



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

TÓPICOS EM BIOFÍSICA E BIONANOSSISTEMAS

Preparação de magnetolipossomas e interação com membranas

**(MUDAR A DATA ANTES DE
ENTREGAR!!!)**

Beatriz Jesus PG50242
Catarina Oliveira PG50287
Henrique Nóbrega PG50412
João Mirra PG50482
Orlando Cunha PG50672

23 outubro 2022

1 Introdução

Este trabalho visa o desenvolvimento de magnetolipossomas aquosos como nanotransportadores do fármaco modelo curcumina, combinando membranas lipídicas com nanopartículas magnéticas de ferrite de mangânes. A capacidade de entrega de fármacos do sistema será avaliada por FRET, num ensaio de fusão membranar, onde serão usados SUVs (do inglês, small unilamellar vesicles) como modelos de membrana. Neste ensaio, a curcumina será utilizada como fármaco modelo e molécula doadora de energia, e a sonda hidrofóbica Nile Red será encapsulada em SUVs e atuará como aceitador de energia.

1.1 Os magnetolipossomas

Os magnetolipossomas (lipossomas que contêm nanopartículas magnéticas, MLs) são sistemas terapêuticos promissores que podem ser guiados e localizados em locais específicos pela aplicação de um gradiente de campo magnético externo, resultando numa alternativa à quimioterapia convencional, através da entrega de fármacos controlada magneticamente e de hipertermia magnética.

Os magnetolipossomas podem ser divididos em magnetolipossomas aquosos (AMLs), nos quais as nanopartículas magnéticas estão encapsuladas na fase aquosa interior, e magnetolipossomas sólidos (SMLs), nos quais não existe núcleo aquoso e há um cluster de nanopartículas rodeado por uma camada lipídica. Neste trabalho foram utilizados os AMLs.

1.2 Nanopartículas superparamagnéticas e superparamagnetismo

A componente magnética dos magnetolipossomas é tipicamente baseada em nanopartículas superparamagnéticas. O superparamagnetismo consiste num comportamento magnético caracterizado por elevada magnetização, mas apenas na presença de um campo externo. Ou seja, as nanopartículas magnéticas não se mantêm magnetizadas após remoção do campo magnético (ausência de histerese). Desta forma, a perda de magnetização depois do campo magnético externo ser removido evita a agregação, tornando este tipo de materiais adequados para aplicações biomédicas.

1.3 FRET

A interação não-específica dos magnetolipossomas com modelos de membranas celulares (SUVs) foi avaliada pela transferência de energia fármaco modelo curcumina (doador) para sonda hidrofóbica Nile Red (aceitante). FRET (do inglês, Förster Resonance Energy Transfer) é uma técnica de fluorescência que permite estudar interações moleculares e depende da transferência de energia de excitação eletrónica, não radiativa, entre dois fluoróforos.

Para que ocorra FRET, é necessário que:

1. O doador tenha um tempo de vida longo o suficiente para que a transferência de energia ocorra;
2. As moléculas doadoras e aceitantes devem estar a uma distância entre 1 e 10 nm, aproximadamente;
3. O espectro de absorção do fluoróforo aceitante deve sobrepor-se ao espectro de emissão de fluorescência do doador;
4. As orientações do dipolo do doador e do aceitante devem estar aproximadamente paralelas.

2 Protocolo Experimental

2.1 Preparação de nanopartículas de ferrite de mangânes pelo método de co-precipitação:

1. Aquecer a 90°C uma solução aquosa contendo 19 mL de água ultrapura, 1 M de hidróxido de sódio (NaOH 50%) e 0,05 M de citrato trissódico di-hidratado ($C_6H_9Na_3O_9$);
2. Preparar uma mistura contendo 500 μ L de $MnSO_4$, H_2O (0,033 M) e 500 μ L de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,066 M);
3. Adicionar, gota a gota e sob agitação magnética, a solução mistura preparada no ponto 2 à solução aquosa do ponto 1;
4. Após 2 horas a 90°C, sob agitação magnética, as nanopartículas são formadas.
5. Depois de formadas, as nanopartículas são lavadas com água ultrapura, por decantação magnética, de forma a remover restos de reação.

