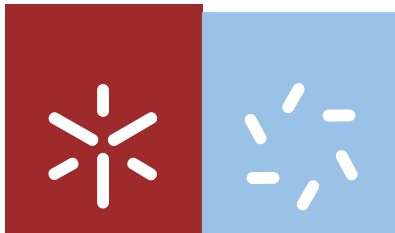


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ana Rita Oliveira Rodrigues

Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em nanopartículas de níquel com coroa de sílica para aplicações na entrega de fármacos antitumorais



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Ana Rita Oliveira Rodrigues

**Desenvolvimento de magnetolipossomas
baseados em nanopartículas de níquel
com coroa de sílica para aplicações na
entrega de fármacos antitumorais**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

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

Outubro de 2012

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Doutora Elisabete Castanheira Coutinho e Doutor Paulo Coutinho, por todas as oportunidades que já me deram assim como a disponibilidade e apoio incondicionais demonstrados ao longo do desenvolvimento deste projeto e de todo o meu percurso académico.

À Doutora Maria João R. P. Queiroz, do Centro de Química, pela cedência dos compostos potencialmente antitumorais.

Ao Professor Bernardo Almeida, pela avaliação preliminar das propriedades magnéticas das nanopartículas, realizada na Universidade do Porto.

Aos meus pais, irmão, avós e restante família pela educação e incentivos que desde sempre estiveram presente na minha vida.

Ao Nuno e aos meus meninos e meninas, pela paciência, constante incentivo e pela compreensão da minha ausência em alguns momentos.

A todos os meus colegas de laboratório por tornarem este projeto mais divertido e pela troca de ideias.

Também ao Departamento e Centro de Física, pela cedência do espaço, equipamentos e materiais necessários para a concretização deste projeto.

RESUMO

Na área biomédica, a nanotecnologia tem produzido avanços significativos no diagnóstico, terapêutica e bioengenharia. As nanopartículas magnéticas são de especial relevância, porque podem ser orientadas e localizadas no local de interesse, através de gradientes de campo magnético externo, usado no tratamento do cancro por hipertermia.

Neste trabalho, desenvolveram-se magnetolipossomas para aplicação na entrega de fármacos antitumorais, combinando membranas lipídicas com nanopartículas magnéticas de níquel, com e sem coroa de sílica.

Foram preparadas nanopartículas magnéticas de níquel usando diferentes meios microheterogêneos, as quais foram posteriormente cobertas com coroa de sílica. Foram avaliadas as propriedades estruturais, espectroscópicas e magnéticas das nanopartículas preparadas. Estas partículas foram incorporadas em lipossomas, ou também produzidas na presença de camadas de lípido ou tensioativo, obtendo-se assim magnetolipossomas.

Nestes magnetolipossomas, foram incorporados novos compostos fluorescentes com potencial atividade antitumoral, 1,3-diarilureias derivadas de tieno[3,2-*b*]piridinas, sintetizadas pelo CQ/UM. Os compostos foram previamente caracterizados por espectroscopias de absorção UV-visível e de fluorescência. Verificou-se que apresentam uma emissão de fluorescência sensível ao solvente, embora não sejam emissivos em solventes próticos. Os rendimentos quânticos de fluorescência determinados variam entre 6% e 65%, sendo os valores mais baixos obtidos em clorofórmio e os mais elevados em dimetilsulfóxido.

A localização dos compostos em lipossomas foi avaliada por medidas de anisotropia de fluorescência em estado estacionário, tendo-se concluído que estes se localizam maioritariamente na bicamada lipídica, sentindo a transição entre as fases gel e líquido-cristalina dos lípidos.

Foi realizado um estudo preliminar da interação dos magnetolipossomas com as células, usando GUVs (vesículas unilamelares gigantes) de lecitina de soja como modelos de membranas celulares. A interação foi avaliada por transferência de energia (FRET) entre os compostos sintetizados (doadores) e lípidos marcados incluídos nos GUVs, contendo o marcador fluorescente NBD (funcionando como aceitante).

O objetivo global deste trabalho foi o desenvolvimento de nanossistemas que aliam as propriedades magnéticas à capacidade de transportar novos princípios ativos antitumorais.

ABSTRACT

In the field of biomedicine, nanotechnology has produced significant advances in diagnosis, therapy and bioengineering. Magnetic nanoparticles are particularly important because they can be oriented and localized in the therapeutic site, by means of external magnetic field gradients used in cancer treatment by hyperthermia.

In this work, systems of nanometric dimensions based on magnetoliposomes were developed, for application in the delivery of antitumor drugs, by combining lipid membranes with nickel magnetic nanoparticles, with or without a silica shell.

Thus, nickel magnetic nanoparticles were prepared using different microheterogeneous media, which were then covered with a silica shell. The structural, spectroscopic and magnetic properties of the prepared nanoparticles were evaluated. These nanoparticles were either incorporated in liposomes or produced in the presence of a lipid or surfactant layer, thereby obtaining magnetoliposomes.

New fluorescent compounds with potential antitumor activity, 1,3-diarylureas derived from thieno[3,2-*b*]pyridines, synthesized by CQ/UM, were incorporated in these magnetoliposomes. The compounds were previously studied by UV-vis. absorption and fluorescence spectroscopies, and exhibited a solvent sensitive emission, although they are not emissive in protic solvents. Fluorescence quantum yields vary from 6% to 65%, the lower values being obtained in chloroform and the highest ones in dimethylsulfoxide.

The localization of the compounds in liposomes was assessed by fluorescence (steady state) anisotropy measurements. The results showed that these are mainly located in the lipid bilayer, feeling the transition between the gel phase and the liquid-crystalline phase of the lipids.

A preliminary study of the interaction of the magnetoliposomes with cells was performed using soybean lecithin GUVs (giant unilamellar vesicles) as models of cell membranes. The interaction was evaluated by resonance energy transfer (FRET) between the synthesized compounds (donors) and labeled lipids included in the GUVs, containing the fluorescent marker NBD (nitrobenzodiazole, acting as acceptor) at several different positions of the lipid molecule.

The overall goal of this work was the development of nanosystems that combine the magnetic properties with the ability to transport new potential antitumor drugs.

Índice

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 Importância da nanotecnologia	1
1.2 Moléculas e agregados moleculares organizados estudados	3
1.2.1 Derivados de tienopiridinas	3
1.2.2 Lipossomas	4
1.2.2.1 Constituição estrutural	4
1.2.2.2 Auto-organização	6
1.2.2.3 Estruturas e características	7
1.2.3 Nanopartículas magnéticas	9
1.2.3.1 Características estruturais	9
1.2.3.2 Propriedades magnéticas das nanopartículas	10
1.2.3.3 Estruturas núcleo-coroa	12
1.2.3.4 Níquel	13
1.2.4 Magnetolipossomas	14
1.2.4.1 Constituição e características estruturais	14
1.3 Aplicação das nanoestruturas como sistemas de entrega controlada e outras aplicações biomédicas	16
1.3.1 Aplicações das nanopartículas magnéticas	17
1.3.1.1 Sistemas de entrega controlada baseados em nanopartículas magnéticas	18
1.3.1.2 Aplicação das nanopartículas magnéticas em Termoterapia e imagiologia por ressonância magnética	18
1.3.2 Lipossomas como sistemas de nanoencapsulamento	19
1.3.3 Magnetolipossomas como sistemas de nanoencapsulamento	21
1.4 Referências do capítulo 1	23
 Capítulo 2 – Técnicas de análise e caracterização	 27
2.1 Radiação eletromagnética	27
2.2 Espectroscopia Molecular	28

2.2.1	Espetroscopia de absorção UV-Visível	29
2.2.1.1	Níveis de energia e transições eletrônicas	29
2.2.1.2	Lei de Lambert-Beer	32
2.2.1.3	Espetrofotômetro	34
2.2.2	Espetroscopia de fluorescência	35
2.2.2.1	Processos intramoleculares radiativos e não radiativos	36
2.2.2.2	Rendimento quântico de fluorescência	38
2.2.2.3	Anisotropia	39
2.2.2.4	Transferência de energia (FRET)	41
2.2.2.5	Espetrofluorímetro	42
2.3	Difusão Dinâmica de Luz (DLS)	43
2.4	Microscopia de fluorescência	45
2.5	Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)	45
2.6	Dispositivo de interferência quântica supercondutora (SQUID)	46
2.7	Referências do Capítulo 2	47
Capítulo 3 – Procedimento Experimental		48
3.1	Derivados de tienopiridinas	49
3.2	Estudo fotofísico dos compostos em solução	49
3.2.1	Rendimento quântico de fluorescência	50
3.3	Estudo fotofísico dos compostos em vesículas lipídicas	50
3.3.1	Preparação de lipossomas	51
3.3.2	Medidas de Anisotropia	52
3.4	Preparação de nanopartículas de níquel	52
3.4.1	Síntese de nanopartículas de níquel em soluções aquosas com surfactante	53
3.4.2	Síntese de nanopartículas de níquel em micelas invertidas	53
3.4.3	Síntese de nanopartículas de níquel cobertas de lípido ou AOT	56
3.4.4	Cobertura do núcleo das nanopartículas	57
3.5	Encapsulamento	58

3.6	Preparação de modelos de membrana	59
3.7	Estudos de transferência de energia	60
3.8	Referências do Capítulo 3	61
 Capítulo 4 – Resultados e discussão		63
4.1	Estudo fotofísico dos compostos em vários solventes	63
4.2	Estudo fotofísico dos compostos em membranas lipídicas	69
4.3	Caracterização das nanopartículas de níquel	72
4.3.1	Caracterização do tamanho e polidispersividade	73
4.3.2	Avaliação das propriedades magnéticas das nanopartículas	77
4.4	Estudo fotofísico dos compostos incorporados em magnetolipossomas	80
4.5	Caracterização dos tamanhos dos magnetolipossomas	82
4.6	Ensaio de interação com modelos de membrana por FRET	84
4.7	Referências do Capítulo 4	89
 Capítulo 5 – Conclusões e perspectivas futuras		91

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Importância da nanotecnologia

A nanotecnologia apresenta-se hoje, de tal forma presente em vários aspetos das nossas vidas, que não podemos rejeitar esta nova tecnologia. É uma área muito apelativa, devido a todas as suas potencialidades e aplicações nas mais variadas áreas. É interdisciplinar, na medida em que agrega várias ciências como a química, física, biologia e engenharias, integrando diversas áreas de interesse. Está em permanente crescimento, sendo por isso, alvo de grandes incentivos monetários governamentais e privados para investigação e desenvolvimento [1].

A nanotecnologia consiste na manipulação funcional de sistemas à escala molecular, ou seja, é a manipulação de objetos à escala nanométrica, que permite criar novos sistemas funcionais com características diferentes e inovadoras.

As nanoestruturas apresentam propriedades físicas e químicas muito diferentes daquelas que regem o mundo macroscópico. À medida que o tamanho dos sistemas diminui, os fenómenos físicos que regem a matéria alteram-se, 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.

Devido às suas propriedades físico-químicas únicas, os nanomateriais apresentam uma ampla gama de aplicações. Em 2005, foi publicado um artigo pela revista *BBC News* onde foram destacadas as áreas mais promissoras da Nanotecnologia, de onde se destacaram:

- ✓ Armazenamento, produção e conversão de energia;
- ✓ Incremento da produtividade da agricultura;
- ✓ Tratamento de água e remediação ambiental;
- ✓ Diagnóstico e rastreio de doenças;
- ✓ Sistemas de entrega de fármacos (em inglês, *Drug Delivery*);
- ✓ Processamento e armazenamento de alimentos;

- ✓ Poluição do ar e remediação;
- ✓ Construção;
- ✓ Monitorização da saúde;
- ✓ Vetores, deteção e controlo de pragas.

Com esta diversidade de aplicações, é fácil compreender a importância dos estudos e investimentos feitos em nanotecnologia por todo mundo. Tendo como fonte a Fundação Nacional da Ciência dos Estados Unidos (em inglês, *US National Science Foundation*), prevê-se que, nos próximos 10 a 12 anos, o investimento no mercado mundial da nanotecnologia chegue a cerca de um trilião de dólares.

A bionanotecnologia direciona as aplicações da nanotecnologia para as ciências da vida, combinando os avanços da biologia com os das engenharias. Tem como principal objetivo o fabrico de nanodispositivos e nanomateriais para atuação biológica. É um campo com inúmeras aplicações e potencialidades em diversas áreas, como a nanomedicina (diagnóstico e terapia), física médica, desenvolvimentos de novos nanofármacos (sistemas de entrega controlada de fármacos), nanocosmética, entre outros.

Uma das áreas mais promissoras em bionanotecnologia é o desenvolvimento de sistemas de encapsulamento e libertação controlada de fármacos. Os seus enormes benefícios fazem com que, atualmente, seja um campo de investigação de grande importância a nível mundial. Existem vários tipos de sistemas de nanoencapsulamento a ser estudados, cada um com peculiaridades associadas que devem ser levadas em consideração na sua escolha.

Dos sistemas de nanoencapsulamento melhor estudados, destacam-se os lipossomas, pequenos vesículos esféricos constituídos por moléculas lipídicas de origem natural, não tóxica e biodegradável. Também os magnetolipossomas se destacam como um sistema promissor. Combinam as já conhecidas e inovadoras características dos lipossomas com nanopartículas magnéticas incorporadas. Desta forma, os magnetolipossomas podem ser conduzidos a um alvo específico. Com este mecanismo de transporte, a droga encapsulada é libertada apenas na zona de interesse (por exemplo, um tumor), sem que as restantes células saudáveis sejam afetadas. Sendo os magnetolipossomas um sistema ainda pouco estudado e

considerando todo o seu potencial, considera-se que este sistema de libertação controlada de fármacos deve então ser alvo de maior investigação.

Sendo relativamente recente, a bionanotecnologia encontra-se em permanente expansão, pelo que, a todo o momento, surgem novos estudos. Estudos de toxicidade dos sistemas devem ser efetuados antes da sua introdução no mercado, de maneira a que estes sejam somente benéficos para a sociedade. Assim, algumas das recentes discussões são referentes à aplicação da nanotecnologia com responsabilidade social, incluindo o uso de “Química Verde”, um conceito que relata uma geração de resíduos totalmente desprovidos de poluentes para o meio ambiente.

1.2 Moléculas e agregados moleculares organizados estudados

Neste subcapítulo vão ser abordados os compostos potencialmente antitumorais, nanopartículas magnéticas e agregados moleculares estudados, de modo a compreender os seus mecanismos de acção.

1.2.1 Derivados de tienopiridinas

Na indústria farmacêutica têm surgido vários compostos bastante promissores no tratamento de várias doenças. Os compostos utilizados neste estudo são ureias derivadas de tienopiridinas. São moléculas biologicamente ativas de bastante interesse, uma vez que possuem diferentes potencialidades biológicas. São considerados agentes antitumorais [2], inibidores dos recetores não específicos de Src quinase [3] e inibidores dos recetores de tirosina quinase [2,4,5].

Na nossa investigação, a propriedade mais importante destes compostos cinge-se ao facto de se revelarem antitumorais contra vários tipos de células malignas. Inibem facilmente o crescimento de linhas celulares tumorais MCF-7 (adenocarcinoma da mama), A375-C5 (melanoma) e NCI-H460 (células de cancro pulmonar de média dimensão). Compostos deste tipo foram avaliados nestas linhas celulares tumorais e apresentaram valores bastante baixos de GI_{50} (concentração que inibe o crescimento de 50% das células) nas linhas celulares estudadas [6].

A síntese destes compostos fluorescentes foi realizada no Centro de Química da Universidade do Minho (CQ/UM) [3,6]. As estruturas químicas das ureias derivadas de tienopiridinas encontram-se na figura 1.1.

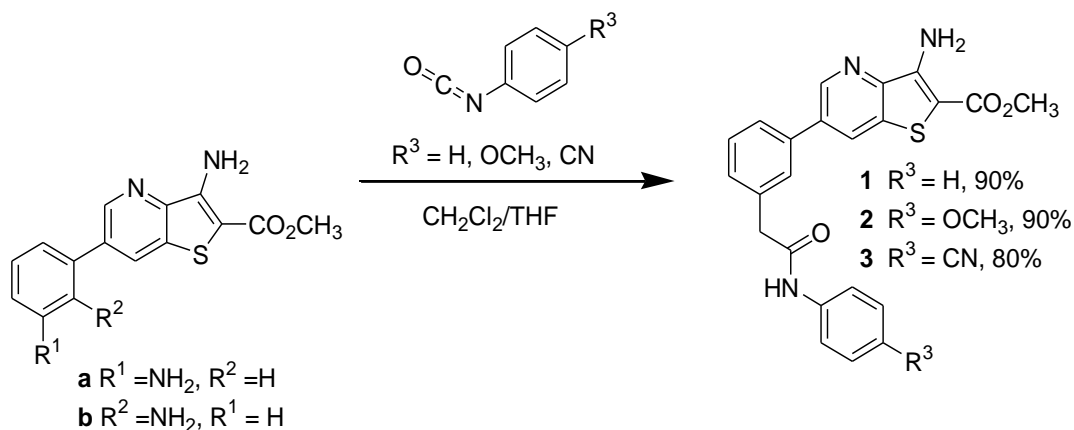


Figura 1.1 – Esquema da síntese de diarilureias derivadas de tieno[3,2-*b*]piridinas **1-3**. As percentagens são os rendimentos da reação de síntese.

1.2.2 Lipossomas

1.2.2.1 Constituição estrutural

As unidades estruturais constituintes dos lipossomas são moléculas anfipáticas/anfifílicas denominadas de fosfolípidos (principais constituintes da membrana biológica). Estas moléculas possuem uma cabeça polar ou hidrofílica (que possui afinidade por água) constituída por um grupo fosfato e uma base (colina, etanolamina, glicerol, etc.), e uma cauda apolar ou hidrofóbica (que repele moléculas de água) constituída por cadeias de ácidos gordos (figura 1.2). Esta característica é fundamental para as células, uma vez que estabelece uma interface entre o meio intracelular e o meio extracelular.

Os fosfolípidos são caracterizados por uma temperatura de transição de fase (T_m), na qual uma membrana lipídica passa de uma fase gel (onde a cadeia hidrocarbonada do lípido se encontra numa fase ordenada) para uma fase líquido-cristalina (em que as caudas ficam com movimentos mais livres e as cabeças hidrofílicas agrupadas tornam-se completamente hidratadas).

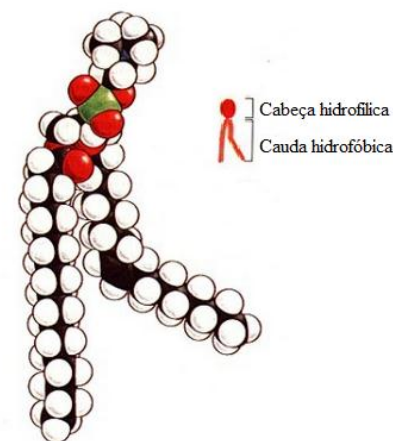


Figura 1.2 – Ilustração de um fosfolípido.

A transição da fase organizada para a fase líquido-cristalina (fase desordenada ou fluida) é sempre uma reação endotérmica (absorve calor). A temperatura de transição depende da composição dos fosfolípidos, aumentando com o comprimento da cauda e diminuindo com o grau de insaturação da mesma.

As moléculas anfifílicas, quanto à carga elétrica, dividem-se em iônicas (catiônicas ou aniônicas), não iônicas (neutras) e zwitteriônicas (neutras, mas que possuem cargas opostas em diferentes átomos).

Existem vários tipos de fosfolípidos com diferentes propriedades físicas e químicas. Abaixo são apresentadas as estruturas (figura 1.3) e algumas características químicas (tabela 1.1) dos fosfolípidos que vamos usar na formulação dos nossos lipossomas [7-9].

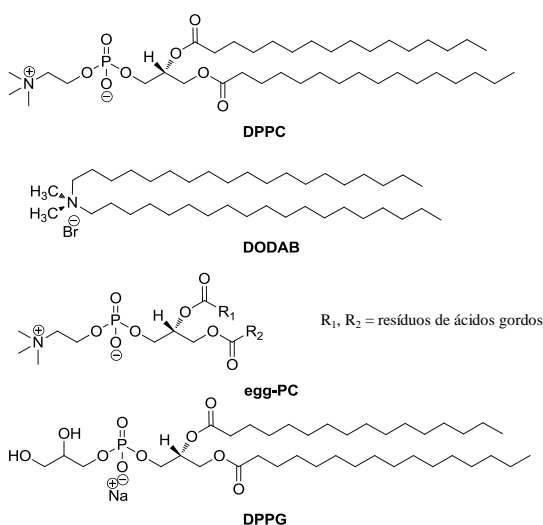


Figura 1.3 - Estruturas químicas dos diferentes lípidos.

Tabela 1.1 - Características químicas de diferentes lípidos.

Fosfolípido	Carga elétrica	T _m
DODAB (<i>brometo de dioctadecildimetilamínio</i>)	Catiónica	45 °C [7]
DPPC (<i>dipalmitoilfosfatidilcolina</i>)	Zwitteriónica	41 °C [8]
DPPG (<i>dipalmitoilfosfatidilglicerol</i>)	Aniónica	39,6 °C [9]
Egg-PC (<i>fosfatidilcolina do ovo (lecitina)</i>)	Zwitteriónica	muito baixa

1.2.2.2 Auto-organização

Auto-organização (em inglês, *self-assembling*) é o processo em que um sistema desordenado forma uma estrutura organizada devido às interações locais entre as unidades do sistema (monómeros).

Em meio aquoso, os fosfolípidos são obrigados a adotar orientações bem definidas (auto-organização) devido às interações hidrofílicas/hidrofóbicas, interações eletrostáticas e interações de van der Waals. Formam estruturas bem organizadas, de forma a evitar o contacto entre a parte não polar e a água, energeticamente desfavorável, e mantendo em simultâneo o contacto entre as moléculas de água e a parte polar dos fosfolípidos [10].

Durante a organização molecular dos fosfolípidos em água, os grupos polares hidrofílicos permanecem em contacto com a fase aquosa e as regiões apolares hidrofóbicas ficam em contacto direto entre si. Esta técnica de auto-organização dos fosfolípidos em água é referida como um processo de nanofabricação “*bottom-up*”, uma vez que a estrutura final é obtida da organização de estruturas mais pequenas. É uma técnica bastante importante em bionanotecnologia. Utilizada como método de nanofabricação, imita as estratégias da auto-organização molecular para a organização de estruturas moleculares bem definidas.

Dependendo das características físicas e das propriedades químicas da cabeça e cauda das moléculas anfifílicas, quando hidratadas, formam-se diferentes estruturas moleculares organizadas, como micelas normais ou invertidas, bicamadas lipídicas e ainda vários tipos de lipossomas (figura 1.4).

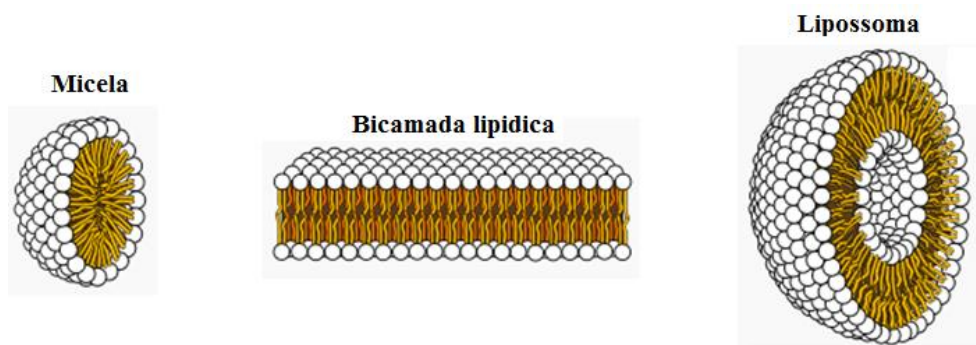


Figura 1.4 - Ilustração esquemática de diferentes estruturas moleculares organizadas.

1.2.2.3 Estruturas e características

Os lipossomas são pequenas vesículas esféricas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolípidos que se organizam espontaneamente em meio aquoso (figura 1.5). São usados como veículos de transporte na administração de nutrientes, genes e fármacos.

São estruturalmente flexíveis no tamanho, composição e fluidez [3]. Devido à sua composição anfipática, os lipossomas podem integrar substâncias hidrofílicas e/ou hidrofóbicas, sendo que as primeiras ficam na cavidade aquosa e as segundas inseridas ou adsorvidas na membrana.

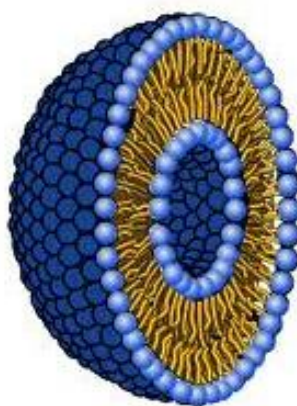


Figura 1.5 - Ilustração de um lipossoma unilamelar.

De acordo com a carga, podem ser separados em catiónicos (carga positiva), aniônicos (carga negativa) e neutros (sem carga). Podem ser classificados pelo seu tamanho e pelo número de lamelas que os constituem, dividindo-se em três subcategorias (figura 1.6):

- Vesículas Multilamelares (MLV, em inglês *MultiLamellar Vesicles*), possuem uma estrutura multilamelar de várias esferas de fosfolípidos concêntricas, com tamanhos decrescentes, separadas por camadas de água. O diâmetro varia de 400 nm a 3500 nm;
- Vesículas Unilamelares Grandes (LUV, em inglês *Large Unilamellar Vesicles*), são constituídas por uma só bicamada esférica de fosfolípidos com grande cavidade aquosa. O diâmetro varia entre 200nm e 1000nm;
- Vesículas Unilamelares pequenas (SUV, em inglês *Small Unilamellar Vesicles*), são também constituídas por uma só bicamada esférica de fosfolípidos com uma cavidade aquosa. O diâmetro varia entre 20nm a 50nm.

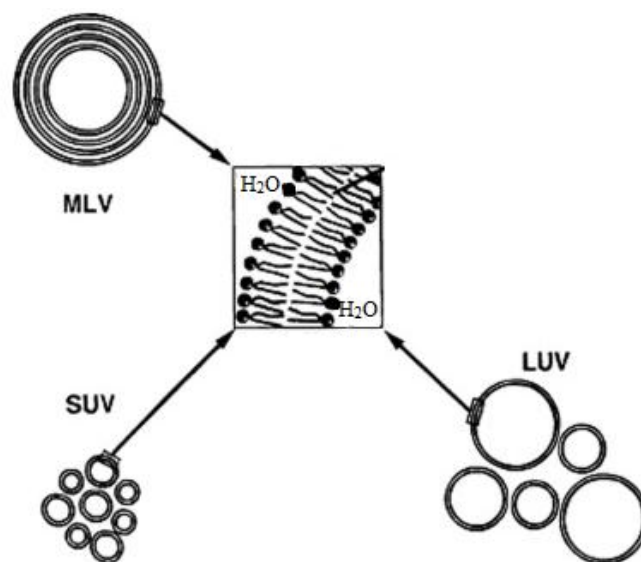


Figura 1.6- Modelos ilustrativos dos vários tipos de lipossomas.

