



**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Liliana Sofia da Silva Ferreira Pinto Melro

**Desenvolvimento de nanomagnetogéis para  
aplicações biomédicas**



**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Liliana Sofia da Silva Ferreira Pinto Melro

## **Desenvolvimento de nanomagnetogéis para aplicações biomédicas**

Dissertação de Mestrado em Micro e Nano Tecnologias

Trabalho realizado sob a orientação da

**Doutora Catarina Gonçalves**

e do

**Doutor José Alberto Martins**

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A  
REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram de uma forma directa ou indirecta para a realização desta dissertação.

De uma forma especial à minha orientadora, Doutora Catarina Gonçalves, pelo conhecimento transmitido, orientação, paciência, dedicação e bom senso. Gostaria ainda de lhe agradecer a preciosa ajuda na realização da tese.

Ao Prof. Doutor José Alberto Martins, meu co-orientador, pelo apoio e disponibilidade que sempre demonstrou.

Aos meus colegas de laboratório, Dina, Luísa, Sílvia, Tininha, Vera, Alexandre, João Pedro, Susana e Raniere pelo bom ambiente, boa disposição e ajuda disponibilizada. Em particular à Paulinha, pelo auxílio em alguns ensaios, e ao Jorge, pelo tempo despendido.

Ao Miguel Ferreira, estudante de Doutoramento do Departamento de Química da Universidade do Minho pela disponibilidade e preciosa ajuda nos ensaios de relaxividade.

Ao Grupo *Bionanomaterials* (UMR 7244 CNRS-CSPBAT) da Universidade de Paris 13, que amavelmente forneceram as nanopartículas de ferro, especialmente ao Dr. Yoann Lalatonne.

Ao Prof. Doutor Miguel Gama do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, ao Professor Doutor Carlos Geraldês do Departamento de Bioquímica da Universidade de Coimbra, e à Prof.<sup>a</sup> Doutora Cidália Botelho do Departamento de Engenharia Química da FEUP pela disponibilização dos laboratórios e equipamentos.

Não posso deixar de mencionar a Marisa, a Sara “Rastosa” e o Pedro pelos conselhos, amizade e companheirismo, e em geral os restantes colegas de mestrado.

E finalmente, à minha família e amigos, em particular ao meus pais, pelo carinho, incentivo e apoio dado ao longo dos anos e sem os quais nada disto teria sido possível.

A todos os meus sinceros agradecimentos.



## Resumo

O desenvolvimento de nanosistemas inteligentes tem suscitado grande interesse na área da nanomedicina devido às suas potenciais aplicações biomédicas. Estes são sistemas de libertação controlada capazes de direccionar o agente activo para o local de interesse e aí controlar o seu perfil de libertação. No presente trabalho, nanopartículas magnéticas de óxido de ferro,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (maguemite), foram estabilizadas com um nanogel de dextrino, que foi previamente sintetizado e caracterizado. A maguemite apresenta propriedades superparamagnéticas, ou seja, as nanopartículas permanecem dispersas e estáveis após remoção do campo magnético, uma vez que não retêm o magnetismo, podendo ser direccionadas através da aplicação de um campo magnético externo. Estas nanopartículas superparamagnéticas têm ainda a capacidade de diminuir os tempos de relaxação dos prótons das moléculas de água presentes nos tecidos, actuando como agente de contraste em imagiologia de ressonância magnética (IRM). A sua aplicação sem revestimento, em organismos, encontra limitações devido ao seu tamanho e estabilidade, assim como ao reconhecimento por parte do sistema fagocitário mononuclear, que reduz o seu tempo de permanência no organismo, impedindo que as nanopartículas atinjam o alvo. Uma forma de ultrapassar este problema é revestindo as nanopartículas de óxido de ferro com polímeros que lhes confirmam estabilidade e protecção *in vivo*. Os revestimentos poderão também servir de agentes de transporte de moléculas activas, como fármacos.

O principal objectivo deste trabalho foi estudar a incorporação/estabilização de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas num nanogel de dextrino, obtendo-se um nanomagnetogel. Foram preparadas diferentes formulações, usando uma quantidade constante de nanogel e variando a quantidade de óxido de ferro. As formulações foram caracterizadas física e quimicamente tendo sido verificado que o tamanho do complexo  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@nanogel}$  é aproximadamente o mesmo para todas as formulações preparadas (140 nm), assim como a estabilidade é mantida até ao final do tempo de observação (4 semanas). O tamanho foi analisado por DLS, criomev e MET. Verificou-se que para a concentração de nanogel estudada (0,5 mg/mL) a saturação com óxido de ferro ocorre quando se adiciona 2,93 mM de

ferro tendo-se estabilizado 1,21 mM de ferro. Estudos de relaxividade apresentaram tempos de relaxação transversal ( $T_2$ ) muito inferiores aos tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ ). Os valores de relaxividade são por isso bastante elevados, característicos de agentes de contraste à base de óxido de ferro. Esta particularidade é especialmente importante quando se pretende uma aplicação como agentes de contraste para IRM. O complexo foi ainda estudado em ensaios de biocompatibilidade. Os ensaios de MTT revelaram que o nanomagnetogel não comprometeu a viabilidade dos fibroblastos 3T3. Os macrófagos internalizaram o nanomagnetogel 3 h após incubação. O nanomagnetogel desenvolvido demonstrou possuir características interessantes para aplicação como agente de contraste em IRM, podendo ser direccionado após administração intravenosa, por aplicação de um campo magnético externo. O nanomagnetogel foi funcionalizado com um agente quelante que complexa um metal trivalente, como o samário 153 (radioactivo), e caracterizado. Demonstrou-se que será possível realizar estudos de biodistribuição por emissão de raios- $\gamma$ , após administração intravenosa, com e sem aplicação de um campo magnético numa região específica (por exemplo tumor).

## Abstract

The development of nanosystems has created great interest in nanomedicine due to their diverse biomedical applications. Nanosystems are controlled drug delivery carriers capable of directing the targeting agent to a specific site. In the present study, superparamagnetic iron oxide nanoparticles,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (maghemite) were stabilized in a previously synthesized and characterized, dextrin nanogel. Maghemite is a superparamagnetic material that through application of an external magnetic field can be directed to a desired location. By removal of the externally applied magnetic field they do not retain significant magnetization, thus remaining stable and dispersed. They can also be directed through an external magnetic field. Superparamagnetic nanoparticles are also able to shorten the relaxation times of neighboring protons (water molecules) present in tissues, acting as contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI). Their *in vivo* application in the absence of a stabilizer (coating agent) presents limitations, for they are easily taken up by the reticuloendothelial system, decreasing the circulation time of the nanoparticles, hindering their purpose. A commitment between size and stability must therefore be achieved to overcome such obstacles. Polymer stabilizers are used as coatings for iron oxide nanoparticles in order to promote stability and *in vivo* protection. The coatings can also serve as carriers for active molecules such as drugs.

The main purpose of this work was to study the loading of superparamagnetic iron oxide nanoparticles inside a dextrin nanogel, thus obtaining a nanomagnetogel. Different formulations were prepared using different volumes of iron oxide and maintaining the nanogel concentration. These formulations were characterized in size and stability. The average size of the nanomagnetogels was approximately 140 nm, according to studies with DLS, cryo-SEM and TEM. For 0.5 mg/mL of nanogel, the maximum iron concentration stabilized was 1.21 mM. Relaxivity studies presented very short transverse relaxation times, which is a particular characteristic of superparamagnetic nanoparticles, and an extremely important feature of contrast agents for MRI. Their biocompatibility was also studied and MTT assays showed that the  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @nanogel complex does not affect cell viability in 3T3 fibroblasts. The uptake of the complex by macrophages can be inferred

by the blue staining inside the cells, after the cells were incubated in the presence of the formulations for 3 hours.

The studied nanomagnetogels demonstrated to be good contrast agents for MRI. Nonetheless, it should be interesting to study a higher iron loading inside the nanogel, by increasing the nanogel concentration. Also, the incorporation of a hydrophobic drug inside the hydrophobic domains of the nanomagnetogel should be considered as a possible study subject, as should the biodistribution of the complex through intravenous administration, with or without the appliance of an external magnetic field in the area of interest (e.g. tumour).

# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice.....	ix
Lista de figuras .....	xi
Lista de tabelas .....	xiii
Abreviaturas.....	xv
1      Introdução.....	1
1.1    Nanogéis obtidos por auto-organização.....	3
1.2    Nanopartículas de ferro .....	6
2      Materiais e métodos .....	15
2.1    Materiais.....	15
2.2    Métodos.....	16
2.2.1  Preparação das formulações .....	16
2.2.2  Caracterização físico-química .....	17
2.2.2.1 Incorporação de $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	17
2.2.2.2 Avaliação da distribuição de tamanhos e estabilidade por DLS .....	17
2.2.2.3 Visualização por microscopia.....	17
2.2.2.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIV) .....	18
2.2.2.5 Propriedades magnéticas.....	19
2.2.3  Interacção com células .....	22
2.2.3.1 Estudo de viabilidade celular: Ensaio de MTT .....	23
2.2.3.2 Estudo de internalização: Microscopia.....	24
2.2.4  Funcionalização do nanogel para estudos de biodistribuição.....	24
3      Apresentação e discussão de resultados.....	27
3.1    Quantificação da concentração de ferro estabilizado no nanogel .....	28
3.2    Caracterização físico-química.....	29
3.2.1  Avaliação da distribuição de tamanhos e estabilidade por DLS .....	29
3.2.2  Avaliação do tamanho através de crio-MEV e MET.....	31
3.2.3  Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIV) .....	33
3.3    Propriedades magnéticas.....	35

3.3.1	Estudos de relaxividade.....	35
3.3.2	<i>Magnetic Immunoassays Technology</i> (MIAtek).....	37
3.3.3	<i>Magnetic Immunoassays Multiplex</i> (MIAplex).....	38
3.4	Interacção com as células.....	40
3.4.1	Estudos de viabilidade celular: Ensaio de MTT.....	42
3.4.1.1	Fibroblastos 3T3.....	42
3.4.1.2	Macrófagos derivados da medula óssea de ratinhos.....	43
3.4.2	Estudo de internalização: Microscopia.....	44
3.5	Funcionalização do nanogel para estudos de biodistribuição.....	45
4	Conclusão e trabalho futuro.....	47

## Lista de figuras

Figura 1 - Síntese do dexC <sub>16</sub> (Gonçalves <i>et al.</i> , 2007). .....	6
Figura 2 – Propriedades magnéticas de nanopartículas de óxido de ferro (Boyer <i>et al.</i> , 2010). (a) Alinhamento dos spins magnéticos por aplicação de um campo magnético. Desorganização de spins à superfície devida à falta de organização cristalina. (b) Campo magnético gerado pelas nanopartículas de óxido de ferro.....	9
Figura 3 – Diferentes tipos de revestimento (Sun <i>et al.</i> , 2008). (a) Polímero enxertado na NP. (b) NP completamente revestida pelo polímero. (c) NP revestida através de lipossoma. ....	12
Figura 4 – Curvas de magnetização (Alphandérya <i>et al.</i> , 2010 ) (a, d), primeira derivada (b, e) e segunda derivada (c,f) para nanopartículas superparamagnéticas (a, b, c) e partículas ferromagnéticas (d, e, f).....	20
Figura 5 – Imagens de MET (a e b) e curvas de MIAplex (c e d) de nanopartículas de óxido de ferro com 20 nm (a e c ) e 50 nm (b e d) (Lalatonne <i>et al.</i> , 2009) .....	21
Figura 6 – Funcionalização do dexC <sub>16</sub> com o agente quelante DO <sub>3</sub> A e complexação com o íon lantanídeo (Eu <sup>3+</sup> ). .....	26
Figura 7 – Distribuição de tamanhos em intensidade do nanogel (0,5 mg/mL) (a), e do nanomagnetogel $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @nanogel (nanogel 0,5 mg/mL e ferro estabilizado 0,64 mM) (b) ambos em solução aquosa a pH 7,0.....	30
Figura 8 – Distribuição de tamanhos em intensidade do nanomagnetogel (nanogel 0,5 mg/mL e ferro estabilizado 0,64 mM), antes (a) e após (b) passar na coluna de exclusão PD10.....	31
Figura 9 – Imagem de crio-MEV de nanogel 5,0 mg/mL (a) com uma objectiva x10000 e $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @nanogel (nanogel 0,5 mg/mL e ferro estabilizado 1,41 mM) (b) com objectiva x50000.....	32
Figura 10 – Imagem de MET de nanopartículas $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> em solução tampão a pH 2 (a) e do nanomagnetogel, nanogel 0,5 mg/mL e ferro estabilizado 0,64 mM (b) e 1,41 mM (c). .....	32
Figura 11 – Espectros de absorção no infra vermelho por transformada de Fourier para o nanogel (a) e nanomagnetogéis com 1,21 e 1,41 mM de ferro estabilizado.....	34
Figura 12 – Gráficos da velocidade de relaxação (1/T) longitudinal (♦) e transversal (x), em função da concentração de ferro [Fe]. O declive da recta dá o valor da relaxividade.....	36
Figura 13 – Quantificação do número de nanopartículas superparamagnéticas em cada formulação através de MIAtek.....	38
Figura 14 – Sinal MIAplex (d <sup>2</sup> M/dH <sup>2</sup> ) para os nanomagnetogéis estudados.....	39
Figura 15 – Acumulação do nanomagnetogel (seta branca) por aplicação de um campo magnético (ímã). .....	40
Figura 16 – Viabilidade dos fibroblastos após 24 h e 48 h de incubação com nanogel (NG) e com nanomagnetogéis com 0,39 e 3,24 mM de ferro estabilizado. DMEM	

refere-se ao controlo em que as células não foram sujeitas a qualquer tratamento. O nanogel tem uma concentração de 0,5 mg/mL em todas as formulações. ....	42
Figura 17 – Viabilidade dos macrófagos após 24 h e 48 h de incubação com nanogel (NG) e nanomagnetogéis com 0,39 e 3,24 mM de ferro estabilizado. RPMI refere-se ao controlo em que as células não foram sujeitas a qualquer tratamento. O nanogel tem uma concentração de 0,5 mg/mL em todas as formulações. ....	43
Figura 18 – Coloração de macrófagos derivados da medula óssea de ratinho com azul da prússia. As imagens referem-se ao tratamento com o nanogel (a1 e a2), e com nanomagnetogel com uma concentração de ferro estabilizado de 0,39 mM (b1 e b2) e de 3,24 mM (c1 e c2). ....	44

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Volume (mL) de solução de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (11,7 mg/mL ou 73,3 mM) adicionado por cada mL de dispersão de nanogel (0,5 mg/mL). .....	16
Tabela 2 – Concentração de ferro nas diferentes formulações preparadas e respectivos tamanhos (diâmetro) e Pdl ao longo de 4 semanas. O desvio padrão ( $\sigma$ ) refere-se a 5 medições consecutivas.....	29
Tabela 3 – Relaxividade longitudinal ( $r_1$ ) e transversal ( $r_2$ ) de diferentes formulações de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @nanogel e de agentes de contraste comerciais.....	37
Tabela 4 – Tamanho (diâmetro), Pdl, potencial zeta e concentração de ferro estabilizado (determinado por absorção atômica) das amostras usadas nos ensaios de interação com células. ....	41
Tabela 5 – Análise de DLS das formulações de nanogel para biodistribuição, pH 7,0.	45



## Abreviaturas

3T3	Fibroblastos de embrião de ratinho
ADN	Ácido desoxirribonucleico
C <sub>16</sub>	Cadeia alquílica de 16 carbonos
Crio-MEV	Microscopia Electrónica de Varrimento com câmara criogénica
DexC <sub>16</sub>	Dextrino modificado com cadeias alquílicas de 16 carbonos
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS <sub>C16</sub>	Grau de substituição do dextrino com cadeias alquílicas
EuCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloreto de Európio Hexahidratado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FBS	Soro fetal bovino
FDA	Entidade Americana que regula a Administração de Alimentos e Medicamentos
Fe	Ferro
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Magnetite
FTIV	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Etanosulfónico
IRM	Imagiologia de Ressonância Magnética
ISO	Organização Internacional para Padronização
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Ferrocianeto de potássio
LCCM	<i>Cell conditioned medium</i>
L-DOPA	Ácido propanóico; (S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)
MET	Microscopia Electrónica de Transmissão
MIAp <sub>lex</sub>	<i>Magnetic Immunoassays Multiplex</i>
MIAT <sub>ek</sub>	<i>Magnetic Immunoassays Technology</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NP	Nanopartícula
PBS	Solução de Tampão Fosfato
PdI	Índice de Polidispersividade
PEG	Polietilenoglicol

PEG-DOPA	Conjugado polietilenoglicol-DOPA
PEO	Polioxietileno
PPO	Polióxiopropileno
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poli-láctico-co-glicólico
$r_1$	Relaxividade longitudinal
$r_2$	Relaxividade transversal
$R_1$	Velocidade de relaxação longitudinal
$R_2$	Velocidade de relaxação transversal
RPMI 1640	Meio de cultura criado no <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SC <sub>16</sub>	Cadeia alquílica de 16 carbonos
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
Sm <sup>3+</sup>	Samário (III)
T <sub>1</sub>	Tempo de relaxação longitudinal
T <sub>2</sub>	Tempo de relaxação transversal
VMA	Metacrilato de vinilo
z-avg	Tamanho hidrodinâmico médio
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Maguemite
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @nanogel	Complexo nanogel maguemite (nanomagnetogel)
$\lambda$	Comprimento de onda
[Fe]	Concentração de ferro

# 1 Introdução

---

A nanomedicina tem como principais desafios a terapia e o diagnóstico de doenças através da imagiologia e direccionamento de agentes activos, em quantidades adequadas, evitando assim o seu uso excessivo e os consequentes efeitos secundários.

Na tentativa de alcançar estes objectivos têm sido desenvolvidos sistemas de libertação controlada, os nanosistemas, capazes de direccionar o agente activo para o local de interesse e aí controlar o seu perfil de libertação (Farokhzad e Langer, 2006). Estes sistemas possuem grande potencial na nanomedicina uma vez que permitem o transporte de diferentes tipos de moléculas. As moléculas transportadas podem ser fármacos (Oh *et al.*, 2007b), antigénios (Cruz *et al.*, 2011), sondas (Wu *et al.*, 2010), genes (Anderson *et al.*, 2004), proteínas (Carvalho *et al.*, 2010), ADN (Murata e Stojanovic, 2008), entre outros. Os nanosistemas são utilizados na terapia, prevenção e diagnóstico de doenças. Devido às suas reduzidas dimensões, interagem com sistemas e barreiras biológicas (tecidos e células), conseguindo alcançar locais muito específicos como por exemplo o núcleo celular onde libertam a carga que transportam (Pouton *et al.*, 2007). Além do direccionamento, os sistemas de transporte podem conferir protecção, evitando degradação *in vivo* (Morgan *et al.*, 1996) e ainda podem permitir solubilização de moléculas insolúveis em meio fisiológico (Chen *et al.*, 2008). A eficiência com que o agente activo é libertado no órgão específico sobre o qual actua depende do método de administração (p.ex. oral, intravenoso ou intratumoral) (Kateb *et al.*, 2011). Uma das grandes apostas da nanotecnologia é conseguir desenvolver sistemas com capacidade de transpor barreiras fisiológicas até então intransponíveis, como é o caso da barreira hemato-encefálica (Vinogradov *et al.*, 2004).

Existem variados tipos de nanosistemas tais como nanopartículas poliméricas (nanogéis) (Oh *et al.*, 2007a), dendrímeros (Nanjwade *et al.*, 2009), lipossomas (Falciani *et al.*, 2011), nanocápsulas (Hilder e Hill, 2008) e nanoesferas (Arias *et al.*, 2007). Cada um destes sistemas difere na composição e estrutura, por

isso o sistema de transporte escolhido depende do agente activo que se pretende transportar. O direccionamento dos nanosistemas pode ser um processo activo ou passivo. O endereçamento activo recorre ao uso de moléculas (ligandos) que são reconhecidas pelo alvo (receptor), ou seja baseia-se no reconhecimento molecular, para uma entrega mais específica e eficiente. Uma forma de o fazer é revestindo as nanopartículas com anticorpos que interagem com o seu antigénio específico, melhorando a internalização celular. Outros exemplos de ligandos são péptidos, vitaminas ou açúcares que são reconhecidos pelas células alvo (Marcucci e Lefoulon, 2004). O endereçamento passivo refere-se à acumulação por difusão passiva no tecido alvo. O melhor exemplo é o efeito de permeabilização e retenção que ocorre nos tecidos tumorais e que se verifica por estes tecidos possuírem fenestrações tornando-os mais permeáveis (Brannon-Peppas e Blanchette, 2004). Quando o objectivo é a acumulação nos tecidos tumorais, deve usar-se um sistema com tempos longos de circulação que permita difusão passiva, e o recurso adicional a uma molécula específica (direccionamento activo) poderá aumentar a internalização celular (Kirpotin *et al.*, 2006).

