

Preparação de Magnetolipossomas e interação com membranas

Tópicos em Biofísica e Bionanossistemas
30 de novembro de 2022

1º Tiago Vieira - PG47700
Mestrado em Engenharia Física
Universidade do Minho
Braga, Portugal

2º Sofia Nogueira - PG50204
Mestrado em Engenharia Física
Universidade do Minho
Braga, Portugal

3º Beatriz Demétrio - PG50256
Mestrado em Engenharia Física
Universidade do Minho
Braga, Portugal

4º Carlos Ferreira - PG50279
Mestrado em Engenharia Física
Universidade do Minho
Braga, Portugal

5º Ricardo Lopes - PG50713
Mestrado em Engenharia Física
Universidade do Minho
Braga, Portugal

6º Tiago Abreu - PG50778
Mestrado em Engenharia Física
Universidade do Minho
Braga, Portugal

Resumo—O presente relatório visa apresentar o procedimento da preparação de magnetolipossomas aquosos utilizados como transportadores de um fármaco, no caso curcumina, e posteriormente avaliação da viabilidade destes por *FRET* num ensaio de fusão membranar. Após a recolha dos dados confirmou-se a correta combinação de nanotransportadores com o fármaco escolhido.

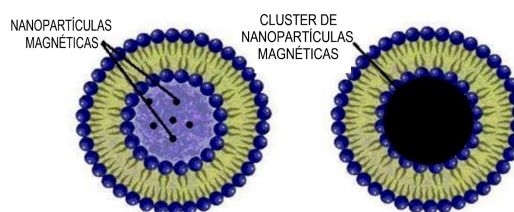


Figura 1. Ilustração de AML(esquerda) e SML(direita).

I Introdução Teórica

Os **magnetolipossomas** correspondem a lipossomas (vesículas esféricas lipídicas mantidas em suspensão num meio aquoso e utilizadas no transporte de nutrientes, fármacos, entre outros) que integram na sua constituição nanopartículas magnéticas.

Estes nanossistemas permitem que, dadas as suas características singulares, possam ser guiados e localizados em locais específicos através da aplicação de um Campo Magnético, possibilitando a sua aplicabilidade na entrega de fármacos encapsulados de proteção de compostos antitumorais bem como o seu direcionamento ao local alvo, ultrapassando a questão da citotoxicidade sistémica associada a tratamentos convencionais, reduzindo a dosagem de fármacos necessária e, consequentemente, os efeitos secundários associados a este tipo de medicina.

Existem diferentes tipos de magnetolipossomas, entre estes:

- Magnetolipossomas Aquosos, *AMLs* - nanopartículas magnéticas estão encapsuladas na fase aquosa interior.
- Magnetolipossomas Sólidos, *SMLs* - não existe um núcleo aquoso, havendo um *cluster* de nanopartículas rodeado por uma camada lipídica.

No procedimento foram desenvolvidos magnetolipossomas do tipo aquosos.

Utilizando lipossomas termossensíveis, a movimentação destas nanocápsulas até ao local onde se pretende entregar o fármaco é feita com a aplicação de um gradiente do campo magnético. Alcançado o alvo pretendido, o Campo Magnético passa a ser alternado, permitindo um relaxamento magnético que produzirá calor. Este calor não só desconfigura a estrutura dos magnetolipossomas para a libertação dos fármacos, como também facilita a atuação do tratamento dado que as células tumorais são mais sensíveis quando sujeitas a um aumento de temperatura.

A componente magnética dos magnetolipossomas é tipicamente baseada em nanopartículas superparamagnéticas, as quais apresentam uma elevada magnetização quando sujeitas a um Campo Magnético, no entanto não se mantém magnetizadas após remoção do mesmo, isto numa escala nanométrica. Esta perda de magnetização evita efeitos de agregação que poderiam evoluir para embolias em aplicações biomédicas. Este comportamento permite uma abordagem terapêutica dual, combinando de forma sinérgica a hipertermia e quimioterapia num único sistema.

A interação não-específica dos magnetolipossomas com modelos de membranas celulares, *SUVs*, a qual visa a simular o propósito dos magnetolipossomas em transportar fármacos até uma célula alvo (tumoral, por exemplo), avalia-se pela transferência de energia do fármaco modelo curcumina (**dador**), escolhido pelos seus benefícios e características medicinais, para a sonda hidrofóbica NILE RED

(aceitante). Com isso, utiliza-se a técnica de fluorescência **FRET** (Förster Resonance Energy Transfer) que permite estudar interações moleculares e depende da transferência de energia de excitação eletrônica, não radioativa.