Os lipossomas são nanoestruturas que apresentam estabilidade relativa, que pode ser afetada por processos químicos, físicos e biológicos. A instabilidade química está diretamente relacionada com a composição dos lipossomas. Fisicamente, alguns dos principais processos que afetam a estabilidade dos lipossomas são a agregação e fusão das vesículas e o extravasamento das drogas encapsuladas. Já a estabilidade biológica depende de agentes que interagem com estes sistemas, pelo que está diretamente relacionada com a via de administração [11].

1.2.3 Nanopartículas magnéticas

1.2.3.1 Características estruturais

As nanopartículas são partículas que possuem, pelo menos, uma dimensão menor do que 100nm. Possuem uma grande razão superfície/volume e, desta forma, as propriedades de transferência de massa e calor são melhores do que nos materiais comuns [11]. As nanopartículas magnéticas são uma classe de nanopartículas que possuem um componente metálico, pelo que podem ser manipuladas utilizando um campo magnético e, assim, localizadas num local terapêutico de interesse.

Os materiais nanomagnéticos têm vindo a ser alvo de interesse devido às propriedades de supermagnetismo, que surgem nos materiais ferromagnéticos quando estes atingem dimensões nanométricas. O efeito de superparamagnetismo está presente nas nanopartículas magnéticas devido ao seu tamanho. Consiste na magnetização das partículas apenas na presença de um campo magnético externo. Quando é retirado o campo magnético externo, as partículas não permanecem magnetizadas e nenhum comportamento magnético remanescente é verificado.

Partículas magnéticas consistem normalmente em elementos magnéticos, tais como níquel, ferro e cobalto. Dividem-se em três tipos diferentes:

- Óxidos - previnem aglomeração; só exibem o seu comportamento magnético quando sujeitas a um campo magnético externo. Quando o campo magnético externo é desligado, o magnetismo remanescente é anulado.

- Metálicas – são reativas a vários agentes de oxidação, fazendo com que sejam dificilmente manuseáveis permitindo efeitos colaterais indesejados.
- Metálicas com coroa – têm maior magnetização e maior estabilidade em soluções ácidas, básicas e em solventes orgânicos.

As nanopartículas magnéticas possuem uma vasta gama de aplicações em diversas áreas da nanotecnologia. O baixo custo associado à sua produção é também um parâmetro bastante apelativo para a sua utilização na indústria farmacêutica.

1.2.3.2 Propriedades magnéticas das nanopartículas

Os efeitos magnéticos são causados pelo movimento de partículas que possuem massa e carga elétrica, como elétrons, lacunas, prótons e íons. Uma partícula carregada eletricamente a girar cria um dipolo magnético. A estrutura magnética dos materiais magnéticos macroscópicos é dividida em domínios, volumes do material nos quais todos os dipolos magnéticos estão alinhados, denominado de domínio de Weiss [12]. Os domínios estão separados entre si por paredes de Bloch e, dentro de cada um desses domínios, os momentos magnéticos encontram-se paralelamente alinhados. Através da formação de domínios, há uma redução da energia magnetostática do sistema, proporcional ao volume da partícula. A formação das paredes de Bloch requer uma quantidade de energia que é proporcional à área de interface do domínio. Desta forma, à medida que o tamanho das partículas diminui, a energia necessária para a formação do domínio aumenta, até um diâmetro crítico, a partir do qual a formação de domínios passa a ser energeticamente desfavorável [13]. O diâmetro crítico depende da composição e da estrutura cristalina do material [14].

Existem dois tipos de comportamentos magnéticos para as nanopartículas de dimensões nanométricas, abaixo do diâmetro crítico (partículas de tamanhos comparáveis aos de domínios magnéticos):

- ✓ ferromagnetismo com domínio magnético único;

✓ superparamagnetismo.

Numa nanopartícula de domínio único, como não é possível ajustar domínios magnéticos, a energia necessária para mudar de uma configuração magnética favorável para outra é proporcional à razão $KV/K_B T$ (K – constante de anisotropia; V – volume da partícula; K_B – constante de Boltzmann; e T – temperatura absoluta). Logo, se a energia térmica for superior à energia anisotrópica, a magnetização da partícula não é estável e a nanopartícula é considerada superparamagnética [15]. Desta forma, é possível concluir que o comportamento superparamagnético está diretamente dependente do tamanho das nanopartículas (figura 1.8), uma vez que, quanto menor for o tamanho das nanopartículas magnéticas, menor será a sua temperatura de transição de um comportamento ferromagnético para superparamagnético [14].

Um material superparamagnético apresenta um comportamento idêntico a material paramagnético. Contudo, em vez de cada átomo ser afetado individualmente pelo campo magnético externo, o momento magnético de todo o material tende a alinhar-se com o campo magnético externo. Desta forma, os momentos magnéticos não se cancelam mutuamente, alinhando-se em conjunto e fazendo com que estes materiais tenham um momento magnético permanente, muito superior, apenas na presença de um campo magnético externo.

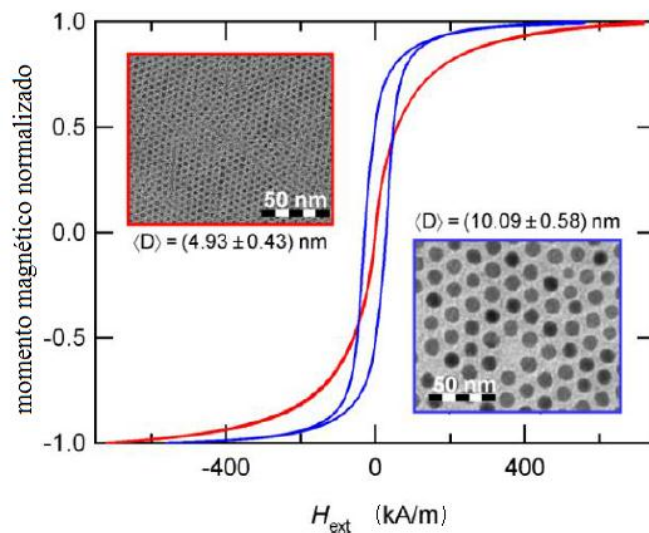


Figura 1.7 - Curvas de histerese dependentes do tamanho das partículas [19].

As nanopartículas superparamagnéticas não possuem histerese (tendência das nanopartículas conservarem o magnetismo na ausência do campo magnético que o gerou). A curva de histerese é própria para cada material. A resposta deste tipo de partículas à aplicação de um campo magnético externo (figura 1.8) assemelha-se ao comportamento de Langevin (variação das propriedades magnéticas das substâncias paramagnéticas dependente da temperatura) para materiais paramagnéticos, mas com valores de magnetização superiores. Por outro lado, a magnetização e a desmagnetização de um material que possui histerese produz perda de energia e a temperatura do material aumenta durante o processo.

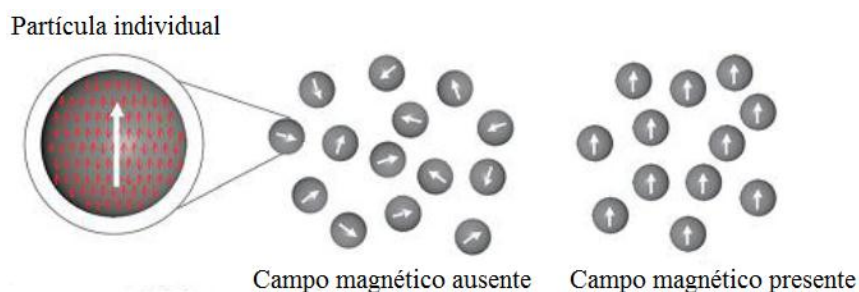


Figura 1.8 – Representação esquemática dos momentos magnéticos de partículas superparamagnéticas.

Em nanopartículas com vários domínios, a reorientação do momento magnético é feita pelo ajuste das paredes de Bloch (perda de histerese). Por outro lado, nas nanopartículas de domínio único, a reorientação é obtida pela rotação do momento dentro da nanopartículas, ultrapassando a perda de energia de anisotropia, ou pela rotação mecânica das nanopartículas, causando fricção com o meio [14].

1.2.3.3 Estruturas núcleo-coroa

As estruturas núcleo-coroa (em inglês, *core-shell*) têm sido cada vez mais utilizadas em biomedicina, por exemplo, em imagiologia, entrega de fármacos, marcadores biológicos e ainda em transplantes. São nanoestruturas com tamanhos entre os 20nm e os 200nm [16]. Possuem um núcleo de um material coberto por uma coroa de outro material, que permite evitar os efeitos indesejáveis das nanopartículas e melhorar as suas propriedades.

As partículas núcleo-coroa (figura 1.9) têm como funções melhorar a estabilidade térmica e química das nanopartículas, melhorar a solubilidade, torná-las menos citotóxicas e permitir a conjugação de outras moléculas com as partículas [16].

A cobertura do núcleo é normalmente feita com um material biocompatível (por exemplo, a sílica), permitindo a conjugação com outras moléculas, sem que o material do núcleo seja afetado. Tendo em conta o tamanho das nanopartículas, o material utilizado para a cobertura (coroa) pode ser escolhido de forma a evitar a sua aglomeração, melhorando assim a monodispersividade e evitando também a oxidação do núcleo [16,17].

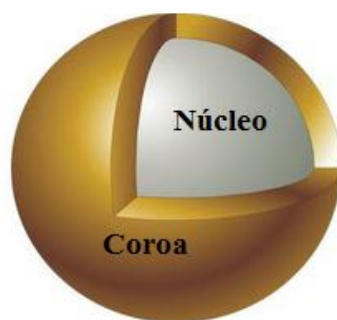


Figura 1.9 – Estrutura núcleo-coroa.

1.2.3.4 Níquel

O níquel (Ni) é um elemento químico de número atômico 28, que pertence aos metais de transição, situado no grupo 10 da tabela periódica. À temperatura ambiente, encontra-se no estado sólido. No seu estado puro, o níquel apresenta atividade química significativa, que é facilmente maximizada com o aumento da sua superfície de exposição, como acontece no níquel pulverizado.

Como já foi referido, devido às suas propriedades físicas e às suas promissoras aplicações, as nanopartículas magnéticas, como as de ferro (Fe), cobalto (Co) e níquel (Ni), são consideradas bastante interessantes para atividade biológica, tanto no diagnóstico, como na terapêutica [18]. Estes materiais apresentam, normalmente, comportamento ferromagnético. Neste tipo de materiais, os dipolos magnéticos estão completamente alinhados nos domínios, segundo um campo

magnético aplicado. Este forte alinhamento provoca enorme permeabilidade magnética (capacidade de magnetização de um material, em resposta a um campo magnético aplicado), muito maior do que a que ocorre nos materiais paramagnéticos. Para temperaturas acima da Temperatura de Curie, o comportamento ferromagnético desaparece e os materiais passam a ter um comportamento paramagnético, em que o alinhamento dos dipolos magnéticos é menor e só existe na presença de um campo magnético externo.

Por reunir muitas características apelativas, o níquel torna-se num bom candidato para a produção de nanopartículas magnéticas para atividade biológica. É considerado um metal de interesse biológico, uma vez pertence ao grupo dos quatro elementos que apresentam propriedades magnéticas à temperatura ambiente [19]. A sua temperatura de Curie é de 355°C, o que significa que só acima desta temperatura é o que níquel deixa de apresentar propriedades magnéticas de origem ferromagnética e passa a ter comportamento paramagnético. As nanopartículas de níquel apresentam superparamagnetismo para diâmetros abaixo dos 30nm [20].

Existem algumas particularidades biologicamente indesejáveis nas nanopartículas de níquel que devem ser consideradas, como a sua toxicidade, alta reatividade e ainda o facto de serem facilmente degradadas, devido à área de superfície ser muito elevada em relação ao volume. Para ultrapassar estes problemas, podemos cobrir as nanopartículas com um material biocompatível (estruturas núcleo-coroa).

1.2.4 Magnetolipossomas

1.2.4.1 Constituição e características estruturais

Os magnetolipossomas têm sido propostos como sistemas promissores de entrega de fármacos. São constituídos por lipossomas que possuem nanopartículas magnéticas incorporadas, combinando assim as propriedades de cada uma destas nanoestruturas.

Podem ser divididos em:

- Magnetolipossomas aquosos - (AMLs, em inglês *Aqueous MagnetoLiposomes*) nos quais as nanopartículas magnéticas estão encapsuladas na fase aquosa interior;
- Magnetolipossomas sólidos - (SMLs, em inglês *Solid MagnetoLiposomes*) nos quais não existe núcleo aquoso e há um *cluster* de nanopartículas rodeado por uma camada lipídica (figura 1.10) [21].

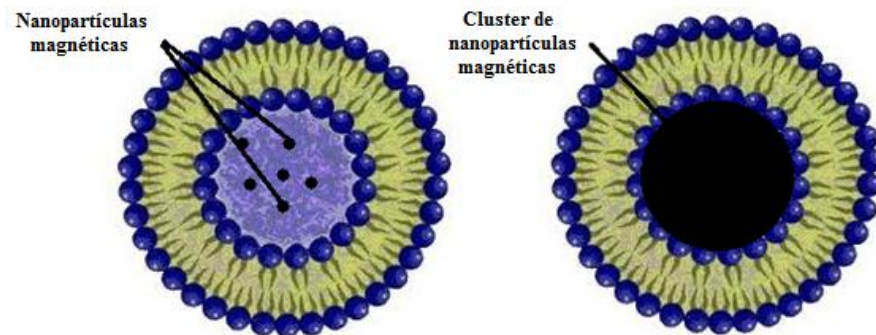


Figura 1.10 – Ilustração de magnetolipossomas aquosos (à esquerda) e magnetolipossomas secos (à direita).

Os fármacos antitumorais transportados nos magnetolipossomas podem, por sua vez, ser encapsulados no compartimento aquoso interior (moléculas hidrofílicas, para os AMLs), solubilizados na bicamada lipídica (moléculas hidrofóbicas), ou pela ligação covalente a grupos ativos de superfície na membrana do lipossoma [22], tirando vantagem da direcionamento magnética.

Devido às propriedades magnéticas das nanopartículas, os magnetolipossomas podem ser localizados num local terapêutico de interesse, usando um campo magnético externo.

1.3 Aplicação das nanoestruturas como sistemas de entrega controlada e outras aplicações biomédicas

O cancro é uma doença que causa mais de seis milhões de mortes por ano em todo o mundo, tendo este número vindo a aumentar [11]. Na indústria farmacêutica, têm surgido vários novos fármacos citotóxicos que são considerados fortes candidatos ao tratamento de cancro. Contudo, a administração destes fármacos continua a ser um problema, uma vez que, normalmente, a sua administração resulta sempre na toxicidade para células saudáveis, o que pode conduzir a outros problemas de saúde. Desta forma, a administração dos promissores fármacos tem de ser muito bem estudada, de forma evitar a toxicidade sistémica (toxicidade para as células saudáveis circundantes). Assim, surge a necessidade de encontrar formas de transporte para os fármacos, permitindo que estes sejam apenas libertados na zona de interesse e que somente as células cancerígenas sejam afetadas pela atuação dos fármacos.

Para uma aplicação eficiente e segura destes nanossistemas de transporte *in vivo*, foram estabelecidos alguns critérios, tendo os sistemas que obedecer aos seguintes requisitos:

- ✓ Não serem tóxicos a componentes celulares ou organismos vivos;
- ✓ Biodegradáveis após o desempenho da sua função;
- ✓ Biocompatíveis;
- ✓ Otimização estrutural aos menores custos: desde a síntese, à caracterização e custo ambiental;
- ✓ Possibilidade de integração e funcionalização destes sistemas com proteínas, péptidos ou ácidos nucleicos, que facilitem ou permitam a interação nanossistema-componente celular;
- ✓ Encapsulamento e preservação de substâncias (fármacos, enzimas, material genético);
- ✓ Libertação/atuação controlada no local pretendido.

Uma possível forma de transporte consiste no nanoencapsulamento, que tem como principal propósito a proteção dos fármacos da rápida degradação enzimática, favorecendo a permanência dos mesmos no organismo até à sua libertação no alvo

de interesse. Estes sistemas de libertação controlada destacam-se pelas inúmeras vantagens que lhes estão associadas, quando comparados com outros métodos convencionais, tais como:

- ✓ Maior eficácia terapêutica, com libertação progressiva e controlada do fármaco;
- ✓ Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- ✓ A natureza e composição dos veículos, além de proteção contra mecanismos de instabilidade previnem a decomposição do fármaco (inativação prematura);
- ✓ Administração segura, sem reações inflamatórias locais;
- ✓ Diminuição do número de doses devido a libertação progressiva;
- ✓ Possibilidade de direcionamento a alvos específicos, atravessando barreiras celulares.

1.3.1 Aplicações das nanopartículas magnéticas

As propriedades das nanopartículas magnéticas tornam-nas extremamente interessantes para aplicação no tratamento do cancro por hipertermia [23,24], entrega controlada de fármacos [25,26], e para serem usadas como agentes de contraste em imagiologia por ressonância magnética (MRI, em inglês *Magnetic Resonance Imaging*) [27].

A estabilidade do fluido magnético é importante e deve ser controlada pela dimensão das partículas, devendo estas ter dimensões muito pequenas, de forma a prevenir a precipitação por forças de gravitação. Assim, o tamanho e oxidação de superfície das nanopartículas são parâmetros que devem ser tidos em atenção. O tamanho depende diretamente do método de preparação, podendo ser controlado usando um tensioativo para esse fim. Deve também ser evitada a agregação e preservada a monodispersividade das partículas. Para tal, pode ser adicionado ácido cítrico às partículas em solução [28]. Podem ainda ser controladas as cargas elétricas de superfície das partículas, que estão diretamente relacionadas com as repulsões coulombianas [29].

Para aplicações *in vivo*, as nanopartículas devem ser biocompatíveis e possuir elevada magnetização, de forma a ser possível controlar facilmente o seu movimento no sangue por um campo magnético externo. Para atuação biológica são seleccionadas preferencialmente partículas superparamagnéticas, que apresentem superparamagnetismo à temperatura ambiente [15].

1.3.1.1 Sistemas de entrega controlada baseados em nanopartículas magnéticas

Primeiramente proposto por Freeman, o uso de nanopartículas magnéticas para entrega de fármacos em tecidos doentes tem vindo a ser cada vez mais um campo atrativo de investigação. A entrega controlada de fármacos para o tratamento de cancro, fazendo uso de nanopartículas magnéticas, pode ser feita de várias formas. As próprias nanopartículas magnéticas podem ser funcionalizadas com fármacos que são direccionados até ao local de interesse. De outra forma, as partículas magnéticas podem ser internalizadas em lipossomas que possuem fármacos incorporados. Neste segundo caso, com a aplicação de um campo magnético externo, os lipossomas são localizados no local terapêutico de interesse, sendo os fármacos libertados apenas nessa zona.

1.3.1.2 Aplicação das nanopartículas magnéticas em termoterapia e imagiologia por ressonância magnética

Outras aplicações de grande interesse das nanopartículas magnéticas são a termoterapia e a imagiologia por ressonância magnética, MRI.

A termoterapia utiliza também nanopartículas magnéticas para o tratamento de tumores. Esta técnica é possível pelo facto das células cancerígenas serem mais sensíveis ao calor do que as células saudáveis. Quando um campo magnético suficientemente forte para reorientar o momento magnético das nanopartículas é aplicado, há libertação de energia sob a forma de calor [19]. Esta técnica consiste na fixação das nanopartículas sobre a superfície das células malignas. Quando localizadas no tumor, a simples aplicação de um campo magnético externo oscilante (da mesma forma como é feita uma ressonância magnética), pela técnica denominada Hipertermia Magnética, elevará em alguns graus a temperatura destas

partículas e das células onde estão aderidas. Desta forma, as células cancerígenas são destruídas e o tecido normal circundante não é afetado.

A imagiologia por ressonância magnética (MRI) é uma técnica médica que faz uso da ressonância magnética nuclear para visualizar a estrutura interna detalhada do corpo humano. É uma técnica não invasiva que permite avaliar a anatomia e função dos tecidos com resolução celular. A imagem obtida através de MRI é gerada pelos sinais provenientes dos prótons de água presentes no corpo dos indivíduos.

É possível obter uma imagem por MRI apenas definindo o contraste da imagem a partir das diferenças na abundância natural e mobilidade da água nos vários tecidos. No entanto, a resolução da imagem pode não ser muito boa. De forma a melhorar a resolução da imagem, são usados os chamados agentes de contraste, capazes de melhorar o contraste das imagens através da diminuição dos tempos de relaxação dos prótons da água presentes nos tecidos (aumento das velocidades de relaxação protónica), isto é, possuem um relaxamento adequado. O uso de nanopartículas magnéticas em MRI consiste em incorporar nanopartículas magnéticas em lipossomas, que funcionarão como agentes de contraste, uma vez que este uso permite uma grande acumulação dos elementos paramagnéticos no local de interesse.

1.3.2 Lipossomas como sistemas de nanoencapsulamento

Devido às suas fortes potencialidades, os lipossomas são um dos sistemas de encapsulamento de fármacos mais estudados em todo o mundo. Os lipossomas conseguem superar muitos dos problemas associados a outras terapias, tais como aqueles que envolvem solubilidade, farmacocinética, estabilidade *in vivo* e toxicidade [2,4]. Outra característica de elevado interesse, talvez mesmo aquela que se destaca de entre muitas outras, é o facto de estes sistemas conseguirem atravessar a barreira endotelial (camada de células que reveste a superfície interior dos vasos sanguíneos e linfáticos, formando uma interface entre o sangue e linfa circulante no lúmen e o resto da parede do vaso).

Como já referido, a estabilidade dos lipossomas pode ser afetada por vários processos, mas a sua funcionalização é uma realidade que permite aumentar tanto a sua estabilidade, como eficácia.

A estabilidade física dos lipossomas pode ser aumentada pela inclusão de moléculas com carga elétrica, pois a repulsão eletrostática reduz a agregação e fusão dos lipossomas. A inclusão de colesterol na sua formulação pode diminuir a permeabilidade dos lipossomas, prevenindo o extravasamento dos fármacos e melhorando, assim, a sua estabilidade. Alguns estudos têm ainda demonstrado que um pH acima de 6 ajuda a manter a estabilidade dos lipossomas [11].

Investigações recentes têm ajudado a descobrir algumas práticas que permitem aumentar a eficácia deste sistema *in vivo*. Funcionalizar a bicamada fosfolipídica, por exemplo com porções FAB (uma parte da molécula do anticorpo que se liga ao antígeno), faz com que os lipossomas sejam apenas endocitados por células que possuam antígenos específicos. Também a funcionalização da superfície dos lipossomas com uma coroa de PEG (polietilenoglicol) consegue torná-los menos reconhecíveis pelo sistema imunitário [5], apresentando capacidade furtiva (longa circulação) e com acumulação do fármaco na área tumoral. Tem sido também descrito que os lipossomas catiónicos são preferencialmente direcionados para a vasculatura [30], enquanto os lipossomas aniônicos são capturados por monócitos/neutrófilos do sangue [31].

Contudo, este sistema continua a apresentar alguns problemas devido à rápida libertação dos fármacos no sangue, adsorção de proteínas do plasma na membrana fosfolipídica, havendo ainda alguns casos de reconhecimento e destruição do sistema por fagocitose. Para contrariar esta tendência, os lipossomas devem possuir tamanhos muito pequenos, na ordem das dezenas de nanómetros (≤ 100 nm), por forma a diminuir o reconhecimento e fagocitose, aumentando assim a probabilidade de penetração nos tecidos [32].

1.3.3 Magnetolipossomas como sistemas de nanoencapsulamento

Os magnetolipossomas são também um nanossistema que pode ser utilizado em medicina, tanto para diagnóstico como para terapêutica. Das suas diversas aplicações, as de maior destaque, uma vez que possuem nanopartículas magnéticas, são mais uma vez a termoterapia, imagiologia por ressonância magnética e nanoencapsulamento. Contudo, a investigação baseada em magnetolipossomas é relativamente recente, pelo que não é muito aprofundada, recaindo mais sobre os métodos de preparação e caracterização.

O objetivo desta investigação consiste na conceção de magnetolipossomas que funcionarão como sistema de entrega controlada de potenciais fármacos antitumorais. Estes sistemas, incorporando fármacos (hidrofílicos ou hidrofóbicos) e nanopartículas magnéticas nos lipossomas, são multifacetados, bastante versáteis e promissores.

O funcionamento dos magnetolipossomas como sistemas de entrega controlada de fármacos consiste na competição entre as forças exercidas sobre as partículas durante a sua circulação no sangue e as forças magnéticas exercidas pelo campo magnético externo aplicado. Quando as forças magnéticas são exercidas no fluxo linear sanguíneo das artérias ou capilares, o fluido magnético é localizado no local de interesse, podendo ser internalizado de seguida por células endoteliais dos tecidos alvo [24]. A libertação do fármaco dos magnetolipossomas pode ser induzida por um conjunto de variações físico-químicas do meio, tais como alterações de pH, de temperatura, etc.

A eficácia deste fluido magnético depende de um conjunto de parâmetros fisiológicos da solução fluido magnético/fármaco e do campo magnético externo, que devem ser controlados [33]:

- ✓ Tamanho das partículas;
- ✓ Características da superfície das partículas;
- ✓ Concentração do fluido;
- ✓ Volume do fluido;

- ✓ Eliminação total do material magnético externo aos lipossomas;
- ✓ O acesso ao organismo (rota de infusão);
- ✓ Duração / taxa de injeção / perfusão;
- ✓ Geometria e força do campo magnético externo;
- ✓ Duração da aplicação do campo magnético externo.

Também alguns parâmetros fisiológicos do paciente podem comprometer a eficácia do sistema, tais como:

- ✓ Tamanho, peso e superfície do corpo;
- ✓ O volume de sangue;
- ✓ O débito cardíaco e a resistência vascular sistémica;
- ✓ O tempo de circulação;
- ✓ O volume do tumor e localização;
- ✓ Conteúdo vascular do tumor;
- ✓ O fluxo de sangue no tumor.

Para aumentar a sua eficácia e prolongar o tempo de circulação no sangue, os magnetolipossomas devem ser física e biologicamente estáveis. As nanopartículas incorporadas nos magnetolipossomas ajudam a evitar problemas de diluição precoce e interações indesejáveis com estruturas biológicas.

Sendo os lipossomas um sistema bastante bem estudado, facilmente encontramos alguns procedimentos que ajudam a ultrapassar algumas dificuldades associadas à aplicação *in vivo* dos magnetolipossomas. É também importante perceber se a dose de fluido magnético deixa a microcirculação e difunde livremente para o espaço intersticial, ou se o sistema permanece inalterado na circulação sistémica (biodisponibilidade), assim como compreender qual o tempo de dessorção do fármaco *in vivo*.

