.
13. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discovery Today*. 2010 Oct;15(19–20):842–50.
14. Machado VA, Peixoto D, Queiroz MJ, Soares R. Antiangiogenic 1-Aryl-3-[3-(thieno[3,2-b]pyridin-7-ylthio)phenyl]ureas Inhibit MCF-7 and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Lines Through PI3K/Akt and MAPK/Erk Pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2016 Dec;117(12):2791–9.
15. Rodrigues ARO, Almeida BG, Rodrigues JM, Queiroz MJRP, Calhella RC, Ferreira ICFR, et al. Magnetoliposomes as carriers for promising antitumor thieno[3,2-b]pyridin-7-arylamines: photophysical and biological studies. *RSC Advances*. 2017;7(25):15352–61
16. New Liposomes for Drug Delivery Swim Past Body's Immune System | Medgadget. [Visitado a 1 Abril 2020]. <https://www.medgadget.com/2016/03/new-liposomes-for-drug-delivery-swim-past-bodys-immune-system.html>.
17. Monteiro N, Martins A, Reis RL, Neves NM. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of The Royal Society Interface*. 2014 Dec 6;11(101):20140459
18. Vemuri S, Rhodes C. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1995 Jul;70(2):95–111
19. Lipids | Biology for Non-Majors I. [Visitado a 1 Abril 2020]. <https://courses.lumenlearning.com/wm-nmbiology1/chapter/reading-lipids-2/>
20. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CRH, Shimizu T, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of lipid research*. 2009 Apr;50(Supplement):S9–14.
21. Leonenko ZV, Finot E, Ma H, Dahms TES, Cramb DT. Investigation of Temperature-Induced Phase Transitions in DOPC and DPPC Phospholipid Bilayers Using Temperature-Controlled Scanning Force Microscopy. *Biophysical Journal*. 2004 Jun;86(6):3783–93.

22. Olsson U, Wuerz U, Strey R. Cylinders and bilayers in a ternary nonionic surfactant system. *Journal of Physical Chemistry*. 1993 Apr;97(17):4535–9.
23. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. Vol. 10, *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd; 2015. 975–99.
24. Sharma A. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997 Aug 26;154(2):123–40.
25. Batista CM, Carvalho CMB de, Magalhães NSS. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007 Jun;43(2):167–79.
26. Park JW. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Research*. 2002 Jun 1;4(3):95.
27. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005 Feb;4(2):145–60.
28. Patel NR, Pattni BS, Abouzeid AH, Torchilin VP. Nanopreparations to overcome multidrug resistance in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013 Nov;65(13–14):1748–62.
29. Muthu MS, Kulkarni SA, Raju A, Feng S-S. Theranostic liposomes of TPGS coating for targeted co-delivery of docetaxel and quantum dots. *Biomaterials*. 2012 Apr;33(12):3494–501.
30. Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005 Jul;100(1):1–11
31. Kawanishi M, Ogo S, Ikemoto M, Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, et al. Genotoxicity and reactive oxygen species production induced by magnetite nanoparticles in mammalian cells. *Journal of Toxicological Sciences*. 2013;38(3):503–11.
32. Pereira DSM, Cardoso BD, Rodrigues ARO, Amorim CO, Amaral VS, Almeida BG, et al. Magnetoliposomes Containing Calcium Ferrite Nanoparticles for Applications in Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutics*. 2019 Sep 14;11(9):477.
33. Saldivar-Ramírez MMG, Sánchez-Torres CG, Cortés-Hernández DA, Escobedo-Bocardo JC, Almanza-Robles JM, Larson A, et al. Study on the efficiency of nanosized magnetite and mixed ferrites in magnetic hyperthermia. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014 Oct 27;25(10):2229–36
34. Khanna L, Verma NK. Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity study of calcium ferrite nanoparticles. *Materials Science in Semiconductor Processing*. 2013 Dec;16(6):1842–8.
35. Tartaj P, Morales MP, González-Carreño T, Veintemillas-Verdaguer S, Serna CJ. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005. 28–34.
36. Indira T. Magnetic Nanoparticles: A Review. *International Journal of Pharmaceutical*. 2010;3(3):1035–42.
37. Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters*. 2012;7(1):144.
38. Sinatra FL. Understanding the interaction between blood flow and an applied magnetic field. *ProQuest Dissertations and Theses*. University of South Florida; 2010.

39. Sayad M, Gütersloh D, Potthoff M. Macrospin approximation and quantum effects in models for magnetization reversal. *The European Physical Journal B*. 2012 Apr 13;85(4):125.
40. Frey NA, Peng S, Cheng K, Sun S. Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage. *Chemical Society Reviews*. 2009;38(9):2532.
41. Sun C, Lee JSH, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2008 Aug 17;60(11):1252–65.
42. Estelrich J, Sánchez-Martín MJ, Busquets MA. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: From simple to dual contrast agents. *International Journal of Nanomedicine*. 2015 Mar 6;10:1727–41.
43. Arruebo M, Fernández-Pacheco R, Ibarra MR, Santamaría J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*. 2007 Jun;2(3):22–32.
44. Yew YP, Shameli K, Miyake M, Ahmad Khairudin NBB, Mohamad SEB, Naiki T, et al. Green biosynthesis of superparamagnetic magnetite Fe₃O₄ nanoparticles and biomedical applications in targeted anticancer drug delivery system: A review. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020 Jan;13(1):2287–308.
45. Gonzales M, Krishnan KM. Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystal cores for hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2005 May;293(1):265–70.
46. Kim J, Park S, Lee JE, Jin SM, Lee JH, Lee IS, et al. Designed Fabrication of Multifunctional Magnetic Gold Nanoshells and Their Application to Magnetic Resonance Imaging and Photothermal Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*. 2006 Nov 27;45(46):7754–8.
47. Shinkai M, Le B, Honda H, Yoshikawa K, Shimizu K, Saga S, et al. Targeting Hyperthermia for Renal Cell Carcinoma Using Human MN Antigen-specific Magnetoliposomes. *Japanese Journal of Cancer Research*. 2001 Oct;92(10):1138–46.
48. Perecin C, Cerize N, Chitta V, Gratens X, Léo P, de Oliveira A, et al. Magnetite Nanoparticles Encapsulated with PCL and Poloxamer by Nano Spray Drying Technique. *Nanoscience and Nanotechnology*. 2016 Aug 1;6(4):68–73.
49. Pollert E, Veverka P, Veverka M, Kaman O, Závěta K, Vasseur S, et al. Search of new core materials for magnetic fluid hyperthermia: Preliminary chemical and physical issues. *Progress in Solid State Chemistry*. 2009 Jan;37(1):1–14.
50. Cole AJ, Yang VC, David AE. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. *Trends in Biotechnology*. 2011 Jul;29(7):323–32.
51. Goya G, Grazu V, Ibarra M. Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy. *Current Nanoscience*. 2008 Feb 1;4(1):1–16.
52. Rodrigues ARO, Almeida BG, Araújo JP, Queiroz M-JRP, Coutinho PJG, Castanheira EMS. Magnetoliposomes for dual cancer therapy. *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines*. Elsevier; 2018. 489–527.
53. Soenen SJ, Velde G Vande, Ketkar-Atre A, Himmelreich U, De Cuyper M. Magnetoliposomes as magnetic resonance imaging contrast agents. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2011 Mar;3(2):197–211.

54. Pradhan P, Giri J, Rieken F, Koch C, Mykhaylyk O, Döblinger M, et al. Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy. *Journal of Controlled Release*. 2010 Feb;142(1):108–21.
55. Hayashi K, Nakamura M, Miki H, Ozaki S, Abe M, Matsumoto T, et al. Magnetically Responsive Smart Nanoparticles for Cancer Treatment with a Combination of Magnetic Hyperthermia and Remote-Control Drug Release. *Theranostics*. 2014;4(8):834–44.
56. Alexiou C, Tietze R, Schreiber E, Jurgons R, Richter H, Trahms L, et al. Cancer therapy with drug loaded magnetic nanoparticles—magnetic drug targeting. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2011 May;323(10):1404–7.
57. Fattahi H, Laurent S, Liu F, Arsalani N, Elst L Vander, Muller RN. Magnetoliposomes as multimodal contrast agents for molecular imaging and cancer nanotheragnostics. *Nanomedicine*. 2011 Apr;6(3):529–44.
58. Chomoucka J, Drbohlavova J, Huska D, Adam V, Kizek R, Hubalek J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research*. 2010 Aug;62(2):144–9.
59. Babincová M, Čičmanec P, Altanerová V, Altaner Č, Babinec P. AC-magnetic field controlled drug release from magnetoliposomes: design of a method for site-specific chemotherapy. *Bioelectrochemistry*. 2002 Jan;55(1–2):17–9.
60. Haas GP, Klugo RC, Hetzel FW, Barton EE, Cerny JC. The Synergistic Effect of Hyperthermia and Chemotherapy on Murine Transitional Cell Carcinoma. *Journal of Urology*. 1984 Oct;132(4):828–33.
61. Zhang W, Guo Z, Huang D, Liu Z, Guo X, Zhong H. Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using PEGylated graphene oxide. *Biomaterials*. 2011 Nov;32(33):8555–61.
62. Watanabe N, Niitsu Y, Umeno H, Sone H, Neda H, Yamauchi N, et al. Synergistic Cytotoxic and Antitumor Effects of Recombinant Human Tumor Necrosis Factor and Hyperthermia. *Cancer Research*. 1988;48(3):584–8.

Capítulo 2 – Técnicas de Caracterização

2.1. Radiação Eletromagnética

A radiação eletromagnética é uma forma de energia que se propaga no espaço com uma velocidade de aproximadamente 3×10^8 m/s e que apresenta características ondulatórias e corpusculares. Muitos fenômenos óticos tais como a interferência, a reflexão, a refração, a difração e a polarização são descritos considerando a radiação como um movimento ondulatório. No entanto, este modelo ondulatório apresentou falhas importantes na interpretação da absorção e emissão de energia, e daí surgiu a necessidade de considerar a teoria corpuscular, onde se admite que a radiação eletromagnética é constituída por partículas discretas de energia.

A descrição quantitativa de algumas interações da radiação com o meio material implicou considerar que a radiação é constituída por partículas de energia ou fótons. A energia, E , de um fóton depende da frequência da radiação, ν , e é dada por

$$E = h \nu = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Equação 2.1}$$

em que h é a constante de Planck ($6,6256 \times 10^{-34}$ J.s), c é a velocidade da luz no vácuo (3×10^8 m/s) e λ o comprimento de onda da radiação. Uma onda eletromagnética propaga-se livremente no espaço e é constituída por um campo elétrico e um campo magnético oscilante. A onda comporta um vetor campo elétrico (E) e um vetor campo magnético (B). Os dois vetores variam de modo sinusoidal e oscilam em planos perpendiculares um ao outro, perpendicularmente à direção de propagação da onda (Figura 2.1) [1].

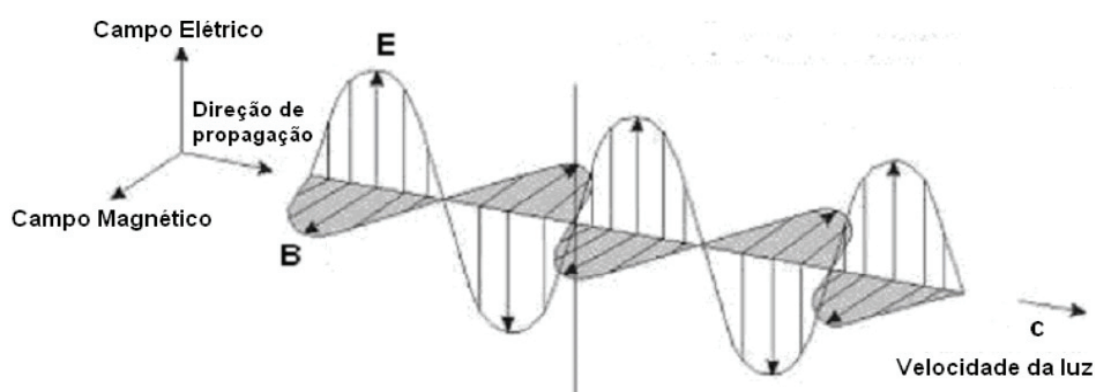


Figura 2.1 - Representação de uma onda eletromagnética, onde E representa o vetor campo elétrico, B o vetor campo magnético e c o vetor da direção de propagação da onda.

2.1.1. Espetro eletromagnético

O espectro eletromagnético é o intervalo de todas as ondas eletromagnéticas conforme as respectivas frequências e está dividido em várias regiões, de acordo com o seu comprimento de onda e frequência. A região de luz visível (figura 2.2), que é a luz observável pelo olho humano, está compreendida entre os comprimentos de onda de 380 a 750nm. A região ultravioleta abrange comprimentos de onda menores do que 400 nm. Por outro lado, a região do infravermelho corresponde a comprimentos de onda superiores a 750 nm.

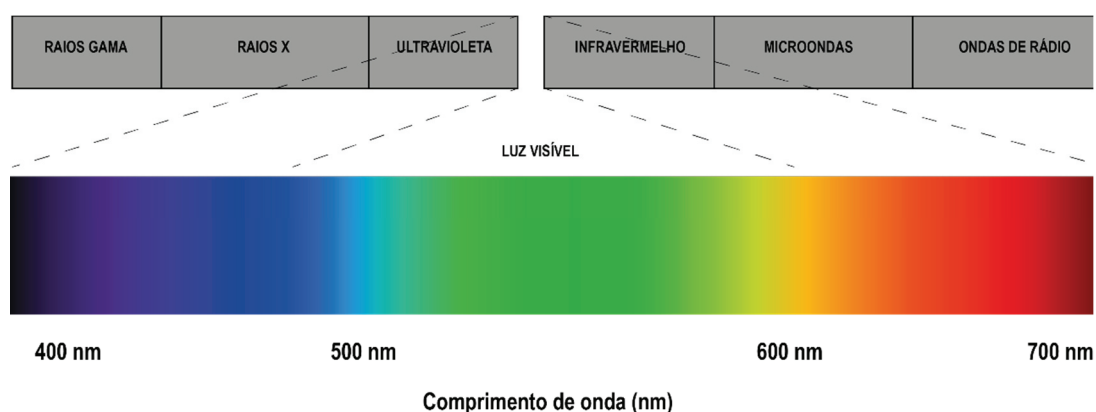


Figura 2.2 - Representação do espectro da região da luz visível.

A absorção de radiação, e também a emissão, por parte da matéria está relacionada com a natureza da sua superfície. A radiação incidente numa superfície pode ser, parcialmente, absorvida, refletida ou transmitida.

Quando um feixe de radiação atravessa um meio, certas frequências podem ser seletivamente absorvidas. A energia dos fótons é absorvida por átomos ou moléculas que, conseqüentemente, sofrem excitação, passando do seu estado energético fundamental para estados energéticos superiores. Os átomos, as moléculas e os iões possuem um número limitado de níveis de energia quantificados. Para que possa ocorrer absorção, o fóton deve possuir uma determinada energia, igual ou superior à diferença de energia, ΔE , entre o estado fundamental e o estado excitado. Assim, nas transições entre dois níveis quânticos de energia como, por exemplo, de E_0 (estado fundamental) para E_1 (primeiro estado excitado), a quantidade de energia absorvida é determinada pela equação (Equação 2.2):

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h \nu = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Equação 2.2}$$

onde c é a velocidade da luz no vácuo, h é a constante de Planck, ν é a frequência e λ o comprimento de onda da radiação absorvida.

O tempo de vida de um estado eletrônico excitado singlete é geralmente muito pequeno, da ordem de grandeza de 10^{-9} segundos. Após a absorção, as substâncias retornam ao seu estado fundamental através de diferentes processos e a energia da radiação absorvida pode ser convertida em energia térmica, energia radiante, ou ainda em energia química.

2.2. Espectroscopia de absorção UV-Visível

2.2.1. Níveis de energia e transições eletrônicas

Um nível de energia é definido como o estado quântico (de um elétron, átomo ou molécula) cuja energia está bem definida ao longo do tempo. Uma camada eletrônica pode ser pensada como um conjunto de elétrons que giram ao redor do núcleo do átomo. As camadas correspondem aos números quânticos principais ($n = 1, 2, 3, 4\dots$) e vão aumentando de número conforme se afasta do núcleo (figura 2.3).

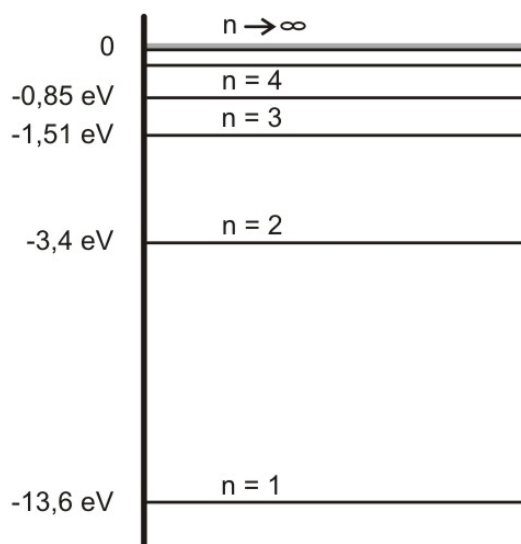


Figura 2.3 - Representação esquemática de um diagrama de níveis de energia.

Um átomo, íon ou molécula que estão no menor estado possível de energia, com os elétrons no nível de energia mais baixo, diz-se que estão no estado fundamental. Qualquer átomo, íon ou molécula

que possua elétrons que estejam num nível mais alto de energia, é dito no estado excitado. Os elétrons em átomos ou moléculas podem realizar transições entre níveis de energia ao absorverem ou emitirem um fóton (ou radiação eletromagnética). A energia total de uma molécula compreende três tipos diferentes de energia:

- energia rotacional, que está associada à rotação da molécula em torno do seu centro de gravidade;
- energia vibracional, que está relacionada com a vibração dos átomos ou grupos de átomos dentro da molécula;
- energia eletrônica, relacionada com a distribuição dos elétrons em torno dos núcleos dos átomos.

Estes três tipos de energia (juntamente com a energia nuclear) contribuem para a energia total da molécula e estão quantificados, de modo que, para cada estado eletrônico, existe um conjunto de níveis vibracionais e rotacionais, como se pode observar na figura 2.4 [2].

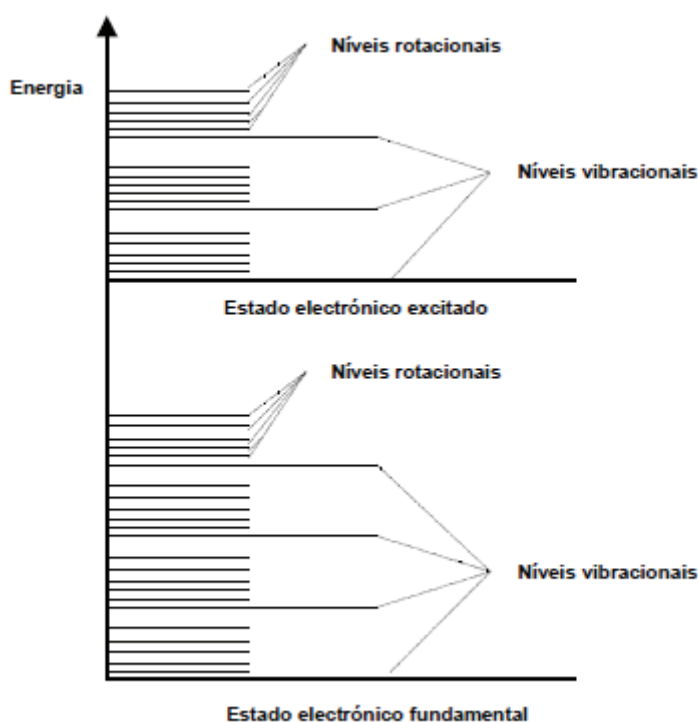


Figura 2.4 - Representação esquemática dos níveis de energia eletrônica, níveis rotacionais e vibracionais de uma molécula.

À temperatura ambiente, a maioria das moléculas encontram-se no nível de energia vibracional mais baixo do estado eletrónico fundamental, por isso, as transições para o estado excitado dão-se a

partir deste nível. Uma vez que as diferentes transições correspondem a intervalos de energia diferentes, irão obter-se picos (ou bandas) de absorção de diferentes comprimentos de onda [3]. Em espectroscopia de absorção, estes comprimentos de onda correspondem à absorção de radiação na região do ultravioleta e visível.

As transições eletrônicas que ocorrem numa molécula estão relacionadas com a existência de orbitais moleculares ligantes (σ , π), antiligantes (σ^* , π^*) e de orbitais não ligantes (n), sendo a relação entre as suas energias a seguinte:

$$E_{\text{anti-ligantes}} > E_{\text{não ligantes}} > E_{\text{ligantes}} .$$

As orbitais moleculares associadas a ligações simples são designadas orbitais σ e a distribuição da densidade eletrónica é rotacionalmente simétrica em relação ao eixo da ligação. As orbitais π são formadas pela sobreposição paralela de orbitais atómicas p. A sua distribuição eletrónica é caracterizada por um plano nodal (região de densidade eletrónica baixa) ao longo do eixo da ligação e densidade máxima em regiões acima e abaixo do plano.

