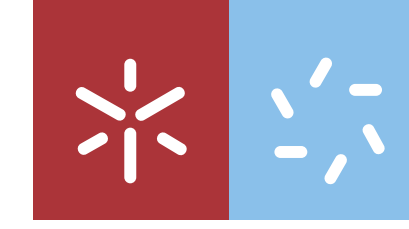


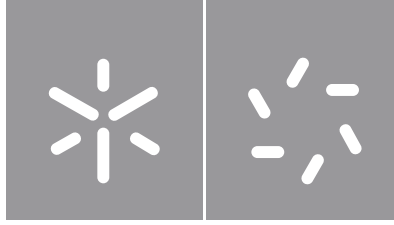


Fábio Alberto Costa Lopes

Desenvolvimento de (magneto)lipossomas inteligentes contendo nanopartículas compósitas de ferrite e ouro para aplicação em terapia multimodal do cancro

Universidade do Minho
Escola de Ciências





Universidade do Minho

Escola de Ciências

Fábio Alberto Costa Lopes

**Desenvolvimento de (magneto)lipossomas
inteligentes contendo nanopartículas
compósitas de ferrite e ouro para aplicação
multimodal do cancro**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação do(a)

Prof. Dr. Paulo José Gomes Coutinho

Dr. Ana Rita Oliveira Rodrigues

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

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

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

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



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações

CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Agradecimentos

Primeiramente à minha mãe e ao meu pai que se sacrificaram e apoiaram toda a minha vida, além de proporcionar a possibilidade de estudar e realizar este trabalho. Agradeço igualmente aos meus irmãos, Rafael e Carlos, que me acompanharam e apoiaram em todos os momentos. Esta tese é dedicada a vocês, obrigado.

Ao meu orientador, Professor Dr. Paulo Coutinho, expresso a minha gratidão por ter me aceitado como aluno e pela orientação e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Dr. Ana Rita Rodrigues, que me acompanhou durante todo este projeto e permitiu despertar a minha paixão pela investigação científica. Agradeço igualmente pela sua orientação, amizade e paciência que sem dúvida foram essenciais para a realização desta Tese.

Ao departamento de Física da Universidade do Minho pela infraestrutura disponibilizada e aos colegas de laboratório que me acompanharam durante este período.

Ao meu amigo, Albino Machado, que me acompanhou e apoiou durante maior parte da minha vida. Obrigado pela amizade, bons momentos e gargalhadas.

Aos meus colegas de mestrado Jorge Cunha, Ana Martins e Diana Sousa e colegas de licenciatura Edgar Moita, Rita Oliveira, Patrícia Rodrigues, Leandro Soares, Fábio Pombo e Rafael Alves que me acompanharam nesta jornada académica. Obrigado pelo apoio, amizade e todos bons momentos vividos.

“Humans are natural-born scientists. When we're born, we want to know why the stars shine. We want to know why the sun rises.”

(Michio Kaku)

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

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

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

Desenvolvimento de (magneto)lipossomas inteligentes contendo nanopartículas compósitas de ferrite e ouro para aplicação em terapia multimodal do cancro.

Resumo

Magnetolipossomas contendo nanopartículas com propriedades magnéticas e plasmónicas são um nanossistema multifuncional promissor para a terapia do cancro. As suas propriedades permitem uma abordagem terapêutica multimodal, combinando de forma sinérgica a quimioterapia localizada com a hipertermia magnética e terapia fototérmica. As características estruturais e físicas deste nanossistema fornecem a capacidade de transporte e direcionamento de fármacos antitumorais ao local alvo, permitindo ainda uma libertação controlada e enfraquecimento de células cancerígenas por ação de estímulos externos. Assim, os magnetolipossomas multifuncionais são de grande interesse para a terapia oncológica, permitindo tratamentos potencialmente com maior eficiência terapêutica e menor toxicidade sistémica.

Neste trabalho, foram desenvolvidos magnetolipossomas baseados em nanopartículas magneto-plasmónicas. Para tal, foram sintetizadas nanopartículas de ferrite de manganês usando duas metodologias diferentes. A caracterização estrutural das nanopartículas obtidas foi efetuada XRD, SEM e espectroscopia de absorção. O comportamento superparamagnético das nanopartículas foi confirmado por SQUID, tendo sido obtidos valores elevados de magnetização de saturação ($M_s(A) = 14,75 \text{ emu/g}$ e $M_s(B) = 26,77 \text{ emu/g}$). Posteriormente, foi promovida a agregação das ferrites de manganês em *clusters* e fez-se crescer uma coroa de ouro de forma a obter nanopartículas magneto-plasmónica em estrutura núcleo-coroa. As nanopartículas núcleo-coroa de ferrite de manganês e ouro foram cobertas com uma bicamada surfactante/lípido, originando magnetolipossomas com diâmetros entre os 100 e os 400 nm. Por fim, foram realizados ensaios de fototermia para avaliar a capacidade de aquecimento dos nanossistemas desenvolvidos. Os resultados obtidos mostram que, sob fonte de luz, os magnetolipossomas promovem o aquecimento de 1°C nos primeiros 10 minutos de irradiação.

Palavras-chave:

Nanopartículas magnéticas; Nanopartículas plasmónicas; Lipossomas multifuncionais; Hipertermia; Fototermia

Development Of Smart (Magneto)Liposomes Containing Magnetic/Gold Composite Nanoparticles For Applications In Multimodal Cancer Therapy

Abstract

Magnetoliposomes containing nanoparticles with magnetic and plasmonic properties are a promising multifunctional nanosystem for cancer therapy. Its properties allow a multimodal therapeutic approach, synergistically combining localized chemotherapy with magnetic hyperthermia and photothermal therapy. The structural and physical characteristics of this nanosystem provide the ability to transport and direct anti-tumor drugs to the target site, also allowing a controlled release and weakening of cancer cells by the action of external stimuli. Thus, multifunctional magnetoliposomes are of great interest for cancer therapy, potentially allowing treatments with greater therapeutic efficiency and less systemic toxicity.

In this work, magnetoliposomes based on magnetoplasmonic nanoparticles were developed. To this end, manganese ferrite nanoparticles were synthesized using two different methodologies. The structural characterization of the obtained nanoparticles was carried out by XRD, SEM and absorption spectroscopy. The superparamagnetic behavior of the nanoparticles was confirmed by SQUID, and high values of saturation magnetization were obtained ($M_s(A) = 14.75$ emu/g and $M_s(B) = 49,79$ emu/g). Subsequently, the aggregation of manganese ferrites into *clusters* was promoted and a gold shell was grown in order to obtain magnetoplasmonic nanoparticles in a core-shell structure. The manganese and gold ferrite *core-shell* nanoparticles were coated with a surfactant/lipid bilayer, originating magnetoliposomes with diameters between 100 and 400 nm. Finally, photothermal tests were carried out to evaluate the heating capacity of the developed nanosystems. The results obtained show that, under a light source, magnetoliposomes heat up to 1°C in the first 10 minutes of irradiation.

Keywords:

Magnetic nanoparticles; Plasmonic nanoparticles; Multifunctional liposomes; Hyperthermia; Phototherapy

Índice

Agradecimentos	III
Resumo	V
Abstract	VI
Índice	VII
Lista de Figuras	IX
Lista de Abreviações	XII
I. Introdução	1
I.1. Cancro	2
I.2. Nanopartículas de Ouro (Au)	2
I.3. Nanopartículas Magnéticas	3
I.4. Lipossomas	4
I.4.1. Lipossomas Como Transportador de Fármacos	6
I.4.2. Magnetolipossomas para terapia multimodal do cancro	7
I.5. Objetivo	8
II. Materiais e Métodos	10
II.1. Síntese das nanopartículas magneto-plasmónicas	11
II.1.1. Síntese das nanopartículas de $MnFe_2O_4$	11
II.1.2. Formação dos <i>Clusters</i> de $MnFe_2O_4$	13
II.1.3. Síntese de nanopartículas de ouro	13
II.1.4. Formação de <i>Clusters</i> de $MnFe_2O_4$ decorados com nanopartículas de ouro ..	14
II.1.5. Formação de <i>Clusters</i> de $MnFe_2O_4$ com coroa de ouro	14
II.2. Preparação de SMLs baseados em <i>clusters</i> de $MnFe_2O_4$ com coroa de ouro	15
II.2.1. Preparação de SMLs marcados com carboxifluoresceína e rodamina B	15
II.2.2. Preparação dos SMLs marcados com sonda de Reichardt	16
II.3. Medidas de espectroscopia de absorção e fluorescência	17
II.4. Caracterização estrutural e magnética	17

II.5. Avaliação do efeito fototérmico	19
III. Resultados e discussão	21
III.1. Caracterização das nanopartículas magnetoplasmónicas	22
III.1.1. Caracterização das nanopartículas de ferrite de manganês	22
III.1.2. Formação de <i>clusters</i> magnéticos baseados nas nanopartículas A e B	29
III.1.3. Caracterização das nanopartículas magnético-plasmónicas	31
III.2. Caracterização dos magnetolipossomas	36
III.2.1. Prova de formação de magnetolipossomas sólidos	36
III.2.2. Caracterização dos magnetolipossomas por SEM e DLS	40
III.2.3. Estudos fototérmicos	41
IV. Conclusão e perspectivas futuras	47
V. Referências	49

Lista de Figuras

Figura 1: Taxa de sobrevivência de adultos com diferentes tipos de cancro, diagnosticados entre 2013-2017 na Inglaterra. Adaptada [2].	2
Figura 2: Ilustração esquemática das aplicações das nanopartículas de ouro no cancro. (A) diagnóstico por imagiologia; (B) hipertermia fototérmica; (C) direcionamento de fármacos.	3
Figura 3: Exemplo de funcionalização do lipossoma e possíveis cargas. (A) fármaco hidrofílico; (B) fármaco lipofílico; (C) nanopartículas magnéticas/plasmónicas; (D) PEG; (E) anticorpos, (F) proteínas.	6
Figura 4: Representação esquemática dos (A) AMLs e dos (B) SMLs.	7
Figura 5: Representação esquemática da libertação do fármaco encapsulado magnetolipossomas, sob ação de um campo magnético externo (A) geração de calor; (B) funcionalização da superficial do magnetolipossomas com polietilenoglicol (PEG); (C) Anticorpos específicos para a célula alvo; (D) fármaco libertado; (F) campo magnético alternado.	8
Figura 6. Ilustração esquemática do processo de síntese das nanopartículas magneto-plasmónicas.	11
Figura 7. Ilustração esquemática do processo de síntese dos magnetolipossomas de $MnFe_2O_4$ com coroa de ouro.	15
Figura 8. Representação esquemática do setup experimental das medições do efeito fototérmico.	20
Figura 9. Espectros de absorção em UV-Vis das nanopartículas A e B em água.	22
Figura 10. Taxa de deposição das nanopartículas (NPs) em água.	23
Figura 11. Imagens SEM A. Das nanopartículas A após calcinação (escala: 500nm). B. Das nanopartículas B após calcinação (escala: 1 μ m).	23
Figura 12. Padrão de difração de raios-X das nanopartículas A.	24
Figura 13. Padrão de difração de raios-X das nanopartículas B.	25
Figura 14. Ciclo de histerese das nanopartículas B calcinadas sob atmosfera controlada e na ausência de atmosfera controlada, à temperatura ambiente. Inserção: Ampliação na região de baixo campo.	27
Figura 15. Ciclo de histerese das nanopartículas A e B, à temperatura ambiente.	28
Figura 16. Espectros de absorção das (A) nanopartículas A e respetivos clusters em água. (B) nanopartículas B e respetivos clusters em água.	30

Figura 17. Imagens SEM A. Dos clusters das nanopartículas A (escala: 1µm). B. Dos clusters das nanopartículas B (escala: 1µm).....	31
Figura 18. Absorvância das nanopartículas: (A) clusters A (água), plasmônicas (tolueno) e magnético-plasmônicas baseadas em nanopartículas A (água), e (B) clusters B (água), plasmônicas (tolueno) e magneto-plasmônicas baseadas em nanopartículas B (água).	32
Figura 19. Imagens SEM A. Dos clusters A com nanopartículas de ouro acopladas (escala: 1µm). B. Dos clusters B com nanopartículas de ouro acopladas (escala: 200nm).....	33
Figura 20. Espectros de absorção das nanopartículas em estrutura núcleo-coroa ao longo do tempo, após adição do ácido cloroáurico (0,725 mM) em água. (A) nanopartículas de núcleo de ferrites de manganês A com coroa de ouro. (B) nanopartículas de núcleo de ferrites de manganês B com coroa de ouro.....	34
Figura 21. Imagens TEM A. Clusters das nanopartículas A após o crescimento da shell de ouro (escala: 1µm). B. Clusters das nanopartículas A após o crescimento da shell de ouro (escala: 1µm). B1. Histograma de tamanhos da imagem B e o ajuste a uma distribuição gaussiana....	35
Figura 22. Estrutura química da carboxifluoresceína e da Rodamina B-DOPE. Espectro da sobreposição entre a emissão da carboxifluoresceína e da absorção da rodamina B.	37
Figura 23. Espectro de fluorescência ($\lambda_{exc} = 470nm$) dos magnetolipossomas (MLs) marcados apenas com Rodamina B-DOPE, marcados apenas com carboxifluoresceína, e marcados com Rodamina B-DOPE e carboxifluoresceína.....	38
Figura 24. Imagem SEM dos magnetolipossomas baseados em nanopartículas núcleo-coroa das nanopartículas B. A. Diâmetro Indicado B. Tamanhos das bicamadas indicado.....	40
Figura 25. Espectro de transmitância dos magnetolipossomas B ao longo do tempo (1 hora). 41	
Figura 26. Gráficos de absorção A. dos SMLs contendo sonda Reichardt com o aumento da temperatura da solução. B. dos SMLs contendo sonda Reichardt com a irradiação do laser ao longo do tempo. C. dos SMLs contendo sonda Reichardt com a irradiação da lâmpada ao longo do tempo.....	43
Figura 27. Variação do espectro de absorção ajustado da sonda de Reichardt nos magnetolipossomas, A. com o aumento da temperatura da solução. B. durante a irradiação com a lâmpada arc xenon. C. durante a irradiação laser.	45
Figura 28. Variação da temperatura ajustada da amostra, durante a irradiação com fonte de lâmpada arc xenon ou laser.....	46

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros de Rietveld selecionadas das nanopartículas A e B : Tamanho, Composição elementar, pureza, estrutura cristalina e células.	25
Tabela 2. Campo coercivo (H_c), magnetização de saturação (M_s), magnetização remanescente (M_r) e razão M_r / M_s para as nanopartículas B calcinadas sob atmosfera controlada e sem atmosfera controlada, à temperatura ambiente.	27
Tabela 3. Campo coercivo (H_c), magnetização de saturação (M_s), magnetização remanescente (M_r) e razão M_r / M_s para as nanopartículas A e B.	29
Tabela 4. Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta dos magnetolipossomas determinado por DLS.	41

Lista de Abreviações

LSPR	Ressonância plasmônica de superfície localizado
MRI	Imagem de ressonância magnética
SAR	Taxa de absorção específica
PEG	Polietilenoglicol
AMLs	Magnetolipossomas aquosos
SMLs	Magnetolipossomas sólidos
SQUID	Dispositivo supercondutor de interferência quântica
DEG	Dietilenoglicol
OA	Oleato de sódio
MSA	Ácido mercaptosuccínico
DMF	N,N Dimetilformamida
TOAB	Brometo de tetraoctilamônio
PVP	Polivinilpirrolidona
CDI	1,1'-carbonildiimidazol
ODT	1-Octadecanetiol
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
FRET	Transferência ressonante de energia por fluorescência
SR	Sonda de Reichardt
Rh DOPE	Lípido marcado rodamina B
DLS	Difusão dinâmica de luz
XRD	Difração de raios-X
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
STEM	Microscópio eletrônico de varredura no modo de transmissão
FC	Arrefecimento em campo
ZFC	Arrefecimento em campo zero
TB	Temperatura de bloqueio
SEM	Microscópio eletrônico de varredura
M _s	Magnetização de saturação
M _r	Magnetização remanescente

H_c Campo coercivo
NPs Nanopartículas
MLs Magnetolipossomas
UV-Vis-NIR Luz ultravioleta, visível e infravermelho próximo

I. Introdução

I.1. Cancro

Apesar dos avanços da medicina, o cancro continua a ser a segunda maior causa de morte no mundo, sendo responsável por 1 em cada 6 mortes [1]. O cancro é caracterizado pelo crescimento anormal e descontrolado de células que se transformam em células cancerígenas devido a anomalias no seu ADN [4]. Os tratamentos atuais para o tratamento do cancro, como a quimioterapia, radioterapia e cirurgia demonstram ser ineficientes contra os cancros mais agressivos, tais como o cancro do mesotelioma, do pâncreas e do cérebro. Estes apresentam taxas de sobrevivência abaixo dos 15% (Figura 1) [2].

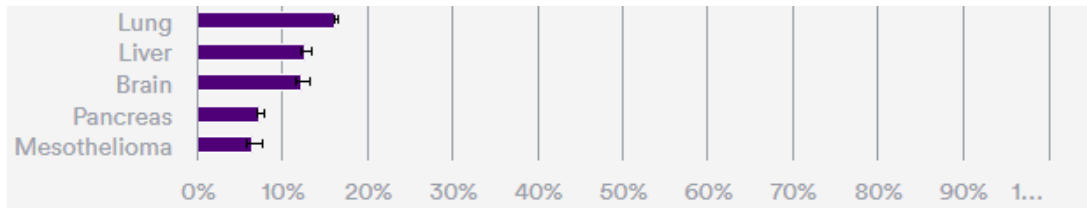


Figura 1: Taxa de sobrevivência de adultos com diferentes tipos de cancro, diagnosticados entre 2013-2017 na Inglaterra. Adaptada [2].

Devido à falta de especificidade e direcionamento, estes tratamentos apresentam toxicidade sistémica que leva a efeitos secundários nos pacientes, tais como a anemia, perda de cabelo, fadiga, dores, etc, [3]. É necessário então desenvolver novas formas de tratamento que complementem ou substituam os tratamentos atuais, de forma a aumentar a eficácia, especificidade e diminuir os efeitos secundários tóxicos.

I.2. Nanopartículas de Ouro (Au)

No ramo da nanotecnologia, as nanopartículas de ouro têm mostrado ser muito promissoras na terapia do cancro. Estas nanopartículas possuem características ideais para aplicação teranóstica, tais como o efeito fototérmico, bioimagem e direcionamento de fármacos. Assim, estas nanopartículas apresentam a capacidade de desempenhar diagnósticos e terapia ao mesmo tempo [5].

As nanopartículas de ouro apresentam um efeito de ressonância de plasmão de superfície localizado (LSPR, do inglês localized surface plasmon resonance). O comprimento de onda onde o LSPR ocorre depende do tamanho e forma das nanopartículas. No caso das nanopartículas esféricas, o LSPR ocorre entre os 500 e 600 nm. Devido a este efeito as nanopartículas de ouro podem absorver energia, permitindo que as nanopartículas de ouro funcionem como agente de contraste em bioimagem já que os componentes dos tecidos e do sangue não absorvem as ondas eletromagnéticas nesse comprimento de onda (Figura 2A). Adicionalmente, podem ser usadas como agentes de sobreaquecimento localizado

em terapia oncológica. Este tratamento implica incidir luz nas nanopartículas. Quando irradiadas, as nanopartículas de ouro provocam aquecimento localizado devido à conversão de energia da luz absorvida em calor. A este efeito dá-se o nome de efeito fototérmico. Este efeito resulta da relaxação não-radiativa da ressonância de plasmão de superfície. O efeito fototérmico causa o aquecimento local do tecido tumoral, levando à sua destruição (Figura 2B) [5].

As nanopartículas de ouro podem ser funcionalizadas com anticorpos e outras biomoléculas que permitem reconhecer alvos específicos, como as células tumorais. Na terapia oncológica, a possibilidade de funcionalização é de extrema importância uma vez que permite direcionar as nanopartículas ao local alvo, diminuindo a toxicidade sistémica e melhorando a entrega localizada de fármacos (Figura 2C) [5].

Uma das grandes vantagens do uso de nanopartículas de ouro em aplicações biomédicas é a sua elevada biocompatibilidade. Estas não apresentam toxicidade e são facilmente eliminadas do corpo. Assim, o uso destas nanopartículas na corrente sanguínea é considerado seguro [5].