1.4 Referências do Capítulo 1

- [1] D. K. R. Robinson, A. Rip, V. Mangematin, Technological agglomeration and the emergence of clusters and networks in nanotechnology, *Research Policy* 36 (2007) 871-879.
- [2] T. L. Andresen, S. S. Jensen, K. Jorgensen, Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release, *Prog. Lipid Res.* 44 (2005) 68-97.
- [3] Y. Malam, M. Loizidou, A. M. Seifalian, Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer, *Trends in Pharmacol. Sci.* 30 (2009) 592-599.
- [4] N. A. Ochekepe, P. O. Olorunfemi, N. C. Ngwuluka, Nanotechnology and Drug Delivery Part 1: Background and Applications, *Tropical J. Pharm. Res.* 8 (2009) 265-274.
- [5] N. Nuytten, M. Hakimhashemi, T. Ysenbaert, L. Defour, J. Trekker, S. J. H. Soenen, P. V. Meeren, M. Cuyper, PEGylated lipids impede the lateral diffusion of adsorbed proteins at the surface of (magneto)liposomes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 80 (2010) 227-231.
- [6] R. Banerjee, Liposomes: Applications in medicine, *J. Biomater. Appl.* 16 (2001) 3-21.
- [7] E. Feitosa, P. C. A. Barreleiro, G. Olofson, Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods, *Chem. Phys. Lipids* 105 (2000) 201-213.
- [8] B. R. Lentz, Membrane “fluidity” as detected by diphenylhexatriene probes, *Chem. Phys. Lipids* 50 (1989) 171-190.

- [9] J. S. Vicent, S. D. Revak, C. D. Cochrane, I. W. Levin, Interactions of model human pulmonary surfactants with a mixed phospholipid bilayer assembly: Raman spectroscopic studies, *Biochemistry* 32 (1993) 8228-8238.
- [10] U. Olsson, U. Wurz, R. Strey, Cylinders and bilayers in a ternary nonionic surfactant system, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 4535-4539.
- [11] C. M. Batista, C. M. B. Carvalho, N. S. S. Magalhães, Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 43 (2007) 167-178.
- [12] A. Akbarzadeh, M. Samiei, S. Davaran, Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine, *Nanoscale Res. Lett.* 7 (2012) 144-157.
- [13] A. Weddemann, I. Ennen, A. Regtmeier, C. Albon, A. Wolff, K. Eckstädt, N. Mill, M. K-H. Peter, J. Mattay, C. Plattner, N. Sewald, A. Hütten, Review and outlook: from single nanoparticles to self-assembled monolayers and granular GMR sensors, *Beilstein J. Nanotech.* 1 (2010) 75-93.
- [14] M. Colombo, S. C. Romero, M. F. Casula, L. Guyérrez, M. P. Morales, I. B. Bohm, J. T. Heverhagen, D. Prosperi, W. J. Park, Biological applications of magnetic nanoparticles, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 4306-4334.
- [15] N. A. Frey, S. Peng, K. Cheng, S. Sun, Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 2532-2542.
- [16] N. Sounderya, Y. Zhang, Use of core/shell structured nanoparticles for biomedical applications, *Recent Patents on Biomedical Engineering* 1 (2008) 34-42.
- [17] L. M. Manocha, *Composites with Nanomaterials*, American Scientific Publishers, California, 2006.
- [18] M. Benelmekki, A. Montras, A. J. Martins, P. J. G. Coutinho, Ll. M. Martinez, Magnetophoresis behaviour at low gradient magnetic field and size

- control of Nickel single core nanobeads, *J. Magn. Magn. Mater.* 323 (2011) 1945-1949.
- [19] L. B. Bangs, New developments in particle-based immunoassays: Introduction, *Pure Appl. Chem.* 68 (1996) 1873-1879.
- [20] K. M. Krishnan, Biomedical Nanomagnetism: A *Spin* Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy, *IEEE Trans. Mag.* 46 (2010) 2523–2558.
- [21] C. J. Meledandri, T. Ninjbadgar, D. F. Brougham, Size-controlled magnetoliposomes with tunable magnetic resonance relaxation enhancements, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 214-222.
- [22] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Duguet, Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 2161-2175.
- [23] Cell tracking using superparamagnetic particles of iron oxide (SPIO) and magnetic resonance imaging (MRI) - a pilot study, *ClinicalTrials.gov* NCT00972946, US National Institutes of Health, University of Edinburgh (2009).
- [24] J. H. Stefaan, U. Himmelreich, N. Nuytten, M. Cuyper, Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labeling, *Biomaterials* 32 (2011) 195-205.
- [25] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *J. Physics* 36 (2003) 167-181.
- [26] J. Dobson, Magnetic nanoparticles for drug delivery, *Drug Development Res.* 67 (2006) 55-60.
- [27] C. Corot, P. Robert, J. M. Idee, M. Port, Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging, *Adv. Drug Delivery Rev.* 58 (2006) 1471-1504.
- [28] M. Lattuada, T. A. Hatton, Functionalization of monodisperse magnetic nanoparticles, *Langmuir* 4 (2007) 2158-2168.

- [29] R. Langer, *New methods of drug delivery*, *Science* 249 (1990) 1527-1533.
- [30] S. Dandamudi, R. B. Campbell, Development and characterization of magnetic cationic liposomes for targeting tumor microvasculature, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes* 3 (2007) 427-438.
- [31] G. Poste, R. Kirsch, W. E. Fogler, I .J. Fidler, Analysis of the fate of systemically administered liposomes and implications for their use in drug delivery, *Cancer Res.* 42 (1982) 1412-1422.
- [32] G. Gregoriadis, Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems, *Trends Biotechnol.* 13 (1995) 527-537.
- [33] A. S. Lubbe, C. Bergemann, J. Brock, D. G. McClure, Physiological aspects in magnetic drug-targeting, *J. Magn. Magn. Mater.* 194 (1999) 149-155.

Capítulo 2 – Técnicas de análise e caracterização

Numa parte inicial deste capítulo vão ser descritas algumas propriedades da radiação electromagnética, de forma a melhor compreender as principais técnicas instrumentais utilizadas neste trabalho. Estas técnicas permitiram analisar e caracterizar as nanoestruturas em estudo nesta investigação.

2.1 Radiação eletromagnética

A radiação eletromagnética é uma forma de energia que se propaga no espaço e que apresenta, ao mesmo tempo, comportamentos ondulatórios e corpusculares. É caracterizada por ondas que se propagam livremente no espaço, compostas por um campo elétrico e um campo magnético. O vetor campo elétrico, \vec{E} , e o vetor campo magnético, \vec{B} , são sinusodais e oscilam em planos perpendiculares à direção de propagação da onda [1] (figura 2.1).

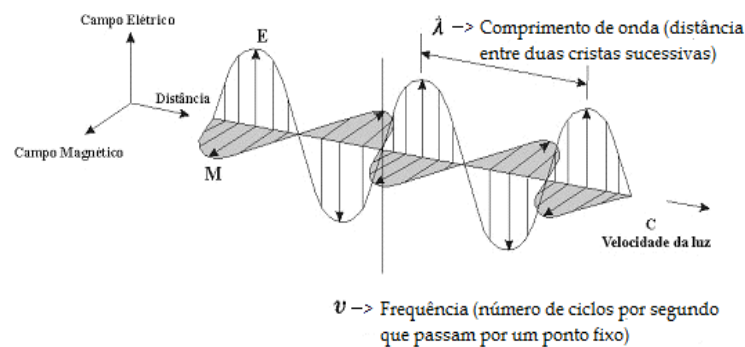


Figura 2.1 – Flutuações dos campos elétrico e magnético da radiação eletromagnética.

As ondas eletromagnéticas são caracterizadas por uma frequência (ϑ) e um comprimento de onda (λ), sendo essas grandezas físicas relacionadas pela equação (2.1),

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

onde c é a velocidade da luz.

Inicialmente, os fenómenos ópticos, como a reflexão, refração, difração, entre outros, eram estudados considerando que a radiação tinha um comportamento

ondulatório. Mais tarde, percebeu-se que este modelo apresentava falhas na interpretação de outros fenômenos, como os de absorção e emissão da energia radiante, surgindo a necessidade de admitir um comportamento corpuscular da radiação. Assim, foi desenvolvida a dualidade onda/partícula para a luz. Enquanto se difunde livremente no espaço, a luz apresenta um comportamento ondulatório; por outro lado, quando se dá a interação da luz com a matéria, a luz passa a ter um comportamento corpuscular. Desta forma, na teoria corpuscular, a radiação é constituída por partículas de energia, fotões ou *quanta* de luz, cuja energia, E , depende da frequência da radiação (ν):

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

em que h é a constante de Planck ($6,6256 \times 10^{-34}$ J.s), λ o comprimento de onda da radiação absorvida e c a velocidade da luz no vácuo.

A radiação eletromagnética é dividida e classificada em diferentes tipos de radiação, de acordo com a frequência das ondas que a caracterizam. Apenas parte de todo o espectro eletromagnético é visível ao olho humano, a essa fatia de luz damos o nome de espectro de luz visível.

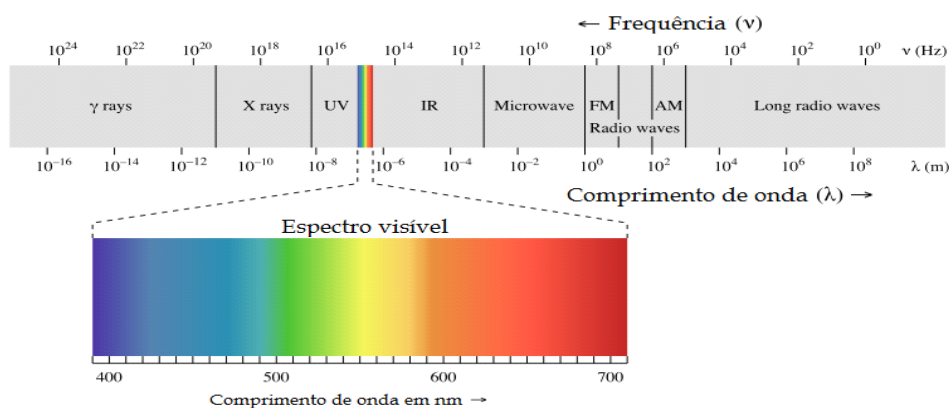


Figura 2.2 – Espectro eletromagnético com o espectro de luz visível indicado.

2.2 Espectroscopia Molecular

Grande parte do atual conhecimento da estrutura da matéria é baseado em investigações espectroscópicas. Espectroscopia é a técnica que estuda a interação da

radiação com a matéria, associada a vários fenómenos como a absorção e emissão.

2.2.1 Espectroscopia de absorção UV-Visível

Quando a luz atravessa um meio absorvente (sólido, líquido ou gasoso), certas frequências são seletivamente absorvidas e a sua intensidade diminui. Este processo denomina-se de absorção, depende das características do material, da radiação incidente e das estruturas químicas dos compostos envolvidos. A absorção ocorre devido a choques inelásticos (sem conservação da energia cinética) entre os fótons e os eletrões constituintes do material.

A energia absorvida dos fótons é fixada pelos átomos que, consequentemente, sofrem excitação passando do estado eletrónico fundamental para estados eletrónicos de energias superiores.

A absorção ocorre quando a energia dos fótons é igual à diferença de energia entre as energias do estado excitado e fundamental,

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

Espectroscopia de absorção é uma técnica na qual a intensidade de um feixe de luz é medida antes e depois da interação com uma amostra, sendo posteriormente comparados. A espectroscopia de absorção UV-Visível utiliza como fonte de luz radiação eletromagnética, na faixa de comprimento de onda entre os 190 e 750 nm. Quando a radiação incide nas moléculas, ocorrem transições eletrónicas que variam de acordo com a absorção de energia quantificada. Desta forma, pode dizer-se que a espectroscopia de absorção UV-Visível estuda as transições eletrónicas.

2.2.1.1 Níveis de energia e transições eletrónicas

As moléculas possuem, além de energia eletrónica, energia rotacional e vibracional quantificadas. A energia rotacional está associada à rotação da molécula em torno do seu centro de gravidade; a energia vibracional está relacionada com a vibração dos átomos nas moléculas; e a energia eletrónica está relacionada com a distribuição dos eletrões em torno dos núcleos dos átomos. Estes diferentes tipos de

energia contribuem para a energia total da molécula e assim, para cada estado eletrónico, existe um conjunto de níveis vibracionais e rotacionais [2] (figura 2.3).

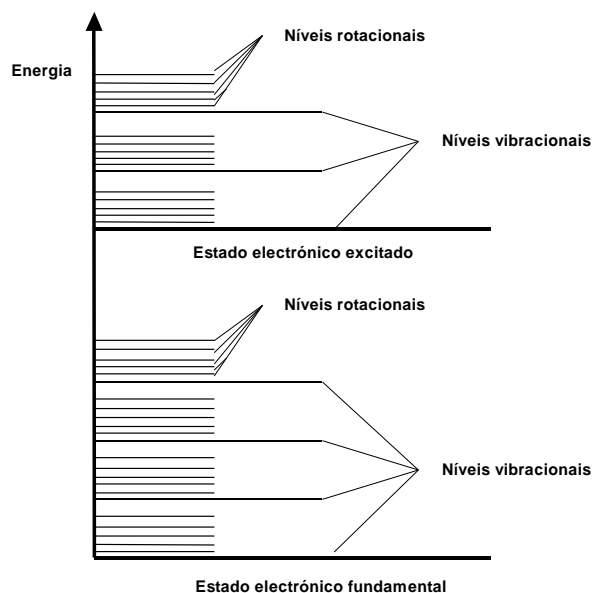


Figura 2.3 - Representação do sistema de níveis de energia de uma molécula.

A absorção de um fóton dá origem a uma transição eletrónica que provoca alterações nos estados vibracionais e rotacionais das moléculas. A transição eletrónica do estado fundamental para o estado excitado pode ser observada num espectro de absorção como resultado das alterações dos estados eletrónicos das moléculas. O espectro de absorção surge como uma banda que pode apresentar picos na sua estrutura. Os picos devem-se ao facto de as moléculas possuírem, para um mesmo estado eletrónico, vários níveis de energia vibracional e rotacional quantificados.

À temperatura ambiente e na ausência de perturbações, as moléculas encontram-se no nível vibracional mais baixo do estado fundamental. Desta forma, as bandas de absorção correspondem à transição do nível vibracional mais baixo do estado fundamental para os diferentes níveis vibracionais do estado excitado. As diversas transições possíveis correspondem a diferentes energias absorvidas e, desta forma, obtêm-se picos de absorção de diferentes comprimentos de onda.

À orbital molecular de menor energia ocupada dá-se o nome de HOMO (em inglês, *Highest Occupied Molecular Orbital*) e à orbital molecular de mais baixa

energia desocupada dá-se o nome de LUMO (em inglês, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*).

Nas moléculas, as transições resultantes de absorção podem ser classificadas de acordo com o tipo de orbitais moleculares; orbitais moleculares ligantes (π , σ), anti-ligantes (π^* , σ^*) e não ligantes (n), sendo estas relacionadas energeticamente da seguinte forma,

$$E_{(\text{anti-ligante})} > E_{(\text{não ligante})} > E_{(\text{ligante})}$$

Devido a razões de simetria (sobreposição espacial das orbitais envolvidas na transição), as transições mais prováveis (permitidas) são aquelas que ocorrem entre elétrons de orbitais $\pi \rightarrow \pi^*$, e as menos prováveis (proibidas) são aquelas que envolvem transições entre orbitais de diferente simetria, $n \rightarrow \pi^*$. As transições do tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$ e $\pi \rightarrow \sigma^*$ ocorrem para energias muito elevadas na zona do ultravioleta de vácuo, enquanto que as transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ ocorrem para energias na zona do UV-visível, sendo estas as transições a que temos acesso com os espectrofotómetros mais comuns [1].

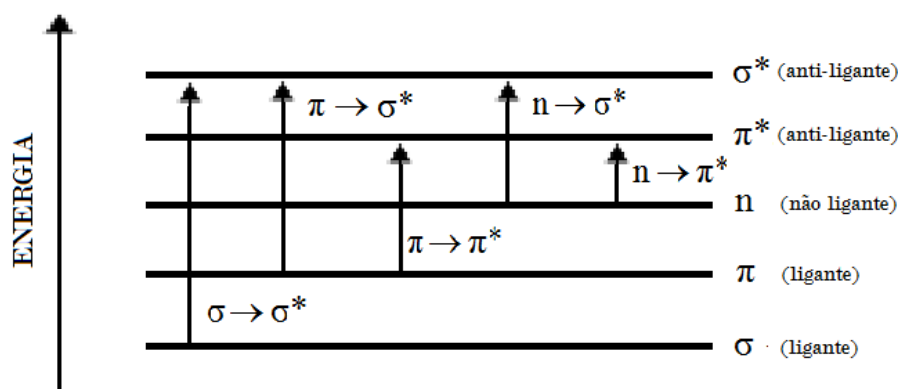


Figura 2.4 – Transições eletrônicas entre orbitais moleculares.

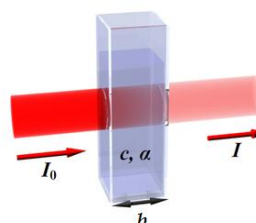
As propriedades do ambiente em que os compostos absorventes se encontram, como o pH e a polaridade do meio, influenciam a energia das transições eletrônicas, alterando a posição e a forma das bandas de absorção. Quanto maior é a polaridade do solvente, maior é o desvio das transições $n \rightarrow \pi^*$ para menores comprimentos de onda (desvio para o azul), enquanto as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ deslocam-se para maiores comprimentos de onda (desvio para o vermelho) com o aumento da polaridade do solvente.

Dependendo da sua multiplicidade, um estado electrónico pode ser singlete ou tripleto. A multiplicidade é definida pela expressão $2S+1$, em que S é a soma dos números quânticos de spin dos eletrões do sistema. Quando os eletrões estão emparelhados, o somatório do seu spin é zero, logo a multiplicidade do estado é 1 (estado singlete). Quando o eletrão passa de uma orbital de menor energia para outra de maior energia invertendo o spin, a soma dos números quânticos de spin passa a ser 1 e, portanto, a multiplicidade passa a ser 3 (estado tripleto).

A intensidade das bandas de absorção está diretamente relacionada com a probabilidade de ocorrência de uma determinada transição. As transições são afectadas por vários factores, como o spin electrónico, a simetria orbital, a paridade e o momento. A probabilidade de transição é maior para transições permitidas, apresentando uma banda mais intensa, ao contrário, a probabilidade de transição é menor para transições proibidas, pelo que a banda correspondente será pouco intensa [3].

2.2.1.2 Lei de Lambert-Beer

Ao atravessar um meio absorvente, a intensidade de um feixe incidente diminui de acordo com a seguinte equação exponencial,



$$I(\lambda) = I_0 \exp(-\alpha_{\lambda} b) \quad (2.4)$$

Figura 2.5 – Diagrama de absorção de um feixe de luz atravessando uma cuvette de percurso ótico b .

em que I_0 e I são, respetivamente, as intensidades do feixe incidente e do feixe transmitido, α_{λ} é o coeficiente de absorção (cm^{-1}), b é a espessura do meio absorvente (cm) e c a concentração da espécie absorvente no meio.

A transmitância, T , é a fração da luz incidente, com um comprimento de onda específico, que atravessa uma amostra de matéria e está diretamente relacionada com a absorvância. Consiste na passagem inalterada de radiação pela matéria e é definida como

$$T(\lambda) = \frac{I(\lambda)}{I_0} \quad (2.5)$$

A partir da transmitância, podemos obter a absorvância, A_λ , pela seguinte relação

$$A_\lambda = -\log_{10} T_\lambda \quad (2.6)$$

O coeficiente de absorção relaciona-se com a concentração de espécies absorventes, C , do meio,

$$\alpha_\lambda = 2.303 \varepsilon_\lambda C \quad (2.7)$$

em que ε_λ é o coeficiente de absorção molar (ou absortividade molar), que constitui uma medida da intensidade da banda de absorção. Partindo das relações anteriores, podemos chegar à seguinte expressão, que traduz a Lei de Lambert-Beer,

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda b C \quad (2.8)$$

A Lei de Lambert-Beer prevê, para soluções diluídas e em que exista apenas uma espécie absorvente, uma proporcionalidade direta entre a absorvância e a concentração. Esta relação só é válida para radiação monocromática, e a cada comprimento de onda corresponde um coeficiente de absorção. Se existir mais do que uma espécie absorvente, a absorvância passa a ser a soma das absorvâncias de cada uma das espécies. A Lei de Lambert-Beer é uma lei fundamental para todos os tipos de absorção de radiação eletromagnética.

A escolha do solvente para as espécies em análise é um parâmetro importante, uma vez que é necessário ter em conta a sua transparência na zona de comprimento de onda em estudo, assim como os efeitos que pode produzir no sistema absorvente. Normalmente, os solventes polares como água, alcoóis e ésteres tendem a destruir a estrutura fina das moléculas devido a efeitos vibracionais, ao contrário dos solventes não polares, como os hidrocarbonetos.

É importante descontar a absorvância do meio em que se encontram as espécies cuja absorção se pretende estudar. Para tal basta utilizar, em vez de I_0 , a intensidade da radiação monocromática que se obtém depois de atravessar o meio

em que as espécies se encontram, mas sem estas estarem presentes (I_{branco}). Assim, a absorvância vai ser obtida através da seguinte expressão

$$(A - A_{\text{branco}})_{\lambda} = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) - \log\left(\frac{I_0}{I_{\text{branco}}}\right) = \log\left(\frac{I_{\text{branco}}}{I}\right) \quad (2.9)$$

em que I_{branco} é a intensidade de radiação detetada na célula que contém o solvente (branco) e I a intensidade de radiação detetada pela célula que contém a amostra.

2.2.1.3 Espectrofotómetro

O espectro eletrónico de absorção é a representação gráfica da variação da absorvância em função do comprimento de onda da radiação incidente. Permite verificar qual o intervalo de comprimentos de onda em que um dado composto apresenta maior capacidade de absorção.

O aparelho utilizado para medir espectros de absorção denomina-se de espectrofotómetro. Os espectrofotómetros permitem produzir um feixe de luz monocromática e posteriormente medir a quantidade dessa luz que é absorvida pela amostra em estudo [4]. A configuração destes aparelhos permite medir a transmitância (T), que se traduz na absorvância através da equação (2.6). São constituídos por uma fonte de radiação, um monocromador, os porta-amostras, o detetor (fotomultiplicador) e ainda uma unidade de processamento e aquisição de informação, normalmente um computador (Figura 2.6).

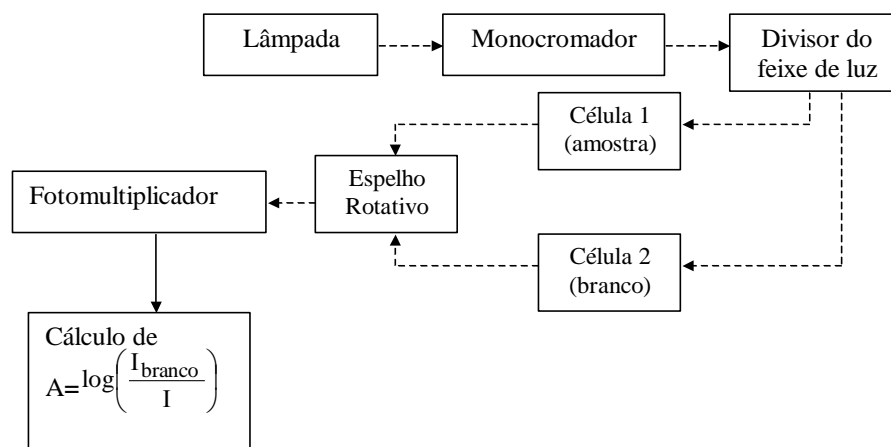


Figura 2.6 - Representação esquemática dos componentes de um espectrofotómetro.

2.2.2 Espectroscopia de fluorescência

Luminescência é o nome que se dá à capacidade que certas substâncias apresentam de emitir radiação eletromagnética. As técnicas espectroscópicas de luminescência molecular dividem-se em dois tipos, os métodos espectroscópicos de fluorescência e de fosforescência. A fluorescência difere da fosforescência na medida em que, na fluorescência, o tempo de vida do estado excitado (intervalo de tempo em que as moléculas permanecem excitadas) é muito curto, cerca de 10^{-9} s após a excitação; por outro lado, na fosforescência a radiação emitida prolonga-se por mais tempo [1].

Estes métodos experimentais baseiam-se na excitação eletrônica das espécies em estudo por meio de um feixe de radiação eletromagnética, sendo os resultados do excesso de energia perdido por emissão apresentados em espectros que fornecem informações para análise qualitativa e quantitativa.

A fluorescência foi o método instrumental mais utilizado durante a nossa investigação, pelo que consideramos essencial um melhor conhecimento dos fundamentos da fluorescência. É um método muito sensível utilizado em estudos de mudanças conformacionais, interações e localização de locais de atuação de moléculas de interesse biológico em macromoléculas e biomembranas.

Depois de absorverem fótons, as moléculas excitadas têm de perder o excesso de energia eletrônica 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 relaxamento vibracional, conversão interna e cruzamento intersistemas (ou entre sistemas), são processos em que o excesso de energia é perdido pelas 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.

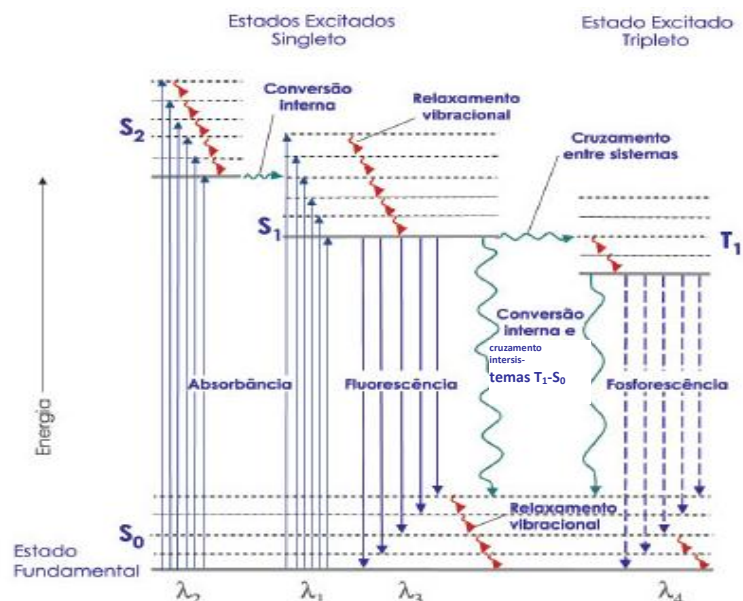


Figura 2.7 - Diagrama de níveis de energia com a representação dos processos radiativos e não radiativos (diagrama de Jablonski).