2.2 Preparação dos magnetolipossomas aquosos (AMLs) pelo método injeção etanólica:

1. Preparar uma solução aquosa de nanopartículas de concentração de 0,02 mg/ml em 5 ml;
2. Fazer uma mistura etanólica contendo Egg-PC (1x10⁻³ M) e curcumina (1x10⁻⁶ M), molécula que atuará como doador de energia;
3. Injetar a solução etanólica na dispersão de nanopartículas, gota a gota, sob vortex;
4. No final, fazer uma lavagem por decantação magnética com um magneto para remover as nanopartículas magnéticas não encapsuladas (que apresentam uma resposta magnética maior do que as nanopartículas encapsuladas).

2.3 Preparação de modelos de membrana (Small Unilamellar Vesicles, SUVs):

1. Preparar um mistura etanólica contendo Egg-PC (1x10⁻³ M) e a sonda hidrofóbica Nile Red (1x10⁻⁶ M) que atuará como aceitador de energia;
2. Injetar a solução etanólica em água, gota a gota, sob vortex.

2.4 Cálculos

As equações que vão ser utilizadas serão apenas três:

$$c_i v_i = c_f v_f \quad c = \frac{n}{v} \quad n = \frac{m}{M}$$

Para obter o volume de NaOH necessário para a diluição utilizou-se:

$$c_i v_i = c_f v_f \Rightarrow v_i = \frac{c_f v_f}{c_i} = \frac{1 \times 0.020}{18.94} = 1.056 \text{ mL} = 1056 \mu\text{L}$$

Sabendo que a solução final terá 20 mL de volume, terão de ser adicionados $20000 - 1056 = 18944 \mu\text{L}$ de água ultrapura ao NaOH diluído.

No caso do citrato, sendo a sua massa molar conhecida e sabendo a concentração final desejada, podemos, a partir das outras duas equações, calcular o número de moles necessárias para juntar à solução e, conseqüentemente, a massa de citrato que é preciso pesar na balança:

$$c = \frac{n}{v} \Rightarrow n = cv = 0.05 \times 20 \times 10^{-3} = 0.001 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \Rightarrow m = nM = 0.001 \times 294.1 = 0.294 \text{ g}$$

Seguindo o mesmo raciocínio para a solução de $MnSO_4 \cdot H_2O$ e $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, obtemos também as massas necessárias de cada componente.

Para a segunda e terceira parte da experiência foi necessário calcular os volumes iniciais de curcumina e de Nile-Red para efetuar as respectivas diluições e esses valores estão presentes na tabela, calculados também com a equação das diluições.

Depois de formadas as nanopartículas verificou-se que estas tinham uma $m = 266.21 \text{ mg}$ e ao adicionar 2ml de água tem-se uma $c_i = 262.21/2 = 131.105 \text{ mg/mol}$.

Posto isto queremos uma solução "mãe" com uma concentração final de $c_f = 1 \text{ mg/mol}$ e para isso é necessário diluir a anterior duas vezes. A solução inicial de nanopartículas é demasiado concentrada relativamente à concentração que se quer obter, por isso, se fosse realizada apenas uma diluição, o volume necessário para a efetuar seria quase insignificante e difícil de adquirir. Então para uma $c_f = 1 \text{ mg/mol}$ e para um $v_f = 5 \text{ ml}$ é preciso um $v_i = 0.038 \text{ ml}$. Tendo agora uma primeira solução mais diluída é finalmente possível obter a concentração de nanopartículas desejada de $c_f = 0.02 \text{ mg/mol}$ retirando $c_i = 0.1 \text{ ml}$ da primeira diluição.