Algumas das transições possíveis entre orbitais são:

- Transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$: Neste caso, um eletrão numa orbital σ ligante de uma molécula é excitado à orbital antiligante correspondente, pela absorção de radiação. Em relação a outras transições possíveis, a energia necessária para induzir uma transição $\sigma \rightarrow \sigma^*$ é extremamente elevada, correspondendo a frequências na região do ultravioleta de vácuo, não sendo observada na região ultravioleta.
- Transições $n \rightarrow \sigma^*$: Compostos saturados contendo átomos com pares de eletrões não ligantes são capazes de sofrer transições $n \rightarrow \sigma^*$. Em geral, estas transições requerem menos energia que as do tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$ e podem ser produzidas por radiação na região entre 150 e 250 nm, aparecendo a maior parte dos picos abaixo de 200 nm. Contudo, o número de grupos funcionais orgânicos que apresenta com picos $n \rightarrow \sigma^*$ na região ultravioleta é relativamente pequeno.
- Transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$: A maioria das aplicações da espectroscopia de absorção a compostos orgânicos baseia-se em transições de eletrões n ou π para o estado excitado π^* . As energias necessárias para estas transições situam-se numa região espectral experimental de comprimentos de onda entre os 200 e 700 nm. Os picos associados a transições $n \rightarrow \pi^*$ são geralmente deslocados para comprimentos de onda menores (deslocamento hipsocrómico ou deslocamento para o azul) com o aumento da polaridade do solvente. O efeito hipsocrómico é

devido à maior solvatação do par de eletrões na orbital não-ligante n , o que baixa a energia desta orbital. Normalmente, uma tendência oposta (deslocamento batocrómico ou deslocamento para o vermelho) é observada para transições $\pi \rightarrow \pi^*$.

A intensidade da banda de absorção encontra-se relacionada com a probabilidade de ocorrência de uma determinada transição. Quanto maior a probabilidade da transição, mais intensa é a banda, o que revela uma transição permitida. Se a transição for proibida, a probabilidade de ocorrência é baixa e a banda correspondente será pouco intensa [4]. A ocorrência de uma determinada transição eletrónica depende de vários fatores como o spin eletrónico, a simetria orbital, a paridade e o momento.

2.2.2. Lei de Lambert-Beer

A intensidade de um feixe de radiação eletromagnética é diminuída quando esta atravessa um meio que contém uma espécie absorvente. À temperatura ambiente, a maioria das moléculas estão no estado de menor energia vibracional do nível mais baixo de energia eletrónica, o estado fundamental (E_0), onde a absorção de radiação UV ou luz visível leva a promoção dos eletrões de E_0 para o nível eletrónico excitado, E_1 .

A lei de Lambert-Beer baseia-se no facto da quantidade de luz absorvida por uma amostra ser proporcional ao número de moléculas presentes nessa amostra capazes de absorver a luz. Na figura 2.5 é ilustrado o princípio da absorção de radiação.

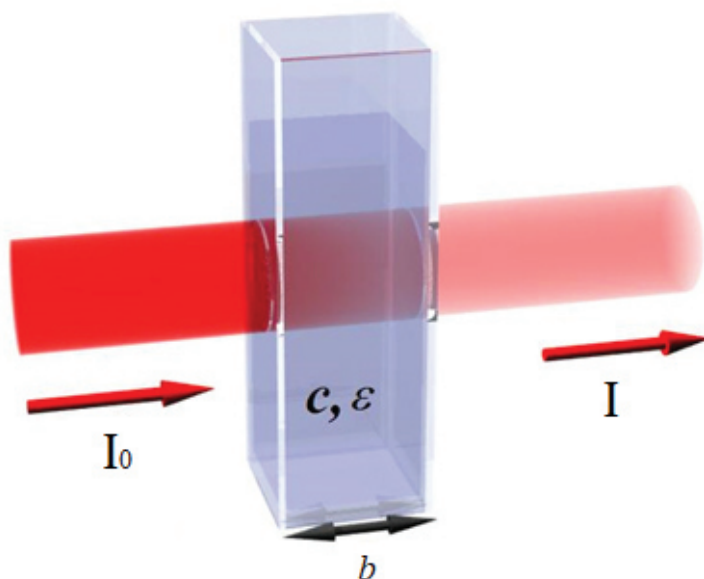


Figura 2.5 - Esquema representativo da diminuição da intensidade de uma radiação monocromática, após atravessar uma cuvette de comprimento b , que contém uma solução de concentração c , com um coeficiente de absorção molar ϵ .

A Lei de Lambert-Beer tem por base a quantificação da luz absorvida por uma solução, que pode ser expressa pela transmitância ou pela absorvância, sendo esta proporcional ao número de moléculas capazes de absorver a luz incidente. Quando um feixe de luz intercepa uma amostra, a quantidade de luz absorvida é dada pela diferença entre a intensidade do feixe incidente (I_0) e a intensidade do feixe transmitido (I). Tendo em conta apenas os processos de absorção, a intensidade do feixe transmitido relaciona-se com a do feixe incidente pela equação 2.3,

$$I = I_0 10^{-\varepsilon(\lambda)cb} \quad \text{Equação 2.3}$$

onde c é a concentração da espécie absorvente (mol cm^{-3}), ε o coeficiente de absorção molar ($\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$) ao comprimento de onda λ , e b o percurso ótico da radiação no meio (cm). A transmitância, T , é dada por:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{Equação 2.4}$$

Para um dado comprimento de onda e uma única espécie absorvente, a absorvância (A) é uma função linear da sua concentração, dada pela equação 2.5.

$$A = -\log_{10} T \quad \text{Equação 2.5}$$

Relacionando as equações apresentadas, conseguimos obter a equação 2.6 que traduz a Lei de Lambert-Beer para um único comprimento de onda e uma única espécie absorvente:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda bc \quad \text{Equação 2.6}$$

que representa a capacidade que uma espécie possui de absorver a radiação para um determinado comprimento de onda.

Para a utilização correta da lei de Lambert-Beer é necessário que alguns pré-requisitos sejam cumpridos, entre os quais:

- As partículas presentes na solução devem absorver a luz de forma independente entre si;
- A solução deve ser homogénea e não dispersar a radiação;
- A radiação incidente deve estar colimada (raios paralelos entre si) e deve atravessar a mesma distância durante a qual interage com as partículas existentes em solução;

- A radiação deve ser monocromática, isto é, ser composta por apenas um comprimento de onda;

Normalmente, a lei tende a não ser válida para concentrações elevadas, pois alguns processos como, por exemplo, a difusão da luz, são cada vez mais significativos. Assim, para concentrações superiores a 0,01M, verificam-se desvios à linearidade entre a absorvância e a concentração, pois o coeficiente de absorção molar deixa de ser constante, devido a interações entre as nuvens eletrônicas das moléculas em solução.

2.2.3. Funcionamento de um Espectrofotômetro

Um espectrofotômetro é um instrumento utilizado para a medição da absorvância e transmitância de uma amostra, em função do comprimento de onda da radiação eletromagnética. Existem espectrofotômetros básicos que medem a absorvância a um comprimento de onda específico, definido pelo utilizador, e outros, que podem analisar toda a gama de UV-visível. Os espectrofotômetros permitem produzir um feixe de luz monocromática e posteriormente medir a quantidade dessa luz que é absorvida pela amostra em estudo. A configuração destes aparelhos permite medir a transmitância (T), que se traduz na absorvância através da equação 2.5.

Os espectrofotômetros de feixe simples medem a absorção da referência em primeiro lugar e, de seguida, a amostra, usando um único feixe [5]. No espectrofotômetro de feixe duplo, a luz é dividida em dois feixes paralelos, cada um dos quais atravessa uma célula; uma célula contém a amostra dissolvida em solvente e a outra célula contém apenas o solvente. Assim, esta medida é feita de forma indireta, onde o detetor mede a intensidade da luz transmitida através do solvente (I_0) e compara-a com a intensidade da luz transmitida através da célula da amostra (I). O espectrofotômetro de feixe duplo é constituído essencialmente por uma fonte de radiação, um monocromador, dois porta-células (um para a amostra a analisar e outro para a referência), e um detetor (onde a luz é convertida num sinal elétrico pelo fotomultiplicador) para medir a quantidade de luz que passa através das células (cuvettes). As intensidades são seguidamente reconhecidas e convertidas num gráfico de absorvância em função do comprimento de onda [2].

2.3. Espectroscopia de Fluorescência

A emissão de fótons devida aos processos de desexcitação é chamada fotoluminescência. O modo de excitação é a absorção de um fóton, que coloca as espécies que absorvem a luz em estados eletrônicos excitados. A fluorescência e a fosforescência são casos particulares de fotoluminescência. Na fosforescência, a luz persiste depois de cessar a excitação pois a emissão de luz ocorre a partir de estados tripleto excitado, ou seja, transições proibidas. A fluorescência distingue-se da fosforescência pelo facto de a molécula excitada voltar ao estado fundamental imediatamente após a excitação. A emissão de fluorescência ocorre sempre a partir do nível vibracional mais baixo do estado eletrónico excitado, normalmente do estado excitado singleto, em que os spins opostos dos eletrões são conservados, para o estado fundamental, sendo esta uma transição permitida. O tempo médio que a molécula permanece no estado excitado é da ordem dos 10^{-9} s (tempo de vida do estado excitado) [6].

2.3.1. Diagrama de Jablonski

Os processos que ocorrem entre a absorção e a emissão luz são ilustrados pelo Diagrama de Jablonski. Este diagrama ilustra os vários processos moleculares que ocorrem entre estados excitados e o estado fundamental. É uma ferramenta essencial para a descrição de processos quânticos envolvidos na absorção e na emissão de luz, tais como absorção de fóton, conversão interna, cruzamento intersistemas, fosforescência, transições tripleto-tripletto e fluorescência. Os estados eletrónicos singleto fundamental, primeiro e segundo são representados por S_0 , S_1 e S_2 , respetivamente. Em cada um desses níveis eletrónicos pode existir um conjunto de níveis energéticos vibracionais denotados por 0, 1, 2, (...). As transições entre estados são descritas com linhas verticais para ilustrar a natureza instantânea da absorção da luz e ocorrem num intervalo de tempo da ordem dos 10^{-15} s. Após a absorção da luz, um fluoróforo é excitado para um nível vibracional de um estado excitado singleto (por exemplo: S_1 ou S_2).

Depois de absorverem fótons, as moléculas excitadas têm de perder o excesso de energia eletrónica para voltarem ao estado fundamental. A perda do excesso de energia pode ser feita por processos radiativos, em que o excesso de energia é perdido através da emissão de fótons, e processos não radiativos, em que não ocorre emissão de luz. Os processos não radiativos, como relaxação vibracional, conversão interna e cruzamento intersistemas, são processos em que o excesso de energia é perdido por exemplo com colisões entre as moléculas excitadas com as moléculas de solvente. Os processos de fluorescência e fosforescência são processos radiativos. Normalmente, a emissão de

radiação eletromagnética ocorre na região visível do espectro eletromagnético, contudo, pode também ocorrer na região do ultravioleta e ainda do infravermelho.

Conforme se pode observar na figura 2.6, o estado tripleto (T_1) possui uma energia mais baixa do que o estado singlete (S_1). A figura ilustra também os processos radiativos (aqueles que envolvem emissão de fótons) e não radiativos (aqueles em que a energia dos estados excitados é degradada sob a forma de calor mediante colisões entre as moléculas ou através de redistribuições eletrônicas que originam uma conversão interna).

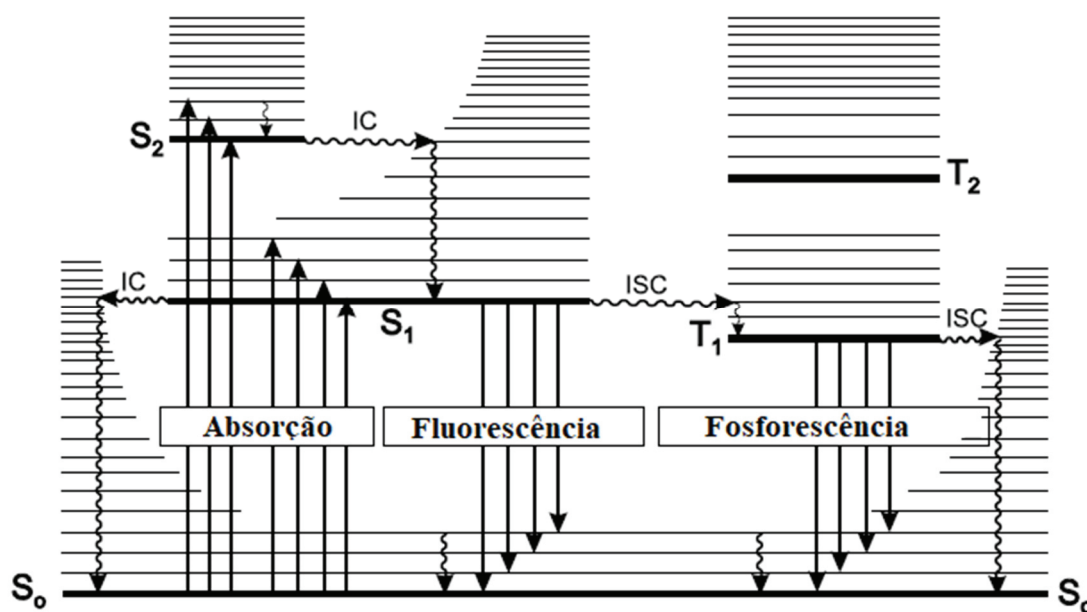


Figura 2.6 - Representação esquemática do diagrama de Jablonski, ilustrando os vários processos radiativos e não radiativos envolvidos na excitação e desexcitação eletrônica. Adaptado de [7]

2.3.2. Processos moleculares radiativos e não radiativos

Como referido anteriormente, os processos intramoleculares de desexcitação podem ser radiativos ou não radiativos. Nos processos não radiativos a perda de energia não é devida à emissão de radiação, mas sim à conversão interna (IC), cruzamento intersistemas (ISC) e relaxação (ou relaxamento) vibracional (VR).

Uma molécula pode ser conduzida a vários níveis vibracionais, durante o processo de excitação eletrônica. No entanto, a energia vibracional em excesso é perdida imediatamente como consequência de colisões entre as moléculas da espécie excitada e as do solvente. O resultado é uma transferência de energia para o solvente e um aumento da sua temperatura. Este processo de relaxação vibracional é tão

eficiente que o tempo de vida médio de uma molécula excitada vibracionalmente é de 10^{-12} segundos ou menos.

Na conversão interna, ocorre a transferência de um estado eletrónico para outro estado eletrónico da mesma multiplicidade, num processo isoenergético. A velocidade da conversão interna entre estados singletos excitados é muito alta. Consequentemente, os tempos de vida dos estados excitados mais elevados são extremamente curtos (10^{-11} a 10^{-13} s).

Se o processo é de cruzamento intersistemas, dá-se uma transição para estados eletrónicos de diferente multiplicidade. O processo de conversão intersistemas mais importante é $S_1 \rightarrow T_1$. Normalmente, a transição ocorre para um nível vibracional de T_1 em que a molécula tem a mesma geometria de S_1 . Como envolve uma transição proibida por inversão do spin, a transição é lenta (10^{-2} a 10^{-8} s). Quanto maior for a energia de separação entre os níveis vibracionais mais baixos dos estados envolvidos na transição, mais lenta é a taxa de decaimento dos processos de conversão interna e de conversão intersistemas. De facto, uma grande energia de separação entre os níveis vibracionais mais baixos dos estados S_1 e S_0 e dos estados T_1 e S_0 contribui para uma menor eficiência dos processos de conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$ e conversão intersistemas $T_1 \rightarrow S_0$. As escalas de tempo em que estes processos ocorrem são 10^{-7} a 10^{-9} segundos para a conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$, e cerca de 10^{-3} segundos para o decaimento do estado tripleto $T_1 \rightarrow S_0$.

Nos processos radiativos, a perda de energia é devida à emissão de fotões. Existem dois tipos de fotoluminescência:

- Fluorescência - quando a transição radiativa é permitida e ocorre entre dois estados da mesma multiplicidade (em geral, $S_1 \rightarrow S_0$).
- Fosforescência - quando a transição é proibida, pois ocorre entre estados de diferente multiplicidade ($T_1 \rightarrow S_0$), sendo necessário haver uma inversão de spin.

A figura 2.7 esquematiza a relação entre os processos de absorção, fluorescência e fosforescência para uma molécula.

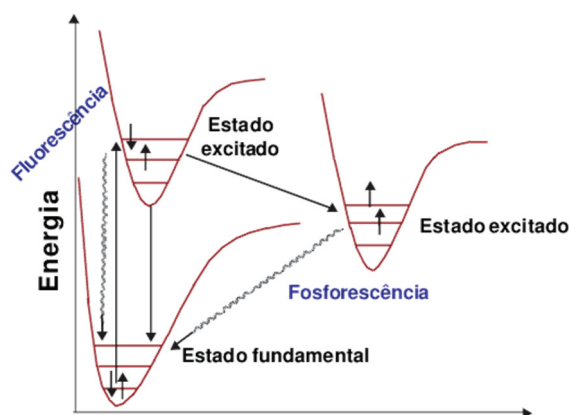


Figura 2.7 - Esquema representativo do mecanismo de fluorescência e fosforescência [8].

A fluorescência ocorre sempre do primeiro estado excitado singlete para o estado fundamental, mesmo que durante a absorção, a molécula seja excitada para níveis eletrônicos mais elevados do que o primeiro. Isto verifica-se devido à eficiência do processo de conversão interna, onde o excesso de energia vibracional é facilmente perdido pelas colisões moleculares até ao equilíbrio térmico, que é rapidamente atingido em solução. Como consequência da eficiência deste processo, a banda de fluorescência para uma dada transição eletrônica encontra-se deslocada para menores valores de frequência (maiores valores de comprimentos de onda) relativamente à banda de absorção. A esta diferença dá-se o nome de desvio de Stokes (figura 2.8). Assim, a fluorescência resulta de uma transição radiativa entre o nível vibracional mais baixo do primeiro estado eletrônico excitado para os vários níveis vibracionais do estado fundamental.

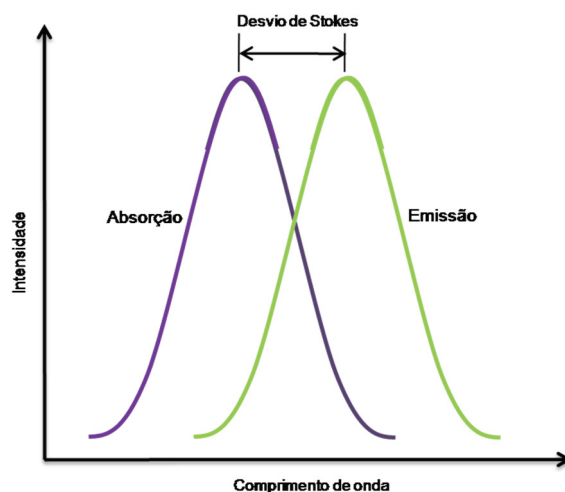


Figura 2.8 - Esquema representativo do posicionamento das bandas de absorção e emissão do processo de fluorescência, mostrando o desvio de Stokes.

Por outro lado, a fosforescência resulta da transição radiativa a partir do nível vibracional mais baixo de T_1 para os vários níveis vibracionais de S_0 . Como a energia do estado eletrônico tripleto T_1 é

mais baixa do que a do estado excitado singleto S_1 o espectro de fosforescência é de fraca intensidade, ao contrário da fluorescência que corresponde a transições permitidas entre estados com a mesma multiplicidade.

2.3.3. Rendimento quântico de fluorescência

A eficiência do processo de emissão radiativa é medida pelo rendimento quântico de fluorescência, Φ_F , dada pela fração de moléculas excitadas que fluorescem, de acordo à equação:

$$\Phi_F = \frac{N^\circ \text{ de fotões emitidos}}{N^\circ \text{ de fotões absorvidos}} \quad \text{Equação 2.7}$$

O rendimento quântico de fluorescência é independente da intensidade da luz de excitação e constante para uma dada temperatura na ausência de processos intermoleculares. Na ausência de inibidores de fluorescência ("quenchers"), o rendimento quântico de fluorescência é dado por:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \quad \text{Equação 2.8}$$

em que k_F é a constante de velocidade do processo de fluorescência, k_{IC} a constante de velocidade do processo de conversão interna e k_{ISC} a constante de velocidade do processo de conversão intersistemas.