2.2.2.1 Processos intramoleculares radiativos e não radiativos

Os processos intramoleculares não radiativos são processos em que o excesso de energia é perdido por processos que não envolvem emissão de radiação, como relaxamento vibracional, conversão interna e conversão ou cruzamento intersistemas.

Durante a excitação, o excesso de energia vibracional é perdida imediatamente por colisões entre as moléculas da espécie excitada e as moléculas de solvente, resultando em transferência de energia sob a forma de calor das moléculas excitadas para moléculas de solvente (e consequente aumento da sua temperatura). A este processo dá-se o nome de relaxamento vibracional. É um processo eficiente com um tempo médio de vida de uma molécula excitada vibracionalmente de cerca de 10^{-12} segundos, período significativamente menor que o tempo médio de vida de um estado eletrônico excitado. 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 este desvio dá-se o nome de Desvio de Stokes (figura 2.8).

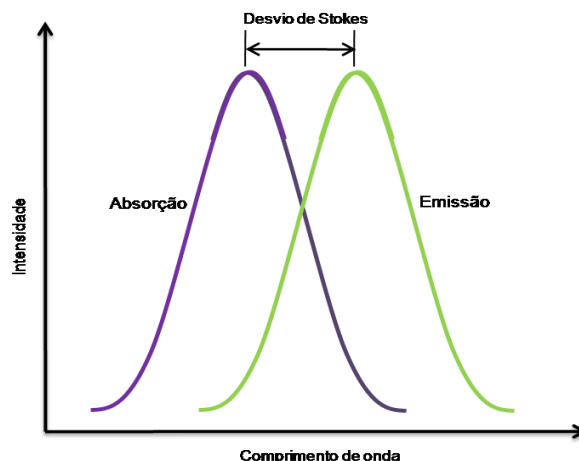


Figura 2.8 – Representação gráfica do Desvio de Stokes.

A conversão interna é outro processo intramolecular não radiativo em que as moléculas são transferidas de um estado eletrónico para outro de multiplicidade igual. Este fenómeno ocorre quando os níveis vibracionais de um estado eletrónico de mais baixa energia se sobrepõem, em energia, aos níveis vibracionais de outro estado eletrónico de maior energia para o qual o eletrão foi excitado. A velocidade deste processo entre estados singletos excitados é bastante alta, pelo que, os tempos de vida dos estados excitados mais elevados são extremamente curtos, cerca de 10^{-11} a 10^{-13} segundos [5].

O cruzamento intersistemas é, por sua vez, um processo em que a transição ocorre para estados eletrónicos de multiplicidade diferente. A transição ocorre normalmente para um nível vibracional do primeiro estado tripleto em que a molécula tem a mesma geometria do primeiro estado singleto excitado. Como esta transição é proibida por spin, o seu tempo de vida médio é grande, cerca de 10^{-2} a 10^{-8} segundos [5]. Este é o processo no qual o spin do eletrão excitado é invertido permitindo a transição deste para um estado tripleto. Este processo é mais comum em moléculas com átomos pesados, pois as interações spin-orbital ficam mais fortes na presença destes átomos e, desta forma, a mudança do spin é favorecida. A presença de espécies paramagnéticas em solução, como o oxigénio molecular, promove o cruzamento intersistemas, diminuindo a fluorescência.

Quanto maior for a diferença de energia entre os níveis vibracionais mais baixos dos estados eletrónicos das transições, mais lenta será a taxa de decaimento dos processos de conversão interna e conversão intersistemas. Assim, uma grande

diferença energética entre os níveis vibracionais mais baixos do estado singlete excitado mais baixo e o estado fundamental, assim como a diferença entre o primeiro estado tripleto e o estado fundamental, contribuem para uma menor eficiência dos processos de conversão interna entre o estado singlete excitado e o estado fundamental e conversão intersistemas do primeiro estado tripleto para o estado fundamental [5,6].

Os processos intramoleculares radiativos, como já foi referido, são processos em que o excesso de energia é perdido por emissão de radiação (luminescência), que consiste na emissão de fótons na região do ultravioleta, visível ou infravermelho.

Os dois tipos de processos intramoleculares radiativos são a fluorescência e a fosforescência. A fosforescência ocorre quando a transição é proibida por spin, uma vez que ocorre entre estados de diferentes multiplicidades (de um estado tripleto para um estado singlete), sendo necessário haver inversão de spin.

Por outro lado, a fluorescência dá-se quando a transição é permitida por spin. O processo de emissão de radiação por fluorescência ocorre sempre do primeiro estado excitado singlete para o estado fundamental (também um estado singlete), mesmo que durante a absorção, a molécula seja excitada para níveis eletrónicos mais elevados do que o primeiro. Isto verifica-se devido à eficiência do processo de conversão interna. O excesso de energia vibracional, como já sabemos, é facilmente perdido devido a colisões moleculares e ao equilíbrio térmico, que é rapidamente atingido em solução [4,6].

2.2.2.2 Rendimento quântico de fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência, Φ_F , é o parâmetro físico que permite determinar a eficiência da emissão radiativa, representando a fração de moléculas excitadas que fluorescem. É dado pela seguinte equação

$$\Phi_F = \frac{\text{Nº de fótons emitidos}}{\text{Nº de fótons absorvidos}} \quad (2.10)$$

Este parâmetro não depende da intensidade da luz de excitação e pode aumentar com a diminuição de temperatura, uma vez que, quanto menor for a

temperatura menos frequentes serão as colisões entre as partículas e, desta forma, os processos não radiativos decrescem.

Na ausência de agentes inibidores de fluorescência, o rendimento quântico de fluorescência é dado por:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (2.11)$$

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 cruzamento intersistemas [6].

2.2.2.3 Anisotropia

A luz não polarizada é caracterizada pela radiação eletromagnética que se propaga livremente no espaço. É composta por ondas eletromagnéticas que vibram em infinitos planos perpendiculares à direção de propagação da luz, pois durante a propagação da luz, os planos elétrico e magnético giram em torno do seu eixo de propagação. Por outro lado, a luz polarizada propaga-se apenas num plano, uma vez que os planos de vibração elétrico e magnético não giram. Desta forma, as ondas de luz polarizada são ondas de luz em que as vibrações ocorrem num único plano.

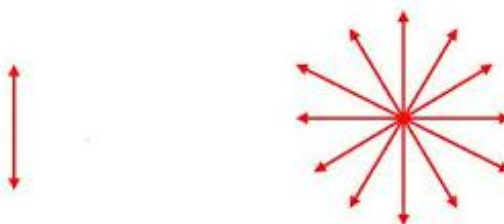


Figura 2.9 - Representação dos planos de propagação de ondas de luz não polarizada (à direita) e luz polarizada (à esquerda), vistos de frente.

A luz polarizada pode ser obtida utilizando aparelhos específicos, como polarizadores, ou fazendo a luz normal atravessar um Prisma de Nicol (prisma que consiste num dispositivo para a produção de luz polarizada).

O método de anisotropia de fluorescência consiste em fazer incidir luz polarizada numa amostra, de tal forma que a fluorescência emitida pela amostra é polarizada, podendo ter uma polarização diferente da de excitação. Apenas as

moléculas que estão alinhadas no plano da radiação incidente podem absorver e ser excitadas para emitir fluorescência – fotoseleção (figura 2.10). Se durante 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.

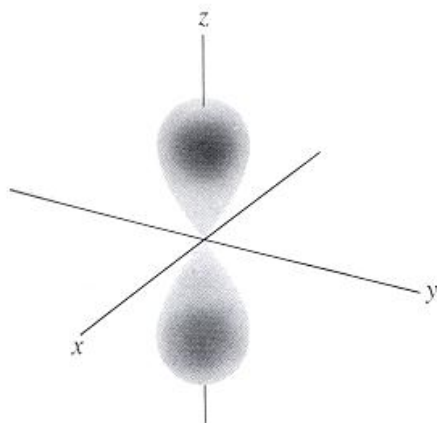


Figura 2.10 - Fotoseleção provocada por excitação com luz polarizada na direção z.

A anisotropia de fluorescência mede a difusão rotacional de uma molécula a partir da diferença na correlação de polarização em fluorescência, quer dizer, entre os fótons que excitam e os emitidos. As medidas de anisotropia de fluorescência (r) podem fornecer informação importante sobre a localização de compostos fluorescentes em estruturas moleculares. Uma aplicação importante é a determinação da temperatura de transição (ou de fusão) entre a fase gel e a fase líquido-cristalina dos fosfolípidos.

Através de espectroscopia de fluorescência, os valores de anisotropia, r , são calculados por

$$r = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + 2G I_{VH}} \quad (2.12)$$

onde I_{VV} e I_{VH} são as intensidades de fluorescência obtidas com polarizadores 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} and I_{HH} são as intensidades de fluorescência obtidas com polarização vertical e horizontal (para luz de excitação polarizada horizontalmente).

A anisotropia pode ainda ser relacionada com o tempo de vida do estado excitado e o tempo de correlação rotacional da molécula fluorescente [6],

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c} \right) \quad (2.13)$$

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.

2.2.2.4 Transferência de energia (FRET)

Durante a nossa investigação, a interação não-específica dos magnetolipossomas com modelos de membranas celulares (GUVs) foi avaliada pela transferência de energia dos compostos fluorescentes (doadores) para lípidos marcados (aceitantes) incluídos nas membranas.

FRET (em inglês, *Förster Resonance Energy Transfer*) é uma técnica de fluorescência que permite estudar interações moleculares e depende da transferência de energia de excitação eletrônica, não radiativa, entre dois fluoróforos.

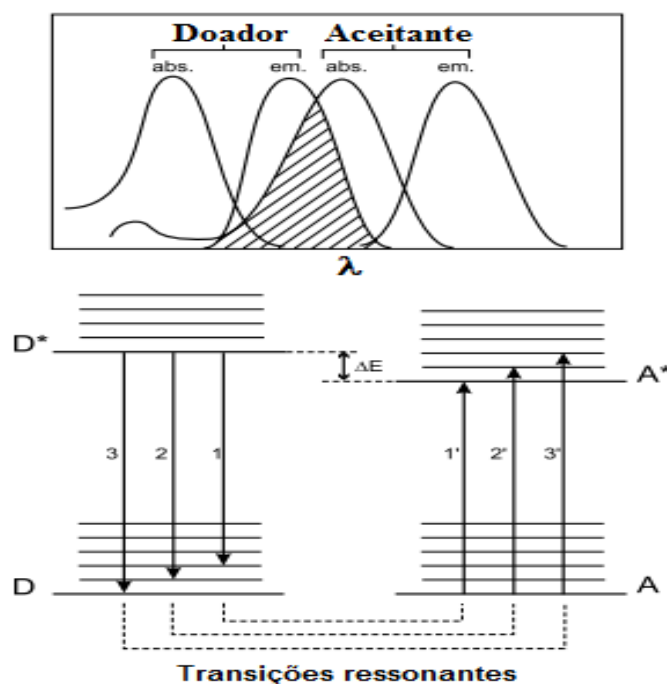
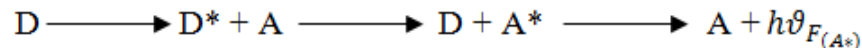


Figura 2.11 – Esquema dos níveis de energia das moléculas doador e aceitante mostrando as transições em que o relaxamento vibracional é mais rápido que a transferência de energia (muito fraca) e ilustração da sobreposição dos espectros integrados ente o espectro de emissão do doador e da absorção do aceitante.

A transferência de energia eletrônica ocorre quando um doador excitado (D^*) transfere a sua energia para um aceitante (A) através de uma interação dipolar:



A transferência de energia é demonstrada pela inibição de fluorescência do doador e diminuição do seu tempo de vida e, por outro lado, pelo aumento da emissão de fluorescência do aceitante.

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 [6,7].

2.2.2.5 Espetrofluorímetro

O espectrofluorímetro é o equipamento usado para medir a intensidade de fluorescência, I_F , que é dada pela seguinte equação

$$I_F = I_0 \left(1 - 10^{-\varepsilon(\lambda_{exc})bc} \right) \Phi_F G, \quad (2.14)$$

em que I_0 é a intensidade de radiação incidente, $1 - 10^{-\varepsilon(\lambda_{exc})bc}$ representa a fração de radiação absorvida, Φ_F é o rendimento quântico de fluorescência e G é um factor de geometria que representa a fração de luz detetada.

A configuração de 90° entre o monocromador de excitação e o detetor é muito importante, pois só assim se regista apenas a radiação proveniente da fluorescência e não a radiação transmitida.

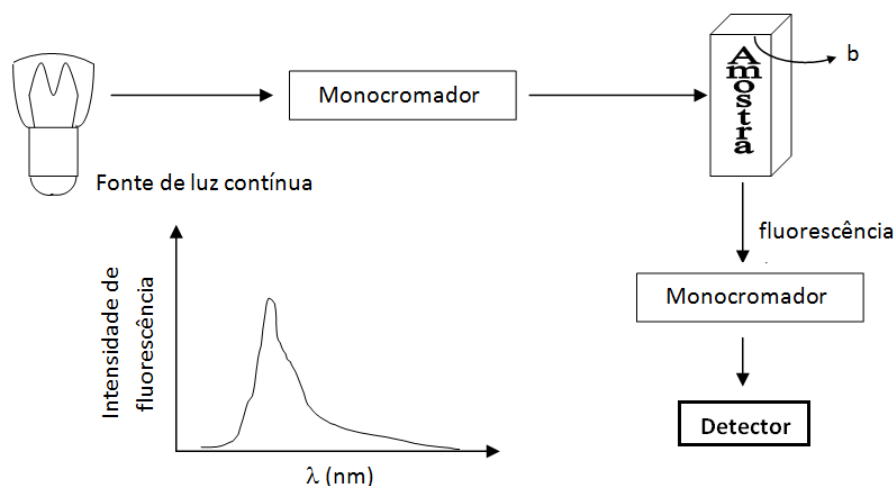


Figura 2.11 - Representação esquemática de um espectrofluorímetro com exemplo de espectro de fluorescência inserido.

Os espectrofluorímetros são constituídos por uma fonte de radiação contínua com excitação no ultravioleta e visível, habitualmente uma lâmpada de arco de xénon. Em geral possuem ótica de feixe duplo, de forma a compensar as flutuações da intensidade da fonte de radiação. A radiação passa primeiro por um monocromador (monocromador de excitação) e depois 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.

O uso de dois monocromadores permite obter dois tipos de espectros, espectros de emissão e espectros de excitação. Nos espectros de emissão é selecionado no primeiro monocromador um comprimento de onda onde a amostra absorve, enquanto o segundo faz um varrimento para toda a região de comprimentos de onda no qual a amostra emite. Por outro lado, os espectros de excitação são obtidos colocando o segundo monocromador fixo num comprimento de onda em que a amostra emite, e o primeiro monocromador faz, então, o varrimento da região de comprimentos de onda em que a amostra é excitada.

2.3 Difusão Dinâmica de Luz (DLS)

Para se determinar o tamanho médio das partículas obtidas nas diferentes amostras podem ser realizadas medidas de difusão dinâmica de luz (em inglês DLS - *Dynamic Light Scattering*). É uma técnica que permite medir o tamanho de

moléculas em solução com resolução nanométrica. Revela-se uma técnica bastante apelativa, na medida em que é não invasiva e as análises são feitas a partir de pequenos volumes de amostras com concentrações relativamente baixas.

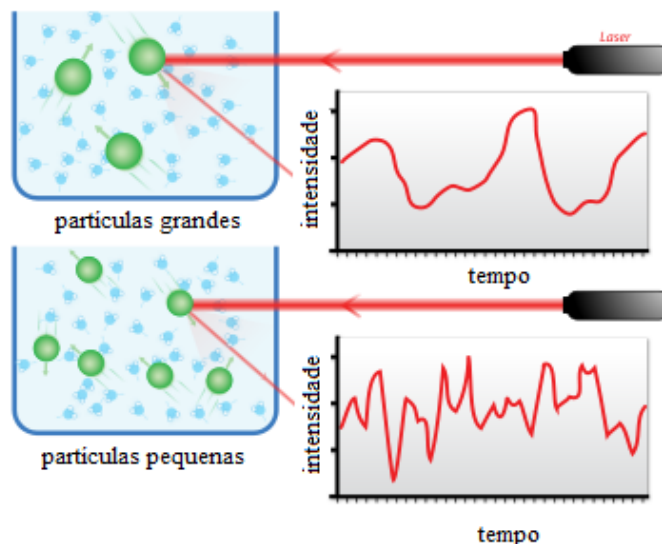


Figura 2.11 – Ilustração da difusão dinâmica da luz em duas amostras.

Em DLS, um feixe de luz (normalmente um laser) atravessa uma amostra. Posteriormente, a intensidade da luz que é difundida pelas moléculas da amostra é medida como função do tempo. Se as moléculas estiverem estacionárias, a quantidade de luz difundida deve ser constante. Contudo, todas as moléculas em solução apresentam movimento Browniano (movimento aleatório das partículas em solução causado pelos choques das moléculas do fluido com as partículas em suspensão), sendo, por isso, a luz difundida em todas as direções sem perda ou ganho de energia (difusão de Rayleigh). Sendo a fonte de luz um feixe monocromático e coerente, é observada uma variação dependente do tempo da intensidade de luz difundida. Esta dependência cinge-se ao facto de, em solução, as partículas serem sujeitas ao movimento Browniano e, por isso, a distância entre as partículas está constantemente a mudar no tempo. A importância do movimento Browniano em DLS deve-se ao princípio das partículas pequenas se moverem mais rápido do que partículas maiores. Desta forma, as partículas de maiores dimensões dispersam mais a luz incidente, e as partículas de menores dimensões espalham menos a radiação.

Através destes princípios, e medindo as flutuações da intensidade de luz detectada numa escala de tempo é possível obter informações relativas às partículas em suspensão, como o tamanho médio, a distribuição de tamanhos e a polidispersividade da amostra.

2.4 Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência é uma ferramenta bastante poderosa que tem permitido importantes avanços no estudo da morfologia e dinâmica estrutural e molecular de células vivas [8].

A imagiologia por fluorescência permite visualizar as moléculas além do limite de resolução do microscópio, sendo, por isso, considerada uma técnica bastante poderosa. Utiliza as propriedades de fluorescência de determinados compostos (marcadores) para observar estruturas moleculares. Este tipo de microscópios possui dois tipos de filtros, um filtro de excitação e um filtro de barragem. O primeiro localiza-se logo a seguir ao feixe de luz incidente na amostra, e permite selecionar o comprimento de onda desejado para fazer a excitação da amostra. Já o filtro de barragem está localizado entre a objetiva e a ocular, e tem como objetivo permitir somente a passagem da luz emitida pela amostra [9].

2.5 Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

O microscópio eletrónico de varrimento possui elevada resolução (na ordem de 2 a 5 nm) e foi desenvolvido para o estudo e caracterização de nanomateriais, como, por exemplo, as nanopartículas. Permite a análise da superfície de amostras condutoras, semicondutoras e não condutoras. A preparação das amostras precisa de ser cuidada. As amostras de metal não precisam de nenhuma preparação especial; contudo, as restantes precisam de ser cobertas por um material condutor e as amostras biológicas necessitam de ser desidratadas, de forma a preservar a sua estrutura.

O SEM utiliza um feixe de eletrões para examinar a amostra através da interação dos eletrões com a matéria. O seu princípio de operação baseia-se na

quantificação dos elétrons secundários (elétrons de baixa energia) emitidos por uma amostra em resposta a uma excitação eletrônica incidente [10].

Dentro de uma coluna de alto vácuo, são gerados elétrons a partir de um filamento de tungstênio. 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 objectiva, que o focaliza 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. A imagem é formada pela informação do microscópio, que consiste na localização dos pontos de varrimento do plano x,y com o conjunto de intensidades correspondentes, originadas pelo detetor de elétrons secundários.

2.6 Dispositivo de interferência quântica supercondutora (SQUID)

O SQUID (em inglês, *superconducting quantum interference device*) é um dispositivo de interferência quântica feito com materiais supercondutores. São instrumentos bastante sensíveis que permitem analisar as propriedades magnéticas de uma amostra. Permitem detetar campos magnéticos bastante baixos, na ordem de 10^{-15} T.

O funcionamento do SQUID baseia-se no efeito de Josephson. É um efeito físico que se manifesta pela manifestação de uma corrente elétrica através de dois supercondutores fracamente interligados, separados apenas por uma barreira isolante muito fina. Esta disposição é conhecida como uma Junção Josephson e a corrente que atravessa a barreira é chamada de Corrente Josephson. Fazendo uso das junções de Josephson, é possível detetar pequenas variações de energia.

Este equipamento é formado por um anel supercondutor interrompido por uma ou duas junções Josephson. Ao submetemos este equipamento a um campo externo perpendicular, é ser possível verificar e quantificar a dinâmica de fluxo magnético no anel.

2.7 Referências do Capítulo 2

- [1] D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª Edição, Bookman, 2002.
- [2] B. P. Straughan, S. Walker, *Spectroscopy*, Vol. 3, Science Paperbacks, Chapman and Hall, 1996.
- [3] D. A. Skoog, *Principles of Instrumental Analysis*, 3rd Edition, Saunders College Pub., Philadelphia, 1985.
- [4] M. L. S. S. Gonçalves, *Métodos Instrumentais para Análise de Soluções*, 4ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.
- [5] C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the study of biological structure and function*, Freeman and Co., New York, 1980.
- [6] B. Valeur, *Molecular Fluorescence – Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- [7] C. H. Wells, *Introduction to Molecular Photochemistry*, Chapman and Hall Ltd., London, 1972.
- [8] <http://www.nikoninstruments.com/>
- [9] S. R. Taboga, *Microscopia* in “A célula”, Eds. S. M. Recco-Pimentel, H. F. Carvalho (2001), cap. 2, p. 6-14.
- [10] B. A. Dedavid, C. I. Gomes, G. Machado, *Microscopia Eletrônica de Varredura - Aplicações e preparação de amostras*, Edipucrs, Porto Alegre, 2007.

Capítulo 3 – Procedimento Experimental

Neste capítulo vamos descrever o procedimento experimental, desde a preparação de soluções, até à execução das medidas utilizando as técnicas instrumentais descritas no capítulo anterior.

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. A água desionizada ultrapura foi cedida pelo Departamento de Ciências da Terra.

As medidas de absorção e fluorescência foram realizadas no Laboratório de Fotofísica do Centro de Física da Universidade do Minho. Os espectros de absorção foram determinados num espectrofotómetro UV-Vis-NIR Shimadzu, modelo UV-3101PC. Os espectros de emissão de fluorescência foram medidos num espectrofluorímetro Fluorolog 3, equipado com monocromadores duplos na excitação e emissão e um porta-amostras com controlo de temperatura. Os espectros de fluorescência foram corrigidos para a resposta instrumental, utilizando a curva de correção fornecida pelo fabricante do equipamento. As medidas de absorção e fluorescência foram efetuadas em células (em inglês, *cuvettes*) de absorção e fluorescência de quartzo, de 10 mm de percurso ótico.

As medidas de difusão dinâmica de luz (DLS) e as imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência foram realizadas no Departamento de Biologia da Universidade do Minho. Foi utilizado um equipamento de DLS da marca Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS e as análises foram feitas em *cuvettes* de polistireno, de percurso ótico 10 mm. O modelo do microscópio confocal de fluorescência utilizado foi um Leica Microsystems DM-5000B e as imagens foram obtidas por uma câmara digital Leica DCF350FX. As medidas de propriedades magnéticas foram realizadas pela técnica de SQUID na Universidade do Porto, através de uma colaboração existente.

3.1 Derivados de tienopiridinas

Os compostos potencialmente antitumorais, ureias derivadas de tienopiridinas, estudados foram sintetizados e purificados no Centro de Química da UM, tendo sido fornecidos para este estudo já caracterizados (com a informação da estrutura e massa molar), apresentando-se a seguir a sua estrutura.

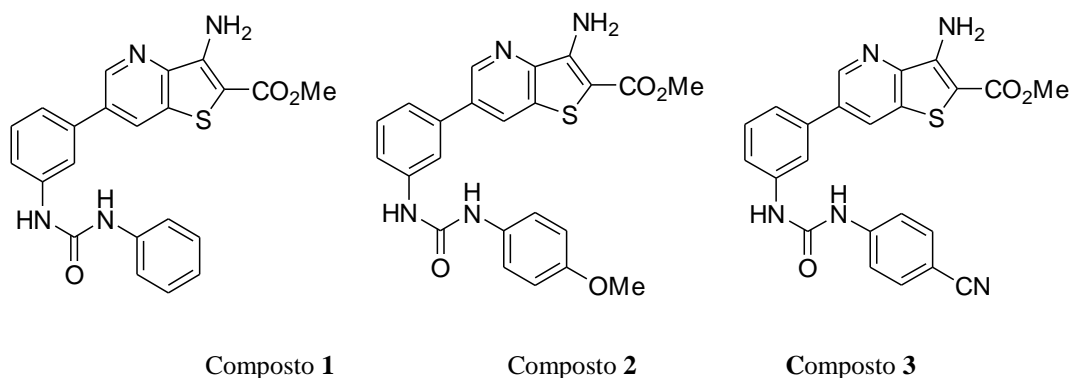


Figura 3.1 – Estrutura dos três compostos estudados (Me designa o grupo metilo, -CH₃).

As massas molares destes compostos são 419,12 g.mol⁻¹ para o composto **1**, 449,13 g.mol⁻¹ para o composto **2** e 444,11 g.mol⁻¹ para o composto **3**. As soluções-mãe dos compostos foram preparadas em etanol, para uma concentração final de, aproximadamente, 10⁻⁴ M.

3.2 Estudo fotofísico dos compostos em solução

As propriedades de absorção e fluorescência dos compostos foram estudadas em vários solventes. Os estudos espectroscópicos dos compostos em solventes foram realizados com soluções de concentração final de 3×10⁻⁶ M para as análises por fluorescência e 10⁻⁵ M para as medidas de absorção.

Os solventes utilizados, fornecidos pela Sigma-Aldrich, foram:

- Etanol
- Dioxano
- Diclorometano
- Acetato de Etilo
- Clorofórmio

- Dimetilformamida
- Dimetilsulfóxido
- Acetonitrilo

Os comprimentos de onda abaixo dos quais os solventes passam a absorver (em inglês, *cut-off*), são 275nm para o solvente dimetilformamida, 270 nm para o dimetilsulfóxido, 265 nm para o acetato de etil e 250 nm para o clorofórmio. Todos os outros absorvem abaixo de 200 nm.

