

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE
DO PORTO
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

Carla Sofia Martins Cabral

**Nanopartículas híbridas para sistemas
de *drug delivery* inteligentes**

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica em Saúde, no ramo de Bioquímica Clínica e Metabólica realizada sob a orientação do Professor Doutor Miguel Duarte Correa e do Professor Doutor Rúben Fernandes.

Setembro, 2015

*“ Aproveitem a vida e ajudem-se uns aos outros.
Apreciem cada momento. Agradeçam e não deixem
nada por dizer, nada por fazer”*

António Feio

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores, ao Professor Ruben Fernandes e ao Professor Miguel Correa, por quem eu tenho uma eterna gratidão por me terem dado a oportunidade de entrar no mundo da ciência, o que permitiu desenvolver um enorme interesse pela área. Agradeço toda a partilha de conhecimento, motivação e ajuda incondicional.

A todos os outros professores que ao longo do meu percurso académico contribuíram com toda a disponibilidade.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Team Nano Tech por toda a boa disposição e ajuda prestada e por tornarem este projeto mais divertido e pela troca de ideias. Aos meus meninos e meninas, pela paciência, constante incentivo e pela ajuda e compreensão e por estarem sempre presentes.

À minha família por estarem sempre presentes e disponíveis. À minha irmã, por toda a ajuda que me deu ao longo destes dois anos. Acima de tudo, eternamente agradecida aos meus pais, por terem investido na minha formação, por todo o amor e carinho e sobretudo pelo apoio incondicional. Obrigada por acreditarem sempre em mim.

Também ao Departamento Física-Química da Universidade de Vigo e ao departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina do Hospital S.João, por me terem recebido, pela cedência do espaço, equipamentos e materiais necessários para a concretização deste projeto.

A todos os que direta ou indiretamente me motivaram e ajudaram ao longo deste meu percurso académico.

Obrigada!

Resumo

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que consiste na otimização das propriedades da matéria permitindo assim o desenvolvimento de sistemas com um tamanho manométrico. A aplicação da nanotecnologia na medicina surge como um campo de pesquisa que está a gerar um grande interesse, principalmente em sistemas de libertação controlada de fármacos.

A nanotecnologia, e a sua aplicação na área da nanomedicina, em particular em *drug delivery systems*, tem sido alvo de um desenvolvimento acentuado. A administração de fármacos ocorre sobretudo por via oral ou por injeção direta no organismo. O percurso destes fármacos desde o local de entrada no organismo até ao tecido-alvo obriga que estes entrem em contato com os outros tecidos podendo interagir com eles. Deste modo, esta interação química pode produzir efeitos indesejáveis no organismo e reduzir a capacidade de ação do fármaco. Tem-se verificado, nas últimas décadas, um grande desenvolvimento de sistemas que contornam estes problemas, tais como a quantidade e o período de administração do fármaco bem como o seu local de libertação e atuação específicos.

Este estudo surge com esta necessidade de se desenvolver sistemas de libertação controlada de fármacos. O objetivo destes sistemas inteligentes é controlar a libertação de fármacos por um dado período de tempo, a dose, a diminuição da toxicidade, o aumento da permanência em circulação e o aumento da eficácia terapêutica através da libertação progressiva e controlada do fármaco por administrações menos frequentes. Além de todas estas vantagens, a administração destes sistemas possibilita a libertação dos fármacos em locais específicos, tais como em tumores e, assim, minimizar os efeitos colaterais indesejados dos fármacos em outros tecidos.

O presente trabalho visa o desenvolvimento de novos biomateriais utilizando nanopartículas mesoporosas de sílica (MSN) e nanopartículas (NPs) metálicas de ouro para a aplicação a sistemas de libertação controlada de fármacos. Para isto, estudou-se a libertação de doxorubicina (DOX) encapsulada em NPs e nanocápsulas mesoporosas de sílica tanto em solução como em superfícies como em vidro. Os resultados obtidos mostraram que as NPs apresentam uma grande capacidade de encapsulação com 36 ng DOX/mg partícula. O tempo de libertação em superfície (vidro) foi estimado em 50 horas enquanto que em solução obteve-se um período inferior a 10 horas. Em relação as NPs de ouro pode-se observar como estas promovem a libertação do fármaco ao serem irradiadas mediante um laser. Deste modo, estas

NPs podem ser úteis para sistemas de liberação controlada de fármacos e para várias aplicações na nanomedicina.

Palavras-Chave: Nanotecnologia, nanopartículas de sílica mesoporosas, nanopartículas metálicas, *drug delivery systems*

Abstract

Nanotechnology is a multidisciplinary science that consists in optimizing the properties of matter thus allowing the development of systems with a gage size. The application of nanotechnology in medicine emerges as a field of research that generates a lot of interest, especially in controlled drug release systems.

Nanotechnology and its application in the field of nanomedicine, particularly in drug delivery systems, has undergone an exponential development. The administration of drugs occurs primarily orally or by direct injection into the organism. The route of these drugs from the entry site in the body to the target tissue requires that they come into contact with other tissues can interact with them. Thus, these chemical interactions can produce undesirable effects in the body and reduce the capacity of drug action. There has been in recent decades, a large development of systems that circumvent these problems, such as the amount and the drug administration period and their place of release and specific activities.

This study emerges due to this need to develop controlled drug delivery systems. The purpose of these intelligent systems is to control the release of drugs for a given period of time, the dosage, decreased toxicity, increased circulation at all times and increased therapeutic efficacy through the gradual and controlled release of the drug for less frequent administrations. Besides all these advantages, administrations of these systems allow the release of drugs at specific locations such as tumors and thereby minimize unwanted side effects of drugs on other tissues.

This research aims to develop new biomaterials using mesoporous silica nanoparticles (MSN) and nanoparticles (NPs) Metallic gold for the application of controlled drug release systems. For this, the release of encapsulated doxorubicin was studied in mesoporous silica NPs and nanocapsules both in solution and on surfaces such as glass. The results showed that NPs have a great capacity for encapsulating with 36 ng DOX / mg particle. The time-release surface (glass) was estimated at 50 hours while in solution gave a period less than 10 hours. Concerning the gold NPs can be observed as these promote the release of drug when being irradiated by a laser. Thus, these NPs can be useful for controlled release drug systems and for various applications in Nanomedicine.

Plano de trabalho

Os materiais derivados de sílica são considerados como biomateriais inertes e inócuos. O objetivo do trabalho era desenvolver um sistema de libertação controlada de fármacos, adsorvidas em dispositivos médicos, como por exemplo implantes, *chips*, adesivos, entre outros.

Assim, no presente projeto pretendeu-se desenvolver NPs de sílica através da síntese de NPs mesoporosas de sílica (MSN) e nanocápsulas de sílica e para a libertação de fármacos. Adicionalmente, foram sintetizadas NPs de ouro (AuNPs). As AuNPs possuem interessantes propriedades óticas, entre as quais a de produzir calor quando irradiadas com um laser. Assim, formulou-se a hipótese de que a emissão de calor pelo ouro (sob a forma de AuNPs) poderia induzir, em NPs vizinhas de sílica uma alteração da libertação. A ser assim, poderíamos ter um sistema “inteligente” de libertação controlada de fármacos.

Para isso, o projeto foi dividido em várias fases. Inicialmente foram sintetizadas NPs que cumprissem alguns requisitos para a libertação de fármacos no organismo. Posteriormente, estudou-se a libertação de um citostático fluorescente, a doxorubicina (DOX). A DOX é uma molécula amplamente usada que tem como vantagem, além de ser antitumoral, poder ser monitorizada por espectroscopia UV-Vis.

O estudo da libertação realizou-se primeiramente em solução de forma a avaliar o seu comportamento em meio contínuo. Dadas as suas peculiaridades e resultados dos ensaios de difusão em solução, foram rejeitadas para ensaios subsequentes as nanocápsulas de sílica. Posteriormente, imobilizaram-se as MSN numa superfície e procedeu-se de novo a ensaios de libertação do fármaco em solução. Conseguiu-se compreender que o método de imobilização não foi eficaz porque foram libertadas NPs da superfície para o meio. Finalmente, desenvolveu-se um modelo experimental, que tivesse a particularidade de confinar as NPs numa superfície mas que impedisse o despreendimento das NPs para o meio. Utilizou-se para isso, uma câmara de difusão vertical (*Vertical Diffusion Cell* da *Copley Scientific*). Esta célula de difusão possui uma membrana permeável a separar dois compartimentos. Depositaram-se as MSN em cima da membrana e, após avaliação da difusão do fármaco, chegou-se à conclusão que o sistema era adequado ao estudo.

Desenvolvido o modelo experimental, procedeu-se à síntese de AuNPs com o intuito de as irradiar com um laser de forma a que estas pudessem emitir calor. Calor este, que em contacto com as NPs de sílica, poderiam alterar a cinética de libertação do fármaco.

Este trabalho tem quatro capítulos. No capítulo um será apresentado uma revisão de literatura na área, começando-se por descrever resumidamente as NPs utilizadas, as suas aplicações e alguns processos de síntese, assim como, as suas características físico-químicas. No mesmo capítulo serão abordadas várias técnicas utilizadas, bem como as principais aplicações biomédicas. No capítulo dois descrevem-se os materiais e os métodos usados. No capítulo três apresentam-se os principais resultados e discutem-se os resultados obtidos. Por último, no capítulo quatro apresentam-se as conclusões e analisam-se perspectivas futuras.

Índice

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VIII
Abstract.....	IXX
Plano de trabalho.....	IXI
Índice.....	IXIII
Índice de abreviaturas, acrónimos, sinais.....	XV
Índice de quadros.....	XVIII
Índice de figuras.....	XVIII
1. Introdução.....	3
1.1. Nanotecnologia.....	3
1.2. Nanopartículas.....	4
1.3. Nanopartículas de sílica.....	5
1.3.1. Estrutura e propriedades.....	5
1.3.2. Síntese de nanopartículas mesoporosas de sílica.....	7
1.4. Nanopartículas metálicas.....	9
1.4.1 Estrutura e propriedades das nanopartículas metálicas.....	10
1.4.2. Propriedades opticas das nanopartículas metálicas.....	12
1.4.3. Síntese de nanopartículas de ouro.....	13
1.5. Estabilidade coloidal.....	15
1.5.1. Propriedades elétricas.....	15
1.5.2. Teoria <i>Derjaguin-Laudau-Verwey-Overbeck</i>	16
1.5.3. Técnica Layer-by-Layer.....	17
1.6 Aplicações biomédicas.....	19
1.6.1. Libertação controlada de fármacos.....	19
1.6.2. Aplicações biomédicas das nanopartículas mesoporosas.....	20
1.6.3. Aplicações biomédicas das nanopartículas de ouro.....	21
1.7.Desafios futuros na investigação com nanopartículas.....	22
2. Metodologia.....	27
2.1. Reagentes.....	27
2.2. Síntese das nanopartículas.....	27
2.2.1. Síntese de nanopartículas mesoporosas de sílica.....	27
2.2.2. Síntese de nanocápsulas mesoporosas de sílica.....	27
2.2.3. Síntese de nanopartículas de ouro de 15 nm.....	28

2.2.4. Microscopia eletrônica de Transmissão (TEM)	28
2.2.5 Armazenamento.....	28
2.3. Carregamento das nanopartículas com Doxorubicina	29
2.3.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis)	29
2.3.2 Carregamento das NPs mesoporosas de sílica	29
2.3.3 Carregamento das nanocápsulas mesoporosas de sílica.....	29
2.3.4 Carregamento das nanopartículas carregadas em superfície.....	30
2.4. Ensaio de liberação	30
2.4.1. Preparação do material para os ensaios de difusão em superfície.....	30
2.4.1.1. Preparação do vidro de 50 camadas de nanopartículas mesoporosas de sílica	30
2.4.1.2. Preparação material dos ensaios da célula de difusão	31
2.4.2. Ensaio de liberação do fármaco	29
2.4.2.1. Estudo da liberação de doxorubicina em solução	32
2.4.2.2. Estudo da liberação de doxorubicina em superfície	32
2.4.2.3. Estudo da liberação de doxorubicina na célula de difusão	32
3. Resultados e Discussão	37
3.1 Síntese de NPs e nanocápsulas mesoporosas de sílica	37
3.2. Estudos de liberação em solução.....	40
3.2.1. Estudos de liberação em NPs mesoporosas de sílica	40
3.2.2. Estudos de liberação em nanocápsulas mesoporosas da sílica.....	41
3.3 Estudo de liberação de doxorubicina em vidro.....	42
3.4. Estudo de liberação de doxorubicina na célula de difusão	43
4. Conclusão	49
Bibliografia.....	53

Índice de abreviaturas, acrónimos, sinais

MSN (s) – NP(s) mesoporosa(s) de sílica

AuNPs - NPs de ouro

TEOS - tetraetilortossilicato

CTAB - brometo hexadeciltrimetilamónio

SPR - ressonância plasmónica superficial

DOX- Doxorrubicina

UV-visível – Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

TEM – Microscopia eletrónica de transmissão

DCE – dupla camada elétrica

PAH – polialilamina

PSS - Sulfonato de poliestireno de sódio

SiO₂ – silício

HAuCl₄ – ácido tetracloroáurico

Índice de quadros

Quadro 1: Principais características das MSNs	6
---	---

Índice de figuras

Figura 1: Comparação do tamanho entre os diferentes tipos de estruturas.	5
Figura 2: Mecanismo de polimerização de TEOS	7
Figura 3: Representação esquemática de uma MSN	8
Figura 4: Fotografias do cálice de <i>Lycurgus</i> em exposição no British Museum em Londres. O vidro apresenta uma cor verde em condições normais de iluminação, mas apresenta uma cor vermelha quando o cálice é iluminado a partir do interior.	10
Figura 5: Soluções com AuNPs com distintos tamanhos da esquerda para a direita 5,18,25,60 e 90nm).	11
Figura 6: Representação esquemática da interação de NPs de ouro e a luz, o que leva à oscilação dos elétrons condutores na superfície das NPs.....	12
Figura 7: Espectro de AuNPs em função do seu tamanho	13
Figura 8: Energia potencial (V) de interação partícula-partícula em função da distância (d) de separação entre duas moléculas coloidais.....	17
Figura 9: Fabricação esquemática de uma camada/ filme pelo método LbL. Um substrato sólido, por exemplo com cargas positivas é inicialmente imerso numa solução polianiónica. No passo (a) o excesso de moléculas pode ser removido por imersão do substrato na solução de lavagem (2) o substrato contendo a camada aniónica é imerso na solução com o polícatião (3). No passo 4 ocorre a última lavagem onde as moléculas não adsorvidas são removidas	18
Figura 10: Libertação de carga controlada	19
Figura 11: a) Célula de difusão, b) Esquema da deposição das MSNs na célula de difusão, c) Deposição das MSNs na membrana.....	31
Figura 12: a) Imagem de microscopia eletrónica de transmissão de MSNs com uma resolução de 200nm b) Imagem de TEM de MSN com uma resolução de 50nm.....	38
Figura 13: Histograma exemplificativo da distribuição de tamanhos resultantes de um processo de síntese ($39,56 \pm 4,27\text{nm}$).....	38

Figura 14: a) TEM com esferas de poliestireno recobertas com sílica (resolução 1 μ m) b) Formação de cápsulas depois da eliminação do PS por calcinação.....	39
Figura 15: Histograma de distribuição de tamanho de nanocápsulas de sílica mesoporosa (520,16 \pm 21,06nm).	40
Figura 16: Comparação dos estudos de liberação DOX em solução com MSN.....	41
Figura 17: Comparação dos estudos de liberação DOX nas 3 réplicas com nanocápsulas em solução.....	42
Figura 18: Liberação com o tempo de DOX em vidro.	43
Figura 19: Liberação de DOX em MSN em uma célula de difusão	44
Figura 20: Liberação de DOX na célula de difusão promovida pelo uso do laser.....	45

Capítulo
ESTADO DA ARTE **1**

1. Introdução

1.1. Nanotecnologia

O termo de nanotecnologia foi enunciado inicialmente numa das comunicações de Richard Feynman em 1959, “*There 's plenty of room at the bottom*”. No entanto a nanotecnologia enquanto ciência foi impulsionada a partir de 1974 pelo professor Nório Taniguchi, da Universidade de Ciências de Tokyo, para descrever as tecnologias que permitem a construção de materiais à escala nanométrica (Ali e Tariq, 2014).