2.3.4. Anisotropia de fluorescência

A anisotropia de fluorescência mede a difusão rotacional de uma molécula a partir da diferença na correlação de polarização em fluorescência, ou seja, entre os fotões absorvidos e os fotões emitidos. Esta correlação permite medir o "tempo de rotação" de uma molécula no seu conjunto, ou de uma parte da molécula em relação ao todo. A anisotropia (r) está assim relacionada com o tempo de vida do estado excitado e pode ser obtida pela equação [7],

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c} \right) \quad \text{Equação 2.9}$$

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

Fazendo incidir luz polarizada numa amostra existe absorção preferencial de fótons cujos vetores elétricos estão alinhados paralelamente ao momento de transição do fluoróforo, isto é, orientados com a luz de excitação (fotoseleção). Se entre a absorção e emissão de radiação, as moléculas se moverem para fora do plano de polarização da radiação incidente, a emissão de radiação vai perder polarização. Assim, experimentalmente, a anisotropia de fluorescência em estado estacionário, r , é calculada por:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad \text{Equação 2.10}$$

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

As medidas de anisotropia de fluorescência fornecem informações sobre o tamanho e forma de proteínas e a rigidez de diferentes ambientes moleculares, permitindo medir também a fluidez das membranas.

2.3.5. Transferência de energia de ressonância (FRET)

A técnica de FRET (do inglês, *Förster Resonance Energy Transfer*), é um processo físico de transferência de energia não radiativa que permite estudar interações moleculares entre dois fluoróforos que estejam suficientemente perto (distâncias entre os 10 e os 100 Å) [9]. Esta transferência ocorre por ressonância entre os eletrões do estado eletrónico excitado da molécula doadora fluorescente e os eletrões da molécula aceitadora, através de interações dipolo-dipolo, sem que ocorra transferência de eletrões. Este processo só pode ocorrer se existir uma sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência do doador e o espectro de absorção do aceitador (figura 2.9), de forma que ocorram algumas transições vibrónicas do doador com aproximadamente a mesma energia das do aceitador.

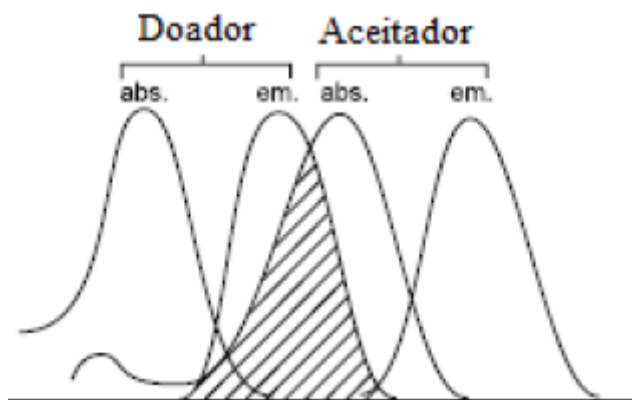


Figura 2.9 - Representação da sobreposição espectral entre o espectro de emissão do doador e absorção do aceitador. Adaptado de [10].

A teoria de Förster mostra que a eficiência de FRET (E_{FRET}) varia de acordo com a seguinte equação:

$$E_{FRET} = 1/[1 + (r/R_0)^6] \quad \text{Equação 2.11}$$

no qual r é a distância entre o doador e o aceitador e R_0 (raio de Förster) é a distância característica onde a eficiência de FRET é de 50%, e que pode ser calculada para qualquer par de moléculas fluorescentes. O raio de Förster é calculado por [11]:

$$R_0 = 0,2108 \cdot [k^2 \cdot \Phi_d^0 \cdot n^{-4} J(\lambda)]^{1/6} \quad \text{Equação 2.12}$$

onde λ é o comprimento de onda (nm), $J(\lambda)$ é a integral da sobreposição espectral entre a emissão do doador e a absorção do aceitador, $k^2 = 2/3$ é o fator orientacional assumindo uma orientação aleatória das moléculas, Φ_d^0 é o rendimento quântico de fluorescência do doador na ausência de transferência de energia e n é o índice de refração do meio. A sobreposição espectral entre a emissão do doador e a absorção do aceitador é obtida por [11]:

$$J(\lambda) = \int_0^\infty I_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad \text{Equação 2.13}$$

onde $I_D(\lambda)$ é o espectro de fluorescência do doador normalizado de forma que $\int_0^\infty I_D(\lambda) = 1$ e $\epsilon_A(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar do aceitador.

Os outros parâmetros que podem afetar a eficiência de FRET são, assim, o rendimento quântico do doador e o coeficiente de absorção molar do aceitador.

2.3.6. Funcionamento de um Espectrofluorímetro

O espectrofluorímetro é o equipamento usado para medir a intensidade de fluorescência. É constituído por uma fonte de radiação contínua com excitação no ultravioleta e visível (lâmpada de xénon, tungsténio ou mercúrio). Em geral, possuem ótica de feixe duplo, de forma a compensar as flutuações da intensidade da fonte de radiação. No que diz respeito à sua geometria, a radiação passa primeiro por um monocromador (monocromador de excitação) que incide na amostra, excitando as moléculas da espécie em estudo. De seguida, a radiação emitida pela amostra passa por um segundo monocromador (monocromador de emissão) e, por fim, no fotomultiplicador onde é amplificada e registada. A presença de polarizadores no aparelho permite selecionar o plano de polarização da luz [6].

O uso de dois monocromadores permite obter dois tipos de espectros, espectros de emissão e espectros de excitação. Nos espectros de emissão de fluorescência o comprimento de onda de excitação é mantido contante. Geralmente, é selecionado o comprimento de onda onde a absorção de luz pelo fluoróforo é máxima. O espectro obtido corresponde a uma distribuição espectral da emissão do composto num intervalo de comprimentos de comprimento de onda. Nos espectros de excitação, o comprimento de onda da fonte de excitação varia, enquanto a deteção da luz emitida é feita a um comprimento de onda específico. Daí, obtém-se informação acerca da variação da intensidade de fluorescência num determinado comprimento de onda, dependente do comprimento de onda de excitação. A deteção da emissão de fluorescência é realizada num ângulo de 90° , de forma a reduzir ao máximo a intensidade de radiação transmitida no detetor, registando somente a radiação de fluorescência da amostra.

2.4. SQUID

O SQUID (do inglês, *superconducting quantum interference device*), é um dispositivo bastante sensível utilizado para medir sinais magnéticos extremamente fracos (permite detetar campos magnéticos bastante baixos, na ordem de 10^{-15} T). É composto por materiais supercondutores que permitem analisar as propriedades magnéticas de uma amostra. Os SQUIDs são sensores versáteis capazes de medir qualquer quantidade física que possa ser convertida em fluxo magnético, como campo magnético, gradiente de campo magnético, suscetibilidade magnética, corrente, voltagem ou deslocamento mecânico.

O seu funcionamento combina dois fenómenos físicos: a quantização de fluxo num anel supercondutor e o efeito de Josephson. O efeito de Josephson manifesta-se por uma corrente que flui, indefinidamente por muito tempo sem nenhuma tensão aplicada, através de um dispositivo conhecido como Junção de Josephson. A junção consiste em dois supercondutores acoplados por um elo fraco que pode ser uma barreira isolante fina ou uma secção curta de metal não supercondutor que enfraquece a supercondutividade no ponto de contacto. Este equipamento é formado por um anel supercondutor interrompido por uma ou duas junções Josephson. Fazendo uso das junções de Josephson, é possível detetar pequenas variações de energia. De acordo com o número de junções existentes, é possível distinguir dois tipos de equipamentos SQUID. Num equipamento de radiofrequência, uma junção de Josephson está montada num anel supercondutor em que uma corrente oscilante é aplicada a um circuito externo cuja tensão muda como efeito da interação entre ela e o anel. Outro equipamento mais sensível, de corrente contínua, é composto por duas junções de Josephson em paralelo, de modo que os eletrões que passam através das junções demonstram interferência quântica que depende da força do campo magnético dentro de um *loop*. Os SQUIDs de corrente contínua medem variações muito pequenas de campo magnético, o que lhes confere a capacidade de detetar alterações mínimas.

2.5. Difração de raios-X (XRD)

A difração de raios-X (XRD) é uma técnica não destrutiva utilizada para caracterizar materiais cristalinos. Esta técnica fornece informações sobre a estrutura, fase cristalina e orientação preferencial dos cristais entre outros parâmetros tais como tamanho médio de grão e deformações no material. Baseia-se na interferência construtiva de raios-X incidentes sobre uma determinada estrutura cristalina. A regularidade com que os átomos estão distribuídos na rede cristalina produz raios difratados que se cancelam mutuamente, mas, em certas direções pode ocorrer uma interferência construtiva se as condições satisfizerem a lei de Bragg, de acordo à equação:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{Equação 2.15}$$

onde n é um número inteiro, λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d é a distância entre planos atômicos e θ é o ângulo de incidência em relação ao plano considerado [12].

Esta lei relaciona o comprimento de onda da radiação eletromagnética com o ângulo de difração e o espaçamento da rede na amostra cristalina. A direção das difrações possíveis depende do tamanho

e forma da célula unitária do material, já a sua intensidade depende do tipo de arranjo entre os átomos na estrutura cristalina. Os raios-X são filtrados de modo a produzir radiação monocromática e são direcionados à amostra variando o ângulo de incidência de modo a que todas as direções da rede sejam alcançadas. Quando a geometria dos raios-X incidentes satisfazem a lei de Bragg, ocorre interferência construtiva evidenciada por um pico de intensidade. Os raios-X difratados são detetados e processados. A conversão dos picos de difração em espaçamento (d) permite a identificação de uma amostra, por comparação a um padrão de referência, uma vez que esses espaçamentos são característicos.

Assim, esta técnica tem como objetivo obter informação sobre a estrutura cristalina dos materiais, permitindo a sua caracterização e identificação, tendo por base um padrão de difração apresentado.

2.6. Difusão Dinâmica de Luz (DLS)

A difusão dinâmica de luz, DLS (do inglês, *Dynamic Light Scattering*), é uma técnica utilizada para a determinação do tamanho e forma de partículas. Esta técnica baseia-se no princípio de que as partículas apresentam movimento browniano, ou seja, movimentos aleatórios por estarem sujeitas a forças aleatórias resultantes da colisão com moléculas de solvente, de tal forma que as mais pequenas se movem mais rápido e as maiores mais lentamente. Como o movimento depende da temperatura, viscosidade e do tamanho, é necessário assegurar condições estáveis, para que a viscosidade se mantenha constante e, assim, não se obtenha resultados ambíguos [13]. O DLS é um dos métodos que pode ser utilizado para determinar o tamanho das nanopartículas e de nanossistemas, possuindo uma sensibilidade de 1 nm a 10 μ m.

Fazendo incidir um feixe de luz monocromático, como um laser, numa solução de partículas, a intensidade da luz difundida muda, sendo assim possível medir as variações consequentes do movimento das partículas no tempo (figura 2.10). A análise dessas flutuações de intensidade permite a determinação da distribuição dos coeficientes de difusão dos sistemas, que são convertidos em distribuição de tamanho.

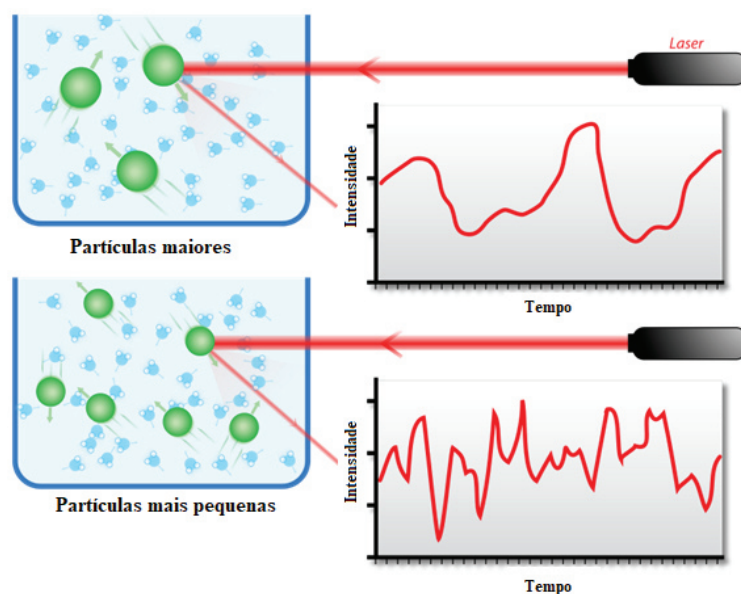


Figura 2.10 - Ilustração da difusão dinâmica de luz em duas amostras com tamanhos diferentes.

Quanto maior o tamanho da partícula, menor o movimento browniano e maior difusão de luz, pois a correlação obtida entre a intensidade de luz espalhada diminui com o passar do tempo devido ao movimento das partículas. Este movimento permite determinar o coeficiente de difusão translacional (D_τ) com a ajuda da função de autocorrelação da intensidade de luz difundida ao longo do tempo com uso de algoritmos. Posteriormente, é aplicada a equação de Stokes-Einstein (equação 2.14) que calcula o diâmetro hidrodinâmico das partículas (R_h) [11]:

$$D_\tau = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_h} \quad \text{Equação 2.14}$$

onde K_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura e η a viscosidade do solvente. Uma dificuldade inerente a esta técnica é a formação de agregados de nanopartículas, já que o valor médio de R_h depende fortemente da intensidade de luz difundida pelas partículas.

A técnica de DLS, na modalidade de medida da mobilidade eletroforética, permite também determinar outro parâmetro, o potencial zeta. Este parâmetro mede a carga superficial de nanopartículas em suspensão, revela detalhes sobre a sua estabilidade na solução/suspensão e pode ajudar a confirmar o revestimento das nanopartículas. Quanto maior o valor deste potencial, maiores as repulsões eletrostáticas e menor o grau de agregação das partículas. Se o valor se aproxima de zero, existe probabilidade de formação de agregados [14].

Um sistema de DLS convencional é constituído por sete componentes: um laser, um atenuador, uma célula que contém a amostra, dois detetores, um correlador e um software que devolve a informação medida e permite o seu tratamento.

2.7. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

A microscopia eletrónica de varrimento, SEM (do inglês, *scanning eletron microscopy*), é uma técnica que permite a análise da superfície de amostras condutoras, semicondutoras e não condutoras. Possui elevada resolução, na ordem de 2 a 5 nm. A preparação das amostras para SEM tem de ser cuidada. As amostras de metal não precisam de nenhuma preparação especial; contudo, as restantes precisam de ser cobertas por um material condutor. Por outro lado, amostras biológicas necessitam de ser desidratadas, de forma a preservar a sua estrutura.

Os componentes básicos de um microscópio de SEM são o sistema de lentes, canhão de elétrons, coletor de elétrons, tubos de raios catódicos visuais e de gravação, e ainda toda a parte eletrónica que lhes está associada [15]. No SEM, os feixes de elétrons produzidos passam por uma série de bobinas e de lentes objetivas que defletem vertical e horizontalmente de forma a fazer um varrimento da superfície da amostra. Utiliza um feixe de elétrons para examinar a amostra através da quantificação dos elétrons secundários (elétrons de baixa energia) emitidos por uma amostra em resposta a uma excitação eletrónica incidente [16]. Os elétrons são gerados a partir de um filamento de tungsténio, dentro de uma coluna de alto vácuo, e posteriormente são acelerados por uma diferença de potencial entre um cátodo e um ânodo. O feixe gerado passa por lentes condensadoras que reduzem o seu diâmetro e por uma lente objetiva, que o foca na amostra que é varrida. Este feixe interage com a região de incidência da amostra, conhecida por volume de interação, que gera os sinais que são detetados e utilizados para a formação da imagem. Neste tipo de equipamento, os elétrons têm uma baixa capacidade de penetração da amostra, sendo indicado para estudos de superfície.

2.8. Referências do Capítulo 2

1. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Princípios de Análise Instrumental. 6ª Edição. Bookman; 2009.
2. Rätty JA, Peiponen K-E, Toshimitsu A. UV-Visible Reflection Spectroscopy of Liquids. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2004.
3. Wells CH. Introduction to Molecular Photochemistry. Chapman and Hall Ltd., 1972

4. Straughan BP, Walker SD. Spectroscopy. Volume 3. Chapman and Hall, 1976.
5. Anderson RJ, Bendell DJ, Groundwater PW. Organic Spectroscopic Analysis. Abel EW, editor. Royal Society of Chemistry; 2004.
6. Albani JR. Fluorescence Spectroscopy Principles. Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy. Wiley; 2007. 88–114.
7. Valeur B. Molecular Fluorescence. Methods. Wiley VCH Weinheim; 2001.
8. Silva GS, Braibante MEF, Braibante HTS, Pazinato MS, Trevisan MC. Oficina temática: uma proposta metodológica para o ensino do modelo atômico de Bohr. *Ciência & Educação (Bauru)*. 2014 Apr;20(2):481–95.
9. Piston DW, Kremers G-J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem Sci*. 2007 Sep;32(9):407–14.
10. Valeur B, Berberan-Santos MN. Molecular fluorescence: Principles and applications. 2th Edition. Wiley VCH Weinheim; 2013.
11. Medintz I, Hildebrandt N. FRET – Förster Resonance Energy Transfer. Wiley VCH Weinheim; 2013.
12. Elton LRB, Jackson DF. X-Ray Diffraction and the Bragg Law. *American Journal of Physics*. 1966 Nov;34(11):1036–8.
13. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev*. 2016 Dec 6;8(4):409–27.
14. Nobbmann U, Connah M, Fish B, Varley P, Gee C, Mulot S, et al. Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2007 Jan;24(1):117–28.
15. Cowden RR, Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DE, Fioie C, et al. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. *Transactions of the American Microscopical Society*. 1983 Jan;102(1):59.
16. Dedavid BA, Gomes CI, Machado G. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA- Aplicações e preparação de amostras-Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores. *Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)*. 2007.

3. Capítulo 3 – Procedimento Experimental

Todas as soluções foram preparadas em solventes de grau espectroscópico e água ultrapura (grau Milli-Q), para evitar contaminações nas amostras, devido à elevada sensibilidade da técnica de emissão de fluorescência.

As medidas de espectroscopia de absorção e fluorescência foram realizadas nos Laboratórios de Fotofísica I e II do Centro de Física da Universidade do Minho. Os espectros de absorção foram medidos num espectrofotómetro UV-Vis-NIR Shimadzu, modelo UV-3101PC. Os espectros de emissão de fluorescência foram determinados num espectralfluorímetro Fluorolog 3, com monocromadores duplos na excitação e emissão, porta-amostras com controlo de temperatura e polarizadores Glan-Thompson.

As medidas de SQUID foram realizadas num magnetómetro Quantum Design MPMS5XL, no IFIMUP (Universidade do Porto), e posteriormente analisadas no software Origin.

As medidas de DLS foram realizadas no Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, num equipamento Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS. A análise das amostras neste equipamento foi feita em células de polistireno com um percurso ótico de 10 mm. As imagens de SEM foram realizadas no Laboratório de Serviços de Caracterização de Materiais da Universidade do Minho (SEMAT/UM) num Microscópio Eletrónico de Varrimento NanoSEM FEI Nova 2000 (FEG/SEM).

3.1. Propriedades fotofísicas dos compostos antitumorais

Os compostos antitumorais derivados de tienopiridina são de grande interesse, uma vez que o seu esqueleto apresenta atividade simultaneamente antitumoral e antiangiogénica, atividades promissoras no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para doenças como o cancro [1]. Os novos compostos em estudo foram sintetizados e caracterizados (estrutura e massa molar) no Centro de Química da Universidade do Minho. A sua estrutura encontra-se representada na figura 1.1 e as fórmulas moleculares e massas molares, na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Fórmula molecular e massa molar dos compostos **A** e **B** em estudo.

	Fórmula molecular	Massa molar (M)
Composto A	C ₁₈ H ₁₃ NO ₂ S	307,37
Composto B	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	294,33

Foram preparadas soluções mãe dos compostos em etanol, para cada um dos compostos, numa concentração final de, aproximadamente, 10⁻⁴ M.

As propriedades fotofísicas da absorção UV-visível e fluorescência dos compostos antitumorais foram estudadas em vários solventes com diferentes polaridades. Para este estudo, foram preparadas soluções de composto A e B de concentração final 10⁻⁶ M, a partir das respectivas soluções mãe, nos diferentes solventes.

Os solventes utilizados para estes ensaios estão listados na tabela 3.2. Cada solvente tem um comprimento de onda característico abaixo do qual passa a absorver luz (do inglês, *cut-off*). Neste estudo, foi tido em conta o *cut-off* de cada solvente, para garantir que se observa a zona de absorção dos compostos sem interferência da absorção de luz por parte do solvente.

Tabela 3.2 - Massa molar, constante dielétrica, cut-off e índice de refração dos solventes utilizados no estudo fotofísico dos compostos **A** e **B** [2].