Componentes	$c_i(\text{M})$	$v_i(\text{ml})$	$c_f(\text{M})$	$v_f(\text{mL})$	n(moles)	$M_W(\text{g/mol})$	m(g)
NaOH	18.94	*1.056*	1	20			
$C_6H_9Na_3O_9$			0.05	20	*0.001*	294.1	*0.294*
$MnSO_4 \cdot H_2O$			0.033	20	*0.00066*	169.02	*0.112*
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$			0.066	20	*0.00132*	270.3	*0.357*
Curcumina	2.88×10^{-4}	*0.02*	1×10^{-6}	5			
Nile Red	1×10^{-4}	*0.05*	1×10^{-6}	5			

Os valores colocados entre asteriscos foram calculados através das equações descritas acima.

3 Análise de Resultados

Utilizando os valores calculados na secção 2.4 observou-se que devido à baixa concentração tanto de dadores como de aceitadores os resultados obtidos não coincidiram com o expectável, pois outros processos como o efeito de coalescência introduziram erros inesperados. Por este motivo, aumentou-se a concentração de Curcumina e de Nile-Red e os resultados estão presentes na seguinte figura:

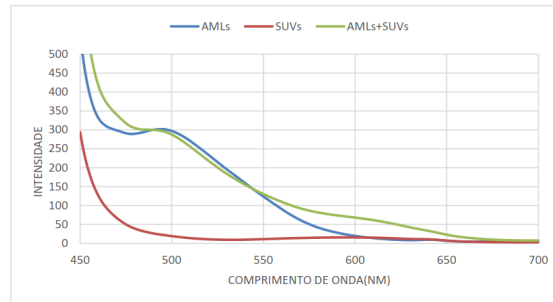


Figure 1: Intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda para as várias soluções

Inicialmente excitamos as soluções de AMLs e de SUVs, respetivamente, com um comprimento de onda de $\lambda_{exc} = 440 \text{ nm}$. Tendo em conta que este comprimento de onda, apenas se sobrepõe

ao espectro de absorção da curcumina será de esperar que apenas AMLs sejam excitados por esta energia. Realizando a espectro-fluorescência da solução de AMLs observou-se que para um comprimento de onda de aproximadamente 500 nm, ocorre uma elevada emissão de fluorescência, como representado no gráfico pela linha azul. Por outro lado, no caso dos SUVs, esta emissão não ocorre visualizando-se apenas um pequeno aumento da intensidade de fluorescência por volta dos 600nm devido à energia emitida por processos termo-geração - linha vermelha do gráfico anterior. Excitando a mistura de AMLs e SUVs com o mesmo comprimento de onda, é esperado, que devido à excitação da curcumina e à sobreposição dos espectros de emissão e absorção do doador e aceitador, respetivamente, ocorra uma transferência da energia do primeiro para o segundo, levando a uma diminuição da intensidade de fluorescência na zona de emissão da curcumina e um aumento na zona de emissão do Nile Red, como pode ser constatado visualmente no gráfico. Estes resultados comprovam a formação dos magnetolipossomas.

4 Conclusão

Neste trabalho foram desenvolvidos magnetolipossomas aquosos com sucesso, através da combinação de membranas lipídicas com nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês. Foi possível verificar a criação destes magnetolipossomas através da técnica de fluorescência FRET, onde ocorreu transferência de energia das moléculas dadoras (AMLs), para a aceitadora (SUVs), como era esperado.

Bibliografia

- Rodrigues, Ana Rita O, Bernardo G Almeida, João P Araújo et al. (2018). ‘Magnetoliposomes for dual cancer therapy’. In: *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines*. Elsevier, pp. 489–527.
- Rodrigues, Ana Rita O, Bernardo G Almeida, Juliana M Rodrigues et al. (2017). ‘Magnetoliposomes as carriers for promising antitumor thieno [3, 2-b] pyridin-7-arylamines: photophysical and biological studies’. In: *RSC advances* 7.25, pp. 15352–15361.
- Rodrigues, Ana Rita O, José MF Ramos et al. (2016). ‘Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs’. In: *RSC advances* 6.21, pp. 17302–17313.
- Valeur, Bernard and Mário Nuno Berberan-Santos (2012). *Molecular fluorescence: principles and applications*. John Wiley & Sons.