A nanotecnologia é uma das áreas do conhecimento que apresentou um desenvolvimento mais acelerado, em particular desde o início dos anos 90. Apresenta-se de tal forma presente em vários aspetos das nossas vidas, que não podemos rejeitar esta nova área e tecnologia. É uma área bastante apelativa, devido a todas as suas potencialidades e aplicações nas mais variadas ciências. Assume-se como uma ciência interdisciplinar uma vez que agrega várias áreas como a química, física, biologia, biotecnologia, medicina e engenharias, integrando assim várias áreas de interesse. Desta forma, a nanotecnologia tem suscitado um grande interesse na comunidade científica e no público geral, o que justifica os elevados investimentos na área, contribuindo pra o seu desenvolvimento (Pyrrho and Schramm 2012).

A nanotecnologia caracteriza-se pela manipulação da matéria a uma escala atómica e molecular. Ou seja, é a manipulação de objetos à escala manométrica de forma a criar estruturas que podem levar à formação de novos produtos ou otimização de outros já existentes. É um ramo que compreende a utilização de NPs pequenas com um tamanho entre 1-100 nm. A nanotecnologia ainda esta envolvida na síntese, desenho conceção, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos estruturados, em pelo menos uma dimensão, numa escala nanométrica (Saini, Saini, and Sharma 2010; Vélez et al. 2014; Jain et al. 2008).

Em virtude do seu reduzido tamanho os nanomateriais apresentam propriedades físicas, químicas, mecânicas, elétricas, magnéticas e óticas muito diferentes daquelas que regem o mundo macroscópico. À medida que o tamanho dos sistemas diminui, os fenómenos físicos que regem a matéria alteram-se, uma vez que na escala manométrica são os efeitos quânticos que dominam. Isto é, com a alteração do seu tamanho, os nanomateriais alteram as suas propriedades como a estabilidade e a reatividade entre outros fatores. Algumas das propriedades que tornam estes materiais interessante deve-se à sua elevada superfície/volume, estrutura bem organizada e definida (Vélez et al. 2014).

De todas as áreas de aplicação aquela que tem suscitado mais interesse na comunidade científica é a biomedicina. A aplicação da nanotecnologia na medicina surge como um novo campo de pesquisa interdisciplinar entre diversas áreas da ciência, combinando os avanços da medicina com as engenharias. Tem como principal objetivo o fabrico de nanodispositivos e nanomateriais para atuação biológica. É um campo com inúmeras aplicações e potencialidades em diversas áreas como na nanomedicina (diagnóstico e terapia), desenvolvimento de sistemas inteligentes para entrega e libertação controlada de fármacos, nanocosmética, entre outros (Britto 2012).

Uma das áreas mais promissoras da nanotecnologia a nível da medicina é o desenvolvimento de sistemas de encapsulamento e libertação controlada de fármacos. Estes nanomateriais quando comparados com as formas farmacêuticas convencionais oferecem inúmeras vantagens como: a melhoria de eficácia da terapia, diminuição ou limitação de fenómenos tóxicos associados ao fármaco encapsulado e libertação controlada e direcionada do fármaco encapsulado. Existem vários tipos de sistemas de nanoencapsulamento e libertação de fármacos a serem investigados e cada um com particularidades que devem ser levadas em consideração na sua escolha. Deste modo os rápidos e significativos avanços na nanotecnologia o desenvolvimento de novas oportunidades de diagnóstico e aplicações terapêuticas para várias doenças (Britto 2012).

1.2. Nanopartículas

Nos últimos anos a utilização de NPs aumentou de uma forma exponencial tanto na indústria como na investigação.

As NPs são partículas coloidais definidas como sistemas sólidos à base de polímeros (sintéticos, semissintéticos ou naturais), ou de outros materiais, de natureza biodegradável ou não e que podem servir de veículos para fármacos. Apresentam um tamanho manométrico, ou seja, se definem como partículas que têm um tamanho compreendido entre 1-100 nm. Na figura 1 comparam-se os tamanhos de diversas NPs com uma molécula e uma célula.

De acordo com o processo de síntese, as NPs podem adquirir tamanhos diferentes e morfologias distintas.

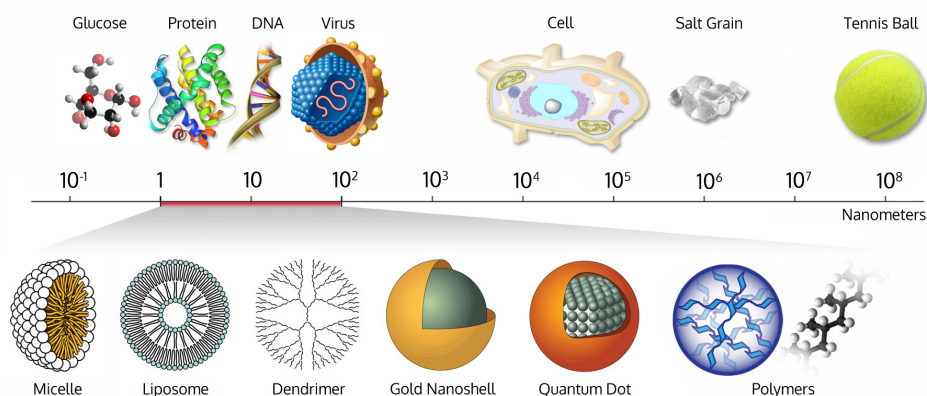


Figura 1: Comparação do tamanho entre os diferentes tipos de estruturas. (Wich 2015)

A investigação em nanotecnologia levou ao aparecimento de diferentes tipos de NPs como por exemplo: dendrímeros, lipossomas, micelas, NPs de sílica, NPs de ouro, NPs de óxido de ferro e nanotubos de carbono. As NPs podem-se classificar atendendo à sua natureza orgânica ou inorgânica. Assim, as NPs orgânicas podem ser formadas por materiais como polímeros e bicamadas lipídicas enquanto as NPs inorgânicas podem ser formadas por metais e materiais inertes como o dióxido de titânio ou por sílica (Ran et al. 2013; Llinàs e Sánchez-García 2014).

1.3. Nanopartículas de sílica

Na última década, as MSNs têm conquistado novas utilizações devido às suas diferentes aplicações em diversas áreas científicas e tecnológicas nomeadamente em química dos materiais, biologia, biomedicina entre outras. É precisamente em biomedicina que tem havido um maior interesse devido à sua morfologia, tamanho, estrutura e propriedades únicas que apresentam. As dimensões nanométricas das NPs de sílica, a sua elevada razão área superficial e volume de poros na sua superfície permitem-lhes uma enorme versatilidade e multiplicidade de aplicações, destacando-se a sua utilização como veículos para a libertação controlada de fármacos (*drug delivery*). Além disso, estas NPs podem ser modificadas para melhorar a sua eficiência, por exemplo, mediante a funcionalização e conjugação com outras moléculas, dependendo da sua aplicação biomédica: diagnóstico ou terapêutica (He e Shi 2011; de Barros et al. 2015; Z. Li et al. 2012).

1.3.1. Estrutura e propriedades

Já foi referido que as MSNs têm atraído uma grande atenção na comunidade científica. Também foi referido que esse facto se deve às suas excepcionais propriedades físico-químicas como a sua resistência mecânica, estabilidade química, biocompatibilidade e versatilidade sintética (Quadro

D). Estas NPs são constituídas por uma matriz de sílica e são caracterizadas pela presença de poros com um diâmetro compreendido entre os 2-50nm. Destacam-se pelo seu reduzido tamanho o que as torna adequadas para trabalhar a nível celular. A sua estrutura rígida e estável permite que sejam submetidas a elevadas temperaturas, mudanças de pH e também ao *stress* mecânico (Cotí et al. 2009; Vivero-Escoto et al. 2010; Cao 2004; II Slowing et al. 2008; Uskoković 2013; Wang et al. 2015).

Quadro 1: Principais características das MSNs

<ul style="list-style-type: none">☀ Elevada área superficial ($> 1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) o que permite acumular uma grande quantidade de carga (35%);☀ Elevado volume de poro ($> 1 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$); grande porosidade;☀ Tamanho do poro pode ser modificado e com uma distribuição estreita (2-10nm), permitindo que sejam suscetíveis a serem usadas em <i>drug delivery</i> de distintas moléculas;☀ Boa estabilidade química e térmica;☀ Baixa toxicidade e biocompatibilidade com o organismo humano;☀ Duas superfícies funcionalizáveis (interna e externa);☀ Mesoestrutura estável;☀ Fáceis de modificar morfológicamente (controlo do tamanho, poros e forma)☀ Fáceis de sintetizar

Adaptado de: (Y. Zhang et al. 2010; Wang et al. 2015)

A sua elevada razão área superficial/volume e elevada porosidade permite que estas sejam utilizadas em conjunto com uma elevada gama de componentes, tais como fármacos, proteínas ou sensores. Além disso, as moléculas hospedadas dentro dos poros vão ser protegidas de uma possível degradação em ambientes hostis, como por exemplo o intestino e estômago. Estas propriedades tornam estas NPs interessantes em nanomedicina, em particular em áreas relacionadas com o *drug delivery* (Llinàs and Sánchez-garcía 2014; Kwon et al. 2013; F. Tang, Li, and Chen 2012).

1.3.2. Síntese de nanopartículas mesoporosas de sílica

As NPs de sílica podem ser preparadas por diversos métodos dos quais se destacam o processo sol-gel e o processo de microemulsão inversa (V. Valtchev 2013).

Kolbe no ano de 1956 foi o primeiro a observar e a descobrir a formação de partículas esféricas de sílica (SiO_2) através da hidrólise e condensação do tetraetilortossilicato (TEOS), numa solução de água/álcool e utilizando o hidróxido de amónio como sistema catalisador (D. Cornejo-Monroy, J. F. Sánchez-Ramírez, J. A. Pescador Rojas 2009).

O processo sol-gel, também conhecido por método de *Stöber*, em 1968, desenvolveu a mais conhecida síntese de partículas de sílica altamente esféricas e monodispersas, sob condições de crescimento controlado a uma escala nanométrica. Esta síntese também consiste na hidrólise controlada e condensação de um precursor de sílica (alcóxido de silício) numa solução água/etanol usando o amoníaco como catalisador (Wu, Mou, e Lin 2013).

Este método tem sido o mais simples e eficaz a gerar esferas monodispersas de SiO_2 . No entanto, existem alguns problemas a ser resolvidos relativamente na fase da hidrólise, de forma a haver um maior controle na distribuição de tamanho médio, diâmetro e morfologia das NPs (D. Cornejo-Monroy, J. F. Sánchez-Ramírez*, J. A. Pescador Rojas 2009; Brinker 1988).

Assim, em 1992 investigadores da *Mobil Company* apresentaram um novo método para a síntese de MSN. A sua metodologia de síntese tem como base a condensação de precursores de sílica na presença de surfactantes catiónicos em condições alcalinas. Este processo trata-se assim, de uma adaptação ao método descrito por *Stöber* para a obtenção de NPs de sílica. A incorporação de um tensoativo catiónico permite a obtenção de estruturas ordenadas e monodispersas mediante a formação de micelas que atuam como molde à formação de poros. O procedimento padrão consiste em misturar um precursor de silicato, geralmente TEOS, com um surfactante catiónico sendo o mais utilizado o brometo hexadeciltrimetilamónio (CTAB) a uma temperatura compreendida entre os 30 e 70°C em meio alcalino (pH=11). As NPs formam-se mediante o processo sol-gel catalisado em meio básico e de acordo com duas reações chave: hidrólise e condensação como observado na figura 2 (Dennis Douroumis e al. 2012; Llinàs e Sánchez-garcía 2014).

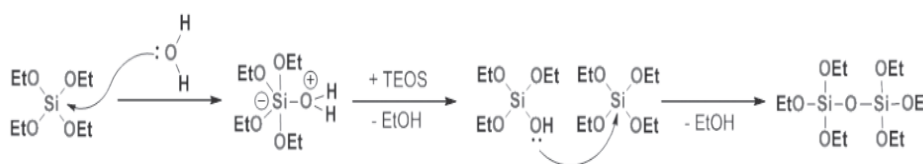


Figura 2: Mecanismo de polimerização de TEOS (Llinàs e Sánchez-García 2014).

A primeira etapa do processo consiste na hidrólise do alcóxido de silício. Nesta etapa, obtém-se uma suspensão coloidal contendo partículas de tamanho inferior a 100 nm onde são formados grupos silanol (Si-OH) enquanto o álcool correspondente é libertado. De seguida, os grupos de silanol polimerizam-se por condensação, dando origem a estruturas tridimensionais unidas por ligações de siloxano (Si-O-Si) ocorrendo a eliminação concomitante de água e álcool. A segunda etapa corresponde à condensação onde se forma um gel, mais ou menos compacto e denso. Nesta fase, a presença de micelas formadas pelo tensioativo é crítica, uma vez que atuam como molde dando origem à formação de poros (Llinàs e Sánchez-García 2014).