Solvente	Massa molar (M)	Constante dielétrica	Cut-off (nm)	Índice de refração
Etanol	46,07	24,50	207	1,36
Clorofórmio	119,38	4,81	245	1,43
Acetonitrilo	41,05	37,50	190	1,34
Acetato de etilo	88,11	6,02	256	1,38

Todas as soluções foram desarejadas por uma corrente de azoto ultrapuro comprimido, durante um período de cerca de vinte minutos antes das medições. Desta forma, evita-se o fenómeno de inibição de fluorescência (em inglês, *quenching*) por parte do oxigénio livre nas soluções.

O rendimento quântico de fluorescência dos compostos foi determinado pelo método do padrão (equação 3.1). Neste método, o rendimento quântico dos compostos **A** e **B** é obtido por comparação da sua área espectral integrada com a de uma referência (padrão) de rendimento quântico conhecido, através da equação seguinte:

$$\Phi = \left(\frac{A_p F n^2}{A F_p n_p^2} \right) \Phi_p \quad \text{Equação 3.1}$$

em que A e A_p são, respectivamente, o valor de absorvância da amostra e do padrão no comprimento de onda de excitação; F e F_p , são respectivamente a área sob a curva de emissão da amostra e do padrão; e n e n_p são, respectivamente, o índice de refração do solvente e do padrão. Como padrão, foi utilizada uma solução de sulfato de quinino em ácido sulfúrico 0,05 M, de concentração 1 ppm (partes por milhão), cujo rendimento quântico de fluorescência é $\Phi_p = 0,546$ a 25 °C [3].

3.2. Preparação de nanopartículas magnéticas

3.2.1. Método de coprecipitação

Foram preparadas nanopartículas de ferrite mista de manganês e magnésio e ferrite mista de manganês e cálcio, pelo método de coprecipitação na proporção de Mn/Mg e Mn/Ca de 0,5:0,5. A síntese de nanopartículas por este método baseia-se na redução dos precursores metálicos em solução por um agente redutor e permite um elevado rendimento a um baixo custo.

3.2.1.1. Ferrite mista de manganês e magnésio

As nanopartículas de ferrite mista de manganês e magnésio foram preparadas de duas formas distintas, no que diz respeito ao precursor metálico de magnésio. Em primeiro lugar, foi preparada, e aquecida em banho-maria sob agitação magnética, uma solução de NaOH com concentração 2,32 M. Quando atingida a temperatura de 90 °C, foi adicionada, gota a gota, uma solução contendo os três precursores metálicos. No método 1, foram usados os precursores metálicos cloreto de ferro (III) hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 270,30$ g/mol), cloreto de magnésio hexahidratado, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 203,327$ g/mol) e sulfato de manganês hidratado $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 169,02$ g/mol), com concentrações 1 M, 0,25 M e 0,25 M, respectivamente. No método 2, foram usados enquanto precursores metálicos, o cloreto de ferro (III) hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 270,30$ g/mol), sulfato de manganês monohidratado, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 169,02$ g/mol) e o sulfato de magnésio, MgSO_4

($M_w = 120,37 \text{ g/mol}$) com concentrações 1 M, 0,25 M e 0,25 M, respetivamente. Depois da adição dos precursores, a mistura foi mantida a 90°C durante duas horas, para o processo de formação de nanopartículas ocorrer.

Posteriormente, as nanopartículas obtidas foram lavadas com ácido clorídrico e etanol em vários ciclos de centrifugação, para purificação. Por fim, as nanopartículas resultantes do método 1 foram submetidas a calcinação com diferentes temperaturas, uma de 300°C por trinta minutos, e outra de 300°C por três horas. As nanopartículas resultantes do método 2 foram também submetidas a calcinação de 800°C por duas horas, 600°C por duas horas, 300°C por duas horas e 300°C por três horas.

3.2.1.2. Ferrite mista de manganês e cálcio

A síntese das ferrites mistas de manganês e cálcio foi semelhante ao descrito em 3.2.1.1. Primeiro, uma solução de NaOH com concentração 2,32 M foi preparada e aquecida em banho-maria, sob agitação magnética. Quando atingida a temperatura de 90°C , foi adicionada, gota a gota, uma solução aquosa contendo os precursores metálicos de ferro, manganês e cálcio. Para tal, foi usado cloreto de ferro (III) hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 270,30 \text{ g/mol}$), sulfato de manganês hidratado $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 169,02 \text{ g/mol}$) e acetato de cálcio hidratado $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 158,7 \text{ g/mol}$), com concentrações de 1 M, 0,25 M e 0,25 M, respetivamente. De seguida, a mistura foi mantida a 90°C e, após duas horas, as nanopartículas estavam formadas. Posteriormente, as nanopartículas foram purificadas com vários ciclos de lavagem com ácido clorídrico e etanol. Por fim, as nanopartículas resultantes foram submetidas a diferentes calcinações, a 600°C por duas horas e a 300°C por três horas.

3.2.2. Método de coprecipitação com adição de citrato

Para este método, procedeu-se de igual forma como foi descrito em 3.2.1.1. para as partículas de ferrite mista de magnésio e manganês e em 3.2.1.2. para as partículas de ferrite mista de manganês e cálcio. Este método difere do descrito em 3.2.1., uma vez que foi adicionado citrato na solução básica inicial, numa proporção de 1 mmol de citrato para 2 mmol do total de iões. O citrato tem um papel fundamental na velocidade da reação, resultando numa solução aquosa de nanopartículas uniformes e estáveis. Os iões citrato também se mostram importantes para uma adequada distribuição de tamanho das nanopartículas [4,5].

3.2.3. Método sol-gel

Foram preparadas nanopartículas de ferrites mistas de manganês e magnésio e de ferrites mistas de manganês e cálcio, pelo método sol-gel.

3.2.3.1. Ferrite mista de manganês e magnésio

As partículas mistas de ferrite de manganês e magnésio foram preparadas de duas formas distintas, usando diferentes precursores metálicos do íon magnésio. Assim, no primeiro método foram usados como precursores metálicos, o cloreto de ferro (III) hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 270,30 \text{ g/mol}$), cloreto de magnésio hexahidratado, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 203,327 \text{ g/mol}$), sulfato de manganês hidratado $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 169,02 \text{ g/mol}$), com concentrações de 0,1 M, 0,025 M, 0,025 M. Foi também usado ácido nítrico, HNO_3 ($M_w = 63,01 \text{ g/mol}$) e ácido cítrico, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ($M_w = 210,14 \text{ g/mol}$) com concentrações de 0,05 M e 0,15 M, respectivamente. Para o segundo método foi usado o cloreto de ferro (III) hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 270,30 \text{ g/mol}$), sulfato de manganês monohidratado, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($169,02 \text{ g/mol}$) e sulfato de magnésio, MgSO_4 ($M_w = 120,37 \text{ g/mol}$), enquanto precursores metálicos, nas mesmas concentrações do método 1. Usaram-se ácido nítrico, HNO_3 ($M_w = 63,01 \text{ g/mol}$) e ácido cítrico, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ($M_w = 210,14 \text{ g/mol}$), com concentrações de 0,05 M e 0,15 M, respectivamente. A solução, contendo a mistura dos precursores e ácidos, foi aquecida lentamente até 90 °C, sob agitação magnética, até se transformar num xerogel. Após a formação do xerogel, a temperatura foi aumentada até se obter um pó. Por fim, as nanopartículas foram submetidas a diferentes calcinações, a temperaturas de 300 °C e 600 °C por três horas.

3.2.3.2. Ferrite mista de manganês e cálcio

De forma semelhante ao descrito em 3.2.3.1., para a síntese das ferrites mistas de manganês e cálcio, pelo método sol-gel, foram usados como reagentes o cloreto de ferro (III) hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 270,30 \text{ g/mol}$), sulfato de manganês hidratado $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 169,02 \text{ g/mol}$) e acetato de cálcio hidratado $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M_w = 158,7 \text{ g/mol}$), com concentrações de 0,1 M, 0,025 M, 0,025 M, respectivamente. Foi usado também ácido nítrico, HNO_3 ($M_w = 63,01 \text{ g/mol}$) e ácido cítrico, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ($M_w = 210,14 \text{ g/mol}$) com concentrações de 0,05 M e 0,15 M, respectivamente. A solução contendo a mistura dos precursores e ácidos foi aquecida lentamente até 90 °C, sob agitação magnética, até se transformar num xerogel. Após a formação do xerogel, a temperatura foi aumentada até se obter

um pó. Por fim, as nanopartículas foram submetidas a diferentes calcinações, à temperatura de 300 °C e 600 °C, por três horas.

3.3. Caracterização estrutural por difração de raios-X

A composição e as fases cristalinas das nanopartículas obtidas foram avaliadas pela técnica de difração de raios-X (XRD, do inglês *X-ray diffraction*), com recurso a um difratômetro PAN'alytical X'Pert PRO, operando com radiação $\text{CuK}\alpha$ e configuração Bragg-Brentano, na Unidade de Microscopia Eletrônica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Os difratogramas das nanopartículas foram analisados no software *Match!*, que nos permite identificar as fases presentes na amostra, pela comparação entre o padrão de difração obtido com padrões de referência presentes na base de dados. Através da largura a meia altura dos picos, é possível avaliar o tamanho, através da equação de Scherrer:

$$d = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad \text{Equação 3.2}$$

onde d é o tamanho médio das partículas, K a constante da forma geométrica (normalmente assume valor de 0,9 para nanopartículas esféricas), λ é o comprimento de onda dos raios-X, β é a largura a meia altura de um pico e θ é o ângulo de Bragg (em graus).

3.4. Ensaio de sedimentação

Para os ensaios de sedimentação das nanopartículas, foram preparadas soluções de diferentes concentrações para várias nanopartículas sintetizadas, com concentrações de 0,2%, 0,1%, 0,05% e 0,025% (% m/v). A taxa de deposição das nanopartículas foi obtida através da medida da cinética de sedimentação, com determinação da absorvância de suspensões de nanopartículas em intervalos de 15 min, durante 3 horas.

O processo de sedimentação é descrito por uma cinética de primeira ordem e os resultados experimentais da dependência da taxa de sedimentação na concentração de nanopartículas foi obtida pelo ajuste à função de Becquerel, de acordo com a seguinte equação:

$$I(t) = \frac{1}{\left[1 + (1 - \beta) \frac{t}{\tau_0}\right]^{1/(1-\beta)}} \quad \text{Equação 3.3}$$

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

3.5. Quantificação do ferro nas nanopartículas

A quantificação de ferro nas nanopartículas foi baseada num protocolo desenvolvido por Torras *et al* [6]. Este procedimento permite a quantificação de ferro através da medição da concentração de complexos de cloreto de ferro (III) usando espectroscopia de absorção UV-visível.

Foram preparadas soluções de concentração de ferro entre 1,5 e 600 mg Fe/L, em ácido clorídrico 4,9 M. Os autores relataram um limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) de 0,18 e 1,2 mg Fe/L, respetivamente, e um ajuste linear $y = 0,0482 x + 0,0320$, para o comprimento de onda de 348 nm, associado à presença das espécies de ferro. A Tabela 3.3 mostra as condições para a preparação das soluções padrão (este ensaio envolveu três réplicas para cada amostra padrão).

Tabela 3.3 - Condições para a preparação de soluções padrão de cloreto de ferro (III) (as concentrações correspondem ao cloreto férrico heptahidratado).

[FeS]inicial	2,5				20				40				60	
[Fe]final	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	10	12	14	16	20	24	30
Fe (mL)	0,5	1	2	4	1	2	4	5	3	3,5	4	5	4	5
H ₂ O (mL)	5,4	4,9	3,9	1,9	4,9	3,9	1,9	0,9	2,9	2,4	1,9	0,9	1,9	0,9
HCl (mL)	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1
Volume total (mL)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

As amostras de concentração de ferro desconhecida foram preparadas a partir de diluições de 1 mg ou 2 mg de nanopartículas em 1,2 mL de HCl 37%, de forma a garantir a sua digestão. De seguida, foram redispersadas em 1,8 mL de solução de ácido clorídrico 4,9 M, para posterior medição da absorvância.

3.6. Preparação de magnetolipossomas

Neste trabalho foram preparados magnetolipossomas aquosos e sólidos, com e sem os compostos antitumorais encapsulados. Foram preparadas diferentes formulações de MLs, contendo CHEMS e PEG. O CHEMS foi utilizado pela sua sensibilidade às variações de pH. Por outro lado, o PEG foi utilizado para aumentar o tempo de circulação dos MLs na corrente sanguínea.

3.6.1. Magnetolipossomas aquosos (AMLs)

Os magnetolipossomas aquosos foram preparados pelo método de injeção etanólica. Neste método, a solução de lípido é injetada gota a gota e sob vórtex, numa solução aquosa de nanopartículas de concentração 0,02 mg/mL, acima da temperatura de transição de fase do lípido, de modo a obter lipossomas com concentração final de 10^{-3} M de lípido. No final da preparação, os magnetolipossomas foram purificados por decantação magnética, utilizando um magneto para eliminar as nanopartículas que não foram encapsuladas.

Para o encapsulamento dos compostos, os AMLs foram sintetizados de forma semelhante, adicionando-se o composto (10^{-6} M) à solução etanólica de lípido, realizando-se a co-injeção do lípido e do composto.

Foram ainda preparados magnetolipossomas aquosos contendo CHEMS, numa proporção de lípido para CHEMS de 80:20, e contendo CHEMS e PEG, na proporção de lípido para CHEMS e PEG 80:20:0,4. As concentrações das formulações utilizadas encontram-se na tabela seguinte.

Tabela 3.4 - Concentrações de lípido, composto, CHEMS e PEG nas diferentes formulações de AMLs.

Formulações lipídicas	[DPPC] (M)	[CHEMS] (M)	[PEG] (M)
DPPC	1×10^{-3}	—	—
DPPC:CHEMS	8×10^{-4}	2×10^{-4}	—
DPPC:CHEMS:PEG	8×10^{-4}	2×10^{-4}	4×10^{-6}

3.6.2. Magnetolipossomas sólidos (SMLs)

Os magnetolipossomas sólidos foram preparados conforme o descrito em [7]. Para tal, uma gota de 20 μ L de uma solução aquosa contendo 0,02 mg/ml de nanopartículas foi colocada em 3 ml de clorofórmio. A seguir, uma solução lipídica de DPPC em etanol foi adicionada, com agitação vigorosa em vórtex, para formar a primeira camada de lípido. Foram feitas duas lavagens por decantação magnética com água ultrapura, de modo a eliminar o excesso de lípido. Em seguida, foi injetada uma segunda solução de DPPC em etanol na dispersão aquosa das nanopartículas cobertas com a primeira camada, formando assim a segunda camada lipídica. Para o encapsulamento dos compostos **A** ou **B** nos SMLs,

estes foram incorporados numa solução etanólica injetada imediatamente antes da formação da segunda camada lipídica.

Foram também preparadas formulações de SMLs contendo CHEMS, na proporção de lípido para CHEMS 80:20, e contendo CHEMS e PEG, na proporção de lípido para CHEMS e PEG 80:20:0,4, tal como nos AMLs e de acordo com a tabela 3. Neste caso, a incorporação tanto do CHEMS como do PEG é feita apenas na injeção correspondente à segunda camada lipídica.

3.7. Caracterização dos Magnetolipossomas

Após serem sintetizados, os magnetolipossomas foram caracterizados pelas técnicas já descritas no Capítulo 2. Para a prova de síntese da bicamada lipídica nos magnetolipossomas sólidos recorreu-se à técnica de transferência de energia de ressonância (FRET) com o uso de lípidos marcados com sondas fluorescentes. A localização dos compostos antitumorais nos magnetolipossomas foi estudada anisotropia de fluorescência, uma vez que os compostos são fluorescentes, conforme já referido. A caracterização estrutural foi obtida por microscopia eletrónica de varrimento (no caso dos SMLs) e por difusão dinâmica de luz (para AMLs e SMLs).

3.7.1. Anisotropia de fluorescência

Foram realizadas medidas de anisotropia de fluorescência dos compostos antitumorais nos magnetolipossomas, de modo a tirar conclusões acerca da localização do composto antitumoral presente nos nanossistemas.

A emissão de fluorescência dos compostos encapsulados em lipossomas foi monitorizada para a fase gel (abaixo da T_m) e fase líquido-cristalina (acima da T_m) dos lípidos. Como, neste estudo, o lípido utilizado foi o DPPC, e este possui uma T_m de 41 °C, os ensaios foram realizados a 25 °C e a 55 °C. Para efeitos de comparação, foram também realizadas mediadas de anisotropia dos compostos em glicerol (solvente muito viscoso).

3.7.2. Ensaio de transferência de energia (FRET)

Os ensaios de transferência de energia foram realizados de modo a verificar a formação da bicamada lipídica nos SMLs. Para o efeito, foram sintetizados SMLs contendo lípidos marcados com

sondas fluorescentes adequadas para a ocorrência de FRET. O lípido marcado NBD-C₆-HPC, incluído na primeira camada lipídica, funcionou como doador de energia (através do grupo NBD), enquanto o lípido marcado com rodamina B (Rh-DOPE), que foi incluído na segunda camada lipídica, atuou como aceitador de energia. Para que ocorra transferência de energia, a distância entre doador e aceitador (NBD-C₆-HPC e Rh-DOPE, respectivamente) tem de ser suficientemente pequena, 10-100 Å. Outro requisito para a ocorrência de transferência de energia é a existência de uma sobreposição espectral entre o espectro de emissão do doador e o espectro de absorção do aceitador, o que se verifica no caso do par NBD/Rodamina.

De modo a provar a formação da bicamada lipídica foram então sintetizados três sistemas diferentes:

- SMLs contendo apenas o lípido marcado NBD-C₆-HPC na primeira camada;
- SMLs contendo apenas o lípido marcado Rh-DOPE na segunda camada;
- SMLs contendo ambos os lípidos marcados NBD-C₆-HPC e Rh-DOPE, na primeira e segunda camada, respectivamente.

3.8. Interação com modelos de membranas biológicas

A interação não-específica entre os magnetolipossomas carregados com os potenciais fármacos e os GUVs (vesículas unilamelares gigantes) foi avaliada por inibição da intensidade de fluorescência do composto encapsulado (*unquenching*). As nanopartículas apresentam um espectro de absorção numa larga gama de comprimentos de onda e, conseqüentemente, podem inibir a emissão de fluorescência dos compostos nos magnetolipossomas. Esta interação foi avaliada a diferentes pHs, de modo a inferir se haverá um aumento da capacidade de fusão a pH ligeiramente ácido, semelhante ao microambiente tumoral.

3.8.1. Preparação dos modelos de membrana

Os modelos de membrana utilizados neste trabalho foram GUVs (do inglês, *Giant Unilamellar Vesicles*) de lecitina de soja. A preparação dos GUVs foi feita a partir de um filme lipídico, obtido por evaporação sob uma corrente de azoto ultrapuro, que passa numa solução que contém 1 mM de lecitina de soja [8]. Posteriormente, este filme foi pré-hidratado com 40 µL de água ultrapura e incubado a 45 °C, por 30 minutos. Por fim, foi adicionada uma solução de 0,1 M de glucose e voltou-se a incubar, durante

duas horas a 37 °C. No fim da incubação, a solução foi sujeita a uma centrifugação de 14000 g por 30 minutos, de modo a remover qualquer tipo de agregado molecular de pequenas dimensões que estivesse na solução.

Foram também preparados GUVs em solução tampão de pH 7,4 e 5, para serem utilizados nos ensaios de libertação e nos estudos de fusão membranar.

3.9. Ensaios de eficiência de encapsulamento dos compostos em AMLs e SMLs

A avaliação da eficiência de encapsulamento dos compostos nos MLs foi feita através do uso de filtros AMICON®, que permitem separar o composto não encapsulado dos MLs contendo composto encapsulado. A solução de magnetolipossomas contendo o composto encapsulado foi colocada na parte superior de um filtro AMICON e submetida a uma centrifugação a 3000 rpm durante dez minutos. A solução contendo o composto não encapsulado foi evaporada e redispersa em etanol. Posteriormente, foi obtido o espectro de fluorescência e a sua intensidade permitiu determinar a concentração de composto não encapsulado, através de uma reta de calibração (intensidade de fluorescência em função da concentração) previamente obtida. No caso dos SMLs, foi também contabilizada a fração de composto que foi eliminada através das lavagens. Assim, foi possível quantificar a quantidade de composto encapsulado nos nanossistemas, utilizado a seguinte expressão:

$$EE(\%) = \frac{C(\text{total de composto}) - C(\text{composto não encapsulado})}{C(\text{total de composto})} \times 100 \quad \text{Equação 3.4}$$

3.10. Ensaios de libertação dos compostos

Foram realizados ensaios de libertação dos compostos ao longo do tempo, a 37 °C. Neste ensaio, os magnetolipossomas contendo os compostos encapsulados foram colocados na parte de cima de microfiltros adequados (com porosidade menor que o diâmetro dos magnetolipossomas), sendo colocada na parte inferior uma solução de GUVs. Foram feitos vários ensaios independentes para cada sistema, em soluções tampão de pH 7,4 e de pH=5. Foram recolhidas alíquotas de 300 µL da parte inferior dos microfiltros, durante intervalos de tempo de 10 minutos na primeira hora de cada ensaio, de 30 em 30 minutos até às 3 horas de ensaio e de hora a hora até às 8 horas de experiência. A última alíquota foi retirada às 24h de experiência. Foi medida a intensidade de fluorescência de todas as alíquotas e a cinética de libertação foi ajustada ao modelo de Korsmeyer-Peppas [9], de acordo com a expressão:

$$\frac{C_t}{C_0} = Kt^n \quad \text{Equação 3.5}$$

onde C_t e C_0 são as concentrações no tempo t e 0 , respectivamente, K a taxa de libertação, t o tempo e n é o expoente de transporte. Quando $n < 0,45$, o mecanismo de libertação é controlado por difusão (libertação *Fickiana*); se $0,45 < n < 0,89$, existe libertação por combinação dos mecanismos de difusão e erosão (libertação não-*Fickiana*); se $0,89 < n < 1$, a libertação é controlada por relaxamento; e quando $n > 1$, a libertação é controlada por inchamento e relaxamento do sistema [10].