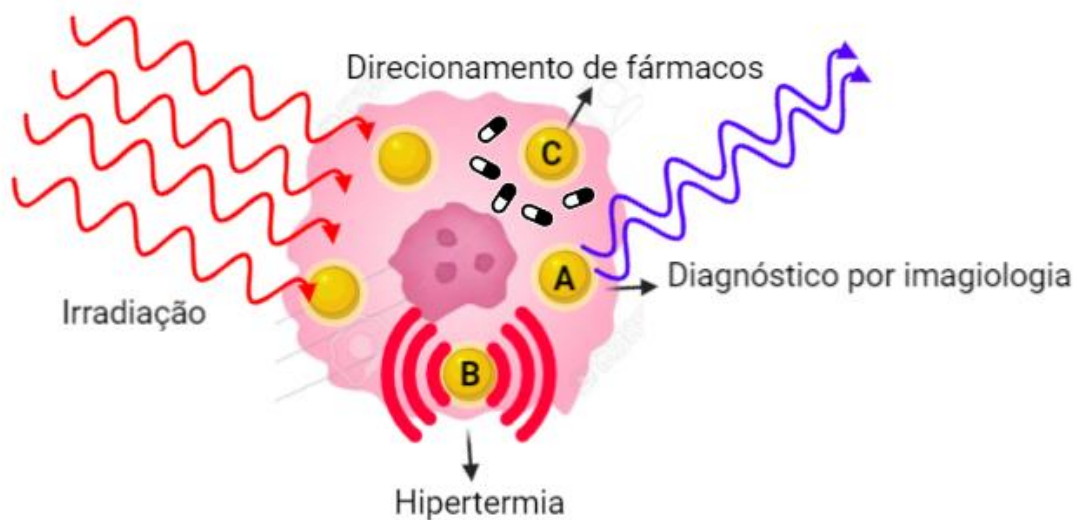


Figura 2: Ilustração esquemática das aplicações das nanopartículas de ouro no cancro. (A) diagnóstico por imagiologia; (B) hipertermia fototérmica; (C) direcionamento de fármacos.

I.3. Nanopartículas Magnéticas

As nanopartículas magnéticas são outro tipo de material que tem demonstrado potencial para aplicações biomédicas. Tal como as nanopartículas de ouro, as nanopartículas magnéticas apresentam potencial de teranóstico, mas ao invés de radiação eletromagnética são usados campos magnéticos. No tratamento do cancro, este tipo de partículas pode ser usado como agentes de contraste para realizar diagnóstico por MRI (do inglês, magnetic resonance imaging). Por outro lado, na presença de um campo magnético

alternado exterior, as nanopartículas magnéticas vibram assim transformando a energia magnética em calor. Esta característica pode ser aplicada na terapia oncológica enquanto agentes de aquecimento em hipertermia magnética. Além disso, é possível direcionar as nanopartículas com um gradiente de campo magnético, assim se acoplar fármacos à nanopartícula é possível realizar uma liberação controlada de fármacos no local desejado [6,7].

Abaixo de determinado tamanho, as nanopartículas ferromagnéticas apresentam um comportamento superparamagnético. As nanopartículas superparamagnéticas são caracterizadas por apresentar elevada magnetização (por apresentarem configurações magnéticas de domínio único – “aproximação macrospin”) [8]. No entanto, a magnetização só é observada na presença de um campo magnético e quando este é removido a magnetização é perdida, não sendo observável magnetização remanescente. Assim, estas partículas são ideais para aplicação biológica uma vez que na ausência de campo externo não têm tendência para se aglomerar.

No geral, as ferrites magnéticas do tipo MFe_2O_4 ($M = Mn, Ni, Co$) são boas candidatas para aplicações biomédicas uma vez que apresentam elevada magnetização, baixa toxicidade e boa estabilidade química. Em particular, as nanopartículas cúbicas de ferrite de manganês ($MnFe_2O_4$) têm sido apontadas como ferrites de eleição. A sua forma cúbica provoca uma anisotropia que leva a uma menor temperatura de bloqueio, maior magnetização de saturação e maior taxa de absorção específica (SAR, do inglês specific absorption rate), estas características permitem uma maior capacidade hipertérmica e direcionamento magnético [20,21]. Além disto, estas nanopartículas apresentam uma grande relaxação, sendo ideais enquanto agentes de contraste em ressonância magnética [6,7].

Devido ao seu reduzido tamanho, as nanopartículas podem ser facilmente reconhecidas e eliminadas pelo sistema imunitário. O uso de lipossomas para o encapsulamento de nanopartículas é uma abordagem que tem sido utilizada para ultrapassar a sua bioeliminação precoce. Além disso, o uso lipossomas permite encapsular compostos antitumorais (hidrofílicos ou hidrofóbicos). Assim, a combinação das nanopartículas magnéticas e lipossomas permite obter um nanossistema multifuncional para a terapia combinada por hipertermia e quimioterapia [6].

1.4. Lipossomas

Recentemente, os lipossomas têm demonstrado imenso potencial no tratamento do cancro. Devido à sua similaridade com as membranas celulares, composição e a capacidade de transportar fármacos e nanopartículas, estas estruturas apresentam elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade terapêutica [10,11].

Os lipossomas são estruturas esféricas concêntricas formadas por bicamadas lipídicas que contêm uma fase aquosa no seu interior. Estas bicamadas são compostas fundamentalmente por fosfolípidos, podendo conter outras estruturas na sua composição. Os fosfolípidos são moléculas anfifílicas, o que significa que contêm na sua estrutura uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. A componente hidrofílica, geralmente denominada por cabeça, é composta por um grupo fosfato e glicerol e parte hidrofóbica, designada por cauda, é constituída por cadeias de ácidos gordos [9].

Quando estes fosfolípidos são adicionados a um meio aquoso, ocorre a repulsão das caudas e atração das cabeças às moléculas de água. Devido a este fenómeno de atração/repulsão das diferentes zonas dos fosfolípidos, estas moléculas vão apresentar tendência de se auto-organizar e formar estruturas tais como as micelas e lipossomas. O tipo de estrutura formada depende das características estruturais do tipo de fosfolípido escolhido, assim como do meio e da temperatura [9].

A capacidade de inclusão de moléculas específicas na superfície da bicamada lipídica permite funcionalizar os lipossomas para aplicações específicas. A incorporação do polímero polietilenoglicol (PEG) à superfície da bicamada lipídica, estratégia conhecida como peguilação, dificulta o reconhecimento das vesículas pelo sistema mononuclear fagocitário aumentando o tempo de circulação. Paralelamente, a adição de moléculas específicas, designadas de ligandos, à superfície dos nanossistemas, permite a sua ligação específica a um recetor complementar, ou seja, os ligandos são reconhecidos por determinadas proteínas de membrana expressas pelas células cancerígenas. Além do mais, a bicamada lipídica e a fase aquosa dos lipossomas podem ser carregadas com moléculas e/ou estruturas de interesse biológico, como fármacos antitumorais ou nanopartículas magnéticas e/ou plasmónicas mantendo as suas propriedades (Figura 3) [10, 11].

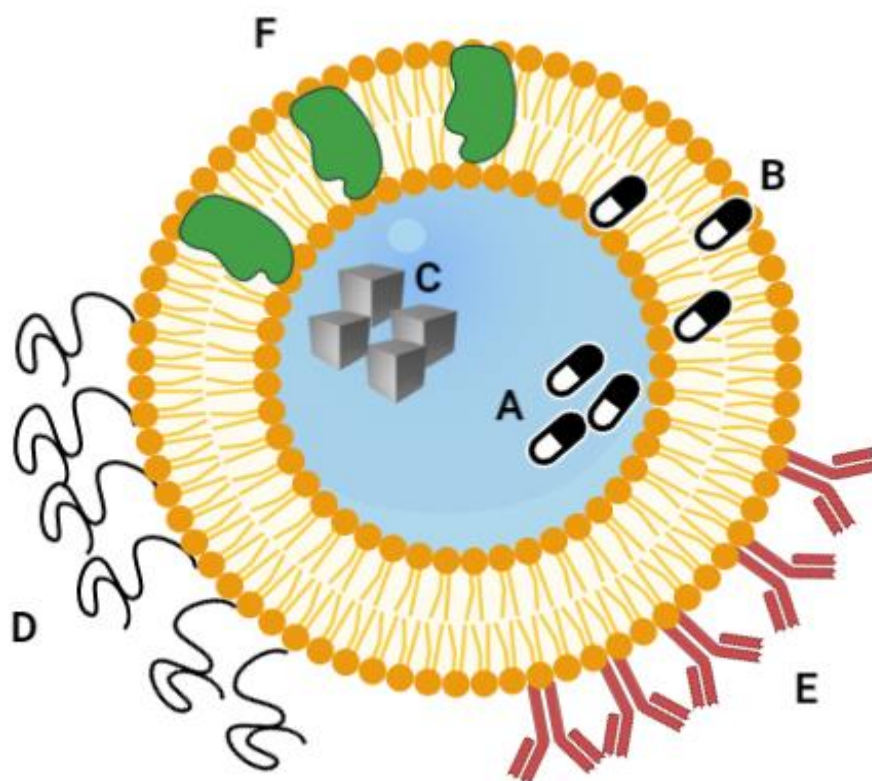


Figura 3: Exemplo de funcionalização do lipossoma e possíveis cargas. (A) fármaco hidrofílico; (B) fármaco lipofílico; (C) nanopartículas magnéticas/plasmônicas; (D) PEG; (E) anticorpos, (F) proteínas.

1.4.1. Lipossomas Como Transportador de Fármacos

Os fármacos quimioterápicos usados no tratamento do cancro apresentam elevada toxicidade e estão normalmente associados a efeitos secundários pela sua incapacidade de diferenciar as células saudáveis das células tumorais. Além disto, estes fármacos podem ser pouco solúveis o que causa baixa biodisponibilidade e conseqüente diminuição de efeito terapêutico. Assim, a utilização de nanossistemas de transporte, como os lipossomas, pode ser uma abordagem eficiente para aumentar o efeito terapêutico dos fármacos além de diminuir a sua toxicidade, prevenir a sua degradação, reduzir a interação precoce com o meio biológico, controle da sua farmacocinética e o controle do seu perfil de distribuição. Além de transportar fármacos, os lipossomas podem transportar material genético para silenciar ou restaurar genes. Este tipo de tratamento é chamado de terapia gênica e tem como foco a terapia de doenças genéticas [12].

Um problema dos lipossomas é a sua instabilidade física e química. Isto deve-se principalmente a problemas de agregação e fusão entre si, que leva à formação de estruturas multilamelares que são termodinamicamente mais estáveis. Para solucionar este problema é possível adicionar lípidos com carga

positiva/negativa. A presença de carga vai prevenir que os lipossomas se fundam, aumentando a sua estabilidade em solução [12,22].

I.4.2. Magnetolipossomas para terapia multimodal do cancro

Os magnetolipossomas são lipossomas que contêm nanopartículas magnéticas no seu interior. Dependendo da sua estrutura, estes podem ser divididas em dois tipos, os magnetolipossomas aquosos (AMLs, do inglês aqueous magnetoliposomes) e os magnetolipossomas sólidos (SMLs, do inglês solid magnetoliposomes). Nos AMLs, as nanopartículas magnéticas estão dispersas no meio aquoso no interior do lipossoma enquanto os SMLs consistem num *cluster* de nanopartículas magnéticas rodeado por uma bicamada lipídica (Figura 4) [13,14].

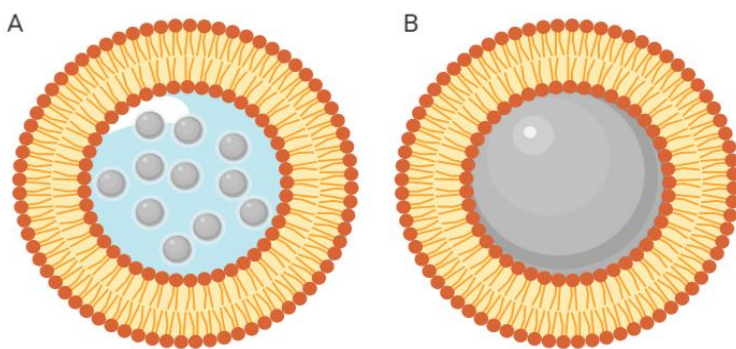


Figura 4: Representação esquemática dos (A) AMLs e dos (B) SMLs.

Os magnetolipossomas são estruturas que permitem reunir as características dos lipossomas e das nanopartículas magnéticas num só sistema, tornando-os multifuncionais e ideais para o tratamento multimodal do cancro. A terapia multimodal consiste em uma combinação de mais que um método de tratamento.

Devido à presença das nanopartículas magnéticas, quando sob a ação de um gradiente de um campo magnético, os magnetolipossomas carregados com fármacos podem ser direcionados a um local alvo. Além disto, sob ação de um campo magnético alternado, é possível induzir a geração local de calor (Figura 5A). Este calor vai permitir não só o sobreaquecimento e consequente morte das células tumorais que são mais sensíveis ao calor, mas também induzir a libertação controlada dos fármacos. Para a libertação controlada de fármacos sob ação de calor são usadas formulações lipídicas termosensíveis (Figura 5D). Neste tipo de formulação, devido ao aquecimento, a bicamada lipídica torna-se mais fluida e mais permeável, o que permite a saída dos fármacos dos lipossomas [12,13,14,15]. Assim, os

magnetolipossomas demonstram ser uma ferramenta poderosa no tratamento do cancro, uma vez que podem fornecer uma abordagem terapêutica dual, combinando a capacidade de hipertermia magnética e quimioterapia localizada num único bionanossistema.

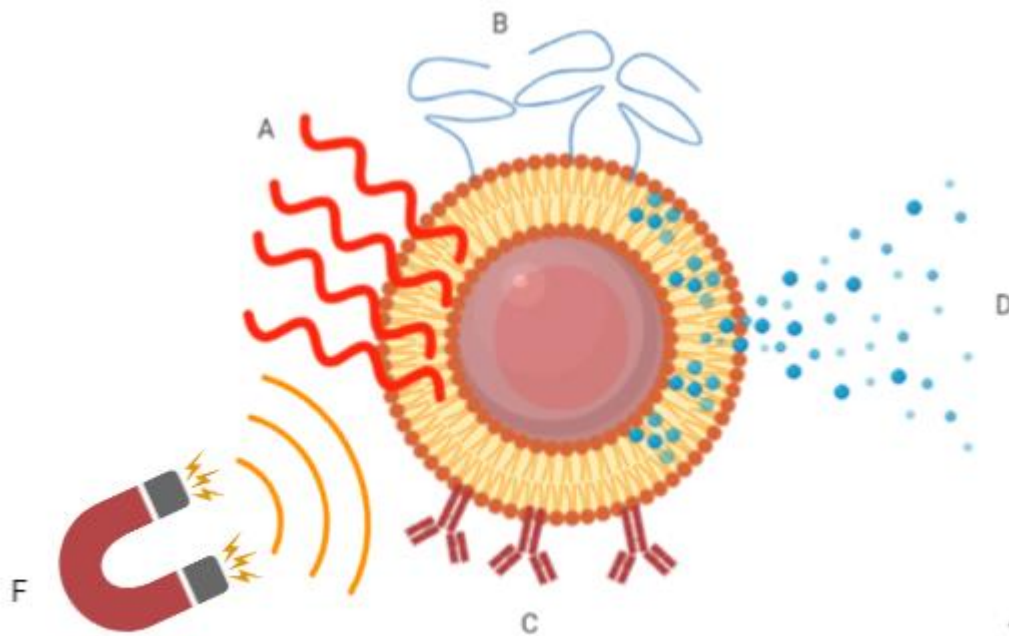


Figura 5: Representação esquemática da liberação do fármaco encapsulado magnetolipossomas, sob ação de um campo magnético externo (A) geração de calor; (B) funcionalização da superfície do magnetolipossomas com polietilenoglicol (PEG); (C) Anticorpos específicos para a célula alvo; (D) fármaco libertado; (F) campo magnético alternado.

1.5. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi a criação de magnetolipossomas baseados em nanopartículas cúbicas compostas de núcleo de ferrite manganês rodeadas com uma coroa de ouro e avaliar as suas capacidades de geração de calor sob uma fonte de luz. Primeiramente foram sintetizadas nanopartículas de ferrite manganês. Estas nanopartículas foram funcionalizadas com ácido mercaptosuccínico promovendo a sua aglomeração em estruturas do tipo *clusters*. Com a formação dos *clusters* foi possível acoplar nanopartículas de ouro com o objetivo de crescer uma coroa de ouro. A esta nanoestrutura foi adicionado uma bicamada composta de uma mistura de surfactante/lípido, assim produzindo magnetolipossomas sólidos (SMLs). As suas propriedades magnéticas foram estudadas pelo dispositivo supercondutor de interferência quântica (SQUID) e as propriedades fototérmicas foram verificadas pelo

efeito da irradiação eletromagnética da coroa de ouro. O efeito da irradiação foi verificado através da absorção do fluoróforo *Reichardt's dye* presente na bicamada dos magnetolipossomas.

II. Materiais e Métodos

II.1. Síntese das nanopartículas magneto-plasmónicas

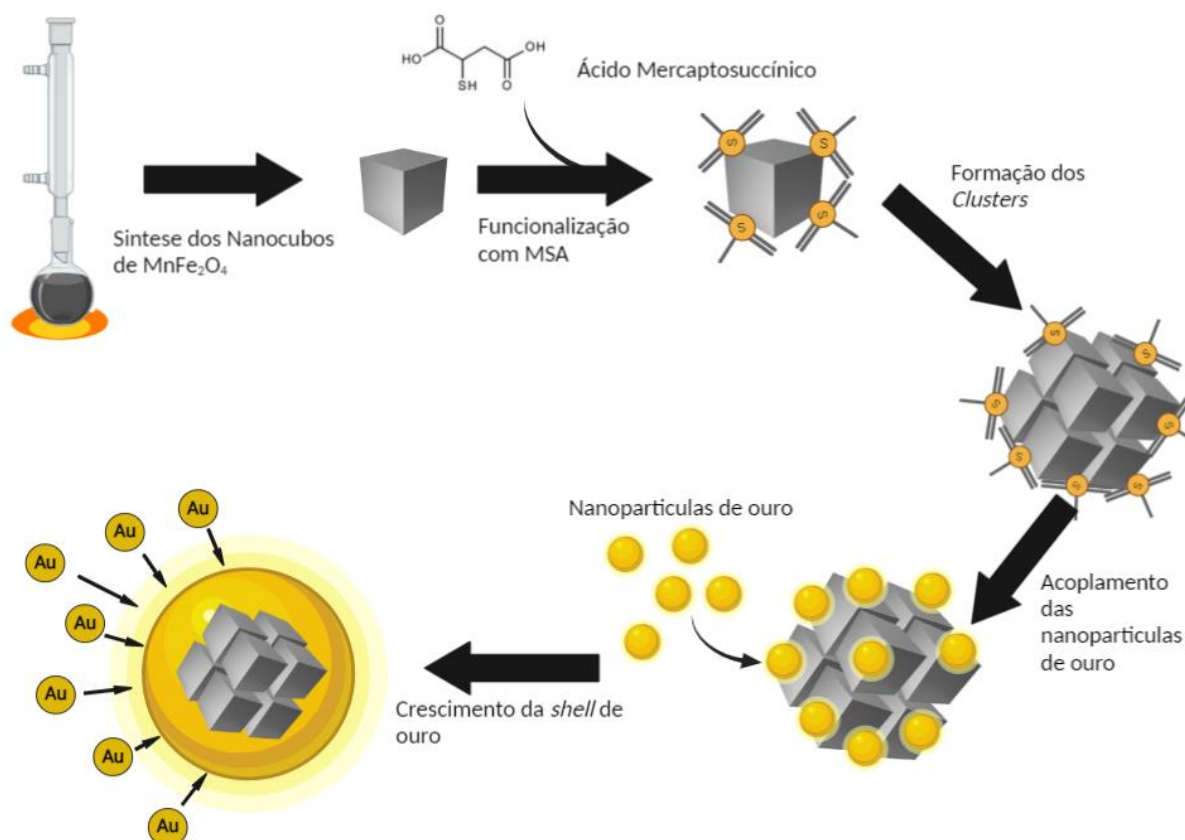


Figura 6. Ilustração esquemática do processo de síntese das nanopartículas magneto-plasmónicas.

II.1.1. Síntese das nanopartículas de $MnFe_2O_4$

Foram testados quatro protocolos diferentes para a síntese de nanopartículas de $MnFe_2O_4$ com o intuito de obter as partículas com as melhores propriedades estruturais e magnéticas para aplicações biomédicas. Tendo em conta a resposta magnética, destes quatro protocolos só dois é que satisfizeram estes requisitos. Assim, no seguimento do trabalho prosseguiu-se com as nanopartículas resultantes dos protocolos dos métodos A e B. Os reagentes não foram sujeitos a purificação.

II.1.1.1. Método A

Materiais

No método A foram usados os seguintes reagentes e solventes: acetilacetonato de ferro (III) ($Fe(acac)_3$); acetilacetonato de manganês (II) ($Mn(acac)_2$); Dietilenoglicol (DEG), água desionizada e etanol. Os reagentes não foram sujeitos a purificação.

Método

Foi utilizado um protocolo de decomposição térmica adaptado de um procedimento proposto por Raghvendra Bohara Et. AL. [23]. Foram adicionados 2 mmol (0,706 g) de $Fe(acac)_3$ e 1 mmol (0,253 g)

de $\text{Mn}(\text{acac})_2$ em 30 mL de dietilenoglicol, num balão de fundo redondo de duas bocas. A mistura foi aquecida a 110 °C, com agitação magnética e sob atmosfera de azoto, durante 1h. De seguida, a solução foi aquecida a 210 °C, sob agitação magnética e refluxo, durante 3h. Após a reação, o balão foi retirado da manta de aquecimento e deixado a arrefecer à temperatura ambiente. A mistura final foi lavada por decantação magnética com etanol e este processo foi repetido três vezes. No final, o precipitado foi novamente disperso em etanol e deixado numa estufa a 80 °C. De seguida, as nanopartículas secas foram calcinadas a 500 °C, durante 1 h, sob atmosfera de azoto. Após a calcinação, as nanopartículas foram novamente lavadas três vezes por decantação magnética, com água desionizada e etanol, e secas na estufa a 80 °C. As nanopartículas obtidas foram pesadas e guardadas para uso posterior.