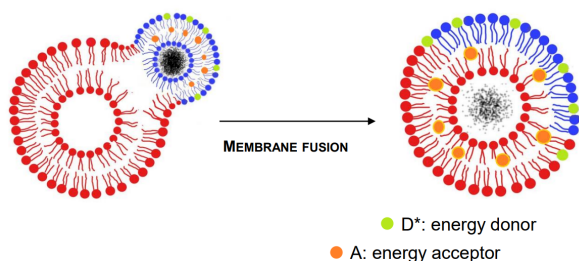


Figura 2. Interação entre doador (AML) e aceitante (SUV)

Aqui se inclui o conceito de quenching de fluorescência como refletido na proximidade de ambas as moléculas ao núcleo das nanopartículas magnéticas, gerando esta transferência de energia que ocorre quando o doador excitado transfere a sua energia para o aceitante através da interação dipolar, visível dada a inibição de fluorescência do doador e diminuição do seu tempo de vida em paralelo com o aumento da emissão de fluorescência do aceitante.

Para que o processo FRET ocorra, é necessário que:

- 1) O doador tenha um tempo de vida longo o suficiente para que haja transferência de energia;
- 2) As moléculas doadoras e aceitantes devem estar a uma distância entre 1 e 10 nm;
- 3) O espectro de absorção de 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.

Num processo de fusão entre o AML e os SUV, a geração de FRET observa-se na sobreposição dos espectros dos fluoróforos, tal como representado na figura 3.

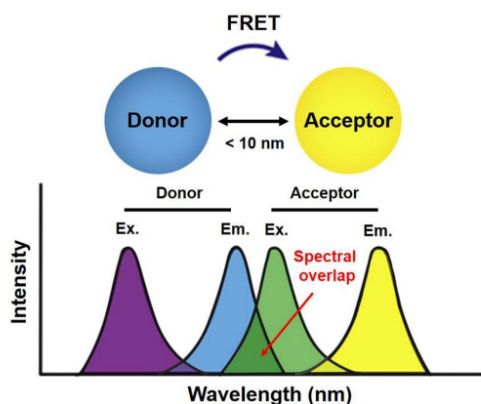


Figura 3. Ilustração da sobreposição dos espectros integrados entre o espectro de emissão do doador e da absorção do aceitante

II Procedimento e Material Utilizado

A. Preparação de nanopartículas de ferrite de manganês pelo método de co-precipitação

Pelo método de co-precipitação (que é uma transferência por um precipitado de substâncias normalmente solúveis nas condições empregadas), foi preparada uma solução de nanopartículas de ferrite de manganês, da seguinte forma:

- 1) Num gobelé, adicionou-se com uma micropipeta 18,944 mL de água ultrapura, 1 M de hidróxido de sódio (NaOH 50%) e 0,05 M de citrato trissódico di-hidratado ($C_6H_9Na_3O_9$). Aqueceu-se esta solução aquosa a 90 °C em banho-maria numa solução previamente aquecida por uma placa de aquecimento, que recorreu à agitação magnética para homogeneizar a temperatura desta.
- 2) Da mesma forma, preparou-se uma mistura contendo 500 µL de $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,033 M) e 500 µL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,066 M).
- 3) Adicionou-se, usando a micropipeta, gota a gota e sob agitação magnética, a mistura preparada anteriormente à solução aquosa inicial.
- 4) Após 2 horas a 90 °C, sob agitação magnética, as nanopartículas formaram-se.
- 5) Depois de formadas, as nanopartículas foram lavadas com água ultrapura, por decantação magnética (separação de misturas sólidas feita utilizando um íman), de forma a remover restos de reação.

Quando aqui se fala no conceito de água ultrapura, que é diferente do conceito de água destilada, quer dizer que é uma água livre dos iões que normalmente estão dentro desta, permitindo assim diminuir ao máximo erros que poderiam ser associados à solução.

B. Cálculos associados à primeira parte da experiência

Nesta primeira parte da experiência, usou-se duas soluções que se irão denominar de soluções A e B.