3.11. Referências do Capítulo 3

1. Machado VA, Peixoto D, Queiroz MJ, Soares R. Antiangiogenic 1-Aryl-3-[3-(thieno[3,2- b]pyridin-7-ylthio)phenyl]ureas Inhibit MCF-7 and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cell Lines Through PI3K/Akt and MAPK/Erk Pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2016 Dec;117(12):2791–9.
2. lsu.edu. UV Cutoff. 2019 [visitado a 2 Dezembro 2020]. <https://macro.lsu.edu/HowTo/solvents/UV%20Cutoff.htm>
3. Meech SR, Phillips D. Photophysics of some common fluorescence standards. *Journal of Photochemistry*. 1983 Jan;23(2):193–217.
4. Hanžić N, Jurkin T, Maksimović A, Gotić M. The synthesis of gold nanoparticles by a citrate-radiolytical method. *Radiation Physics and Chemistry*. 2015 Jan;106:77–82.
5. Bastús NG, Merkoçi F, Piella J, Puntès V. Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic Control and Catalytic Properties. *Chemistry of Materials*. 2014 May 13;26(9):2836–46.
6. Torras M, Moya C, Pasquevich GA, Roig A. Accurate iron quantification in colloids and nanocomposites by a simple UV-Vis protocol. *Microchimica Acta*. 2020 Sep;187(9):488.
7. Rodrigues ARO, Ramos JMF, Gomes IT, Almeida BG, Araújo JP, Queiroz MJRP, et al. Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs. *RSC Advances*. 2016;6(21):17302–13.
8. Wu IY, Bala S, Škalko-Basnet N, di Cagno MP. Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019 Oct;138:105026.
9. Tamba T, Terashima H, Yamazaki M. A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles. *Chemistry Physics and Lipids*. 2011;164(5): 351-358
10. Cardoso BD, Rodrigues ARO, Almeida BG, Amorim CO, Amaral VS, Castanheira EMS, et al. Stealth Magnetoliposomes Based on Calcium-Substituted Magnesium Ferrite Nanoparticles for Curcumin Transport and Release. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 May 21;21(10):3641.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4.1. Caracterização das nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas produzidas foram caracterizadas por diferentes técnicas para avaliação do seu tamanho, forma, cristalinidade, propriedades magnéticas e estabilidade. Foram selecionadas nove amostras de nanopartículas para estes estudos, sendo elas: $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato, $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ por coprecipitação calcinadas a 300 °C 3h, $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel e calcinadas a 300 °C 3h, $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato 1, $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ por coprecipitação 1 calcinadas a 300 °C 3h, $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel 1 e calcinadas a 300 °C 3h, $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato 2, $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ coprecipitação 2 calcinadas a 300 °C 3h e $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel 2 calcinadas a 300 °C 3h. Como referido em 3.2 as partículas denominadas 1 foram sintetizadas com os precursores metálicos cloreto de ferro (III) hexahidratado, cloreto de magnésio hexahidratado e sulfato de manganês hidratado. As partículas denominadas 2 foram sintetizadas com os precursores metálicos cloreto de ferro (III) hexahidratado, sulfato de magnésio e sulfato de manganês monohidratado. Após as várias calcinações testadas, foram escolhidas aquelas que apresentavam melhor resposta magnética quando aplicado um íman.

4.1.1. Cinéticas de sedimentação das nanopartículas magnéticas

O estudo da cinética de sedimentação é de extrema importância para perceber a estabilidade das nanopartículas em solução aquosa. Numa fase inicial, a sedimentação das nanopartículas segue uma cinética de primeiro grau, sendo seguida de uma diminuição da velocidade de sedimentação. Assim, para o ajuste de todos os pontos obtidos, recorreu-se à função de Becquerel (Equação 3.3), considerando as duas fases de deposição. Através desta função, é possível determinar as taxas de sedimentação das nanopartículas (k). Esta análise foi feita para quatro concentrações diferentes de nanopartículas (0,025% m/v, 0,05% m/v, 0,1% m/v e 0,2% m/v) e os resultados encontram-se na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Taxas de sedimentação (K) calculados pela função de Becquerel para as nanopartículas sintetizadas.

	Concentração (wt %)	K (min ⁻¹)
Mn_{0,5}Ca_{0,5}Fe₂O₄ coprecipitação	0,025	0,0023
	0,050	0,0028
	0,10	0,0022
	0,20	0,0030
Mn_{0,5}Ca_{0,5}Fe₂O₄ citrato	0,025	0,0004
	0,050	0,0010
	0,10	0,0014
	0,20	0,0020
Mn_{0,5}Ca_{0,5}Fe₂O₄ sol-gel	0,025	0,0123
	0,050	0,0205
	0,10	0,0490
	0,20	0,0394
Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ Coprecipitação 1	0,025	0,0024
	0,050	0,0017
	0,10	0,0033
	0,20	0,0127
Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ Citrato 1	0,025	0,0012
	0,050	0,0014
	0,10	0,0009
	0,20	0,0002
Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ sol-gel 1	0,025	0,0047
	0,050	0,0068
	0,10	0,0065
	0,20	0,0074
Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ coprecipitação2	0,025	0,0006
	0,050	0,0006
	0,10	0,0012
	0,20	0,0027
Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ citrato2	0,025	0,0023
	0,050	0,0023
	0,10	0,0063
	0,20	0,0125
Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ sol-gel2	0,025	0,0061
	0,050	0,0118
	0,10	0,0146
	0,20	0,0222

As partículas que apresentam uma menor taxa de sedimentação são as ferrites mistas de manganês e cálcio, sintetizadas com adição de citrato. Isto pode ser justificado pelo facto de a cobertura de citrato proporcionar às nanopartículas maior estabilidade, uma vez que contribui para o aumento das repulsões eletrostáticas, impedindo a agregação. As partículas produzidas pelo método sol-gel são as menos estáveis em solução, uma vez que apresentam valores de taxa de deposição mais altos. Para baixas concentrações, todas as NPs apresentam taxas de deposição baixas, mas à medida que aumenta a concentração, a taxa aumenta, sendo que as partículas de $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato apresentam resultados mais favoráveis. O tamanho das NPs também influencia o processo de sedimentação, pelo que, possivelmente, as partículas de maior tamanho serão as $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel, por apresentarem taxas de deposição mais elevadas.

4.1.2. Propriedades magnéticas das nanopartículas

Neste trabalho, a síntese de nanopartículas superparamagnéticas é vantajosa, pela sua elevada magnetização apenas na presença de um campo magnético externo. Todas as nanopartículas obtidas apresentam características magnéticas, tendo-se observado uma resposta imediata das mesmas quando um campo magnético externo é aplicado. Verificou-se ainda que a magnetização desaparece quando este campo magnético é retirado, o que pode indicar que estas apresentam um comportamento superparamagnético. Assim, foi avaliada a dependência do momento magnético em função do campo magnético aplicado, por SQUID, de forma a obter a curva de histerese. As NPs superparamagnéticas não possuem praticamente histerese, ou seja, não conservam as propriedades magnéticas após a remoção do estímulo que as gerou. A sua resposta magnética assemelha-se ao comportamento de Langevin para materiais paramagnéticos, mas com altos valores de magnetização e suscetibilidade característicos dos materiais ferromagnéticos que as compõem [1]. Na figura 4.1, podemos observar alguns exemplos das curvas de histerese das NPs sintetizadas.

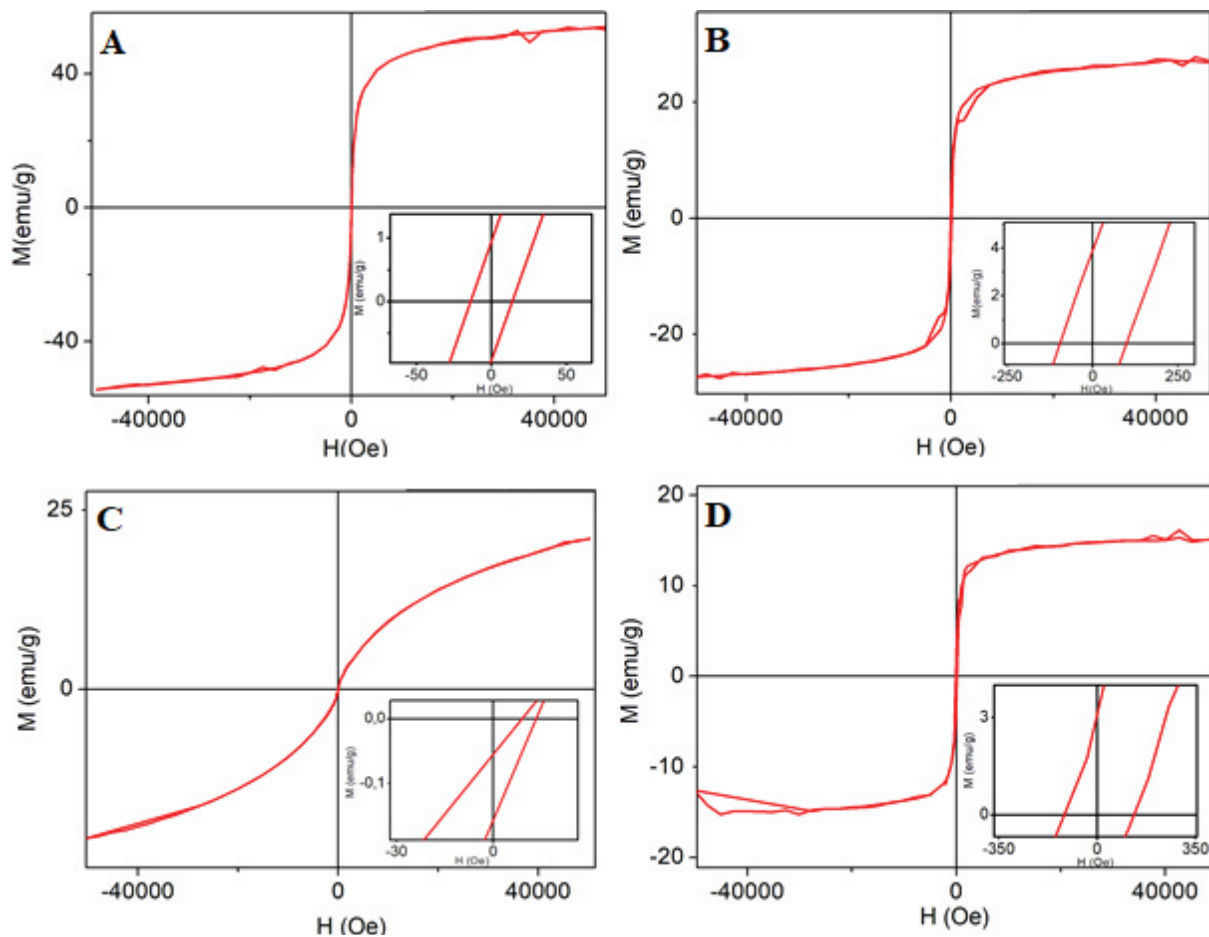


Figura 4.1 - Curva de histerese das nanopartículas de $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ citrato (A), $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ sol-gel (B), $Mn_{0.5}Mg_{0.5}Fe_2O_4$ citrato 2 (C) e $Mn_{0.5}Mg_{0.5}Fe_2O_4$ sol-gel 2 (D), à temperatura ambiente. Inserido: Ampliação da zona de baixo campo da curva de histerese.

A partir das curvas de histerese foi possível determinar o valor da coercividade, que é o valor do campo magnético inverso que deve ser aplicado para que o fluxo magnético volte a zero. Estes valores encontram-se listados na tabela 4.2, bem como os valores da magnetização de remanência (a magnetização que persiste após se ter retirado o campo magnético), da magnetização de saturação (máximo de magnetização) e da razão entre a remanência e a saturação, que nos permite avaliar se as partículas apresentam ou não um comportamento superparamagnético.

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

	Coercividade (Oe)	Remanência (emu/g)	Magnetização de saturação (emu/g)	M_r/M_s
Mn_{0,5}Ca_{0,5}Fe₂O₄ citrato	13,90	0,95	53,91	0,018
Mn_{0,5}Ca_{0,5}Fe₂O₄ coprecipitação	—	—	11,35	—
Mn_{0,5}Ca_{0,5}Fe₂O₄ sol-gel	95,04	5,70	27,40	0,21
Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ citrato 1	5,12	0,01	18,35	0,0004
Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ citrato 2	8,99	0,06	9,21	0,01
Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ coprecipitação 1	—	—	6,52	—
Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ coprecipitação 2	—	—	10,03	—
Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ sol-gel 1	133,37	—	9,01	—
Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ sol-gel 2	118,79	3,16	15,27	0,21

Pela análise dos resultados, é possível observar que as partículas preparadas pelo método de coprecipitação sem adição de citrato e algumas do método sol-gel são as que apresentam valores mais baixos de magnetização de saturação. Verifica-se também que as partículas preparadas pelo método sol-gel apresentam uma maior histerese, com valores de coercividade (~100 Oe) elevados, bem como valores de magnetização de remanescência significativos (entre 3 e 5 emu/g).

As NPs que apresentam melhores propriedades magnéticas são as preparadas pelo método de coprecipitação com adição de citrato, nomeadamente, Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ 1, Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ 2 e Mn_{0,5}Ca_{0,5}Fe₂O₄. Os valores de coercividade destas NP assemelham-se aos referidos na literatura para as nanopartículas de MnFe₂O₄ (6,03 Oe), MgFe₂O₄ (22,1 Oe) e de CaFe₂O₄ (3,41 Oe), bem como os valores de remanescência (0,06 e 0,26 emu/g para partículas de CaFe₂O₄ e MgFe₂O₄ respetivamente) [2-4]. As nanopartículas de ferrites mistas de magnésio e manganês preparadas neste trabalho apresentam valores inferiores aos referidos para partículas de ferrite de magnésio. Os valores da magnetização de saturação das NP Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ citrato 1, Mn_{0,5}Mg_{0,5}Fe₂O₄ sol-gel 2,

$\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato e $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel também se apresentam mais elevados do que nos estudos referidos anteriormente, com exceção das partículas de MnFe_2O_4 que apresentam M_s de 36 emu/g.

As ferrites mistas de manganês e cálcio produzidas pelo método da coprecipitação com adição de citrato apresentam também uma melhoria na magnetização de saturação relativamente a estudos já publicados de partículas de ferrite de cálcio sintetizadas pelo método sol-gel, com tamanhos entre os 5 e os 10 nm [4].

O comportamento superparamagnético também pode ser avaliado pelo valor da razão entre a magnetização de remanescência e a magnetização de saturação. Se esta razão for inferior a 0,1, verifica-se uma perda superior a 90% do seu magnetismo quando o campo magnético é retirado, e as NPs dizem-se superparamagnéticas [5]. Podemos observar (tabela 4.3) que apenas as partículas de $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato, $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato 1 e $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato 2 apresentam um comportamento superparamagnético, com valores da razão M_r/M_s de 0,018, 0,0004 e 0,01, respetivamente.

A partir dos resultados obtidos na avaliação das propriedades magnéticas, foram selecionadas as amostras $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato, $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel, $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato 1 e $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel 2 para prosseguir os estudos deste trabalho.

4.1.3. Caracterização por difração de Raios-X

Os difratogramas de XRD foram analisados com recurso ao software *Match!* e permitiram estudar a constituição das nanopartículas referentes às amostras $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato, $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel, $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato 1 e $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel 2. Na figura 4.2 estão representados os difratogramas onde é possível verificar, para as NPs de ferrites mistas de manganês e cálcio, a presença dos picos característicos de uma fase cristalina pura. É também possível notar que a síntese de NPs pelo método sol-gel resulta em amostras com algumas impurezas, o que é comprovado pela presença de hematite. A presença de hematite também pode ser justificada pelo facto das nanopartículas de sol-gel terem sofrido calcinação a maiores temperaturas.

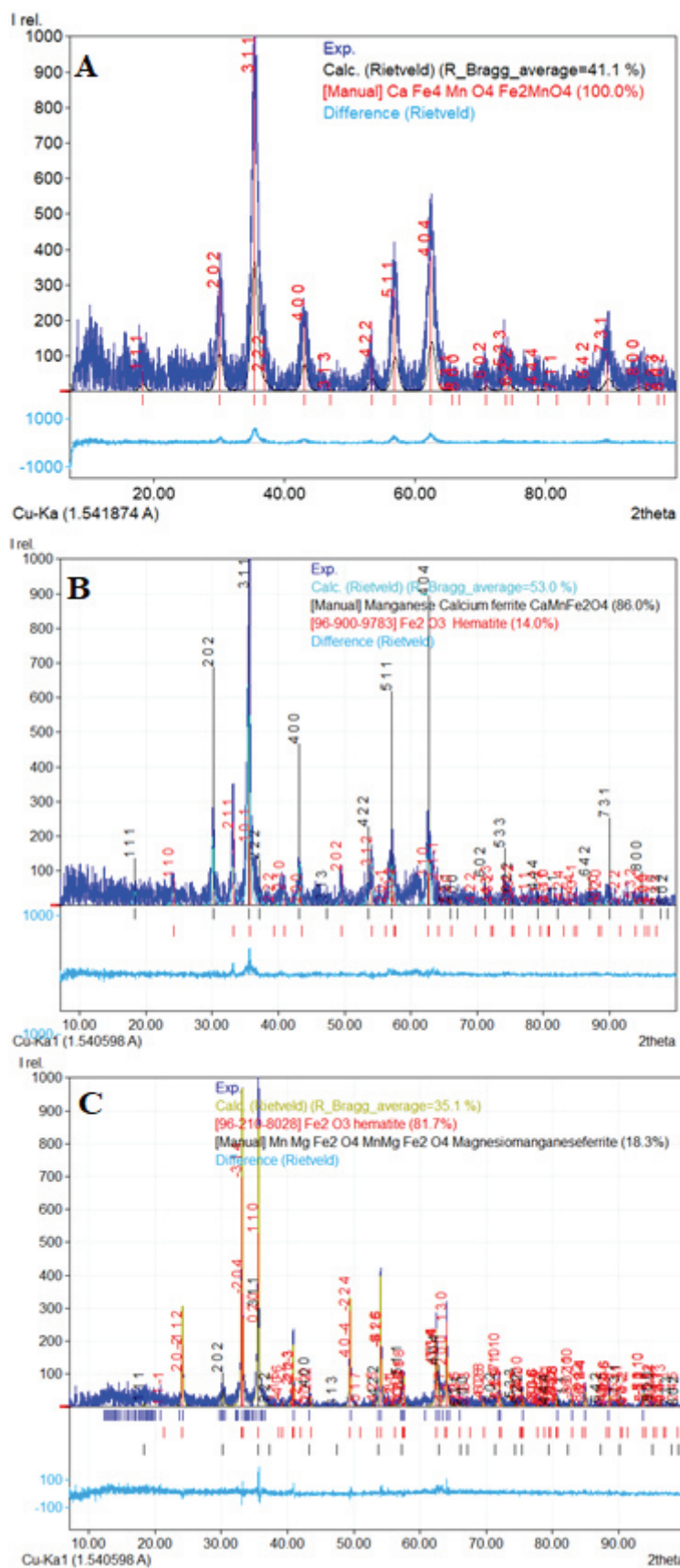


Figura 4.2 - Difratoigramas de XRD das nanopartículas: A – $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato, B - $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel, C - $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel 2.

A amostra de nanopartículas de $\text{Mn}_{0,5}\text{Mg}_{0,5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato 1 (figura 4.3) apresenta-se totalmente amorfa, pelo que poderá ser necessário um tratamento térmico para melhorar a sua estrutura cristalina.