Deste modo, o agente tensioativo catiónico atrai as espécies de sílica que estão carregadas negativamente e que estão concentradas à volta das micelas formando uma estrutura de sílica tubular (Figura 3).

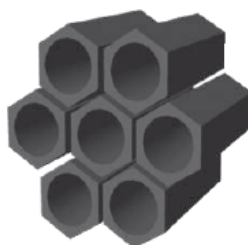


Figura 3: Representação esquemática de uma MSN (Wu, Mou, e Lin 2013).

A morfologia das partículas, tamanho e porosidade podem ser modificados por variação das condições de reação nomeadamente tipo/concentração do precursor de sílica, tipo/concentração de agente tensioativo, pH, solvente, temperatura e tempo de reação. De todos os fatores determinou-se aqueles que afetam mais o tamanho das NPs é a proporção de base em relação à quantidade de TEOS, e em seguida a temperatura (Llinàs e Sánchez-García 2014; Correa-Duarte 2011; Wu, Mou, e Lin 2013).

Por último, o surfactante deve ser removido do interior dos poros. Para isto, pode-se utilizar dois métodos: extração com um solvente ou através de calcinação a temperaturas de 500-600°C. Estes métodos permitem a rutura electrostática entre os grupos de cabeça do agente tensioativo catiónico e dos silicatos aniónicos, facilitando assim a remoção do agente tensioativo nos mesoporos e a formação final das NPs (Llinàs e Sánchez-García 2014; Correa-Duarte 2011).

Outro processo de produção de MSNs, é o método da microemulsão inversa. Gotículas de água de dimensões nanométricas são rodeadas por moléculas de um agente tensioativo presentes numa fase orgânica, originando uma microemulsão. O precursor de sílica sofre hidrólise/condensação dentro das gotículas que atuam como nanoreatores regulando, assim, a cinética das

reações de nucleação e crescimento de partículas. Este método permite um maior controle do tamanho de partícula e distribuição de tamanhos relativamente ao processo sol-gel, especialmente para as partículas com dimensões inferiores a 100nm (V. Valtchev, 2013).

1.4. Nanopartículas metálicas

As NPs metálicas, em especial as NPs de ouro (AuNPs) têm sido alvo de intensa investigação em diversas áreas devido, sobretudo às suas propriedades óticas, catalíticas, eletrônicas, fototérmicas e magnéticas, que lhes conferem uma elevada versatilidade de usos em diversas áreas. Desta forma, a sua aplicação na medicina parece ser das mais promissoras, nomeadamente na prevenção, no diagnóstico e no tratamento de diferentes patologias como no cancro ou na terapia genética. À semelhança das MSNs, estas NPs também se podem definir como sistemas transportadores, uma vez que permitem controlar a libertação de fármacos. A libertação dos fármacos, pode ser controlada mediante estímulos internos, como a variação de concentração, ou por estímulos externos como o uso de um laser) (Huang e El-Sayed 2010; Santos et al. 2014; Cai et al. 2008; Duncan, Kim, and Rotello 2010; Wang et al. 2015).

Apesar da sua redescoberta recente os egípcios e chineses no século V A.C, foram os primeiros a sintetizar AuNPs e, desde então, são vários os exemplos da sua utilização a nível decorativo e medicinal. Um exemplo no uso de ouro nanocristalino para fins decorativos e que se tornou famoso na ciência dos nanomateriais é o cálice de Lycurgus que se encontra em exposição no *British Museum* em Londres como se pode observar na figura 4. Trata-se de um cálice datado no período romano (século IV, D.C) fabricado em matriz vítrea e cuja cor depende do angulo de incidência da luz visível sobre a sua superfície. A cor verde resulta da reflexão da luz pela superfície do cálice, enquanto a luz transmitida através do vidro origina uma cor vermelha. Este efeito ótico deve-se à existência de NPs metálicas, nomeadamente de ouro e prata, que se encontram dispersas no vidro do cálice, originando um vidro dicróico (Freestone e al. 2007; Martins e Trindade 2012).



Figura 4: *Fotografias do cálice de Lycurgus em exposição no British Museum em Londres. O vidro apresenta uma cor verde em condições normais de iluminação, mas apresenta uma cor vermelha quando o cálice é iluminado a partir do interior (Freestone e al. 2007).*

1.4.1 Estrutura e propriedades das nanopartículas metálicas

As AuNPs são NPs esféricas e estáveis em solução coloidal. Dependendo do seu tamanho, a razão superfície/volume vão ser alteradas bem como as suas propriedades óticas. A cor da solução coloidal depende do tamanho médio das NPs que as compõem. As AuNPs de menores dimensões apresentam uma cor vermelha intensa e à medida que o tamanho médio das NPs vai aumentando a sua cor vai mudando para azul, como se pode observar na figura 6. Este fenómeno deve-se à oscilação coletiva de elétrons condutores, designado por ressonância plasmónica superficial (Duncan, Kim, e Rotello 2010; Huang e El-Sayed 2010; Martins e Trindade 2012).

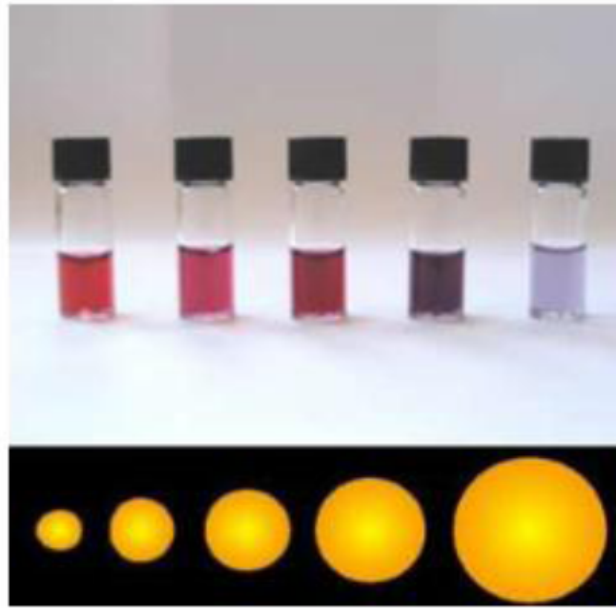


Figura 5: Soluções com AuNPs com distintos tamanhos da esquerda para a direita 5,18,25,60 e 90nm).

Além das propriedades óticas referidas anteriormente, estas NPs apresentam uma baixa toxicidade, elevada estabilidade e biocompatibilidade e uma síntese relativamente simples. Esta baixa toxicidade foi defendida por Connor e colaboradores (2005) que demonstraram que os núcleos de ouro das NPs são inertes e não tóxicos. Por serem substancialmente inertes em fluidos biológicos tornam-se atrativas para aplicações em nanodiagnóstico. Possuem uma grande área superficial sendo por isso capazes de adsorver biomoléculas sem afetar a sua atividade biológica. São constituídas por um núcleo metálico, ou seja, estão revestidas por uma camada orgânica a qual é fundamental para modular o tipo de interações com o ambiente circulante. Esta camada determina a sua estabilidade e a reatividade. A absorção por ressonância plasmónica de superfície (SPR) de NPs metálicas pode ser seguida de uma rápida conversão da luz absorvida em calor. Esta propriedade pode ser utilizada para eliminar células cancerígenas ou para entrega de moléculas dentro das células em um conceito designado por fototerapia. Assim, as propriedades químicas e físicas dependem de fatores como o tamanho, a composição, a forma, razão área de superfície/volume e a natureza da sua superfície. Deste modo, estas NPs apresentam um enorme potencial de aplicação em áreas tais como nanoimunologia, nanobiotecnologia e na nanomedicina, uma vez que as suas propriedades podem ser facilmente ajustadas na síntese controlando fatores como o tamanho e forma. Além disso, devido à sua escala de tamanho, estas NPs podem ser utilizadas para aplicações em *drug delivery* (Connor et al. 2005; Martins e Trindade 2012; Cancino e al. 2014).

1.4.2. Propriedades óticas das nanopartículas metálicas

Como referido, as NPs metálicas apresentam propriedades óticas, eletrônicas e catalíticas diferenciadas dependendo do seu tamanho manométrico. A intensa coloração de certos metais de tamanho manométrico Au, Ag, Cu e metais alcalinos, deve-se à SPR, cuja frequência de ressonância coincide com a região do visível do espectro eletromagnético (Collin R, 1990).

Quando as AuNPs são irradiadas por luz, ocorre uma oscilação coletiva de elétrons livres na superfície da partícula, absorvendo parte da luz visível como se observa na figura 6. Como resultado verifica-se uma forte banda de absorção numa zona do espectro eletromagnético que depende do tamanho da NPs, da forma e do seu material (Kelly et al. 2003; Glomm 2005).

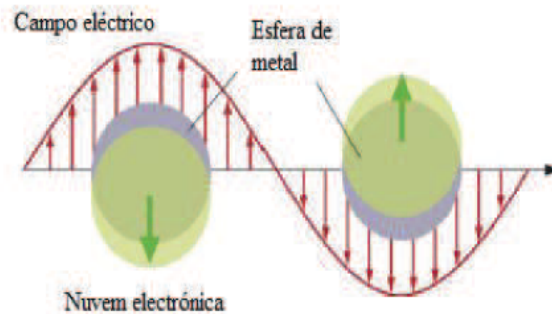


Figura 6: Representação esquemática da interação de NPs de ouro e a luz, o que leva à oscilação dos elétrons condutores na superfície das NPs (Kelly e al. 2003).

A forma e o tamanho das AuNPs, afeta o modo como estas interagem com a luz. Diferentes tamanhos e formas significam diferentes modos de dispersar e absorver a luz, o que se traduz em diferentes propriedades óticas (Martins e Trindade 2012; Huang e El-Sayed 2010).

As AuNPs com um diâmetro de 3-50 nm apresentam uma cor rubi característica dado que a posição na banda plasmónica situa-se em torno dos 510-530 nm. Como se pode observar na figura 7 quanto maior o tamanho das partículas, maior será a seu comprimento de onda (Cancino et al. 2014).

O comprimento de onda e o máximo de intensidade da absorvância não depende apenas do tamanho das NPs, mas também da temperatura e do solvente. De qualquer forma, o espectro que se obtém pode-se utilizar para calcular/estimar a concentração e o tamanho das partículas em solução.

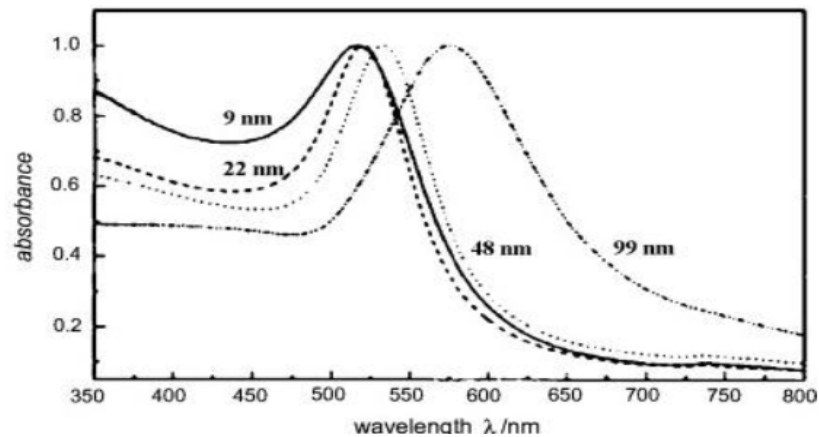


Figura 7: Espectro de AuNPs em função do seu tamanho (Duncan, Kim, e Rotello 2010).

A resposta ótica de AuNPs depende também de outros parâmetros, tais como a função dielétrica do meio circundante e a distância entre NPs vizinhas, que por sua vez, determina o acoplamento plasmônico entre partículas. A variação concertada destes parâmetros permite o ajuste das propriedades óticas nos nanomateriais de ouro (Martins e Trindade 2012; Ehrenhaft e Lorenz 1908; Glomm 2005).

Devido às peculiaridades das propriedades óticas das AuNPs, estas podem emitir luz (*Mie Scattering*) mas também podem absorver-la e transformá-la rapidamente em calor. Relativamente à produção de calor, emitem um calor intenso quando estimuladas com uma frequência adequada de luz (laser) ou através de outra fonte de calor (Ehrenhaft e Lorenz 1908; Duncan, Kim, e Rotello 2010).

Por todas as características mencionadas, neste trabalho, além de outras, foram sintetizadas AuNPs com o objetivo de serem irradiadas por um laser para que a liberação do fármaco ocorresse apenas após esse estímulo.

1.4.3. Síntese de nanopartículas de ouro

As AuNPs podem ser preparadas por diferentes métodos, obtendo-se sistemas coloidais monodispersos e com um tamanho médio entre 1-150nm. A partir do método de síntese escolhido pode-se controlar o tamanho, a forma e a dispersão das AuNPs, controlando assim, as propriedades óticas, elétricas, catalíticas (Kelly et al. 2003).

A forma e o tamanho das AuNPs dependem de diversas variáveis de processo, tais como concentrações dos reagentes, temperatura, pH, surfactantes, aditivos, entre outros. Vários autores já discutiram os efeitos dessas variáveis de processo sobre a cinética de formação, tamanho e morfologia de AuNPs (Kelly et al. 2003).

Michael Faraday foi o primeiro cientista a estudar as AuNPs em 1857. Ele foi o primeiro a demonstrar a formação de uma solução vermelho escuro de ouro coloidal a partir da redução do ácido tetracloroáurico III com fósforo, usando dissulfato de carbono como solvente. Ele reportou as propriedades óticas de finos filmes secos a partir destas soluções e observou a reversível mudança de coloração sobre compressão mecânica (Faraday, 1857).

Atualmente, vários métodos podem ser utilizados, variando principalmente o agente redutor e o meio. Os métodos mais usados são de Turkevich reportado em 1971, e de *Brust-Schiffrin* em 1994.

Turkevich e os seus colaboradores foram os primeiros a demonstrar a possibilidade de controlar o tamanho das AuNPs pela concentração do agente redutor, agitação e temperatura da reação. O método consiste na redução do ácido tetracloroáurico por citrato de sódio em meio aquoso sob agitação e aquecimento controlados, com o intuito de obter NPs estabilizadas. Este método é um dos mais utilizados devido à sua simplicidade e reprodutibilidade, obtendo-se assim AuNPs com um tamanho médio de 15 nm (Turkevich, 1985).