- a solução A vai corresponder aos 18,944 mL de água ultrapura + 1 M de hidróxido de sódio (NaOH 50%) + 0,05 M de citrato trissódico di-hidratado ($C_6H_9Na_3O_9$);
- a solução B vai corresponder 500 µL de $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,033 M) + 500 µL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,066 M).

De forma a conhecer os valores das massas e dos volumes para as substâncias usadas, de forma a obter as duas soluções A e B, utilizou-se as seguintes fórmulas:

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

onde n é o número de moles (em mmoles), m é a massa (em gramas g), M é a massa molar (g/mol), c é a concentração (em M, que é moles/litro) e v que é o volume (em mL).

Aplicando estas fórmulas, obteve-se as seguintes tabelas (ver Anexo para os cálculos):

Tabela I
Valores respetivos para cada substância referentes às equações da concentração e do número de moles

Substâncias	c_f	v_f	n	M_w	m
$C_6H_9Na_3O_9$	0.05	20	1.00	294.1	0.294
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.033	20	0.66	169.020	0.012
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.066	20	1.33	270.300	0.357

Tabela II
Valores respetivos para cada substância referentes às equações da concentração e do volume

Substância	c_i	v_i	c_f	v_f
NaOH 50%	18.94	1.056	1	20

C. Preparação dos magnetolipossomas aquosos pelo método de injeção etanólica

No método de injeção etanólica, os lípidos são dissolvidos num solvente orgânico, sendo depois esta solução injetada de forma rápida e direta com o auxílio de uma agulha fina, sob constante agitação, numa solução etanólica. A força da injeção é capaz de proporcionar uma mistura homogênea, diluindo totalmente o etanol e favorecendo a organização das moléculas de lípidos em forma de vesículas. Os AMLs foram então preparados da seguinte forma:

- 1) Preparou-se uma solução aquosa de nanopartículas de concentração de 0,02 mg/ml em 5 ml.
- 2) Preparou-se uma mistura etanólica contendo o lípido Egg-PC (1×10^{-3} M) e curcumina (1×10^{-6} M), molécula que atuará como doador de energia.
- 3) A solução etanólica foi injetada na dispersão de nanopartículas, gota a gota, sob vortex.
- 4) Por fim, procedeu-se a uma lavagem por decantação magnética com um magneto para remover as nanopartículas magnéticas não encapsuladas, que apresentam uma resposta magnética maior do que as nanopartículas encapsuladas.

D. Preparação dos modelos de membrana, SUVs

- 1) Preparou-se uma mistura etanólica contendo Egg-PC (1×10^{-3} M) e a sonda hidrofóbica Nile Red (1×10^{-6} M) que atuará como aceitador de energia.
- 2) A solução etanólica foi injetada em água, gota a gota, sob vortex.

III Resultados e respetivas discussões

Tendo em conta o procedimento descrito anteriormente, realizou-se as preparações das soluções de forma a cumprir-se o objetivo de no final haver a formação dos magnetolipossomas aquosos, que irão servir como nanotransportadores de curcumina. Os resultados irão ser descritos de seguida.

A. Resultados das preparações realizadas

Feita a primeira preparação experimental, deparou-se com a formação das nanopartículas de ferrite de manganês que estão ilustradas na figura seguinte:

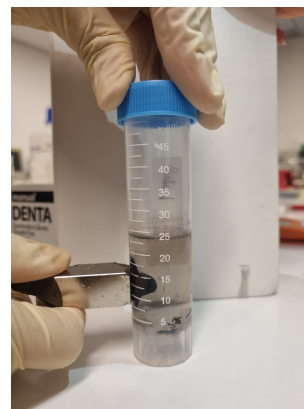


Figura 4. Imagens do resultado da preparação das nanopartículas de ferrite de manganês.

Foi possível observar a formação destas nanopartículas, o que é facilmente confirmado através da colocação do ímã que, como está representando na imagem, atrai as nanopartículas.

A primeira preparação dos magnetolipossomas aquosos ainda teria incluído as nanopartículas encapsuladas e não encapsuladas, por isso teve que se aplicar um processo de decantação. Esta decantação teve, como objetivo, retirar as nanopartículas magnéticas que não foram encapsuladas e que apresentam uma resposta magnética superior às que efetivamente foram encapsuladas, daí que quando aplicado um ímã, elas são imediatamente atraídas para o mesmo. Ora, elas são retiradas com o intuito de reduzir a toxicidade do ferrofluido magnético, e assim permitir melhores resultados.