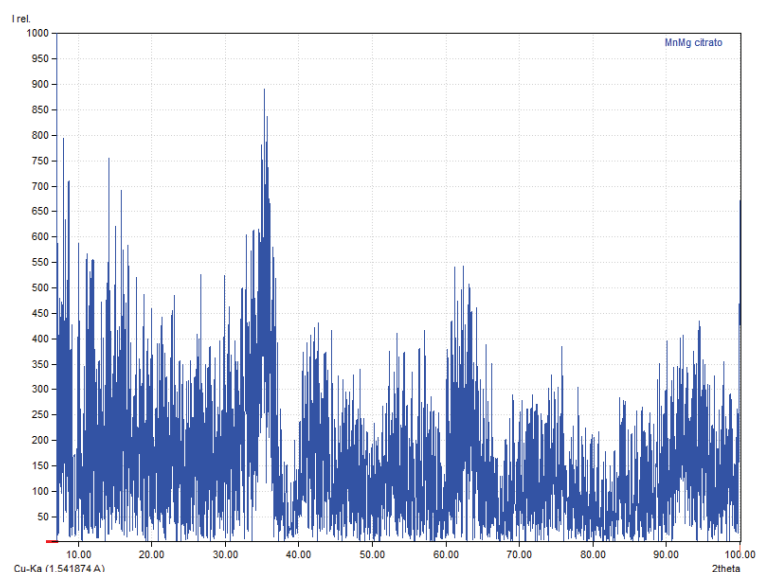


Figura 4.3 - Difratoograma de XRD das nanopartículas $\text{Mn}_{0,5}\text{Mg}_{0,5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato 1.

Pela equação de Scherrer (equação 3.2), foi possível determinar o tamanho das cristalites, encontrando-se estes valores na tabela 4.3. Nos cálculos foi usada a constante de forma geométrica (com valor de 0,9) e o λ do equipamento de XRD (1,54056 Å).

Tabela 4.3 - Tamanhos das nanopartículas calculados pela equação de Scherrer, pureza da amostra e χ^2 .

	Tamanho (nm)	Pureza (%)	χ^2
$\text{Mn}_{0,5}\text{Ca}_{0,5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato	8,1	100	5,8
$\text{Mn}_{0,5}\text{Ca}_{0,5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel	15	86	6,1
$\text{Mn}_{0,5}\text{Mg}_{0,5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel 2	33,1	18,3	7,3

Esta análise permitiu-nos concluir que foram formadas nanopartículas de tamanhos pequenos, ideais para encapsulamento, sendo as mais puras as ferrites de manganês e cálcio preparadas por coprecipitação com citrato.

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

A caracterização do tamanho das nanopartículas foi realizada pela técnica de SEM. As imagens permitiram observar a forma das nanopartículas, bem como obter a distribuição de tamanhos de cada amostra. As imagens das NPs obtidas por SEM permitem observar vários aglomerados representados por regiões mais escuras da imagem. Apesar da agregação, é possível distinguir partículas isoladas de formato circular com tamanhos muito pequenos. As imagens sugerem também que as NPs sintetizadas apresentam, de forma geral, uma distribuição de tamanhos relativamente estreita.

As imagens SEM foram processadas com o software *ImageJ*. Foi feito um aumento do contraste e subtração do fundo, seguido de uma contagem manual das nanopartículas com os melhores limites definidos (média entre 100-150 contagens). As áreas obtidas foram convertidas em diâmetros e os resultados ajustados a uma Guassiana ou à soma de duas Gaussianas, permitindo obter a distribuição de tamanhos de cada uma das amostras.

Na figura 4.4 estão representadas as imagens tratadas pelo programa, bem como os histogramas relativos à distribuição de tamanhos. Através da análise foi possível chegar a um valor médio do diâmetro das NP, resultados que estão apresentados na tabela 4.4.

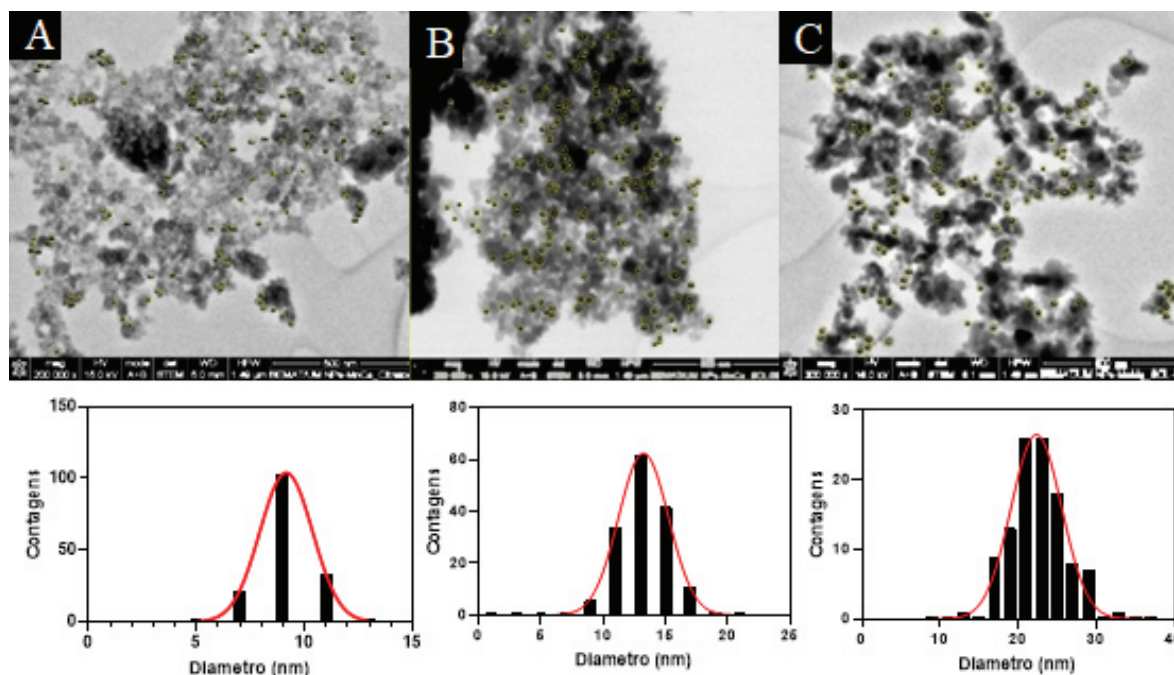


Figura 4.4 - Imagens obtidas por SEM tratadas pelo software ImageJ e os respectivos histogramas da distribuição de tamanhos das nanopartículas: A - $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato, B - $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel e C - $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sol-gel2.

Tabela 4.4 - Tamanhos médios e respectivos desvios padrão para as nanopartículas selecionadas.

	Tamanho (nm)
Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe₂O₄ citrato	9,15 ± 3,32
Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe₂O₄ sol-gel	13,23 ± 2,00
Mn_{0.5}Mg_{0.5}Fe₂O₄ sol-gel 2	22,34 ± 3,32

As amostras de Mn_{0.5}Mg_{0.5}Fe₂O₄ com citrato 1 são demasiadas pequenas, pelo que as imagens de SEM não têm qualidade suficiente para se conseguir obter uma distribuição de tamanhos desta amostra. Contudo, é possível perceber que, além de serem partículas muito pequenas e esféricas, com tamanhos inferiores aos obtidos para as Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe₂O₄ de citrato, o método de citrato origina populações de baixa polidispersividade.

Comparando estes resultados com os obtidos pela técnica de XRD, é possível inferir que os valores de tamanhos são muito semelhantes, revelando uma boa qualidade dos resultados. Os resultados obtidos por SEM permitem comprovar a síntese de partículas com tamanho suficientemente pequeno para serem incorporadas em lipossomas, formando magnetolipossomas. Assim, os MLs baseados nestas NPs são promissores para aplicações em MRI, tratamentos por hipertermia e entrega controlada de fármacos, *in vivo*, por aplicação de um campo magnético externo, uma vez que, nesta gama de tamanhos, as nanopartículas apresentam comportamento superparamagnético.

4.1.5. Quantificação de ferro nas nanopartículas

A massa experimental de ferro presente nas nanopartículas Mn_{0.5}Mg_{0.5}Fe₂O₄ 1 e Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe₂O₄ sintetizadas com adição de citrato foi obtida, para confirmar a relação estequiométrica do ferro para os restantes iões. Para uma maior confiança nos resultados, foram preparadas nanopartículas de magnetite com citrato enquanto branco neste ensaio.

A razão estequiométrica teórica de ferro para os restantes iões M nas ferrites de fórmula geral MFe₂O₄ seria de 2(Fe) para 1(M). Os valores da massa experimental de ferro obtidos e razão estequiométrica corrigida são apresentados na tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Massa experimental de ferro e relação estequiométrica corrigida para as partículas $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ 1 e $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ com adição de citrato.

	Massa partículas (mg)	Massa ferro experimental (mg)	Correção da estequiometria
$\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato 1	1,09	0,538	$(\text{MnMg})_{1.1}\text{Fe}_{1.9}\text{O}_4$
$\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato	2,04	1,10	$(\text{MnCa})_{0.84}\text{Fe}_{2.16}\text{O}_4$

Com estes resultados, foi possível corrigir a razão estequiométrica passando o ferro a ter uma estequiometria de 1,19 e 2,16, para as partículas de ferrite mista de manganês e magnésio e ferrite mista de manganês e cálcio, respetivamente.

A caracterização estrutural e magnética das nanopartículas, produzidas pelos vários métodos permitiu-nos escolher as melhores para prosseguir os estudos. Assim, as partículas selecionadas foram $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato para os vários estudos que se seguem, uma vez que apresentaram melhores propriedades magnéticas.

4.2. Estudo fotofísico dos compostos em vários solventes

Devido à sua atividade antitumoral promissora, encapsularam-se nos magnetolipossomas dois novos compostos fluorescentes derivados de tienopiridinas. Como estudo prévio, foi avaliado o comportamento dos novos compostos em quatro solventes com diferentes polaridades, tendo sido medidos os seus espectros de absorção e fluorescência.

Os espectros de fluorescência normalizados dos compostos **A** e **B** nos vários solventes são mostrados na figura 4.5. Os espectros de absorção dos compostos em etanol e acetonitrilo estão inseridos nas figuras, a título de exemplo. O composto **A** apresenta um espectro estruturado, enquanto o composto **B** apresenta uma banda larga sem estrutura vibracional, com desvios batocrômicos com o aumento da polaridade do solvente, mostrando uma maior conjugação pelo facto de não ter o azoto no anel benzénico e pelo efeito doador de eletrões do grupo metilo. Há ainda a possibilidade de formação de ligações de ligações de hidrogénio com os solventes próticos (clorofórmio e etanol), principalmente através do grupo

éster (O=C-O) e do azoto do anel de piridina, justificando maiores desvios batocrômicos nestes solventes. Uma característica distintiva de outras tienopiridinas estudadas anteriormente é a emissão de fluorescência que se observa em etanol para os compostos aqui estudados [6].

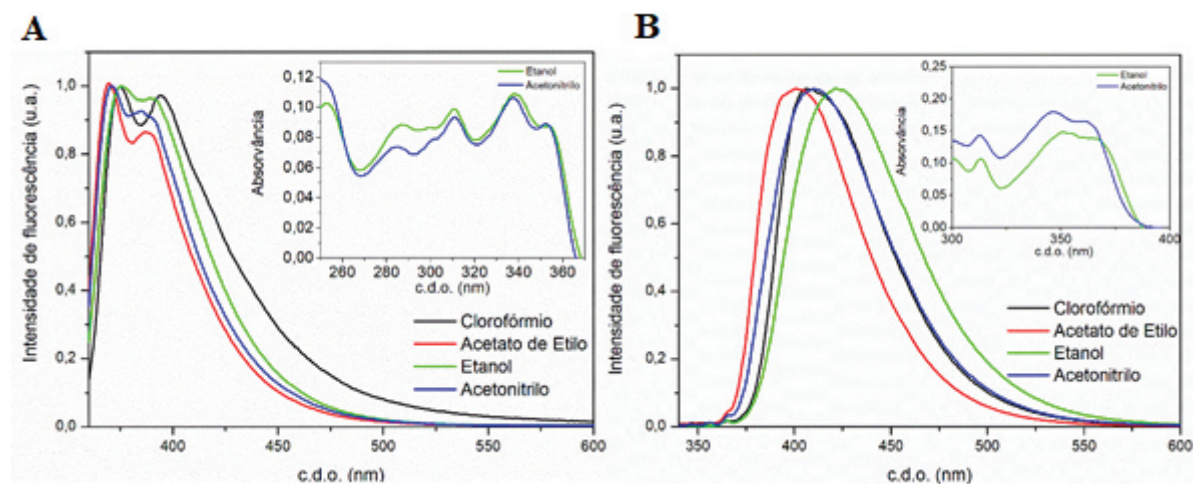


Figura 4.5 - Espectros de fluorescência normalizados do composto **A** (10^{-6} M) ($\lambda_{exc}=350$ nm) (A) e **B** ($\lambda_{exc}=330$ nm) (B), nos vários solventes. Inserido: Espectros de absorção dos compostos **A** e **B** (10^{-6} M) em etanol e acetonitrilo.

Na tabela 4.6 são apresentados os máximos de absorção e emissão e o rendimento quântico de fluorescência dos compostos **A** e **B** nos vários solventes estudados. Os rendimentos quânticos de fluorescência dos compostos foram calculados relativamente ao sulfato de quinino (em H_2SO_4 0,05M); $\Phi_r = 0,546$ a $25^\circ C$.

Tabela 4.6 - Comprimento de onda de absorção máximo (λ_{abs}) e coeficiente de absorção molar (ϵ), comprimento de onda de emissão máximo (λ_{em}) e rendimento quântico de fluorescência dos compostos **A** e **B** em diferentes solventes.

Solvente	λ_{abs}/nm ($\epsilon/10^3 M^{-1}cm^{-1}$)		λ_{em} (nm)		Φ_F	
	A	B	A	B	A	B
Acetato de Etilo	337	346	371			
	(1,02)	(1,35)	387	401	0,02	0,06
Clorofórmio	341	353	375			
	(1,26)	(1,15)	394	406	0,02	0,08
Acetonitrilo	338	348	371			
	(0,87)	(1,27)	385	410	0,02	0,05
Etanol	338	351	375			
	(0,88)	(0,79)	389	421	0,02	0,15

Pela análise dos resultados apresentados na tabela 4.6, é possível observar que os compostos apresentaram uma fluorescência relativamente fraca para todos os solventes em estudo, com a exceção do composto **B** em etanol.

A figura 4.6 mostra uma comparação entre os rendimentos quânticos de fluorescência dos compostos **A** e **B** nos solventes em estudo. Podemos observar que o composto **B** apresenta maiores rendimentos do que o composto **A**, em todos os solventes testados. O composto **A** apresenta rendimentos quânticos de fluorescência na ordem dos 2% para todos os solventes. Por outro lado, os rendimentos quânticos do composto **B** estão numa gama entre 5% e 15%.

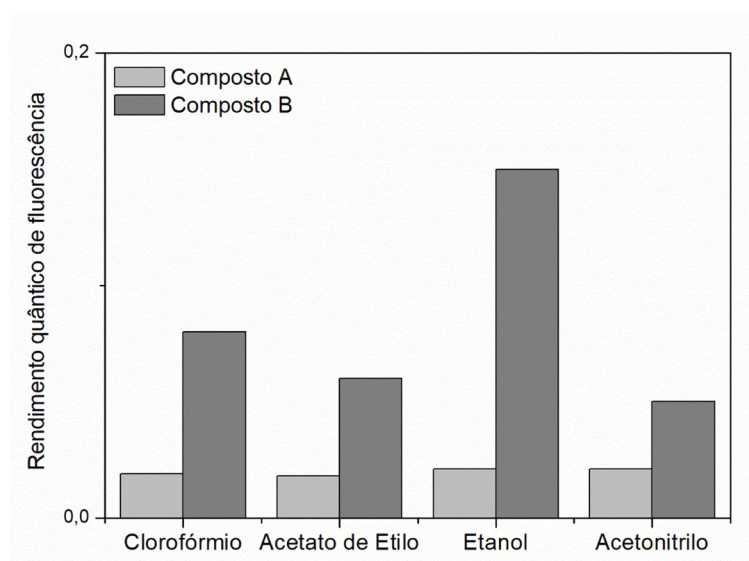


Figura 4.6 - Gráfico comparativo dos rendimentos quânticos de fluorescência dos compostos nos vários solventes.

Pelos espectros de absorção dos compostos **A** e **B** em cada solvente, é possível determinar o coeficiente de absorção molar, através da equação 2.6 referente à Lei de Lambert-Beer, e usando o percurso ótico da cuvette (1 cm). Assim, o coeficiente (absortividade) é determinado pela divisão da absorvância máxima em cada solvente pela concentração do composto. A absortividade mede a capacidade de uma substância absorver radiação a uma determinada frequência, estando os valores obtidos também representados na tabela 4.6. É possível verificar que os valores da absortividade molar correspondem a transições fortemente permitidas, uma vez que estas apresentam uma alta absortividade molar ($\epsilon_{\text{max}} > 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

A sensibilidade da emissão de fluorescência dos compostos ao meio envolvente pode ser útil no estudo do comportamento e localização dos mesmos nos magnetolipossomas, sendo que o composto **B** é o que apresenta melhores qualidades para atuar como sonda solvatocrômica.

4.3. Caracterização dos magnetolipossomas

4.3.1. Cinéticas de sedimentação dos magnetolipossomas aquosos

As NPs preparadas foram encapsuladas em lipossomas, formando magnetolipossomas aquosos. Foram analisadas as taxas de deposição destes nanossistemas e comparadas com as taxas de deposição das nanopartículas. Os resultados estão apresentados na tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Taxa de sedimentação (K) calculados pela função de Becquerel dos magnetolipossomas aquosos.

	Concentração (wt %)	K (min ⁻¹)
Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe₂O₄	0,025	0,0010
coprecipitação	0,050	0,0007
Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe₂O₄	0,025	0,0003
citrato	0,050	0,0003
Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe₂O₄	0,025	0,0023
sol-gel	0,050	0,0071
Mn_{0.5}Mg_{0.5}Fe₂O₄	0,025	0,0007
coprecipitação	0,050	0,0014
Mn_{0.5}Mg_{0.5}Fe₂O₄	0,025	0,0024
sol-gel	0,050	0,0006

Para este estudo foram selecionadas as NPs que apresentaram melhor taxas de deposição no estudo das cinéticas de sedimentação. Os resultados obtidos permitiram concluir que a taxa de deposição das NPs encapsuladas diminui. Estes resultados são importantes para a aplicação destas NPs, uma vez que mostram que o encapsulamento das nanopartículas em lipossomas permite aumentar a sua estabilidade. Mais uma vez, os AMLs baseados em NPs de Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe₂O₄ com citrato apresentam valores mais estáveis, tal como aconteceu para as nanopartículas sozinhas. Foi observada uma diminuição de 0,0010 para 0,0002 na taxa de sedimentação, que representa uma redução considerável.

Os resultados para os magnetolipossomas sólidos não foram os esperados. Possivelmente, estes sistemas estarão sujeitos a agregação, levando à formação de aglomerados que não permitiu determinar as cinéticas de sedimentação ao longo do tempo.

4.3.2. Prova da formação dos magnetolipossomas sólidos por FRET

De forma a provar que a bicamada lipídica dos magnetolipossomas sólidos (SMLs) está de facto formada, foram realizados ensaios de transferência de energia para as formulações de SMLs com e sem PEG. Para este estudo, foram preparados três sistemas de SMLs contendo lípidos marcados com sondas fluorescentes:

- SMLs contendo um lípido marcado com NBD-C₆-HPC, que vai atuar como doador de energia, na primeira camada do sistema;
- SMLs contendo um lípido marcado com Rh-DOPE (rodamina B), que irá atuar como aceitador de energia, na segunda camada do sistema.
- SMLs contendo lípidos com as duas sondas, o lípido com NBD-C₆-HPC na primeira camada e o lípido Rh-DOPE na segunda camada.

Após determinação do espectro de fluorescência dos três sistemas, excitando apenas no comprimento de onda de excitação do doador (NBD-C₆-HPC), é possível observar que os SMLs foram formados (figura 4.7). No espectro do sistema contendo as duas sondas, é possível observar uma diminuição da banda de emissão do doador, comparando com o sistema que contém apenas lípido com NBD-C₆-HPC, e um aumento da banda do aceitante (Rh-DOPE), comparando com o sistema que contém apenas o lípido com sonda aceitante. Este efeito resulta da transferência de energia do doador (NBD-C₆-HPC) para o aceitador (Rh-DOPE), provando que as duas sondas estão perto uma da outra e, por consequência, a formação da bicamada lipídica constituinte dos SMLs. Os resultados obtidos foram semelhantes para a adição de PEG na formulação do sistema.