Em geral, para a síntese de AuNPs em solução aquosa, reduz-se um composto precursor, que geralmente é o HAuCl_4 na presença de um agente estabilizante, capaz de interagir com as NPs metálicas evitando, assim, a sua aglomeração. Os agentes de estabilização podem ser PVP (polivinilpirrolidona), alcanotióis, fosfinas, óxidos de fosfinas, carboxilatos e diferentes aminas. Outro modelo de síntese muito utilizado é o método de *Brust-Schiffrin*. Este método permite sintetizar AuNPs através de um sistema bifásico, geralmente composto por tolueno/água. As AuNPs obtidas por este método possuem um diâmetro de 1-3 nm. Neste método, os íons metálicos em solução aquosa são transferidos para uma fase orgânica, no caso, tolueno, usando um agente de transferência de fase. Em seguida são reduzidos, na presença de um alcanotiol que serve como agente passivante (Xu et al. 2005).

É importante realçar que pequenas variações no tamanho das AuNPs faz com que sua estrutura eletrônica seja modificada, produzindo assim, uma mudança de coloração na solução. As cores podem variar desde do azul (partículas maiores) até ao castanho (partículas mais pequenas) como mostra a figura 5 (Kelly et al. 2003).

Desta forma, o controle do tamanho pode-se observar facilmente através da espectrometria UV-Vis, uma vez que aparece uma banda característica que oscila entre os 500 e 900 nm denominada por banda plasmônica de superfície. As AuNPs com um diâmetro entre 4-50 nm possuem comprimentos de onda de SPR entre os 510-530, enquanto as partículas maiores possuem comprimentos de onda 650 a 900 nm (Huang and El-Sayed 2010; Kelly et al. 2003; Cancino et al. 2014).

1.5. Estabilidade coloidal

Os colóides são apresentados como NPs que têm uma gama de tamanho de 1nm e são responsáveis pelo aparecimento da cor e turbidez (Junior and Varanda 1999).

Um sistema coloidal pode ser, sólido, líquido ou gasoso. As AuNPs quando se encontram dispersas em solução são consideradas um colóide. Os colóides têm um sistema com um estado de energia mais elevada do que os materiais macroscópicos. A estabilidade coloidal é determinada pela energia livre no sistema. O principal parâmetro é a grande área de superfície entre a fase dispersa e a fase contínua. Uma vez que as partículas coloidais se movem constantemente, a sua dispersão de energia é determinada pelo movimento Browniano. A estabilidade das NPs depende de várias características físicas adquiridas a partir das etapas de crescimento e de nucleação. Basicamente durante a preparação dos colóides de ouro as variáveis são por exemplo a temperatura, concentração dos agentes estabilizantes, pH, entre outras (Melo et al. 2012; Junior e Varanda 1999).

1.5.1. Propriedades elétricas

Como mencionado, a principal característica dos colóides/NPs é sua grande relação superfície/volume. Por esta razão, tendem a associar-se para reduzir a sua área superficial, fazendo com que os colóides fiquem termodinamicamente instáveis. Assim, é necessário evitar a sua agregação através do uso de mecanismos de repulsão adequados facilitando, deste modo, a estabilidade cinética. Esta permite que os colóides se mantenham dispersos durante longos períodos de tempo (Junior e Varanda 1999).

A estabilização eletrostática baseia-se na adsorção de iões ou moléculas que estabilizam as partículas na fase contínua. As partículas coloidais adquirem cargas elétricas na sua superfície, expostas a solventes polares, atraindo os iões de cargas contrárias criando assim uma

“atmosfera” difusa. Portanto, forma-se uma dupla camada elétrica (DCE). Esta dupla camada vai proteger as NPs coloidais da agregação, devido à repulsão de cargas da mesma natureza (Junior e Varanda 1999).

Várias teorias foram propostas ao longo da história para estudar a dupla camada elétrica. Destacando-se entre elas: a teoria *Helmholtz-Perrin*, *Stern* e de *Gouy-Chapman*. A ideia da DCE foi primeiramente proposta por *Helmholtz* em 1879. Ele descreve a DCE como uma camada de íões que se ligam fortemente à superfície das partículas com cargas opostas.

Outro modelo foi proposto por *Gouy* em 1910 e *Chapman* em 1913, denominado por modelo de camada difusa. O modelo *Gouy-Chapman* considera a influência do eletrólito e do potencial aplicado na capacitância da DCE para que ela seja difusa e com um comprimento variável. Assim, esta não seria compacta como foi descrita por *Helmholtz*, mas de espessura variável estando os íões livres para se movimentarem. Em 1924 *Stern* combinou os dois modelos descritos anteriormente, a dupla camada seria formada por uma camada compacta próxima do eletrodo e uma camada difusa que se estenderia até ao interior da solução. Isto é, os íões estariam dispersos na solução como uma nuvem em desordem térmica (*Sten*, 1924); (*Chapman*, D.L. 1913).

1.5.2. Teoria *Derjaguin-Laudau-Verwey-Overbeck*

Em 1941, *Derjaguin-Laudau-Verwey-Overbeck* (DLVO), propuseram de forma independente e simultânea a teoria para interpretar o fenómeno da estabilidade de coloides liófilos. Conhecida atualmente como a teoria DLVO. Esta teoria baseia-se nas variações de energia que são observadas quando as partículas se aproximam uma das outras (*Souza* 2010).

Pela teoria DLVO, as dispersões coloidais podem ser descritas em termos de balanços de forças atrativas de van der Waals e por forças repulsivas de *Coulomb*, ou seja, as interações atrativas de curto alcance de van der Waals induzem à agregação do sistema à medida que as superfícies das partículas se aproximam umas das outras. Essas forças de curto alcance são as mesmas provenientes da polarização de átomos e moléculas (dipolos) constituintes dos sólidos dispersos no meio polar que separa as partículas. De acordo com esta teoria, a energia total de interação entre duas partículas (V_T) é dado pela soma da repulsão eletrostática de *Coulomb* (V_R) e a atração de van der Waals (V_{VDW}). Esta pode ser representada por uma curva de energia de potencial como se observa na figura 8 (*Junior and Varanda* 1999; *Araujo et al.* 2010).

$$V_T = V_R + V_{VDW}$$

A curva mostra que pequenas e grandes distâncias entre partículas favorecem a atração, enquanto distâncias intermédias favorecem a repulsão. A concentração de eletrólitos no meio afeta o ponto máximo da curva, de forma que as concentrações mais altas diminuem o potencial máximo, favorecendo a deposição, devido à adesão entre partículas. Esta deposição acontece se as superfícies apresentarem cargas eletricamente opostas e poderá apresentar caráter reversível, caso a deposição ocorra em distâncias situadas no ponto mínimo secundário da curva, ou caráter irreversível, caso a deposição ocorra na região do ponto mínimo primário (Fardim 2002).

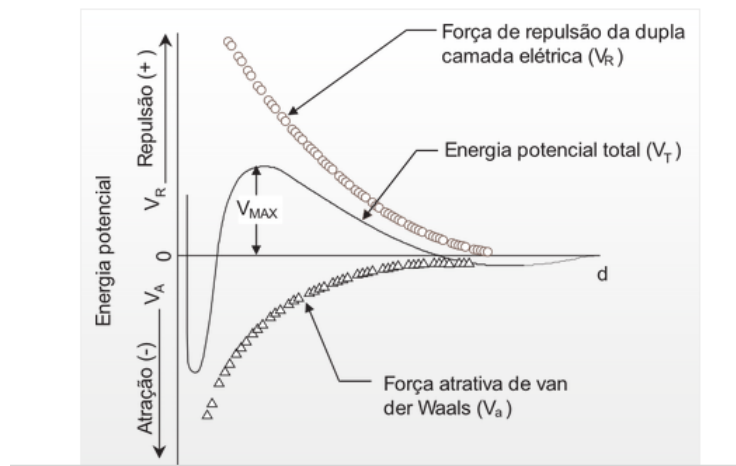


Figura 8: Energia potencial (V) de interação partícula-partícula em função da distância (d) de separação entre duas moléculas coloidais (Junior e Varanda 1999).

1.5.3. Técnica Layer-by-Layer

O conceito *Layer-by-Layer* (camada após camada) foi introduzido por *Decher Hong* e pelos seus colegas de trabalho em 1992 (Y. Li, Wang, e Sun 2012).

A técnica *layer-by-layer*, tornou-se a principal escolha para produção de filmes ultrafinos devido à fabricação dos mesmos acontecer de uma maneira simples e de uma forma mais barata em relação as outras técnicas disponíveis (Popiolski et al. 2011).

Esta técnica foi aplicada pela primeira vez para montar polieletrólitos de cargas opostas, sendo rapidamente alargada a outros sistemas, tais como nanocristais poliméricos, NPs e dendrímeros. Também se utiliza este método de automontagem para imobilizar componentes biológicos tais como proteínas, enzimas, ADN, vírus e membranas celulares. Os filmes automontados têm sido

sugeridos para várias aplicações tais como na ótica, eletroquímica e em *drug delivery* (Crespilho et al. 2006; Z. Tang et al. 2006).

Fundamentalmente esta técnica baseia-se na adsorção física devido a interações eletrostáticas entre espécies apresentando cargas opostas (policatão e polianião). Consiste em imergir um substrato sólido com um determinado polieletrólito (policatão ou polianião) por um período de tempo (geralmente só alguns minutos). Em seguida, o substrato sólido é lavado numa solução com um pH próximo da solução polimérica, o objetivo é remover as moléculas que não foram adsorvidas. Por exemplo, um substrato sólido carregado positivamente, é imerso numa solução aniônica, para formar uma camada do polianião. Após a lavagem, o substrato mais a monocamada é novamente imerso numa solução com um polieletrólito de carga oposta à solução inicial, o que permite a formação da segunda monocamada. Novamente acontece um processo de lavagem para retirar as moléculas que não foram adsorvidas e posteriormente se faz uma secagem em fluxo com N_2 ou ao ar. No final deste processo é obtida a primeira bicamada. Repetindo-se este procedimento pode-se obter o número de bicamadas desejadas (Michel et al. 2012). A figura 9 esquematiza a formação de filmes finos a partir da técnica *Layer-by-Layer*, evidenciando a utilização de polieletrólitos.

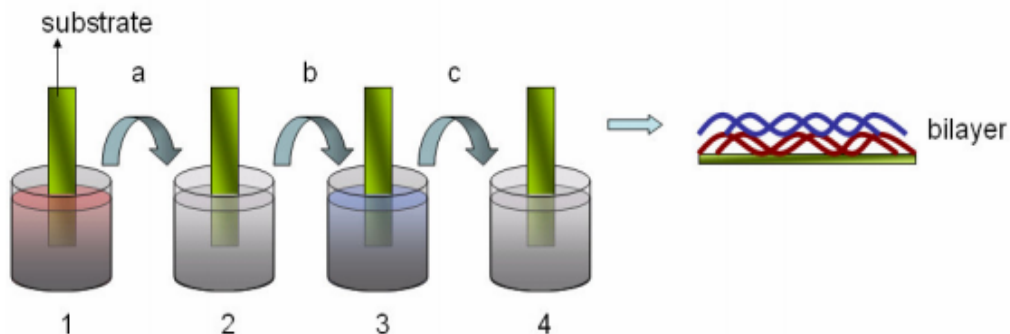


Figura 9: Fabricação esquemática de uma camada/filme pelo método LbL. Um substrato sólido, por exemplo com cargas positivas é inicialmente imerso numa solução polianiônica. No passo (a) o excesso de moléculas pode ser removido por imersão do substrato na solução de lavagem (2) o substrato contendo a camada aniônica é imerso na solução com o policatão (3). No passo 4 ocorre a última lavagem onde as moléculas não adsorvidas são removidas (Crespilho et al. 2006).

A técnica LbL é uma técnica que possui uma grande versatilidade devido ao seu enorme leque de possibilidades com respeito à sua utilização de materiais, quer sejam substratos, vidros hidrofóbicos, metais, polímeros e NPs, quer sejam polieletrólitos orgânicos, inorgânicos ou contendo componentes biológicos imobilizados como proteínas e ADN (Z. Tang et al. 2006).

Além disso, a técnica LbL permite a obtenção de filmes auto-organizados com alto controle de espessura, rugosidade e porosidade. Este método também é útil pois permite controlar o crescimento do filme numa escala nanométrica (Crespilho et al. 2006).

1.6 Aplicações biomédicas

1.6.1. Liberação controlada de fármacos

O controle de liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através de vetores ou nanocarregadores tem sido uma das áreas que tem sido alvo de uma intensa pesquisa nos últimos anos. Dentro dos vetores podem incluir-se as NPs. As NPs têm atraído uma maior atenção dos investigadores devido às suas potencialidades como por exemplo possuem uma maior estabilidade nos fluídos biológicos.

É importante para o desenho de sistemas de liberação inteligente de fármacos ter em conta a eficiente capacidade de carga e que o fármaco seja libertado na região apropriada de forma controlada. A ideia é tentar ultrapassar as desvantagens dos sistemas atuais como: o desconforto de dosagens frequentes, de tentar manter os níveis do fármaco a concentrações constantes e evitar intoxicações por excesso de fármaco. Estes sistemas surgem com a finalidade de ultrapassar estas desvantagens (Rezende et al. 2003).

Neste contexto, as MSNs apresentam-se como uma boa alternativa em relação aos veículos atuais e convencionais (por exemplo lipossomas e polímeros biodegradáveis) uma vez que é possível incorporar elevadas quantidades de carga nos seus mesoporos (figura10). Porém, as NPs metálicas (NPs de ouro) também têm atraído bastante atenção neste campo devido as suas propriedades óticas (Igor I. Slowing, Trewyn, e Lin 2007; Llinàs e Sánchez-garcía 2014).

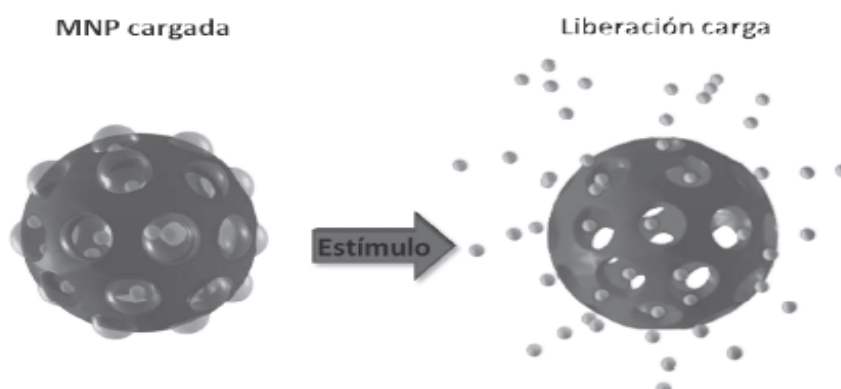


Figura 10: Liberação de carga controlada (Llinàs e Sánchez-garcía 2014).