Mais uma vez voltou-se a utilizar o ímã para demonstrar a magnetização das nanopartículas.

Na preparação 3, onde estão contidos o EGG-PC e o NILE RED, obteve-se no tubo de ensaio uma película fina de lípidos secos. Essa película fina formou-se através da evaporação do solvente, e para que o processo de síntese de lipossomas estivesse completo ao tubo de ensaio administrou-se água.

Na preparação 4, onde se juntou o SUVs com os AMLs, teve que se aumentar a temperatura, pois esse aumento vai alterar o estado da bicamada. A temperaturas abaixo da temperatura de transição o magneto lipossoma encontra-se no estado gel-sólido (estrutura mais organizada), e para temperaturas acima encontra-se na fase cristal-líquida (menos organizada). Ao aumentar-se a temperatura, as estruturas de cadeias hidrocarbonadas dos fosfolípidos vão ficar mais desorganizadas e a espessura da bicamada diminui permitindo que seja possível a formação dos magnetolipossomas, e que se encontre um equilíbrio entre o fármaco e o lipossoma.

B. Espectro de Fluorescência das soluções preparadas de AMLs, SUVs e da solução mistura

Com o auxílio do espectrofluorímetro, que fornece informação sobre a intensidade de fluorescência pelo comprimento de onda, obteve-se os espectros de absorção dos AMLs (que carregam a curcumina), de emissão dos SUVs (que carregam o NILE RED), e da reação quando temos ambos na mesma solução. Como explicado anteriormente, as

componentes incorporadas nos AMLs devem funcionar como dadores de energia e nos SUVs como aceitadores da mesma.

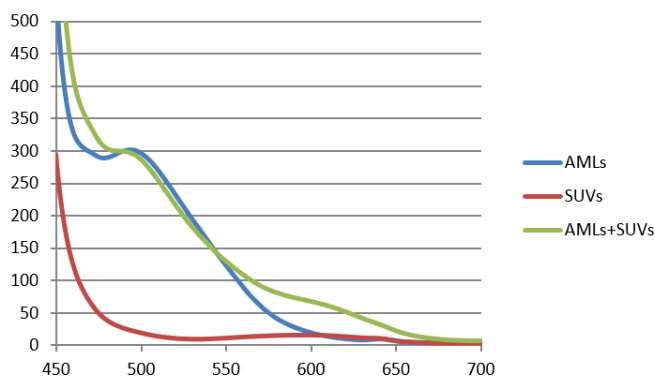


Figura 5. Gráfico obtido pelo espectrofluorímetro onde se tem a intensidade de fluorescência em função dos vários comprimentos de onda para as soluções preparadas.

Em primeira análise, verifica-se que efetivamente houve uma sobreposição espectral entre os espectros de fluorescência de absorção dos dadores e de emissão dos aceitadores. Ora, com isto pode-se afirmar que uma das condições que sem a qual não poderia ter ocorrido o FRET, aconteceu. Esta sobreposição também mostra que foi possível acontecer uma transferência de energia entre os dadores e os aceitadores, ou seja, ocorreu uma transferência de nanopartículas magnéticas para dentro das membranas.

Pela observação do gráfico, também se comprova que o espectro de absorção dos AMLs tem um pico de intensidade de fluorescência perto dos 500 nm. Já no espectro de emissão dos SUVs, observa-se que quase não ocorre esta emissão, pois a intensidade de fluorescência é bastante baixa comparando com as outras duas misturas. Apesar disso, existe uma pequena elevação neste espectro (tem-se quase como um pico de fluorescência perto dos 600 nm), que pode ser explicada pelo facto de a experiência ter sido realizada a uma temperatura ambiente (e não à temperatura de zero absoluto), o que implica que exista a excitação de uma pequena parte das substâncias que constituem os SUVs (pois acontece um fenómeno chamado de excitação térmica). Os máximos de emissão de fluorescência tanto para a curcumina como para o Nile Red estão associados à sua localização nas membranas.

Por fim, considerando os resultados para a solução onde se encontram os dadores (AMLs) e os aceitadores (SUVs), comprova-se que por volta dos 600 nm, existe uma elevação da intensidade de fluorescência. Isto pode ser explicado devido ao facto de que se excitou a curcumina e existe uma sobreposição entre os dois espectros de emissão e absorção do dador e do aceitador, respetivamente, significando que ocorreu uma transferência de energia entre os mesmos (dos AMLs para os SUVs). Ora, isto pode ser visto quando existe uma diminuição da intensidade de fluorescência no espectro dos AMLs e um aumento da mesma no espectro dos SUVs.