Os sistemas de entrega específica devem ser capazes de transportar a quantidade necessária de agente activo para que seja possível realizar a acção pretendida sem o uso excessivo de transportador. O transportador deverá ser biodegradável ou facilmente eliminado do organismo após a entrega, evitando a sua acumulação nos órgãos e consequente toxicidade (Krishnan, 2010). A incorporação de biomoléculas em nanosistemas sem comprometer a sua bioactividade constitui um desafio. As biomoléculas podem estar ligadas ao transportador de forma física (p. ex. atracções electrostáticas, interacções hidrofóbicas, etc...) ou de forma química (ligação covalente). A incorporação física de fármacos pode ser realizada durante a produção do nanosistema ou posteriormente. A eficiência da retenção depende da solubilização na matriz polimérica, a qual está relacionada com a composição do polímero, peso molecular, interacções molécula-polímero, e à presença de grupos funcionais funcionais (Govender *et al.*, 1999, Govender *et al.*, 2000, Panyam *et al.*, 2004). Os polissacarídeos por exemplo, possuem grupos hidroxilo os quais permitem conjugar directamente fármacos que contenham grupos funcionais ácido

carboxílico, produzindo ésteres. A incorporação física de fármacos em nanosistemas poliméricos é o método mais usado (Mehvar, 2000, Shrivastava *et al.*, 2009).

Uma das maiores limitações do uso de nanosistemas para entrega de fármacos relaciona-se com a sua eliminação prematura do sistema circulatório pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) impedindo-os de atingir o alvo pretendido. A adsorção de opsoninas (proteínas do soro) na superfície dos nanosistemas desencadeia o reconhecimento por parte de células fagocíticas, e posterior retenção no fígado, baço e medula óssea (Stolnik *et al.*, 1995). As propriedades dos nanosistemas tais como tamanho e superfície podem ser manipuladas, de forma a aumentar o tempo médio em circulação e reduzir a sua eliminação, pelas células fagocíticas ou por filtração renal. A superfície do nanosistema pode ser modificada de forma a aumentar a estabilidade das dispersões coloidais, assegurar a biocompatibilidade e evitar interações não específicas com o meio (Moghimi *et al.*, 1993).

## **1.1 Nanogéis obtidos por auto-organização**

Os nanogéis são actualmente os sistemas de entrega controlada de agentes activos com maior potencial terapêutico. Estes combinam as características dos hidrogéis, nomeadamente a grande capacidade de absorção de água ou fluidos biológicos devido à presença de grupos hidrofílicos na cadeia polimérica, com um tamanho nanométrico, que lhes permite alcançar capilares sanguíneos e atravessar tecidos. A flexibilidade das cadeias poliméricas é também uma mais-valia para estes sistemas.

Os nanogéis são, tais como os hidrogéis, materiais com estrutura tridimensional de origem natural ou sintética. Os polissacarídeos são exemplo de materiais poliméricos de origem natural. Baseados em hidratos de carbono e compostos por unidades repetitivas (monossacarídeos) unidas por ligações glicosídicas, podem apresentar diferentes grupos funcionais na sua estrutura, tais como grupos hidroxilos primários e secundários, grupos amina e grupos ácido carboxílico. Estes grupos são muitas vezes usados para promover a derivatização química das cadeias poliméricas ou a conjugação de ligandos

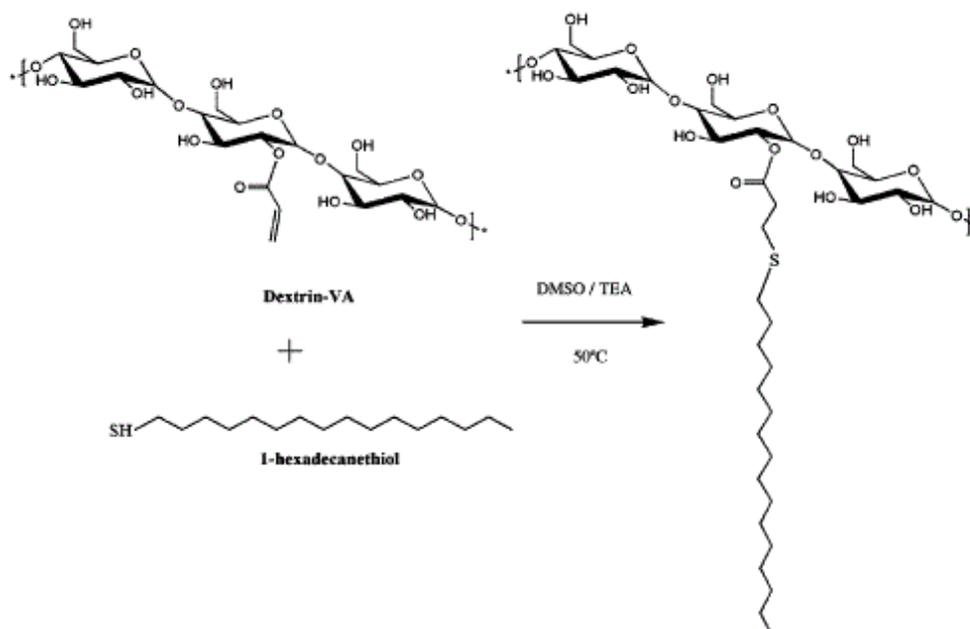
específicos, o que possibilita uma grande diversidade de estruturas (Gil e Ferreira, 2006). Os polissacarídeos podem ser divididos em não carregados, como o dextrano e o dextrino, e carregados (polieletrólitos) que por sua vez podem ser positivamente carregados (quitosano) ou negativamente carregados (heparina e ácido hialurónico) (Nakajima e Shinoda, 1976, Nishi, 1997). Estes polímeros não apresentam toxicidade, são altamente estáveis, hidrofílicos, biodegradáveis, e de baixo custo de produção. Podem ser obtidos a partir de recursos naturais abundantes como algas (alginato), plantas (celulose, amido) e animais (glicogénio, quitosano). Existem no mercado, polímeros naturais disponíveis em grau médico, para aplicações biomédicas. O icodextrino é uma solução de dextrino (com aproximadamente  $\sim 20$  kDa) para diálise peritoneal (Plum *et al.*, 2002). Quanto aos polímeros sintéticos, os mais usados são: o ácido poliláctico (PLA) (Smith e Hunneyball, 1986), o ácido poliglicólico (PGA) (Grayson *et al.*, 2004), e o copolímero ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) (Okassa *et al.*, 2005). Estes materiais são igualmente biodegradáveis, biocompatíveis e aprovados pela *United States Food and Drug Administration* (FDA), sendo por isso muito usados no transporte e direccionamento de fármacos (Hans e Lowman, 2002).

Moléculas anfifílicas são moléculas que possuem uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, por isso auto-organizam-se, na presença de água formando estruturas, tais como micelas, vesículas, tubos e membranas em bicamada. A auto-organização molecular é caracterizada pela difusão, seguida de associação específica de moléculas através de interacções não covalentes, incluindo associações electrostáticas e/ou hidrofóbicas (Letchford e Burt, 2007).

Polímeros hidrofílicos modificados, parcialmente enxertados com cadeias hidrofóbicas distribuídas aleatoriamente ao longo da cadeia polimérica, quando dispersos em água, sofrem associações intra ou intermoleculares entre as unidades hidrofóbicas, formando domínios hidrofóbicos no interior da estrutura polimérica (Gonçalves e Gama, 2008). Estes domínios podem solubilizar moléculas hidrofóbicas (Liu *et al.*, 2005), assim como proteínas (Carvalho *et al.*, 2010) e sondas fluorescentes (Akiyoshi *et al.*, 1993), servindo de veículo de transporte e protecção a moléculas sensíveis a degradação *in vivo* (Morgan *et al.*, 1996).

O polietilenoglicol (PEG) é muitas vezes usado na decoração da superfície das nanopartículas, de forma a prevenir a opsonização por impedimento estérico. O PEG diminui as interações das nanopartículas com as proteínas do sangue, evitando o reconhecimento por parte do SFM, ou seja, aumentando o tempo de circulação no sistema sanguíneo (Flesch *et al.*, 2005, Gref *et al.*, 2000, Zhang e Ferrari, 1998, Zahr *et al.*, 2006). Outros tipos de agentes de revestimento usados são copolímeros derivados do PEG, poli(acrilamida), álcool polivinílico (Owens e Peppas, 2006), dextrano (Bautista *et al.*, 2005) e quitosano (Tsai *et al.*, 2010). Outro factor que contribui para uma rápida eliminação dos nanosistemas por parte do SFM é o tamanho (Sonavane *et al.*, 2008). Partículas de tamanho superior a 200 nm são rapidamente isoladas no baço sendo removidas pelo SFM (Gaumet *et al.*, 2008, Gupta e Gupta, 2005). Por outro lado, partículas de tamanho reduzido, inferiores a 5 nm, são facilmente excretadas pela urina por filtração renal (Choi *et al.*, 2007). O tamanho “ideal” das nanoestruturas de forma a permanecerem no sistema circulatório tempo suficiente para atingirem o seu objectivo deverá ser entre 70 a 200 nm (Gaumet *et al.*, 2008). Assim as nanopartículas deverão ser pequenas o suficiente para não serem reconhecidas pelo SFM, podendo assim penetrar nos capilares tecidulares proporcionando uma distribuição mais eficiente nos tecidos (Pratsinis e Vemury, 1996). A carga da superfície das nanopartículas é igualmente determinante uma vez que limita a estabilidade das nanopartículas dada a propensão das mesmas em se aglomerarem na corrente sanguínea ou interagirem com a membrana celular (Mutsaers e Papadimitriou, 1988, Chouly *et al.*, 1996).

Neste trabalho foi estudada uma molécula anfifílica, o dextrino-VMA-SC<sub>16</sub> (dexC<sub>16</sub>). O dexC<sub>16</sub> é composto por uma cadeia hidrofílica principal, o dextrino, um biomaterial composto por unidades de glucose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1-4). O dextrino foi enxertado com grupos éster acrílico (metacrilato de vinilo: VMA), parcialmente derivatizados com cadeias alquílicas longas (16 carbonos) (Figura 1) (Gonçalves *et al.*, 2010a).



**Figura 1** - Síntese do dexC<sub>16</sub> (Gonçalves *et al.*, 2007).

Estudos anteriores demonstraram que o nanogel de dexC<sub>16</sub> possui uma forma esférica com cerca de 40 nm de diâmetro (Gonçalves e Gama, 2008), tendo-se ainda verificado que a densidade e a estabilidade do nanogel podem ser controladas alterando o grau de substituição com as cadeias hidrofóbicas (Akiyoshi e Sunamoto, 1996). O aumento do número de cadeias alquílicas na cadeia polimérica de dextrino leva a um aumento da densidade de cadeias hidrofóbicas por domínio hidrofóbico com consequente aumento da estabilidade do nanogel. No entanto, o grau de substituição, assim como a concentração, influenciam pouco o tamanho do nanogel (Gonçalves e Gama, 2008).

## 1.2 Nanopartículas de ferro

As nanopartículas de óxido de ferro possuem uma excelente combinação de biocompatibilidade, tamanho e propriedades magnéticas. Duas das suas estruturas principais são a magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) e a sua forma oxidada, a maguemite ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Apesar de possuírem uma estrutura cristalina semelhante, as suas propriedades magnéticas são diferentes (Shen *et al.*, 1993). Uma importante vantagem da maguemite é o superparamagnetismo, ou

seja, as nanopartículas permanecem dispersas e estáveis após remoção do campo magnético, uma vez que não retêm o magnetismo (Tartaj *et al.*, 2003). As nanopartículas magnéticas são actualmente classificadas como dispositivos médicos e aprovadas pela FDA para uso como agentes de contraste .

As nanopartículas de óxido de ferro têm aplicações muito diversificadas tais como o direccionamento de fármacos (Jain *et al.*, 2005), agentes de contraste em Imagiologia de Ressonância Magnética (IRM) (Schweiger *et al.*, 2011), biossensores (Miller *et al.*, 2002), tintas magnéticas para impressão a jacto (Charles e Popplewell, 1982), etc...

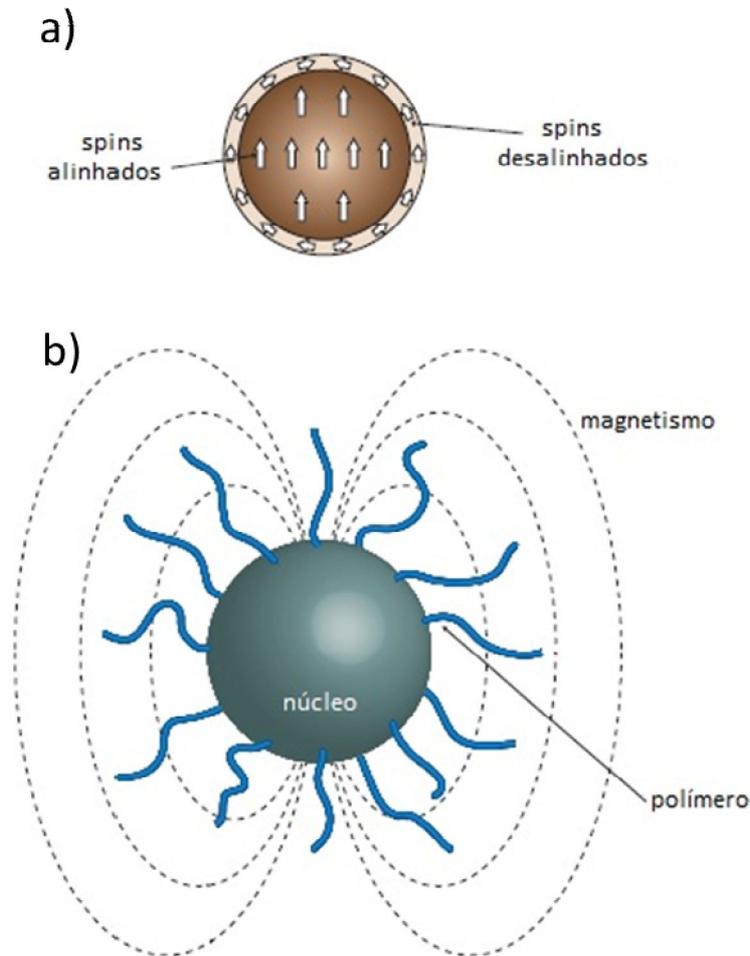
Na nanomedicina, o tamanho reduzido das nanopartículas de óxido de ferro permite-lhes inúmeras aplicações, tais como o tratamento do cancro por hipertermia (Jordan *et al.*, 2001), libertação controlada de agentes terapêuticos (Plank *et al.*, 2003), reparação de tecidos (Lobel *et al.*, 2000), separação celular (Said *et al.*, 2008), e como agentes de contraste em IRM devido ao elevado sinal de ressonância magnética por unidade de metal (Lalatonne *et al.*, 2008).

No tratamento por hipertermia as nanopartículas superparamagnéticas absorvem a energia de um campo magnético oscilante convertendo-a em calor, devido à perda de histerese magnética. Esta propriedade pode ser usada nos organismos para aumentar a temperatura do tecido tumoral destruindo as células cancerígenas, isto porque as células tumorais são mais sensíveis ao aumento da temperatura que as células saudáveis. O procedimento mais comum consiste em submeter o paciente a várias ondas magnéticas de 100 MHz. As células cancerígenas são destruídas a temperaturas superiores a 43 °C. Em contrapartida, as células saudáveis sobrevivem a temperaturas mais altas (Jordan *et al.*, 2001).

O carácter magnético das nanopartículas de ferro pode ser usado para direccionar o fármaco, complexado com o núcleo de ferro, para um alvo específico, através da aplicação de um campo magnético externo. Alexiou *et al.*, demonstrou que a aplicação de um campo magnético na zona tumoral induz a acumulação de nanopartículas e portanto do fármaco, na zona de interesse. Neste trabalho as nanopartículas de óxido de ferro foram revestidas com um derivado do amido com grupos fosfato ligados a um fármaco anti-

cancerígeno (mitoxantrona) (Alexiou *et al.*, 2006). Outros estudos mostram que as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro podem ser covalentemente ligadas a fármacos como o metotrexato (anti-cancerígeno). Neste estudo a superfície das nanopartículas foi modificada para inserção de um grupo amina que reage com um grupo carboxílico do fármaco formando uma ligação amida. Estudos com células mostram que este complexo é internalizado por linhas celulares cancerígenas (MCF-7 e HeLa) (Kohler *et al.*, 2005). Embora aparentemente simples, este processo de direcionamento requer atenção para determinadas variáveis tais como as propriedades físico-químicas da ligação do agente terapêutico ao transportador, a intensidade do campo magnético, o fluxo sanguíneo e a densidade do tecido alvo.

As nanopartículas de ferro superparamagnéticas têm a capacidade de aumentar a velocidade de relaxação dos prótons das moléculas de água (na sua vizinhança) presentes nos tecidos, actuando como agente de contraste em IRM, melhorando o contraste da imagem. A IRM resulta da exposição de uma amostra de tecido (animal) a um campo magnético externo e pulsos de excitação na forma de radiofrequências. O tratamento do sinal gerado pelo processo de relaxação de núcleos magnéticos, dos quais o hidrogénio,  $^1\text{H}$ , é o mais abundante nos tecidos humanos, gera imagens anatómicas tridimensionais de alta resolução espacial úteis em diagnóstico e no prognóstico de uma grande variedade de doenças, especialmente em tecidos moles. O campo magnético externo aplicado às nanopartículas de ferro leva ao alinhamento dos spins magnéticos gerando um momento de dipolo magnético nas nanopartículas (Figura 2a). Os prótons das moléculas de água “dentro” (na vizinhança) do campo magnético gerado pelas nanopartículas (Figura 2b) têm tempos de relaxação muito mais curtos que as moléculas de água “fora” do campo magnético. Portanto, a acumulação de nanopartículas de ferro num determinado local (órgão ou tecido) resulta num aumento de contraste em imagens de IRM. Esta modalidade de imagem é vantajosa em relação a outras modalidades, tais como tomografia por emissão de positrões, cintigrafia, na medida em que não é invasiva e não envolve radiação ionizante (Gil e Geraldes, 1987, Petersen *et al.*, 1985).



**Figura 2** – Propriedades magnéticas de nanopartículas de óxido de ferro. Adaptado de (Boyer *et al.*, 2010). (a) Alinhamento dos spins magnéticos por aplicação de um campo magnético. Desorganização de spins à superfície devida à falta de organização cristalina. (b) Campo magnético gerado pelas nanopartículas de óxido de ferro.

A intensidade do sinal de IRM de uma amostra de tecido depende de factores extrínsecos (a sequência de pulsos; intensidade do campo magnético) e das propriedades inerentes dos tecidos (densidade de prótons; tempo de relaxação longitudinal,  $T_1$ ; tempo de relaxação transversal,  $T_2$ ; susceptibilidade magnética e movimento do tecido mole). Na prática,  $T_1$  e  $T_2$  são os factores de maior influência no contraste de imagem em imagiologia. No entanto, em determinados tecidos as variações intrínsecas em  $T_1$  e  $T_2$  são demasiado pequenas, pelo que a obtenção do contraste se torna difícil, sendo por isso necessário recorrer a agentes de contraste. Estes são mais eficientes quanto maior a interacção magnética com o núcleo do próton de hidrogénio, influenciando os tempos de relaxação (Krishnan, 2010). Os agentes de

contraste devem ser capazes de alterar favoravelmente os parâmetros que determinam o contraste e fazê-lo em concentrações mínimas de forma a minimizar a dose de exposição e evitar uma potencial toxicidade (Nelson e Runge, 1995).

O aumento do sinal produzido em IRM por um agente de contraste depende da sua relaxividade ( $r_1$  e  $r_2$ ). A relaxividade de um material, expressa em  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , é definida como o aumento da velocidade de relaxação ( $R_1=1/T_1$  e  $R_2=1/T_2$ ) produzida por 1mmol por litro de agente de contraste (Bloch *et al.*, 1946).

A grande maioria dos agentes de contraste usados actualmente são os quelatos de gadolínio (III). Este ião possui sete electrões desemparelhados, fazendo dele o ião metálico mais paramagnético. O ferro (III) possui 5 electrões desemparelhados tornando-o assim num material de interesse como agente de contraste em IRM (Tóth *et al.*, 2002). Devido à sua elevada relaxividade transversal, as suspensões superparamagnéticas são boas candidatas a agentes de contraste (Mendonca Dias e Lauterbur, 1986).