Uma forma de atingir este objetivo é desenho e desenvolvimento nanocarregadores/veículos inteligentes que se abram em resposta a um estímulo. Principalmente usam-se dois tipos de estímulo: os estímulos internos como a mudança de pH, meios redutores e atividade enzimática, que dependem da homeostasia da célula, e os estímulos externos como a luz e os campos magnéticos, que podem ser aplicados da maneira pretendida. Além disto, os fatores externos têm uma grande vantagem em relação aos internos, uma vez que se pode controlar a sua localização e o tempo (Llinàs e Sánchez-García 2014).

1.6.2. Aplicações biomédicas das nanopartículas mesoporosas

O uso de NPs como transportadores de fármacos surge com o intuito de resolver problemas existentes com os veículos utilizados até ao momento. Para que o veículo seja eficiente deve ser biocompatível, que permita uma elevada encapsulação de fármaco, que seja estável para evitar a sua degradação e sobretudo que a libertação do fármaco seja de forma controlada no tempo (II Slowing et al. 2007; Z. Li et al. 2012; Llinàs e Sánchez-García 2014).

Na hora de desenhar sistemas de libertação de fármacos há que ter em conta fatores que afetam principalmente a velocidade de libertação e a de encapsulação do fármaco. Um destes fatores determinantes é o método usado para carregar as NPs (Correa-Duarte, 2011).

Neste sentido, as MSNs têm sido sugeridas como veículos para a libertação de fármacos devido às suas propriedades únicas tais como tamanho único, morfologia, tamanho do poro modificável, elevada área superfície/volume e por possuírem uma funcionalização de superfície fácil e propriedades físico-químicas estáveis em comparação com os veículos orgânicos atuais como lipossomas, micelas, cápsulas (Igor I. Slowing, Trewyn, e Lin 2007; Y. Zhang et al. 2010).

Muitos fármacos hidrofóbicos têm aplicações limitadas devido à sua fraca solubilidade em água, o que resulta numa diminuída absorção no trato gastrointestinal. Recentemente *Zhang e colaboradores* descobriram que as NPs mesoporosas de sílica melhoram a velocidade de dissolução e biodisponibilidade de telmisartan hidrofóbico (TEL), após a administração oral. Os resultados demonstraram que a taxa de dissolução do TEL carregado dentro das MSNs melhorou drasticamente em comparação com TEL bruto. Os resultados de permeabilidade sugeriram que a taxa de permeabilidade aumentou significativamente, enquanto a taxa de efluxo do fármaco diminuiu, melhorando assim, a sua absorção oral (Wang et al. 2015).

As MSNs carregadas com moléculas fluorescentes têm vindo a ser cada vez mais utilizadas como marcadores para sinalização em células nomeadamente através do recurso à microscopia de fluorescência entre outras técnicas (D Douroumis et al. 2013).

1.6.3. Aplicações biomédicas das nanopartículas de ouro

As AuNPs, devido às suas propriedades óticas, têm sido amplamente exploradas e estudadas para diversas aplicações na medicina como biossensores, diagnóstico de doenças, veículo para a entrega de moléculas dentro de células, vacinas, terapia genética, imagiologia, fototermia e no tratamento do cancro (Duncan, Kim e Rotello 2010; Connor et al. 2005).

Atualmente, uma das áreas mais populares na nanomedicina é a terapia fototérmica e a implementação de AuNP para diagnóstico de cancro. Nos últimos anos o uso de AuNPs na pesquisa do cancro tem crescido bastante por causa da sua facilidade de síntese, modificação de superfície e das suas propriedades óticas ajustáveis (Kelly et al. 2003).

Para tratar um tumor, estas AuNPs são administradas sistemicamente, atingindo o tumor de uma forma ativa ou passiva. Em seguida, estas NPs são sujeitas a uma fonte de energia, como um laser infravermelho próximo. Estas NPs possuem a capacidade de absorver energia e convertê-la em calor, causando uma ablação das células tumorais, com a respetiva destruição das membranas celulares. O uso de AuNPs combinado com radioterapia e terapias fototérmicas pode ser mais eficaz na redução da incidência do cancro e assim deste modo se reduz a dosagem e a exposição de raios-X que é necessária para a destruição do tumor com muito menos danos para o tecido circundante (X. Zhang 2015; Huang e El-Sayed 2010).

As AuNPs são úteis não só para a produção de imagens, mas também por exemplo, para o tratamento do cancro da mama. O uso destas NPs pode ser benéfico tanto para a terapia na fase precoce da doença como nos estados mais avançados, uma vez que a maioria dos cancros da mama ocorrem relativamente perto da superfície da pele onde eles podem ser facilmente acedidos. Devido às razões estéticas e para diminuir dissecções, há uma grande procura e necessidade de procedimentos minimamente invasivos para o tratamento deste cancro. A hipertermia baseada em AuNPs, ainda experimental, pode-se revelar altamente eficaz no tratamento deste cancro (X. Zhang 2015).

A utilização de AuNPs como veículos de libertação de fármacos também é uma abordagem promissora, principalmente a nível de fármacos quimioterapêuticos. Os principais problemas

associados a estes fármacos são a sua resistência celular e a sua não especificidade. Com o uso destas NPs como veículos de fármaco é possível resolver este problema (X. Zhang 2015).

As AuNPs são também ideais para a deteção de doenças através de imagiologia, numa fase inicial, pois têm a capacidade de interagir e de se ligarem especificamente a biomoléculas localizadas quer na superfície da célula ou no interior do citoplasma das células e organelos celulares (Liu et al. 2015).

1.7.Desafios futuros na investigação com nanopartículas

A preparação de NPs para aplicações biomédicas como nanotransportadores têm que seguir uma ampla gama de propriedades, fatores e condições de caráter químico, físico e biológico. Estas NPs devem ser biocompatíveis, biodegradáveis, devem permitir uma elevada carga de agentes ativos, devem apresentar um mecanismo de entrega da carga num sítio específico, devem apresentar um mecanismo de libertação controlado para proporcionar um tratamento eficaz (Llinàs e Sánchez-García 2014).

Embora grande parte destes requisitos tenham sido observados, as interações das NPs num organismo estão ainda em fase de otimização. A dificuldade de otimização e avaliação de nanoplataformas para aplicações clínicas. Ainda assim grandes progressos foram alcançados na última década (Ishii et al. 2015).

Sem dúvida, uma questão fundamental acerca do uso das NPs é a sua toxicidade. Esta dependerá sempre dos substituintes e dos agentes ativos que se encontram ancorados nas NPs. Por isso, em cada caso, se deverá estudar a toxicidade das NPs funcionalizadas. Deste modo, os materiais utilizados nestes sistemas de libertação de fármacos devem ser submetidos a uma rigorosa avaliação pré-clínica para assegurar o seu bom desenvolvimento. Os fármacos convencionais apresentam efeitos adversos e estes sistemas de entrega também não são exceção. São efetuados testes de citotoxicidade *in vitro* para assim se obter uma primeira indicação do risco de utilização de um determinado material para uma aplicação em particular. Deste modo, para cada nanossistema é essencial assegurar muitos testes e ensaios. A duração e o tempo de ensaios deve ter em consideração a farmacocinética do material que está a ser usado. É preciso realizar vários estudos em linhas celulares para compreensão da toxicidade e dos efeitos secundários e assim, responder a questões relacionadas com a segurança e componentes do nanossistema e dos metabolitos que podem ser produzidos após a sua degradação no organismo (D Douroumis et al. 2013; Ran et al. 2013).

Outro aspecto crítico é a tendência das NPs formarem agregados. Qualquer agregação que ocorra na corrente sanguínea pode obstruir os capilares. Os principais órgãos onde as NPs se acumulam, em maior quantidade geralmente são no fígado e no baço. Acredita-se que uma grande quantidade de NPs seja eliminada através da urina, ou seja, foram observadas NPs intactas na urina pelo processo de excreção. As NPs que são administradas mediante uma injeção por via intravenosa, o tempo de circulação no sangue e a sua biodistribuição depende principalmente do diâmetro efetivo das NP e das suas propriedades de superfície. Sabe-se que as NPs de um grande tamanho, superiores a 100 nm de diâmetro ou NPs agregadas são rapidamente absorvidas pelo sistema reticulo-endotelial (RES). Por tanto, é importante controlar o tamanho e modificar adequadamente a superfícies das nanopartículas para superar com êxito os ensaios clínicos *in vivo* e *in vitro* (Llinàs e Sánchez-García 2014).

Capítulo
MATERIAIS E MÉTODOS

2

2. Metodologia

2.1. Reagentes

Neste projeto foram utilizados os seguintes reagentes: Hidróxido de sódio (NaOH); trihidrato de ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); sulfonato de poliestireno de sódio (PSS); poli (cloridrato de alilamina) (PAH), cloreto de sódio (NaCl), etanol, tetraetilortossilicato (TEOS), brometo hexadeciltrimetilamônio (CTAB), e acetato de etilo, sendo todos adquiridos na Sigma-Aldrich e usados sem purificação adicional. Poliestireno AJ50-Clean (dispersão purificada com um tamanho médio de 500 nm) foi fornecido pela Polímeros Ikerlat. Água MilliQ utilizada (18,2 milliohms / cm).

2.2. Síntese das nanopartículas

2.2.1. Síntese de nanopartículas mesoporosas de sílica

A síntese de MSNs foi realizada de acordo com o método de Stöber. Preparou-se uma solução com 50 mL de água MilliQ onde se adicionou 0,1 g de CTAB e seguidamente 350 μL de NaOH (2M). Tudo isto a uma temperatura de 30°C. De seguida, ajustou-se a temperatura a 70°C e quando esta se estabilizou adicionaram-se 500 μL de TEOS e 500 μL de acetato de etilo. A reação foi realizada sob agitação vigorosa à temperatura de 70 °C durante 2 h. A dispersão obtida foi lavada e centrifugada a 8000rpm durante 20 min. Subsequentemente substituiu-se a água por etanol, e centrifugou-se com a mesma velocidade e tempo 5x, retirando o sobrenadante e substituindo de novo com etanol.

Uma vez que as NPs estão preparadas, estas foram calcinadas para remover o CTAB. Para isto, introduziram-se em um forno a 600°C durante 4 horas. Posteriormente se diluíram-se em etanol e secaram-se numa estufa.

2.2.2. Síntese de nanocápsulas mesoporosas de sílica

As nanocápsulas de sílica mesoporosa foram preparadas de um modo idêntico às MSNs. Preparou-se uma solução com 25 mL de água MilliQ onde se adicionou 0,1g de CTAB e seguidamente 350 μL de NaOH (2M). Tudo isto a uma temperatura de 30°C. De seguida, ajustou-se a temperatura a 70 °C e uma vez estabilizada adicionou-se 3mL de poliestireno (10 mg/mL), 500 μL de TEOS e 500 μL de acetato de etilo. A reação foi realizada sob uma agitação vigorosa à temperatura de 70 °C durante 2 h. A dispersão obtida foi lavada e centrifugada a 2000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente substituiu-se a água por etanol e centrifugou-se

2x a 3500, 2x a 5000 e 1x a 7500 rpm sempre durante o mesmo tempo (20 minutos). Foi retirado o sobrenadante e substituído de novo o etanol.

Uma vez finalizado o processo sintético as nanocápsulas foram calcinadas para eliminar o CTAB e o poliestireno. Para isto, foram inseridas em um forno a 600 °C durante 4 horas. Posteriormente diluíram-se em etanol e secaram-se numa estufa.

2.2.3. Síntese de nanopartículas de ouro de 15 nm

Para a preparação das NPs de ouro aplicou-se o método de Turkevich. Para este efeito, preparou-se 500 mL de uma solução aquosa de HAuCl_4 0,5 mM em agitação magnética em ebulição e 25 mL de citrato de sódio foram adicionados a 1 % (em massa). A redução manteve-se em ebulição durante 30 min e em seguida protegeu-se da luz até alcançar a temperatura ambiente. Nos primeiros instantes após a adição do agente redutor, pode-se observar uma alteração repentina na cor da solução de amarelo (característica do sal do ouro) a incolor, mudando gradualmente para preto. Em poucos minutos a cor muda para um vermelho vinho característica do ouro coloidal (esférica). Através deste método de síntese se obtêm NPs de ouro esféricas com um tamanho médio de 15 nm.

2.2.4. Microscopia eletrônica de Transmissão (TEM)

A microscopia eletrotônica de transmissão apresenta-se como uma técnica de particular importância na caracterização de materiais devido ao seu alto poder de resolução. As observações por TEM permitem obter informações sobre a estrutura interna do material a pequena escala, desde dos microns até alguns angstroms. Nestes microscópios eletrônicos um feixe de elétrons é transmitido através de uma amostra ultrafina do material interagindo com a mesma. Desta interceção dos elétrons transmitidos através da amostra, obtém-se uma imagem com alta resolução. Neste estudo foi usado um microscópio eletrônico de alto contraste JEOL JEM-1010 operado a 100 kV.

2.2.5 Armazenamento

Foram realizadas várias sínteses onde obtiveram-se NPs e nanocápsulas com diferentes tamanhos. Assim, foi possível obter *stocks* de diferentes tamanhos. Foram produzidos lotes de nanopartículas com diâmetros médios de 43nm, 50nm, 58nm, 81nm e 127nm e de nanocápsulas com um diâmetro médio de 521 nm.

2.3. Carregamento das nanopartículas com Doxorrubicina

Para os estudos da **libertação** é necessário um marcador. Neste caso foi utilizada a doxorrubicina por ser simultaneamente um fármaco antitumoral e também por ser uma molécula fluorescente.

2.3.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis)

A espectroscopia UV-Vis envolve a absorção de luz UV-Vis por parte de uma molécula, promovendo a passagem do elétron do estado fundamental para o estado excitado.

Neste projeto, foi utilizado um espectrofotômetro do tipo “*diode-array*” *Hewlett Packard* modelo HP8453 e cubete de quartzo de 1cm. Este método foi utilizado para a caracterização do tamanho das AuNPs, para a determinação da quantidade de DOX absorvida pelas NPs e nos ensaios de libertação de DOX.

Por um lado, a espectroscopia UV-Vis foi utilizada para inferir sobre o diâmetro das NPs metálicas, uma vez que, estas apresentam uma banda SPR na região visível do espectro a 485nm.