II.1.1.2. Método B

Materiais

No método B foram usados os seguintes reagentes e solventes: o cloreto ferro (III) hexahidratado (FeCl_3), cloreto manganês (II) (MnCl_2), oleato de sódio (OA), 1-octadeceno, etanol, hexano, heptano, propanol e água desionizada.

Método

Este foi adaptado de um protocolo de decomposição térmica reportado por Zhichuan Xu Et. Al. [24]. Inicialmente, foram adicionados 1,3 mmol (0,36 g) de cloreto ferro (III) hexahidratado (FeCl_3), 0,6 mmol (0,12 g) de cloreto manganês (II) (MnCl_2) e 12,1 mmol (3,24 g) de oleato de sódio em 40 mL de 1-octadeceno, num balão de fundo redondo de duas cabeças. A mistura foi aquecida a 130 °C, sob agitação magnética e sob atmosfera de azoto, e mantida nestas condições durante 1h. De seguida, a solução foi aquecida a 317 °C, sob agitação magnética e refluxo durante 2h. Decorrido o tempo de reação, a solução foi retirada da manta de aquecimento e deixada a arrefecer à temperatura ambiente. A solução resultante foi sonicada com uma mistura de 80 mL de hexano, 20 mL de etanol e 80 mL de água desionizada. A solução final foi lavada com água desionizada através da sonicação e separação de fases, este processo foi repetido até que a água resultante da lavagem apresentasse uma cor transparente. No final, foi adicionada uma mistura de tolueno, 2-propanol e etanol (v/v = 1:1:0,5:1,5) e decantado magneticamente. O precipitado resultante foi disperso numa mistura de heptano, tolueno, 2-propanol e etanol (v/v = 1:1:0,5:1,5) e decantado magneticamente, sendo este passo repetido duas vezes. O precipitado final foi disperso em etanol e seco na estufa a 80 °C. Finalmente, as nanopartículas secas foram calcinadas a 500 °C, durante 1 hora, sob atmosfera de azoto. Após a calcinação, as nanopartículas

foram novamente lavadas, por decantação magnética, com água desionizada e etanol, sendo este passo sendo repetido 3 vezes. As nanopartículas obtidas foram secas a 80 °C na estufa, sendo posteriormente pesadas e guardadas.

II.1.2. Formação dos *Clusters* de MnFe₂O₄

Materiais

Neste passo, as nanopartículas de MnFe₂O₄ foram funcionalizadas de forma a promover a agregação das mesmas em estruturas do tipo *cluster*. Para tal, foram usados os seguintes reagentes e solventes: ácido mercaptosuccínico (MSA) (figura 6.), N,N-Dimetilformamida (DMF), éter etílico, acetona e tolueno.

Método

O processo de funcionalização baseou-se no acoplamento das nanopartículas através de grupos tióis funcionais reativos [25]. Após a funcionalização, os tióis presentes na superfície das nanopartículas vão formar pontes de enxofre (-S-S-) com outros grupos tióis promovendo *clusters* de nanopartículas. Este acoplamento implica uma oxidação do enxofre do estado de oxidação -2 para -1 que é eficientemente promovida pelo oxigénio dissolvido na solução [30].

Inicialmente, 1 mg de nanopartículas de MnFe₂O₄ e 48,2 mg MSA foram dispersas em 5 mL de DMF. A mistura foi mantida a 100 °C e sob agitação magnética, durante 18h. Para promover a precipitação das nanopartículas, foi adicionado éter etílico à solução e o precipitado foi recolhido e lavado três vezes com acetona por decantação magnética. No final, os *clusters* obtidos foram dispersos em etanol e guardados para uso posterior.

II.1.3. Síntese de nanopartículas de ouro

Materiais

Na síntese das nanopartículas de ouro foram usados os seguintes reagentes e solventes: ácido cloroáurico (HAuCl₄), brometo de tetraoctilamónio (TOAB), borohidreto de sódio (NaBH₄), tolueno e água desionizada.

Método

Foi aplicado o método Brust-Schiffrin para obter as nanopartículas de ouro [27]. Assim, foram adicionados 30 mM (9,3 µL) de HAuCl₄ em 1,5 mL de água desionizada e 50 mM (110 mg) de TOAB em 4 mL de tolueno e as duas soluções foram misturadas num frasco de vidro. A mistura foi vigorosamente agitada até a fase orgânica (tolueno) apresentar uma cor laranja-escuro e a fase aquosa não apresentar cor. De seguida, 1,25 mL de uma solução preparada na altura de NaBH₄ 0,4 M (18,5 mg) foi acrescentada, gota a gota, e a solução foi deixada sob agitação magnética durante 20 minutos. Neste

passo, também se verificou uma mudança de cor da fase orgânica de laranja-escuro para vermelho rubi. No final, a fase orgânica foi lavada com água destilada por centrifugação a 8000 rpm por 5 minutos, este passo foi repetido 5 vezes.

II.1.4. Formação de *Clusters* de MnFe_2O_4 decorados com nanopartículas de ouro

Materiais

Na síntese dos *clusters* decorados com nanopartículas de ouro foram usados os seguintes reagentes e solventes: *Clusters* de MnFe_2O_4 , nanopartículas de ouro, tolueno, clorofórmio, etanol e água desionizada.

Método

Tendo em conta que os grupos tiol pendentes da superfície dos *clusters* de MnFe_2O_4 ligam-se com alta afinidade à superfície das nanopartículas de ouro, procedeu-se da seguinte forma. Primeiro, foi retirado 50 μL da solução mãe de nanopartículas de ouro que foram secas sob corrente de azoto e dispersas em 5 mL de clorofórmio. De seguida dispersou-se 1 mg de nanopartículas de MnFe_2O_4 em 2 mL de clorofórmio e esta solução foi adicionada à solução de partículas de ouro. Esta solução é, então, centrifugada a 8500 rpm durante 10 minutos. O precipitado final é seco sob corrente de azoto e disperso em 7 mL de etanol.

II.1.5. Formação de *Clusters* de MnFe_2O_4 com coroa de ouro

Materiais

No crescimento da coroa de ouro foram usados os seguintes reagentes e solventes: *clusters* de MnFe_2O_4 decorados com nanopartículas de ouro, ácido cloroáurico (HAuCl_4), cloreto de hidroxilamónio, Polivinilpirrolidona (PVP) e água desionizada.

Método

A formação da coroa de ouro baseou-se no crescimento da camada mediado por sementes de nanopartículas de ouro [28]. Para o efeito, foram adicionados, sob sonicação, 1,5 mL de nanopartículas de ferrite manganês decorados com nanopartículas de ouro (0,6 mM) em 1,5 mL de água desionizada. De seguida, foram adicionados 20 mg de PVP e uma solução de cloreto de hidroxilamónio (0,73 M). Subsequentemente, foi adicionada 50 μL de uma solução aquosa de HAuCl_4 (0,725 mM) e a mistura foi deixada sob sonicação a 30 °C, durante 30 minutos. O crescimento foi acompanhado por espectroscopia de absorção UV-Vis.

II.2. Preparação de SMLs baseados em *clusters* de $MnFe_2O_4$ com coroa de ouro

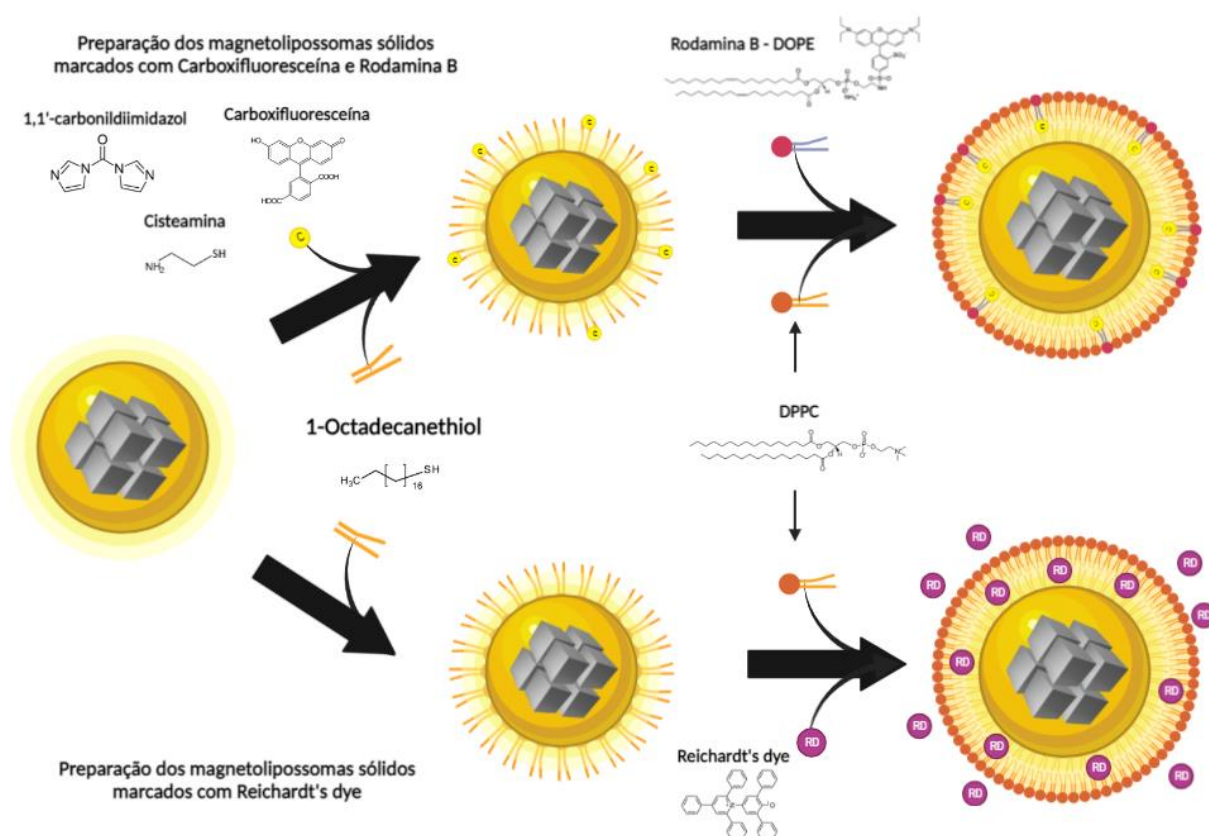


Figura 7. Ilustração esquemática do processo de síntese dos magnetolipossomas de $MnFe_2O_4$ com coroa de ouro.

II.2.1. Preparação de SMLs marcados com carboxifluoresceína e rodamina B

Materiais

Na preparação de SMLs marcados com carboxifluoresceína e rodamina B foram usados os seguintes reagentes e solventes: *clusters* de $MnFe_2O_4$ com coroa de ouro, cisteamina, 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), 1-Octadecanethiol (ODT), carboxifluoresceína, clorofórmio e água desionizada. O lípido Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e o lípido marcado rodamina B – DOPE (Rh-DOPE) foram usados para a formação da bicamada lipídica (figura 7). O objetivo do uso destes fluoróforos é verificar a ocorrência de FRET que corresponde à transferência da energia de excitação das moléculas doadoras (Carboxifluoresceína) para as moléculas aceitadoras (Rodamina B). Este fenômeno ocorre quando a distância dos dois fluoróforos é inferior a 10 nm e quando o espectro de emissão do doador se sobrepõe significativamente ao espectro de excitação do aceitador.

Método

Os SMLs foram obtidos pela funcionalização da superfície dos *clusters* de MnFe_2O_4 com coroa de ouro com ODT (sendo esta a primeira camada). Posteriormente foi realizada a adição da segunda camada de DPPC através de hidratação de filme lipídico. A carboxifluoresceína foi diretamente acoplada à superfície da coroa de ouro [27]. Para tal, 280 μL de *clusters* de MnFe_2O_4 com coroa de ouro (0,3 mM) foram dispersas em 1 mL de clorofórmio. De seguida, 8,8 μL de solução etanólica de cisteamina (2 mM) foi adicionado à solução de nanopartículas e a mistura foi mantida sob sonicação durante 30 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados 8 μL de uma solução de carboxifluoresceína (0,1 mM) e a mistura foi novamente sujeita a sonicação por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 18,5 μL de uma solução de CDI (2 mM) e a solução foi deixada a sonicar por mais 30 minutos. A solução resultante foi decantada magneticamente e lavada com clorofórmio, de forma a descartar a carboxifluoresceína livre e remover o CDI em excesso. De seguida, às nanopartículas funcionalizadas dispersas em clorofórmio, foram adicionados 50 μL de uma solução de ODT (20 mM) e a amostra foi sonicada durante 30 minutos, para a formação da primeira camada. A solução resultante foi novamente lavada com clorofórmio, por decantação magnética. De seguida, a solução contendo os *clusters* funcionalizados com ODT foi seca sobre corrente de azoto até formar um filme fino. Para a formação da segunda camada dos SMLs, a este filme foram adicionadas soluções etanólicas de 75 μL de DPPC (20 mM) e 32 μL de Rh-DOPE (0,154 mM) que foram também evaporados por corrente de azoto para evaporar o etanol e formar novamente um filme. A este filme fino, foram adicionados 3 mL de água desionizada a 60 °C e a mistura foi sonicada durante 1 hora, com intercalação de ciclos de agitação vortex. A solução foi lavada com água por decantação magnética três vezes, de forma a purificar os SMLs obtidos.

II.2.2. Preparação dos SMLs marcados com sonda de Reichardt

Materiais

Na preparação de SMLs marcados com a sonda de Reichardt foram usados os seguintes reagentes e solventes: *clusters* de MnFe_2O_4 com coroa de ouro, 1-Octadecanethiol (ODT), Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), sonda de Reichardt (SR), clorofórmio e água desionizada (figura 7).

Método

Os SMLs foram obtidos pela funcionalização da superfície dos *clusters* de MnFe_2O_4 com coroa de ouro com ODT (sendo esta a primeira camada) e posteriormente foi realizada a adição da segunda camada de DPPC através de hidratação de filme lipídico [27]. Para tal, 1120 μL de *clusters* de MnFe_2O_4 com

coroa de ouro (0,3 mM) foram dispersas em 3 mL de clorofórmio. De seguida, foram adicionados e 50 µL de uma solução de ODT (20 mM) e a amostra foi sonicada durante 30 minutos, para a formação da primeira camada. A solução resultante foi decantada magneticamente e lavada com clorofórmio, de forma a descartar o ODT em excesso. De seguida, a solução contendo os *clusters* funcionalizados com ODT foi seca sobre corrente de azoto até formar um filme fino. Para a formação da segunda camada dos SMLs, a este filme foi adicionado uma solução etanólica de 300 µL de DPPC (20 mM) que foi também evaporado por corrente de azoto para evaporar o etanol e formar novamente um filme. A este filme fino, foram adicionados 3 mL de água desionizada a 60 °C e a mistura foi sonicada durante 1 hora, com intercalação de ciclos de agitação vortex. A solução foi lavada com água por decantação magnética três vezes, de forma a purificar os SMLs obtidos. A solução final foi sujeita a banho-maria a 60°C e foi adicionado 600 µL de uma solução de SR (1 mM). Este processo foi mantido durante 30 minutos, observando mudança de cor.

II.3. Medidas de espectroscopia de absorção e fluorescência

Os espectros de absorção das nanopartículas; *clusters*; *clusters* com nanopartículas de ouro e o crescimento da coroa de ouro foram realizados num espectrofotómetro Shimadzu UV-3600 Plus UV-Vis-NIR (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), equipado com um suporte de *cuvettes* com controlo de temperatura.

Os espetros de emissão dos magnetolipossomas contendo Carboxifluoresceína e Rodamina B foram realizados num espectrofluorímetro SPEX Fluorolog 2 (HORIBA Jobin Yvon IBH Ltd., Glasgow, UK) equipado com monocromadores duplos de excitação e emissão. Todos os espectros foram corrigidos para a resposta instrumental.

Ensaio de transferência de energia de ressonância de Förster (FRET) foram realizados para confirmar a formação da bicamada surfactante / lípido nos magnetolipossomas sólidos. Nestes ensaios, a Carboxifluoresceína foi incorporada na primeira camada (surfactante), enquanto a Rodamina B foi incluída na segunda camada (lípido).

II.4. Caracterização estrutural e magnética

A caracterização estrutural das nanopartículas sintetizadas foi efetuada com recurso às técnicas de microscopia eletrónica, difusão dinâmica de luz (DLS) e difração de raios-X (XRD). As propriedades magnéticas foram obtidas num magnetómetro SQUID.

A técnica de microscopia eletrónica permitiu obter imagens das nanopartículas obtidas e assim aferir acerca da sua forma e tamanho. O equipamento utilizado foi um microscópio eletrónico de varredura

(MEV), modelo FEI Nova 200 NanoSEM, operando no modo de transmissão (STEM), do Laboratório de Serviços de Caracterização de Materiais da Universidade do Minho (SEMAT/UM). A preparação da amostra consistiu em deitar uma gota da solução aquosa de nanopartículas numa grelha de cobre revestida com Formvar/carbono (Agar Scientific Ltd, Essex, UK) suspensa por duas pinças. Após 20 segundos, o excesso de solução foi removido com papel de filtro e a grelha foi deixada a secar ao ar. Para o estudo dos magnetolipossomas foi necessário realizar um procedimento de marcação negativa, a amostra foi previamente misturada com uma solução aquosa com 2 % de volume de molibdato de amónio tetra-hidratado (20 μ L de amostra para 20 μ L de solução de molibdato). As imagens obtidas foram processadas com o software ImageJ (National Institutes of Health (NIH), versão 1.52p, Bethesda, MD, EUA), para realçar o contraste local. O diâmetro médio das partículas foi estimado usando uma distribuição gaussiana da área de cada partícula.

A técnica de DLS permitiu obter o diâmetro hidrodinâmico e a distribuição de tamanhos dos magnetolipossomas. O equipamento utilizado foi um Litesizer 500 da Anton Paar, equipado com um laser de 648 nm e 40 mW. Para cada amostra foi realizada uma medição de 100 *runs*.

As medições de difração de raios-X (XRD) permitiram estudar a composição estrutural e a estrutura cristalina das nanopartículas obtidas. Os difratogramas de raios-X foram obtidos num difratómetro convencional PAN'alytical X'Pert PRO (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, Reino Unido), operando com radiação $\text{CuK}\alpha$ e com configuração Bragg-Brentano existente na UTAD.

As medidas magnéticas foram realizadas num magnetómetro de dispositivo de interferência quântica supercondutor (SQUID), modelo Magnetometer Quantum Design MPMS5XL (Quantum Design Inc., San Diego, CA, EUA), existente no CEMUP, usando campos magnéticos aplicados de até 5,5 T. A dependência da magnetização com a temperatura foi medida na faixa de temperatura de 5 K a 380 K. As curvas foram obtidas ao arrefecer a amostra sob um campo magnético aplicado de $H = 100$ Oe (este processo é chamado de FC do inglês, field cooled) e depois foi medido a sua magnetização com aumento da temperatura (campo aplicado de $H = 50$ Oe). Posteriormente, após atingir 380 K, a amostra foi novamente arrefecida, desta vez sem um campo magnético aplicado (este processo é chamado de ZFC do inglês, zero-field-cooled) e as medições de magnetização foram realizadas novamente com o aumento da temperatura, sob o mesmo campo magnético de $H = 50$ Oe. A partir do comportamento das curvas FC e ZFC, a temperatura de bloqueio (TB) das nanopartículas superparamagnéticas foi obtida. As

medições do *loop* de histerese de magnetização foram feitas ao fixar a temperatura e medindo a magnetização em uma série de diferentes campos magnéticos aplicados. Este tipo de estudo fornece informações sobre a magnetização máxima e o grau em que a amostra permanece magnetizada quando o campo aplicado é removido, e quão facilmente a magnetização da amostra pode ser revertida, o chamado campo coercivo.

II.5. Avaliação do efeito fototérmico

No estudo do efeito fototérmico foi feita uma montagem caseira, de forma a medir o espectro de absorção dos SMLs marcados com a sonda de Reichardt irradiados ao longo do tempo [9]. A aquisição dos espectros de absorção foi feita com um espectrofotômetro de fibra ótica CCD compacto (CCS100 Thorlabs Inc., Newton, NJ, EUA), com um modo de operação num intervalo de comprimentos de onda entre os 350 e os 700 nm, $\Delta\lambda < 0,5$ nm e fendas de 20 μ m, usando uma lâmpada de halogênio de 75 W. As medidas foram realizadas no software Thorlabs SPLICCO, versão 4.0, com um tempo de aquisição de 20 ms e 100 *average*, e foi usada água como referência. Os resultados obtidos do software foram processados pela seguinte equação de absorção.

$$Abs = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (1)$$

Abs - Absorbância

I - Intensidade

I₀ – Intensidade Inicial

A configuração experimental está representada na figura 8. Esta montagem consistiu numa fonte de irradiação: (a) uma lâmpada de arc xenon (200 W) com um filtro corte de comprimentos de onda abaixo de 600 nm, ou (b) um laser contínuo de comprimento de onda de 808 nm e 1 W de potência. Desta forma, apenas as nanopartículas de ouro absorvem a radiação, com mínima excitação da sonda de Reichardt. A solução contendo magnetolipossomas com a sonda de Reichardt foi dividida em três amostras de igual volume, de forma a garantir as mesmas condições experimentais em todos os ensaios. Para cada amostra foram feitos três ensaios independentes, dois de irradiação (com lâmpada ou laser) e um de referência (aquecimento por banho-maria). Em todos os ensaios, os espectros de absorção foram adquiridos de 5 em 5 minutos.