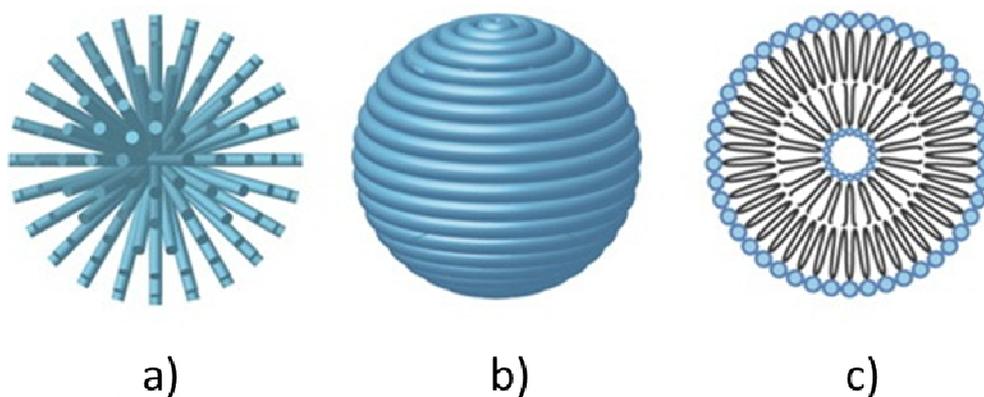
Muitos investigadores têm dedicado o seu trabalho à síntese de nanopartículas de óxido de ferro uma vez que o método é determinante na composição, distribuição de tamanhos, carga superficial e morfologia das nanopartículas (Mornet *et al.*, 2006). Estes parâmetros influenciam directamente as propriedades físicas, assim como a facilidade com que são eliminadas e o perfil de biodistribuição (Chouly *et al.*, 1996). A qualidade, estabilidade e performance das nanopartículas depende em grande parte do controlo da intensidade das forças electroestáticas e repulsão estérica. As forças estéricas são difíceis de prever e quantificar uma vez que dependem do peso molecular e densidade do agente dispersante e da química da superfície (Fritz *et al.*, 2002, Schwertmann e Cornell, 1991).

A síntese de nanopartículas de ferro é possível através de diferentes métodos, tais como, síntese hidrotérmica, sol-gel, electroquímica, sonoquímica, decomposição por hidrólise ou termólise de precursores organometálicos e *electrospray*. O primeiro desafio consiste em otimizar as condições experimentais que dêem origem a populações monodispersas. O segundo depara-se com a reprodutibilidade do processo para que possa ser

industrializado evitando procedimentos de purificação complexos como ultracentrifugação (Sjogren *et al.*, 1997), cromatografia de exclusão (Nunes e Yu, 1987) e filtração magnética (Babes *et al.*, 1999). Parâmetros como o pH da solução têm um papel fundamental nas propriedades das nanopartículas (Tsai *et al.*, 2010), assim como a razão  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  e o tipo de sais usados, desde cloretos, sulfatos, nitratos, percloratos, entre outros (Sjogren *et al.*, 1994, Hadjipanayis e Siegel, 1993).

O método mais comum de síntese de nanopartículas magnéticas é a co-precipitação de sais de ferro. Este é possivelmente o método mais simples e eficiente. A adição de quelantes orgânicos, tais como ácido cítrico (Sahoo *et al.*, 2005), ácido glucónico (Fauconnier *et al.*, 1996) ou ácido oleico (Jain *et al.*, 2005) ou agentes de revestimento como dextrano, álcool polivinílico (Pardoe *et al.*, 2001) ou amido (Kim *et al.*, 2009), durante a síntese das nanopartículas magnéticas pode ajudar no controlo do seu tamanho e estabilidade (Laurent *et al.*, 2008). A carga da superfície das nanopartículas é determinante para a sua estabilidade (Mutsaers e Papadimitriou, 1988, Chouly *et al.*, 1996). A caracterização e medição da carga da superfície das nanopartículas é realizada através do potencial zeta. Para partículas carregadas, as interações repulsivas aumentam com o potencial zeta, originando partículas estáveis e com uma distribuição de tamanhos uniforme. Uma suspensão estabilizada através de repulsões electroestáticas deve ter um potencial zeta superior a  $\pm 30$  mV (Muller *et al.*, 2001).

Tsai *et al.* desenvolveu um método de revestimento de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas com quitosano de forma a aumentar o seu conteúdo em magnetite. Neste método sais de ferro ( $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ) co-precipitam numa matriz porosa de quitosano em solução aquosa de ácido acético, por irradiação com raios  $\gamma$ . As partículas obtidas têm tamanho 87,2 nm, potencial zeta 47,9 mV, 10,4 mg Fe/mL e razão  $r_2/r_1$  de 9,2, sendo  $r_1$  22,0  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  e  $r_2$  202,6  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Tsai *et al.*, 2010). Recentemente, Bautista *et al.* descreveu um método de revestimento de nanopartículas de óxido de ferro preparadas através de dois métodos distintos: pirólise e co-precipitação. Neste caso o agente de revestimento utilizado foi o dextrano, tendo sido obtida uma melhor dispersão pelo método de pirólise. (Bautista *et al.*, 2005).



**Figura 3** – Diferentes tipos de revestimento (Sun *et al.*, 2008). (a) Polímero enxertado na NP. (b) NP completamente revestida pelo polímero. (c) NP revestida através de lipossoma.

Exemplos de agentes de revestimento biocompatíveis são o dextrano carboximetilado (Pollert *et al.*, 2006), carboxidextrano (Lawaczeck *et al.*, 1997), glicosaminoglicano (Sjogren *et al.*, 1997), poloxámero (também conhecido por plurónico) (Jain *et al.*, 2005), polivinilpirrolidona (Ma e Li, 1990), polialquilcianoacrilato (Arias *et al.*, 2005), ácido poliláctico (Gómez-Lopera *et al.*, 2006) ou arabinogalactana (Weissleder *et al.*, 1990). As nanopartículas de óxido de ferro podem também ser revestidas com materiais inorgânicos como a sílica (Zhang *et al.*, 2007), ouro (Chen *et al.*, 2003) ou complexos de gadolínio (III) (Shepherd *et al.*, 1970), proporcionando não só estabilidade às nanopartículas assim como uma maior facilidade de ligação de vários ligandos na sua superfície.

Duan *et al.*, demonstrou a influência da química da superfície e do tamanho na relaxividade das nanopartículas de óxido de ferro. Com este objectivo revestiu nanopartículas de ferro, de 10 e 30 nm de diâmetro, com ácido oleico, polietilenoimina (PEI) e polietilenoglicol enxertado com polietilenoimina (PEG-PEI). Os resultados demonstraram que a relaxividade é fortemente dependente da hidrofiliicidade do revestimento. A máxima relaxividade ( $r_2$ ) foi obtida para nanopartículas de óxido de ferro revestidas com PEI (hidrofílico) enquanto o revestimento com ácido oleico (hidrofóbico) resulta numa relaxividade inferior. Verificou-se também que o tamanho das nanopartículas influencia a relaxividade sendo que um aumento no tamanho resulta num aumento da relaxividade. (Duan *et al.*, 2008). Concluiu-se assim que revestimentos com polímeros hidrofóbicos ou anfífilicos conduzem à diminuição da relaxividade

que poderá dever-se à presença de uma barreira hidrofóbica que dificulta o contacto dos prótons da água com os núcleos magnéticos, reduzindo a relaxividade do próton (Duan *et al.*, 2008).

A estabilidade estérica pode também ser providenciada por dispersantes de baixo peso molecular, como grupos âncora de alta afinidade, que podem ser ligados covalentemente a uma cadeia polimérica hidrofílica. Derivados do catecol são um exemplo de grupos âncora pois permitem uma ligação irreversível ao óxido de ferro, dispersando as nanopartículas superparamagnéticas sob condições fisiológicas. Exemplos de grupos âncora são o L-DOPA e o derivado deste, a dopamina (Amstad *et al.*, 2009a). Amstad *et al.* estudou a estabilização de nanopartículas de óxido de ferro com oito derivados do catecol acoplados com PEG 5KDa. Os grupos nitroDOPA e nitrodopamina mostraram-se altamente eficientes na estabilização das nanopartículas de óxido de ferro possibilitando a sua diluição e aquecimento sem aglomeração (Amstad *et al.*, 2009b, Gao *et al.*, 2008).

Jain *et al.*, desenvolveu um novo sistema de direccionamento de drogas anti cancerígenas, estabilizando o óxido de ferro com um duplo revestimento de ácido oleico e um co-polímero de polióxipropileno (PPO) e polióxietileno (PEO), mais conhecido como plurónico. O ácido oleico é adsorvido quimicamente como um carboxilato na superfície das nanopartículas de ferro, e poderá solubilizar um fármaco hidrofóbico. A parte hidrofóbica do plurónico irá interagir com o ácido oleico ficando exposta a parte hidrofílica do co-polímero. Desta forma o co-polímero serve para estabilizar o complexo. O fármaco é solubilizado pelo ácido oleico em torno do núcleo magnético. Foi ainda verificado que a presença do fármaco não influencia as propriedades magnéticas do núcleo de óxido de ferro (Jain *et al.*, 2005).

Actualmente existem no mercado duas formulações de óxido de ferro aprovadas como agentes de contraste para aplicação intravenosa, em particular em IRM de lesões no fígado e baço e tumores (Kim *et al.*, 2001, Lawaczeck *et al.*, 2004). Os ferumóxidos, revestidos com dextrano são comercializados sob o nome *Endorem*<sup>®</sup> na Europa e *Feridex*<sup>®</sup> nos Estados Unidos da América e Japão. Possuem um diâmetro hidrodinâmico entre 50 - 180 nm e relaxividades de 40,0 e 160,0 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> para  $r_1$  e  $r_2$ , respectivamente. A

dose recomendada é de 15  $\mu\text{mol Fe/Kg}$  com uma concentração de 11,2 mg/mL ou 201 mM de ferro (Runge, 2000, Advanced Magnetics, 2007). O Resovist<sup>®</sup> é um ferucarbotrano, e como o próprio nome indica, o óxido de ferro encontra-se revestido com carboxidextrano. O seu tamanho hidrodinâmico encontra-se entre 45 - 60 nm e possui  $r_1$  de 7,20 e  $r_2$  de 82,0  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ . A dose recomendada é entre 5,8 - 12,9  $\mu\text{mol/Kg}$  com uma concentração de 28 mg/mL ou 500 mM de ferro (Schering, 2002).

Os principais objectivos deste trabalho são a incorporação/estabilização de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas num nanogel de dextrino, obtendo-se um nanomagnetogel. Pretende-se otimizar o nanomagnetogel de forma a estabilizar a máxima quantidade de ferro e ainda caracterizar física e quimicamente as formulações, assim como realizar ensaios de biocompatibilidade. Pretende-se avaliar as propriedades do nanomagnetogel para perceber as suas potencialidades como sistema de transporte de agentes terapêuticos ou como agente de contraste em imagiologia.

Para a realização de estudos de biodistribuição, o nanomagnetogel foi funcionalizado com um agente quelante do tipo DOTA:  $\text{DO}_3\text{A-N}-(\alpha\text{-cistamido})\text{propionato}$  ( $\text{DO}_3\text{A}$ ) (Ferreira *et al.*, 2009). Este conjugado de cisteína do agente  $\text{DO}_3\text{A-N-}\alpha\text{-aminopropionato}$ , forma complexos com iões lantanídeo (III) caracterizados por uma grande estabilidade cinética e termodinâmica, fundamental para estudos *in vivo*. A marcação do agente quelante com radioisótopos (por exemplo  $^{153}\text{Sm}^{3+}$ ) permite realizar estudos de biodistribuição sem alterar as características originais do nanogel (nomeadamente tamanho e carga superficial) devido à formação de complexos neutros.

## 2 Materiais e métodos

---

### 2.1 Materiais

Neste trabalho foi utilizado dextrino-VMA-SC<sub>16</sub> sintetizado anteriormente (Gonçalves *et al.*, 2007), essencialmente composto por uma cadeia principal hidrofílica, o dextrino, enxertado com grupos de éster acrílico (VMA) que são parcialmente substituídos por longas cadeias alquílicas (SC<sub>16</sub>) (Gonçalves *et al.*, 2007). O grau de substituição (número de moléculas por 100 resíduos de glucose) foi 18,0% para o VMA (DS<sub>VMA</sub>) e 6,0% para o SC<sub>16</sub> (DS<sub>SC16</sub>) Este material uma vez modificado foi liofilizado e armazenado na forma de pó.

As nanopartículas de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (159,7 g/mol) foram preparadas e fornecidas por investigadores do Hospital de *Avicenne, Bobigny*, França. A solução fornecida (pH 2,0) tem uma concentração de óxido de ferro de 11,7 mg/mL ou 73,3 mM. De forma resumida, para a obtenção das nanopartículas de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, uma solução aquosa de cloreto de ferro II (FeCl<sub>2</sub>) precipitou em presença de um surfactante, lauril sulfato de sódio (NaLS), ocorrendo a formação de cristais de Fe(LS)<sub>2</sub>. A oxidação dos iões Fe<sup>2+</sup> localizados na superfície das micelas (Fe(LS)<sub>2</sub>) e em presença de uma base fraca, deu origem ao hidróxido de ferro (Fe(OH)<sub>2</sub>), através da complexação dos iões OH<sup>-</sup> com os iões Fe<sup>2+</sup>. Em presença de água e à temperatura ambiente, o Fe(OH)<sub>2</sub> oxidou, formando magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) seguida de maguemite ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

Para os estudos *in vitro* foram usadas células primárias, nomeadamente macrófagos derivados da medula óssea de ratinho e uma linha celular de fibroblastos 3T3 obtidos a partir de embriões de ratinho (ATCC CCL-164). Os fibroblastos foram cultivados em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS; Invitrogen, UK), e 1% de penicilina/estreptomicina. Os macrófagos foram diferenciados e cultivados em RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% L929 *cell conditioned medium* (LCCM), 10 % FBS, 1 % HEPES (Sigma, St. Louis, MO), 0,6 % penicilina/estreptomicina e 0,05 %  $\beta$ -mercaptoetanol.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Preparação das formulações

O dexC<sub>16</sub> foi disperso em água destilada com aquecimento constante a cerca de 50 °C e sob agitação magnética durante cerca de 5 horas. A dispersão resultante foi filtrada com filtro de seringa de 0,20 µm e foi adicionado um determinado volume da solução mãe de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (11,7 mg/mL) de forma a obter a concentração de ferro pretendida. O pH foi ajustado (pH 7,0) após a adição do ferro. As amostras foram deixadas na roda giratória *overnight* para permitir a incorporação do ferro no nanogel. De seguida a dispersão foi centrifugada (Megafuge 1.0, Heraeus Sepatech) à temperatura de 4 °C, a 3000 g, durante 10 minutos, para precipitar o ferro não estabilizado e recuperar o sobrenadante que contém o nanogel com ferro estabilizado. As formulações foram armazenadas a 4 °C.

Na tabela 1 apresentam-se as formulações preparadas usando nanogel na concentração 0,5 mg/mL.

**Tabela 1** - Volume (mL) de solução de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (11,7 mg/mL ou 73,3 mM) adicionado por cada mL de dispersão de nanogel (0,5 mg/mL).

Nanomagnetogel	Volume (mL) de $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /mL	[Fe] adicionado (mM)
1	0,010	1,46
2	0,020	2,93
3	0,040	5,86
4	0,075	10,99

## 2.2.2 Caracterização físico-química

### 2.2.2.1 Incorporação de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

Para avaliar a capacidade do nanogel incorporar/estabilizar nanopartículas de ferro, foi determinada a concentração de ferro nas formulações preparadas (Tabela 1), por absorção atômica na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP).

### 2.2.2.2 Avaliação da distribuição de tamanhos e estabilidade por DLS

A distribuição de tamanhos (z-avg) e índice de polidispersividade (Pdl) das formulações preparadas foi analisada por *Dynamic Light Scattering* (DLS) usando o equipamento Malvern Zetasizer NANO ZS (Malvern Instruments Limited U.K.). Esta técnica avalia a difracção da luz após atravessar a amostra, que é colocada numa cuvete no porta-amostras do equipamento. A medição foi efectuada usando um laser de He-Ne de 633 nm de comprimento de onda ( $\lambda$ ) e com ângulo de detecção de 173 °. As formulações foram analisadas ao longo de 4 semanas tendo sido mantidas a 4 °C. Para cada formulação foram realizadas cinco medições consecutivas, sendo apresentado o tamanho (diâmetro) e Pdl médios assim como os respectivos desvio padrão.

### 2.2.2.3 Visualização por microscopia

De forma a perceber o tamanho e forma do nanogel, foram realizados estudos através de Crio-Microscopia Electrónica de Varrimento (crio-MEV). Durante a preparação, a amostra foi colocada num suporte e depois mergulhada em azoto líquido, -95 °C, durante 2 minutos. De seguida foi transferida para uma câmara em vácuo, Alto 2500 (Gatan Inc, CA), que se encontrava ligada ao MEV, JEOL JMS 6301 F. A amostra congelada foi fracturada a -95 °C. Este método possibilita a preservação da estrutura da amostra, devido à rapidez com que é congelada, sendo que a fractura proporciona um corte limpo

evitando a deformação da mesma. Antes de ser revestida com ouro-paládio (2 minutos), a amostra foi sublimada durante 10 segundos de forma a expor o nanogel. A visualização foi efectuada a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  e as imagens analisadas através de *ImageJ*.

Foi observado o nanogel sem ferro, numa concentração de 5,0 mg/mL. Usou-se uma concentração mais alta de nanogel para facilitar a visualização, isto porque, quando se usam concentrações baixas pode ser difícil encontrar nanogel na superfície fracturada. Com o aumento da concentração é mais provável encontrar o nanogel. Quanto ao  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @nanogel observou-se a formulação com maior quantidade de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (1,41 mM de ferro estabilizado).

O estudo por Microscopia Electrónica de Transmissão (MET) foi efectuada por investigadores do Hospital de *Avicenne, Bobigny*, França. As imagens MET foram obtidas através de um Microscópio FEI CM10 (Philips). As amostras foram preparadas colocando uma gota da formulação sobre uma grelha de MET (grelha de cobre coberta com carbono). A amostra foi observada após evaporação do solvente.

#### **2.2.2.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIV)**

A espectroscopia é o processo analítico baseado nas propriedades de absorção, emissão e reflexão de energia electromagnética numa região específica do espectro. A espectroscopia de infravermelho (IV) compreende a região do espectro electromagnético de comprimentos de onda entre 670 e  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Absorções de energia desta magnitude provocam perturbações nas frequências específicas das diferentes ligações químicas. Ou seja, a frequência de cada ligação corresponde a um nível vibracional e depende da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrónico. Deste modo, grupos funcionais distintos apresentam absorção com intensidade e em regiões distintas do espectro, fazendo da espectroscopia de infravermelho, uma metodologia bastante útil na identificação de compostos orgânicos.

Para a análise de sólidos, especialmente sob a forma de pó, a utilização de pastilha de KBr é recomendada. A preparação da pastilha é importante uma vez que a qualidade do espectro é directamente afectada pela qualidade da pastilha de KBr. A pastilha deve ser translúcida pois caso contrário pode resultar num espectro de baixa resolução, uma vez que pouca radiação infravermelha irá passar através da amostra.

Para a preparação da amostra, colocou-se 400 mg de KBr num almofariz e adicionou-se 2 mg de amostra. A mistura foi moída até obtenção de um pó fino e homogéneo. Montou-se o molde conforme descrito no manual e colocou-se no mesmo uma quantidade suficiente da mistura. Pressionou-se o molde por cerca de 5 minutos, utilizando prensa hidráulica, a fim de formar a pastilha. Desmontou-se o molde e retirou-se cuidadosamente a pastilha de KBr formada, evitando a sua quebra e colocando-a imediatamente no suporte de pastilha para análise. Antes da leitura da amostra no espectrofotómetro (Nicolet 380 FT IR Thermo Electro Corporation) fez-se uma leitura de background.