O carregamento e libertação da DOX nas NPs foi monitorizado mediante espectroscopia UV-Vis. A DOX sendo uma molécula fluorescente tem um pico de absorção máximo de absorvância a um comprimento de onda de 485nm. Posteriormente, a libertação da DOX foi igualmente monitorizada por UV-Vis. Brevemente, no caso da monitorização do carregamento e libertação com DOX, a absorvância da solução foi medida no início e no final do processo. O diferencial de concentração na solução corresponde ao valor de concentração absorvido ou libertado pelas NPs.

2.3.2 Carregamento das NPs mesoporosas de sílica

As MSNs foram preparadas num *vial* contendo uma solução de DOX a 0,02 mg/mL num volume de 10 mL. Adicionou-se 5 mg de NPs ao *vial*, e deixou-se em agitação magnética durante um dia. É necessário proteger o *vial* da luz para assim, evitar a degradação da molécula fluorescente.

2.3.3 Carregamento das nanocápsulas mesoporosas de sílica

Uma vez que estas NPs possuem um tamanho maior, preparou-se uma solução de DOX 0,06 mg/mL num volume de 10 mL. Depois, adicionou-se 5 mg de nanocápsulas ao *vial* e deixou-se em agitação magnética durante 1 dia. O *vial* foi tapado para evitar o contato com a luz.

2.3.4 Carregamento das nanopartículas carregadas em superfície

Os ensaios da libertação do fármaco em superfície foram realizados sobre um vidro sobre o qual foram depositadas as NPs carregadas e posteriormente embebidas numa matriz polimérica. A concentração de DOX utilizada para estes ensaios foi de 0,02 mg/mL. O carregamento de DOX faz-se submergindo as NPs/nanocápsulas durante um dia nesta solução. Foi necessário de igual modo proteger o vidro para evitar o contato com a luz.

2.4. Ensaios de libertação

Foram realizados ensaios de libertação do fármaco com as NPs em solução, numa superfície (em vidro) e numa célula de difusão.

2.4.1. Preparação do material para os ensaios de difusão em superfície

Os ensaios de difusão do fármaco com as NPs adsorvidas numa superfície (vidro) tinham como objetivo de simular o comportamento num dispositivo de libertação interna (por exemplo, na superfície de um implante).

2.4.1.1. Preparação do vidro de 50 camadas de nanopartículas mesoporosas de sílica

Em primeiro lugar foi necessário limpar os vidros com uma solução Piranha (H_2O_2 , H_2SO_4) durante 30 minutos. Depois lavaram-se com água destilada e água MilliQ. Uma vez os vidros limpos prossegue-se para a disposição das camadas. Para isto preparou-se uma solução de PAH (100 mL solução NaCl 0,5 M + 200mg PAH) e uma solução de 0,5 mg/mL de NPs de sílica mesoporosa.

Depois empregou-se o método *layer-by-layer* deixando o vidro submergido, em primeiro lugar em PAH durante 15 min. De seguida lavou-se com água MilliQ, e secou-se com N_2 . Depois realizou-se o mesmo procedimento com a solução de MSN obtendo-se assim uma bicamada. Este procedimento foi repetido até à obtenção das 50 bicamadas de polieletrólito e NPs.

2.4.1.2. Preparação material dos ensaios da célula de difusão

A célula de difusão *Vertical Diffusion Cell (Copley Scientific)* é um dispositivo que permite que as NPs estejam dispersas em filme e confinadas a um compartimento separado do meio por uma membrana permeável (Figura 11). Os ensaios em célula de difusão permitiram estudar a libertação da DOX sem que as NPs corram o risco de dispersar para o meio. Adicionalmente, os ensaios em célula de difusão, permitem o contato do filme de NPs com o ouro de forma a avaliar o seu potencial como agente controlador da difusão do fármaco a partir das NPs.

As NPs carregadas (secção 2.3) foram depositadas gota a gota na membrana da célula de difusão com uma pipeta Pasteur.

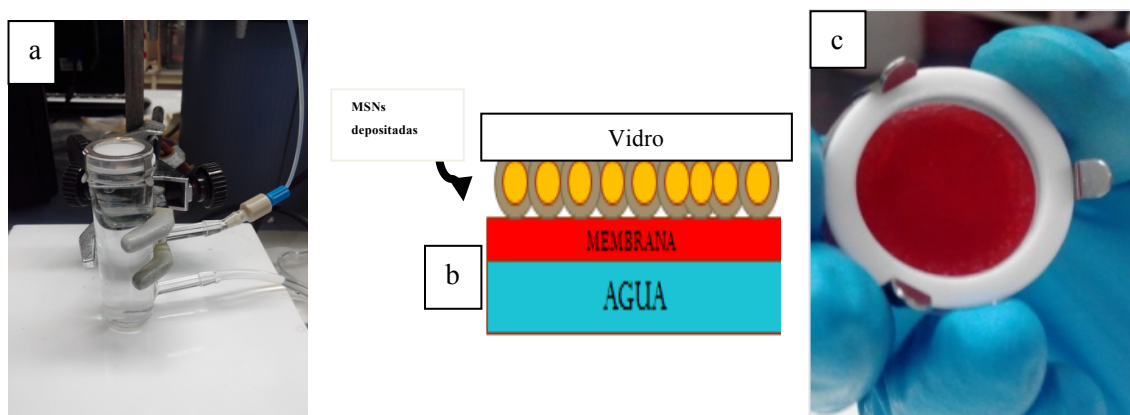


Figura 11: **a)** Célula de difusão, **b)** Esquema da deposição das MSNs na célula de difusão, **c)** Deposição das MSNs na membrana

A parte superior da célula possui um compartimento, superiormente limitada por um vidro que foi revestida por ouro para os ensaios de controle externo da libertação do fármaco com um laser. No caso da célula de difusão o vidro foi preparado seguindo também o método *Layer-by-Layer*. Neste caso utilizaram-se dois polieletrólitos, PAH e o PSS. O procedimento aplicado foi o seguinte: preparou-se uma camada de PAH imergindo o vidro durante 15 minutos, depois lavou-se por 5 min em água MilliQ e posteriormente secou-se o vidro com azoto. Repete-se o mesmo procedimento com o PSS. Voltou-se a preparar outra camada de PAH e PSS, de modo que a configuração fosse PAH/PSS/PAH/PSS. Uma vez formadas as 4 camadas/filmes, imergiu-se o vidro numa solução de ouro (15nm) durante 30 minutos. Depois lavou-se em água por 5 minutos e secou-se o vidro com N₂. Deste modo formou-se a primeira camada de ouro. Este procedimento repetiu-se quatro vezes, obtendo-se assim um vidro com 4 camadas de ouro.

2.4.2. Ensaios de libertação do fármaco

2.4.2.1. Estudo da libertação de doxorrubicina em solução

Para o estudo da libertação da DOX em MSN e nanocápsulas levou-se a cabo o seguinte procedimento. Uma vez que as partículas estavam carregadas (procedimento descrito anteriormente), centrifugaram-se a 9000 rpm durante 10 min. Retirou-se o sobrenadante e substituiu-se por um volume equivalente de água MilliQ. Deste modo, procedeu-se à substituição da água, hora a hora, centrifugando a amostra à mesma velocidade e durante o mesmo período de tempo (10 min) retirando o sobrenadante de cada vez. Mediu-se a absorvância a um comprimento de onda de 485 nm em todos os sobrenadantes retirados até que a absorvância atinja o equilíbrio.

2.4.2.2. Estudo da libertação de doxorrubicina em superfície

Para o estudo da libertação de DOX no vidro, realizou-se um procedimento semelhante ao caso das partículas em solução. Submergiu-se o vidro em água MilliQ com um volume conhecido (20mL) fazendo-se, desta forma, várias amostragens para medição das absorvâncias. Tal como no caso anterior, continuou-se o procedimento até à absorvância máxima.

2.4.2.3. Estudo da libertação de doxorrubicina na célula de difusão

Os ensaios em célula de difusão tinham como objetivo desenvolver um modelo que permitisse estudar o comportamento da libertação do fármaco através da ativação das NPs, na presença do ouro mediante o controle externo com uma fonte de luz, o laser. Este ensaio, realizou-se em duas condições: 1) apenas com as partículas imobilizadas sobre a membrana no dispositivo e 2) nas mesmas condições mas com a tampa (vidro) do dispositivo coberto com uma película de ouro (AuNPs) que ficou em contacto com a camada de partículas imobilizadas sobre a membrana do dispositivo.

Assim, nas condições controle, utilizou-se uma célula de difusão com um volume aproximadamente de 20 mL. Esta célula de difusão foi concebida de modo a poder-se introduzir e retirar meio da solução utilizando uma seringa. Na parte superior em contato com o meio apresenta uma membrana permeável, coberta por um vidro onde se encontram as NPs depositadas. Uma vez que o volume da célula é grande, usou-se 15 mg de NPs carregadas com a DOX. Para manter o meio homogêneo utilizou-se uma placa de agitação magnética. A libertação da DOX foi estudada através das amostras recolhidas ao longo do tempo. Mediu-se a absorvância (485nm) das amostras e de seguida introduziram-se de novo na célula.

Nas condições que permitiram avaliar a eficácia do controle da libertação com o ouro irradiou-se o vidro revestido (2.4.1.2.) durante um período de tempo determinado para se observar as

alterações causadas na libertação da DOX. No presente estudo, foram utilizados os seguintes períodos de tempo: 1,5 h, 1h e 45 min de irradiação com laser sobre as AuNPs. A absorvância também foi medida ao longo do tempo após cada irradiação.

Capítulo
RESULTADOS E DISCUSSÃO **3**

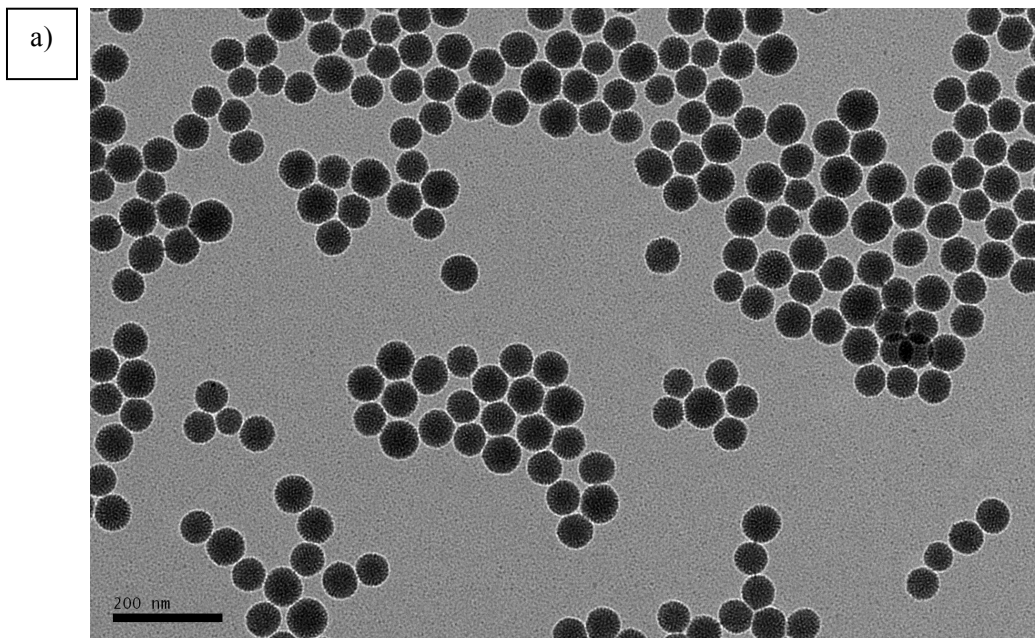
3. Resultados e Discussão

3.1 Síntese de NPs e nanocápsulas mesoporosas de sílica

Como foi explicado anteriormente no método experimental, a síntese de NPs e nanocápsulas de sílica mesoporosa foram preparadas seguindo o método Stöber.

Através do uso do uso do microscópio eletrônico de transmissão eletrónica (TEM) foi possível caracterizar o tamanho e morfologia das partículas. O diâmetro médio das partículas foi observado a partir das ultrafotografias obtidas (figura 11). Para a obtenção da referida análise, uma gota da solução foi diluída e depositada e seca a temperatura ambiente em uma micrograde portaobjetos de cobre recoberta por uma película delgada de carbono do tipo *Formva* (400 Mesh). Foram realizadas várias sínteses de MSNs, obtendo-se NPs com tamanhos entre os 25 e 70 nm. Durante o processo síntese alguns dos lotes não foram utilizados por não apresentarem uma forma esférica ou poros definidos. Este facto pode ter acontecido por algumas das variáveis estarem a ser afetadas, como por exemplo a temperatura e o pH. A temperatura deveria permanecer a 70 °C e o pH a 11.

Na figura 12 (a,b) podemos observar MSNs, bem como a sua forma esférica e como apresentam uma estrutura porosa bastante evidente.



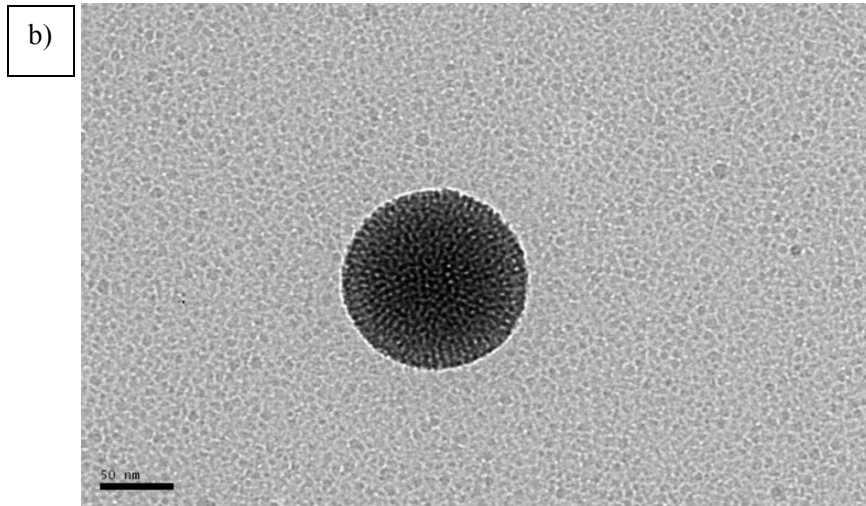


Figura 12: a) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de MSNs com uma resolução de 200nm b) Imagem de TEM de MSN com uma resolução de 50nm.

No presente estudo foram realizadas várias sínteses. Durante um processo de síntese obtinham-se partículas cujos tamanhos eram medidos com auxílio de um software *Image Tools*. A figura 12 ilustra a distribuição de tamanhos de MSNs que eram obtidas no final do processo de síntese.