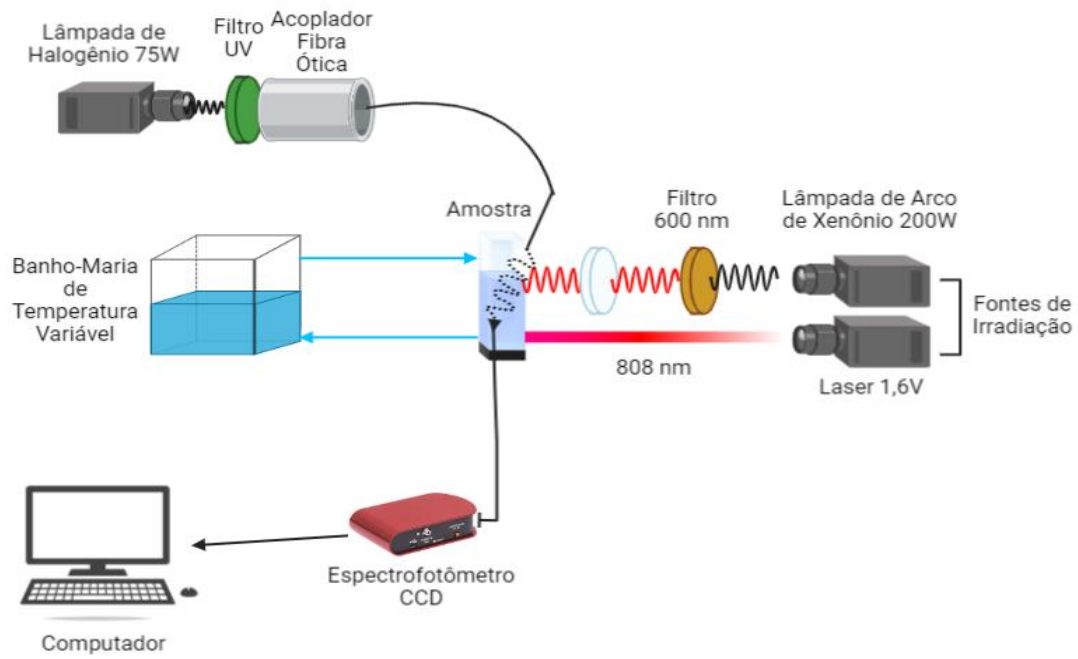


Figura 8. Representação esquemática do *setup* experimental das medições do efeito fototérmico.

III. Resultados e discussão

III.1. Caracterização das nanopartículas magnetoplasmônicas

III.1.1. Caracterização das nanopartículas de ferrite de manganês

A caracterização estrutural das nanopartículas magnéticas de MnFe_2O_4 foi efetuada por espectroscopia de absorção UV-Vis, XRD e SEM. As propriedades magnéticas foram adquiridas num magnetómetro SQUID. Na figura 9 observa-se um largo espectro de absorção característica de óxidos metálicos que confirmou a síntese das nanopartículas para ambas as nanopartículas sintetizadas. As nanopartículas A apresentaram uma banda larga. Sensivelmente entre os 350 e os 600, enquanto para as nanopartículas B foi possível verificar uma banda mais estreita e melhor definida entre os 350 e os 450. Todas as amostras foram medidas para concentrações de nanopartículas iguais, de forma a manter o fator de diluição.

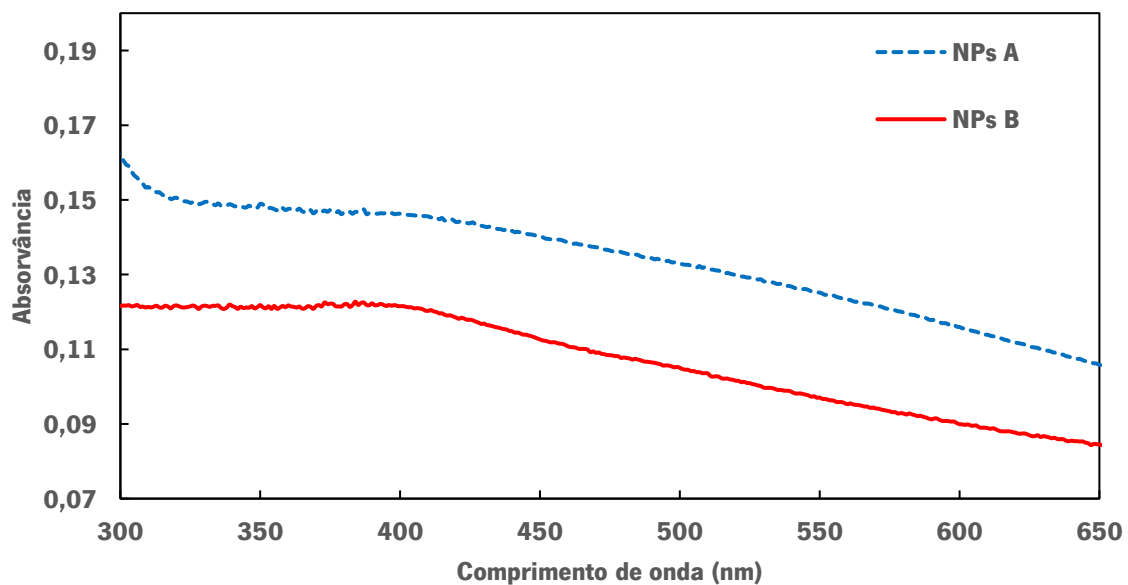


Figura 9. Espectros de absorção em UV-Vis das nanopartículas **A** e **B** em água.

Foi feito um estudo da cinética de sedimentação das nanopartículas **A** e **B** em água de forma a aferir acerca da sua estabilidade em solução. Para isso, a absorvância das nanopartículas foi medida ao longo do tempo e os gráficos obtidos estão apresentados na figura 10. De forma geral, as nanopartículas apresentam boa estabilidade em água já que ocorreu apenas uma perda aproximada de 0,05 na absorção durante uma hora [31].

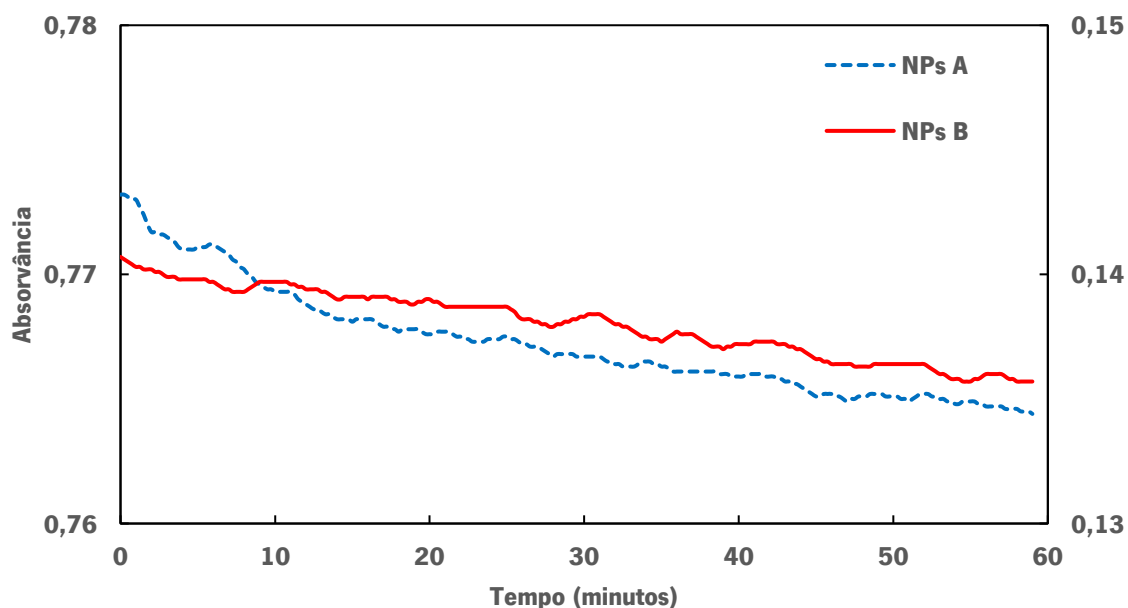


Figura 10. Taxa de deposição das nanopartículas (NPs) em água.

Os resultados SEM das nanopartículas após a calcinação estão representados na figura 11. Não é possível identificar a sua estrutura no SEM já que o seu tamanho estimado é de 10 nm [23,24].

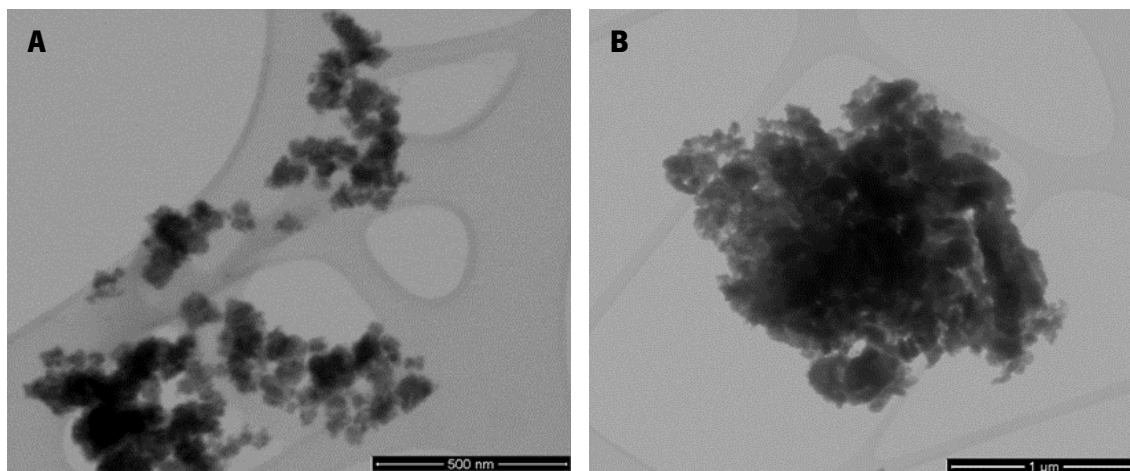


Figura 11. Imagens SEM **A.** Das nanopartículas A após calcinação (escala: 500nm). **B.** Das nanopartículas B após calcinação (escala: 1µm).

Os resultados XRD das nanopartículas **A** e **B** calcinadas confirmaram a síntese de nanopartículas cristalinas de ferrite de manganês e os respectivos difratogramas estão apresentados nas figuras 12 e 13. Os dados obtidos foram analisados no software MATCH!, tendo sido feita uma análise Rietveld. Os dados obtidos foram ajustados a difratogramas da base de dados através da importação dos ficheiros CIF nr. 1528316 (Fd-3m) para as nanopartículas **A** e CIFs nr. 2300619 (Fd-3m) e nr. 9015696 (R-3c) para as nanopartículas **B**. Estes ajustes permitiram estimar a composição e o tamanho das nanopartículas

obtidas. Os dados obtidos estão sintetizados na tabela 1. Os resultados obtidos revelaram uma amostra pura para as nanopartículas **A**, com tamanhos estimados de 40 nm. Para a amostra **B** foi possível obter 79,8 % de ferrite de manganês com tamanhos estimados de 64 nm e com uma composição elementar típica para este tipo de ferrites e 20,2 % de hematite [23,24].

Na figura 12 está representado a difratograma das nanopartículas **A**, onde todos os picos correspondentes a uma estrutura cristalina de ferrite de manganês foram indexados. Os picos de difração obtidos e o respectivo plano de crescimento, estão devidamente identificados pelos índices de Miller entre parênteses, nomeadamente: $2\theta = 29,94^\circ$ (202), $35,23^\circ$ (311), $42,81^\circ$ (400), $53,05^\circ$ (422), $56,53^\circ$ (511) e $62,06^\circ$ (404) [44].

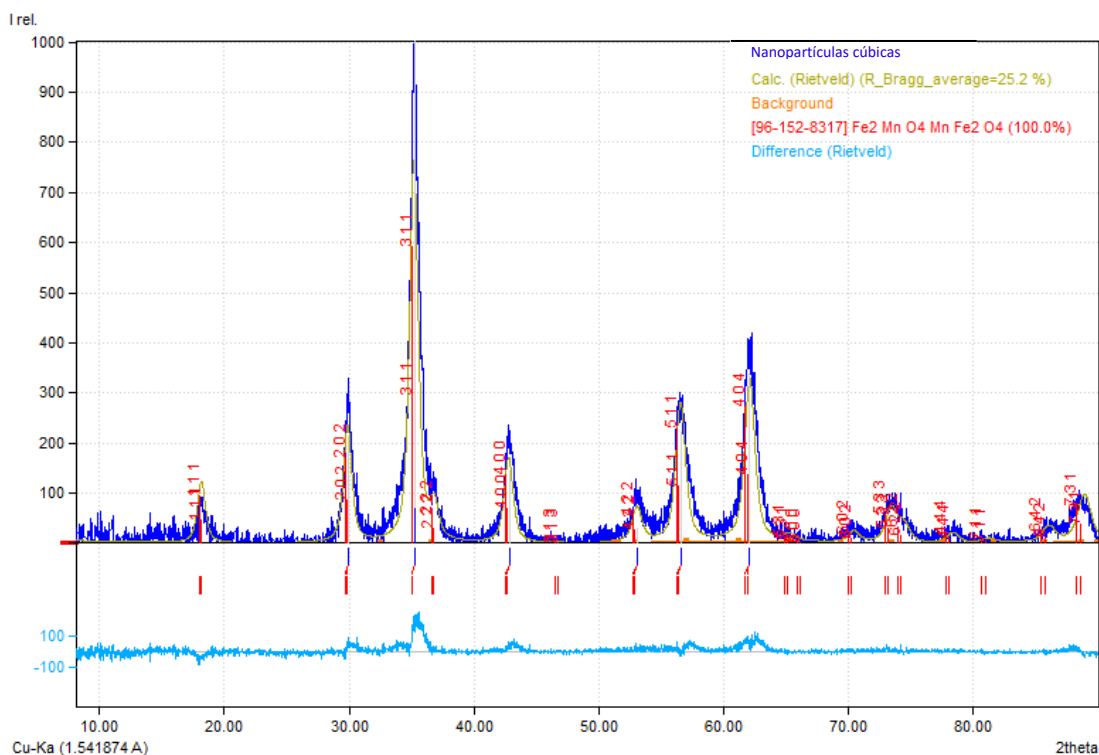


Figura 12. Padrão de difração de raios-X das nanopartículas **A**.

Na figura 13 está representado a análise XRD das nanopartículas **B**. Neste difratograma foi possível identificar picos correspondentes a duas estruturas cristalinas, nomeadamente ferrites de manganês e hematite. Os picos de difração da estrutura cristalina de ferrite de manganês estão indexados a vermelho e identificados pelos respectivos índices de Miller, nomeadamente a $2\theta = 30,23^\circ$ (202), $35,64^\circ$ (311), $43,32^\circ$ (400), $57,31^\circ$ (511) e $62,94^\circ$ (404). Os picos de difração da Fe_2O_3 estão indexados a verde, a $2\theta = 33,16^\circ$ (104), $35,64^\circ$ (100), $43,32^\circ$ (202), $54,06^\circ$ (116) e $57,31^\circ$ (212). Todos os picos foram indexados para cada plano de crescimento. Assim, é possível concluir que as nanopartículas B

apresentam impurezas, neste caso hematite, que pode ser justificada por alguma contaminação durante o processo de síntese e calcinação [45,46].

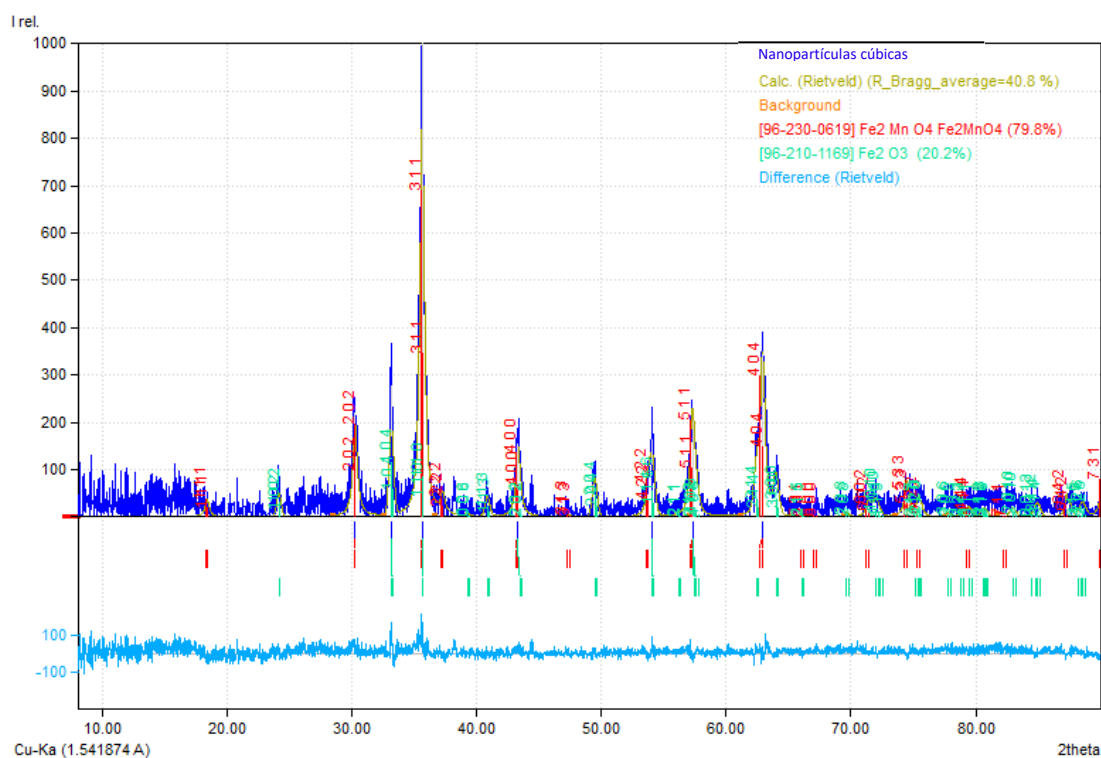


Figura 13. Padrão de difração de raios-X das nanopartículas **B**.

Tabela 1. Parâmetros de Rietveld selecionadas das nanopartículas **A** e **B**: Tamanho, Composição elemental, pureza, estrutura cristalina e células.

	Tamanho (Å)	Composição elemental	Pureza	Estrutura cristalina	Célula unitária (Å)
Nanopartículas A	400,1	Fe (48,43 %) O (27,75 %) Mn (23,82 %)	Fe ₂ MnO ₄ (100 %)	Cúbica	8,498 (a)
Nanopartículas B	647,5	Fe (52,78 %) O (28,22 %)	Fe ₂ MnO ₄ (79,8 %)	Cúbica	8,371 (a)
	729,7	Mn (19,00 %)	Fe ₂ O ₃ (20,2 %)		

As propriedades magnéticas das nanopartículas dependem do método de síntese e do tamanho e forma das nanopartículas [37]. A caracterização magnética das nanopartículas **A** e **B** foram feita por SQUID, através da medição da magnetização em função do campo aplicado, o chamado ciclo de histerese. Para verificar o efeito da atmosfera controlada no processo de calcinação nas propriedades magnéticas das nanopartículas, foram medidos os ciclos de histerese das nanopartículas **B** obtidas com calcinação feita com e sem atmosfera controlada (figura 14). Nesta figura é possível observar uma histerese pequena para ambas as amostras, com um campo coercivo de 15,15 Oe para as nanopartículas **B** calcinadas sob atmosfera controlada e 65,68 Oe para as nanopartículas **B** calcinadas na presença de oxigênio. Contudo, apenas as nanopartículas **B** calcinadas em atmosfera controlada exibiram um comportamento superparamagnético, já que a razão entre a magnetização remanescente, M_r , e a magnetização de saturação, M_s , foi menor do que 0,1. Isto indica que mais de 90% da magnetização induzida foi perdida após a retirada do campo magnético externo. Por outro lado, as nanopartículas **B** calcinadas sem controle de atmosfera apresentam uma razão superior a 0,1 pelo que apresentam um comportamento ferromagnético (Tabela 2.) [14]. Apesar de um campo aplicado elevado de 5,5 T, as nanopartículas **B** calcinadas na ausência de atmosfera controlada apresentam uma magnetização de saturação baixa no valor de 3,66 emu/g, enquanto as nanopartículas **B** calcinadas sob atmosfera controlada apresentam uma elevada magnetização de saturação de 49,79 emu/g (Figura 14). Esta grande diferença pode ser atribuída à presença de oxigênio no processo de calcinação das nanopartículas **B** calcinadas na ausência de atmosfera controlada, o que pode levar a uma oxidação da superfície e consequente diminuição da sua magnetização [38].