### **2.2.2.5 Propriedades magnéticas**

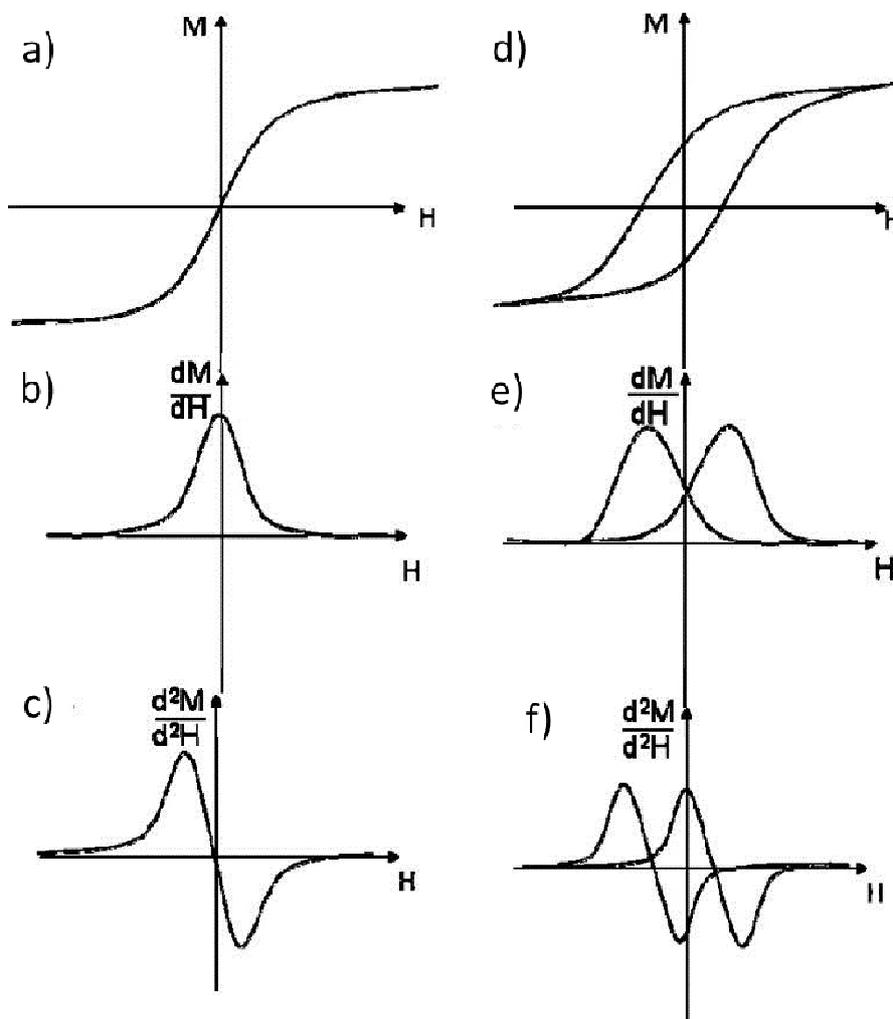
Os estudos de relaxividade foram realizados no Departamento de Bioquímica da Universidade de Coimbra com um Relaxómetro Bruker Minispec mq20 (20 MHz,  $B_0 = 0,47$  T,  $T = 25$  °C). A relaxividade do composto foi medida a 20 MHz.

A empresa *Magnisense* (Paris) desenvolveu dois sensores, MIAtek e MIAplex (*Magnetic Immunoassay technology and multiplex*, respectivamente). O sensor MIAtek mede o sinal proporcional à terceira derivada da magnetização num campo magnético zero (Lenglet *et al.*, 2008). O sinal MIAtek é muito sensível e é proporcional à quantidade de partículas magnéticas, permitindo detectar material superparamagnético na ordem dos nanogramas.

O MIAplex mede o sinal proporcional à segunda derivada da curva de magnetização (Lenglet, 2009). As curvas obtidas pelo MIAplex permitem concluir acerca do comportamento magnético das nanopartículas. O comportamento superparamagnético tem uma curva característica. Essa curva

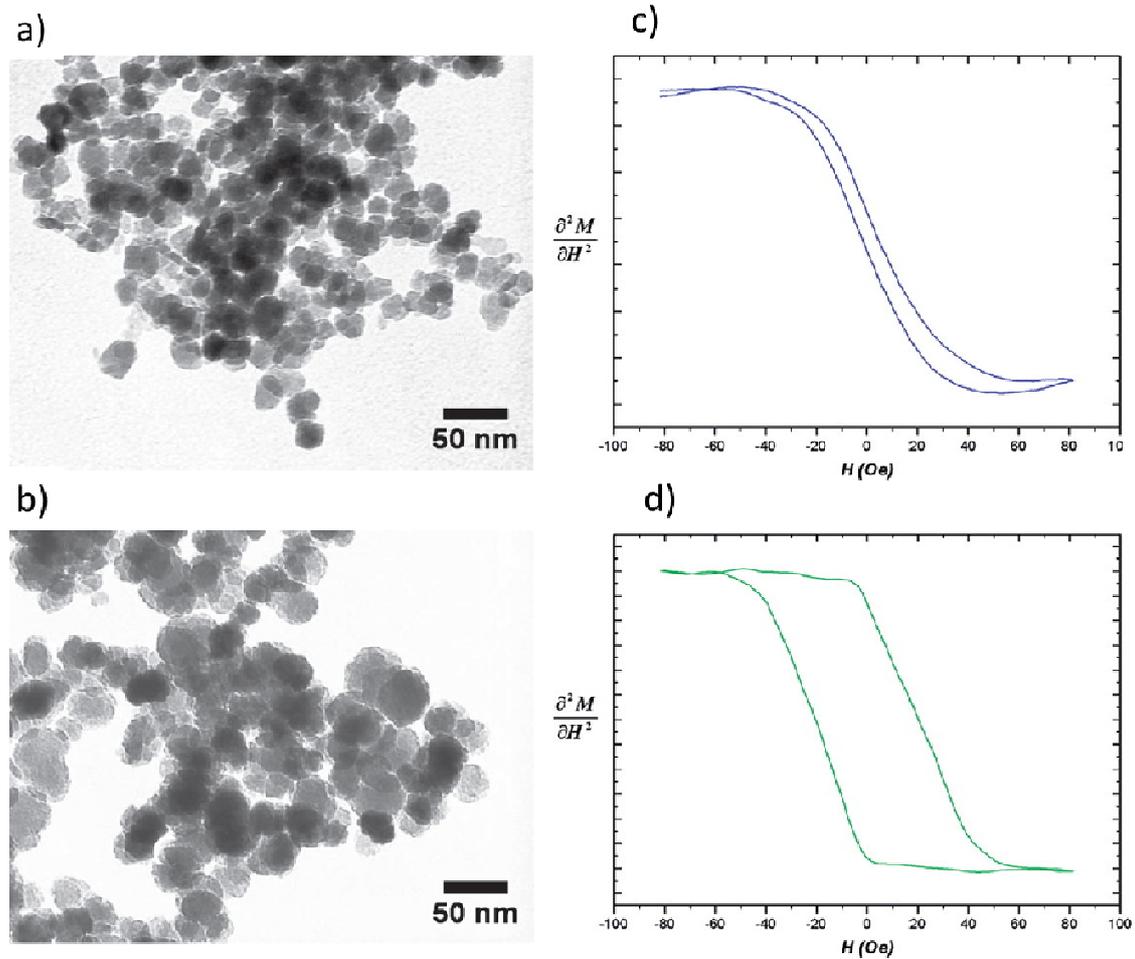
pode ainda dar indicações acerca das interações dipolares entre as nanopartículas (Lalatonne *et al.*, 2009).

As curvas de magnetização típicas, assim como as respectivas primeira e segunda derivadas estão representadas na figura 4, para nanopartículas superparamagnéticas pequenas (a-c) e para nanopartículas ferromagnéticas maiores (d-f) (Alphandérya *et al.*, 2010). Como mostra a figura, a segunda derivada da curva de magnetização passa por zero para nanopartículas superparamagnéticas, enquanto tal não acontece para nanopartículas ferromagnéticas. Esta diferença constitui portanto um critério de diferenciação.



**Figura 4** – Curvas de magnetização (Alphandérya *et al.*, 2010 ) (a, d), primeira derivada (b, e) e segunda derivada (c,f) para nanopartículas superparamagnéticas (a, b, c) e partículas ferromagnéticas (d, e, f).

No que refere a nanopartículas superparamagnéticas, o tamanho das nanopartículas e as interações dipolares entre elas, influenciam significativamente a curva da segunda derivada da magnetização (curva MIAplex). A figura 5 mostra a influência do tamanho, comparando partículas de 20 e 40 nm, na curva MIAplex (Lalatonne *et al.*, 2009).



**Figura 5** – Imagens de MET (a e b) e curvas de MIAplex (c e d) de nanopartículas de óxido de ferro com 20 nm (a e c) e 50 nm (b e d) (Lalatonne *et al.*, 2009)

Para ambas as técnicas as análises foram realizadas à temperatura ambiente tendo sido utilizados 10  $\mu\text{L}$  de amostra para o MIAtek e 200  $\mu\text{L}$  para o MIAplex.

### 2.2.3 Interacção com células

Os fibroblastos 3T3 foram cultivados em DMEM completo, como indicado em 2.1.

Os macrófagos foram obtidos por diferenciação de células da medula óssea de ratinho. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os respectivos fémures foram removidos em condições assépticas. O meio de cultura RPMI 1640 incompleto foi usado na lavagem do osso e consequente remoção da medula. A suspensão foi deixada a repousar sendo o sobrenadante posteriormente centrifugado durante 10 minutos a 500 g e 4 °C. O *pellet* resultante foi resuspenso em meio RPMI 1640 suplementado com 10% LCCM (RPMI completo). Para remoção de fibroblastos ou macrófagos diferenciados, as células foram cultivadas em placas de petri (Starstedt, Canadá) e incubadas a 37 °C com 5% atmosfera CO<sub>2</sub>. As células não aderentes foram centrifugadas durante 10 minutos a 500 g e 4 °C e o *pellet* resuspenso em RPMI completo aquecido, sendo distribuídas em placas de 24 poços com uma densidade celular de  $5,0 \times 10^5$  células/poço e incubadas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. No quarto dia após a sementeira das células, o meio foi reforçado com 10% LCCM em cada poço sendo renovado ao sétimo dia. As amostras foram aplicadas no nono dia, altura em que os macrófagos estão já completamente diferenciados (Torrado *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2008).

Na preparação das formulações para os estudos com células, o dexC<sub>16</sub> foi disperso em água destilada (2,5 mg/mL) com uma concentração 5 vezes superior à que se pretende aplicar nas células, para posterior diluição em meio de cultura, de forma a resultar numa concentração final de nanogel de 0,5 mg/mL. A quantidade de ferro adicionada ao nanogel foi também 5 vezes superior à que se pretende testar nas células. As concentrações de ferro (adicionado) testadas com as células foram 1,46 e 10,99 mM. O controlo com nanopartículas de ferro, sem incorporação no nanogel, foi efectuado apenas para a concentração de ferro 1,46 mM. As amostras foram centrifugadas como referido anteriormente (2.2.1) para recuperação do ferro estabilizado, no sobrenadante, e depois filtradas (filtro estéril de 0,20 µm) de forma a garantir condições assépticas. As amostras foram armazenadas a 4 °C. A diluição de

cada formulação em meio de cultura foi realizada momentos antes da sua aplicação nas células.

### **2.2.3.1 Estudo de viabilidade celular: Ensaio de MTT**

O ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; Sigma Aldrich) é usado para determinar viabilidade celular. Este ensaio é baseado na redução dos sais de tetrazólio, por desidrogenases e reductases associadas à cadeia respiratória mitocondrial, sendo por isso activo apenas na presença de células viáveis. Esta redução resulta na formação de cristais de formazano de coloração púrpura no interior das células (Mosmann, 1983, Nicolau *et al.*, 1999).

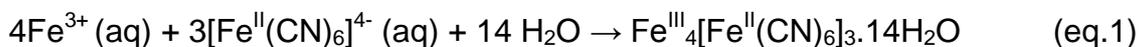
No ensaio de MTT as células foram semeadas em placas de 24 poços (Sarstedt, Canada) tendo-se usado uma densidade celular de  $2,25 \times 10^4$  e  $5,0 \times 10^4$  células/poço para os fibroblastos e macrófagos, respectivamente. Após a sementeira, as células ficaram a aderir durante 24 horas. Após esse período o meio de cultura foi removido e foram aplicadas as formulações a testar. Os ensaios de viabilidade foram realizados após diferentes tempos de incubação: 24 h e 48 h, tendo sido efectuadas 3 réplicas para cada formulação. No momento de aplicação das formulações (0h) foi quantificado o número de células, pela adição de MTT, com o objectivo de avaliar o crescimento celular ao longo do ensaio.

O MTT foi dissolvido em água desionizada a 5,0 mg/mL protegido da luz, e filtrado num filtro de 0,20  $\mu\text{m}$  em condições estéreis. A solução foi adicionada às células (100  $\mu\text{L}$  em 1000  $\mu\text{L}$ ) obtendo-se uma concentração final de MTT em meio de cultura de 0,5 mg/mL. As células foram de novo incubadas a 37 °C e atmosfera 5%  $\text{CO}_2$  durante 3 horas. Após esse período de tempo o meio de cultura foi removido, e os cristais formados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) para posterior quantificação em placa de 96 poços (Sarstedt, Canada) (100  $\mu\text{L}$ ) no leitor de microplacas ELISA (Synergy HT, BIOTEK), a 550 e 690 nm. A cada amostra foi subtraído o valor da densidade óptica da placa de 96 poços (690 nm). A absorvância da solução púrpura de formazano é directamente proporcional ao número de células viáveis.

### 2.2.3.2 Estudo de internalização: Microscopia

No estudo de internalização, as células foram semeadas em lamelas com uma densidade celular de  $2,2 \times 10^5$  células/poço e incubadas para aderir durante 24 h. Após a adesão, o meio de cultura foi removido e foram aplicadas as formulações e incubadas durante 3h. Após esse período de tempo, as células foram lavadas três vezes com PBS para remover o ferro que não foi internalizado pelas células. As células foram incubadas durante um período de 30 minutos com o azul da prússia. A internalização de ferro foi verificada através de um microscópio óptico invertido LEICA, por coloração com azul da prússia. Para obtenção do azul da prússia, 5% de ferrocianeto de potássio,  $K_4Fe(CN)_6$ , foram misturados numa razão de 1:1 com 5% de HCl (Buser *et al.*, 1977, Tsai *et al.*, 2010).

A reacção do  $Fe^{3+}$  com  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  resulta numa intensa coloração azul (Tafesse, 2003). A formação do azul da prússia pode ser descrita da seguinte forma (equação 1) (Verdaguer *et al.*, 2002):

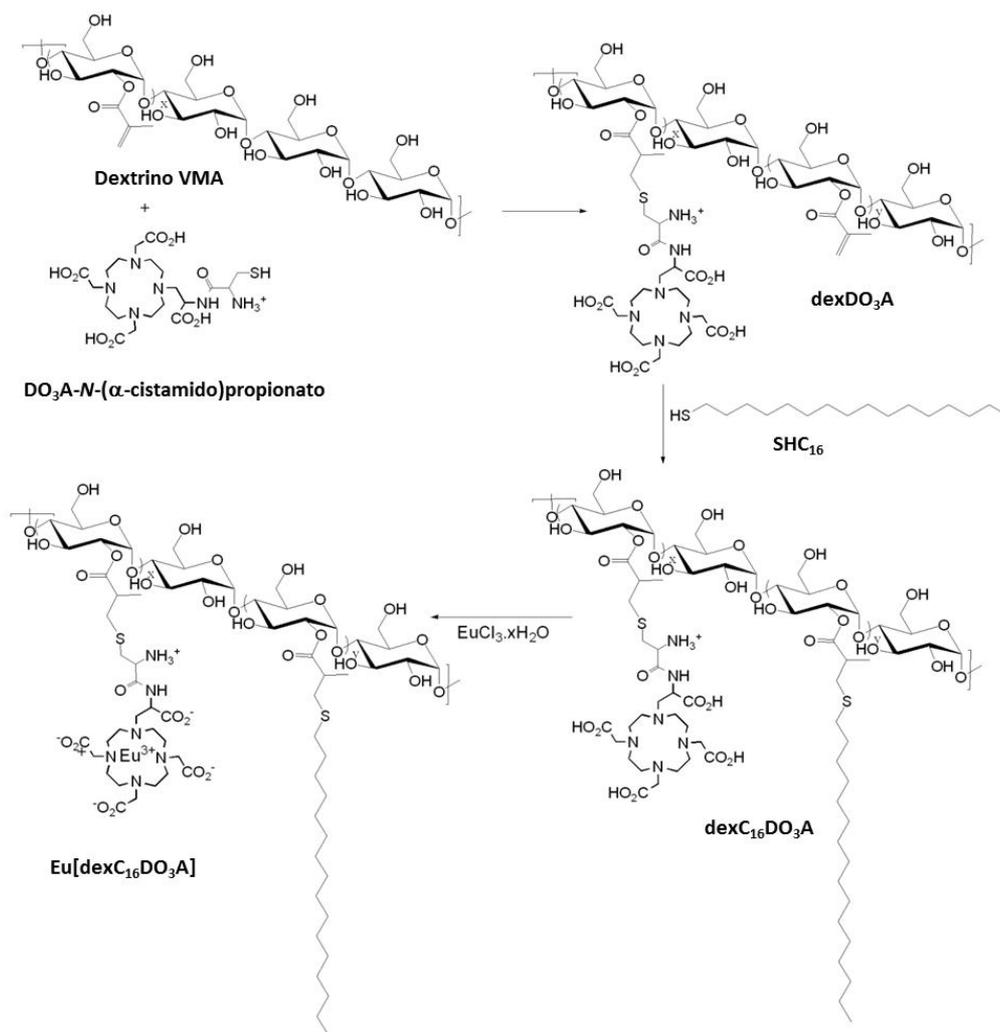


### 2.2.4 Funcionalização do nanogel para estudos de biodistribuição

No desenvolvimento de um nanosistema para aplicações biomédicas é importante conhecer o seu comportamento (tempo de circulação na corrente sanguínea) e distribuição pelos órgãos, após administração. Para tal, o nanosistema terá de ser acompanhado/visualizado após a sua administração. Com este objectivo, o nanogel de dextrino foi ligado covalentemente a um agente quelante,  $DO_3A$ , funcionalizado com um grupo tiol. Os agentes quelantes macrocíclicos do tipo DOTA complexam iões lantanídeo (III) ( $Ln(III)$  = Sm, Eu, Gd, etc...) formando complexos caracterizados por grande estabilidade cinética e termodinâmica. A marcação do nanogel com radioisótopos (por exemplo  $^{153}Sm^{3+}$ , emissor gama), permite localizar, quantificar e visualizar o nanogel após administração. As radiações  $\gamma$  são

emissões de natureza electromagnética, isto é, são fotões de massa desprezível e sem carga eléctrica. A capacidade da radiação  $\gamma$  atravessar os tecidos faz com que possa ser captada (medida) no exterior do corpo fornecendo informação sobre a localização do isótopo emissor. No entanto é importante garantir que a ligação do agente quelante e complexação com o metal não altera as características originais do nanosistemas, nomeadamente tamanho e carga.

Estudou-se a complexação do nanogel funcionalizado com DO<sub>3</sub>A, um ião lantanídeo “frio” (não radioactivo), Eu<sup>3+</sup>, uma química de coordenação semelhante à do Sm<sup>3+</sup>. O agente quelante (DO<sub>3</sub>A) foi ligado covalentemente ao dexVMA (DS<sub>VMA</sub> 17,4%). DexVMA (100 mg) e DO<sub>3</sub>A (25 mg, 50% mol para grupos VMA) foram dissolvidos em DMSO (concentração grupos VMA 0,0413 mol/L) usando trietilamina como catalisador (3 equivalentes para grupos VMA). A reacção decorreu sob agitação magnética, durante 24 h a 50 °C. A ligação da cadeia alquílica (SC<sub>16</sub>) fez-se de seguida, tendo-se adicionado à mistura reaccional a quantidade de hexadecanotiol necessária para a obtenção de um grau de substituição (DS<sub>C16</sub>) aproximado de 6,0%. A mistura reaccional foi dialisada contra água destilada (com várias trocas de água) para remover reagentes em excesso e trocar o solvente por água. No final, o produto da reacção, dexC<sub>16</sub>DO<sub>3</sub>A (Figura 6), foi liofilizado e armazenado na forma de pó a 4 °C.



**Figura 6** – Funcionalização do dexC<sub>16</sub> com o agente quelante DO<sub>3</sub>A e complexação com o íon lantanídeo (Eu<sup>3+</sup>).

A marcação do nanomagnetogel com radioisótopos (<sup>153</sup>Sm<sup>3+</sup>) para estudos de biodistribuição pode ser feita de dois modos diferentes: marcar primeiro o nanogel com o radioisótopo e proceder de seguida à preparação do nanomagnetogel; ou preparar primeiro o nanomagnetogel e fazer a marcação de seguida. Neste estudo optou-se pela marcação do nanomagnetogel (pré-formado) dado que minimiza a manipulação do material “quente”, marcado com <sup>153</sup>Sm<sup>3+</sup>. A preparação do nanomagnetogel fez-se como descrito anteriormente. Adicionou-se  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1,46 mM) ao nanogel DO<sub>3</sub>A (0,5 mg/mL) e ajustou-se o pH a 7,0. A formulação  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@nanogel DO<sub>3</sub>A foi deixada a incorporar *overnight*. O complexo  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@Eu[dexC<sub>16</sub>DO<sub>3</sub>A] foi preparado adicionando uma solução de EuCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (46,8  $\mu$ L) a 1 mL de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@dexC<sub>16</sub> DO<sub>3</sub>A. O pH da solução desceu para aproximadamente 5,0.

# 3 Apresentação e discussão de resultados

---

A aplicação de nanopartículas magnéticas em biomedicina tem crescido nos últimos anos. A biocompatibilidade e o comportamento *in vivo* determinam a sua aplicação. As nanopartículas superparamagnéticas de ferro possuem propriedades magnéticas únicas, que aliadas ao seu tamanho possibilitam a interação ao nível celular, tornando-as num material de interesse como agentes de contraste em IRM e sistemas de transporte de agentes terapêuticos. No entanto, devido às fortes interações entre as nanopartículas de ferro, existe uma grande tendência em se aglomerarem. O seu revestimento com agentes surfactantes ou poliméricos é conhecido por estabilizar essas nanopartículas, tornando-as não só mais dispersas em solução como aumentando o tempo que permanecem em circulação, pois dificultam o seu reconhecimento pelas opsoninas.