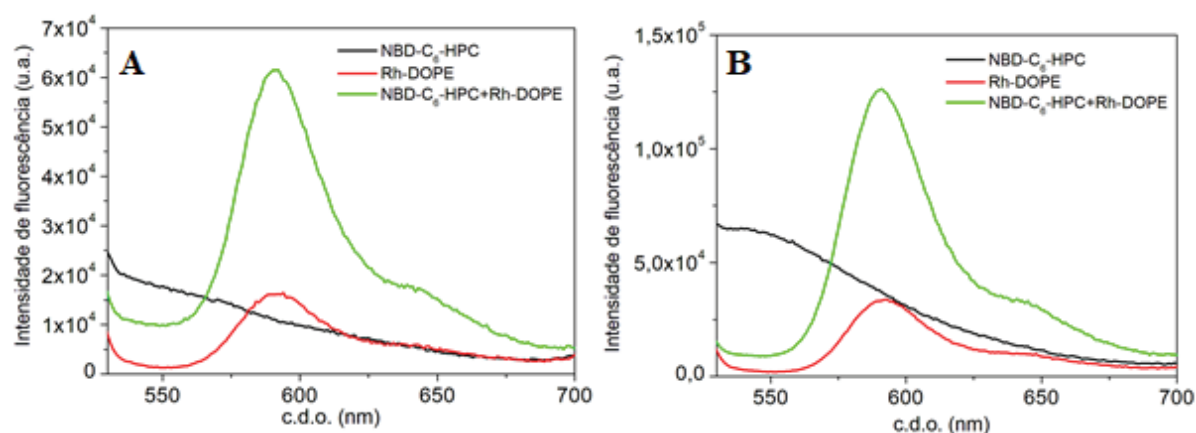


Figura 4.7 - Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 440$ nm) dos SMLs de DPPC (A) e SMLs DPPC:PEG (B) baseados em NPs de Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe₂O₄ contendo apenas lípido com NBD-C₆-HPC (10⁻⁶ M), apenas lípido com Rh-DOPE (10⁻⁶ M) e contendo lípidos com ambas as sondas.

Como resultado destes ensaios, foi possível calcular a distância doador-aceitante, o raio de Förster e a eficiência de FRET. Os resultados para os sistemas com e sem PEG estão apresentados na tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Parâmetros da Transferência de energia ressonante de Förster: eficiência de FRET (Φ_{FRET}), raio de Förster (R_0) e distância doador-aceitador (r) obtidos para os ensaios de SMLs baseados em nanopartículas de $\text{Mn}_{0,5}\text{Ca}_{0,5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato com e sem PEG.

	Φ_{FRET}	R_0 (Å)	r (nm)
SMLs DPPC	0,45	32,63	3,38
SMLs DPPC : PEG	0,86	43,53	3,24

Os resultados relativos ao processo de FRET são favoráveis para ambos os sistemas, uma vez que eficiência é de 45% para o sistema sem PEG e 86% para o sistema com PEG, correspondendo a uma distância entre o dador e o aceitante de cerca de 3 nm para ambos os casos. Uma vez que a espessura das membranas celulares varia entre 7,5 e 10 nm [7], é possível concluir que a bicamada lipídica foi formada, contendo a molécula doadora na primeira camada e a molécula aceitante na segunda camada lipídica. Desta forma, demonstrou-se que as ferrites mistas de manganês e cálcio com citrato podem ser cobertas com uma bicamada lipídica (PEGuilada ou não), dando origem a magnetolipossomas sólidos.

4.3.3. Caracterização do tamanho e polidispersividade

A caracterização do tamanho e índice de polidispersividade dos magnetolipossomas sintetizados foi realizada pela técnica de difusão dinâmica de luz (DLS) e por microscopia eletrônica de varrimento (SEM). A técnica de DLS permite-nos determinar o tamanho das partículas em solução aquosa através da velocidade a estas se movem, mas não faz a distinção entre partículas isoladas e agregados de partículas. Assim, os resultados de DLS são fiáveis quando existe uma boa curva de autocorrelação, bem como um índice de polidispersividade inferior a 0,3 [8].

Neste ensaio, foram estudadas três formulações diferentes, DPPC (100 %), DPPC:CHEMS (80:20) e DPPC:CHEMS:PEG (80:20:0,4). Os valores de diâmetro médio, polidispersividade e potencial zeta dos AMLs e SMLs sintetizados estão apresentados na tabela 4.9. A título de exemplo, o correlograma de distribuição de tamanhos de AMLs de DPPC (100%) baseados em nanopartículas $\text{Mn}_{0,5}\text{Ca}_{0,5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ com citrato é apresentado na figura 4.8.

Tabela 4.9 - Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta dos magnetolipossomas (AMLs e SMLs) baseados em partículas de $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ citrato, obtidos por DLS.

	Formulação lipídica	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
AMLs	DPPC	160,47 ± 35,39	0,17	-1,83
	DPPC:CHEMS	77,70 ± 19,54	0,34	-5,10
	DPPC:CHEMS:PEG	87,69 ± 24,59	0,27	-5,70
SMLs	DPPC	137,43 ± 96,94	0,28	-11,33
	DPPC:CHEMS	160,13 ± 48,97	0,35	-9,580
	DPPC:CHEMS:PEG	89,15 ± 24,02	0,25	-16,90

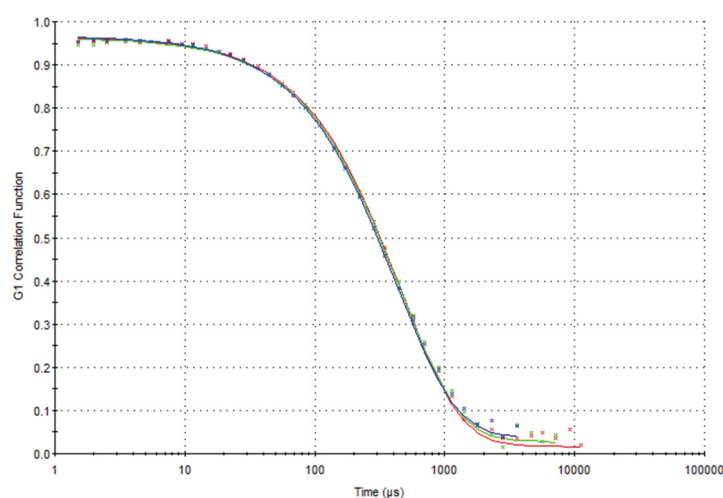


Figura 4.8 - Correlograma da distribuição de tamanhos obtido para AMLs 100% DPPC baseados em nanopartículas de $Mn_{0.5}Ca_{0.5}Fe_2O_4$ citrato.

Os resultados apontam para variações nos tamanhos entre os 77 e 160 nm de diâmetro, sendo que os AMLs apresentam menores tamanhos que os SMLs. Podemos ainda observar que a adição de CHEMS e PEG ao sistema reduz o seu diâmetro hidrodinâmico. Esta diminuição poderá estar relacionada a uma menor agregação dos sistemas, ou um rearranjo da bicamada lipídica, já que não se verifica alteração apreciável da carga superficial.

Apesar do ajuste razoável dos correlogramas, nalguns casos, verifica-se uma aglomeração dos nanossistemas, pelo que os valores dos diâmetros médios obtidos por DLS serão superiores aos valores reais. De facto, em algumas amostras, é possível observar duas ou três populações distintas com diferentes tamanhos, sendo que populações com tamanho menor poderão corresponder a magnetolipossomas isolados e as populações com tamanho maior poderão corresponder a agregados

de MLs ou poeiras na amostra. A título de exemplo, está representado na figura 4.9 um gráfico de distribuição de tamanhos, onde é possível comprovar a existência de duas populações distintas.

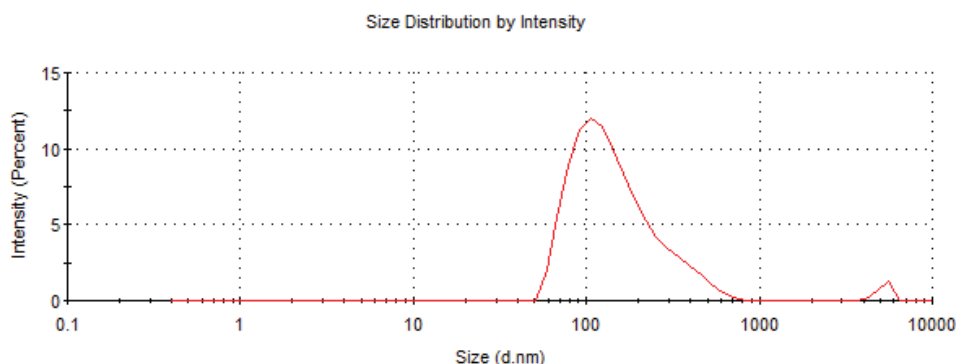


Figura 4.9 - Representação da intensidade dos picos da amostra de SMLs retirada do software do equipamento Zetasize.

Os resultados do potencial zeta vão de encontro ao esperado, uma vez que são próximos de 0 mV para sistemas com 100% DPPC (lipídeo zwitteriônico), mas quando são adicionados CHEMS e PEG, há um aumento de carga superficial negativa. Este aumento da carga (em valor absoluto) faz com que a agregação seja evitada pela repulsão eletrostática, resultando em tamanhos menores. A presença do *cluster* de NPs nos SMLs pode contribuir para um potencial zeta mais negativo.

A constituição sólida dos SMLs permite a sua observação por SEM, na medida em que a sua estrutura não é destruída pelo sistema de vácuo do equipamento. Através das imagens obtidas por SEM, foi possível observar a superfície destes sistemas e o seu diâmetro médio, com maior precisão, relativamente aos resultados obtidos por DLS. Na figura 4.10, está representada a imagem obtida para a amostra de SMLs 100% DPPC baseados em nanopartículas $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato.

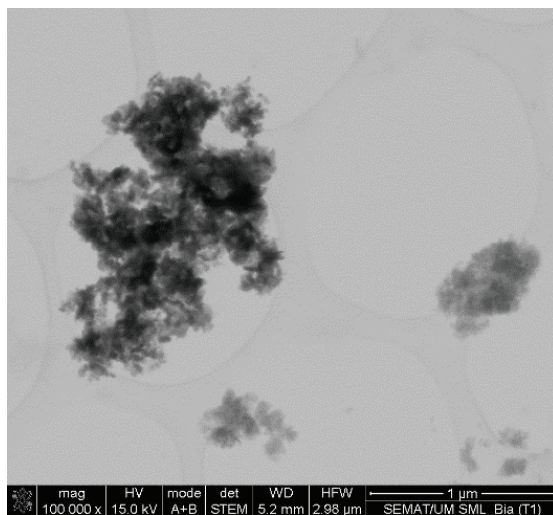


Figura 4.10 - Imagem de SEM de SMLs 100% DPPC nanopartículas de $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ citrato.

Pela análise da imagem é possível observar um grande agregado de SMLs, no entanto, no canto inferior direito podemos observar um SML que aparenta ter uma dimensão aproximada de 200 nm e uma forma oval. Apesar da sua constituição sólida, o vácuo do SEM pode destruir alguns SMLs devido à água residual constituinte destes sistemas. Comparando com os resultados obtidos por DLS para este sistema, concluímos que existe alguma agregação dos SMLs em solução. No futuro, será de interesse realizar uma análise SEM de formulações de SMLs com adição de CHEMS e PEG, uma vez que os resultados de DLS sugerem uma diminuição da agregação dos sistemas.

4.4. Encapsulamento dos compostos

4.4.1. Estudo fotofísico dos compostos em magnetolipossomas

As propriedades fotofísicas dos compostos encapsulados nos magnetolipossomas foram estudadas para várias composições dos magnetolipossomas. Neste estudo, foram usadas três formulações diferentes de AMLs e SMLs de DPPC (100%), DPPC:CHEMS (80:20) e DPPC:CHEMS:PEG (80:20:0,4).

A incorporação e localização dos potenciais fármacos antitumorais nos magnetolipossomas pode ser estudada através de medições da anisotropia de fluorescência (r). Este estudo pode fornecer informação relevante, uma vez que o valor de anisotropia aumenta com o tempo de correlação rotacional

da molécula fluorescente e, consequentemente, com a viscosidade do meio [9] (de acordo com a equação 2.9).

O lípido DPPC apresenta uma temperatura de transição de fase de cerca de 41 °C [10]. Deste modo, as medidas de anisotropia foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C) e acima da temperatura de transição de fase (55 °C), de forma a monitorizar a fase gel e a fase líquido-cristalina dos lípidos.

Os compostos exibem emissão de fluorescência razoável quando incorporados nas diferentes formulações de magnetolipossomas, como é possível observar na figura 4.11, onde estão representados dois espectros a título de exemplo.

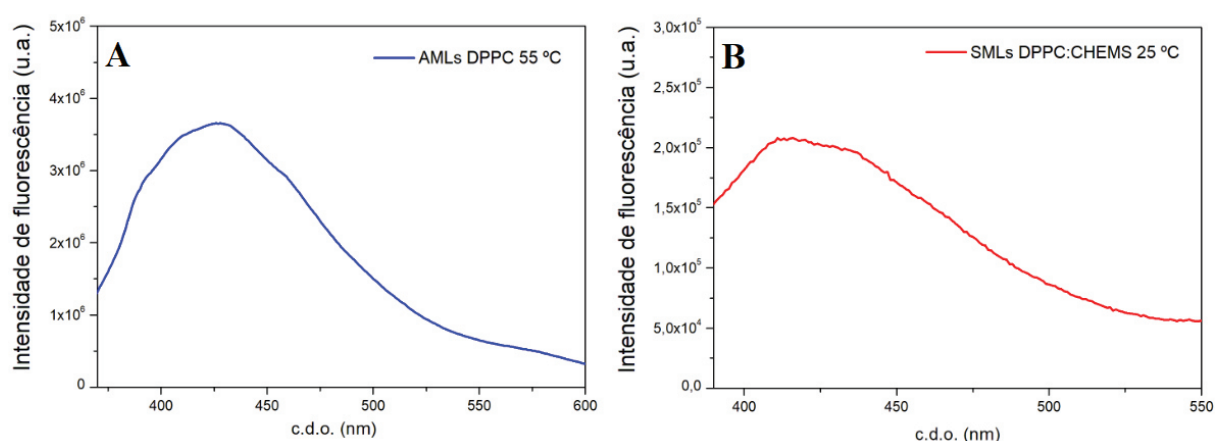


Figura 4.11 - Espectros emissão de fluorescência: A - do composto **A** (10⁻⁶ M) em AMLs 100% DPPC a 55 °C e B - do composto **B** (10⁻⁶ M) em SMLs, DPPC:CHEMS a 25 °C. [condições de análise: A - λ_{exc} =350nm e B - λ_{exc} =330nm]

Para comparação, foram realizadas também medidas de anisotropia de fluorescência dos compostos em glicerol, que é um solvente altamente viscoso (η = 993,4 cP a 25 °C). Assim, o glicerol apresenta uma viscosidade de aproximadamente 1000 cP à temperatura ambiente, enquanto a viscosidade das membranas lipídicas ronda 100 a 200 cP [11]. Considerando a dependência da anisotropia de fluorescência na viscosidade do meio, espera-se, para os fármacos incorporados nos magnetolipossomas, uma anisotropia significativamente inferior à obtida em glicerol.

As anisotropias de fluorescência dos compostos encapsulados nas diferentes formulações de AMLs e SMLs em estudo estão apresentadas na tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Valores de anisotropia de fluorescência (r) para os compostos **A** e **B** em SMLs e AMLs, abaixo (25 °C) e acima (55 °C) da temperatura de transição do DPPC. Os valores de anisotropia dos compostos em glicerol à temperatura ambiente são mostrados para comparação.

	Formulação	T (°C)	r	
			Composto A	Composto B
SMLS	DPPC (100%)	25	0,08 ± 0,04	0,03 ± 0,01
		55	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,02
	DPPC:CHEMS	25	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,01
		55	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,01
	DPPC:CHEMS:PEG	25	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,02
		55	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0,02
AMLs	DPPC (100%)	25	0,05 ± 0,01	0,13 ± 0,01
		55	0,02 ± 0,01	0,12 ± 0,01
	DPPC:CHEMS	25	0,15 ± 0,01	0,23 ± 0,01
		55	0,12 ± 0,01	0,21 ± 0,01
	DPPC:CHEMS:PEG	25	0,17 ± 0,02	0,23 ± 0,004
		55	0,12 ± 0,02	0,19 ± 0,003
	Glicerol	25	0,33	0,30

Os valores de anisotropia permitem concluir que ambos os compostos se encontram localizados na região interna da bicamada lipídica. A anisotropia de fluorescência dos compostos encapsulados nas diferentes formulações de AMLs e SMLs diminui à temperatura de 55 °C, para todas as formulações estudadas. Este comportamento pode ser atribuído a uma diminuição no tempo de correlação rotacional do fluoróforo, permitindo detetar a transição da fase gel para a fase líquido-cristalina, resultante da diminuição da microviscosidade da membrana. Desta forma, os resultados de anisotropia permitiram concluir que os fármacos estão localizados maioritariamente na membrana dos MLs, uma vez que foi possível observar a transição de fase gel para a fase líquido-cristalina do DPPC, componente maioritário de todas as formulações.

As formulações de DPPC 100% revelam valores de anisotropia relativamente baixos, apontando para uma localização mais interna dos compostos na membrana, uma vez que a viscosidade da membrana diminui de fora para dentro da membrana [12,13]. Por outro lado, o efeito do hemisuccinato de colesterol (CHEMS) nas membranas, conforme observado pelo aumento de anisotropia de fluorescência, poderá indicar uma afinidade dos compostos para estas moléculas [14]. É de notar também um comportamento semelhante para as formulações contendo CHEMS e PEG.

A diminuição na viscosidade local das membranas (ou por aquecimento, ou por adição de CHEMS) poderá facilitar uma penetração mais profunda destes compostos nas bicamadas lipídicas,

sentindo um ambiente menos hidratado. Desta forma, estes compostos revelam-se promissores na monitorização de alterações na fluidez das membranas lipídicas.

4.4.2. Eficiências de encapsulamento

Os ensaios de eficiência de encapsulamento dos compostos **A** e **B** nos magnetolipossomas permitem-nos estimar a percentagem de composto encapsulado nos sistemas. Para estes ensaios, foram realizadas três réplicas para cada formulação de magnetolipossomas, tendo sido também realizados ensaios em lipossomas para comparação. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 4.11.

Tabela 4.11 - Eficiências de encapsulamento dos compostos A e B em AMLs, SMLs e lipossomas 100% DPPC.

	Eficiência de encapsulamento	
	Composto A	Composto B
SMLs	54,(7) $\pm$ 12	65,(2) $\pm$ 1,3
AMLs	97,1 $\pm$ 0,1	88,(9) $\pm$ 2,7
Lipossomas	95,(7) $\pm$ 2	86,(4) $\pm$ 6

No geral, obtiveram-se eficiências de encapsulamento razoáveis. Os melhores valores foram observados para os AMLs e lipossomas, sendo os valores semelhantes e superiores a 85%, para ambos os compostos. Por outro lado, os SMLs registaram eficiências de encapsulamento mais baixas, entre os 55% e os 65% para os compostos **A** e **B**, respetivamente. Ao contrário do que acontece para os AMLs, a técnica de síntese dos SMLs é mais complexa e leva a perdas de composto aquando das lavagens, reduzindo assim a eficiência de encapsulamento. As eficiências de encapsulamento obtidas apontam para um uso promissor destes nanotransportadores no transporte magneticamente guiado dos compostos **A** e **B**, e como agentes para quimioterapia e hipertermia simultâneas em terapia oncológica.

4.5. **Ensaio de fusão com modelos de membranas**

De modo a inferir se os magnetolipossomas serão capazes de se fundir com as membranas celulares, libertando assim o seu conteúdo, foram feitos ensaios de fusão com modelos de membrana celular, os GUVs (do inglês, *giant unilamellar vesicles*). Este estudo foi realizado com base no efeito de inibição ("quenching") da intensidade de fluorescência dos compostos, provocado pela presença das nanopartículas magnéticas (que absorvem numa região larga de comprimentos de onda). Os espectros

de fluorescência dos compostos encapsulados em lipossomas e magnetolipossomas da mesma formulação, apresentados na figura 4.12, mostram que, para a mesma concentração de composto, a intensidade de fluorescência dos compostos é maior nos lipossomas do que nos magnetolipossomas, devido à absorção de parte dessa emissão pelas nanopartículas nos MLs. Verificamos ainda que o efeito de *quenching* é maior para os SMLs, devido à maior proximidade dos compostos ao cluster de nanopartículas neste tipo de estrutura.