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

3.2.1 Rendimento quântico de fluorescência

Os rendimentos quânticos de fluorescência foram determinados pelo método do padrão ou referência (equação 3.1) [1,2]. Neste método, o rendimento quântico dos compostos é obtido por comparação da sua área espectral integrada com a de uma referência padrão de rendimento quântico conhecido.

$$\Phi_s = \left[\frac{A_r F_s n_s^2}{A_s F_r n_r^2} \right] \Phi_r \quad (3.1)$$

em que A é o valor da absorvância no comprimento de onda de excitação, F é a área de emissão integrada e n é o índice de refração do solvente utilizado. O subscrito *r* refere-se ao padrão (referência) e o subscrito *s* refere-se à amostra (em inglês, *sample*).

Como padrão foi utilizada uma solução de sulfato de quinino em ácido sulfúrico 0,05M, de concentração 1 ppm (partes por milhão), cujo rendimento quântico de fluorescência é $\Phi_r = 0,546$ a 25 °C [3].

3.3 Estudo fotofísico dos compostos em vesículas lipídicas

Os compostos foram também estudados quando incorporados em lipossomas, com uma concentração final de lípido de 10^{-3} M e de composto 2×10^{-6}

M, de modo a ter-se uma razão composto/lípido de 1:500. Foram também preparados lipossomas com colesterol numa proporção de (7:3), 70% de fosfolípido para 30% de colesterol. Foi utilizada uma solução de colesterol em etanol de concentração 20mM. De facto, vesículas de Egg-PC com colesterol, numa proporção de (7:3), são habitualmente usadas como modelos de membrana biológica [4,5].

Os lípidos usados na formulação dos lipossomas foram:

- DODAB (brometo de *dioctadecildimetilamónio*)
- DPPC (*dipalmitoilfosfatidilcolina*)
- Egg-PC (*fosfatidilcolina ou lecitina do ovo*)
- DPPG (*dipalmitoilfosfatidilglicerol*)

Os lípidos DPPC, Egg-PC, DPPG e o colesterol foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, o DODAB foi fornecido pela Tokyo Kasei. As soluções *stock* dos lípidos foram preparadas com concentrações de 20mM em etanol para a solução de DODAB, 50 mM em etanol para o DPPC, 26,8 mM em clorofórmio para o DPPG e 86,2 mM em clorofórmio para o Egg-PC.

3.3.1 Preparação de lipossomas

A preparação dos lipossomas de diferentes composições, com os compostos incorporados, foi feita pelo método de injeção etanólica [6-8]. Esta técnica baseia-se na co-injeção de uma solução etanólica de fosfolípidos com composto numa solução tampão. A solução tampão utilizada foi uma solução de Tris-HCl (base Tris(hidroxilamina)aminometano) (10 mM Tris, pH=7,4). O pH da solução foi acertado com ácido clorídrico concentrado, até obtenção de pH neutro. Quando se realiza a injeção, a solução tampão deve encontrar-se a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase do lípido utilizado na preparação das vesículas.

Para a preparação de vesículas de Egg-PC, a mistura composto/fosfolípido em etanol foi injetada, sob agitação rigorosa, à solução tampão, à temperatura ambiente. Para tal, o clorofórmio da solução de Egg-PC foi evaporado e a mistura foi redissolvida em etanol. Um processo similar foi utilizado para formação das vesículas de DPPC, DODAB e DPPG; contudo, a injeção da solução mistura foi

feita na solução tampão pré-aquecida à temperatura de 60 °C, acima da temperatura de transição de fase dos lípidos. Nos casos em que a formulação dos lipossomas inclui colesterol, este foi acrescentado nas proporções pretendidas (30% de colesterol para 70% de lípido), à solução mistura antes da injeção.

3.3.2 Medidas de Anisotropia

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. Uma vez que a temperatura de transição de fase do Egg-PC é muito baixa [9], este lípido encontra-se na fase líquido-cristalina à temperatura ambiente. Assim, só se realizaram medidas a esta temperatura para os compostos em vesículas de Egg-PC.

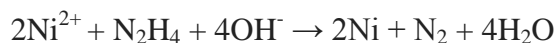
Para obter os valores de anisotropia, foram ainda traçados espectros de emissão de fluorescência com polarizadores na vertical e horizontal, na excitação e na emissão, também para temperaturas abaixo e acima da temperatura de transição de fase de cada lípido.

3.4 Preparação de nanopartículas de níquel

Ao longo do trabalho, foram efetuados diversos procedimentos para a síntese das nanopartículas de níquel, de modo a obter nanopartículas com cada vez melhores propriedades.

Começou-se com uma preparação em meio homogéneo, seguindo o procedimento descrito em [10] e [11]. O cloreto de níquel, com massa molar de 129,62 g.mol⁻¹, foi fornecido pela Merck. A solução *stock* de níquel foi preparada com uma concentração final de 0,186 M.

Em todos os ensaios, foi utilizada hidrazina mono-hidratada, de concentração 20,188M, como agente redutor e como base usou-se o hidróxido de sódio (NaOH, solução de hidróxido de sódio, 50% em água), 8,25M. O processo de redução do níquel é:



As nanopartículas foram preparadas a temperaturas elevadas, de forma a favorecer a sua síntese, por efetivação do processo de redução. Os ensaios foram reproduzidos utilizando soluções desarejadas, contudo, não foram verificadas diferenças significativas no que diz respeito à resposta das partículas formadas a um pequeno magneto.

Posteriormente, em alguns ensaios, foi acrescentado ácido cítrico (AC) 0,2 M, ou ácido tioglicólico (TGA) 0,2 M, às nanopartículas, numa proporção de (1:0,75), de forma a evitar a agregação das partículas [10].

No final de cada ensaio, as partículas foram lavadas várias vezes com etanol e água, por decantação magnética ou centrifugação, de forma a retirar restos dos reagentes das reações.

3.4.1 Síntese de nanopartículas de níquel em soluções aquosas com surfactante

As nanopartículas de níquel foram sintetizadas numa solução aquosa de surfactante catiónico *CTAB* (brometo de cetiltrimetilamónio), usando uma solução *stock* de (0,025 M) [10]. Neste ensaio com *CTAB*, as quantidades utilizadas foram:

Tabela 3.1 – Quantidades usadas na preparação com *CTAB*.

Ensaio com CTAB	
<i>Volume</i> (CTAB) = 1,25 ml	$[CTAB]_f = 7 \times 10^{-7} M$
<i>Volume</i> (Ni) = 538 μL	$[Ni]_f = 0,02 M$
<i>Volume</i> (acetona) = 50 μL	(10 $\mu L/ml$)
<i>Volume</i> (hidrazina) = 248 μL	$[hidrazina]_f = 1 M$
<i>Volume</i> (NaOH) = 2425 μL	$[NaOH]_f = 4 M$

3.4.2 Síntese de nanopartículas de níquel em micelas invertidas

As micelas invertidas são microemulsões de água em solvente orgânico (“óleo”) – w/o, constituídas por piscinas de água rodeadas pelo surfactante e dispersas no meio orgânico.

Neste processo de síntese de partículas de níquel, utilizou-se como surfactante ou o CTAB (tal como no procedimento anterior), ou o Triton X-100 (Sigma-Aldrich, massa molar 576,6 g.mol⁻¹ e densidade 1,07). Como solventes orgânicos, foram usados os álcoois pentanol 99% (massa molar 88,15 g.mol⁻¹ e densidade 0,81 g.cm⁻³) ou heptanol 98% (massa molar 116,2 g.mol⁻¹ e densidade 0,82 g.cm⁻³) ou o ciclohexano, fornecidos pela Sigma-Aldrich.

As microemulsões de Triton X-100 em ciclohexano necessitam normalmente de co-surfactante (álcoois de cadeia média), tendo sido usado, para esse efeito, o heptanol.

São preparadas duas misturas em diferentes tubos de ensaio (tubo **A** e tubo **B**), posteriormente misturados sob agitação [12]. Desta forma, é possível diminuir a probabilidade dos reagentes ficarem mal distribuídos na amostra, e assim diminuir a polidispersividade das partículas obtidas.

Para o tubo **B**, em primeiro lugar, foi preparada uma mistura que continha hidrazina e água. O pH foi corrigido, através da adição de NaOH (1 M), para cerca de 13, uma vez que se verificou que, a este pH, as partículas de Ni resultantes ficam dispersas durante mais tempo.

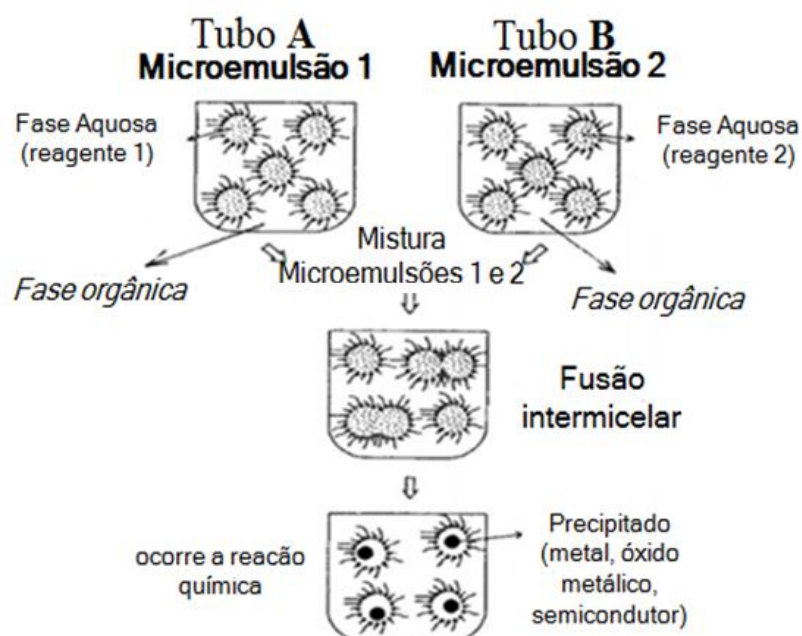


Figura 3.2 – Esquema da síntese de nanopartículas em micelas invertidas.

A concentração final de níquel em água utilizada nestes ensaios foi de 0,005M. As quantidades de reagentes utilizadas encontram-se a seguir.

Tabela 3.2 – Quantidades usadas na preparação com CTAB e heptanol.

Ensaio com CTAB e heptanol	
Tubo A	Tubo B
<i>Massa</i> (CTAB) = 1,65 g	<i>Massa</i> (CTAB) = 1,65g
<i>Volume</i> (heptanol) = 2737 µL	<i>Volume</i> (heptanol) = 2737 µL
<i>Volume</i> (Ni) = 299 µL	<i>Volume</i> (hidrazina) = 109 µL
<i>Volume</i> (H ₂ O)= 801 µL	<i>Volume</i> (NaOH) =3 µL
	<i>Volume</i> (H ₂ O) = 987 µL

Tabela 3.3 – Quantidades usadas na preparação com CTAB e pentanol.

Ensaio com CTAB e pentanol	
Tubo A	Tubo B
<i>Massa</i> (CTAB) = 1,65g	<i>Massa</i> (CTAB) = 1,65g
<i>Volume</i> (pentanol) = 2774 µL	<i>Volume</i> (pentanol) = 2774 µL
<i>Volume</i> (Ni) = 299 µL	<i>Volume</i> (hidrazina) = 109 µL
<i>Volume</i> (H ₂ O)= 801 µL	<i>Volume</i> (NaOH) = 2,7 µL
	<i>Volume</i> (H ₂ O) = 978 µL

Tabela 3.4 – Quantidades usadas na preparação com Triton X-100 e heptanol.

Ensaio com Triton X-100 + heptanol	
Tubo A	Tubo B
<i>Volume</i> (Triton) = 2400µL	<i>Volume</i> (Triton) = 2400µL
<i>Volume</i> (heptanol) = 2774µL	<i>Volume</i> (heptanol) = 2774µL
<i>Volume</i> (Ni) = 299µL	<i>Volume</i> (hidrazina) =109µL
<i>Volume</i> (H ₂ O) = 801µL	<i>Volume</i> (NaOH) = 1,75µL
	<i>Volume</i> (H ₂ O) = 400µL

Tabela 3.5 – Quantidades usadas na preparação com Triton X-100, heptanol e ciclohexano.

Ensaio com Triton X-100 + heptanol + ciclohexano	
Tubo A	Tubo B
<i>Volume</i> (Triton) = 530 μ L	<i>Volume</i> (Triton) = 530 μ L
<i>Volume</i> (ciclohexano) = 2250 μ L	<i>Volume</i> (ciclohexano) = 2250 μ L
<i>Volume</i> (heptanol) = 540 μ L	<i>Volume</i> (heptanol) = 540 μ L
<i>Volume</i> (Ni) = 299 μ L	<i>Volume</i> (hidrazina) = 109 μ L
<i>Volume</i> (H ₂ O) = 801 μ L	<i>Volume</i> (NaOH) = 1,75 μ L
	<i>Volume</i> (H ₂ O) = 989 μ L

O ponto de ebulição do ciclohexano é 80,74 °C. Desta forma, nos ensaios em que este é utilizado (tabela 3.5) não se deve ultrapassar esta temperatura.

3.4.3 Síntese de nanopartículas de níquel cobertas de lípido ou AOT

Para a síntese de nanopartículas cobertas de lípido, tomou-se como base o procedimento descrito em [13] e [14]. Assim, usou-se o lípido DOPG (dioleoilfosfatidilglicerol), de massa molar 797.026 g.mol⁻¹ fornecido pela Avanti Polar Lipids. Adaptou-se também o procedimento para a utilização do surfactante aniônico AOT (*bis*(2-etilhexil)sulfosuccinato de sódio), com massa molar 444.56 g.mol⁻¹, fornecido pela Sigma-Aldrich.

Tabela 3.6 – Quantidades usadas na preparação com lípido DOPG.

Ensaio com DOPG	
<i>Volume</i> (H ₂ O) = 2ml	
<i>Volume</i> (Ni) = 54 μ L	[Ni] _f = 0,002M
<i>Volume</i> (DOPG) = 272 μ L	(25mg/ml)
<i>Volume</i> (hidrazina) = 186 μ L	
<i>Volume</i> (NaOH) = 2727,25 μ L	

Tabela 3.7 – Quantidades usadas na preparação com surfactante AOT.

Ensaio com AOT	
<i>Volume</i> (H ₂ O) = 2ml	
<i>Volume</i> (Ni) = 54μL	[Ni] _f = 0,001M
<i>Volume</i> (AOT) = 168μL	(25mg/ml)
<i>Volume</i> (hidrazina) = 434μL	
<i>Volume</i> (NaOH) = 5151μL	

3.4.4 Cobertura do núcleo das nanopartículas

Depois de obtidas e purificadas as nanopartículas a partir dos diversos procedimentos, procedeu-se à sua cobertura com coroa de sílica. A sílica foi obtida a partir de uma solução de TEOS 98% (*tetraetilortossilicato*), da Sigma Aldrich.

Foram utilizados, com sucesso, dois processos diferentes. O primeiro processo consiste em injetar 100 μL da solução de nanopartículas, previamente lavadas e dispersas em etanol, em 5 mL de uma solução de AOT 0,1M em ciclohexano. Posteriormente, é adicionado TEOS na proporção requerida.

O segundo processo consiste numa primeira fase de dispersão das nanopartículas, antes de adicionar TEOS. Primeiro, adicionou-se ácido mercaptododecanóico (MDA) $5,7 \times 10^{-2}$ M às partículas, numa proporção de (1:1), ajudando à ligação das partículas ao TEOS através dos grupos hidróxido (-OH). O grupo tiol liga-se à superfície metálica e o grupo -COOH permite a solubilização em água. Posteriormente, acertou-se o pH da solução para 13, com NaOH. Por magnetização, as nanopartículas que não ficaram dispersas são decantadas. Durante 90 minutos, o pH é controlado ao valor de 11. Por fim, adiciona-se TEOS na proporção requerida. Este procedimento foi adaptado da referência [15] para partículas de níquel, substituindo o citrato por MDA, uma vez que desempenham o mesmo papel.

As razões de concentração de TEOS para nanopartículas de níquel utilizadas foram:

- ✓ (5:1)
- ✓ (10:1)
- ✓ (25:1)
- ✓ (30:1)
- ✓ (50:1)
- ✓ (60:1)
- ✓ (100:1)

As soluções de nanopartículas com e sem coroa de sílica foram analisadas por espectroscopia de absorção e fluorescência. Foram também analisadas por DLS.

3.5 Encapsulamento

O encapsulamento das nanopartículas em magnetolipossomas foi realizado por dois processos.

No primeiro processo, uma mistura de lípidos e composto é injetada, de modo a obter, como anteriormente, lipossomas com 10^{-3} M de lípido e 2×10^{-6} M de composto, numa solução aquosa de nanopartículas bem dispersa. Deste processo, resultam magnetolipossomas aquosos.

O segundo processo baseia-se em fazer crescer uma segunda camada de lípidos à volta das nanopartículas resultantes dos ensaios de síntese com DOPG ou AOT (capítulo 3.4.3), acrescentando um volume de lípido igual ao utilizado inicialmente nesse ensaio. Desta forma, é criada uma bicamada lipídica à volta das nanopartículas, resultando deste método magnetolipossomas sólidos.

No final das preparações, os magnetolipossomas foram lavados por decantação magnética, utilizando um pequeno magneto. Desta forma, são eliminadas as nanopartículas de níquel que não foram encapsuladas e a toxicidade do ferrofluido magnético é reduzida.

3.6 Preparação de modelos de membrana

Foram usados GUVs (*Giant Unilamellar Vesicles*) de lecitina de soja, 776 g.mol⁻¹, para imitar modelos de membrana celular. Como marcadores fluorescentes da membrana, foram utilizados os lípidos marcados:

- NBD-C₆-HPC (3,24×10⁻⁴ M), excitação/emissão máxima ~ 464/536 nm
- NBD-C₁₂-HPC (2,91×10⁻⁴ M), excitação/emissão máxima ~ 463/536 nm
- NBD-PE (4,18×10⁻⁴ M), excitação/emissão máxima ~ 463/536 nm

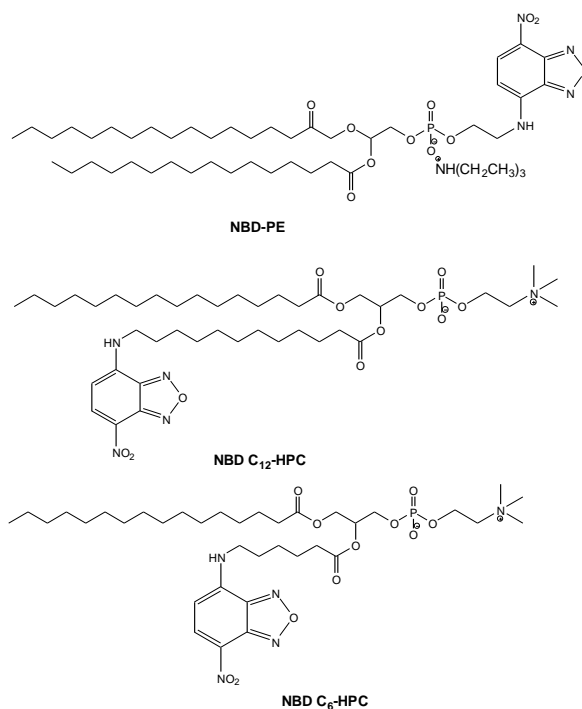


Figura 3.3 – Estrutura dos três marcadores fluorescentes utilizados.

Estes marcadores marcam diferentes zonas das moléculas de fosfolípidos. O NBD-C₆-HPC marca, aproximadamente, o meio da cadeia hidrocarbonada, o NBD-C₁₂-HPC marca uma posição mais para o fim da cadeia, e o NBD-PE marca a cabeça polar dos fosfolípidos.

Os GUVs foram preparados a partir de um filme obtido por uma corrente de azoto ultrapuro, que passa numa solução que contém 1 mM de lecitina de soja e 10⁻⁵ M de marcador. Este filme é pré-hidratado com 20 µL de água e incubado durante 45 minutos, a 45 °C. Posteriormente, adicionaram-se 3 mL de uma solução de glucose 0,1 M e volta a incubar-se durante duas horas, a 37 °C. No final, a solução

é sujeita a uma centrifugação de 14000g durante trinta minutos a 20 °C. Desta forma, qualquer tipo de agregado molecular de pequenas dimensões é removido, conforme descrito em [16,17].

Para compensar a perda de marcador originada pela eliminação dos pequenos agregados moleculares, foi utilizada uma quantidade de marcador dez vezes superior à quantidade de composto utilizada nos magnetolipossomas.

Os GUVs foram observados por microscopia confocal.

3.7 Estudos de transferência de energia

A interação não-específica dos magnetolipossomas com modelos de membrana celular pode ser facilmente avaliada pela transferência de energia ente os magnetolipossomas e os GUVs. Os compostos incorporados nos magnetolipossomas funcionaram como doadores de energia e os marcadores de membrana nos GUVs como aceitantes. Estes ensaios permitem perceber se a droga internalizada consegue sair dos magnetolipossomas para se localizar nas células alvo.

Primeiro, foram traçados os espectros dos magnetolipossomas e dos GUVs isolados. Posteriormente, fez-se nova análise espectral a uma mistura de 500 µL da solução de magnetolipossomas e 1500 µL de solução de GUVs. Em alguns casos, adicionou-se ainda 5 µL de uma solução de cloreto de cálcio 1M, uma vez que o cálcio auxilia a libertação do composto dos lipossomas.

3.8 Referências do Capítulo 3

- [1] J.N. Demas, G.A. Crosby, Measurement of photoluminescence quantum yields – Review, *J. Phys. Chem.* 75 (1971) 991-1024.
- [2] S. Fery-Forgues, D. Lavabre, Are fluorescence quantum yields so tricky to measure? A demonstration using familiar stationery products, *J. Chem. Educ.* 76 (1999) 1260-1264.
- [3] S. R. Meech, D. Phillips, Photophysics of some common fluorescence standards, *J. Photochem.* 23 (1983) 193-217.
- [4] C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, V. Monaco, C. Goulard, S. Rebuffat, B. Bodo, Effect of N^α-acyl chain length on the membrane-modifying properties of synthetic analogs of the lipopeptaibol trichogin GA IV, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 4952-4958.
- [5] M. Crisma, A. Barazza, F. Formaggio, B. Kaptein, B. Q. Broxterman, J. Kamphuis, C. Toniolo, Peptaibolin: synthesis, 3D-structure, and membrane modifying properties of the natural antibiotic and selected analogues, *Tetrahedron* 57 (2001) 2813-2825.
- [6] S. Batzri, E. D. Korn, Single bilayer liposomes prepared without sonication, *BBA: Biomembranes* 298 (1973) 1015-1019.
- [7] J. M. H. Kremer, M. W. J. v. d. Esker, C. Pathmamanoharan, P. H. Wiersema, Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method, *Biochemistry* 16 (1977) 3932-3935.
- [8] J. R. Nordlund, C. F. Schmidt, S. N. Dicken, T. E. Thompson, Transbilayer distribution of phosphatidylethanolamine in large and small unilamellar vesicles, *Biochemistry* 20 (1981) 3237-3241.
- [9] D. Papahadjopoulos, N. Miller, Phospholipid model membranes. I. Structural characteristics of hydrated liquid crystals, *Biochim. Biophys. Acta* 135 (1967) 624-638.

- [10] D.-H. Chen, C.-H. Hsieh, Synthesis of nickel nanoparticles in aqueous surfactant solutions, *J. Mater. Chem.* 12 (2002) 2412-2415.
- [11] M. Benelmekki, A. Montras, A. J. Martins, P. J. G. Coutinho, Ll. M. Martinez, *J. Magn. Magn. Mater.* 323 (2011) 1945-1949.
- [12] A. K. Ganguli, A. Ganguly, A. Vaidya, Microemulsion-based synthesis of nanocrystalline materials, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 474-485.
- [13] C. J. Meledandri, T. Ninjbadgar, D. F. Brougham, Size-controlled magnetoliposomes with tunable magnetic resonance relaxation enhancements, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 214-222.
- [14] P. Calandra, Synthesis of Ni nanoparticles by reduction of NiCl₂ ionic clusters in the confined space of AOT reversed micelles, *Materials Lett.* 63 (2009) 2416-2418.
- [15] S. Campelj, D. Makovec, M. Drofenik, Preparation and properties of water-based magnetic fluids, *J. Phys.: Condens. Matter* 20 (2008) 204101.
- [16] Y. Tamba, H. Terashima, M. Yamazaki, A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles, *Chem. Phys. Lipids* 164 (2011) 351-358.
- [17] T. Tanaka, Y. Tamba, S. Md. Masum, Y. Yamashita, M. Yamazaki, La³⁺ and Gd³⁺ induce shape change of giant unilamellar vesicles of phosphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta* 1564 (2002) 173-182.

Capítulo 4 – Resultados e discussão

4.1 Estudo fotofísico dos compostos em vários solventes

Os compostos fluorescentes derivados de tienopiridinas apresentam uma promissora atividade antitumoral, já testada em vários compostos deste tipo [1], pelo que o estudo do seu comportamento fotofísico em solução e quando incorporados em lipossomas é de especial relevância.

Os rendimentos quânticos de fluorescência, assim como os máximos de absorção e emissão, determinados para os três compostos nos vários solventes, encontram-se na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Comprimentos de onda máximos de absorção (λ_{abs}) e emissão (λ_{em}), coeficiente de absorção molar (ϵ) e rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) para os compostos em vários solventes.

<i>Solvente</i>	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm} (\epsilon / 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$			$\lambda_{\text{em}} (\text{nm})$			Φ_F^b		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Dioxano	373 (0.78); 290 (4.06)	374 (0.05); 292 (0.34)	376 (0.07); 290 (0.71)	455	455	452	0.09	0.19	0.23
Diclorometano	370 (0.63); 291 (3.23); 254 (3.21)	368 (0.68); 290 (3.52); 255 (3.53)	370 (0.87); 290 (8.73)	457	458	458	0.25	0.22	0.07
Acetato de Etilo^a	369 (0.78); 288 (4.06)	372 (0.51); 290 (2.76)	370 (1.13); 290 (8.70)	460	459	456	0.15	0.18	0.14
Cloroformio^a	365 (0.69); 292 (3.61); 256 (3.44)	365 (0.11); 283 (1.59)	366 (0.11); 282 (6.92)	446	447	446	0.10	0.07	0.06
Dimetilformamida^a	369 (0.08); 290 (0.43)	360 (0.07); 290 (0.42)	371 (0.08); 300 (0.81)	472	471	471	0.24	0.25	0.38
Dimetilsulfóxido^a	373 (0.71); 295 (3.30)	371 (0.63); 296 (2.58)	375 (0.76); 297 (5.93)	481	481	481	0.53	0.65	0.61
Acetonitrilo	371 (0.43); 290 (3.02); 256 (4.03)	372 (0.58); 289 (2.96); 256 (3.20)	371 (0.84); 292 (7.83)	466	465	466	0.19	0.20	0.04

^a cut-off dos solventes: *N,N*-dimetilformamida: 275 nm; Dimetilsulfóxido: 270 nm; Acetato de Etilo: 265 nm; Clorofórmio: 250 nm.