As propriedades magnéticas das nanopartículas dependem do tamanho, forma, estrutura química, carga superficial e presença de um agente de revestimento.

Neste trabalho foram preparadas diferentes formulações de nanomagnetogel mantendo a concentração de nanogel (0,5 mg/mL) constante e variando a concentração de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Avaliou-se a estabilidade por DLS e o tamanho por DLS, crio-MEV e MET, das formulações preparadas. A capacidade do nanogel incorporar/estabilizar óxido de ferro foi determinada através de espectroscopia de absorção atômica. As propriedades magnéticas da formulação foram avaliadas através de estudos de relaxividade, MIAtek e MIAplex. Uma vez que o interesse da produção deste nanomagnetogel se insere na sua futura aplicação, foram realizados ensaios de biocompatibilidade em dois tipos de células (fibroblastos e macrófagos).

### **3.1 Quantificação da concentração de ferro estabilizado no nanogel**

A concentração de ferro estabilizado no nanogel (0,5 mg/mL) foi determinada por espectroscopia de absorção atómica. A concentração de nanogel estudada deve-se ao facto de ter sido o valor usado em estudos anteriores de biodistribuição. De salientar que a solubilidade máxima do dexC<sub>16</sub> (DS<sub>C16</sub> = 6,0%) é aproximadamente 10,0 mg/mL (Gonçalves *et al.*, 2010a). Foram testadas diferentes concentrações de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com o objectivo de determinar a concentração máxima de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> que se consegue estabilizar na concentração de nanogel em estudo. Para tal, foi quantificada a concentração de ferro no sobrenadante das formulações, depois de centrifugadas. Assim, pretende-se garantir que está a ser quantificado apenas ferro efectivamente estabilizado a pH 7,0.

A concentração de ferro presente em cada formulação é apresentada na tabela 2. Verificou-se que para uma concentração de nanogel de 0,5 mg/mL, a quantidade máxima de ferro estabilizado é 1,41 mM. Para a concentração mais baixa de ferro adicionado (1,46 mM), obteve-se uma concentração de ferro mais baixa (0,64 mM), no entanto, para as concentrações superiores, a quantidade de ferro estabilizado não é significativamente diferente. Parece então que ocorre uma saturação do nanogel para a concentração de ferro adicionado de 2,93 mM.

## 3.2 Caracterização físico-química

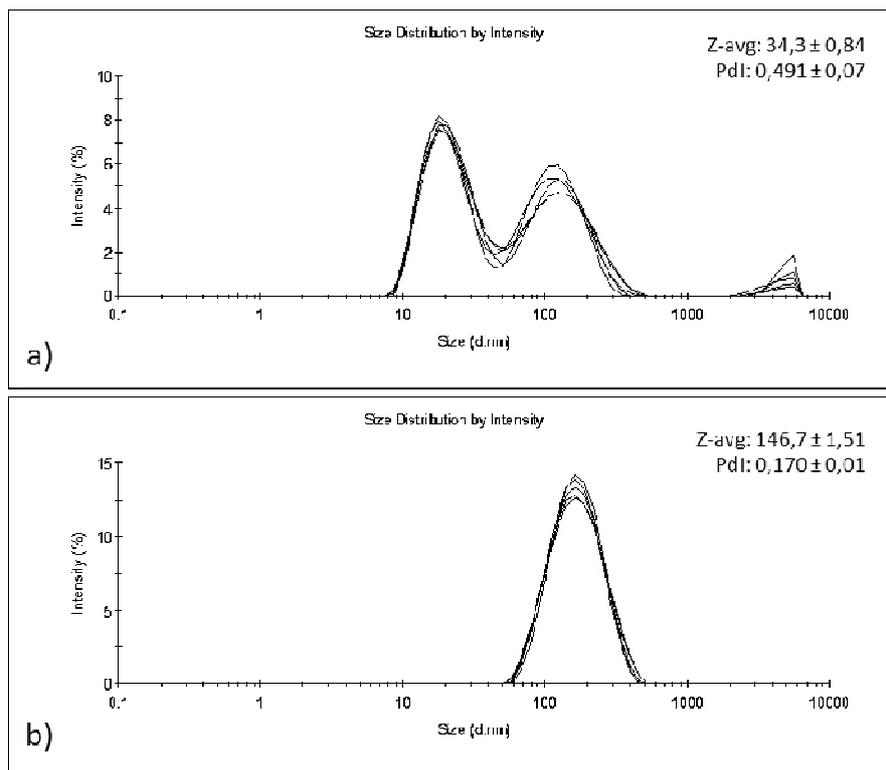
### 3.2.1 Avaliação da distribuição de tamanhos e estabilidade por DLS

O DLS fornece, com base na intensidade de luz refractada, a distribuição de tamanhos das nanopartículas em dispersão aquosa. A análise por DLS do nanogel mostra uma distribuição de tamanhos bimodal com uma população predominante com cerca de 20 nm e uma outra população com aproximadamente 100 nm (Figura 7a). O tamanho médio (diâmetro) do nanogel é  $34,3 \pm 0,8$  nm com um valor médio de polidispersividade (Pdl) 0,491. A adição de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  ao nanogel resulta numa dispersão com distribuição unimodal (Figura 7b). As formulações estudadas ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @nanogel) ao longo de 4 semanas demonstraram uma boa estabilidade do complexo ao longo desse tempo e valores baixos de Pdl, sendo 0,262 o valor mais elevado. A tabela 2 mostra o tamanho médio e o Pdl para cada uma das formulações ao longo do tempo. Em relação ao tamanho do complexo  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  @nanogel, os valores encontram-se próximos, numa gama de 120 a 170 nm, sendo que não parece existir influência da quantidade de ferro estabilizado no tamanho do nanomagnetogel.

**Tabela 2** – Concentração de ferro nas diferentes formulações preparadas e respectivos tamanhos (diâmetro) e Pdl ao longo de 4 semanas. O desvio padrão ( $\sigma$ ) refere-se a 5 medições consecutivas.

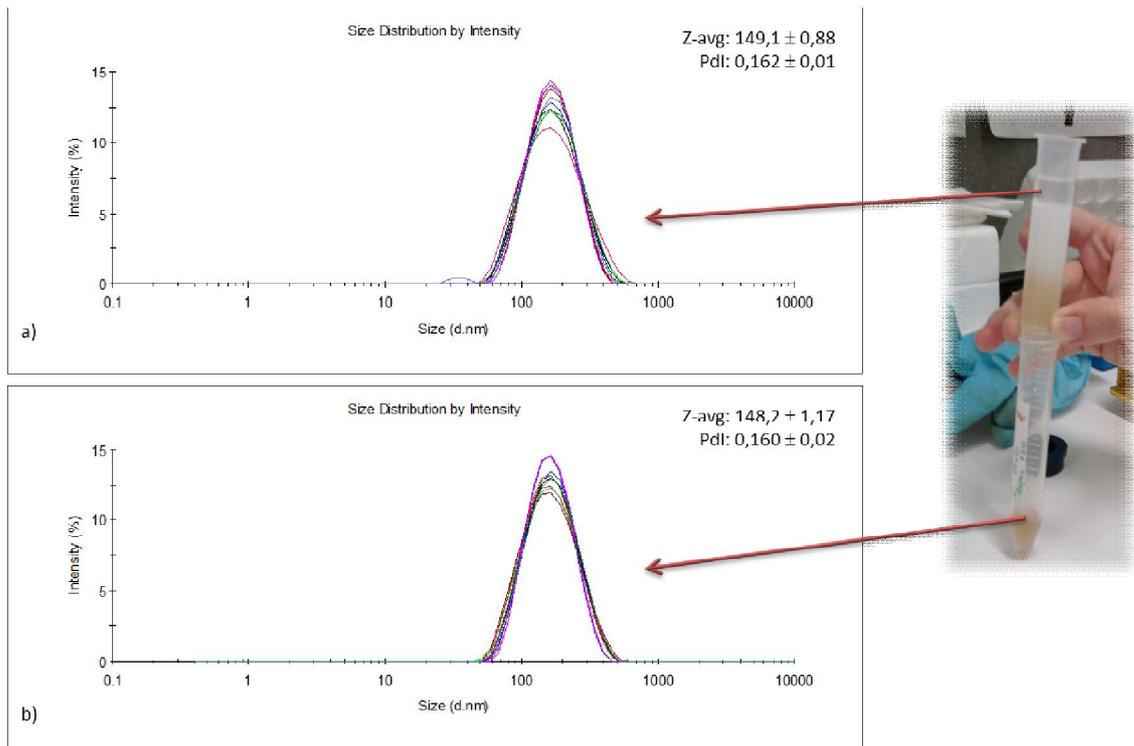
[Fe] adicionado (mM)	[Fe] <sup>*</sup> estabilizado (mM)	Tamanho (d. nm) $\pm \sigma$ Pdl $\pm \sigma$			
		Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
1,46	0,64	130,7 $\pm$ 0,708	127,8 $\pm$ 1,252	165,1 $\pm$ 0,657	145,5 $\pm$ 0,540
		0,145 $\pm$ 0,021	0,143 $\pm$ 0,012	0,262 $\pm$ 0,005	0,242 $\pm$ 0,005
2,93	1,21	165,3 $\pm$ 0,461	155,6 $\pm$ 1,630	149,6 $\pm$ 3,114	142,9 $\pm$ 1,188
		0,185 $\pm$ 0,013	0,169 $\pm$ 0,017	0,168 $\pm$ 0,011	0,153 $\pm$ 0,011
5,86	1,39	151,3 $\pm$ 0,207	142,8 $\pm$ 1,853	142,0 $\pm$ 1,522	130,5 $\pm$ 0,791
		0,165 $\pm$ 0,017	0,152 $\pm$ 0,006	0,166 $\pm$ 0,009	0,128 $\pm$ 0,012
10,99	1,41	149,4 $\pm$ 0,277	146,4 $\pm$ 0,487	120,4 $\pm$ 0,981	120,6 $\pm$ 0,723
		0,235 $\pm$ 0,009	0,233 $\pm$ 0,015	0,135 $\pm$ 0,011	0,123 $\pm$ 0,019

<sup>\*</sup>Determinado por absorção atómica.



**Figura 7** – Distribuição de tamanhos em intensidade do nanogel (0,5 mg/mL) (a), e do nanomagnetogel  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@nanogel (nanogel 0,5 mg/mL e ferro estabilizado 0,64 mM) (b) ambos em solução aquosa a pH 7,0.

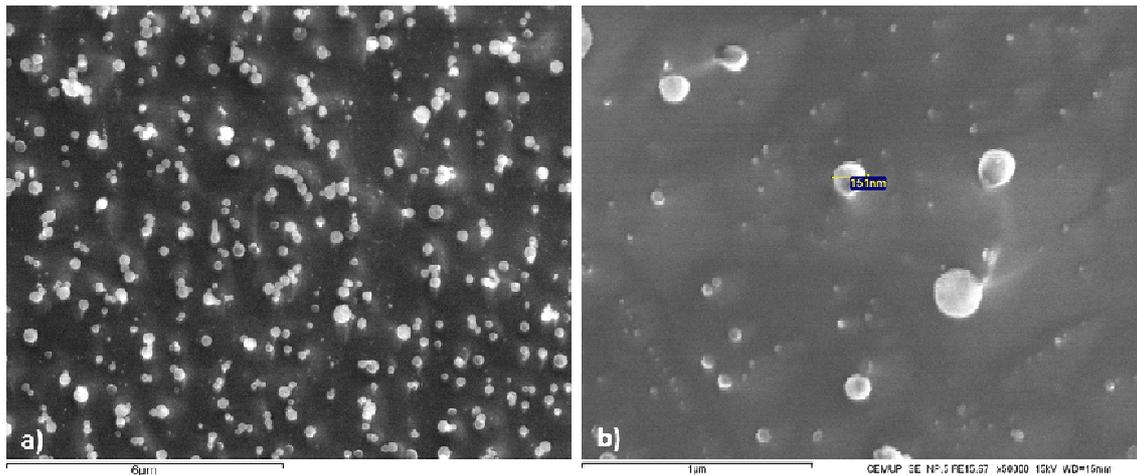
De forma a perceber a organização (uniformidade de tamanhos), o complexo  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@nanogel foi passado através de uma coluna de exclusão molecular PD 10. A coluna de exclusão molecular permite a rápida separação de partículas de elevado peso molecular de partículas de baixo peso molecular. Moléculas de tamanho superior são excluídas da matriz e eluídas primeiro por efeito da gravidade. Moléculas de tamanho inferior atravessam os poros da *Sephadex* eluindo depois das moléculas de elevado peso molecular. De acordo com a figura 8, a amostra atravessa a coluna de exclusão sem aparentemente ter ficado retida, como é visível na imagem. Ou seja os constituintes do complexo  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@nanogel terão migrado em simultâneo através da coluna. Poderíamos ter, por exemplo, uma separação entre o nanogel e o  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, mas tal não aconteceu. Os resultados obtidos por DLS, antes e após a formulação ter atravessado a coluna, demonstram isso mesmo, pois obteve-se a mesma distribuição de tamanhos (Figura 8).



**Figura 8** – Distribuição de tamanhos em intensidade do nanomagnetogel (nanogel 0,5 mg/mL e ferro estabilizado 0,64 mM), antes (a) e após (b) passar na coluna de exclusão PD10.

### 3.2.2 Avaliação do tamanho através de crio-MEV e MET

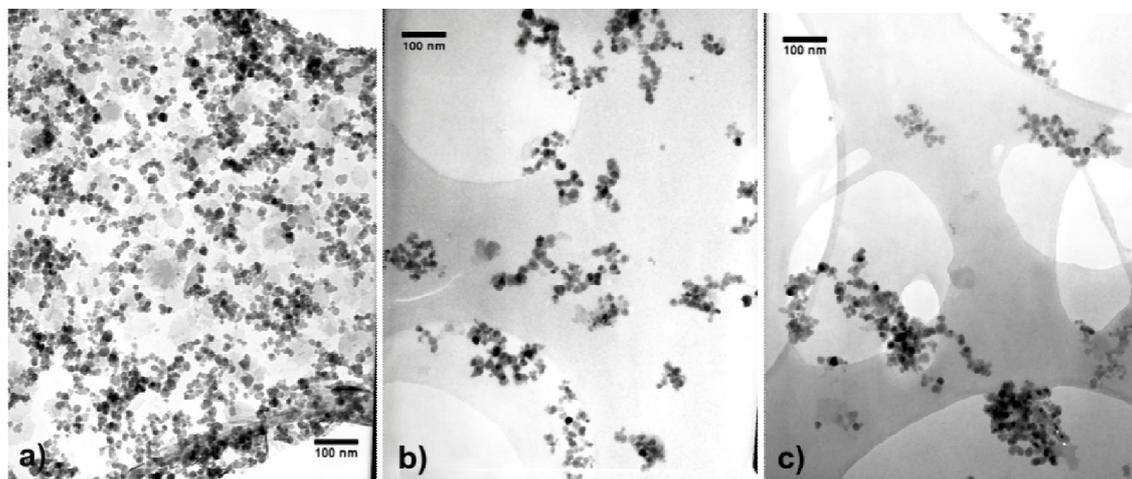
As nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  estabilizadas com dextrino foram observadas através de crio-MEV e MET. A figura 9 refere-se à visualização por crio-MEV. É possível verificar que o complexo  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@$ nanogel se encontra disperso possuindo uma forma esférica de cerca de 151 nm de diâmetro. Valores que estão de acordo com os resultados obtidos por DLS. No entanto, este método não nos permite inferir sobre as nanopartículas de ferro no interior do nanogel.



**Figura 9** – Imagem de crio-MEV de nanogel 5,0 mg/mL (a) com uma objectiva x10000 e  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @nanogel (nanogel 0,5 mg/mL e ferro estabilizado 1,41 mM) (b) com objectiva x50000.

De forma a perceber como as nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  se organizam no interior do nanogel, foram realizados estudos através de MET. A formulação foi colocada numa grelha de MET (cobre revestida a carbono) cuja malha possui a forma hexagonal, idêntica a uma colmeia, de forma a melhorar o contraste.

Com o MET foi possível observar as partículas de óxido de ferro (pontos escuros) e já não se consegue observar o polímero (nanogel).



**Figura 10** – Imagem de MET de nanopartículas  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  em solução tampão a pH 2 (a) e do nanomagnetogel, nanogel 0,5 mg/mL e ferro estabilizado 0,64 mM (b) e 1,41 mM (c).

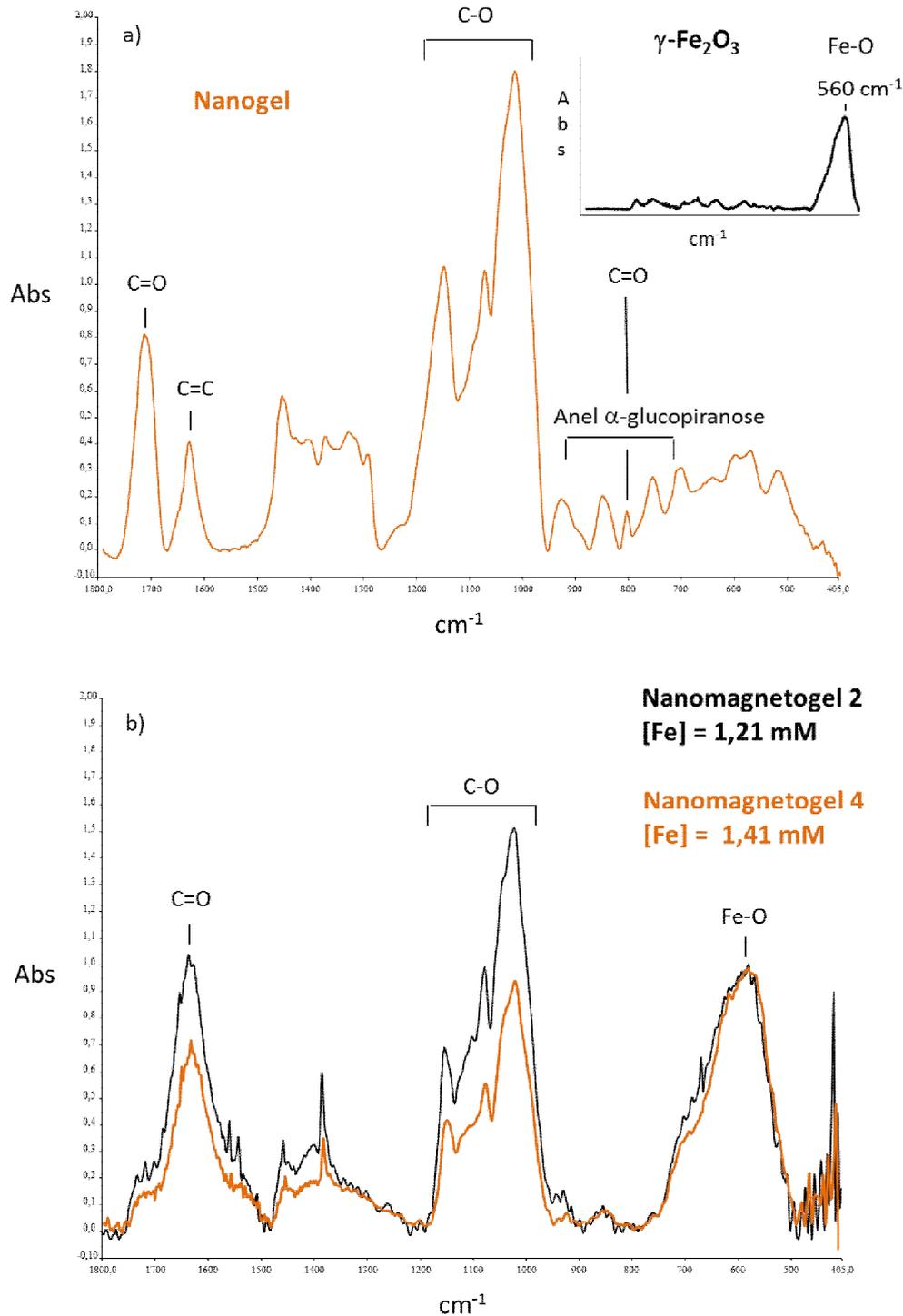
As imagens de MET revelaram que as nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (pontos escuros), na ausência de nanogel, se distribuem uniformemente na superfície da grelha de MET (Figura 10a). No entanto, na presença do nanogel (Figura

10b e 10c) é possível perceber que as nanopartículas de óxido de ferro estão organizadas em agregados que têm um tamanho aproximado de 100 nm. Desta forma estes agregados terão de estar cobertos pelo nanogel caso contrário não estariam estáveis a pH 7,0. O nanogel deverá provocar um efeito estérico prevenindo a atracção entre as nanopartículas de ferro, o que está de acordo com a literatura que menciona que agentes poliméricos proporcionam protecção estérica às nanopartículas de ferro prevenindo que estas interajam entre si formando grandes aglomerados (Gupta e Gupta, 2005, Vila *et al.*, 2002). Estes aglomerados são ligeiramente superiores a 100 nm, na amostra de maior concentração de Fe (Figura 10c). Além de uma possível incorporação de um maior número de núcleos de ferro, um outro factor para este aumento de tamanho na amostra de maior concentração de ferro pode ser o método de preparação da amostra para MET, uma vez que aquando da evaporação as nanopartículas de ferro tendem a aglomerar. A técnica de crio-MEV já não apresenta o artefacto provocado pela remoção do meio dispersante, uma vez que a amostra é congelada e observada nessa forma. Com este tipo de material, que se forma devido à presença de um solvente polar, é importante ter isso em atenção. Assim como a crio-MEV, a MET confirma a distribuição de tamanhos obtida por DLS para as formulações de nanomagnetogel.