Outro pormenor que se pode reparar analisando o gráfico é o facto de que inicialmente, isto é, até aos comprimentos de onda com valores perto de 475 nm, existe uma diminuição

acentuada dos valores da intensidade de fluorescência em todas as soluções. Teoricamente, este aspeto não se verifica, pois isto é um efeito da lâmpada usada no espectrofluorímetro, que era recente, e que por isso quando acesa vai excitar as soluções imediatamente, provocando o efeito de fluorescência em todas as soluções. Mas para comprimentos de onda maiores, este fenómeno desaparece.

Assim, com os resultados obtidos, comprova-se que ocorreu a formação de magnetolipossomas aquosos, tal como pretendido.

IV Conclusões

Tendo em conta os resultados obtidos e comparando-os com o que era esperado teoricamente, pode-se concluir que neste trabalho experimental foi cumprido o objetivo apresentado que era o desenvolvimento de magnetolipossomas aquosos como nanotransportadores da curcumina. Isto foi possível devido à combinação das membranas lipídicas (que formaram o que se chama de SUVs) com as nanopartículas magnéticas de ferrite de manganês (que mais tarde deram origem aos AMLs). A técnica usada para confirmar e analisar esta combinação foi a técnica de Fluorescência FRET (transferência de energia de ressonância por fluorescência), em que os respetivos resultados verificaram que ocorreu uma transferência de energia entre as moléculas que se definiu como dadoras (os AMLs) e as moléculas aceitadoras (os SUVs).

Para trabalhos futuros, seria interessante entender que diferenças poderia existir caso fossem utilizados os SMLs (magnetolipossomas sólidos na qual as nanopartículas são cobertas com uma bicamada lipídica, não existindo um núcleo aquoso, mas sim um cluster de nanopartículas), e com diferentes tamanhos ou até mesmo número de lamelas dos lipossomas (MLVs, LUVs ou GUVs).

Referências

- [1] Valeu B., *Molecular Fluorescence - Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2001
- [2] Rodrigues, Ana Rita O., Bernardo G. Almeida, João P. Araújo et al.(2018), *Magnetoliposomes for dual cancer therapy*. In: *Inorganic Frameworks as Smart Nanomedicines*. Elsevier, Chapter 11.
- [3] Rodrigues, Ana Rita O., José M.F. Ramos et al.(2016). *Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs*. In: *RSC advances*, chapter 6, pp. 17302– 17313.
- [4] Rodrigues, Ana Rita O., Bernardo G. Almeida, Juliana M. Rodrigue al.(2017). *Magnetoliposomes as carriers for promising antitumor thieno [3,2-b] pyridin-7-arylamines: photophysical and biological studies*. In: *RSC advances*, chapter 7, pp.15352–15361.
- [5] "Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em nanopartículas de ferrite de cálcio para aplicações na entrega de fármacos antitumorais"

Anexo

1 Cálculos para as tabelas apresentadas no Protocolo

Para calcular os valores escritos nas tabelas I e II, utilizou-se as seguintes equações:

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

onde c é a concentração, v é o volume, c_i e c_f são a concentração inicial e final, respetivamente; v_i e v_f o volume inicial e final, n é o número de mols, m o número de massa e M é a massa molar.

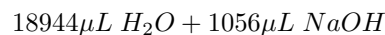
1.1 Preparação de nanopartículas de ferrite de manganês pelo método de co-precipitação

Nesta primeira experiência, necessitou-se de preparar duas soluções. A primeira consistia em 19 mL de H_2O ultrapura, juntamente com 1,0 M de $NaOH$ e no final acrescentou-se 0,05 M de citrato (solução A). Logo, usando as equações em cima:

- sabendo que $C_i(NaOH) = 18,94M$, $C_f = 1M$ e $V_f = 20mL$, para se saber o volume de $NaOH$ necessário para acontecer uma diluição, tem-se que:

$$c_i v_i = c_f v_f \rightarrow v_i = 1056\mu L$$

Como se sabe que a solução final terá um volume de $v_f = 20mL$, então terão de ser adicionados $(20000 - 1056) = 18944\mu L$ de água ultrapura ao $NaOH$ diluído:



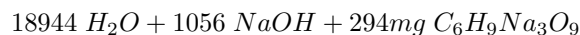
- em relação ao citrato, tem-se que $c_f = 0,05M$, $M = 294,1g$ e $V_f = 20mL$. Por isso, daqui pode-se calcular a massa, em gramas, de Citrato necessária, começando por calcular primeiro o número de moles necessário:

$$c = \frac{n}{v} \leftrightarrow n = 0,05 \times 20 \times 10^{-3} \leftrightarrow n = 1 \times 10^{-3} mol$$

Como $n = m/M$, então:

$$(1 \times 10^{-3}) = \frac{m}{294,1} \leftrightarrow m = (1 \times 10^{-3}) \times 294,1 \leftrightarrow m = 0,294g$$

Logo, nesta solução A tem de se colocar:



A segunda solução tem-se 500 μL de $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,033 M), juntamente com 500 μL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,066 M) (solução B).

- sabe-se que $MnSO_4 \cdot H_2O$ tem uma $c_f = 0,033M$, um $v_f = 20mL$ e $M = 169,020g/mol$. A partir daqui vai-se ter o seguinte:

$$c = \frac{n}{v} \leftrightarrow n = 0,033 \times 20 \times 10^{-3} \leftrightarrow n = 0,66 \times 10^{-3} mol$$

Fazendo o mesmo que na solução A:

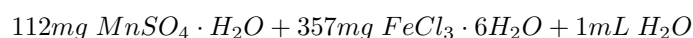
$$\frac{m}{M} = (0,66 \times 10^{-3}) \leftrightarrow m = (0,66 \times 10^{-3}) \times 169,020 \leftrightarrow m = 0,112g$$

- tem-se que μL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ tem $c_f = 0,033M$, $v_f = 20mL$ e $M = 169,020g/mol$. Fazendo o mesmo que anteriormente:

$$c = \frac{n}{v} \leftrightarrow n = 0,066 \times 20 \times 10^{-3} \leftrightarrow n = 1,33 \times 10^{-3} mol$$

$$\frac{m}{M} = (1,33 \times 10^{-3}) \leftrightarrow m = (1,33 \times 10^{-3}) \times 270,300 \leftrightarrow m = 0,357g$$

Logo, nesta solução B terá que se colocar:



1.2 Preparação dos magnetolipossomas aquosos (AMLs) pelo método injeção etanólica

Nesta segunda parte do protocolo, serão utilizadas duas soluções, que serão denominadas de soluções A e B.

- a solução A consiste em $5ml H_2O + 0,02mg/mL$ de Nanopartículas.
- já a solução B consiste num Lípido com uma $c_i = 20 \times 10^3 M$, $c_f = 1 \times 10^{-3} M$ e $v_f = 5mL$, e com a curcumina de $c_i = 88 \times 10^{-4} M$, $c_f = 1 \times 10^{-6} M$ e $v_f = 5mL$.

Aqui será necessário calcular o volume inicial de curcumina, para que seja possível realizar as diluições necessárias e descritas no protocolo.

Utilizando a equação $c_i v_i = c_f v_f$, tem-se que para o lípido:

$$v_i = 250\mu L$$

Para a curcumina, tem-se que, utilizando a mesma equação que para o lípido:

$$v_i = 205\mu L$$

Portanto, esta preparação (solução A + solução B) vai ser efetuada com:

$$250\mu L \text{ Egg} - PC + 205\mu L \text{ curcumina}$$

1.3 Preparação de modelos de membrana (Small Unilamellar Vesicles, SUVs)

Tal como anteriormente, nesta preparação tem-se $5mL$ de H_2O e uma outra solução com a junção de um lípido com Nile Red. Olhando apenas para esta segunda solução tem-se que:

- em relação ao Lípido, foi calculado anteriormente que para uma $c_f = 1 \times 10^{-3}$, teria-se que:

$$v_i = 250\mu L$$

- mas para o Nile Red, vai-se ter uma $c_f = 1 \times 10^{-6} M$, $c_i = 1 \times 10^{-4} M$ e $v_f = 5mL$. Por isso, tal como antes, obtém-se que:

$$v_i = 50\mu L$$

Em suma, esta última preparação vai ser efetuada com:

$$250\mu L \text{ Egg} - PC + 50\mu L \text{ NileRed} + 5mL \text{ H}_2\text{O}$$