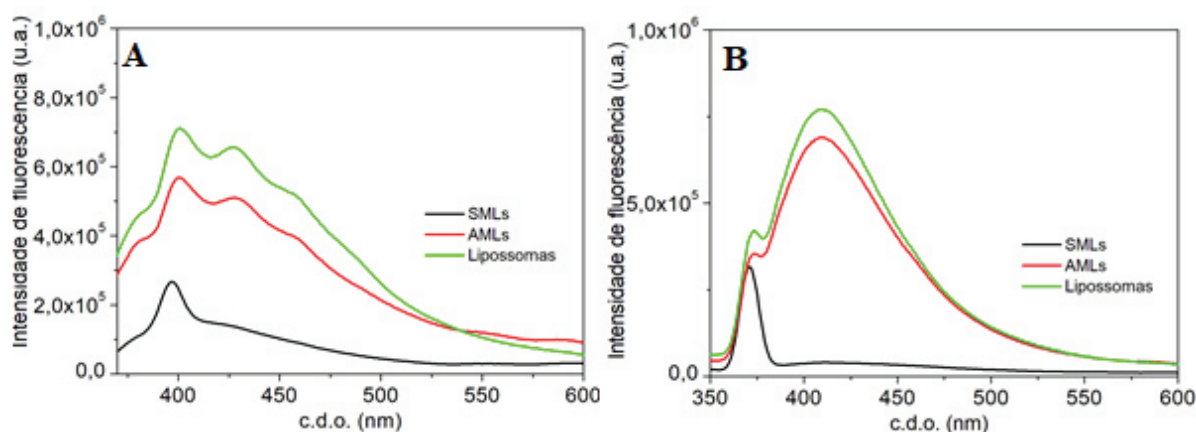


Figura 4.12 - Espectros de emissão de fluorescência dos compostos (10^{-6} M) A - **A** ($\lambda_{exc} = 350\text{nm}$) e B - **B** ($\lambda_{exc} = 330\text{nm}$) em lipossomas, AMLs e SMLs de DPPC (100 %).

Foram realizados ensaios de fusão a diferentes valores de pH, de modo a estudar a influência do pH na capacidade de fusão com as membranas. Estes ensaios foram realizados para as formulações contendo CHEMS, uma vez que esta molécula a pH=7 apresenta uma fase lamelar, enquanto a pH=5 passa a uma fase hexagonal que facilita a passagem dos compostos encapsulados [15].

De forma a estudar a capacidade de fusão dos vários sistemas, foram comparados os espectros de fluorescência dos magnetolipossomas, antes e depois da adição de GUVs (figuras 4.13 e 4.14, como exemplos). Para cada formulação foram efetuadas 3 réplicas e obtido o valor da razão entre os picos antes e depois da fusão.

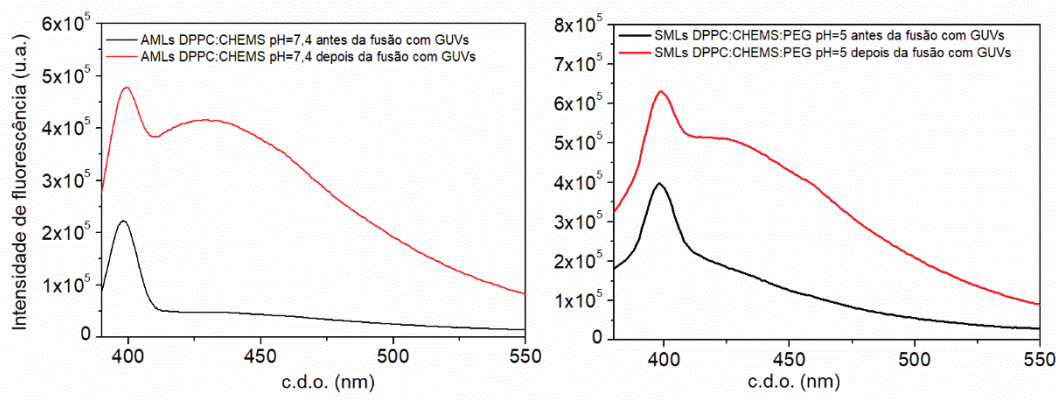


Figura 4.13 - Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 350\text{nm}$) do composto **A** (10^{-6} M) encapsulado em AMLs de DPPC:CHEMS a pH=7,4 (à esquerda) e em SMLs de DPPC:CHEMS:PEG pH 5 (à direita) e em antes e depois da fusão com GUVs.

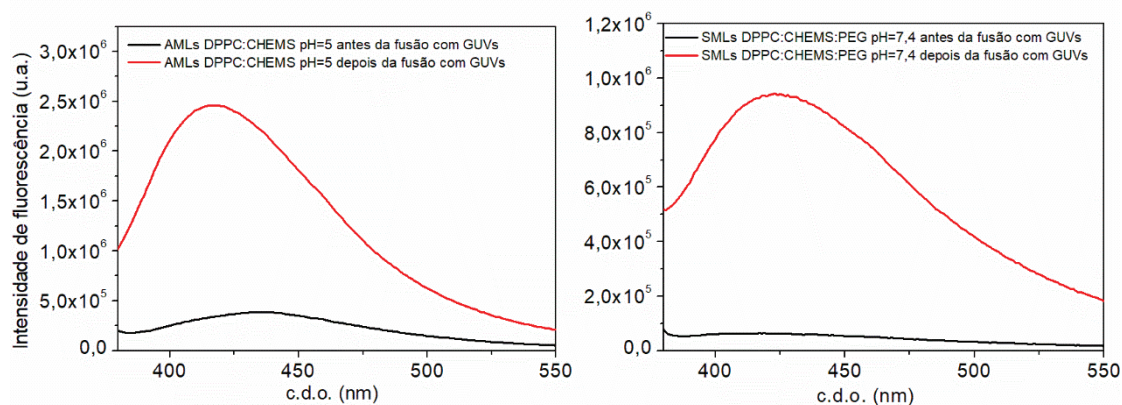


Figura 4.14 - Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 330\text{nm}$) do composto **B** (10^{-6} M) encapsulado em AMLs de DPPC:CHEMS a pH=5 (à esquerda) e em SMLs de DPPC:CHEMS:PEG a pH=7,4 (à direita) e antes e depois da fusão com GUVs.

Através da análise dos gráficos, é possível observar um aumento significativo das bandas de emissão dos compostos **A** e **B**, após a fusão com os GUVs. Este comportamento resulta do efeito de unquenching, ou seja, uma diminuição da inibição de fluorescência dos compostos pelas nanopartículas magnéticas. Após a interação com os GUVs, se ocorrer fusão, forma-se uma estrutura em bicamada maior que leva ao aumento da distância entre os compostos e as nanopartículas, com consequente diminuição da inibição de fluorescência. Assim, o efeito de unquenching, observado após a interação com os GUVs, comprova que os nanossistemas preparados são promissores para transporte de compostos antitumorais, uma vez que são capazes de se fundir com as membranas modelo.

A influência do pH no processo de fusão foi estudada através da razão entre os picos no espectro de fluorescência, antes e depois da fusão com GUVs (Tabela 4.12). Neste estudo, quanto maior o efeito

de *unquenching*, associado à capacidade de fusão do sistemas conforme descrito acima, menor será o valor da razão entre picos.

Tabela 4.12 - Razão da intensidade de fluorescência dos compostos **A** e **B**, encapsulados nas diferentes formulações de magnetolipossomas, antes e depois da interação com GUVs, a pH 5 e 7,4.

		Composto A		Composto B	
		pH=7,4	pH=5	pH=7,4	pH=5
AMLs	DPPC (100 %)	0,70 ± 0,02	—	0,68 ± 0,08	—
	DPPC:CHEMS	0,58 ± 0,02	0,57 ± 0,04	0,07 ± 0,03	0,13 ± 0,02
	DPPC:CHEMS:PEG	0,87 ± 0,10	0,89 ± 0,05	0,07 ± 0,05	0,16 ± 0,05
SMLs	DPPC (100 %)	0,23 ± 0,03	—	0,10 ± 0,01	—
	DPPC:CHEMS	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,14 ± 0,01
	DPPC:CHEMS:PEG	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,01

Tendo em conta que o efeito de *quenching* é muito mais pronunciado para os SMLs do que para os AMLs, a discussão destes resultados só faz sentido em termos de comparação de forma independente para os SMLs e para os AMLs. De qualquer forma, para as formulações que contêm CHEMS, é possível verificar que, ao contrário do que seria expectável, não se observa uma diferença significativa da capacidade de fusão para pH=5. Estudos recentes mostraram que a protonação do CHEMS (que leva à passagem à fase hexagonal) pode ocorrer num intervalo de pHs entre 4,5 e 6,5, pelo que, nestes ensaios, a fase lamelar do CHEMS poderá ainda ser predominante, não promovendo uma maior capacidade fusogénica [15]. Assim, no futuro, será de interesse fazer um estudo mais alargado de valores de pH.

Por outro lado, é possível observar que a adição de PEG parece reduzir a capacidade de fusão, o que poderá indicar um aumento da rigidez da membrana, que dificulta a libertação dos compostos. Assim, o PEG poderá ter um papel que mascara a sensibilidade do sistema ao pH, de tal forma que não é possível observar grandes diferenças entre os ensaios a pH=7,4 e a pH=5.

Estes resultados também corroboram o que foi observado através das medidas de anisotropia de fluorescência, uma vez que mostram que a localização dos compostos numa região de maior rigidez (nas formulações que contêm CHEMS e PEG) causa uma maior dificuldade para a sua libertação dos nanossistemas.

4.6. Ensaios de liberação dos compostos

A taxa de liberação dos compostos foi avaliada como descrito em 3.10 e para cada sistema foram feitas 3 réplicas. A figura 4.15 mostra, a título de exemplo, os resultados do ensaio para SMLs a pH=7,4 para o composto **B**. Neste gráfico é possível observar que nos primeiros 50 minutos a liberação é mais acelerada e que a partir dos 200 min a liberação ocorre de forma mais lenta. Este comportamento é geral para todos os sistemas e para ambos os compostos em estudo.

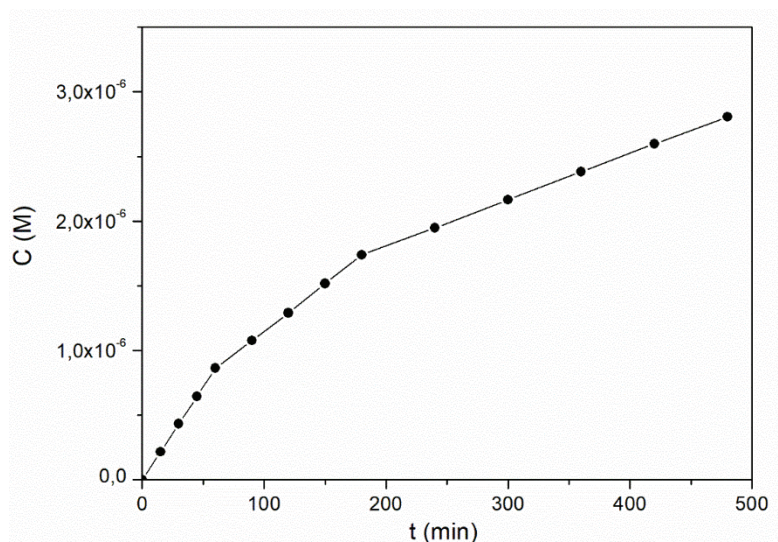


Figura 4.15 - Representação da liberação do composto **B** em SMLs 100% DPPC a pH 7,4 ao longo do tempo.

Estes resultados foram ajustados ao modelo de Korsmeyer-Pepper (equação 3.5), de modo a aferir acerca da taxa de liberação (k) e do tipo de transporte (n), para cada um dos ensaios. Os resultados deste estudo são apresentados na tabela 4.13.

Tabela 4.13 - Valores da taxa de liberação (k), tipo de transporte (n) e coeficiente de determinação (R^2) do ajuste dos ensaios de liberação dos compostos **A** e **B** encapsulados em AMLs e SMLs, a pH 7,4 e pH 5.

	Formulação	pH	k (min^{-1})		n		R^2	
			A	B	A	B	A	B
SMLs	DPPC	7,4	0,16	0,11	0,61	0,59	0,997	0,996
		5	0,16	0,08	0,58	0,60	0,996	0,997
	DPPC:CHEMS	7,4	0,15	0,09	0,62	0,59	0,997	0,996
		5	0,17	0,11	0,58	0,57	0,995	0,996
	DPPC:CHEMS:PEG	7,4	0,17	0,08	0,60	0,59	0,997	0,996
		5	0,17	0,09	0,58	0,58	0,996	0,997
	DPPC	7,4	0,10	0,07	0,60	0,59	0,997	0,996
		5	0,10	0,04	0,60	0,67	0,996	0,994
	DPPC:CHEMS	7,4	0,11	0,06	0,60	0,61	0,997	0,997
		5	0,09	0,05	0,60	0,58	0,996	0,996
AMLs	DPPC:CHEMS:PEG	7,4	0,11	0,06	0,61	0,62	0,997	0,997
		5	0,12	0,05	0,60	0,59	0,997	0,996

A partir dos resultados obtidos, é possível observar que os SMLs apresentam, em geral, uma taxa de liberação superior aos AMLs, para os dois compostos em todas as formulações. Mais ainda, o composto **B** apresentou taxas de liberação inferiores às do composto **A**.

A taxa de liberação de composto a pH=5 não revelou grande diferença quando comparado com as mesmas formulações a pH=7,4. Analisando as formulações de DPPC:CHEMS:PEG, observamos que a variação na taxa de liberação para os diferentes pHs é quase nula, pelo que podemos concluir que a presença do PEG nas membranas torna os sistemas mais rígidos, impedindo um favorecimento da liberação de composto por parte do CHEMS. O estudo da taxa de liberação dos compostos encapsulados nos AMLs não mostraram diferenças significativas entre as formulações e os diferentes pHs para ambos os compostos.

Os valores de n apontam para uma difusão não-Fickiana, uma vez que estão compreendidos entre 0,5 e 0,89, o que significa que há uma combinação de difusão e erosão [16]. Os valores dos coeficientes de determinação para todos os sistemas são superiores a 0,99, o que indica bons ajustes ao modelo de Korsmeyer-Pepper.

4.7. Referências do Capítulo 4

1. Weddemann A, Ennen I, Regtmeier A, Albon C, Wolff A, Eckstädt K, et al. Review and outlook: from single nanoparticles to self-assembled monolayers and granular GMR sensors. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2010 Nov 22;1:75–93.
2. Pereira DSM, Cardoso BD, Rodrigues ARO, Amorim CO, Amaral VS, Almeida BG, et al. Magnetoliposomes Containing Calcium Ferrite Nanoparticles for Applications in Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutics*. 2019 Sep 14;11(9):477.
3. Rodrigues ARO, Ramos JMF, Gomes IT, Almeida BG, Araújo JP, Queiroz MJRP, et al. Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs. *RSC Advances*. 2016;6(21):17302–13.
4. Cardoso BD, Rio ISR, Rodrigues ARO, Fernandes FCT, Almeida BG, Pires A, et al. Magnetoliposomes containing magnesium ferrite nanoparticles as nanocarriers for the model drug curcumin. *Royal Society Open Science*. 2018 Oct 17;5(10):181017.
5. Khanna L, Verma NK. Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity study of calcium ferrite nanoparticles. *Materials Science in Semiconductor Processing*. 2013 Dec;16(6):1842–8.
6. Rodrigues ARO, Almeida BG, Rodrigues JM, Queiroz MJRP, Calhella RC, Ferreira ICFR, et al. Magnetoliposomes as carriers for promising antitumor thieno[3,2-b]pyridin-7-arylamines: photophysical and biological studies. *RSC Advances*. 2017;7(25):15352–61
7. Curtis H, Barnes SN. *Biology*. 5th Edition. New York: Worth; 1989.
8. Derakhshandeh K, Kashanian, Hemati Azandaryani A. New surface-modified solid lipid nanoparticles using N-glutaryl phosphatidylethanolamine as the outer shell. *International Journal of Nanomedicine*. 2011 Nov;2393.
9. Valeur B. *Molecular Fluorescence. Methods*. Wiley VCH Weinheim; 2001.
10. Leonenko ZV, Finot E, Ma H, Dahms TES, Cramb DT. Investigation of Temperature-Induced Phase Transitions in DOPC and DPPC Phospholipid Bilayers Using Temperature-Controlled Scanning Force Microscopy. *Biophysical Journal*. 2004 Jun;86(6):3783–93
11. Israelachvili JN, Marčelja S, Horn RG. Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1980 May 17;13(2):121–200.
12. Bahri MA, Heyne BJ, Hans P, Seret AE, Mouithys-Mickalad AA, Hoebeke MD. Quantification of lipid bilayer effective microviscosity and fluidity effect induced by propofol. *Biophysical Chemistry*. 2005 Apr;114(1):53–61.
13. Tilley L, Thulborn KR, Sawyer WH. An assessment of the fluidity gradient of the lipid bilayer as determined by a set of n-(9-anthroyloxy) fatty acids (n = 2, 6, 9, 12, 16). *Journal of Biological Chemistry*. 1979 Apr;254(8):2592–4.
14. Massey JB. Effect of cholesteryl hemisuccinate on the interfacial properties of phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1998 Dec;1415(1):193–204
15. Klasczyk B, Panzner S, Lipowsky R, Knecht V. Fusion-Relevant Changes in Lipid Shape of Hydrated Cholesterol Hemisuccinate Induced by pH and Counterion Species. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010 Nov;114(46):14941–6.

16. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001 May;13(2):123–33.

Capítulo 5 - Conclusão e perspectivas futuras

5.1. Conclusão

Neste trabalho foi possível preparar e caracterizar nanopartículas magnéticas de ferrites mistas de manganês e magnésio e ferrites mistas de manganês e cálcio. A análise de XRD confirmou a sua síntese, com tamanhos médios das cristalites de 8 nm a 33 nm, semelhantes aos obtidos por SEM. Os ensaios de SQUID permitiram concluir que as partículas de $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ com citrato, $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ com citrato 1 e $\text{Mn}_{0.5}\text{Mg}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ com citrato 2 apresentam um comportamento superparamagnético. As nanopartículas de $\text{Mn}_{0.5}\text{Ca}_{0.5}\text{Fe}_2\text{O}_4$ com citrato foram selecionadas para a incorporação em magnetolipossomas, por serem as que apresentaram melhores propriedades magnéticas e pureza na análise de XRD.

Foi realizado o estudo fotofísico de dois novos compostos potencialmente antitumorais derivados de tienopiridina, em diferentes solventes. Ambos os compostos apresentaram emissão de fluorescência em vários solventes, também quando incorporados em lipossomas e magnetolipossomas. A sensibilidade da emissão ao meio envolvente torna estes compostos também úteis como potenciais sondas solvatocrômicas.

As nanopartículas selecionadas foram incorporadas em lipossomas (formando magnetolipossomas aquosos) ou cobertas por uma bicamada lipídica (originando magnetolipossomas sólidos), sendo os nanossistemas carregados com os novos potenciais fármacos. A técnica de DLS revelou tamanhos promissores para os MLs, sempre inferiores a 200 nm, um tamanho compatível com a sua aplicação biomédica. Os estudos de anisotropia de fluorescência em estado estacionário permitiram concluir que os compostos antitumorais se localizam na bicamada lipídica dos MLs. A interação não específica entre os magnetolipossomas e modelos de membrana (GUVs) foi estudada, tendo os MLs revelado serem capazes de se fundirem com as membranas modelo, confirmada pelo efeito de *unquenching* da emissão dos fármacos após interação com os GUVs. Por fim, foram realizados ensaios de libertação dos fármacos, que mostraram uma libertação mais rápida para os SMLs.

5.2. Perspetivas futuras

Os resultados obtidos neste trabalho são relevantes para aplicações futuras de entrega dos novos fármacos potencialmente antitumorais, usando magnetolipossomas como sistemas de transporte, de forma a reduzir os efeitos citotóxicos e aumentar o tempo de circulação dos fármacos.

Como desenvolvimento futuro do trabalho desta dissertação, podem ser traçadas as seguintes linhas de evolução:

- Síntese de nanopartículas com outros revestimentos, de forma a evitar agregação e permitindo maior estabilidade em meio aquoso, dotando ainda as partículas de grupos livres para conjugar diferentes biomoléculas;
- Realização de ensaios de sedimentação com magnetolipossomas sólidos;
- Realizar novos estudos de influência do pH, nomeadamente estudos de fusão com membranas por FRET, de modo a investigar a influência do CHEMS;
- Preparação de magnetolipossomas funcionalizados com moléculas com afinidade para recetores sobre-expressos nas células tumorais, como o folato e o RGD, com o objetivo de torná-los mais específicos para as células tumorais;
- Realizar estudos de interação com membranas modelo (GUVs) dos magnetolipossomas marcados com sondas específicas;
- Avaliação da taxa de absorção específica (SAR) das nanopartículas sintetizadas, para avaliar a sua capacidade de hipertermia magnética;
- Realizar ensaios de libertação dos compostos na presença de um campo magnético externo;
- Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas magnéticas e dos magnetolipossomas;
- Ensaios em linhas celulares normais e tumorais dos magnetolipossomas com os compostos antitumorais encapsulados, para avaliar o seu potencial em terapia dual do cancro (combinando hipertermia magnética e quimioterapia).