### **3.2.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIV)**

A espectroscopia de infravermelhos foi realizada neste trabalho com o objectivo de identificar, nos nanomagnetogéis estudados, a presença do  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e do nanogel. O espectro de absorção dos anéis de  $\alpha$ -glucopirranose apresenta picos a 916, 852 e 764 cm<sup>-1</sup> e as ligações C-O surgem a 1156 e 1010 cm<sup>-1</sup> (Bautista *et al.*, 2005). A derivatização do dextrino com grupos acrilato foi já reportada anteriormente (Garcia *et al.*, 2008). Os picos do grupo acrilato surgem a 1713 e 806 cm<sup>-1</sup> para a ligação C=O e 1628 cm<sup>-1</sup> para C=C. Na figura 11a mostram-se os espectros de absorção da maguemite ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e do nanogel. Verifica-se que a maguemite absorve essencialmente a 560 cm<sup>-1</sup> (ligação Fe-O) e o nanogel apresenta os picos referidos anteriormente,

característicos do anel de glucopiranosose e do grupo acrilato. Na figura 11b apresentam-se os espectros de absorção dos nanomagnetogéis com ferro estabilizado 1,21 e 1,41 mM. É possível observar a banda situada a  $560\text{ cm}^{-1}$  característica da maguemite, assim como todos os picos atribuídos ao nanogel.



**Figura 11** – Espectros de absorção no infra vermelho por transformada de Fourier para o nanogel (a) e nanomagnetogéis com 1,21 e 1,41 mM de ferro estabilizado.

### 3.3 Propriedades magnéticas

#### 3.3.1 Estudos de relaxividade

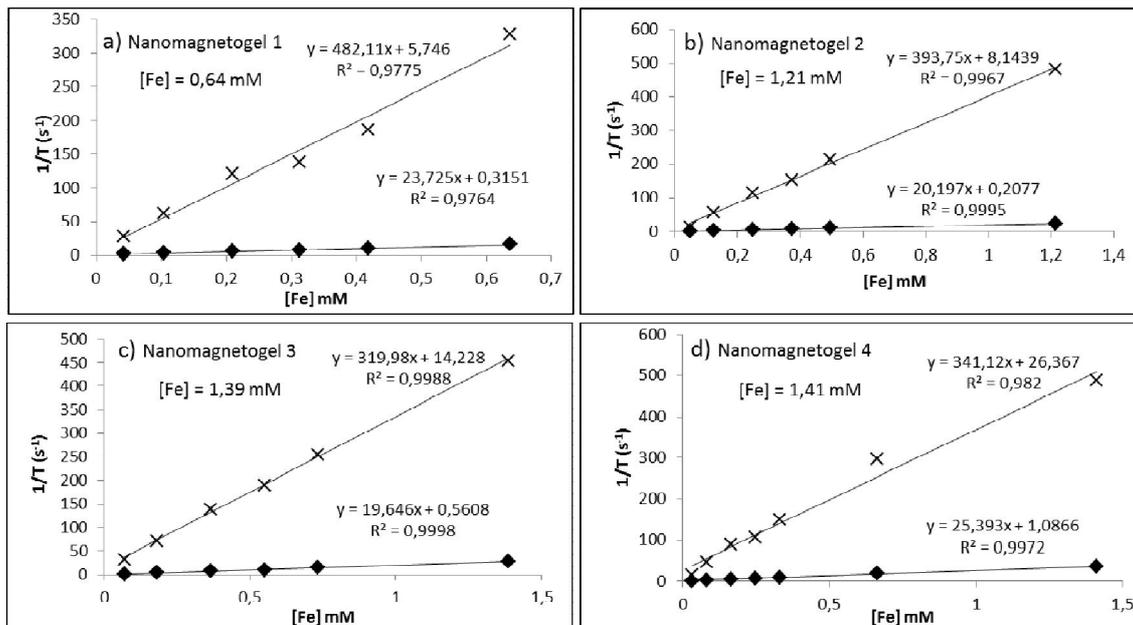
A eficiência de um agente de contraste é normalmente estudada exclusivamente em soluções aquosas, embora as propriedades de relaxação *in vivo* sejam por vezes diferentes das verificadas *in vitro*. As mais importantes características do agente de contraste são as relaxividades longitudinal ( $r_1$ ) e transversal ( $r_2$ ). Estes parâmetros permitem a comparação entre diferentes agentes de contraste e reflecte a eficiência deles: quanto maior as relaxividades, menores as quantidades de agente de contraste necessárias injectar nos pacientes. A tabela 3 compara a relaxividade de diferentes compostos de óxido de ferro comerciais: *Endorem*<sup>®</sup> e *Resovist*<sup>®</sup> e mostra que a relaxividade transversal ( $r_2$ ) destes é bastante superior à relaxividade longitudinal ( $r_1$ ).

O contraste em imagiologia não está intrinsecamente ligado às nanopartículas magnéticas, mas à sua influência na velocidade de relaxação longitudinal e transversal nos núcleos circundantes. As nanopartículas superparamagnéticas reduzem significativamente o tempo de relaxação spin-spin ( $T_2$ ), sendo por isso bons agentes de contraste em imagiologia. No entanto, estas nanopartículas também conseguem gerar um bom contraste  $T_1$  para imagiologia (Thorek *et al.*, 2006). Factores como o tamanho das nanopartículas e o revestimento são essenciais na obtenção de bons resultados de relaxometria (Duan *et al.*, 2008).

As relaxividades das formulações estudadas foram determinadas representando as velocidades de relaxação ( $R_1$  e  $R_2$ ) em função da concentração de ferro (equação 2).

$$R(1,2) = 1/T(1,2) \quad (\text{eq. 2})$$

É possível verificar que  $R_1$  ( $1/T_1$ ) e  $R_2$  ( $1/T_2$ ) aumentam linearmente com a concentração de ferro, obtendo-se uma recta cujo declive dá o valor da relaxividade longitudinal ou transversal,  $r_1$  ou  $r_2$ , respectivamente (Figura 12).



**Figura 12** – Gráficos da velocidade de relaxação ( $1/T$ ) longitudinal (♦) e transversal (x), em função da concentração de ferro [Fe]. O declive da recta dá o valor da relaxividade.

Os valores de relaxividade determinados para as formulações testadas estão apresentados na tabela 3. É possível verificar que os valores de relaxividade transversal são muito superiores aos de relaxividade longitudinal, como esperado para nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas. Esse valor não difere de forma substancial para as diferentes formulações preparadas, encontrando-se dentro da mesma ordem de grandeza, assim como sucede com os valores da concentração de ferro. Comparativamente com os agentes de contraste comercialmente disponíveis, as formulações testadas possuem valores de relaxividade transversal bastante superiores.

**Tabela 3** – Relaxividade longitudinal ( $r_1$ ) e transversal ( $r_2$ ) de diferentes formulações de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@nanogel e de agentes de contraste comerciais.

Formulação	$r_1$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$r_2$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$r_2/r_1$
Nanomagnetogel 1*	23,72	482,1	20,32
Nanomagnetogel 2*	20,20	393,7	19,49
Nanomagnetogel 3*	19,65	320,0	16,28
Nanomagnetogel 4*	25,39	341,1	13,43
Endorem	40,00	160,0	4,0
Resovist	7,20	82,0	11,39

\*As formulações designadas “Nanomagnetogel 1, 2, 3, 4” referem-se às concentrações de ferro estabilizado de 0,64 mM, 1,21 mM, 1,39 mM e 1,41 mM, respectivamente.

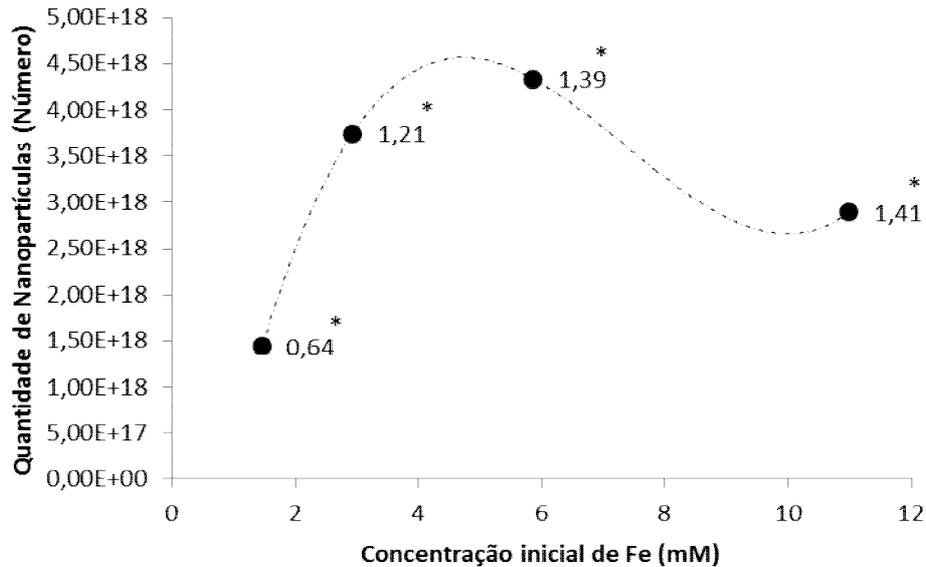
Valores da literatura mostram uma relaxividade transversal de 287 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, para as mesmas nanopartículas de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, usando concentrações idênticas, ligadas a um agente terapêutico, o alendronato (Benyettou *et al.*, 2011). No entanto, o nanomagnetogel em estudo produz relaxividades superiores.

Tendo em conta os valores determinados para relaxividade longitudinal e transversal, os nanomagnetogéis estudados poderão ter um bom desempenho como agentes de contraste em imagiologia de ressonância magnética. Quando comparado com produtos comerciais, os nanomagnetogéis têm relaxividades superiores.

### 3.3.2 *Magnetic Immunoassays Technology (MIAtek)*

O sensor MIAtek mede o sinal proporcional à terceira derivada da magnetização num campo magnético constante (H=0). Uma vez que o sinal MIAtek é muito sensível e é proporcional à quantidade de partículas magnéticas este permite detectar nanogramas de material superparamagnético. Desta forma, o sensor MIAtek quantifica o número de partículas superparamagnéticas presentes numa amostra. A figura 13 mostra a quantidade de nanopartículas de óxido de ferro presente nas diferentes formulações preparadas. É possível observar que a formulação com menor quantidade de ferro adicionado (1,46 mM) tem efectivamente um menor

número de nanopartículas. Em relação às restantes formulações, o número de nanopartículas é aproximadamente o mesmo, ou seja varia pouco, o que está em conformidade com a concentração de ferro, em cada formulação, determinada por absorção atômica. Os valores obtidos por absorção atômica estão indicados na figura 13 para permitir essa comparação.

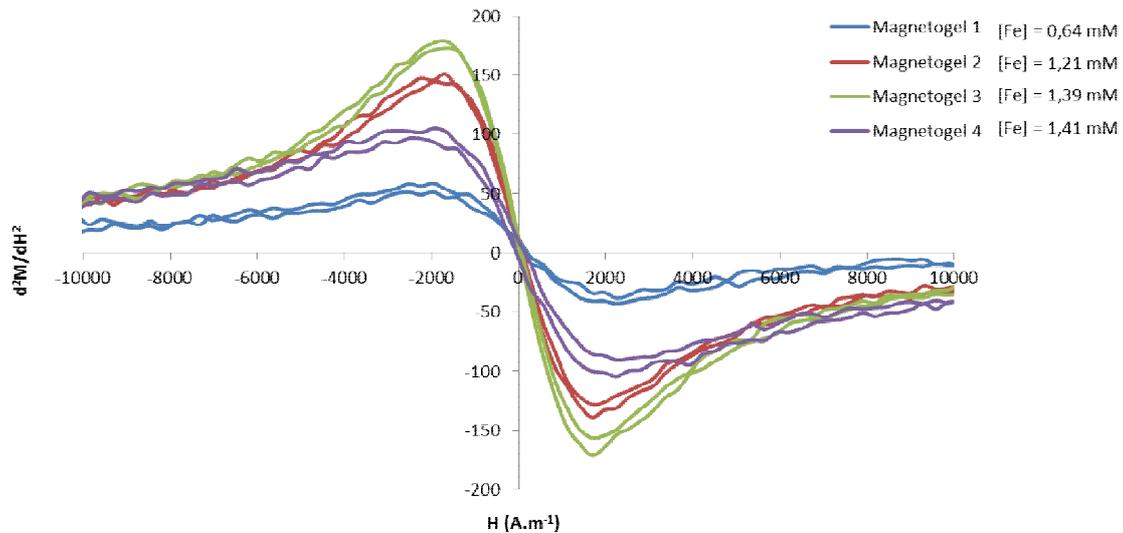


\* Concentrações obtidas por absorção atômica (mM)

**Figura 13** – Quantificação do número de nanopartículas superparamagnéticas em cada formulação através de MIAtek.

### 3.3.3 *Magnetic Immunoassays Multiplex (MIAplex)*

O sensor magnético, MIAplex, mede o sinal proporcional à segunda derivada de uma curva de magnetização  $d^2M/dH^2$ . A curva MIAplex permite concluir acerca do comportamento magnético das nanopartículas em estudo e ainda acerca das interações dipolares magnéticas entre elas. Quando as nanopartículas estão próximas e portanto em contacto, as interações magnéticas dipolares aumentam e verifica-se uma abertura na curva MIAplex. Em sistemas diluídos (nanocristais, dispersos em água 1,0%) não existe abertura na curva MIAplex, uma vez que as partículas se encontram afastadas (Lalatonne *et al.*, 2009).



**Figura 14** – Sinal MIAplex ( $d^2M/dH^2$ ) para os nanomagnetogéis estudados.

A segunda derivada das curvas de magnetização obtidas para os nanomagnetogéis estudados está representada na figura 14. As curvas obtidas são características de nanopartículas superparamagnéticas uma vez que passam por zero. No que diz respeito à abertura das curvas pode dizer-se que é muito pequena, ou seja não haverá grande interação entre as nanopartículas. A abertura maior verifica-se para o nanomagnetogel com maior concentração de ferro estabilizado (1,41 mM) o que faz sentido pois neste caso haverá mais ferro no interior do nanogel, o que aumenta a probabilidade de interações entre nanopartículas. No geral pode concluir-se que os nanomagnetogéis apresentam um comportamento superparamagnético e o ferro estabilizado no interior do nanogel terá apenas ligeiras interações entre si. Assim o nanogel estabiliza as nanopartículas de óxido de ferro e mantém-nas dispersas no seu interior. Convém salientar que os agregados que se observam por MET poderão ser induzidos pelo processo de evaporação do agente dispersante (água).



**Figura 15** – Acumulação do nanomagnetogel (seta branca) por aplicação de um campo magnético (íman).

O magnetismo das formulações estudadas foi verificado através da aplicação de um campo magnético (íman). A figura 15 mostra a acumulação do nanomagnetogel, após aplicação do íman. De salientar que a migração do ferro para o íman é lenta, ou seja não acontece instantaneamente. A acumulação que se mostra na figura 15 aconteceu após a aplicação do íman *overnight*.

### **3.4 Interacção com as células**

As formulações usadas nos estudos de interacção com células foram caracterizadas através de DLS. Os nanomagnetogéis preparados ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ @nanogel) com diferentes concentrações de ferro estabilizado apresentaram um tamanho (diâmetro) idêntico, com cerca de 100 nm. O potencial zeta é ligeiramente negativo. O nanogel, sem incorporação de ferro, apresenta um diâmetro de 56 nm.

**Tabela 4** – Tamanho (diâmetro), Pdl, potencial zeta e concentração de ferro estabilizado (determinado por absorção atômica) das amostras usadas nos ensaios de interação com células.

Amostra	nanogel	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{nanogel}$	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@\text{nanogel}$	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
[Fe] adicionado (mM)	--	1,46	10,99	1,46
[Fe] estabilizado (mM)	--	0,39	3,24	0,10
Tamanho (d.nm) $\pm \sigma$	55,77 $\pm$ 0,825	93,83 $\pm$ 0,189	102,2 $\pm$ 0,311	--*
Pdl $\pm \sigma$	0,601 $\pm$ 0,013	0,136 $\pm$ 0,013	0,126 $\pm$ 0,018	--*
Potencial Zeta (mV) $\pm \sigma$	--	-12,1 $\pm$ 1,280	-6,64 $\pm$ 0,416	--*

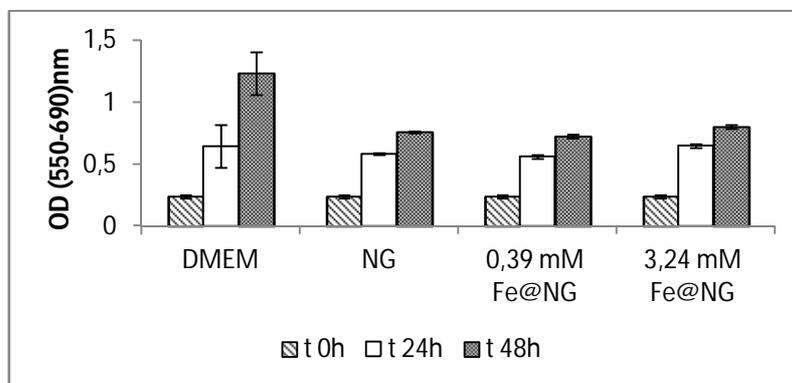
\*Após ajuste de pH a 7,0 ocorreu precipitação do ferro.

A citotoxicidade dos nanomagnetogéis foi analisada *in vitro* através de ensaios com MTT usando dois tipos de células: fibroblastos 3T3 e macrófagos. Foram preparadas formulações com a menor e maior quantidade de ferro adicionado, nomeadamente 1,46 e 10,99 mM. A concentração de ferro (determinada por absorção atômica) efectivamente estabilizado no nanogel foi de 0,39 e 3,24 mM (Tabela 4). Fez-se um teste só com nanogel e tentou fazer-se um teste só com  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Não foi possível determinar a citotoxicidade das nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , sem incorporação no nanogel, uma vez que durante o ajuste do pH a 7,0 o ferro precipitou, perdendo-se assim todo o ferro no processo de centrifugação. Desta forma, a concentração de ferro na amostra é exígua como foi comprovado por espectroscopia de absorção atômica (Tabela 4). Como controlo, as células foram mantidas em meio de cultura (DMEM) sem nenhum tipo de tratamento.

### 3.4.1 Estudos de viabilidade celular: Ensaio de MTT

#### 3.4.1.1 Fibroblastos 3T3

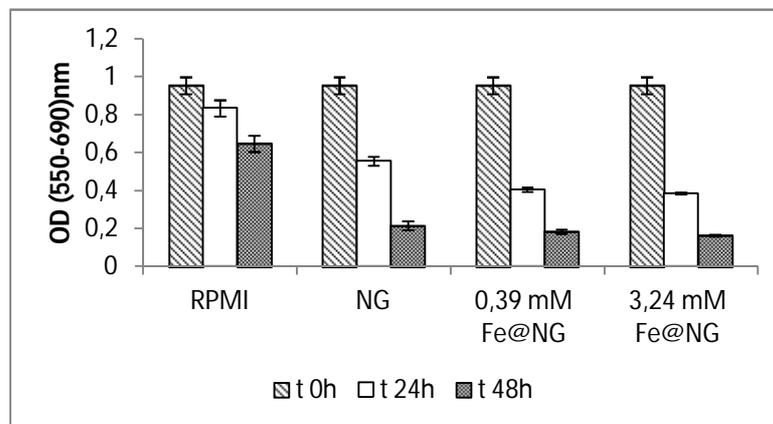
O gráfico da figura 16 mostra a viabilidade celular 24 h e 48 h após a adição das formulações às células. Como é possível observar, nenhum dos tratamentos demonstrou causar morte celular dado que ocorreu proliferação celular ao longo do tempo. Após o período de incubação de 24 h não se verificou influência do nanogel ou do nanomagnetogel na viabilidade celular. Após o período de incubação de 48 h, verificou-se uma inibição no crescimento celular em todos os tratamentos. De salientar que essa inibição é observada para o controlo com o nanogel. Os nanomagnetogéis têm o mesmo efeito que o nanogel, não havendo influência da concentração de ferro estabilizado. É possível concluir que o nanomagnetogel, mesmo contendo diferentes concentrações de ferro estabilizado, não provoca morte celular. A inibição na proliferação que se verifica às 48 h de incubação será devida exclusivamente à presença do nanogel.