No caso particular da amostra da figura 12 o tamanho médio de MSN foi de 39,56 nm com um desvio médio de $\pm 4,27$ nm.

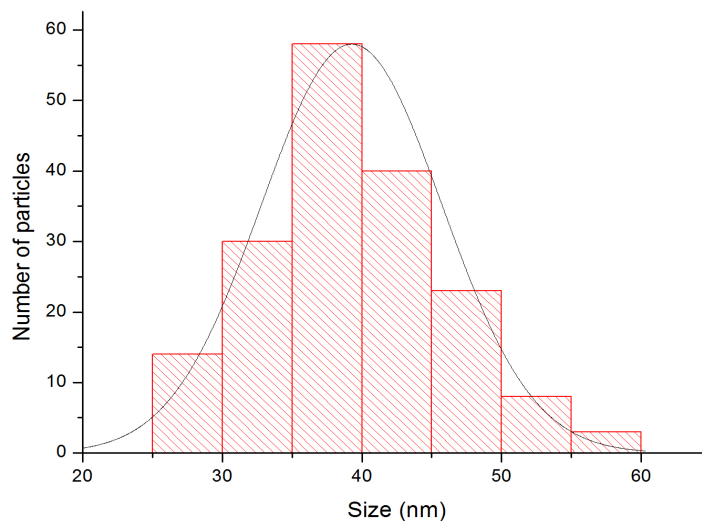


Figura 13: Histograma exemplificativo da distribuição de tamanhos resultantes de um processo de síntese ($39,56 \pm 4,27$ nm).

Em relação as MSNs foram realizadas várias sínteses obtendo-se NPs com tamanhos entre os 490 e 520nm.

Na figura 14a podemos observar que as nanocápsulas de sílica mesoporosas apresentam uma cor mais escura antes da calcinação. Este tom é devido ao poliestireno. Quando as nanocápsulas são calcinadas o poliestireno é eliminado, observando-se uma estrutura porosa na superfície, uma vez que estas nanocápsulas são estruturas ocas revestidas com sílica como podemos observar na figura 14b

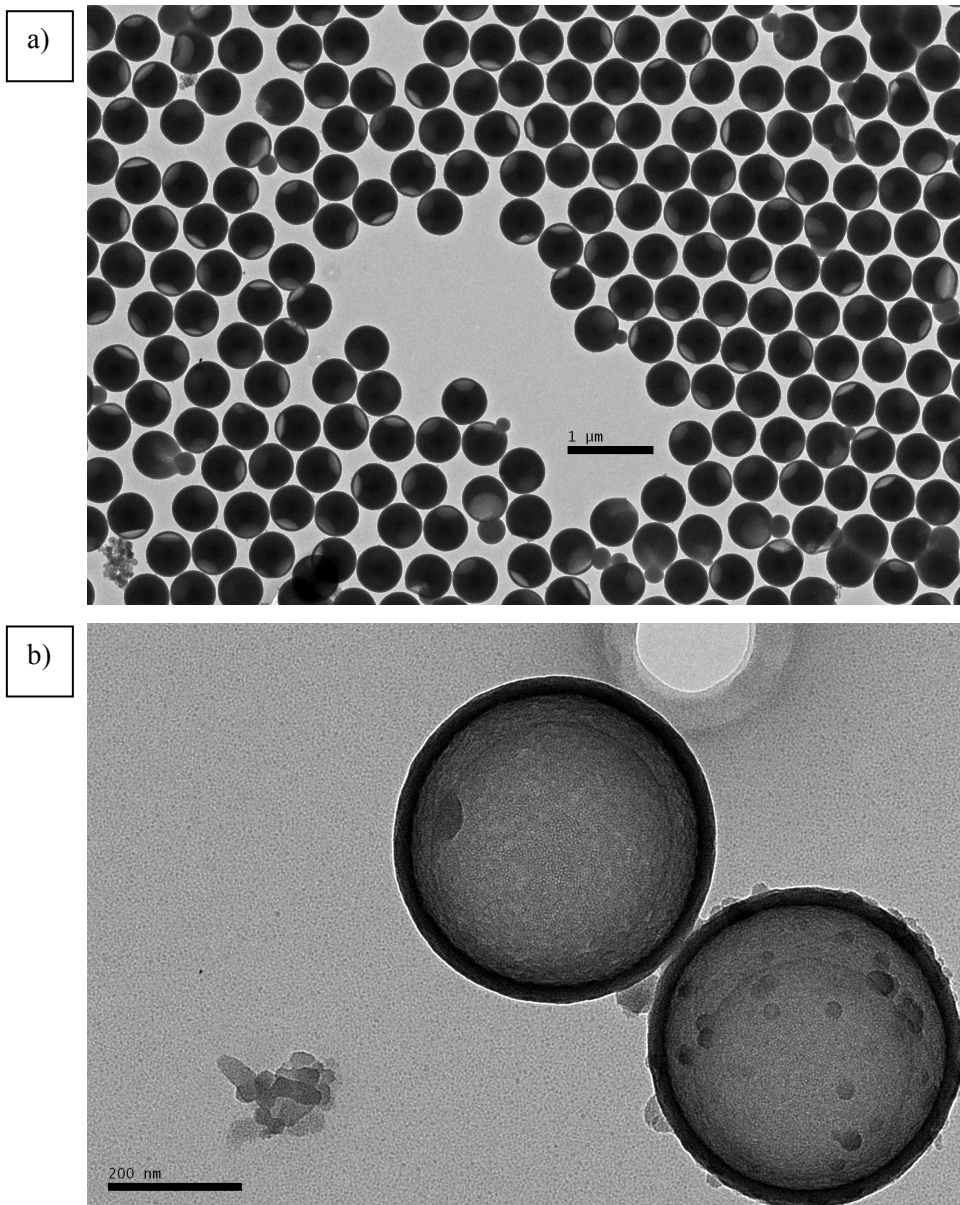


Figura 14: *a) TEM com esferas de poliestireno recobertas com sílica (resolução 1μm) b) Formação de cápsulas depois da eliminação do PS por calcinação*

Da síntese de nanocápsulas mesoporosas de sílica também resultaram várias amostras com vários tamanhos médios. Neste caso os tamanhos obtidos variavam entre 420 e 590 nm. A

figura 15 é ilustrativa da distribuição de tamanhos de nanocápsulas mesoporosas de sílica cujo o valor medio é de 520,16 nm e com um desvio padrão de $\pm 21,06$ nm.

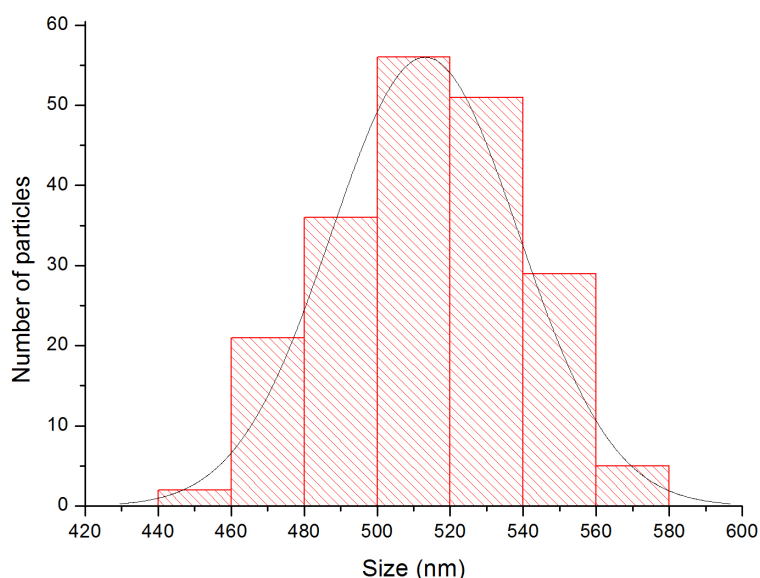


Figura 15: Histograma de distribuição de tamanho de nanocápsulas de sílica mesoporosa ($520,16 \pm 21,06$ nm).

3.2. Estudos de liberação em solução

3.2.1. Estudos de liberação em NPs mesoporosas de sílica

Uma vez sintetizadas as NPs levou-se a cabo o encapsulamento do fármaco fluorescente (doxorubicina). O tamanho médio das MSNs usadas nesta experiência foi de $39,56 \pm 6$ nm. Observa-se que praticamente toda a solução de DOX preparada ($0,02$ mg/mL) é absorvida pelas NPs ($0,018$ mg/mL) deixando um pequeno excesso no sobrenadante ($0,002$ mg/mL). Tendo em conta que em cada experiência se usou 5mg de MSNs, a concentração de fármaco absorvido é de 36 mg fármaco/mg partículas.

Posteriormente, procedeu-se ao estudo de liberação nas NPs já carregadas (procedimento descrito no ponto 2.4.) em meio aquoso. Esta experiência foi realizada em triplicado para assegurar resultados mais fiáveis. Como podemos observar na figura 16, a tendência de liberação, expressa em mg de fármaco libertado/h, é similar nestes 3 ensaios. Observa-se, assim, o máximo de liberação alcançado às 7 horas do estudo, sempre e quando a mostra não está saturada.

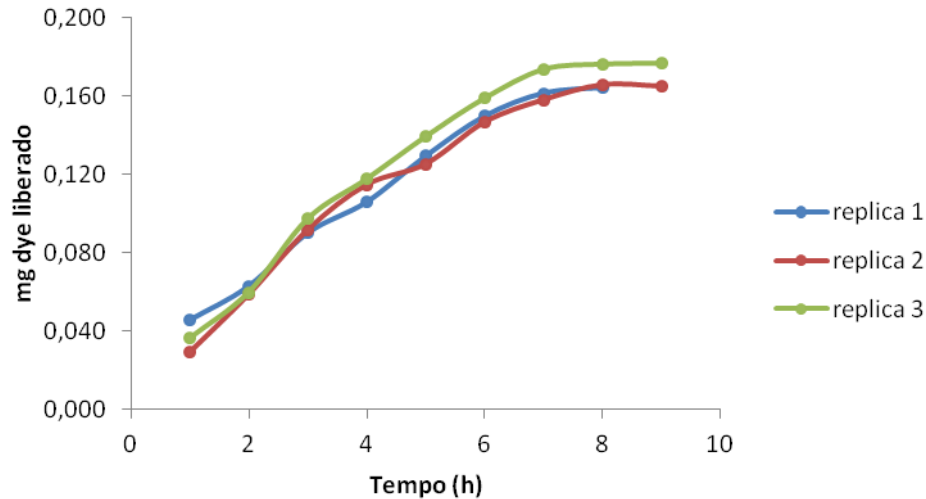


Figura 16: Comparação dos estudos de liberação DOX em solução com MSN.

Deste modo podemos observar que a liberação da DOX é máxima em aproximadamente 7 horas do início da experiência, já que a partir desse tempo começa a estabilizar-se. As curvas de liberação das 3 réplicas não são exatamente iguais. Estas pequenas diferenças podem-se atribuir a variações na situação periódica da troca da água o que pode ter levado à perda da DOX.

3.2.2. Estudos de liberação em nanocápsulas mesoporosas da sílica.

Uma vez sintetizadas as nanocápsulas levou-se a cabo o encapsulamento do fármaco. O tamanho médio das nanocápsulas mesoporosas de sílica usadas nesta experiência é de $499,54 \pm 21,06$ nm.

Neste caso as nanocápsulas apresentam um tamanho cerca de 10 vezes superior às NPs. Por este motivo, esperar-se-ia que a absorção fosse muito maior. Pelo contrário, parece que aproximadamente metade do fármaco em solução ($0,06$ mg/mL) é absorvido ($0,025$ mg/mL) pelas nanocápsulas, encontrando-se o restante no sobrenadante ($0,035$ mg/mL). Neste sentido, a grande quantidade de espaço vazio no interior da nanocápsula faz com que o fármaco interaja principalmente com a membrana de sílica de 10 nm.

Nesta experiência usou-se 5 mg de nanocápsulas por réplica. A concentração de fármaco absorvido é 50 ng/mg de nanocápsulas. Neste caso é maior que no caso das NPs compactas.

Posteriormente, levou-se a cabo o estudo de liberação do fármaco encapsulado nas nanocápsulas carregadas em meio aquoso. Esta experiência realizou-se em triplicado, de forma a assegurar a fidelidade de resultados. Como mostra a figura 17 a liberação, expressa em mg de

fármaco liberado/h, é semelhante nos 3 ensaios realizados alcançando o máximo de libertação às 65 horas.

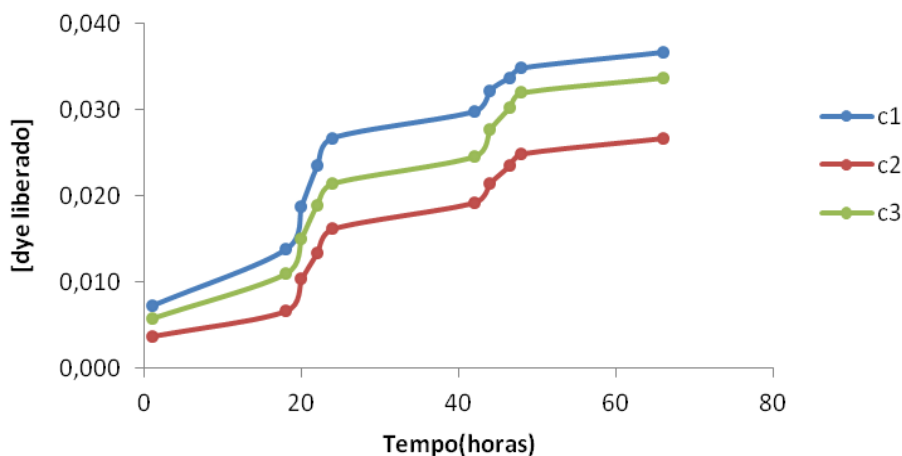


Figura 17: Comparação dos estudos de libertação DOX nas 3 réplicas com nanocápsulas em solução.

Deste modo, observa-se que a libertação de DOX se completa em aproximadamente 65 horas, já que a partir desse tempo começa a estabilizar-se e não ocorre mais libertação. As curvas de libertação das 3 réplicas diferem um pouco. Isto pode dever-se a erros experimentais mencionados anteriormente.

3.3 Estudo de libertação de doxorrubicina em vidro

O estudo da libertação do fármaco numa superfície sobre um vidro realizou-se com um vidro que tinha 50 bicamadas de MSN e PAH, descrito nos pontos 2.4.1. O procedimento da medida de libertação realizou-se seguindo o ponto 2.6.2. O tamanho médio das MSNs utilizadas neste ensaio foi de $77,81 \pm 11,1$ nm.