^b Relativo ao sulfato de quinino (em H_2SO_4 0,05M); $\Phi_F = 0,546$ a 25 °C. Erro absoluto: 10%.

Inicialmente, as propriedades de absorção e fluorescência dos três novos compostos estudados neste trabalho foram avaliadas em vários solventes de diferentes polaridades.

Todos os compostos apresentaram uma fluorescência razoável em vários solventes. Os solventes estudados não incluem ciclo- ou *n*-alcanos (por exemplo, ciclohexano ou *n*-heptano), porque a solubilidade destes compostos neste tipo de solventes é muito baixa. Os rendimentos quânticos de fluorescência estão na gama de 6% em clorofórmio até 65% em DMSO (dimetilsulfóxido) (Tabela 4.1).

Contudo, não foi observada qualquer emissão em solventes próticos como a água, o metanol e o etanol. Um comportamento semelhante já foi anteriormente observado noutros derivados recentemente sintetizados de tieno[3,2-*b*]piridinas, também antitumorais, de tipo di(hetero)ariléter [2].

Os espectros de fluorescência normalizados são mostrados nas figuras seguintes. Os espectros de absorção dos compostos em acetonitrilo e dioxano estão inseridos nas figuras, a título de exemplo. Um gráfico comparativo dos rendimentos quânticos apresenta-se na figura 4.4.

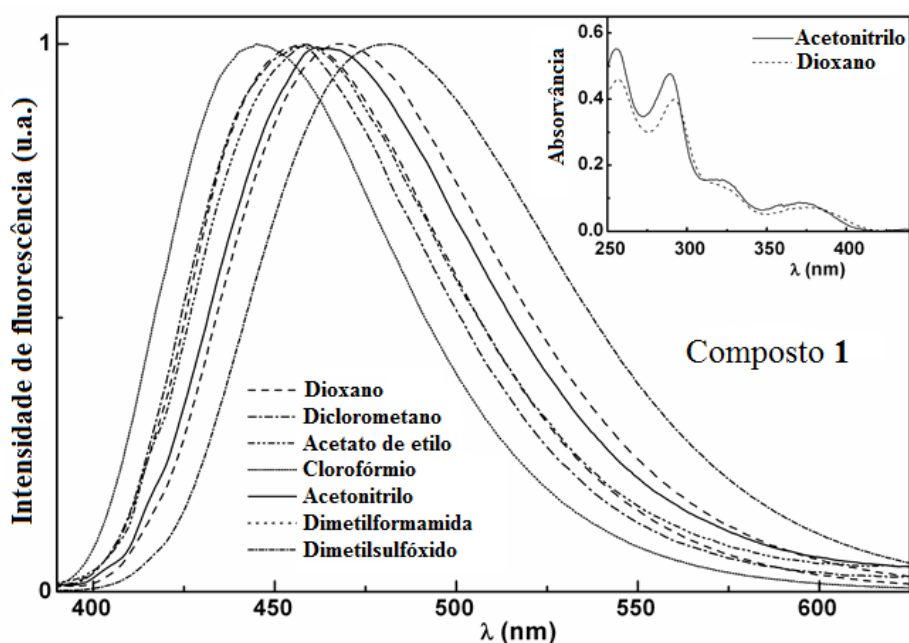


Figura 4.1 – Espectros de fluorescência normalizados do composto **1** em solução (3×10^{-6} M) em vários solventes ($\lambda_{\text{exc}}=370$ nm). *Inserido*: Espectros de absorção do composto **1** em solução (10^{-5} M) em Dioxano e Acetonitrilo, como exemplo.

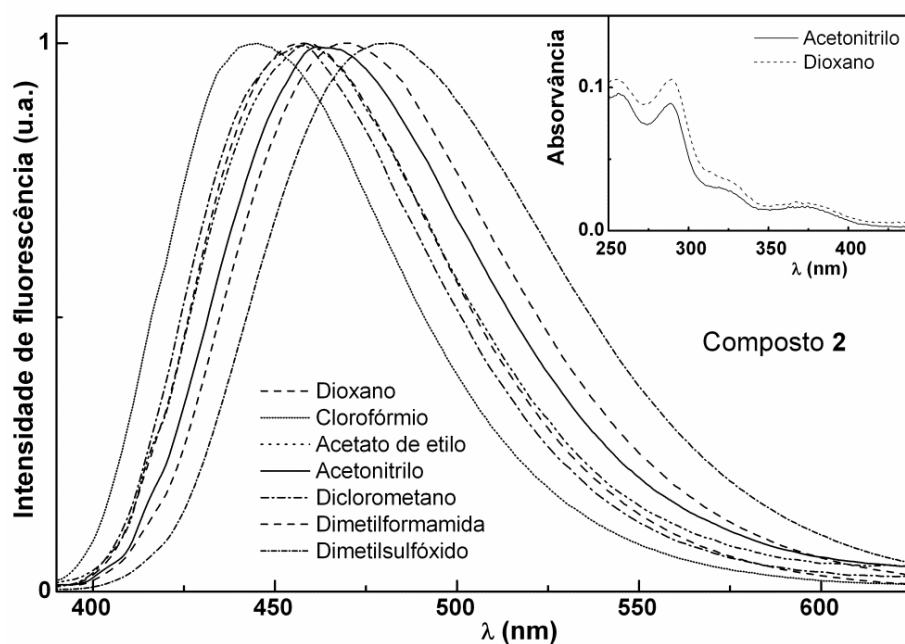


Figura 4.2 – Espectros de fluorescência normalizados do composto **2** em solução (3×10^{-6} M) em vários solventes ($\lambda_{\text{exc}}=370$ nm). *Inserido:* Espectros de absorção do composto **2** em solução (10^{-5} M) em Dioxano e Acetonitrilo, como exemplo.

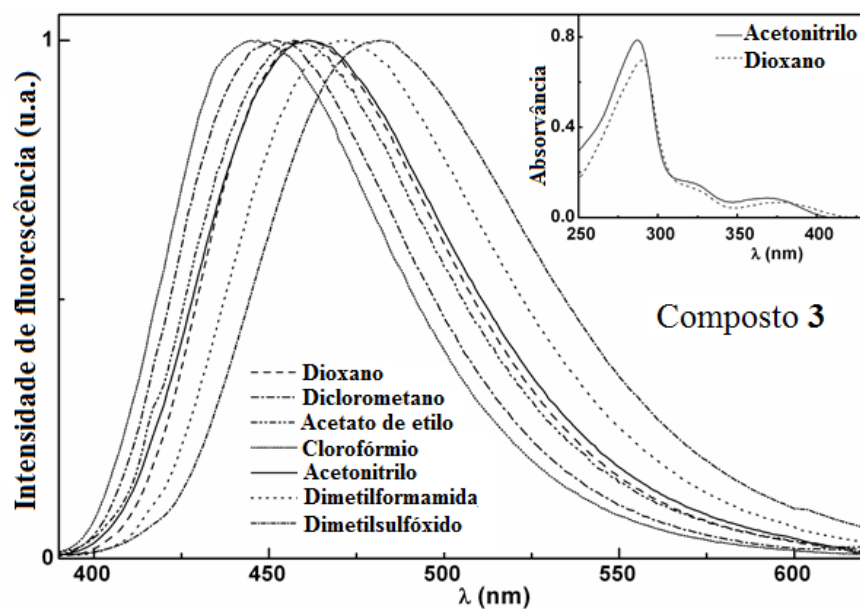


Figura 4.3 – Espectros de fluorescência normalizados do composto **3** em solução (3×10^{-6} M) em vários solventes ($\lambda_{\text{exc}}=370$ nm). *Inserido:* Espectros de absorção do composto **3** em solução (10^{-5} M) em Dioxano e Acetonitrilo, como exemplo.

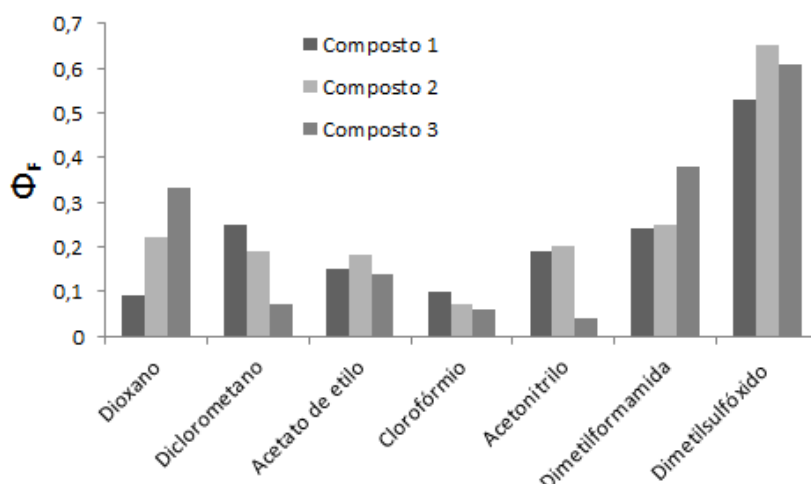


Figura 4.4 – Gráfico comparativo dos rendimentos quânticos de fluorescência dos compostos nos vários solventes.

A não emissão em solventes próticos poderá ser justificada por uma interação específica solvente-soluto por pontes de hidrogénio, por exemplo, por protonação do átomo de azoto do anel de piridina [2]. Esta justificação pode ainda explicar os baixos rendimentos quânticos de fluorescência obtidos no solvente clorofórmio, uma vez que a formação de pontes de hidrogénio entre moléculas de clorofórmio e aceitantes de prótons já foi descrita na literatura [3-4].

Todos os compostos revelaram maior intensidade de fluorescência em solventes polares, como dimetilsulfóxido e dimetilformamida, comportamento também comum para os derivados de tipo di(hetero)ariléter de tienopiridina [2]. O grupo substituinte dos compostos parece não influenciar significativamente o rendimento quântico de fluorescência (figura 4.4), apesar de o grupo $-OCH_3$ (substituinte do composto **2**) ter um carácter doador de eletrões e o grupo $-CN$ (composto **3**) ter um carácter de aceitador de eletrões.

Para todos os compostos foi verificado um desvio para o vermelho (para maiores comprimentos de onda) na emissão de fluorescência nos solventes polares (34-36nm entre o clorofórmio e o dimetilsulfóxido). Contudo, na absorção, o desvio para o vermelho é desprezável (Tabela 4.1). Este comportamento aponta para um importante contributo da relaxação do solvente após a fotoexcitação,

indicando um caráter de transferência de carga intramolecular (ICT, em inglês, *Intramolecular Charge Transfer*) do estado excitado.

Os desvios das bandas de emissão dependentes do solvente (desvios solvatocrômicos) são muitas vezes descritos pela equação de Lippert-Mataga (equação 4.1), que relaciona a diferença energética entre os máximos de absorção e emissão com a polarizabilidade orientacional [5,6]

$$\bar{\nu}_{\text{abs}} - \bar{\nu}_{\text{fl}} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{2\Delta\mu^2}{hcR^3} \Delta f + \text{const} \quad (4.1)$$

em que $\bar{\nu}_{\text{abs}}$ é o número de onda máximo de absorção, $\bar{\nu}_{\text{fl}}$ é o número de onda máximo de emissão, $\Delta\mu = \mu_e - \mu_g$ é a diferença no momento dipolar do soluto entre o estado excitado (μ_e) e fundamental (μ_g), R é o raio da cavidade (considerando o fluoróforo como um dipolo pontual no centro de uma cavidade esférica imersa no solvente homogêneo), e Δf é a polarizabilidade orientacional (equação 4.2) dada por:

$$\Delta f = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}, \quad (4.2)$$

sendo ϵ a constante dielétrica estática e n o índice de refração do solvente.

As representações de Lippert-Mataga para os três compostos encontram-se na figura 4.5, sendo razoavelmente lineares. O declive é mais acentuado para o composto **3**, o que indica um caráter ICT mais pronunciado para o estado excitado deste composto.

Com o programa ArgusLab obteve-se a geometria otimizada (Figura 4.6) da estrutura destas três moléculas (usando o modelo semi-empírico PM3), e foram estimados os raios da cavidade (Tabela 4.2). A partir das representações de Lippert-Mataga foram então calculados os valores de $\Delta\mu = \mu_e - \mu_g$ (Tabela 4.2).

Os valores mostram que os compostos **2** e **3** apresentam maior caráter de transferência de carga intramolecular (ICT) no estado excitado que o composto **1**. A substituição com um grupo doador de elétrons (-OCH₃ no composto **2**) ou um grupo

retirador de elétrons (-CN no composto **3**) conduz a um maior caráter ICT, especialmente no composto **3**.

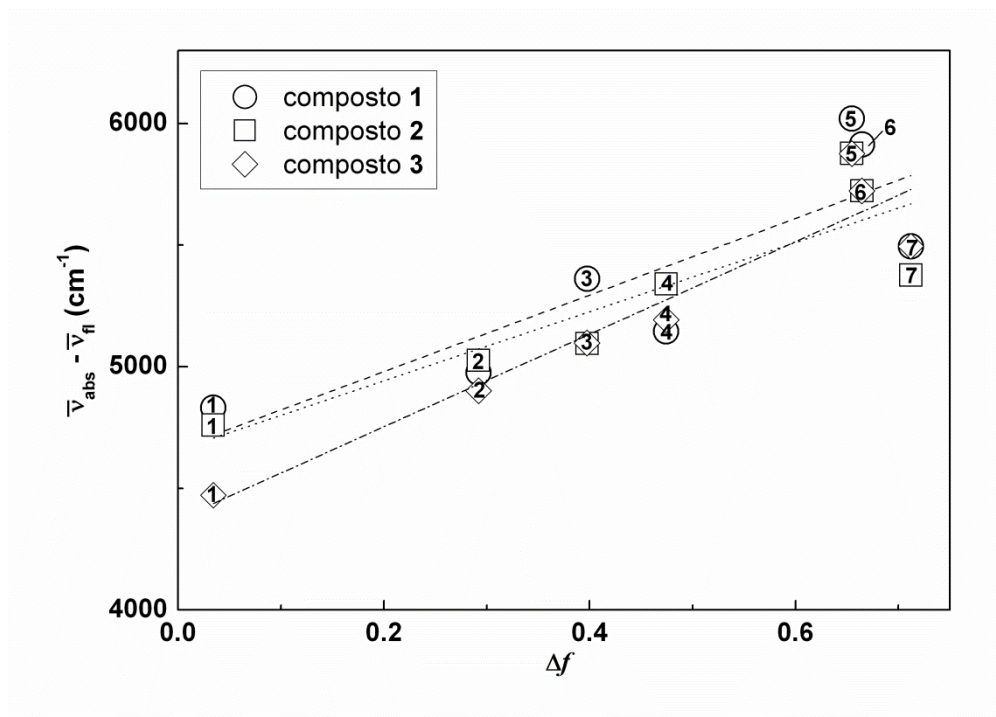


Figura 4.5 – Representação de Lippert-Mataga para os três compostos estudados. Solventes: 1 - Dioxano; 2 - Clorofórmio; 3 - Acetato de etilo; 4 - Diclorometano; 5 - Dimetilsulfóxido; 6 - *N,N*-dimetilformamida; 7 - Acetonitrilo (os valores de ϵ e n foram retirados da referência [7]).

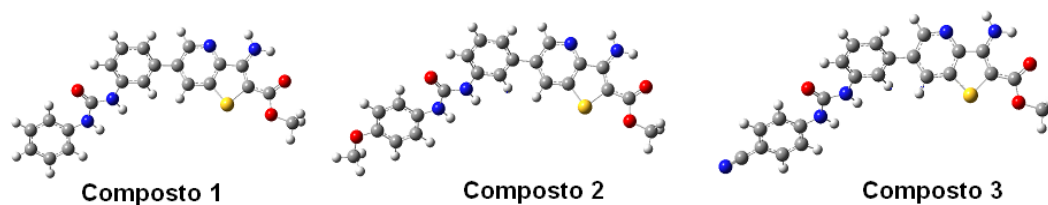


Figura 4.6 – Geometria otimizada no estado fundamental para os três compostos estudados (as cores dos átomos são cinza: C; branco: H; vermelho: O; azul: N; amarelo: S).

Tabela 4.2 – Raios da cavidade e valor absoluto da diferença entre os momentos dipolares do estado excitado e fundamental.

Composto	Raio da cavidade, R (Å)	$ \vec{\mu}_e - \vec{\mu}_g $ (D)
1	5.6	5.2
2	6.2	5.8
3	5.9	6.2

O comportamento fotofísico destes compostos mostrou que eles podem considerados como sondas solvatocrômicas, fornecendo informações importantes sobre as interações soluto-solvente. A sensibilidade da emissão de fluorescência do fluoróforo ao meio envolvente pode ser útil no estudo da localização dos compostos em modelos de membranas biológicas.

4.2 Estudo fotofísico dos compostos em membranas lipídicas

Foram efetuados estudos de emissão de fluorescência dos três compostos incorporados em lipossomas de diferentes composições e cargas à superfície, para temperaturas abaixo (25 °C) e acima (55 °C) da temperatura de transição da fase de cada fosfolípido. Foram preparadas membranas lipídicas de DPPC (lípidio zwitteriônico), DPPG (aniônico), DODAB (lípidio sintético catiónico), Egg-PC (mistura de fosfolípidos zwitteriônicos) e misturas Egg-PC:Coolesterol 7:3 e DPPC:Coolesterol 7:3. Como já referido, à temperatura ambiente, os lípidos DPPC, DODAB e DPPG encontram-se na fase gel (ordenada), em que as cadeias hidrocarbonadas estão completamente estendidas e densamente empacotadas. Já a lecitina do ovo (Egg-PC) encontra-se na fase líquido-cristalina (fase desordenada ou fluida).

Alguns exemplos de espectros de fluorescência dos compostos incorporados em lipossomas são apresentados nas figuras 4.7 e 4.8 (como exemplo, já que todos os espectros são de forma semelhante).

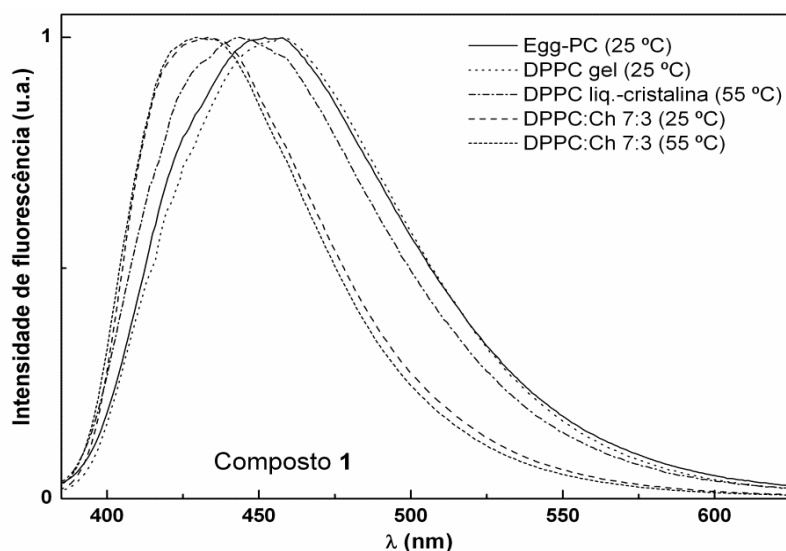


Figura 4.7 – Espectros de fluorescência normalizados do composto **1** (3×10^{-6} M) em membranas lipídicas de Egg-PC, Egg-PC:Coolesterol, DPPC e DPPC:Coolesterol, à temperatura de 25 °C e 55 °C.

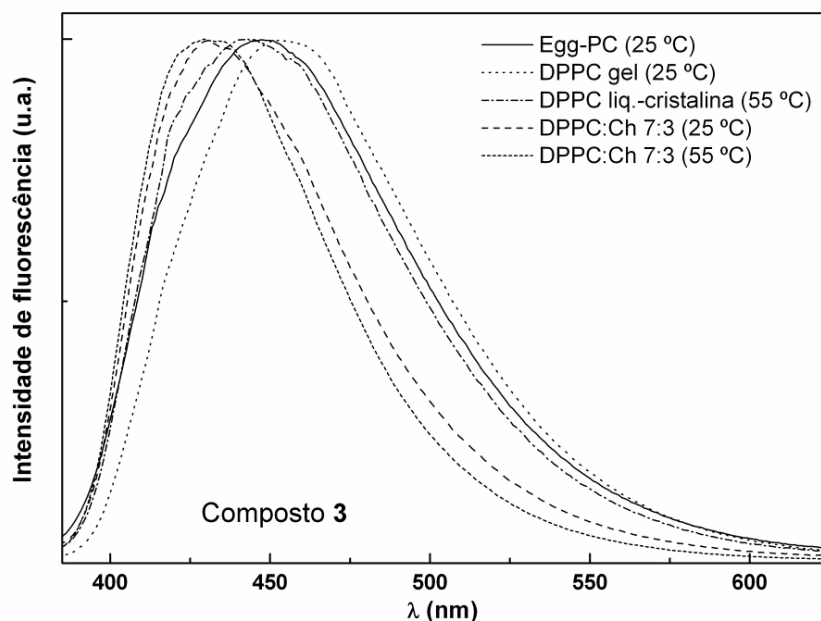


Figura 4.8 – Espectros de fluorescência normalizados do composto **3** (3×10^{-6} M) em membranas lipídicas de Egg-PC, Egg-PC:Coolesterol, DPPC e DPPC:Coolesterol, à temperatura de 25 °C e de 55 °C.

Todos os compostos apresentaram emissão de fluorescência razoável quando incorporados em lipossomas, indicando que poderão estar principalmente localizados na região da bicamada lipídica, uma vez que nos estudos dos compostos em solventes se verificou que estes não são fluorescentes em álcoois e água. Desta forma, os compostos poderão ser transportados na zona hidrofóbica dos lipossomas.

O comprimento de onda máximo de emissão nos lipossomas aponta para um ambiente hidrofóbico para todos os compostos nestes agregados lipídicos, sentindo um ambiente com polaridade próxima do dioxano ou ainda menos polar do que este (Tabela 4.3). Um ambiente ligeiramente mais hidratado é inferido para estes compostos nos lipossomas de DPPG a 25°C, considerando os valores de comprimento de onda máximo de emissão.

As medidas de anisotropia de fluorescência (r) podem fornecer informação relevante sobre a localização dos compostos nos lipossomas, uma vez que r aumenta com o tempo de correlação rotacional da molécula fluorescente e, portanto, com a viscosidade do ambiente do fluoróforo [8].

A anisotropia em estado estacionário relaciona-se com o tempo de vida do estado excitado e o tempo de correlação rotacional do fluoróforo [8],

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_c} \right) \quad (4.3)$$

em que r_0 é a anisotropia intrínseca, τ é o tempo de vida do estado excitado e τ_c é o tempo de correlação rotacional.

Os valores de anisotropia em estado estacionário encontram-se na Tabela 4.3. Valores de anisotropia em glicerol à temperatura ambiente foram também determinados, para comparação.

Tabela 4.3 – Valores de anisotropia de fluorescência (r) e comprimento de onda de emissão máximo (λ_{em}) para os compostos **1**, **2** e **3** em lipossomas, abaixo (25 °C) e acima (55 °C) da temperatura de transição dos lípidos. Valores de anisotropia dos compostos em glicerol à temperatura ambiente são mostrados para comparação.

Lípido	T (°C)	1		2		3	
		λ_{em} (nm)	r	λ_{em} (nm)	r	λ_{em} (nm)	r
Egg-PC	25	452	0.221	449	0.205	451	0.210
Egg-PC:Ch (7:3)	25	443	0.197	440	0.187	443	0.190
DPPC	25	458	0.238	459	0.232	452	0.262
	55	443	0.168	441	0.167	443	0.175
DPPC:Ch (7:3)	25	434	0.172	438	0.175	439	0.192
	55	430	0.143	432	0.136	431	0.155
DODAB	25	457	0.229	457	0.200	453	0.243
	55	446	0.182	447	0.167	446	0.131
DPPG	25	467	0.230	466	0.223	466	0.250
	55	457	0.181	458	0.190	457	0.195
Glicerol	25	474	0.325	465	0.295	469	0.308

Os resultados de anisotropia de fluorescência (tabela 4.3) permitem concluir que todos os compostos se encontram localizados na região interna da bicamada lipídica.

A transição da fase gel para a fase líquido-cristalina é claramente detetada por uma significativa diminuição da anisotropia à temperatura de 55 °C. Um aumento da anisotropia é previsto por diminuição do tempo de vida do estado

excitado (equação 4.3). Desta forma, a diminuição da anisotropia de fluorescência verificada a 55 °C pode ser atribuída à diminuição do tempo de correlação rotacional do fluoróforo e, portanto, a uma diminuição da microviscosidade do meio envolvente.

Os valores de anisotropia de fluorescência dos compostos encapsulados revelam também uma diminuição significativa quando a fluidez dos lipossomas é aumentada pela adição de colesterol na sua constituição. Estas variações de anisotropia são acompanhadas por um desvio para o azul nos espectros de emissão (Figuras 4.7 e 4.8), que também ocorre na fase líquido-cristalina dos lipossomas.

A diminuição na viscosidade local (ou por aquecimento ou por adição de colesterol) 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.

4.3 Caracterização das nanopartículas de níquel

Foram traçados os espectros de absorção no UV-Visível das dispersões de nanopartículas de níquel, de forma a comprovar a sua formação (figura 4.9). A absorção de luz pelas nanopartículas é descrita pela interação do campo elétrico da radiação eletromagnética com as nanopartículas metálicas, o que provoca oscilações coletivas coerentes nos elétrons livres. A estas oscilações dá-se o nome de plasmões superficiais. Quando a frequência da luz for a mesma da frequência da oscilação do plasmão, é observada uma banda de absorção devido à ressonância [9].

A banda de absorção por volta dos 290nm (figura 4.9) pode ser atribuída à absorção do plasmão superficial ressonante das nanopartículas de níquel, o que prova a formação das mesmas [10]. Também a absorção registada em toda a gama espectral comprova a existência de nanopartículas de níquel em solução, uma vez que as nanopartículas metálicas absorvem em toda a região do espectro.