**Figura 16** – Viabilidade dos fibroblastos após 24 h e 48 h de incubação com nanogel (NG) e com nanomagnetogéis com 0,39 e 3,24 mM de ferro estabilizado. DMEM refere-se ao controlo em que as células não foram sujeitas a qualquer tratamento. O nanogel tem uma concentração de 0,5 mg/mL em todas as formulações.

### 3.4.1.2 Macrófagos derivados da medula óssea de ratinhos

De acordo com o gráfico da figura 17, após 24 h e 48 h de incubação, as diferentes formulações parecem comprometer a viabilidade dos macrófagos. O nanogel por si só já tem uma influência na viabilidade celular. O resultado com o nanogel é na verdade surpreendente uma vez que já foi estudado anteriormente o efeito do nanogel neste tipo de células, usando uma concentração superior (1,0 mg/mL) e não se verificou nenhum efeito na viabilidade celular (Gonçalves *et al.*, 2010b). Os nanomagnetogéis com diferentes concentrações de ferro estabilizado (0,39 e 3,24 mM) afectam de forma idêntica a viabilidade celular após 24 h e 48 h de incubação.



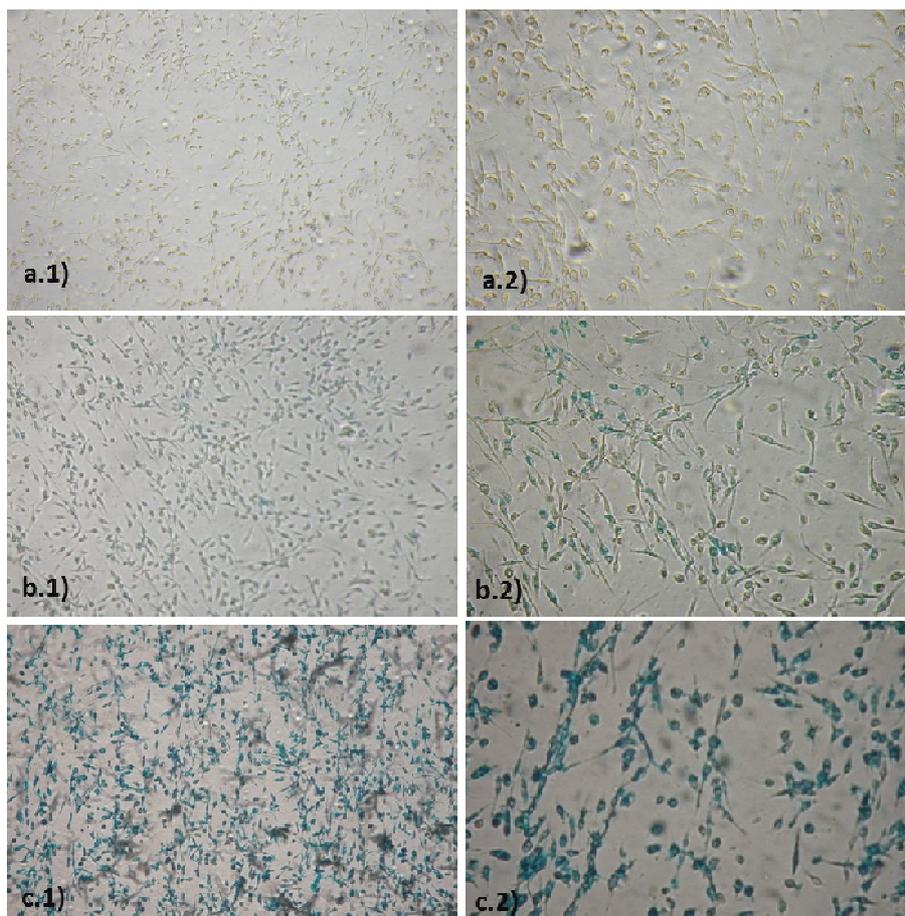
**Figura 17** – Viabilidade dos macrófagos após 24 h e 48 h de incubação com nanogel (NG) e nanomagnetogéis com 0,39 e 3,24 mM de ferro estabilizado. RPMI refere-se ao controlo em que as células não foram sujeitas a qualquer tratamento. O nanogel tem uma concentração de 0,5 mg/mL em todas as formulações.

Em suma, nos estudos de interacção dos nanomagnetogéis com células, não parece existir nenhum efeito provocado pela presença da maguemite no interior do nanogel. Da mesma forma, a concentração de ferro estabilizado também não tem qualquer influência. A presença do nanogel (0,5 mg/mL) demonstrou uma inibição na proliferação dos fibroblastos apenas após 48 h de incubação. Os macrófagos derivados da medula óssea de ratinho já se mostraram sensíveis à presença do nanogel, logo após 24 h de incubação. De salientar que os macrófagos são uma cultura primária e por isso não proliferam, pelo contrário vão morrendo ao longo do tempo. De qualquer forma o efeito do nanogel verificado foi uma surpresa uma vez que em estudos anteriores não se verificou qualquer efeito, mesmo com concentrações superiores.

### 3.4.2 Estudo de internalização: Microscopia

A internalização de ferro nas células foi analisada através da coloração com o azul da prússia. Uma solução de ferrocianeto de potássio e ácido clorídrico na presença de ferro torna-se azul. O ferro não internalizado foi removido através de sucessivas lavagens e só posteriormente as células foram coradas com a solução de azul da Prússia, para verificar a presença de ferro.

A figura 18a refere-se ao tratamento com o nanogel, logo, a solução de ferrocianeto de potássio com ácido clorídrico não ficou azul. A coloração azul visível na figura 18b e 18c mostra a incorporação do nanomagnetogel pelos macrófagos. A coloração azul mais acentuada na figura 18c mostra a existência de mais ferro no nanomagnetogel, o que está de acordo com a concentração mais elevada de ferro estabilizado detectada por absorção atômica.



**Figura 18** – Coloração de macrófagos derivados da medula óssea de ratinho com azul da prússia. As imagens referem-se ao tratamento com o nanogel (a1 e a2), e com nanomagnetogel com uma concentração de ferro estabilizado de 0,39 mM (b1 e b2) e de 3,24 mM (c1 e c2).

### 3.5 Funcionalização do nanogel para estudos de biodistribuição

O nanogel preparado para os estudos *in vivo* (ligado covalentemente a um agente quelante) foi complexado com o európio, que é uma molécula modelo de um metal trivalente, como o samário 153 (radioactivo) que será mais tarde utilizado nos estudos de biodistribuição. O material foi caracterizado antes e após a complexação (Tabela 5). Verificou-se que a ligação do agente quelante ao dexC<sub>16</sub> não teve grande influência no tamanho. A formação de um complexo Eu-(DO<sub>3</sub>A) neutro assegura que a ligação do agente quelante não altera de forma substancial a carga superficial do complexo  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@nanogel, não sendo esperado que venha a interferir nos estudos de biodistribuição. A quantidade de agente quelante ligado ao dextrino foi estimada através de uma titulação indirecta de Eu<sup>3+</sup> em excesso com EDTA e na presença do indicador laranja de xilenol: tendo-se obtido 0,383  $\mu$ mol de DO<sub>3</sub>A /mg de dexC<sub>16</sub> DO<sub>3</sub>A.

**Tabela 5** – Análise de DLS das formulações de nanogel para biodistribuição, pH 7,0.

Material	Tamanho (d.nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
dexC <sub>16</sub>	34,3 ± 0,8	0,491 ± 0,07	-4,02 ± 0,3
dexC <sub>16</sub> DO <sub>3</sub> A	49,40 ± 2,2	0,457 ± 0,01	-25,0 ± 1,6
Eu[dexC <sub>16</sub> DO <sub>3</sub> A]	--	--	-4,18 ± 0,2
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @dexC <sub>16</sub>	102,2 ± 0,3	0,126 ± 0,02	-6,64 ± 0,4
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @dexC <sub>16</sub> DO <sub>3</sub> A	107,4 ± 0,3	0,153 ± 0,01	-18,2 ± 0,1
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> @Eu[dexC <sub>16</sub> DO <sub>3</sub> A]	111,8 ± 1,6	0,226 ± 0,02	-1,89 ± 0,3

De acordo com os valores de potencial zeta obtidos, a complexação do Eu<sup>3+</sup> ao complexo  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@dexC<sub>16</sub>DO<sub>3</sub>A, apresenta um valor quase neutro (-1,89 mV), tal como seria de esperar. A carga neutra do complexo Eu<sup>3+</sup>-DO<sub>3</sub>A assegura que a marcação não influencia a estrutura e carga do  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@dexC<sub>16</sub>, sendo de esperar que a complexação não interfira nos resultados de biodistribuição.



## 4 Conclusão e trabalho futuro

---

No presente trabalho foi desenvolvido um nanomagnetogel, que consiste em nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), maguemite, incorporadas num nanogel de dextrino através de um método bastante simples (incorporação física), sem recurso a solventes orgânicos, sais ou surfactantes.

O método desenvolvido permite preparar diferentes formulações de nanomagnetogel, variando a proporção óxido de ferro/nanogel. Neste trabalho foi estudada a quantidade máxima de maguemite que é possível estabilizar numa concentração de nanogel igual a 0,5 mg/mL. A quantificação de ferro no nanogel mostrou que a saturação do nanogel 0,5 mg/mL ocorre quando se adiciona 2,93 mM de óxido de ferro, pois a partir desta concentração já não há um aumento significativo da concentração de ferro estabilizado. A concentração máxima de ferro que se consegue estabilizar em 0,5 mg/mL de nanogel é 1,41 mM. Os estudos realizados por DLS mostram que o nanomagnetogel tem uma distribuição de tamanhos unimodal com um diâmetro de cerca de 140 nm, e um índice de polidispersão relativamente baixo, independentemente da concentração de óxido de ferro estabilizado. Verificou-se ainda estabilidade das formulações, ao longo do tempo (até 4 semanas). Estudos de microscopia por crio-MEV demonstraram que o nanomagnetogel tem uma forma esférica e uma distribuição de tamanhos uniforme, de acordo com os resultados obtidos por DLS. Imagens de MET mostraram a organização das nanopartículas de óxido de ferro em agregados individualizados que deverão corresponder ao conteúdo de um nanogel. Deve salientar-se que a evaporação da água aquando da preparação da amostra poderá ter induzido a coalescência das nanopartículas de óxido de ferro. A presença do nanogel (ligações C=O e C=C) e do óxido de ferro (ligações Fe-O) no nanomagnetogel foi confirmada por FTIV.

Os nanomagnetogéis estudados poderão ter um bom desempenho como agentes de contraste em IRM tendo em conta os valores de relaxividade, longitudinal e transversal obtidos, comparativamente com os agentes de

contraste disponíveis comercialmente. O número de nanopartículas superparamagnéticas em cada nanomagnetogel foi quantificado por MIAtek. Este valor confirmou a concentração de ferro presente em cada nanomagnetogel, determinada por absorção atômica. As curvas do sinal de MIAplex demonstraram um comportamento superparamagnético das nanopartículas. Foi ainda possível concluir que existem interações dipolares ligeiras entre nanopartículas de maguemite no interior do nanogel. Uma vez que o nanogel é essencialmente constituído por água, as nanopartículas deverão estar dispersas pelo nanogel, por isso estão estabilizadas, mas afastadas o suficiente para não interagirem. Por sua vez, a incorporação das nanopartículas no nanogel não comprometeu a sua relaxividade, tendo-se observado valores elevados essencialmente para relaxividade transversal.

Dado o interesse em aplicar o nanomagnetogel *in vivo*, a citotoxicidade dos nanomagnetogéis foi testada *in vitro* através de ensaios de MTT. A presença do nanomagnetogel, independentemente da concentração de ferro estabilizado, não provocou morte celular nos fibroblastos 3T3. A internalização do nanomagnetogel pelos macrófagos foi verificada através da coloração com o azul da prússia.

O nanomagnetogel foi complexado com o európio (molécula modelo) que será substituído pelo  $^{153}\text{Sm}^{3+}$  nos estudos de biodistribuição, para verificar se a complexação influencia as propriedades do nanomagnetogel. De acordo com os valores de potencial zeta obtidos, a ligação do agente quelante e complexação do  $\text{Eu}^{3+}$  não influencia a estrutura e carga do nanomagnetogel, e por isso os resultados de biodistribuição.

O nanomagnetogel em estudo demonstrou ser um bom candidato a agente de contraste para IRM devido às propriedades superparamagnéticas, tendo exibidos elevados valores de relaxividade. A sua biocompatibilidade foi verificada e se o nanomagnetogel for administrado nas concentrações testadas existirá uma diluição do material na corrente sanguínea e portanto as células e tecidos do organismo ficarão expostas a concentrações inferiores às testadas neste trabalho. Desta forma o nanomagnetogel desenvolvido poderá servir de agente de contraste em IRM podendo ser direccionado por aplicação de um campo magnético externo. Outra possível aplicação será tratamento por

hipertermia ou transporte de fármacos sendo que o direccionamento poderá ser feito por aplicação de um campo magnético externo, mas a internalização ainda poderá ver melhorada recorrendo a ligandos específicos ligados na superfície do nanogel.

Num trabalho futuro será interessante abordar os seguintes aspectos:

- Estudar a incorporação da maguemite em concentrações superiores de nanogel, como 2,0 e 1,0 mg/mL com o objectivo de obter um nanomagnetogel com uma concentração superior de ferro estabilizado.
- Testar a reprodutibilidade da preparação das formulações.
- Usar grupos âncora ligados covalentemente ao dextrino como forma de estabilizar de forma irreversível os núcleos de óxido de ferro.
- Estudar a possibilidade de incorporação de um fármaco (ligação física) no nanomagnetogel.
- Fazer estudos de biodistribuição, após administração intravenosa do complexo  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@nanogel-Sm}(\text{DO}_3\text{A})$ , com e sem aplicação de campo magnético externo em modelos animais.



## 6 Bibliografia

---

- ADVANCED MAGNETICS, I. 2007. Feridex I.V.®. *In*: INC., B. H. P. (ed.). Cambridge, MA 02138.
- AKIYOSHI, K., DEGUCHI, S., MORIGUCHI, N., YAMAGUCHI, S. & SUNAMOTO, J. 1993. Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water. Formation and characteristics of nanoparticles. *Macromolecules*, 26, 3062-3068.
- AKIYOSHI, K. & SUNAMOTO, J. 1996. Supramolecular assembly of hydrophobized polysaccharides. *Supramolecular Science*, 3, 157-163.
- ALEXIOU, C., SCHMID, R. J., JURGONS, R., KREMER, M., WANNER, G., BERGEMANN, C., HUENGES, E., NAWROTH, T., ARNOLD, W. & PARAK, F. G. 2006. Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers. *Eur Biophys J*, 35, 446-50.
- ALPHANDÉRYA, E., LIJEOURB, L., LALATONNE, Y. & MOTTEC, L. 2010 Different signatures between chemically and biologically synthesized nanoparticles in a magnetic sensor: A new technology for multiparametric detection. *Sensors and Actuators B*, 147, 786–790.
- AMSTAD, E., GILLICH, T., BILECKA, I., TEXTOR, M. & REIMHULT, E. 2009a. Ultrastable iron oxide nanoparticle colloidal suspensions using dispersants with catechol-derived anchor groups. *Nano Lett*, 9, 4042-8.
- AMSTAD, E., ZURCHER, S., MASHAGHI, A., WONG, J. Y., TEXTOR, M. & REIMHULT, E. 2009b. Surface functionalization of single superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted magnetic resonance imaging. *Small*, 5, 1334-42.
- ANDERSON, D. G., PENG, W. D., AKINC, A., HOSSAIN, N., KOHN, A., PADERA, R., LANGER, R. & SAWICKI, J. A. 2004. A polymer library approach to suicide gene therapy for cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 16028-16033.
- ARIAS, J. L., GALLARDO, V., GÓMEZ-LOPERA, S. A. & DELGADO, A. V. 2005. Loading of 5-Fluorouracil to Poly(ethyl-2-cyanoacrylate) Nanoparticles with a Magnetic Core. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 1 Number 2, 214-223.
- ARIAS, J. L., GALLARDO, V., RUIZ, M. A. & DELGADO, A. V. 2007. Ftorafur loading and controlled release from poly(ethyl-2-cyanoacrylate) and poly(butylcyanoacrylate) nanospheres. *Int J Pharm*, 337, 282-90.
- BABES, L., DENIZOT, B., TANGUY, G., LE JEUNE, J. J. & JALLET, P. 1999. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study. *J Colloid Interface Sci*, 212, 474-482.
- BAUTISTA, C., BOMATI-MIGUEL, O., MORALES, M. P., SERNA, C. J. & VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S. 2005. Surface characterisation of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293, 20-27.

- BENYETTOU, F., LALATONNE, Y., CHEBBI, I., DI BENEDETTO, M., SERFATY, J. M., LECOUCVEY, M. & MOTTE, L. 2011. A multimodal magnetic resonance imaging nanoplatform for cancer theranostics. *Phys Chem Chem Phys*, 13, 10020-7.
- BLOCH, F., HANSEN, W. W. & PACKARD, M. E. 1946. Nuclear Induction. *Phys Rev*, 69, 127.
- BOYER, C., WHITTAKER, M. R., BULMUS, V., LIU, J. & DAVIS, T. P. 2010. The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *NPG Asia Mater*, 2, 23-30.
- BRANNON-PEPPAS, L. & BLANCHETTE, J. O. 2004. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1649-1659.
- BUSER, H., SCHWARZENBACH, D., PETTER, W. & LUDI, A. 1977. The Crystal Structure of Prussian Blue. *Inorganic Chemistry*, 16.
- CARVALHO, V., CASTANHEIRA, P., FARIA, T. Q., GONÇALVES, C., MADUREIRA, P., FARO, C., DOMINGUES, L., BRITO, R. M., VILANOVA, M. & GAMA, M. 2010. Biological activity of heterologous murine interleukin-10 and preliminary studies on the use of a dextrin nanogel as a delivery system. *Int J Pharm*, 400, 234-42.
- CHARLES, S. W. & POPPLEWELL, J. 1982. Properties and applications of magnetic liquids. *Endeavour*, 6, 153-161.
- CHEN, H. T., KIM, S. W., LI, L., WANG, S. Y., PARK, K. & CHENG, J. X. 2008. Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Forster resonance energy transfer imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 6596-6601.
- CHEN, M., YAMAMURO, S., FARRELL, D. & MAJETICH, S. A. 2003. Gold-coated iron nanoparticles for biomedical applications. *J. Appl. Phys*, 93, 7551.
- CHOI, H. S., LIU, W., MISRA, P., TANAKA, E., ZIMMER, J. P., ITTY IPE, B., BAWENDI, M. G. & FRANGIONI, J. V. 2007. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol*, 25, 1165-70.
- CHOULY, C., POULIQUEN, D., LUCET, I., JEUNE, J. J. & JALLET, P. 1996. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul*, 13, 245-55.
- CRUZ, L. J., RUEDA, F., CORDOBILLA, B., SIMON, L., HOSTA, L., ALBERICIO, F. & DOMINGO, J. C. 2011. Targeting Nanosystems to Human DCs via Fc Receptor as an Effective Strategy to Deliver Antigen for Immunotherapy. *Molecular Pharmaceutics*, 8, 104-116.
- DUAN, H., KUANG, M., WANG, X., WANG, Y. A., MAO, H. & NIE, S. 2008. Reexamining the Effects of Particle Size and Surface Chemistry on the Magnetic Properties of Iron Oxide Nanocrystals: New Insights into Spin Disorder and Proton Relaxivity. *Journal of Physical Chemistry C*, 112, No. 22, 8127-8131.