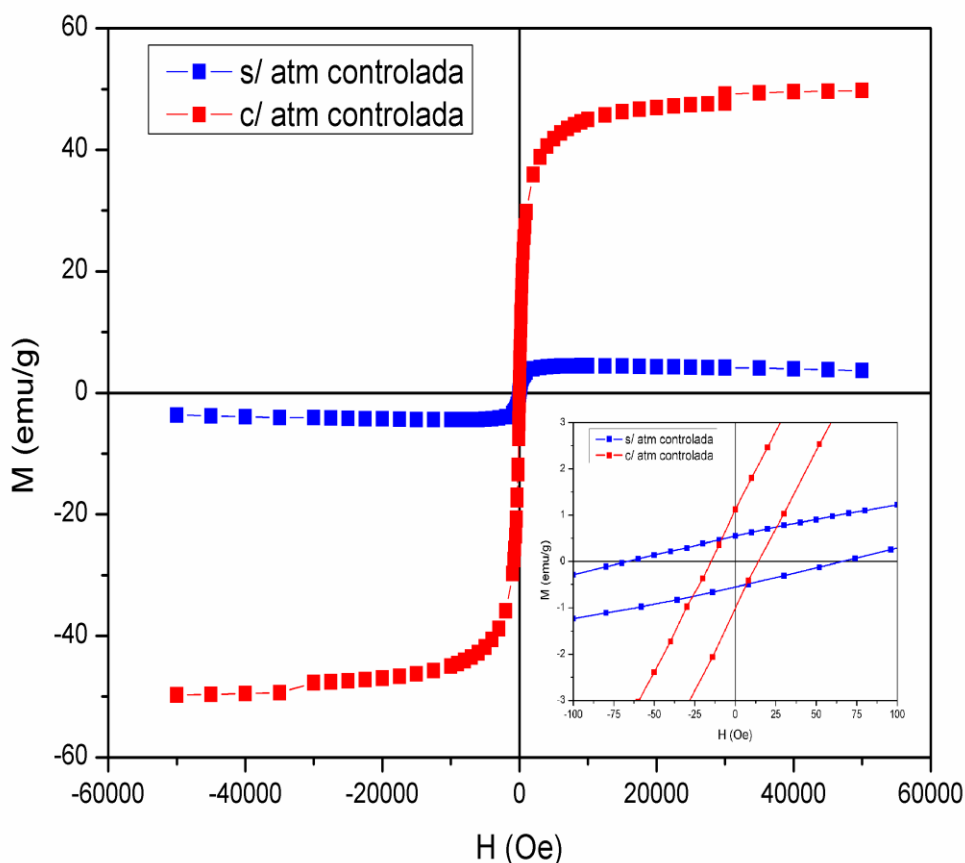


Figura 14. Ciclo de histerese das nanopartículas **B** calcinadas sob atmosfera controlada e na ausência de atmosfera controlada, à temperatura ambiente. Inserção: Ampliação na região de baixo campo.

Tabela 2. Campo coercivo (H_c), magnetização de saturação (M_s), magnetização remanescente (M_r) e razão M_r/M_s para as nanopartículas **B** calcinadas sob atmosfera controlada e sem atmosfera controlada, à temperatura ambiente.

	H_c (Oe)	M_r (emu/g)	M_s (emu/g)	M_r/M_s
NPs B calcinadas sob atmosfera controlada	15,15	1,12	49,79	0,022
NPs B calcinadas na ausência de atmosfera controlada	65,68	0,55	3,66	0,150

As propriedades magnéticas das nanopartículas A e B foram caracterizadas. A figura 15 representa o gráfico de histerese resultante.

Na figura 15 é possível observar uma histerese pequena para ambas as amostras, com um campo coercivo de 9,46 Oe para as nanopartículas A e 15,15 Oe para as nanopartículas B (Tabela 3). Como esperado pela literatura, ambas as nanopartículas exibiram um comportamento superparamagnético, já que a razão entre a magnetização remanescente, M_r , e a magnetização de saturação, M_s , foi menor do que 0,1. Isto indica que mais de 90% da magnetização induzida foi perdida após a retirada do campo magnético externo. Apesar de um campo aplicado elevado de 5,5 T, as nanopartículas A apresentam uma magnetização de saturação no valor de 14,56 emu/g, enquanto as nanopartículas B magnetização de saturação de 49,79 emu/g, sendo os valores das nanopartículas A inferiores ao esperado pela literatura [23]. Esta baixa magnetização de saturação pode ser devido a contaminações presentes na amostra ou algum erro de medição experimental. Por outro lado, as nanopartículas B demonstram valores de magnetização de saturação equivalentes à literatura [24].

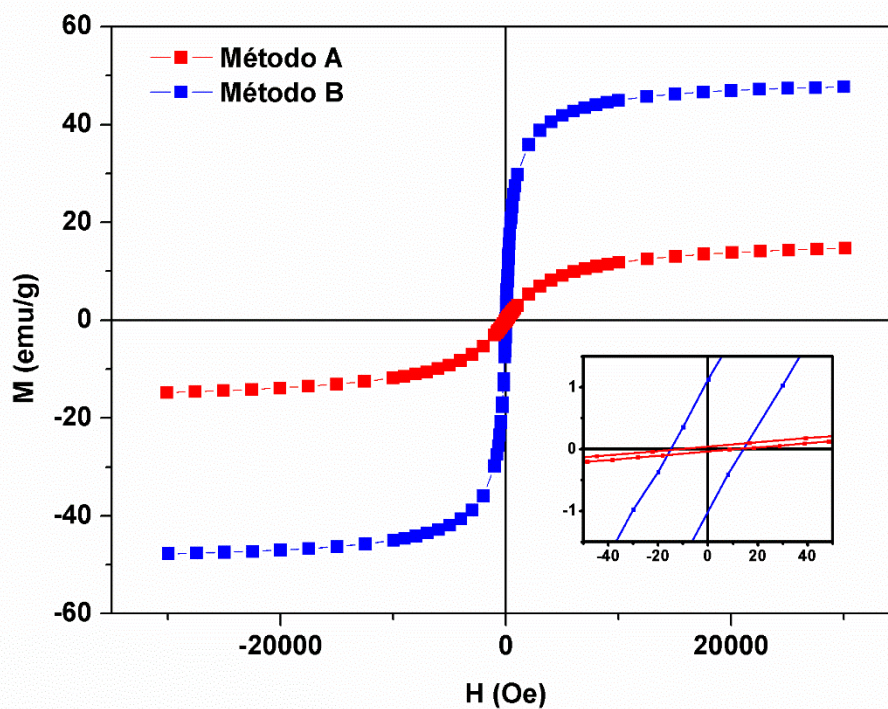


Figura 15. Ciclo de histerese das nanopartículas A e B, à temperatura ambiente.

Tabela 3. Campo coercivo (H_c), magnetização de saturação (M_s), magnetização remanescente (M_r) e razão M_r/M_s para as nanopartículas A e B.

	H_c (Oe)	M_r (emu/g)	M_s (emu/g)	M_r/M_s
Método A	9,46	0,04	14,75	0,003
Método B	15,15	1,12	49,79	0,022

III.1.2. Formação de *clusters* magnéticos baseados nas nanopartículas A e B

A formação de aglomerados das nanopartículas **A** e **B** em estruturas do tipo *cluster* foi promovida tendo em conta as possíveis alterações das propriedades magnéticas coletivas. Efetivamente, tem sido demonstrado que o agrupamento de nanopartículas magnéticas em *clusters* induz um aumento significativo do momento magnético total, o que por sua vez pode influenciar de forma positiva o seu desempenho enquanto agentes para hipertermia magnética [49,50].

A formação dos *clusters* baseados nas nanopartículas **A** e **B** foi confirmada pelos espectros de absorção apresentados na figura 16. Para o efeito, o espectro de absorção das nanopartículas foi medido imediatamente antes e depois da formação de *clusters*, mantendo a concentração das nanopartículas igual nas duas medidas. Para ambas as nanopartículas, é possível observar que após a formação dos agregados a banda larga típica de óxidos metálicos é substituída por um espectro de maior dispersão (figura 16, A e B). Isto é devido ao maior tamanho das estruturas em *cluster* que dispersam mais luz devido ao aumento de tamanho. Por outro lado, é previsível uma perda de estabilidade em água dos *clusters* maiores. Os *clusters* baseados nas nanopartículas **B** apresentam maior absorção e maior dispersão em maiores comprimentos de onda, indicando uma maior estabilidade em água quando comparado com os *clusters* baseados nas nanopartículas **A** [31,32].

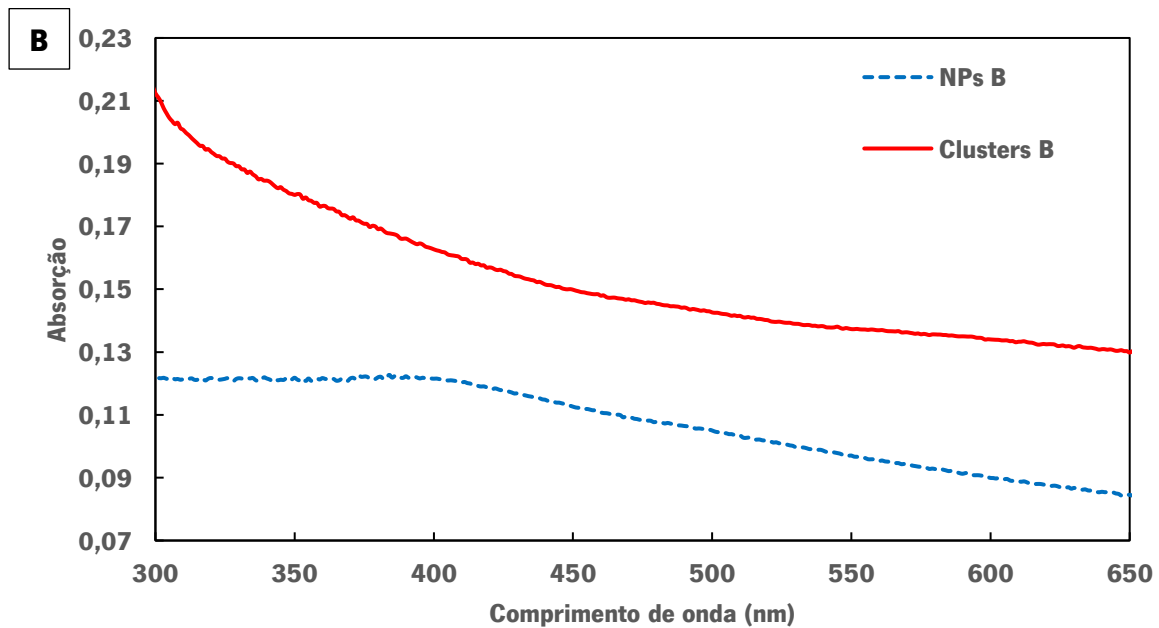
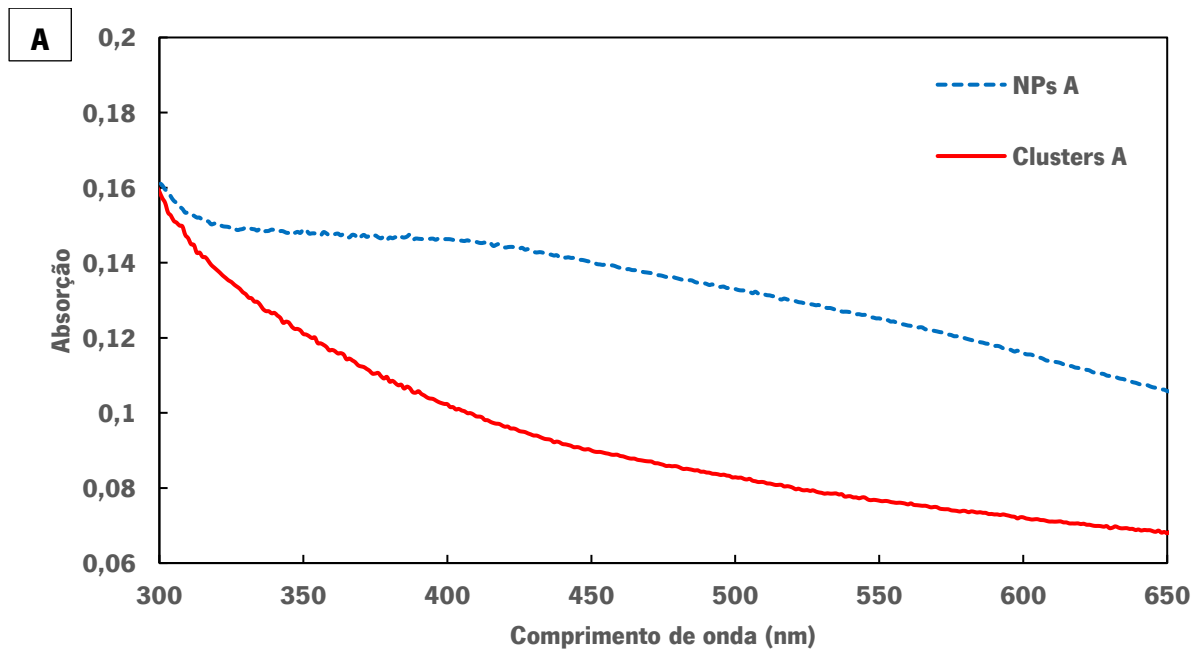


Figura 16. Espectros de absorção das (A) nanopartículas **A** e respectivos *clusters* em água. (B) nanopartículas **B** e respectivos *clusters* em água.

Através das imagens SEM é possível visualizar a formação dos *clusters* (figura 17). É observável agregados de nanopartículas resultantes da funcionalização das nanopartículas com MSA [25]. Estes *clusters* apresentam tamanhos entre 100 e 300 nm, ideais para aplicações biológicas.

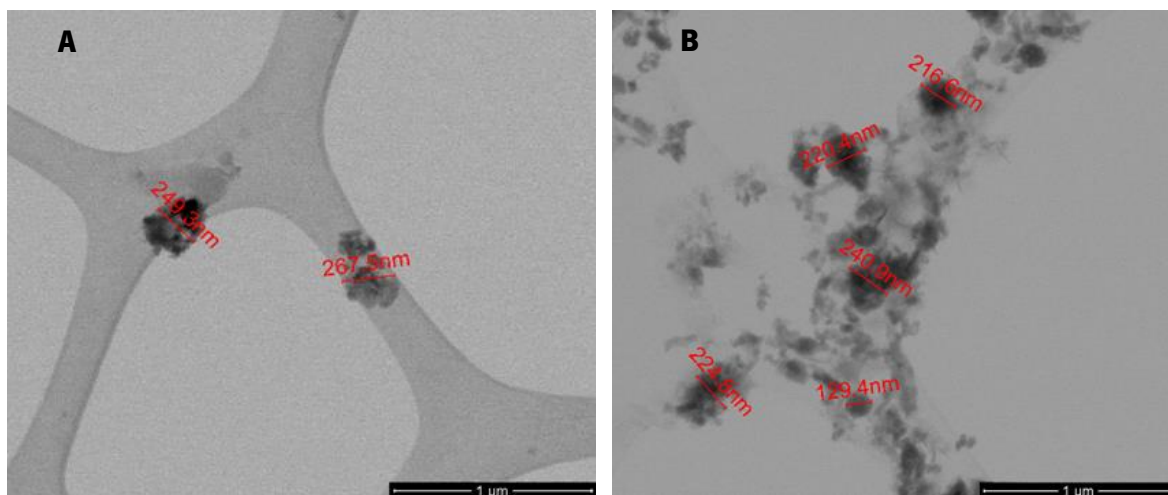


Figura 17. Imagens SEM **A.** Dos *clusters* das nanopartículas A (escala: 1 μm). **B.** Dos *clusters* das nanopartículas B (escala: 1 μm).

III.1.3. Caracterização das nanopartículas magnético-plasmónicas

A formação das estruturas do tipo *clusters* decorados com bolinhas de ouro foi obtida pelo acoplamento de nanopartículas plasmónicas de ouro aos *clusters* magnéticos de ferrite de manganês, conforme descrito no capítulo anterior. O sucesso do acoplamento foi confirmado por espectroscopia de absorção UV-Vis e NIR, pelos gráficos apresentados na figura 18. Foi pretendido manter concentração de *clusters* igual ao longo de todo o processo para facilitar a comparação entre espectros sem influência de fatores de diluição, mas é possível que tenha ocorrido perda de material durante as lavagens.

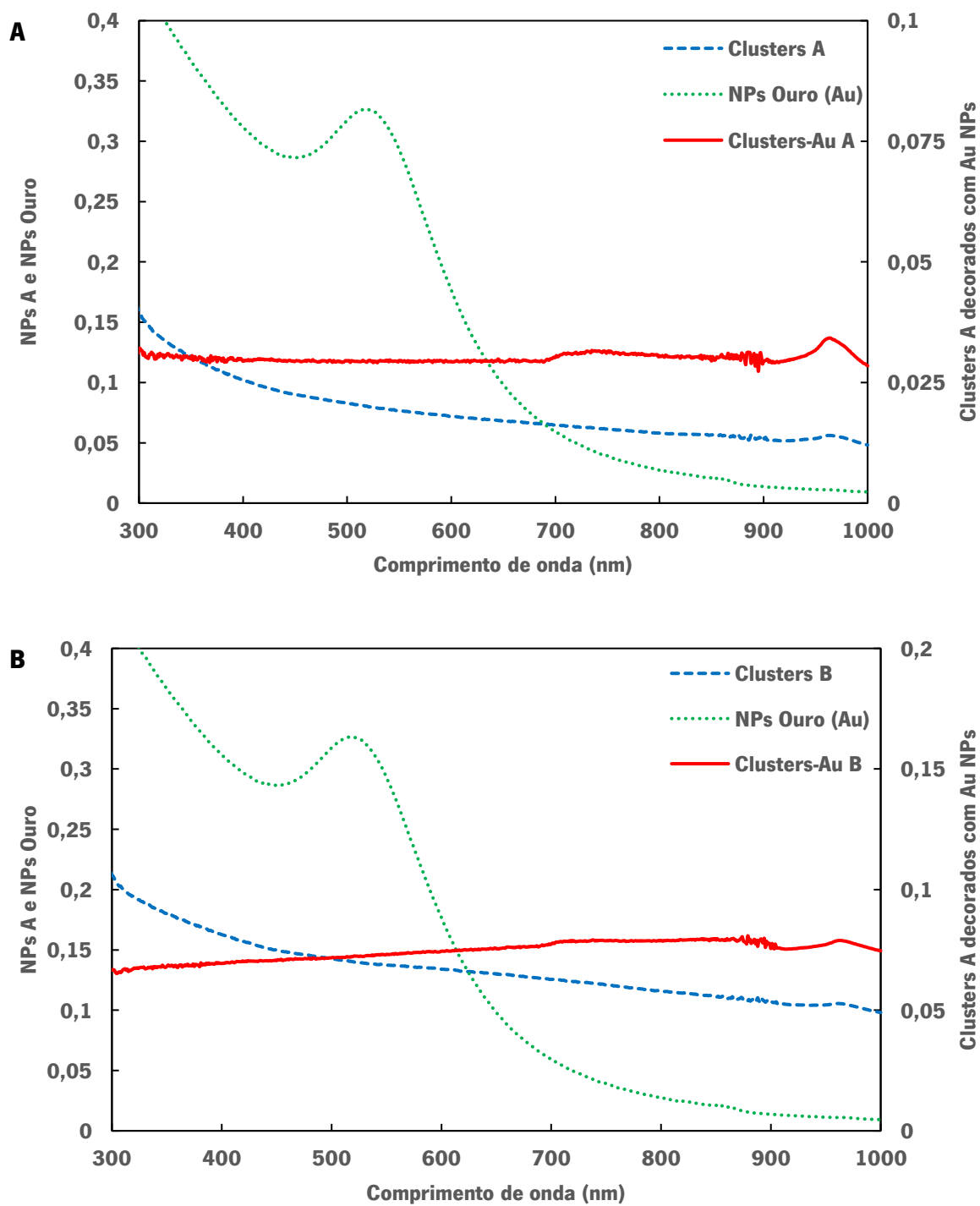


Figura 18. Absorvância das nanopartículas: **(A)** *clusters A* (água), plasmónicas (tolueno) e magnético-plasmónicas baseadas em nanopartículas **A** (água), e **(B)** *clusters B* (água), plasmónicas (tolueno) e magneto-plasmónicas baseadas em nanopartículas **B** (água).

Através da observação e comparação dos espectros da figura 18, é possível concluir o acoplamento das nanopartículas de ouro à superfície dos *clusters* de ferrites de manganês. O espectro de absorção das nanopartículas de ouro sintetizadas apresenta uma banda larga à volta dos 600 nm, típica para nanopartículas esféricas com tamanhos de cerca de 100 nm [51]. Tendo em conta o intervalo de comprimentos de onda da banda de absorção das nanopartículas de ouro e os espectros das nanopartículas magnéticas **A** e **B** com, verifica-se um aumento da absorvância na zona da banda de ressonância plasmónicas do ouro (entre os 500 nm e os 900 nm) para os espectros de absorção das estruturas de *clusters* **A** e **B** decoradas com nanopartículas de ouro. Assim, o aumento da intensidade de absorção nesta zona indica a existência das nanopartículas de ouro na superfície dos *clusters* das ferrites de manganês. O facto de a zona de absorção das nanopartículas de ouro estar muito alargada dever-se-á à grande proximidade entre elas quando acopladas à superfície dos *clusters*. É possível que no processo de acoplamento com as NPs de ouro aos *clusters* de ferrites de manganês se percam algumas das ligações S-S entre as NPs de $MnFe_2O_4$. Isso pode levar a uma diminuição da absorvância dos clusters por estes diminuírem de tamanho.