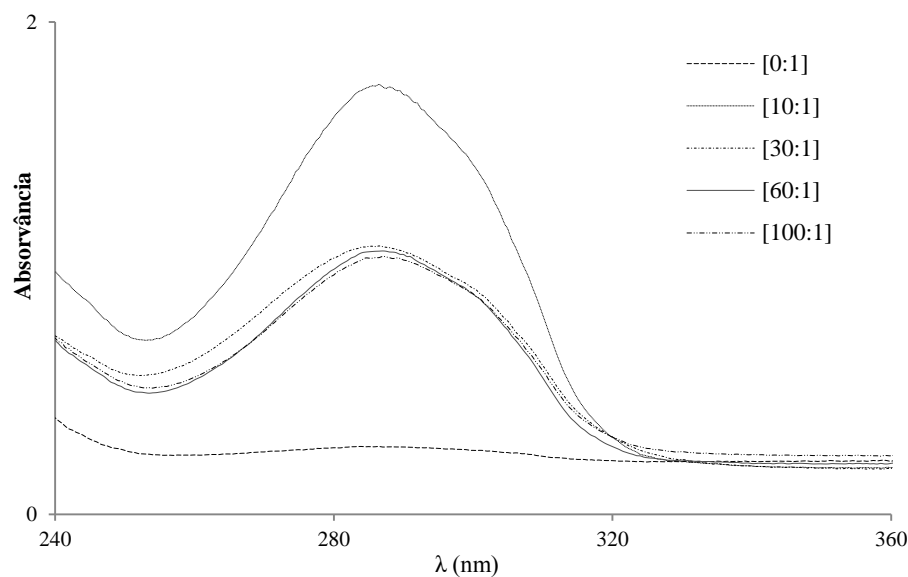


Figura 4.9 – Espectros de absorção das nanopartículas de níquel ($1,92 \times 10^{-2}$ M em etanol) do ensaio com CTAB, para diferentes razões de [TEOS]:[Ni].

A intensidade da banda de absorção está relacionada com tamanho médio das partículas e a largura da banda de absorção relaciona-se com a dispersão de tamanhos das partículas [11]. Desta forma, o aumento da absorção do plasmão com o aumento da razão [TEOS]:[Ni] confirma a formação da coroa de sílica. Contudo, a partir da razão de [30:1], os valores de absorvância mantêm-se. Este facto pode ser explicado pela formação de partículas de sílica a partir de determinada concentração de TEOS, em vez de um aumento do tamanho da coroa.

4.3.1 Caracterização do tamanho e polidispersividade

A caracterização do tamanho e índice de polidispersividade das nanopartículas foi realizada pela técnica de difusão dinâmica de luz (DLS) e por microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Seguindo os protocolos descritos no capítulo 3.4, foram obtidas partículas de vários tamanhos (tabela 4.4).

Os resultados obtidos por DLS indicam que o tamanho das partículas está diretamente relacionado com o método de preparação. Foram obtidas partículas, aparentemente, com dimensões entre os 67,2 e 772,7 nm. Os procedimentos de preparação que originam nanopartículas cobertas de lípidos ou AOT revelaram formar partículas de pequenas dimensões, nas dezenas de nanómetros. Por outro

lado, dos ensaios em micelas invertidas resultaram as partículas de maiores dimensões.

Tabela 4.4 - Diâmetro médio ($\bar{\phi}_{\text{médio}}$) e índice de polidispersividade (PdI).

<i>ENSAIO</i>	[TEOS]:[Ni]	$\bar{\phi}_{\text{médio}}$ (nm) ^a	PdI
Ensaio com CTAB [Ni]:[Ac.Cítrico]=(1:0,75)	(0:1)	294,00	0,912
	(10:1)	323,45	0,279
	(30:1)	444,40	0,558
	(60:1)	447,20	0,455
	(100:1)	457,40	0,392
Ensaio com CTAB e heptanol	(0:1)	772,70	1,000
	(2:1)	140,90	0,310
	(5:1)	102,10	0,252
	(10:1)	113,30	0,377
Ensaio com CTAB e pentanol	(0:1)	598,00	0,685
	(5:1)	154,40	0,347
	(10:1)	212,80	0,516
	(60:1)	248,70	0,606
Ensaio com Triton X-100, heptanol e ciclohexano	(0:1)	523,60	0,710
	(10:1)	134,80	0,329
	(20:1)	232,70	0,525
Ensaio com AOT	(0:1)	104,90	0,304
	(5:1)	88,61	0,307
	(10:1)	298,30	0,652
	(50:1)	154,10	0,403
Ensaio com DOPG	(0:1)	67,20	0,209
	(10:1)	204,30	0,450
	(20:1)	203,50	0,563

^a Precisão: Melhor do que +/- 2% em padrão NIST látex

A cobertura do núcleo das partículas com uma coroa de sílica, através do processo em AOT, foi confirmada pelo aumento do tamanho das partículas. Na maioria dos casos, foi ainda demonstrada uma dependência do aumento do tamanho das partículas com o aumento da razão [TEOS]:[Ni] (tabela 4.4). Por outro lado, verificou-se que, a partir de certas razões, já não foi perceptível novo aumento do

tamanho das partículas. Este facto pode ser explicado pela formação de partículas de TEOS a partir de determinada concentração, uma vez que, tendo sido utilizado o processo em AOT para cobrir as partículas, o tamanho da coroa fica limitado ao espaço dentro do surfactante, levando à formação de partículas de sílica com o excesso de TEOS.

Em alguns ensaios, nomeadamente nos ensaios em micelas invertidas com co-surfactante, verificou-se uma diminuição acentuada do diâmetro médio das nanopartículas após a adição de TEOS. Desta forma, podemos presumir que, antes da adição de TEOS, existe uma aglomeração das nanopartículas, que diminui após a cobertura das mesmas com coroa de sílica. Por outro lado, isso não se verificou no caso do ensaio com CTAB, em que foi utilizado ácido cítrico. Desta forma, concluímos que o ácido cítrico ajuda a dispersar as partículas.

O índice de polidispersividade ideal é cerca de 0,3 (ou menor) e representa condições de medida ideais com uma suspensão homogénea de partículas com baixa taxa de aglomeração e com apenas uma distribuição de tamanhos [12]. Desta forma, alguns dos valores elevados de polidispersividade obtidos sugerem uma aglomeração das nanopartículas, pelo que os valores dos diâmetros médios obtidos por DLS serão superiores aos valores reais.

Através das imagens obtidas por SEM, foi possível observar a superfície das nanopartículas e o seu diâmetro médio, com maior precisão, relativamente aos resultados obtidos por DLS. A título de exemplo, apresentam-se algumas das imagens obtidas (figuras 4.10 e 4.11).

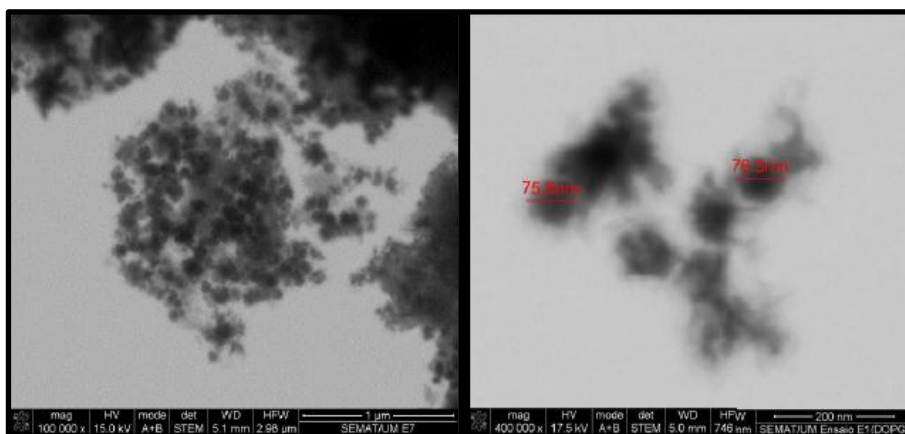


Figura 4.10 – Imagens de SEM de nanopartículas de Ni do ensaio coberto por lípido, sem TEOS, em etanol.

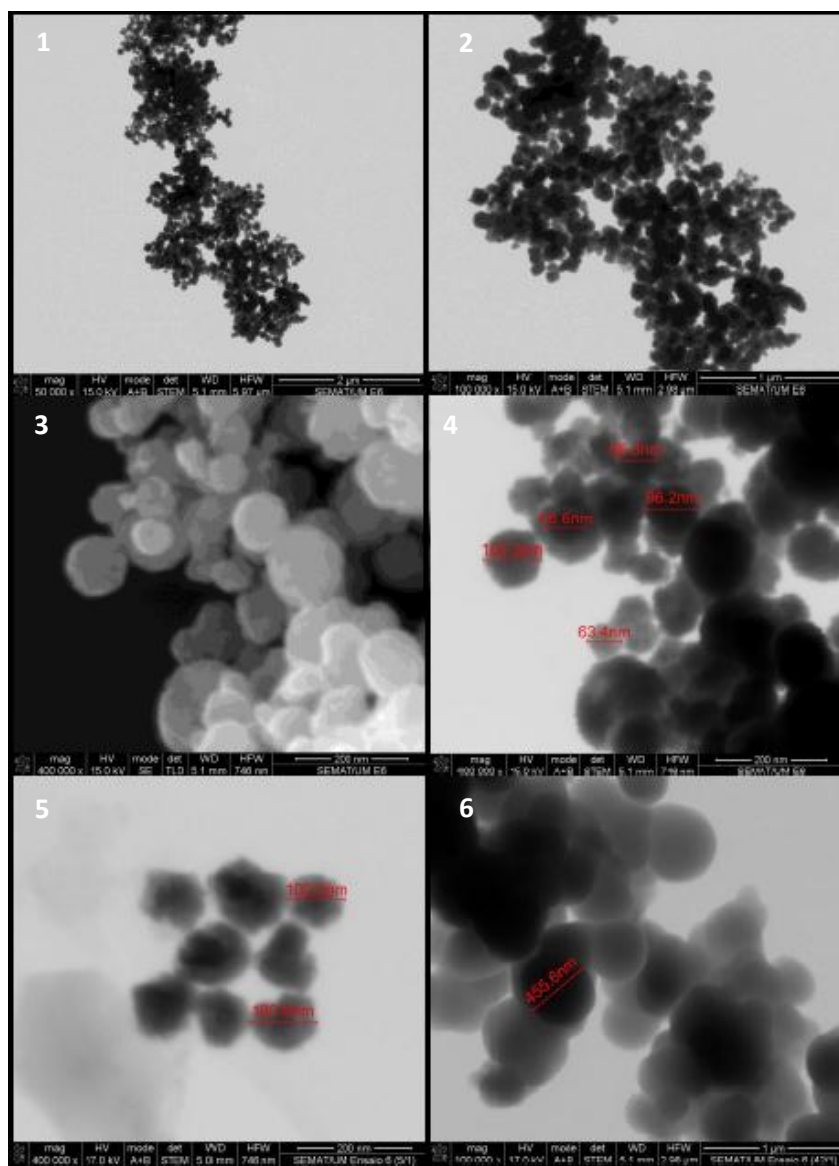


Figura 4.11 – Imagens de SEM de nanopartículas do ensaio com CTAB dispersas em etanol, com ácido cítrico; $[\text{Ni}]:[\text{ác. cítrico}]=(1:0,75)$. **1, 2, 3 e 4**: Imagens das nanopartículas de Ni sem coroa de sílica; **5**: nanopartículas de Ni com coroa de sílica numa razão de TEOS para nanopartículas de Ni de (5:1) (processo com AOT); e **6**: nanopartículas de Ni com coroa de sílica numa razão de TEOS para nanopartículas de Ni de (42:1) (processo com MDA).

As imagens obtidas por SEM mostram que as amostras não apresentam uma polidispersividade muito grande, apresentando quase todos tamanhos semelhantes. Comprovando o que foi anteriormente depreendido dos resultados de DLS, as nanopartículas de Ni de menores dimensões foram as obtidas nos ensaios com cobertura de lípidos ou AOT.

Fazendo uso dos diferentes modos de visualização disponíveis neste microscópio SEM (localizado no SEMAT/UM), foi possível demonstrar que as

partículas obtidas são metálicas, através do contraste de fase das imagens obtidas (imagens 3 e 4 da figura 4.11).

Os tamanhos obtidos por SEM revelaram partículas de menores dimensões, relativamente aos resultados obtidos por DLS. Através da análise de imagens, com a mesma ampliação, de ensaios de nanopartículas com e sem coroa de sílica, foi possível observar uma ligeira redução da aglomeração das nanopartículas de níquel para aquelas que possuíam coroa de sílica, uma vez que as partículas com coroa se apresentaram ligeiramente mais afastadas e melhor distribuídas. Desta forma, pode concluir-se que em DLS foram analisados aglomerados de partículas, o que falseou os valores do tamanho determinado para as nanopartículas. Podemos ainda considerar que a cobertura das partículas com coroa de sílica ajuda a reduzir a aglomeração das partículas.

Os dois processos utilizados para acrescentar a coroa de sílica às nanopartículas parecem funcionar bastante bem, uma vez que foi sempre verificado um aumento do tamanho nas partículas com coroa, como está demonstrado, a título de exemplo, nas imagens 5 e 6 da figura 4.11. O tamanho da coroa de sílica está diretamente relacionado com o processo utilizado, uma vez que, no processo em que se utilizou AOT, as micelas limitam o crescimento da camada de sílica. No segundo processo, em que se utilizou MDA para favorecer a ligação do TEOS às partículas, não existe nenhuma barreira física ao crescimento da coroa, podendo resultar deste processo coroas de maiores dimensões, ou até mesmo partículas de sílica. Assim, algumas das partículas observadas para as razões maiores de [TEOS]:[Ni] podem ser partículas de sílica. A única desvantagem associada ao processo em AOT está relacionada com a concentração final de nanopartículas obtida, que é bastante reduzida, uma vez que existe uma limitação à quantidade de fase aquosa nas microemulsões de AOT.

4.3.2 Avaliação das propriedades magnéticas das nanopartículas

Aparentemente, as nanopartículas de níquel obtidas em todos os procedimentos descritos no capítulo anterior são magnéticas, uma vez que foi sempre perceptível uma resposta imediata das nanopartículas a um pequeno campo magnético externo aplicado. Uma vez retirado o campo magnético, verifica-se

ainda que a magnetização desaparece, indicando que estas partículas poderão possuir um comportamento superparamagnético.

Nas imagens seguintes, a título de exemplo, são apresentadas fotografias das nanopartículas sintetizadas.



Figura 4.12 – Solução dispersa de nanopartículas de níquel obtidas do ensaio com CTAB, $[\text{Ni}]:[\text{Ac. cítrico}] - [1]:[0,75]$ (à esquerda); resposta das nanopartículas a um pequeno magneto (à direita).

No período que em decorreu este trabalho, apenas foi possível realizar medidas magnéticas por SQUID para uma das amostras preparadas. As medidas foram realizadas na Universidade do Porto, pelo Prof. Bernardo Almeida.

A amostra consistiu em nanopartículas de níquel sem coroa de sílica, preparadas em solução aquosa com surfactante CTAB (vd. Tabela 3.1). Na figura 4.13, apresenta-se a variação do momento magnético em função do campo magnético aplicado. Expandindo a região central da figura, é possível observar a curva de histerese (figura 4.14).

As partículas superparamagnéticas não possuem histerese; a sua resposta a um campo magnético externo assemelha-se ao comportamento de Langevin para materiais paramagnéticos, mas com os altos valores de magnetização e suscetibilidade característicos dos materiais ferromagnéticos que as compõem [13]. Estas partículas de níquel possuem uma histerese acentuada (figura 4.14), o que indica que terão oxidado, formando-se à sua superfície uma camada de óxido de níquel. Pode verificar-se que a curva de histerese observada experimentalmente é semelhante à previamente obtida para nanopartículas de níquel com NiO à volta [14], o que fornece a indicação da oxidação destas nanopartículas.

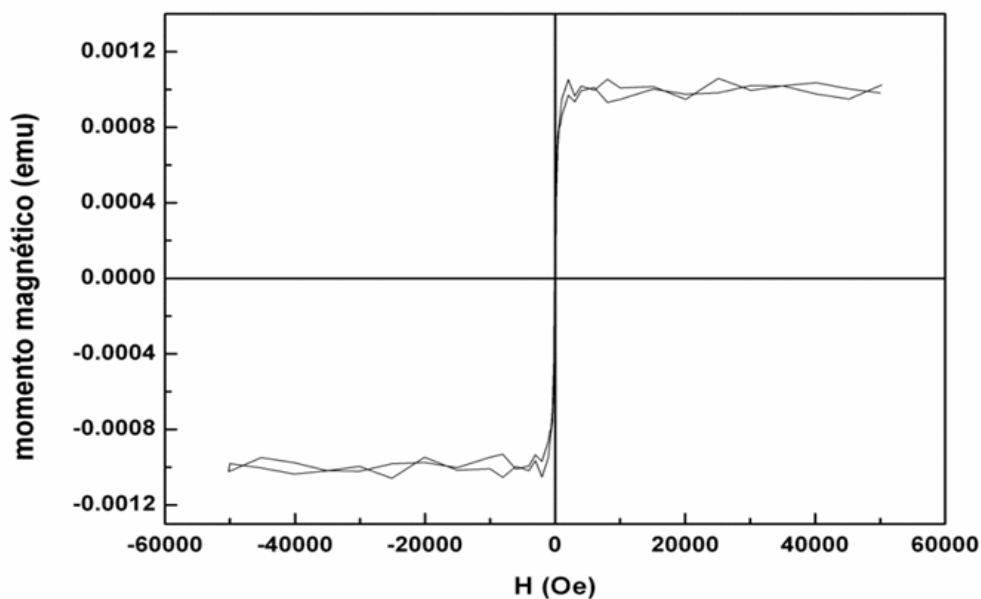


Figura 4.13 - Momento magnético das nanopartículas de Níquel, em função do campo magnético aplicado.

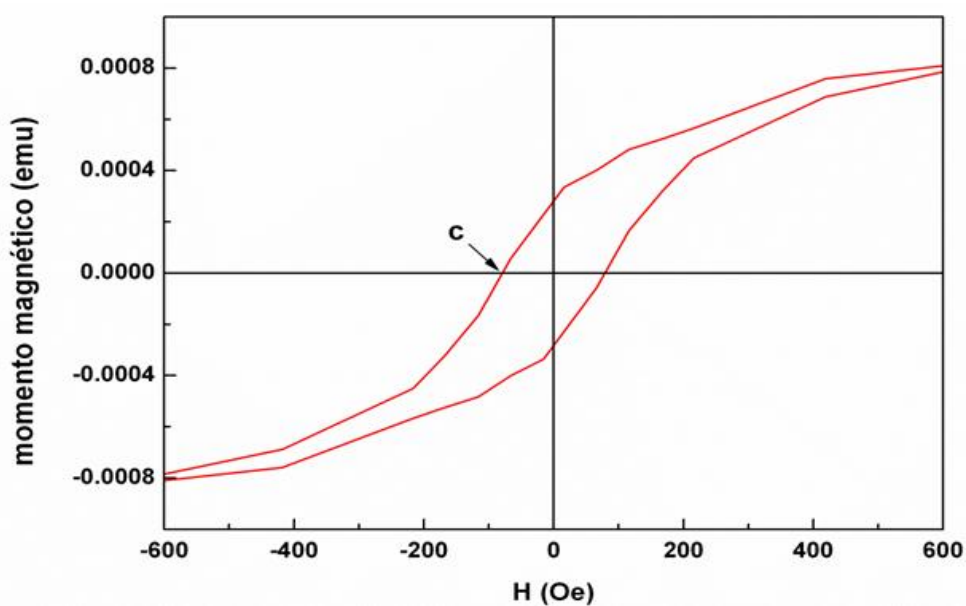


Figura 4.14 – Curva de histerese das nanopartículas de Níquel à temperatura ambiente.

Desta curva, pode estimar-se o ponto de coercividade, que é o valor do campo magnético inverso que deve ser aplicado ao material magnético para fazer com que o fluxo magnético volte a zero. O valor obtido é cerca de 80 Oe (ponto c), inferior ao publicado em [14] para nanopartículas de níquel. Assim, as nanopartículas aqui produzidas possuem melhores propriedades magnéticas.

4.4 Estudo fotofísico dos compostos incorporados em magnetolipossomas

As propriedades fotofísicas dos novos compostos fluorescentes potencialmente antitumorais encapsulados em magnetolipossomas foram avaliadas. Nas figuras seguintes (figuras 4.15 a 4.17), são apresentados os espectros obtidos para os três compostos encapsulados em lipossomas e magnetolipossomas de composição idêntica, para comparação. Os espectros de absorção dos compostos em magnetolipossomas estão inseridos.

Apesar da dispersão causada pelos lipossomas, nos espectros de absorção dos magnetolipossomas continua a ser visível a banda de absorção do plasmão superficial ressonante das nanopartículas de níquel por volta dos 290nm. Desta forma, podemos confirmar o encapsulamento das nanopartículas. A presença das nanopartículas metálicas nos magnetolipossomas é também confirmada pela absorção presente em toda a gama espectral.

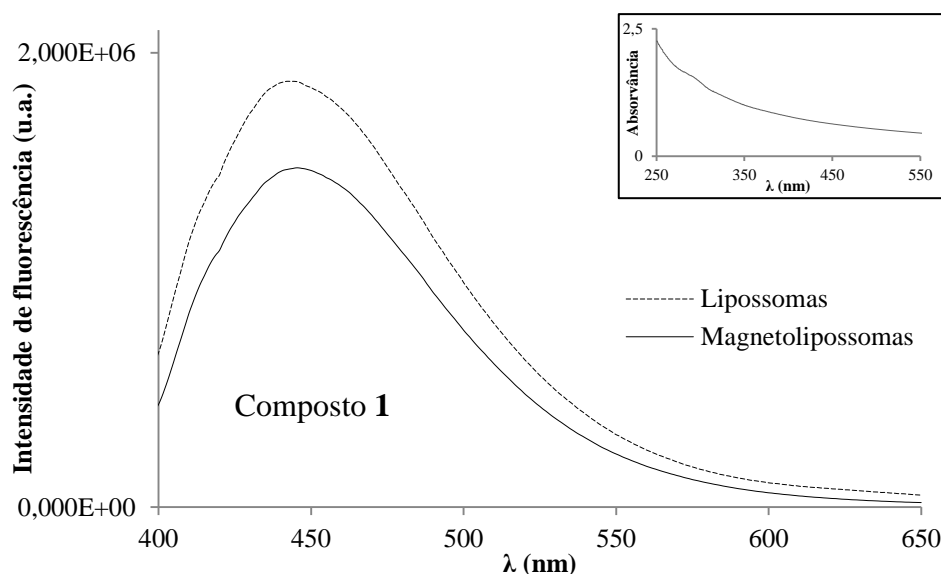


Figura 4.15 – Espectros de fluorescência do composto **1** (2×10^{-6} M) em lipossomas de Egg-PC (10^{-3} M) e magnetolipossomas de Egg-PC/nanopartículas de Ni com coroa de sílica (obtidas no ensaio com CTAB). Inserido: Espectro de absorção do composto **1** em magnetolipossomas de Egg-PC/nanopartículas de Ni com coroa de sílica (ensaio com CTAB).

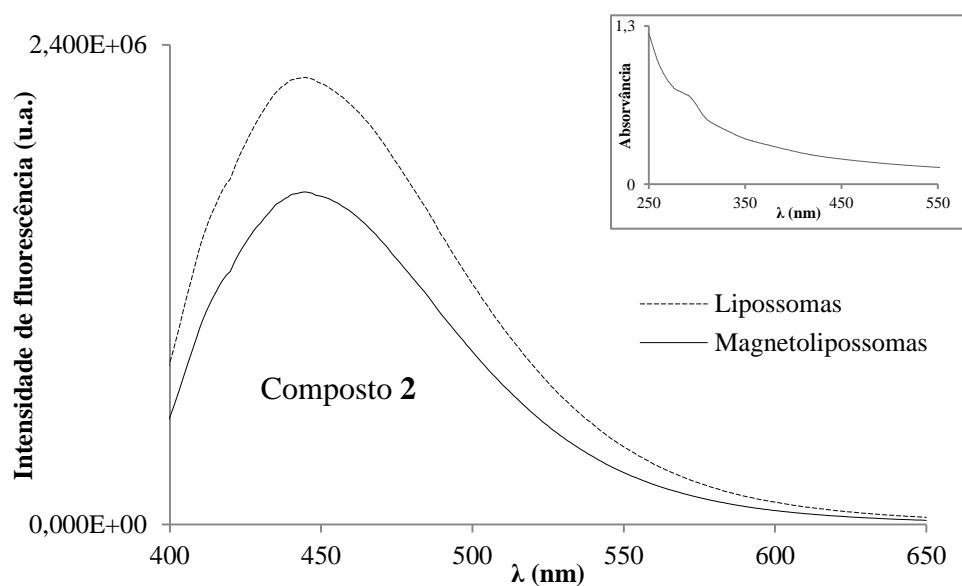


Figura 4.16 – Espetros de fluorescência do composto **2** (2×10^{-6} M) em lipossomas de Egg-PC (10^{-3} M) e magnetolipossomas de Egg-PC/nanopartículas de Ni com coroa de sílica (obtidas no ensaio com CTAB). Inserido: Espectro de absorção do composto **2** em magnetolipossomas de Egg-PC/nanopartículas de Ni com coroa de sílica (ensaio com CTAB).

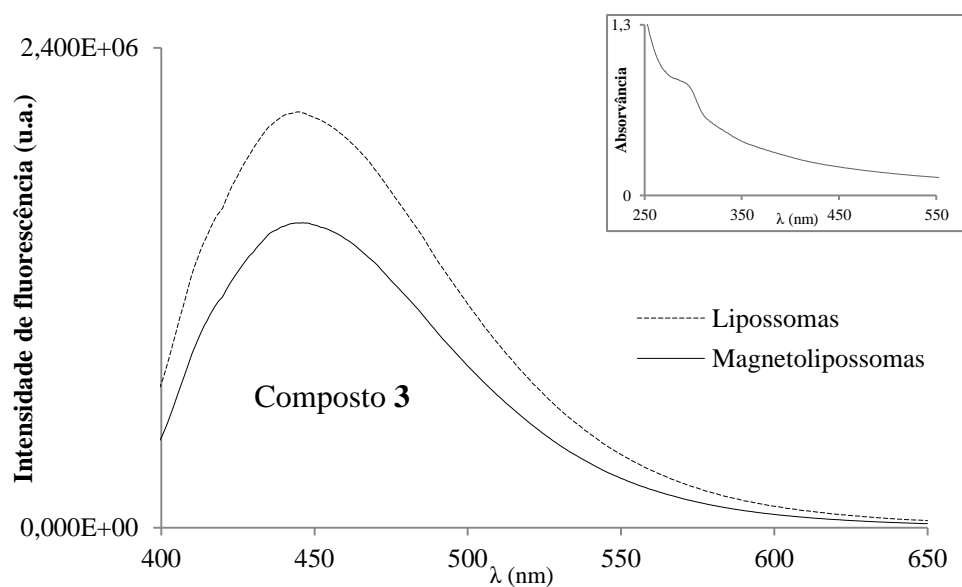


Figura 4.17 – Espetros de fluorescência do composto **3** (2×10^{-6} M) em lipossomas de Egg-PC (10^{-3} M) e magnetolipossomas de Egg-PC/nanopartículas de Ni com coroa de sílica (obtidas no ensaio com CTAB). Inserido: Espectro de absorção do composto **3** em magnetolipossomas de Egg-PC/nanopartículas de Ni com coroa de sílica (ensaio com CTAB).