- FALCIANI, C., ACCARDO, A., BRUNETTI, J., TESAURO, D., LELLI, B., PINI, A., BRACCI, L. & MORELLI, G. 2011. Target-selective drug delivery through liposomes labeled with oligobranched neurotensin peptides. *ChemMedChem*, 6, 678-85.
- FAROKHZAD, O. C. & LANGER, R. 2006. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1456-1459.
- FAUCONNIER, N., BEE, A., ROGER, J. & PONS, J. N. 1996. Adsorption of gluconic and citric acids on maghemite particles in aqueous medium. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 100, 212-216.
- FERREIRA, M. F., MARTINS, A. F., MARTINS, J. A., FERREIRA, P. M., TOTH, E. & GERALDES, C. F. 2009. Gd(DO3A-N-alpha-aminopropionate): a versatile and easily available synthon with optimized water exchange for the synthesis of high relaxivity, targeted MRI contrast agents. *Chem Commun (Camb)*, 6475-7.
- FLESCH, C., UNTERFINGER, Y., BOURGEAT-LAMI, E., DUGUET, E., DELAITE, C. & DUMAS, P. 2005. Poly(ethylene glycol) Surface Coated Magnetic Nanoparticles. *Macromol. Rapid Commun.*, 26, 1494-1498.
- FRITZ, G., SCHÄDLER, V., WILLENBACHER, N. & WAGNER, N. J. 2002. Electrosteric Stabilization of Colloidal Dispersions. *Langmuir*, 18, 6381-6390.
- GAO, J., LIANG, G., CHEUNG, J. S., PAN, Y., KUANG, Y., ZHAO, F., ZHANG, B., ZHANG, X., WU, E. X. & XU, B. 2008. Multifunctional yolk-shell nanoparticles: a potential MRI contrast and anticancer agent. *J Am Chem Soc*, 130, 11828-33.
- GARCIA, H., BARROS, A., GONÇALVES, A., GAMA, F. M. & GIL, A. M. 2008. Characterization of dextrin hydrogels by FTIR spectroscopy and solid state NMR spectroscopy. *European Polymer Journal*, 44, 2318-2329.
- GAUMET, M., VARGAS, A., GURNY, R. & DELIE, F. 2008. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm*, 69, 1-9.
- GIL, M. H. & FERREIRA, P. 2006. Polissacarídeos como biomateriais. In: QUÍMICA, S. P. D. (ed.) *Grupo Glúcidos*. Lisboa: FCT.
- GIL, V. M. S. & GERALDES, C. F. G. C. 1987. *Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações*, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- GÓMEZ-LOPERA, S. A., ARIAS, J. L., GALLARDO, V. & DELGADO, A. V. 2006. Colloidal Stability of Magnetite/Poly(lactic acid) Core/Shell Nanoparticles. *Langmuir*, 22, 2816-2821.
- GONÇALVES, C., FERREIRA, M. F., SANTOS, A. C., PRATA, M. I., GERALDES, C. F., MARTINS, J. A. & GAMA, F. M. 2010a. Studies on the biodistribution of dextrin nanoparticles. *Nanotechnology*, 21, 295103.
- GONÇALVES, C. & GAMA, F. M. 2008. Characterization of the self-assembly process of hydrophobically modified dextrin. *European Polymer Journal*, 44, 3529-3534.
- GONÇALVES, C., MARTINS, J. A. & GAMA, F. M. 2007. Self-assembled nanoparticles of dextrin substituted with hexadecanethiol. *Biomacromolecules*, 8, 392-8.

- GONÇALVES, C., TORRADO, E., MARTINS, T., PEREIRA, P., PEDROSA, J. & GAMA, M. 2010b. Dextrin nanoparticles: studies on the interaction with murine macrophages and blood clearance. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 75, 483-9.
- GOVENDER, T., RILEY, T., EHTEZAZI, T., GARNETT, M. C., STOLNIK, S., ILLUM, L. & DAVIS, S. S. 2000. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *Int J Pharm*, 199, 95-110.
- GOVENDER, T., STOLNIK, S., GARNETT, M. C., ILLUM, L. & DAVIS, S. S. 1999. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Release*, 57, 171-85.
- GRAYSON, A. C., VOSKERICIAN, G., LYNN, A., ANDERSON, J. M., CIMA, M. J. & LANGER, R. 2004. Differential degradation rates in vivo and in vitro of biocompatible poly(lactic acid) and poly(glycolic acid) homo- and co-polymers for a polymeric drug-delivery microchip. *J Biomater Sci Polym Ed*, 15, 1281-304.
- GREF, R., LUCK, M., QUELLEC, P., MARCHAND, M., DELLACHERIE, E., HARNISCH, S., BLUNK, T. & MULLER, R. H. 2000. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 18, 301-313.
- GUPTA, A. K. & GUPTA, M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26, 3995-4021.
- HADJIPANAYIS, G. C. & SIEGEL, R. W. 1993. *Nanophase materials: synthesis, properties and applications*, Dordrecht, Boston, Kluwer Academic Publishers.
- HANS, M. L. & LOWMAN, A. M. 2002. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6, 319-327.
- HILDER, T. A. & HILL, J. M. 2008. Carbon nanotubes as drug delivery nanocapsules. *Current Applied Physics*, 8, 258-261.
- JAIN, T. K., MORALES, M. A., SAHOO, S. K., LESLIE-PELECKY, D. L. & LABHASETWAR, V. 2005. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Mol Pharm*, 2, 194-205.
- JORDAN, A., SCHOLZ, R. & MAIER-HAUFF, K. 2001. Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225, 118-126.
- KATEB, B., CHIU, K., BLACK, K. L., YAMAMOTO, V., KHALSA, B., LJUBIMOVA, J. Y., DING, H., PATIL, R., PORTILLA-ARIAS, J. A., MODO, M., MOORE, D. F., FARAHANI, K., OKUN, M. S., PRAKASH, N., NEMAN, J., AHDOOT, D., GRUNDFEST, W., NIKZAD, S. & HEISS, J. D. 2011. Nanoplatfoms for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: what should be the policy? *Neuroimage*, 54 Suppl 1, S106-24.

- KIM, D. H., KIM, K. N., KIM, K. M. & LEE, Y. K. 2009. Targeting to carcinoma cells with chitosan- and starch-coated magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia. *J Biomed Mater Res A*, 88, 1-11.
- KIM, D. K., ZHANG, Y., KEHR, J., KLASON, T., BJELKE, B. & MUHAMMED, M. 2001. Characterization and MRI study of surfactant-coated superparamagnetic nanoparticles administered into the rat brain. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225, 256-261.
- KIRPOTIN, D. B., DRUMMOND, D. C., SHAO, Y., SHALABY, M. R., HONG, K. L., NIELSEN, U. B., MARKS, J. D., BENZ, C. C. & PARK, J. W. 2006. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Research*, 66, 6732-6740.
- KOHLER, N., SUN, C., WANG, J. & ZHANG, M. 2005. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. *Langmuir*, 21, 8858-64.
- KRISHNAN, K. M. 2010. Biomedical Nanomagnetism: A Spin Through Possibilities in Imaging, Diagnostics, and Therapy. *IEEE Trans Magn*, 46, 2523-2558.
- LALATONNE, Y., BENYETTOU, F., BONNIN, D., LIEVRE, N., MONOD, P., M., M., WEIMANN, P. & MOTTE, L. 2009. Characterization of magnetic labels for bioassays. *J. Magn. Magn. Mater.*, 321, 1653–1657.
- LALATONNE, Y., PARIS, C., SERFATY, J. M., WEINMANN, P., LECOUEY, M. & MOTTE, L. 2008. Bis-phosphonates-ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a platform towards diagnosis and therapy. *Chem Commun (Camb)*, 2553-5.
- LAURENT, S., FORGE, D., PORT, M., ROCH, A., ROBIC, C., VANDER ELST, L. & MULLER, R. N. 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*, 108, 2064-110.
- LAWACZECK, R., BAUER, H., FRENZEL, T., HASEGAWA, M., ITO, Y., KITO, K., MIWA, N., TSUTSUI, H., VOGLER, H. & WEINMANN, H. J. 1997. Magnetic iron oxide particles coated with carboxydextran for parenteral administration and liver contrasting. Pre-clinical profile of SH U555A. *Acta Radiol*, 38, 584-97.
- LAWACZECK, R., MENZEL, M. & PIETSCH, H. 2004. Superparamagnetic iron oxide particles: contrast media for magnetic resonance imaging. *Applied Organometallic Chemistry*, 18, 506–513.
- LENGLET, L. 2009. Multiparametric magnetic immunoassays utilizing non-linear signatures of magnetic labels. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 1639-1643.
- LENGLET, L., NIKITIN, P. & PEQUIGNOT, C. 2008. Magnetic immunoassays: a new paradigm in POCT. *IVD Technology*, 43–49.
- LETFORD, K. & BURT, H. 2007. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm*, 65, 259-69.

- LIU, C., CHEN, X. & PARK, H. 2005. Self-assembled nanoparticles based on linoleic acid modified chitosan: Stability and adsorption of trypsin. *Carbohydrate Polymers*, 62, 293–298.
- LOBEL, B., EYAL, O., KARIV, N. & KATZIR, A. 2000. Temperature controlled CO<sub>2</sub> laser welding of soft tissues: urinary bladder welding in different animal models (rats, rabbits, and cats). *Lasers Surg Med*, 26, 4-12.
- MA, C.-M. & LI, C.-L. 1990. Stability of dispersions of ironoxide in mixed solutions of polyvinylpyrrolidone and sodium alkyl sulfate. *Colloids and Surfaces*, 47, 117-123.
- MARCUCCI, F. & LEFOULON, F. 2004. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. *Drug Discovery Today*, 9, 219-228.
- MEHVAR, R. 2000. Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *J Control Release*, 69, 1-25.
- MENDONCA DIAS, M. H. & LAUTERBUR, P. C. 1986. Ferromagnetic particles as contrast agents for magnetic resonance imaging of liver and spleen. *Magn Reson Med*, 3, 328-30.
- MILLER, M. M., PRINZ, G. A., CHENG, S.-F. & BOUNNAK, S. 2002. Detection of a micron-sized magnetic sphere using a ring-shaped anisotropic magnetoresistance-based sensor: A model for a magnetoresistance-based biosensor. *Appl. Phys. Lett.*, 81.
- MOGHIMI, S. M., MUIR, I. S., ILLUM, L., DAVIS, S. S. & KOLBBACHOFEN, V. 1993. Coating Particles with a Block-Copolymer (Poloxamine-908) Suppresses Oponization but Permits the Activity of Dysopsonins in the Serum. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1179, 157-165.
- MORGAN, S. M., SUBR, V., ULBRICH, K., WOODLEY, J. F. & DUNCAN, R. 1996. Evaluation of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-peptide conjugates as potential oral vaccines. Studies on their degradation by isolated rat small intestinal peptidases and their uptake by adult rat small intestinal tissue in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, 128, 99-111.
- MORNET, S., VASSEUR, S. G., F., VEVERKA, P., GOGGIO, G., DEMOURGUES, A., PORTIER, J., POLLERT, E. & DUGUET, E. 2006. Magnetic nanoparticle design for medical applications. *Progress in Solid State Chemistry*, 34, 237-247.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- MULLER, R. H., JACOBS, C. & KAYSER, O. 2001. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev*, 47, 3-19.
- MURATA, S. & STOJANOVIC, M. N. 2008. Tutorial on programming natural systems: Part 1. Molecular systems - DNA-based nanosystems. *New Generation Computing*, 26, 297-312.

- MUTSAERS, S. E. & PAPADIMITRIOU, J. M. 1988. Surface charge of macrophages and their interaction with charged particles. *J Leukoc Biol*, 44, 17-26.
- NAKAJIMA, A. & SHINODA, K. 1976. Complex formation between oppositely charged polysaccharides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 55, 126-132.
- NANJWADE, B. K., BECHRA, H. M., DERKAR, G. K., MANVI, F. V. & NANJWADE, V. K. 2009. Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems. *Eur J Pharm Sci*, 38, 185-96.
- NELSON, K. L. & RUNGE, V. M. 1995. Basic principles of MR contrast. *Top Magn Reson Imaging*, 7, 124-36.
- NICOLAU, A., DIAS, N., CARVALHO, G. S., MOTA, M. & LIMA, N. 1999. Os protozoários como ferramenta da monitorização biotecnológica da poluição: ensaios in vitro. *Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente*. Lisboa: Universidade Nova.
- NISHI, H. 1997. Enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with polysaccharides. *Journal of Chromatography A*, 792, 327-347.
- NUNES, A. C. & YU, Z. C. J. M. M. M., 65, 265. 1987. Fractionation of a water-based ferrofluid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 65, 265-268.
- OH, J. K., SIEGWART, D. J., LEE, H. I., SHERWOOD, G., PETEANU, L., HOLLINGER, J. O., KATAOKA, K. & MATYJASZEWSKI, K. 2007a. Biodegradable nanogels prepared by atom transfer radical polymerization as potential drug delivery carriers: synthesis, biodegradation, in vitro release, and bioconjugation. *J Am Chem Soc*, 129, 5939-45.
- OH, J. K., SIEGWART, D. J. & MATYJASZEWSKI, K. 2007b. Synthesis and biodegradation of nanogels as delivery carriers for carbohydrate drugs. *Biomacromolecules*, 8, 3326-3331.
- OKASSA, L. N., MARCHAIS, H., DOUZIECH-EYROLLES, L., COHEN-JONATHAN, S., SOUCÉ, M., DUBOIS, P. & CHOURPA, I. 2005. Development and characterization of sub-micron poly(d,l-lactide-co-glycolide) particles loaded with magnetite/maghemite nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 302, 187-196.
- OWENS, D. E., 3RD & PEPPAS, N. A. 2006. Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, 307, 93-102.
- PANYAM, J., WILLIAMS, D., DASH, A., LESLIE-PELECKY, D. & LABHASETWAR, V. 2004. Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *J Pharm Sci*, 93, 1804-14.
- PARDOE, H., CHUA-ANUSORN, W., ST. PIERRE, T. G. & DOBSON, J. 2001. Structural and magnetic properties of nanoscale iron oxide particles synthesized in the presence of dextran or polyvinyl alcohol. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225, 41-46.
- PETERSEN, S. B., MULLER, R. N. & RINCK, P. A. 1985. *An introduction to biomedical nuclear magnetic resonance*, New York, Thieme, Stuttgart

- PLANK, C., SCHERER, F., SCHILLINGER, U., BERGEMANN, C. & ANTON, M. 2003. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields. *J Liposome Res*, 13, 29-32.
- PLUM, J., GENTILE, S., VERGER, C., BRUNKHORST, R., BAHNER, U., FALLER, B., PEETERS, J., FREIDA, P., STRUIJK, D. G., KREDIET, R. T., GRABENSEE, B., TRANAEUS, A. & FILHO, J. C. 2002. Efficacy and safety of a 7.5% icodextrin peritoneal dialysis solution in patients treated with automated peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis*, 39, 862-71.
- POLLERT, E., KNÍŽEK, K., MARYŠKO, M., ZÁVĚTA, K., LANČOK, A., BOHÁČEK, J., HORÁK, D. & BABIČ, M. 2006. Magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres containing maghemite prepared by emulsion polymerization. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 306, 241-247.
- POUTON, C. W., WAGSTAFF, K. M., ROTH, D. M., MOSELEY, G. W. & JANS, D. A. 2007. Targeted delivery to the nucleus. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 698-717.
- PRATSINIS, S. E. & VEMURY, S. 1996. Particle formation in gases: a review. *Powder Technology*, 88, 267-273.
- RUNGE, V. M. 2000. Safety of approved MR contrast media for intravenous injection. *J Magn Reson Imaging*, 12, 205-13.
- SAHOO, Y., GOODARZI, A., SWIHART, M. T., OHULCHANSKY, T. Y., KAUR, N., FURLANI, E. P. & PRASAD, P. N. 2005. Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: Fluorescence labeling and magnetophoretic control. *J Phys Chem B*, 109, 3879-85.
- SAID, T. M., AGARWAL, A., ZBOROWSKI, M., GRUNEWALD, S., GLANDER, H. J. & PAASCH, U. 2008. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl*, 29, 134-42.
- SCHERING, A. 2002. New Frontiers in liver imaging: Resovist®. In: AG, S. (ed.). 13342 Berlin.
- SCHWEIGER, C., PIETZONKA, C., HEVERHAGEN, J. & KISSEL, T. 2011. Novel magnetic iron oxide nanoparticles coated with poly(ethylene imine)-poly(ethylene glycol) for potential biomedical application: synthesis, stability, cytotoxicity and MR imaging. *Int J Pharm*, 408, 130-7.
- SCHWERTMANN, U. & CORNELL, R. M. 1991. *Iron oxides in the laboratory : preparation and characterization*, Weinheim ; New York, VCH.
- SHEN, T., WEISSLEDER, R., PAPISOV, M., BOGDANOV, A., JR. & BRADY, T. J. 1993. Monocrystalline iron oxide nanocompounds (MION): physicochemical properties. *Magn Reson Med*, 29, 599-604.
- SHEPHERD, P. G., POPPLEWELL, J. & CHARLES, S. W. 1970. A method of producing ferrofluid with gadolinium particles. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 3 Number 12.
- SHRIVASTAVA, S. K., JAIN, D., SHRIVASTAVA, P. K. & PIYUSH, T. 2009. Flurbiprofen- and Suprofen-Dextran Conjugates: Synthesis, Characterization

- and Biological Evaluation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8, 221-229.
- SJOGREN, C. E., BRILEY-SAEBO, K., HANSON, M. & JOHANSSON, C. 1994. Magnetic characterization of iron oxides for magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*, 31, 268-72.
- SJOGREN, C. E., JOHANSSON, C., NAEVESTAD, A., SONTUM, P. C., BRILEY-SAEBO, K. & FAHLVIK, A. K. 1997. Crystal size and properties of superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles. *Magn Reson Imaging*, 15, 55-67.
- SMITH, A. & HUNNEYBALL, I. M. 1986. Evaluation of poly(lactic acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 30, 215-220.
- SONAVANE, G., TOMODA, K. & MAKINO, K. 2008. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 66, 274-80.
- STOLNIK, S., ILLUM, L. & DAVI, S. S. 1995. Long circulating microparticulate drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16, 195-214.
- SUN, C., LEE, J. S. & ZHANG, M. 2008. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, 1252-65.
- TAFESSE, F. 2003. Comparative Studies on Prussian Blue or Diaquatetraaminocobalt(III) Promoted Hydrolysis of 4-Nitrophenylphosphate in Microemulsions. *International Journal of Molecular Sciences*, 4, 362-370.
- TARTAJ, P., MORALES, M. P., VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S., GONZÁLEZ-CARREÑO, T. & SERNA, C. J. 2003. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D: Appl Phys*, 36:R, 182-97.
- THOREK, D. L., CHEN, A. K., CZUPRYNA, J. & TSOURKAS, A. 2006. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Ann Biomed Eng*, 34, 23-38.
- TORRADO, E., ADUSUMILLI, S., FRAGA, A. G., SMALL, P. L., CASTRO, A. G. & PEDROSA, J. 2007. Mycolactone-mediated inhibition of tumor necrosis factor production by macrophages infected with *Mycobacterium ulcerans* has implications for the control of infection. *Infect Immun*, 75, 3979-88.
- TÓTH, E., HELM, L. & MERBACH, A. E. 2002. *Relaxivity of MRI Contrast Agents*, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- TSAI, Z., WANG, J., KUO, H., SHEN, C., WANG, J. & YEN, T. 2010. In situ preparation of high relaxivity iron oxide nanoparticles by coating with chitosan: A potential MRI contrast agent useful for cell tracking. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 322, 208-213.
- VERDAGUER, M., GALVEZ, N., GARDE, R. & DESPLANCHES, C. 2002. Electrons at Work in Prussian Blue Analogues. *The Electrochemical Society Interface*, 28-32.

- VILA, A., SANCHEZ, A., TOBIO, M., CALVO, P. & ALONSO, M. J. 2002. Design of biodegradable particles for protein delivery. *J Control Release*, 78, 15-24.
- VINOGRADOV, S. V., BATRAKOVA, E. V. & KABANOV, A. V. 2004. Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjug Chem*, 15, 50-60.
- WEISSLEDER, R., REIMER, P., LEE, A. S., WITTENBERG, J. & BRADY, T. J. 1990. MR receptor imaging: ultrasmall iron oxide particles targeted to asialoglycoprotein receptors. *AJR Am J Roentgenol*, 155, 1161-7.
- WU, W. T., AIELLO, M., ZHOU, T., BERLINER, A., BANERJEE, P. & ZHOU, S. Q. 2010. In-situ immobilization of quantum dots in polysaccharide-based nanogels for integration of optical pH-sensing, tumor cell imaging, and drug delivery. *Biomaterials*, 31, 3023-3031.
- ZAHR, A. S., DAVIS, C. A. & PISHKO, M. V. 2006. Macrophage uptake of core-shell nanoparticles surface modified with poly(ethylene glycol). *Langmuir*, 22, 8178-85.
- ZHANG, C., WANGLER, B., MORGENSTERN, B., ZENTGRAF, H., EISENHUT, M., UNTENECKER, H., KRUGER, R., HUSS, R., SELIGER, C., SEMMLER, W. & KIESSLING, F. 2007. Silica- and alkoxy silane-coated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles: a promising tool to label cells for magnetic resonance imaging. *Langmuir*, 23, 1427-34.
- ZHANG, M. & FERRARI, M. 1998. Hemocompatible polyethylene glycol films on silicon. *Journal of Biomedical Microdevices* 1, 81-89.
- ZHANG, X., GONÇALVES, R. & MOSSER, D. M. 2008. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 14, Unit 14.1.