Nos resultados SEM é possível observar pequenos pontos escuros acima dos *clusters* (figura 19), ou seja, é a indicação do acoplamento das nanopartículas de ouro aos aglomerados de ferrite manganês [34].

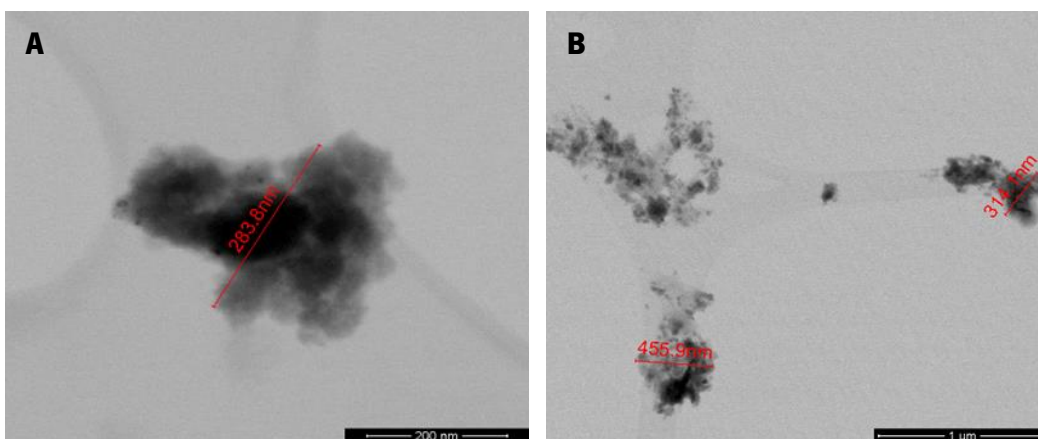


Figura 19. Imagens SEM **A.** Dos *clusters* A com nanopartículas de ouro acopladas (escala: 1 μ m). **B.** Dos *clusters* B com nanopartículas de ouro acopladas (escala: 200nm).

Posteriormente, as nanopartículas de ouro acopladas à superfície serviram como sementes para o crescimento da coroa de ouro, de forma a obter as nanopartículas do tipo núcleo-coroa baseadas em coroa de *clusters* de ferrites de manganês e coroa de ouro [27]. Neste processo, o crescimento da coroa de ouro foi acompanhado por espectroscopia de absorção. Para o efeito, após a adição do ácido

cloroáurico (HAuCl_4), foi retirado um espectro de absorção em intervalos de 5 minutos até à estabilização do crescimento (figura 20, A e B).

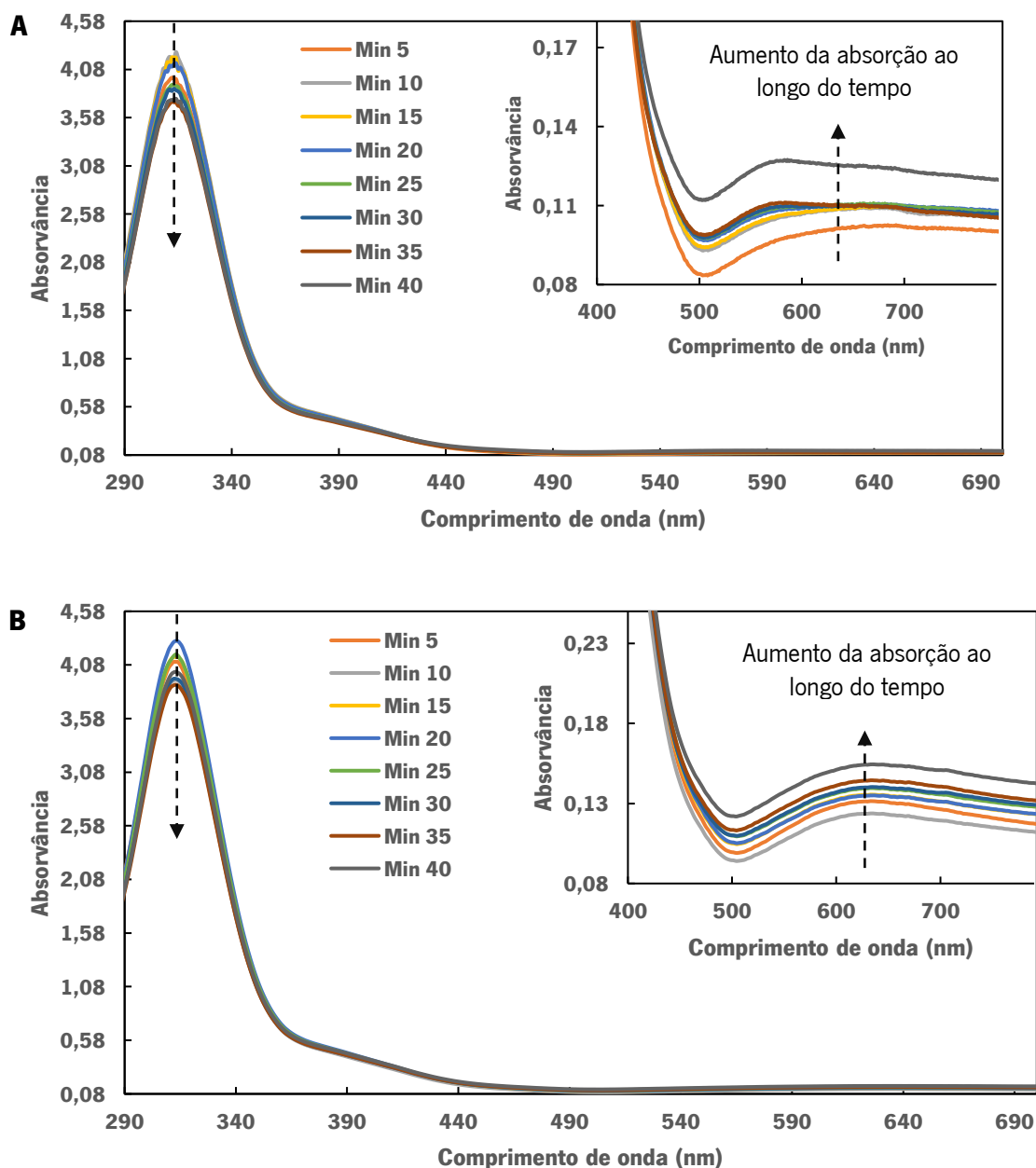


Figura 20. Espectros de absorção das nanopartículas em estrutura núcleo-coroa ao longo do tempo, após adição do ácido cloroáurico (0,725 mM) em água. **(A)** nanopartículas de núcleo de ferrites de manganês **A** com coroa de ouro. **(B)** nanopartículas de núcleo de ferrites de manganês **B** com coroa de ouro.

A monitorização do crescimento da coroa de ouro permitiu observar um aumento da absorção na zona da banda do plasmão (≈ 650 nm) ao longo do tempo. Desta forma é evidenciado o aumento da faixa SPR do ouro com a adição de Au^{3+} , dando suporte para o crescimento de uma coroa de ouro formando assim

a estrutura núcleo-coroa) desejada. Por outro lado, é possível observar uma diminuição da absorção da zona do Au^{3+} ($\approx 300\text{nm}$), indicando assim o consumo do Au^{3+} para a formação da coroa de ouro [33].

A camada de ouro que envolve as nanopartículas (coroa) está bem evidenciada nas imagens TEM da figura 21, onde os aglomerados se tornaram homogeneamente negros [35]. Os aglomerados resultantes do crescimento da *shell* nas nanopartículas A apresentam um tamanho aproximado de 300 nm (Figura 21A). Em contrapartida, aglomerados resultantes do crescimento da *shell* nas nanopartículas B (Figura 21B) apresentam um tamanho aproximado de 81 nm (Figura 21B1), o que as torna ideais para aplicações biomédicas [36].

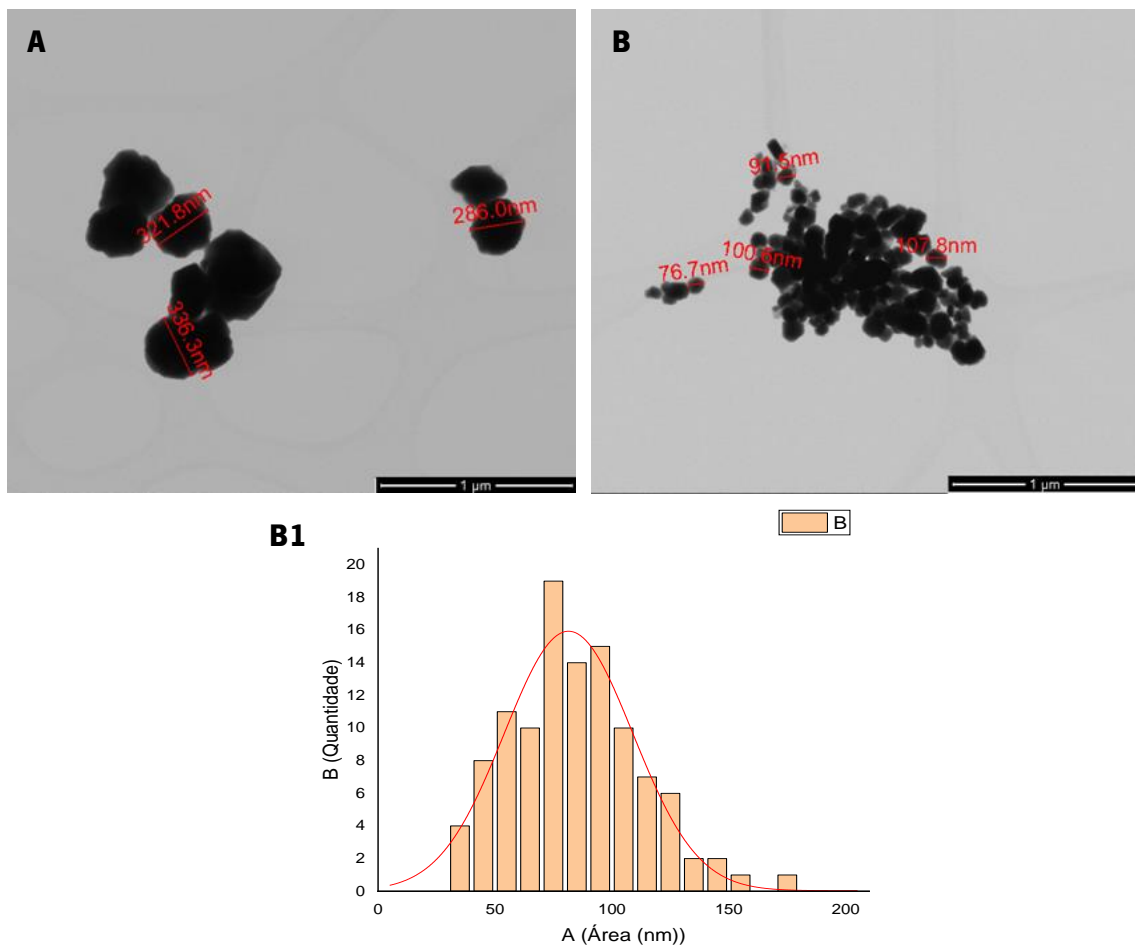


Figura 21. Imagens TEM **A.** *Clusters* das nanopartículas A após o crescimento da *shell* de ouro (escala: 1 μm). **B.** *Clusters* das nanopartículas A após o crescimento da *shell* de ouro (escala: 1 μm). **B1.** Histograma de tamanhos da imagem B e o ajuste a uma distribuição gaussiana.

III.2. Caracterização dos magnetolipossomas

III.2.1. Prova de formação de magnetolipossomas sólidos

Na síntese dos magnetolipossomas (MLs) sólidos, o ODT foi o surfactante selecionado para formar uma primeira camada hidrofóbica envolvendo as nanopartículas magnetoplasmônicas núcleo-coroa. A funcionalização das nanopartículas com coroa de ouro com ODT foi mediada pela grande afinidade de grupos tióis (SH- constituintes das moléculas de ODT) por superfícies de ouro [40]. Após o acoplamento do ODT à superfície do ouro, a estrutura do tipo lipossomas foi fechada após a adição de uma segunda camada lipídica de DPPC.

Para provar a formação da bicamada de surfactante/lípido na superfície das nanopartículas, realizou-se estudos de transferência de energia de ressonância de Förster (FRET). O par doador-aceitador usado neste ensaio foi a sonda fluorescente carboxifluoresceína e o lípido marcado Rodamina B-DOPE, sendo que o primeiro atuou como doador de energia e o segundo como aceitador de energia. Na figura 22, é possível observar a sobreposição espectral entre a emissão da carboxifluoresceína e a absorção da rodamina, condição essencial para a ocorrência de transferência de energia. Além disso, este fenômeno ocorre quando a distância entre os dois fluoróforos é inferior a 10 nm [41]. Neste estudo, a carboxifluoresceína foi ligada quimicamente à superfície de ouro, juntamente com o surfactante ODT, enquanto o lípido DOPE marcado com Rodamina B foi incluído na segunda camada lipídica (Figura 22).

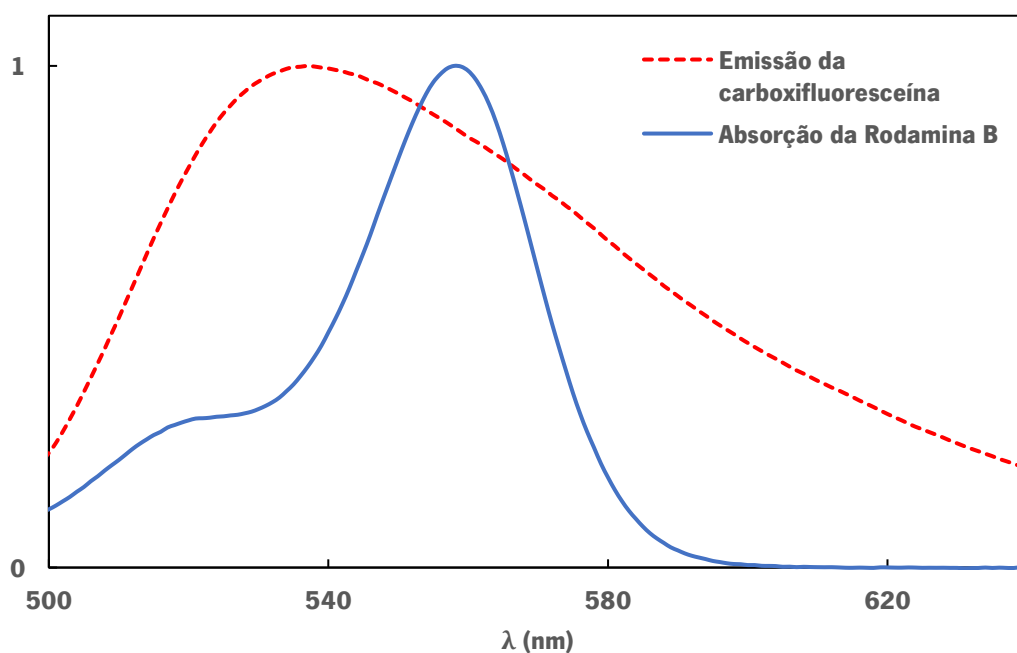
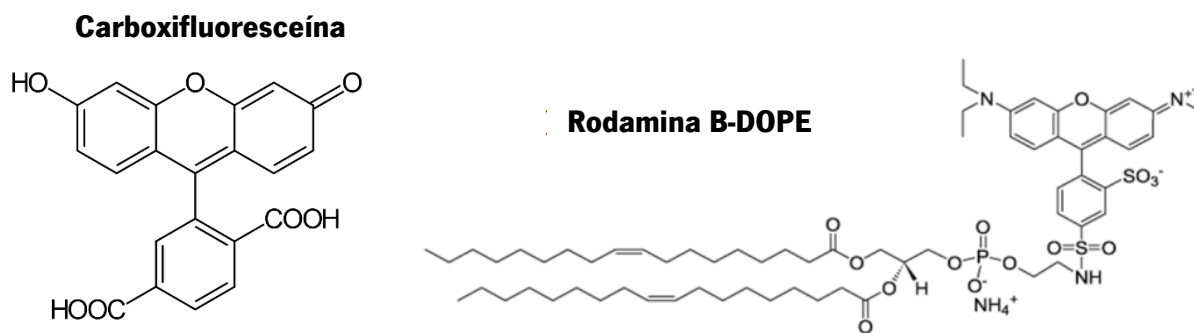


Figura 22. Estrutura química da carboxifluoresceína e da Rodamina B-DOPE. Espectro da sobreposição entre a emissão da carboxifluoresceína e da absorção da rodamina B.

Para este estudo foram preparados três sistemas de magnetolipossomas, um contendo apenas a sonda carboxifluoresceína, outro só com o lípido marcado rodamina b-DOPE e um último contendo os dois marcadores fluorescentes. Os espectros de emissão dos sistemas, excitando apenas o doador ($\lambda_{exc} = 470\text{nm}$), estão apresentados na figura 23.

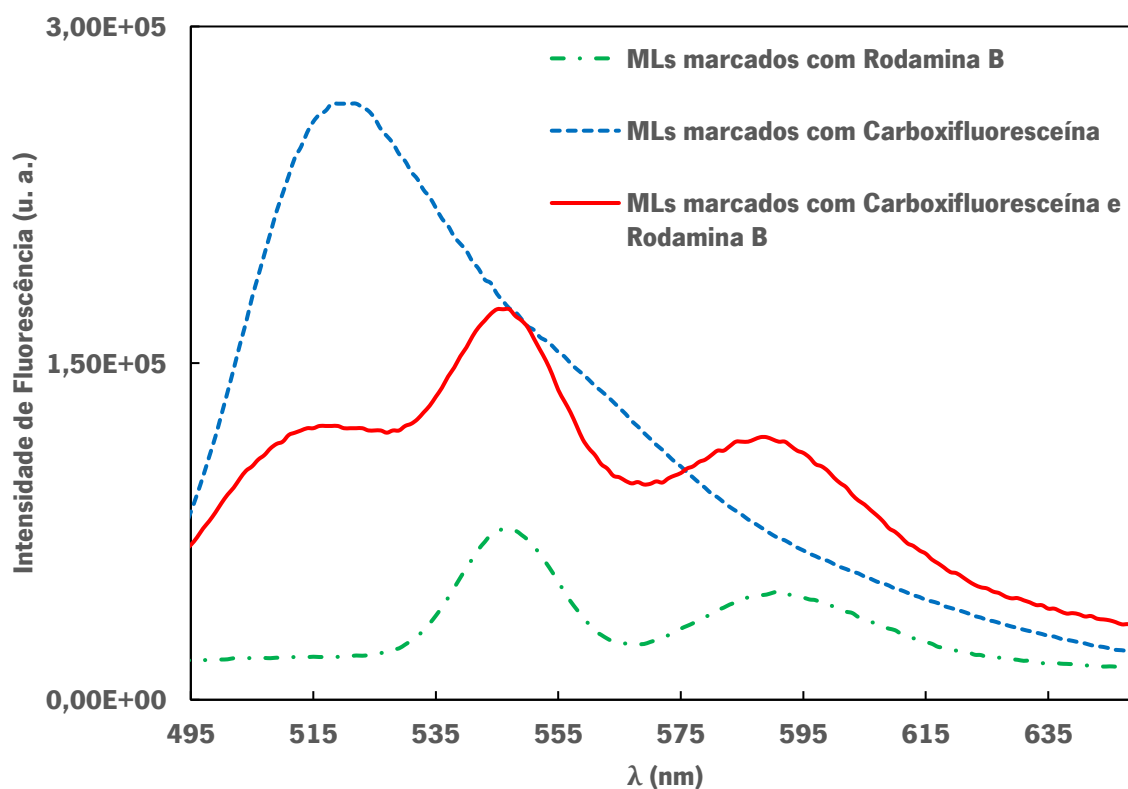


Figura 23. Espectro de fluorescência ($\lambda_{exc} = 470\text{nm}$) dos magnetolipossomas (MLs) marcados apenas com Rodamina B-DOPE, marcados apenas com carboxifluoresceína, e marcados com Rodamina B-DOPE e carboxifluoresceína.

A partir da análise da figura 23, é possível observar que os magnetolipossomas contendo apenas a carboxifluoresceína apresentam uma banda mais intensa do que a dos magnetolipossomas com os dois fluoróforos fluorescência na zona 520 nm. Por outro lado, é possível observar que os magnetolipossomas contendo apenas o lípido DOPE marcado com Rodamina B apresentam a uma banda de fluorescência na zona dos 590 nm que tem intensidade inferior aos magnetolipossomas contendo os dois fluoróforos. Assim, é possível verificar a transferência de energia entre a carboxifluoresceína e a Rodamina B e consequentemente a formação da bicamada dos magnetolipossomas.