Os espectros de emissão dos três compostos nos magnetolipossomas revelaram uma considerável inibição da fluorescência dos compostos pelas nanopartículas magnéticas incorporadas, relativamente aos compostos em lipossomas. Esta inibição (*quenching*) pode ser justificada pelo efeito de átomo pesado provocado pelas nanopartículas de níquel. A presença de átomos pesados em solução pode provocar uma diminuição da fluorescência, uma vez que a interação spin-orbital pode resultar num aumento da perda de energia por cruzamento intersistemas, um processo não radiativo. Assim, a perda de energia de excitação por emissão de fluorescência (processo radiativo) diminui, levando a uma diminuição da emissão detetada.

Por outro lado, esta inibição de fluorescência pode ser ainda justificada pela transferência de energia eletrónica, uma vez que as nanopartículas absorvem numa larga gama espectral. Desta forma, a energia de excitação dos compostos poderá ser transferida para as nanopartículas, causando também uma diminuição da emissão de fluorescência dos compostos antitumorais.

Poderá ainda ocorrer um processo de transferência eletrónica fotoinduzida do composto excitado para as nanopartículas de níquel, com subsequente recombinação de carga. Neste processo, a energia de excitação do composto é libertada sob a forma de calor.

4.5 Caracterização dos tamanhos dos magnetolipossomas

Para a caracterização dos magnetolipossomas, foram obtidas algumas imagens por SEM (Figuras 4.18 e 4.19).

As imagens SEM dos magnetolipossomas secos permitem determinar o seu tamanho, uma vez que é possível observar a bicamada de lípido/surfactante ligada às nanopartículas. Isto acontece porque estes magnetolipossomas não possuem água, pelo que a sua estrutura não é perdida pelo sistema de vácuo utilizado nas análises de SEM. Assim, podemos concluir que os magnetolipossomas secos com nanopartículas de níquel cobertas por bicamada de AOT possuem diâmetros médios da ordem das dezenas de nanómetros, com uma polidispersividade relativamente baixa.

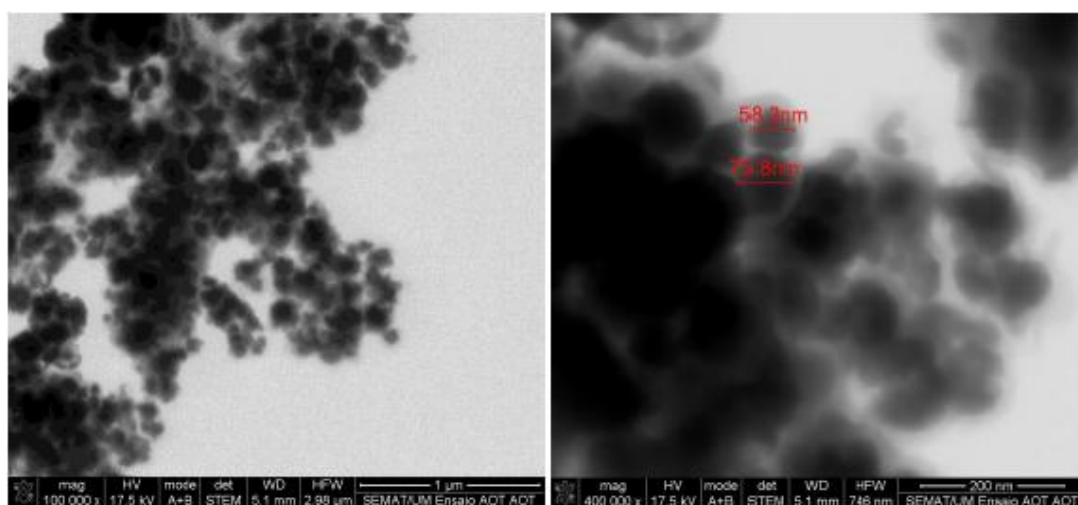


Figura 4.18 – Imagens SEM de magnetolipossomas secos com nanopartículas de níquel (preparação com AOT).

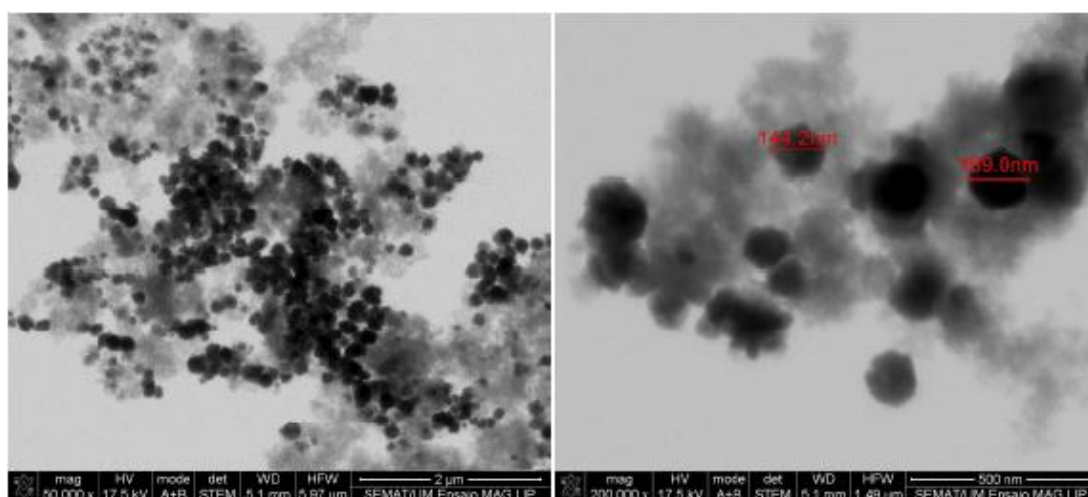


Figura 4.19 – Imagens SEM de magnetolipossomas aquosos de Egg-PC, com nanopartículas de níquel encapsuladas (obtidas no ensaio com CTAB).

Por outro lado, não é possível determinar o tamanho dos magnetolipossomas aquosos por SEM, uma vez que estes possuem água na sua estrutura. O sistema de vácuo do microscópio de varrimento obriga à saída da água, destruindo a estrutura destes magnetolipossomas aquosos. Desta forma, nas imagens SEM deste tipo de magnetolipossomas, só é possível observar as nanopartículas e agregados lipídicos, não sendo possível determinar o tamanho dos magnetolipossomas. Para uma caracterização estrutural adequada deste tipo de magnetolipossomas teríamos de recorrer à microscopia por *cryo*-TEM, técnica não existente em Portugal. Nesta técnica, é possível conservar a estrutura de agregados moleculares que possuem

água na sua composição. Já foram observados, por *cryo*-TEM, magnetolipossomas aquosos contendo nanopartículas de óxidos de ferro superparamagnéticos (SPION) [15].

4.6 Ensaios de interação com modelos de membranas por FRET

Estes estudos incluíram ainda a avaliação da interação não-específica dos magnetolipossomas com modelos de membranas celulares (GUVs – *giant unilamellar vesicles*). Esta interação foi estudada por transferência de energia de ressonância (FRET) entre os compostos antitumorais fluorescentes (doadores) e lípidos marcados com nitrobenzodiazole (NBD) (aceitante) incluídos nos GUVs.

Na figura 4.20, é possível observar a sobreposição espectral entre a emissão de fluorescência do doador (compostos) e a absorção do aceitante (NBD), condição sem a qual não pode ocorrer FRET.

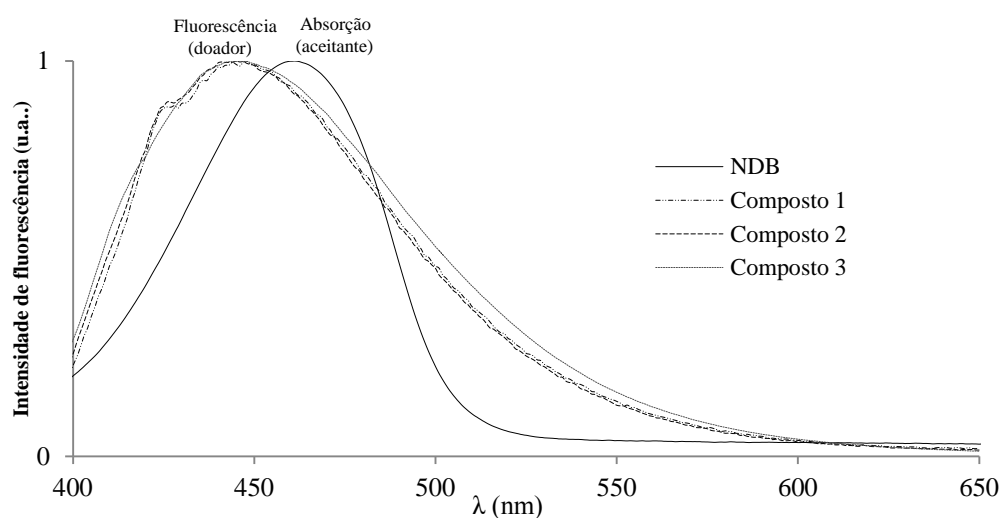


Figura 4.20 - Sobreposição entre o espectro de emissão do doador (composto **1**, **2** ou **3** encapsulado em magnetolipossomas de Egg-PC) e o espectro de absorção do aceitante (NBD).

A transferência de energia não radiativa ocorre devido a mecanismos de interação entre as moléculas doadoras e aceitantes, como interações Coulombicas dipolo-dipolo de longo alcance (mecanismo de Förster). Se o espectro de emissão da espécie doadora se sobrepuser ao espectro de absorção da espécie aceitante, a transferência de energia é possível, uma vez que as várias transições vibrônicas do doador possuem praticamente a mesma energia que as correspondentes transições

do aceitante [8]. O processo pode ocorrer até distâncias entre o doador e o aceitante de 80 a 100Å.

Uma vez que existe a sobreposição espectral entre o espectro de emissão dos compostos (espécies doadoras) e o espectro de absorção do NBD (espécie aceitante), os fótons que seriam emitidos pelos compostos a comprimentos de onda correspondentes à sobreposição podem ser absorvidos e posteriormente emitidos pelo marcador NBD.

De forma a confirmar a ocorrência de transferência de energia, foram comparados os espectros de fluorescência dos magnetolipossomas, dos GUVs e de uma mistura de magnetolipossomas e GUVs (figuras 4.21 a 4.23, como exemplos). Foram realizados ensaios de FRET utilizando os três lípidos fluorescentes marcados com NBD, uma vez que estes marcam diferentes zonas da membrana. Como já referido, no NBD-C₆-HPC o marcador marca, aproximadamente, o meio da cadeia hidrocarbonada, no NBD-C₁₂-HPC marca uma posição mais para o fim da cadeia, e no NBD-PE marca a cabeça polar dos fosfolípidos. Estes lípidos marcados foram já utilizados para monitorar a entrega, para membranas modelo, de um derivado antitumoral do indole transportado em nanolipossomas [16].

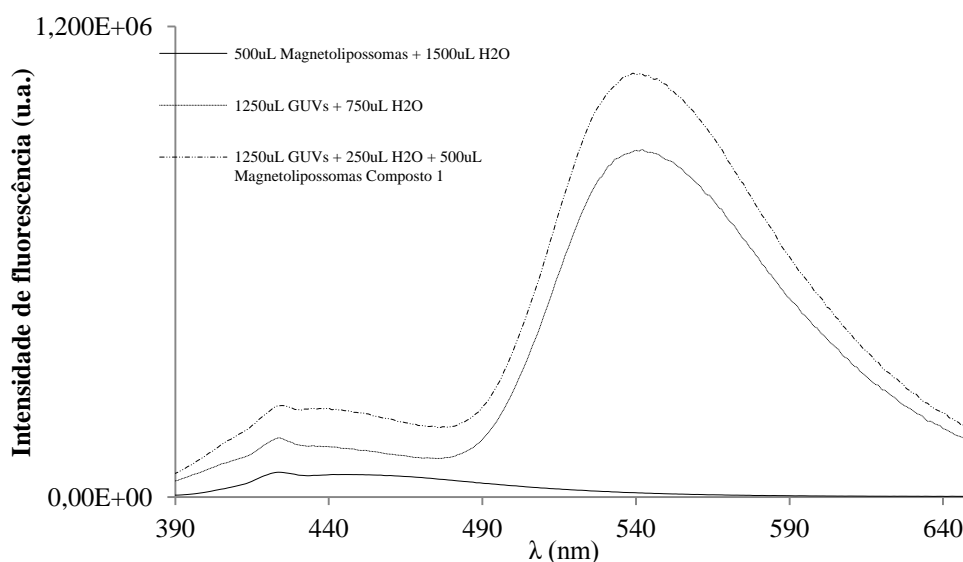


Figura 4.21 – Espectros de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}}=370$ nm) dos magnetolipossomas de Egg-PC, com nanopartículas de níquel (ensaio com CTAB) ([MDA]:[Ni]=1:1 e [TEOS]:[Ni]=42:1) e composto **1** (2×10^{-6} M) encapsulado, GUVs de lecitina de soja (10^{-3} M) marcado com NBD-C₆-HPC (10^{-6} M) e mistura com proporção de volume de magnetolipossomas para GUVs de (2,5:0,6).

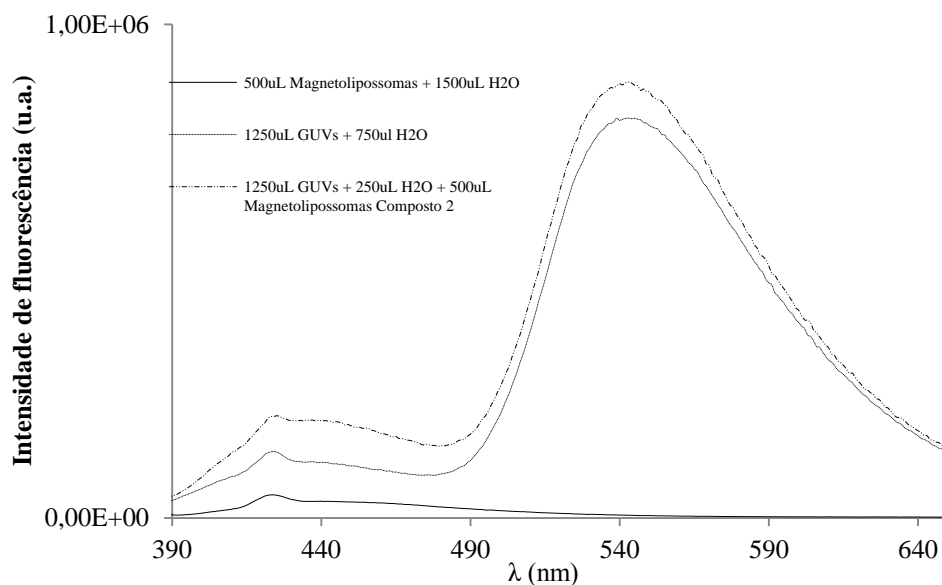


Figura 4.22 – Espetros de fluorescência ($\lambda_{exc}=370$ nm) dos magnetolipossomas de Egg-PC, com nanopartículas de níquel (ensaio com CTAB) ([MDA]:[Ni]=1:1 e [TEOS]:[Ni]=42:1) e composto **2** (2×10^{-6} M) encapsulado, GUVs de lecitina de soja (10^{-3} M) marcado com NBD- C_{12} -HPC (10^{-6} M) e mistura com proporção de volume de magnetolipossomas para GUVs de (2,5:0,6).

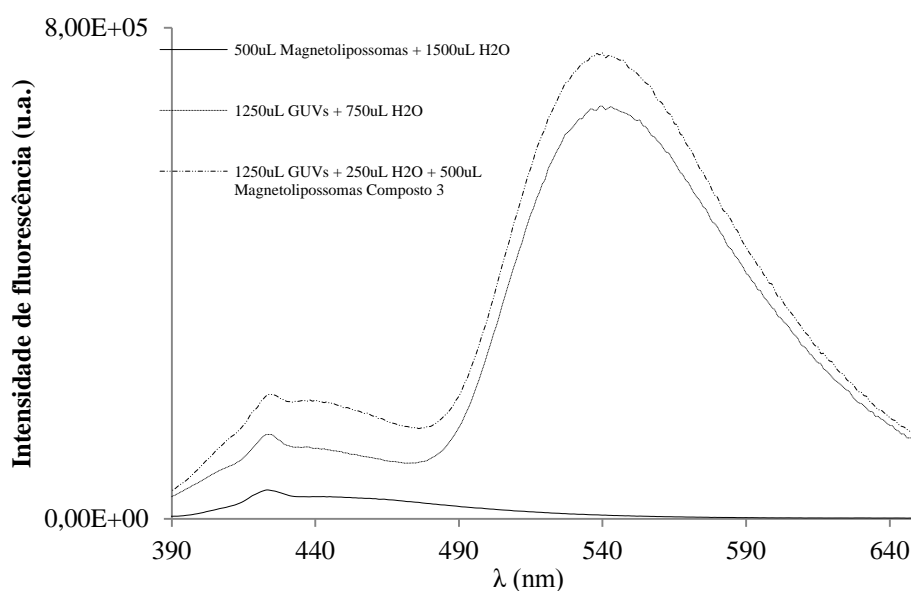


Figura 4.23 – Espetros de fluorescência ($\lambda_{exc}=370$ nm) dos magnetolipossomas de Egg-PC, com nanopartículas de níquel (ensaio com CTAB) ([MDA]:[Ni]=1:1 e [TEOS]:[Ni]=42:1) e composto **3** (2×10^{-6} M) encapsulado, GUVs de lecitina de soja (10^{-3} M) marcado com NBD-PE (10^{-6} M) e mistura com proporção de volume de magnetolipossomas para GUVs de (2,5:0,6).

Foi observado que, excitando a mistura de GUVs marcados e magnetolipossomas (com compostos e nanopartículas de níquel encapsulados), no comprimento de onda de excitação dos compostos (370 nm), é observada a fluorescência do marcador fluorescente dos lípidos (NBD), indicando que as moléculas excitadas de composto transferem o seu excesso de energia para o marcador de membrana.

Foi traçado um espectro de fluorescência dos GUVs de lecitina de soja, também com excitação a 370 nm, na mesma proporção de diluição da mistura. A fluorescência observada é efetivamente menor do que a fluorescência da mistura, pelo que se pode concluir que ocorre transferência de energia.

Uma vez que a transferência de energia depende fortemente da distância entre os fluoróforos, os resultados dos ensaios de FRET demonstraram a existência de interação entre os GUVs e os magnetolipossomas, que pode ser justificada pela fusão membranar entre os dois agregados moleculares.

Contudo, não é observada uma diminuição da fluorescência dos compostos (doadores) após a mistura, prevista pela teoria de FRET. A reduzida fluorescência dos magnetolipossomas antes da mistura, como foi referido anteriormente, pode ser justificada pela inibição da fluorescência dos compostos pelas nanopartículas de níquel. Assim, o aumento da fluorescência da mistura, na zona espectral dos compostos, pode ser justificado por uma diminuição dos vários processos possíveis de inibição de fluorescência pelas nanopartículas, levando a um aumento da emissão de fluorescência do composto. Uma vez que os processos de *quenching* dependem fortemente da distância entre o inibidor (em inglês, *quencher*) e o composto fluorescente, a redução destes processos, após mistura dos GUVs e magnetolipossomas, pode ser explicada pelo aumento da distância entre os compostos e as nanopartículas, após fusão membranar (figura 4.24).

A pequena eficiência de transferência de energia observada pode ser justificada pelo facto de os GUVs serem muito grandes. De facto, os mesmos foram observados por microscopia de fluorescência, tendo-se verificado que os GUVs possuem um diâmetro médio de cerca de 1000 nm.

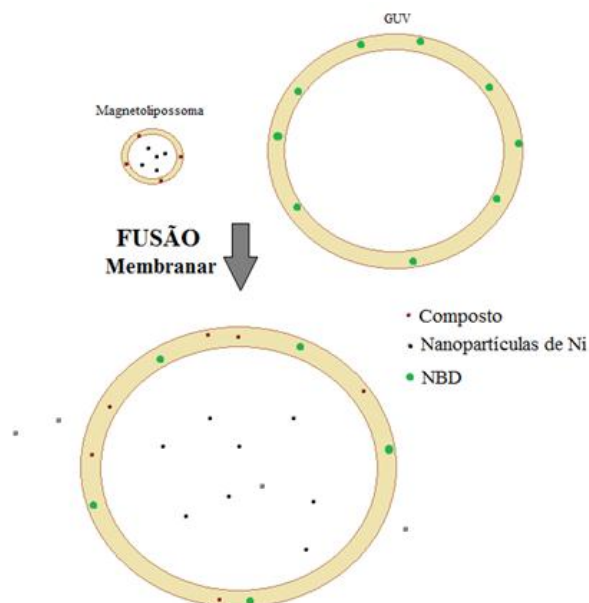


Figura 4.24 – Ilustração da fusão membranar entre os magnetolipossomas e os GUVs.

Desta forma, a distância média entre os compostos e os lípidos marcados com NBD, após fusão membranar, é muito grande, pelo que o processo de transferência de energia não é favorecido. Tentou-se ainda melhorar a eficiência do processo através da adição de cálcio, que promove a fusão membranar, mas não foram registadas diferenças significativas.

Também não foi observada nenhuma diferença significativa relativamente à utilização dos três lípidos marcados em diferentes regiões da molécula, pelo que não se conseguiu concluir acerca de uma localização preferencial do composto que fosse mais favorável à eficiência de FRET. Contudo, os melhores resultados foram obtidos com o lípido marcado NBD-C₆-HPC (figura 4.21).

4.7 Referências do Capítulo 4

- [1] M.-J. R. P. Queiroz, R. C. Calhelha, L. A. Vale-Silva, E. Pinto, R. T. Lima, M. H. Vasconcelos, Efficient synthesis of 6-(hetero)arylthieno[3,2-*b*]pyridines by Suzuki-Miyaura coupling. Evaluation of growth inhibition in human tumor cell lines, SARs and effects on the cell cycle, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 5628-5634.
- [2] M.-J. R. P. Queiroz, S. Dias, D. Peixoto, A. R. O. Rodrigues, A. D. S. Oliveira, P. J. G. Coutinho, L. A. Vale-Silva, E. Pinto, E. M. S. Castanheira, New potential antitumoral di(hetero)arylether derivatives in the thieno[3,2-*b*]pyridine series: Synthesis and fluorescence studies in solution and in nanoliposomes, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 238 (2012) 71-80.
- [3] K. C. James, P. R. Noyce, Hydrogen bonding between testosterone propionate and solvent in chloroform-cyclohexane solutions, *Spectrochim. Acta A* 27 (1971) 691-696.
- [4] G. R. Wiley, S. I. Miller, Thermodynamic parameters for hydrogen-bonding of chloroform with Lewis bases in cyclohexane - Proton magnetic-resonance study, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 3287-3293.
- [5] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Press, New York, 1999.
- [6] N. Mataga, T. Kubota, *Molecular Interactions and Electronic Spectra*, Marcel Dekker, New York, 1970.
- [7] D. R. Lide (Ed.), *Handbook of Chemistry and Physics*, 83th Edition, CRC Press, Boca Raton, 2002.
- [8] B. Valeur, *Molecular Fluorescence - Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- [9] P. N. Prasad, *Nanophotonics*, Wiley-Interscience, New Jersey, 2004.
- [10] D. Li, S. Komarneni, Microwave-Assisted polyol process for synthesis of Ni nanoparticles, *Journal of the American Ceramic Society* 89 (2006) 1510-1517.

- [11] N. Leopold, B. Lendl, A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 5723–5727.
- [12] Nano Zetasizer User Manual, *Malvern Instrument Easier*, Worcesterchire, 2007.
- [13] A. Weddemann, I. Ennen, A. Regtmeier, C. Albon, A. Wolff, K. Eckstädt, N. Mill, M.K.-H. Peter, J. Mattay, C. Plattner, N. Sewald, A. Hütten, Review and outlook: from single nanoparticles to self-assembled monolayers and granular GMR sensors. *Beilstein J. Nanotech.* 1 (2010) 75-93.
- [14] M. Benelmekki, A. Montras, A. J. Martins, P. J. G. Coutinho, Ll. M. Martinez, Magnetophoresis behavior at low gradient magnetic field and size control of nickel single core nanobeads. *J. Magn. Magn. Mater.* 323 (2011) 1945-1949.
- [15] B. Garnier, S. Tan, S. Miraux, E. Bled, A. R. Brisson, Optimized synthesis of 100 nm diameter magnetoliposomes with high content of maghemite particles and high MRI effect, *Contrast Media & Molecular Imaging* 7 (2012) 231-239.
- [16] A. S. Abreu, E. M. S. Castanheira, M.-J. R. P. Queiroz, P. M. T. Ferreira, L. A. Vale-Silva, E. Pinto, Nanoliposomes for encapsulation and delivery of the potential antitumoral methyl 6-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)-1*H*-indole-2-carboxylate, *Nanoscale Res. Lett.* 6 (2011) 482.

Capítulo 5 – Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho foi possível produzir e caracterizar nanopartículas magnéticas de níquel, sem e com coroa de sílica, e incorporar essas nanopartículas em lipossomas, juntamente com novos compostos de potencial antitumoral promissor.

A investigação realizada permitiu concluir que os compostos potencialmente antitumorais estudados podem ser transportados na bicamada lipídica de lipossomas, uma vez que os três compostos apresentaram emissão de fluorescência razoável quando encapsulados em lipossomas.

Através dos estudos espectroscópicos foi também possível confirmar o encapsulamento de nanopartículas magnéticas de níquel em lipossomas. Desta forma, a localização dos magnetolipossomas em locais de interesse torna-se possível.

Por último, dos resultados obtidos nos ensaios de FRET, entre os magnetolipossomas e os modelos de membrana, foi possível verificar a existência de transferência de energia, indicando que ocorre fusão membranar entre os dois agregados moleculares. Assim, podemos prever a saída dos compostos dos magnetolipossomas para as células.

Os resultados obtidos podem ser importantes para aplicações futuras de entrega de fármacos destes compostos 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:

- Produção de nanopartículas mais estáveis e menos suscetíveis à oxidação, por exemplo, de ferrite de níquel (NiFe_2O_4);

- Preparação de magnetolipossomas de tipo aquoso (AMLs) e sólido (SMLs), sua PEG-ilação e marcação com folato, para direcção específica de células tumorais;
- Caracterização estrutural por SEM, AFM, HR-TEM e Difusão Dinâmica de Luz (DLS) das nanopartículas e dos magnetolipossomas preparados;
- Avaliação por SQUID das propriedades magnéticas das nanopartículas e dos magnetolipossomas produzidos;
- Testes da atividade dos magnetolipossomas com compostos antitumorais encapsulados em linhas celulares tumorais humanas;
- Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas magnéticas e dos magnetolipossomas.

Estes estudos serão prosseguidos no âmbito dos trabalhos de Doutoramento da autora, financiados por uma Bolsa de Doutoramento da FCT já aprovada, a iniciar em 2013.