A distância entre o fluoróforo doador e aceitador foi estimada pela eficiência de FRET, através das equações (2), (3) e (4).

$$\Phi_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (2)$$

Φ_{FRET} - Eficiência de FRET
 r - Distância entre doador e aceitante
 R_0 - Raio de Förster

$$\Phi_A = \frac{C_{Ref} \cdot F_A \cdot \eta_A^2}{C_A \cdot F_{Ref} \cdot \eta_{Ref}^2} \cdot \Phi_{Ref} \quad (3)$$

C - Concentração
 F - Área espectral
 Φ - Rendimento quântico de fluorescência
 η - Índice de refração do meio

$$R_0 = 0.2108 \cdot [K^2 \cdot \phi_d^0 \cdot \eta^{-4} \cdot \int_0^\infty I_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda]^{1/6} \quad (4)$$

K^2 - Fator orientacional
 η - Índice de refração do meio
 ϕ_d^0 - Rendimento quântico de fluorescência do doador na ausência de transferência
 $\int_0^\infty I_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda$ - espectro de fluorescência normalizado de forma que $\int_0^\infty I_D(\lambda) d\lambda = 1$;
 $\epsilon_A(\lambda)$ - Coeficiente de absorção molar do aceitante

Foi estimada uma eficiência de FRET de 47,5%, o que corresponde a uma distância do doador-aceitador de 2,90 nm. O raio de Förster calculado foi de 2,95 nm, com um rendimento quântico de fluorescência do doador na ausência de aceitador de 0.0074. Este último valor é baixo o que poderá ser devido ao ambiente de proximidade ao ouro que diminui a emissão da sonda. Tendo em conta que uma bicamada apresenta, normalmente, uma espessura entre 4 e 10 nm, os resultados obtidos permitem assumir a formação da bicamada na superfície das nanopartículas núcleo-coroa de ferrites de manganês e ouro [42].

III.2.2. Caracterização dos magnetolipossomas por SEM e DLS

A figura 24 demonstra imagens SEM de magnetolipossomas baseados em nanopartículas de estrutura núcleo-coroa baseadas em núcleo de ferrites de manganês **B** e coroa de ouro. Nesta imagem é possível observar estruturas ovais com tamanhos entre 100 e 400 nm, com bicamadas de espessura entre 21 e 27 nm. Tamanhos inferiores a 200 nm são necessários para aplicações biomédicas o que é o caso em alguns dos magnetolipossomas [39].

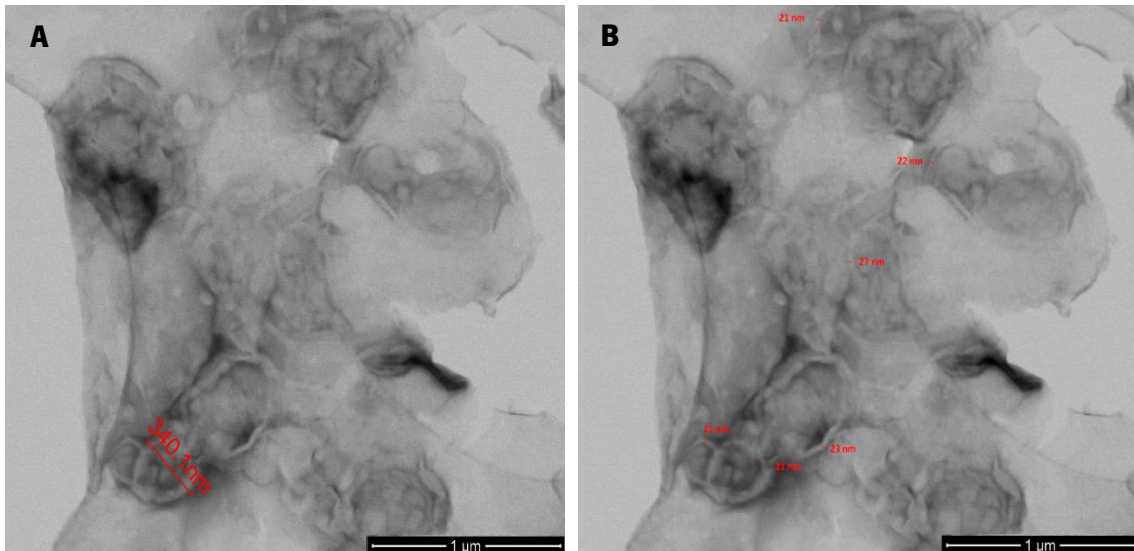


Figura 24. Imagem SEM dos magnetolipossomas baseados em nanopartículas núcleo-coroa das nanopartículas B. **A.** Diâmetro Indicado **B.** Tamanhos das bicamadas indicado.

O tamanho dos magnetolipossomas obtidos foi ainda avaliada pela técnica de DLS. Os valores do tamanho hidrodinâmico e do potencial zeta obtidos estão apresentados na tabela 4. Os tamanhos obtidos estão em concordância com os resultados obtidos por SEM. O potencial zeta baixo medido (<30mv) pode levar à agregação dos sistemas, conforme é observável na figura 24, dificultando a sua caracterização. Para melhorar a estabilidade coloidal dos sistemas, no futuro, poderão ser adicionados lipídios com carga de forma a aumentar o potencial zeta dos magnetolipossomas para promover a repulsão eletrostática. Em solução aquosa, os magnetolipossomas demonstram ser extremamente estáveis, isto indica que não ocorre deposição das mesmas (Figura 25).

Tabela 4. Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta dos magnetolipossomas determinado por DLS.

	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial Zeta (mV)
Magnetolipossomas baseados em nanopartículas núcleo-coroa das nanopartículas B	253,8	14

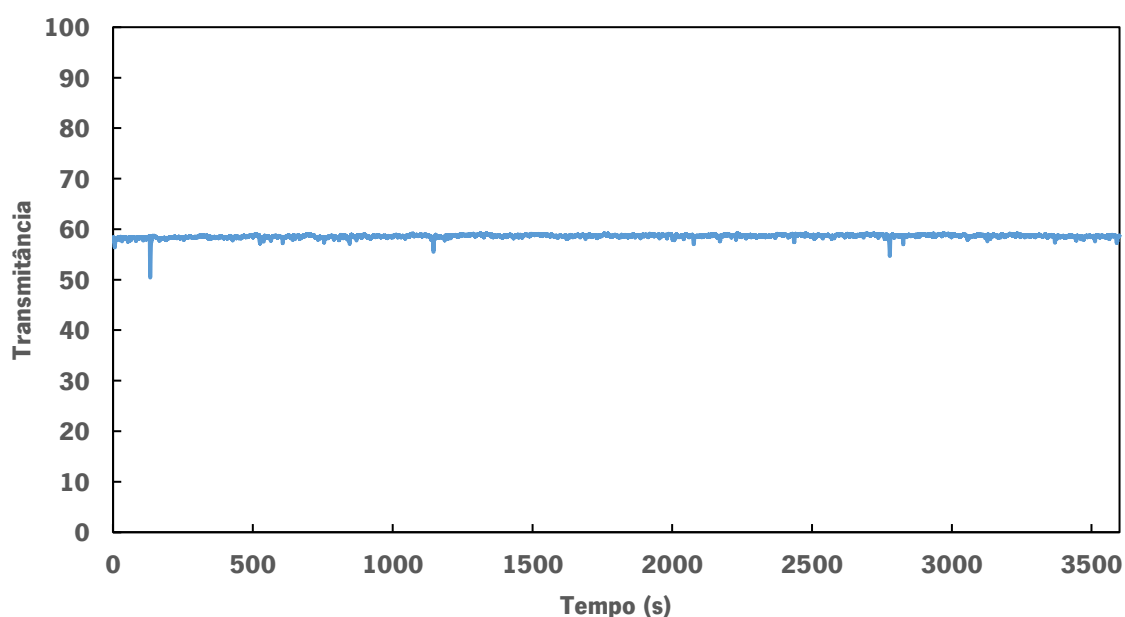
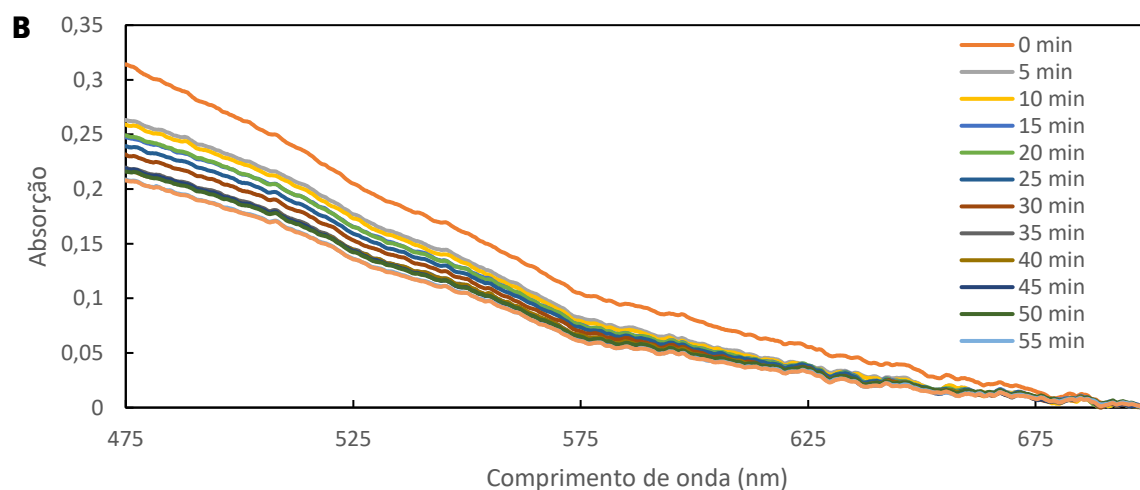
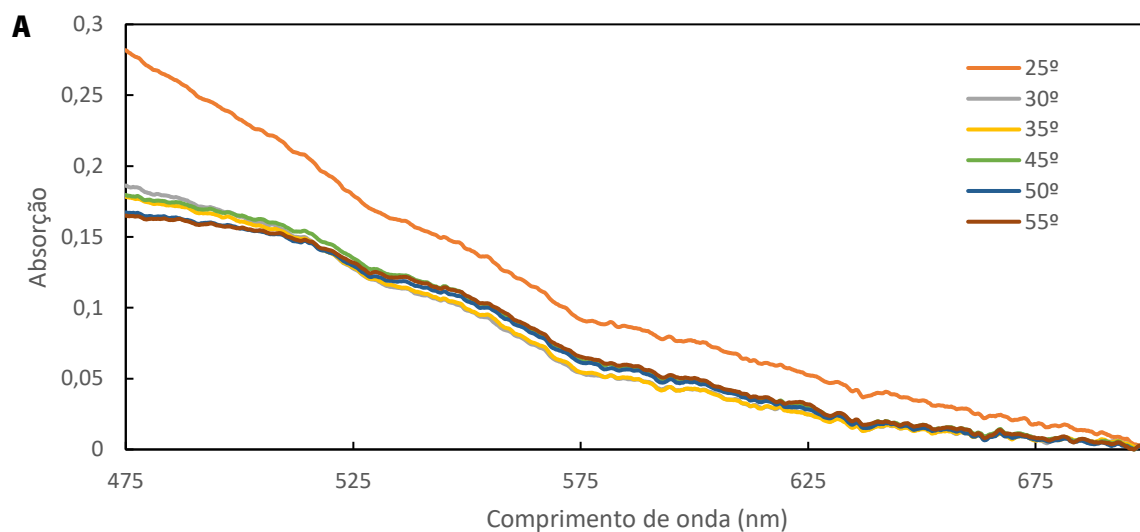


Figura 25. Espectro de transmitância dos magnetolipossomas B ao longo do tempo (1 hora).

III.2.3. Estudos fototérmicos

A capacidade fototérmica dos magnetolipossomas foi avaliada pela variação do espectro de absorção da sonda de Reichardt (incluída na bicamada dos magnetolipossomas), ao longo do tempo de irradiação. Os espectros de absorção foram obtidos numa montagem caseira representada na figura 8. Nestes ensaios foram usadas duas fontes de irradiação (lâmpada ou laser) e a sua capacidade enquanto fonte de produção local de calor foi estudada. Inicialmente, foram realizados três ensaios onde a absorção da sonda Reichardt encapsulada nos magnetolipossomas foi monitorizada ao longo do tempo. Um ensaio em que se utilizou um banho para fazer o aquecimento da solução e de forma a perceber o comportamento da sonda com o aumento da temperatura, que funcionou como branco (figura 26A). Um segundo e terceiro em que a espectro de absorção da sonda Reichardt foi monitorizado ao longo do tempo de irradiação com laser (figura 26B) e ou lâmpada (figura 26C). No ensaio de aquecimento com banho

foi possível observar uma diminuição da banda de absorção com o aumento da temperatura (figura 26A). Assim, é possível prever um aquecimento gerado pelos magnetolipossomas nos gráficos da figura 26B e 26C, onde é observável uma diminuição da banda de absorção ao longo do tempo de irradiação.



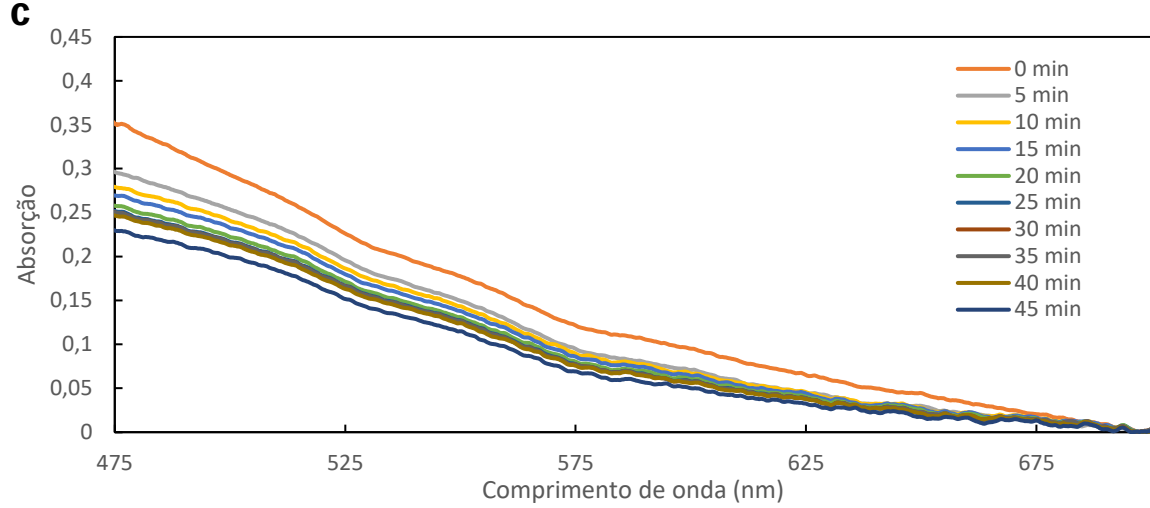


Figura 26. Gráficos de absorção **A.** dos SMLs contendo sonda Reichardt com o aumento da temperatura da solução. **B.** dos SMLs contendo sonda Reichardt com a irradiação do laser ao longo do tempo. **C.** dos SMLs contendo sonda Reichardt com a irradiação da lâmpada ao longo do tempo.

Para cada sistema, a fim de modelar as variações, os espectros de absorção foram globalmente ajustados com uma soma de oito funções gaussianas, restritas a uma sequência de zonas espectrais.

As equações usadas foram as seguintes:

$$g_j(\lambda) = \frac{1}{\sigma_j \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{\lambda - \lambda_{max,i}}{\sigma_j} \right)^2} \quad (5)$$

$$Abs(\lambda, T_i) = A_{disp}(\lambda, T_i) + A(T_i) \sum_{j=1}^8 f_j g_j(\lambda) \quad (6)$$

$$A_{disp}(\lambda, T_i) = A_{offset}(T_i) + \frac{A_d(T_i)}{(\lambda/100)^4} \quad (7)$$

$$f_1(T_i) = \frac{1}{(1 + (a_j + b_j) + c_j^2)^2} \quad j = 2, 3, \dots, 7; T_0 = 25^\circ C \quad (8)$$

$$f_j(T_i) = \left(1 - \sum_{k=1}^{j-1} f_k \right) \frac{1}{(1 + (a_j + b_j) + c_j^2)^2} \quad j = 2, 3, \dots, 7 \quad (9)$$

$$f_8(T_i) = \left(1 - \sum_{k=1}^{j-1} f_k \right) \quad (10)$$

$$A(T_i) = \frac{A}{(1 + (a_0 + b_0) + c_0^2)^2} \quad (11)$$

A fim de controlar o procedimento de ajuste, os parâmetros das funções gaussianas foram restringidos da seguinte forma:

$$\lambda_{max,j} = (\lambda_{max,j})_{min} + [(\lambda_{max,j})_{max} - (\lambda_{max,j})_{min}] \sin^2(m_j) \quad (12)$$

$$\sigma_j = (\sigma_j)_{min} + [(\sigma_j)_{max} - (\sigma_j)_{min}] \sin^2(s_j) \quad (13)$$

O comprimento de onda máximo e meia largura de cada função gaussiana são parâmetros globais do ajuste, que são os mesmos para todas as temperaturas. O peso de cada função gaussiana foi permitido variar com a temperatura, com os três parâmetros que definem tal variação também sendo parâmetros globais para todas as temperaturas. Além disso, uma contribuição de dispersão com comportamento tipo Rayleigh foi considerada para cada espectro. Um conjunto de parâmetros globais foi então usado para ajustar os espectros de absorção que resultaram da irradiação de cada amostra. O procedimento de ajuste global para cada conjunto de espectros de absorção com temperatura variável consiste em minimizar a soma do seguinte erro quadrático:

$$ErrorSum = \sum_{i=1}^{n_T} \sum_{l=1}^{n_\lambda} w_l \left(Abs(\lambda_l, T_i) - Abs_{experimental}(\lambda_l, T_i) \right)^2 \quad (14)$$

Os gráficos resultantes do ajuste estão representados na figura 27.

A temperatura em cada tempo de irradiação é agora um parâmetro local do procedimento de adaptação global. As temperaturas locais obtidas que resultam da irradiação de luz vermelha ($\lambda > 600$ nm) dos magnetolipossomas estão representadas na figura 28 [29].

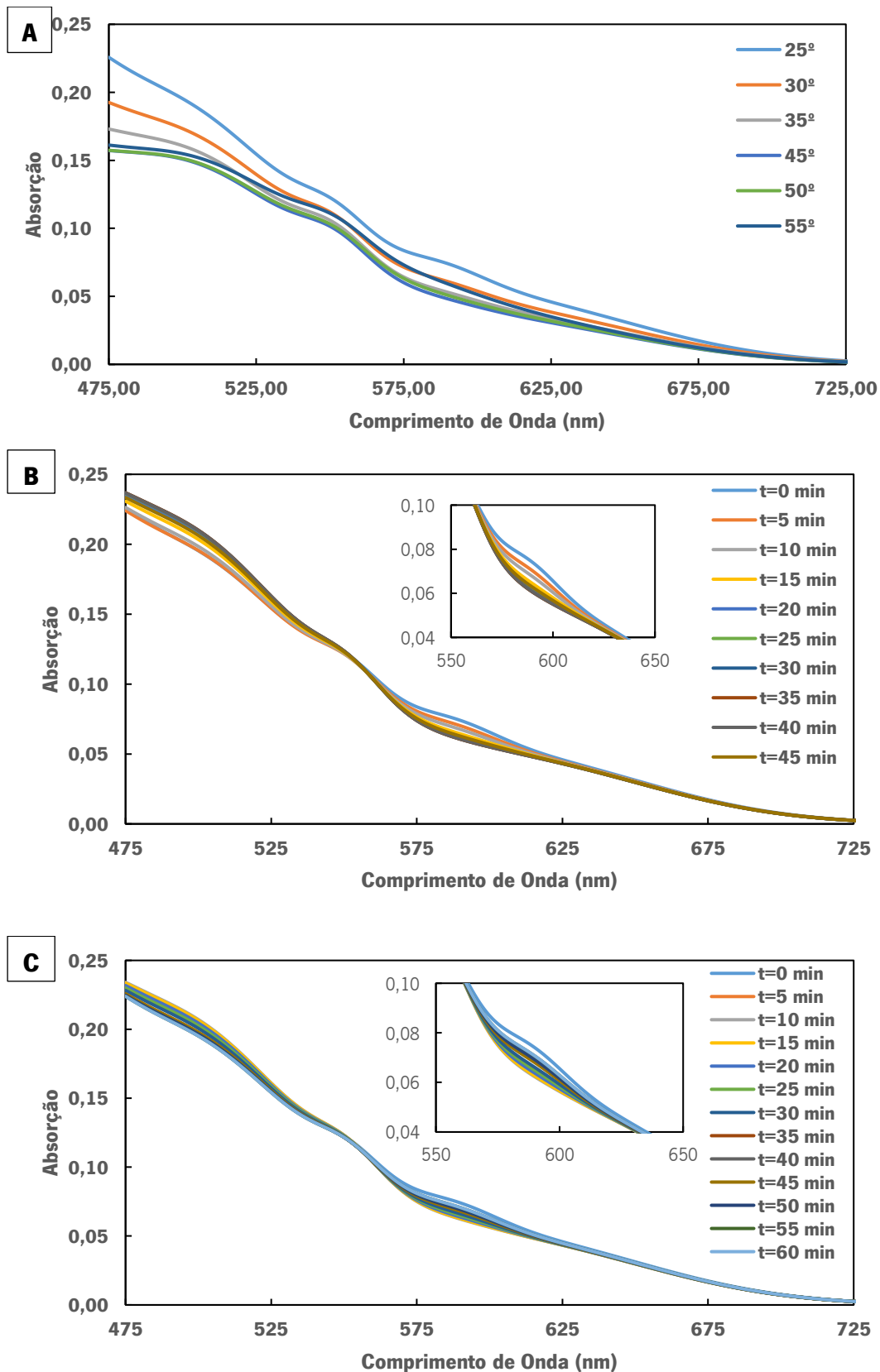


Figura 27. Variação do espectro de absorção ajustado da sonda de Reichardt nos magnetolipossomas, **A.** com o aumento da temperatura da solução. **B.** durante a irradiação com a lâmpada *arc xenon*. **C.** durante a irradiação laser.

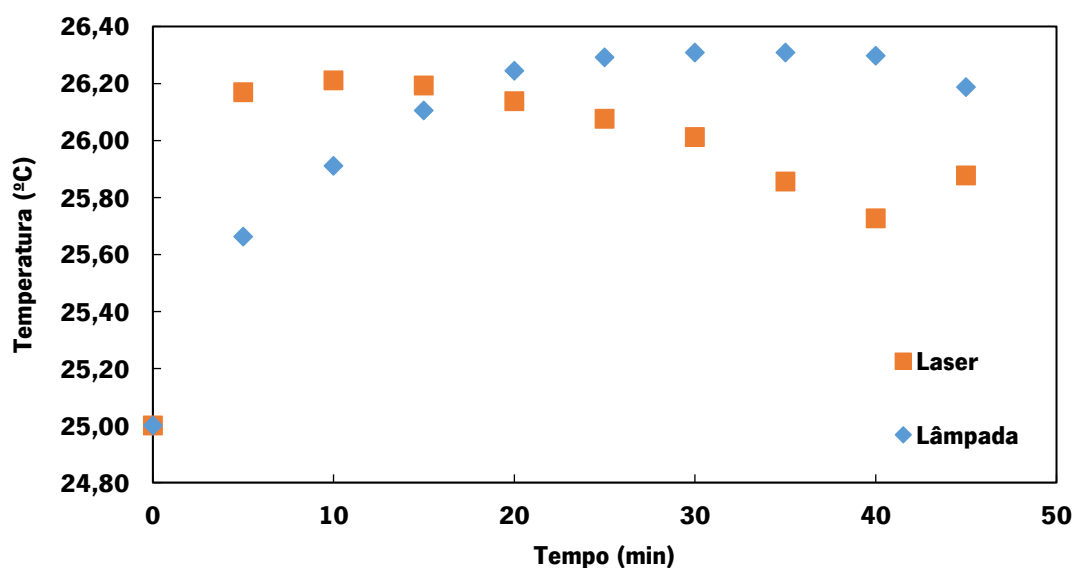


Figura 28. Variação da temperatura ajustada da amostra, durante a irradiação com fonte de lâmpada *arc xenon* ou laser.

Na figura 27B é possível observar uma diminuição do espectro de absorção da sonda de Reichardt, aos 600 nm, durante a irradiação da lâmpada *arc xenon*, o que era esperado. Por outro lado, a figura 27C demonstra um aumento da absorção durante a irradiação do laser ao longo do tempo (exceto dos 0 min aos 10 min). A diferença de comportamento com as diferentes fontes de irradiação pode ser justificada pela pequena área de superfície de irradiação para o caso da fonte de laser na amostra. Isto promove uma maior dissipação do calor levando ao arrefecimento local dos magnetolipossomas com a consequente recuperação do espectro de absorção inicial. A figura 28 confirma esta hipótese, sendo possível observar, durante a irradiação laser, um aumento rápido de 1° C nos primeiros 10 minutos sendo seguido com uma perda térmica ao longo do tempo. Já a variação da temperatura com irradiação da lâmpada demonstra um aumento de 1°C ao longo de todo o estudo como era de esperar [29,47,48]. Os nanossistemas podem ser então considerados fototérmicos apesar do pequeno aumento de 1° C, (figura 28).

IV. Conclusão e perspectivas futuras

Neste trabalho foram sintetizados dois tipos nanopartículas de ferrite manganês (MnFe_2O_4), as nanopartículas **A** e **B**. A estrutura cristalina das nanopartículas foi confirmada por XRD, tendo sido obtida uma fase 100% de ferrites de manganês para as nanopartículas **A**. Para as nanopartículas **B** foram obtidos elevados valores de magnetização de saturação sendo o oposto para as nanopartículas **A**, porém ambas revelaram um comportamento superparamagnético. A partir das nanopartículas MnFe_2O_4 foram feitos com sucesso *clusters* magnéticos, os quais foram posteriormente cobertos com uma coroa de ouro. O crescimento da coroa de ouro foi monitorizado pela banda do plasmão entre 700 e 900 nm em estudos de espectroscopia de absorção. A formação da bicamada surfactante/lípido (ODT / DPPC) sobre as nanopartículas núcleo-coroa foi confirmada por FRET, dando origem a nanossistemas de tamanhos entre os 100 a 300 nm, ideais para aplicações biomédicas. A capacidade fototérmica dos nanossistemas desenvolvidos foi avaliada por irradiação com dois tipos de fonte (laser ou lâmpada *arc xenon*). Os resultados destes ensaios revelaram um aquecimento de 1° C. No entanto, este valor poderá ser mais elevado em ensaios futuros tendo em conta certos artefactos experimentais, tais como, agitação da solução que promove um arrefecimento mais rápido, baixa superfície de irradiação (no caso da fonte de irradiação laser) e estabilização da temperatura inicial.

Para concluir, o trabalho futuro deverá numa maior otimização de variáveis presentes na síntese dos cubos de ferrite manganês (MnFe_2O_4), tais como a presença de oxigénio e tempo de reação. Será também de interesse completar a caracterização estrutural e magnético dos nanossistemas desenvolvidos através da avaliação dos tamanhos por TEM e medição das propriedades magnéticas dos magnetolipossomas. Será necessário desenvolver um método de controlo de tamanho para os *clusters* de ferrite manganês (MnFe_2O_4), de forma a obter uma população mais uniforme de magnetolipossomas. Na questão dos estudos fototérmicos será necessário resolver os erros experimentais ocorridos, podendo estes ser resolvidos com o aumento da concentração de sonda Reichardt, a exclusão da agitação magnética e estabilização da temperatura inicial.

V.Referências

- [1]** Cancer - World Health Organization; www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer; (06/07/2020)
- [2]** Office for National Statistics, Cancer Survival in England; www.nuffieldtrust.org.uk/chart/how-does-five-year-cancer-survival-in-england-vary-by-cancer-type; (06/07/2020)
- [3]** Side Effects of Cancer Treatment – National Cancer Institute; www.cancer.gov/about-cancer/treatment/side-effects; (06/07/2020)
- [4]** What is cancer – Cancer Treatment Centers of America; www.cancercenter.com/what-is-cancer; (06/07/2020)
- [5]** Shah, M., Badwaik, V. D., & Dakshinamurthy, R. (2014). Biological Applications of Gold Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(1), 344–362. Doi:10.1166/jnn.2014.8900
- [6]** YangYang, H., Zhang, C., Shi, X., Hu, H., Du, X., Fang, Y., Ma, Y., Wu, H., & Yang, S. (2010). Water-soluble superparamagnetic manganese ferrite nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Biomaterials*, 31(13), 3667–3673. DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.01.055
- [7]** Pradhan, P., Giri, J., Banerjee, R., Bellare, J., & Bahadur, D. (2007b). Preparation and characterization of manganese ferrite-based magnetic liposomes for hyperthermia treatment of cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311(1), 208–215. DOI: 10.1016/j.jmmm.2006.10.1179
- [8]** Demas, V., & Lowery, T. J. (2011). Magnetic resonance for in vitro medical diagnostics: superparamagnetic nanoparticle-based magnetic relaxation switches. *New Journal of Physics*, 13(2), 025005. DOI:10.1088/1367-2630/13/2/025005
- [9]** Vemuri, S., & Rhodes, C. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, 70(2), 95–111. DOI:10.1016/0031-6865(95)00010-7
- [10]** Andresen, T. L., Jensen, S. S., & Jørgensen, K. (2005). Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Progress in Lipid Research*, 44(1), 68–97. DOI: 10.1016/j.plipres.2004.12.001
- [11]** Batista CM, Carvalho CMB de, Magalhães NSS. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007;43(2):167–79.
- [12]** Sharma, A. (1997). Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154(2), 123–140. DOI:10.1016/s0378-5173(97)00135-x
- [13]** Gonzales, M., & Krishnan, K. M. (2005). Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystal cores for hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1), 265–270. DOI: 10.1016/j.jmmm.2005.02.020

- [14]** Rodrigues, A. R. O., Ramos, J. M. F., Gomes, I. T., Almeida, B. G., Araújo, J. P., Queiroz, M. J. R. P., Coutinho, P. J. G., & Castanheira, E. M. S. (2016). Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs. *RSC Advances*, 6(21), 17302–17313. DOI:10.1039/c5ra27058h
- [15]** Babincová, M., Člčmanec, P., Altanerová, V., Altaner, Č., & Babinec, P. (2002). AC-magnetic field controlled drug release from magnetoliposomes: design of a method for site-specific chemotherapy. *Bioelectrochemistry*, 55(1–2), 17–19. DOI:10.1016/s1567-5394(01)00171-2
- [16]** Rio, I. S. R., Rodrigues, A. R. O., Rodrigues, C. P., Almeida, B. G., Pires, A., Pereira, A. M., Araújo, J. P., Castanheira, E. M. S., & Coutinho, P. J. G. (2020). Development of Novel Magnetoliposomes Containing Nickel Ferrite Nanoparticles Covered with Gold for Applications in Thermo-therapy. *Materials*, 13(4), 815. DOI:10.3390/ma13040815
- [17]** Rodrigues, A., Matos, J., Nova Dias, A., Almeida, B., Pires, A., Pereira, A., Araújo, J., Queiroz, M. J., Castanheira, E., & Coutinho, P. (2018). Development of Multifunctional Liposomes Containing Magnetic/Plasmonic MnFe₂O₄/Au Core/Shell Nanoparticles. *Pharmaceutics*, 11(1), 10. DOI:10.3390/pharmaceutics11010010
- [18]** Rodrigues, A. R. O., Almeida, B. G., Rodrigues, J. M., Queiroz, M. J. R. P., Calhelha, R. C., Ferreira, I. C. F. R., Pires, A., Pereira, A. M., Araújo, J. P., Coutinho, P. J. G., & Castanheira, E. M. S. (2017). Magnetoliposomes as carriers for promising antitumor thieno[3,2-b]pyridin-7-arylamines: photophysical and biological studies. *RSC Advances*, 7(25), 15352–15361. DOI:10.1039/c7ra00447h
- [19]** Cai, S., Yang, Q., Bagby, T. R., & Forrest, M. L. (2011). Lymphatic drug delivery using engineered liposomes and solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(10–11), 901–908. DOI: 10.1016/j.addr.2011.05.017
- [20]** Salazar-Alvarez, G., Qin, J., SEpelák, V., Bergmann, I., Vasilakaki, M., Trohidou, K. N., Ardisson, J. D., Macedo, W. A. A., Mikhaylova, M., Muhammed, M., Baró, M. D., & Nogués, J. (2008). Cubic versus Spherical Magnetic Nanoparticles: The Role of Surface Anisotropy. *Journal of the American Chemical Society*, 130(40), 13234–13239. DOI: 10.1021/ja0768744
- [21]** Nguyen, T. L., Nizamov, T. R., Abakumov, M. A., Shchetinin, I. V., Majouga, A. G., & Savchenko, A. G. (2019). Hyperthermal Effect of Cubic Magnetic Nanoparticles. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 83(10), 1294–1299. DOI: 10.3103/s1062873819100149
- [22]** Narenji, M., Talaee, M. R., & Moghimi, H. R. (2017). Effect of Charge on Separation of Liposomes upon Stagnation. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 16(2), 423–431
- [23]** Bohara, R. A., Thorat, N. D., Yadav, H. M., & Pawar, S. H. (2014). One-step synthesis of uniform and biocompatible amine functionalized cobalt ferrite nanoparticles: a potential carrier for biomedical applications. *New Journal of Chemistry*, 38(7), 2979. DOI: 10.1039/c4nj00344f
- [24]** Xu, Z., Shen, C., Tian, Y., Shi, X., & Gao, H. J. (2010). Organic phase synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals using iron chloride as precursor. *Nanoscale*, 2(6), 1027. DOI: 10.1039/b9nr00400a

- [25]** Davis, K., Cole, B., Ghelardini, M., Powell, B. A., & Mefford, O. T. (2016). Quantitative Measurement of Ligand Exchange with Small-Molecule Ligands on Iron Oxide Nanoparticles via Radioanalytical Techniques. *Langmuir*, 32(51), 13716–13727. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b03644
- [26]** Cabrera, L. I., Somoza, L., Marco, J. F., Serna, C. J., & Puerto Morales, M. (2012). Synthesis and surface modification of uniform MFe₂O₄ (M = Fe, Mn, and Co) nanoparticles with tunable sizes and functionalities. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(6). DOI: 10.1007/s11051-012-0873-x
- [27]** Rio, I. S. R., Rodrigues, A. R. O., Rodrigues, C. P., Almeida, B. G., Pires, A., Pereira, A. M., Araújo, J. P., Castanheira, E. M. S., & Coutinho, P. J. G. (2020). Development of Novel Magnetoliposomes Containing Nickel Ferrite Nanoparticles Covered with Gold for Applications in Thermo-therapy. *Materials*, 13(4), 815. DOI: 10.3390/ma13040815
- [28]** Wang, J., Wu, X., Wang, C., Rong, Z., Ding, H., Li, H., Li, S., Shao, N., Dong, P., Xiao, R., & Wang, S. (2016). Facile Synthesis of Au-Coated Magnetic Nanoparticles and Their Application in Bacteria Detection via a SERS Method. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(31), 19958–19967. DOI: 10.1021/acsami.6b07528
- [29]** Rio, I. S. R., Rodrigues, A. R. O., Rodrigues, J. M., Queiroz, M. J. R. P., Calhelha, R. C., Ferreira, I. C. F. R., Almeida, B. G., Pires, A., Pereira, A. M., Araújo, J. P., Castanheira, E. M. S., & Coutinho, P. J. G. (2021). Magnetoliposomes Based on Magnetic/Plasmonic Nanoparticles Loaded with Tricyclic Lactones for Combined Cancer Therapy. *Pharmaceutics*, 13(11), 1905. DOI: 10.3390/pharmaceutics13111905
- [30]** Gruhlke, M. C., & Slusarenko, A. J. (2012). The biology of reactive sulfur species (RSS). *Plant Physiology and Biochemistry*, 59, 98–107. DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.03.016
- [31]** Vikesland, P. J., Rebodos, R. L., Bottero, J. Y., Rose, J., & Masion, A. (2016). Aggregation and sedimentation of magnetite nanoparticle clusters. *Environmental Science: Nano*, 3(3), 567–577. DOI: 10.1039/c5en00155b
- [32]** Wilcoxon, J. P., & Provencio, P. P. (2004). Heterogeneous Growth of Metal Clusters from Solutions of Seed Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 126(20), 6402–6408. DOI: 10.1021/ja031622y
- [33]** Abdollahi, S. N., Naderi, M., & Amoabediny, G. (2012). Synthesis and physicochemical characterization of tunable silica–gold nanoshells via seed growth method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 414, 345–351. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2012.08.043
- [34]** García-Negrete, C. A., Jiménez De Haro, M. C., Blasco, J., Soto, M., & Fernández, A. (2015). STEM-in-SEM high resolution imaging of gold nanoparticles and bivalve tissues in bioaccumulation experiments. *The Analyst*, 140(9), 3082–3089. DOI: 10.1039/c4an01643b
- [35]** Levin, C. S., Hofmann, C., Ali, T. A., Kelly, A. T., Morosan, E., Nordlander, P., Whitmire, K. H., & Halas, N. J. (2009). Magnetic–Plasmonic Core–Shell Nanoparticles. *ACS Nano*, 3(6), 1379–1388. DOI: 10.1021/nn900118a

- [36]** Dolai, J., Mandal, K., & Jana, N. R. (2021). Nanoparticle Size Effects in Biomedical Applications. *ACS Applied Nano Materials*, 4(7), 6471–6496. DOI: 10.1021/acsanm.1c00987
- [37]** Dey, C., Chaudhuri, A., & Goswami, M. M. (2018). Synthesis of MnFe₂O₄ magnetic nano hollow spheres by a facile solvothermal route and its characterization. *AIP Conference Proceedings*. DOI: 10.1063/1.5028730
- [38]** Rebodos, R. L., & Vikesland, P. J. (2010). Effects of Oxidation on the Magnetization of Nanoparticulate Magnetite. *Langmuir*, 26(22), 16745–16753. DOI: 10.1021/la102461z
- [39]** Sawant, R. R., & Torchilin, V. P. (2012). Challenges in Development of Targeted Liposomal Therapeutics. *The AAPS Journal*, 14(2), 303–315. DOI: 10.1208/s12248-012-9330-0
- [40]** Ishida, T., Tsuneda, S., Nishida, N., Hara, M., Sasabe, H., & Knoll, W. (1997). Surface-Conditioning Effect of Gold Substrates on Octadecanethiol Self-Assembled Monolayer Growth. *Langmuir*, 13(17), 4638–4643. DOI: 10.1021/la970241t
- [41]** Robert M.Clegg. (2009). [Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology] Fret and Flim Techniques Volume 33 | Chapter 1 Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done. 1–57.
- [42]** Mitra, K., Ubarretxena-Belandia, I., Taguchi, T., Warren, G., & Engelman, D. M. (2004). Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4083–4088. DOI: 10.1073/pnas.0307332101
- [43]** Putri, Y. E., Wendari, T. P., Rahmah, A. A., Refinel, R., Said, S. M., Sofyan, N., & Wellia, D. V. (2022). Tuning the morphology of SrTiO₃ nanocubes and their enhanced electrical conductivity. *Ceramics International*, 48(4), 5321–5326. DOI: 10.1016/j.ceramint.2021.11.075
- [44]** Antic, B., Kremenović, A., Nikolic, A. S., & Stojkovic, M. (2004). Cation Distribution and Size-Strain Microstructure Analysis in Ultrafine Zn–Mn Ferrites Obtained from Acetylacetonato Complexes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(34), 12646–12651. DOI: 10.1021/jp036214v
- [45]** Solano, E., Frontera, C., Puente Orench, I., Puig, T., Obradors, X., Ricart, S., & Ros, J. (2014). Neutron and X-ray diffraction study of ferrite nanocrystals obtained by microwave-assisted growth. A structural comparison with the thermal synthetic route. *Corrigendum. Journal of Applied Crystallography*, 47(4), 1478. DOI: 10.1107/s1600576714017452
- [46]** Maslen, E. N., Streltsov, V. A., Streltsova, N. R., & Ishizawa, N. (1994). Synchrotron X-ray study of the electron density in α -Fe₂O₃. *Acta Crystallographica Section B Structural Science*, 50(4), 435–441. DOI: 10.1107/s0108768194002284
- [47]** Kharlanov, V., & Rettig, W. (2009). Experimental and Theoretical Study of Excited-State Structure and Relaxation Processes of Betaine-30 and of Pyridinium Model Compounds. *The Journal of Physical Chemistry A*, 113(40), 10693–10703. DOI: 10.1021/jp904537k

[48] Catalán, J., de Paz, J. L. G., & Reichardt, C. (2010). On the Molecular Structure and UV/vis Spectroscopic Properties of the Solvatochromic and Thermochromic Pyridinium-N-Phenolate Betaine Dye B30. *The Journal of Physical Chemistry A*, 114(21), 6226–6234. DOI: 10.1021/jp1009302

[49] Bender, P., Fock, J., Hansen, M. F., Bogart, L. K., Southern, P., Ludwig, F., Wiekhorst, F., Szczerba, W., Zeng, L. J., Heinke, D., Gehrke, N., Díaz, M. T. F., González-Alonso, D., Espeso, J. I., Fernández, J. R., & Johansson, C. (2018). Influence of clustering on the magnetic properties and hyperthermia performance of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology*, 29(42), 425705. DOI: 10.1088/1361-6528/aad67d

[50] Gavilán, H., Avugadda, S. K., Fernández-Cabada, T., Soni, N., Cassani, M., Mai, B. T., Chantrell, R., & Pellegrino, T. (2021). Magnetic nanoparticles and clusters for magnetic hyperthermia: optimizing their heat performance and developing combinatorial therapies to tackle cancer. *Chemical Society Reviews*, 50(20), 11614–11667. DOI: 10.1039/d1cs00427a

[51] López-Muñoz, G. A., Pescador-Rojas, J. A., Ortega-Lopez, J., Salazar, J. S., & Balderas-López, J. A. (2012). Thermal diffusivity measurement of spherical gold nanofluids of different sizes/concentrations. *Nanoscale Research Letters*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1556-276x-7-423>