Neste caso observa-se que a solução de DOX preparada (0,02 mg/mL) só é absorvida pelas NPs 0,003 mg/mL ficando praticamente todo fármaco no sobrenadante (0,017 mg/mL). Assim, uma vez que se prepara o vidro com capas de PAH entre as capas de NPs não se pode estimar uma concentração de mg fármaco/mg partículas. É também importante notar que é necessário retirar parte do polieletrólito para permitir a absorção do fármaco por parte das NPs.

Na figura 18 podemos observar que pelo menos 50 % do fármaco absorvido (0,05 mg) liberta-se nas primeiras 2,5 h do ensaio. A libertação de fármaco pelas NPs ocorre principalmente das camadas exteriores. Estas são as que primeiro entram em contacto com o meio libertando assim

o fármaco em primeiro lugar. Outro fator que pode levar à diminuição da libertação, é o fato das NPs se despregarem da superfície de vidro, levando a erros de leitura.

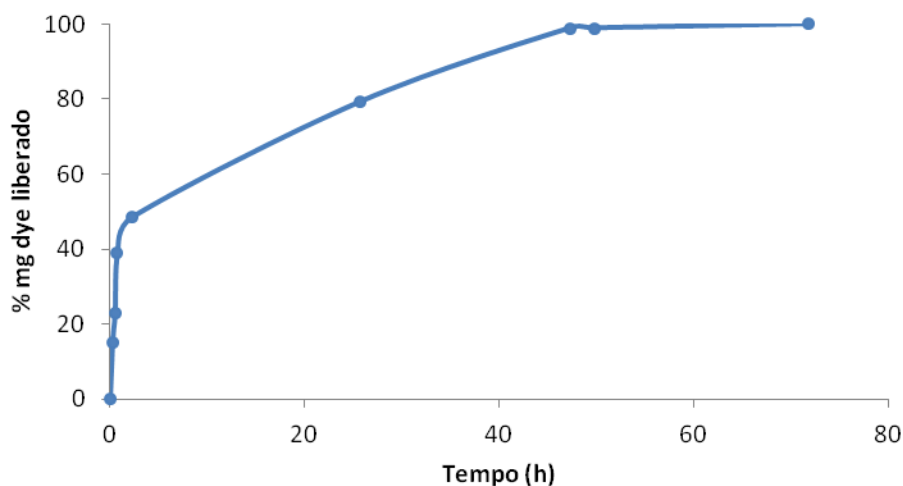


Figura 18: Libertação com o tempo de DOX em vidro.

3.4. Estudo de libertação de doxorubicina na célula de difusão

Um dos objetivos iniciais era compreender a ação do controle da libertação do fármaco pela indução de calor do ouro sobre as NPs. Assim, procedeu-se ao desenvolvimento de um modelo experimental para o efeito. Como modelo experimental foi usada uma célula de difusão. O desenho experimental incluiu dois ensaios (2.4.2.3). Num dos ensaios as NPs foram dispostas em filme sobre uma membrana permeável. No outro ensaio, as NPs foram cobertas por uma película de AuNPs. Esta película foi preparada sobre o vidro que serve de tampa à célula de difusão.

Na primeira utilizou-se um vidro limpo, enquanto na segunda maneira utilizou-se um vidro recoberto por AuNPs. Além disso o processo de libertação é realizada com a utilização de um laser para aproveitar as propriedades fototérmicas do ouro e acelerar a libertação de DOX. O tamanho médio das MSNs utilizadas nesta experiência foi $36,97 \pm 4,7$ nm.

Neste caso observou-se que praticamente toda a DOX preparada (0,06mg/mL) foi absorvida pelas NPs (0,055mg/mL), ficando um pequeno restante no sobrenadante (0,005 mg/mL). Em cada ensaio utilizaram-se 15 mg MSNs, a concentração de fármaco absorvido foi de 36ng fármaco/ mg partículas.

No primeiro ensaio pode-se observar na figura 19 que as NPs alcançaram o seu máximo de libertação a partir do 7 dia, a partir do qual a concentração de fármaco na solução se mantém constante.

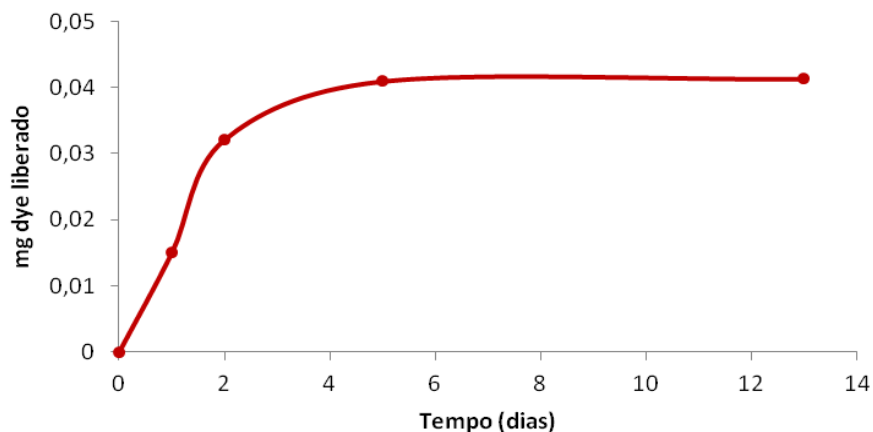
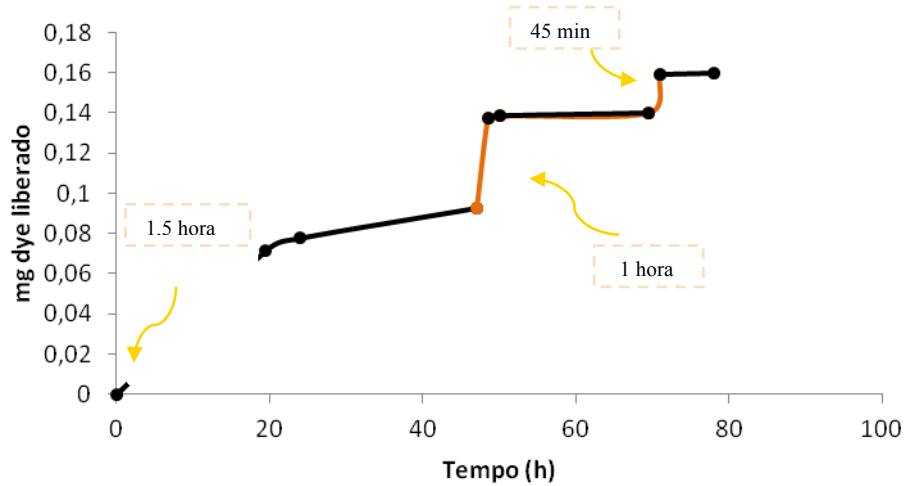


Figura 19: Libertação de DOX em MSN em uma célula de difusão

Neste caso, pode-se observar que uma boa parte do conteúdo de DOX é libertado. A quantificação de fármaco absorvido demonstrou que as MSNs absorveram cerca de 0,055 mg de fármaco/mL de solução, tendo sido libertada cerca de 0,04 mg/mL de solução, correspondendo aproximadamente 73% de eficácia de recuperação.

A libertação de fármaco em célula de difusão foi também avaliada mediante o controlo com um laser sobre uma película AuNPs. Este ensaio pretende acelerar a libertação de DOX mediante um processo de indução de hipertermia causada pelo aquecimento do ouro irradiado por um laser. De forma genérica, o ensaio decorreu em condições semelhantes à libertação da DOX a partir das MSNs na célula de difusão. As alterações introduzidas foram o revestimento de 4 películas de ouro e a respetiva irradiação pelo laser.

Este ensaio inicia-se irradiando com o laser durante 1,5 h, observando-se que a libertação é muito maior que no caso anterior (figura 19). Assim na figura 20 podemos observar três picos provocados pela irradiação com a luz do laser sobre as NPs. Estes picos foram produzidos mediante uma irradiação de 1 hora (segundo pico) e 45 min (terceiro pico). Assim confirma-se que a radiação de luz externa aumenta a libertação.



Legenda: → Irradiação com o laser

Figura 20: Liberação de DOX na célula de difusão promovida pelo uso do laser

Apesar de se confirmar o papel indutor térmico das AuNPs na liberação da DOX das MSN após a irradiação dessa película de ouro com o laser, claramente nos três períodos, registou-se um incidente no registo da medição DOX. Este incidente ocorre após a primeira irradiação, não havendo registos nas primeiras 20 horas. No entanto, após a 2^a e 3^a irradiação verificou-se um aumento acentuado na liberação.

Capítulo
CONCLUSÃO **4**

4. Conclusão

A nanotecnologia tem, inevitavelmente, um forte impacto na área da saúde. O seu avanço, em conjunto com capacidade de manipular e controlar a matéria a uma menor escala e o aproveitamento das propriedades novas dos nanomateriais, apresenta uma nova forma de encarar a doença. Deste modo, a nanomedicina começou a ganhar um espaço na sociedade e na académica e clínica devido ao seu grande espectro de aplicações, algumas das quais já se encontram no mercado. Na atualidade, a nanotecnologia tem potencial para introduzir melhorias na deteção precoce e no diagnóstico, e para o tratamento de diversas patologias crónicas e agudas, favorecendo a rapidez, a sensibilidade e especificidade de análise.

Uma das aplicações mais prometedoras são a libertação controlada e dirigida de fármacos. Estes sistemas possuem a capacidade de administrar fármacos durante um período prolongado de tempo a uma taxa de libertação controlada, direcionando o fármaco para o local específico de ação. Esta metodologia de administração reduz os possíveis efeitos secundários tóxicos dos medicamentos convencionais e pode levar ao aumento da eficácia terapêutica. Deste modo o objetivo deste trabalho consistia em investigar o uso de partículas de tamanho nanométrico para a libertação controlada de fármacos.

No percorrer deste projeto foram realizados diversos estudos, que se incidiram fundamentalmente na libertação de um fármaco cuja a molécula fluorescente DOX utilizando MSNs e AuNPs.

Em primeiro lugar, levou-se a cabo a síntese de NPs e nanocápsulas de sílica. Assim, observou-se que a temperatura pode ser um fator crítico na síntese, afetando a própria forma da NPs. Outro dos fatores influentes foi o pH, o qual determina a velocidade da reação da hidrólise do TEOS influenciando por tanto a formação das nanoestruturas.

Foi observada diferença entre a libertação do fármaco das MSN e das nanocápsulas. Inicialmente, devido ao tamanho das nanocápsulas, seria esperado que a encapsulação do fármaco fosse muito maior nas nanocápsulas do que nas MSN, o que não aconteceu. Poderemos especular que é a porosidade, e não a dimensão da nanoestrutura, que poderá influenciar a capacidade de encapsulação graças à sua elevada superfície específica existente.

Depois de se ter definido que as partículas que poderiam ter interesse a nível de libertação controlada lenta seriam as MSN e não as nanocápsulas, procedeu-se aos ensaios de imobilização.

Nos ensaios de libertação em solução a partir das MSN imobilizadas no vidro, a libertação foi menor do que o esperado. Esta observação poderá dever-se ao facto de algumas NPs se soltarem da superfície de vidro, e assim, na altura da leitura ocorrem viéses. Deste modo, observou-se que seria necessário realizar este estudo num meio controlado para que não se soltassem as MSN. Assim, desenhou-se um modelo experimental, utilizando uma câmara de difusão. Esta é um dispositivo que contém uma membrana permeável e sobre a qual é possível depositar as MSN, de forma a que estas fiquem imobilizadas mas não se desprendam para o meio. Com este procedimento, são evitados possíveis viéses de leitura acerca das quantidade de fármaco libertado.

Depois de se ter verificado que o modelo de difusão do fármaco pelas NPs dispostas em filme, estava otimizado, procedeu-se à avaliação do efeito de emissão de calor provocada pela irradiação de laser sobre o ouro. Este ensaio teve como objetivo compreender se o calor emanado pelo ouro poderia modificar as MSN de forma a alterar na difusão dos fármacos veiculados por estas. Assim, no presente estudo, não só foi possível confirmar que as películas de ouro (filme de AuNPs) colocadas sobre a camada de MSN suspensa em cima da membrana da célula de difusão alteraram a difusão, como esta alteração foi no sentido do aumento da cinética de libertação. Estes resultados demonstram a aplicabilidade do fenómeno de SPR das AuNPs no desenho de novos materiais nanotransportadores inteligentes, no sentido em que permitem o controle “remoto” da libertação de fármacos.

No futuro, será necessário ter em conta que a nanotecnologia se encontra em crescente desenvolvimento e que requer mais investigação, não só a nível das suas potencialidades de diagnóstico e de terapêuticas, mas também ao nível da toxicidade e efeitos secundários dos novos nanomateriais no organismo. Ou seja, será necessário compreender melhor as interações e as reações das NPs no organismo. O transporte das NPs ao nível da circulação e a forma como são excretadas também necessitam maior compreensão e estudo.

Ao nível de sistemas de libertação de fármacos é necessário compreender melhor os processos de distribuição das NPs no organismo bem como os seus efeitos citotóxico colaterais. No presente estudo ainda não foi possível avaliar a citotoxicidade dos biomateriais produzidos. Assim, será necessário proceder a ensaios *in vitro* e *in vivo* de forma a que, no futuro possamos

dispor de um arsenal terapêutico com novas ferramentas mais seguras e eficazes no combate de diversas patologias, quer do ponto de vista do diagnóstico, quer do ponto de vista do tratamento.

Bibliografía

- Ali, Syed Ahsan, and Muhammad Tariq. n.d. "Editorial Nanotechnology and Its Implication in Medical Science." *Journal of Pakistan Medical Association* vol 64 (9): 984–86.
- Araujo, E a, N J de Andrade, a F de Carvalho, a M Ramos, C a D Silva, and L H M da Silva. 2010. "Colloidal Aspects of Bacterial Adhesion." *Química Nova* 33 (9): 1940–48. doi:Doi 10.1590/S0100-40422010000900022.
- Brinker, C.J. 1988. "Hydrolysis and Condensation of Silicates: Effects on Structure." *Journal of Non-Crystalline Solids*. doi:10.1016/0022-3093(88)90005-1.
- Britto, Fiona M. 2012. "Nanotecnología , Hacia Un Nuevo Portal Científico-Tecnológico Nanobiotechnology: Towards a New Scientific and Technological Gateway." *Revista QuímicaViva*.
- Cai, Weibo, Ting Gao, Hao Hong, and Jiangtao Sun. 2008. "Applications of Gold Nanoparticles in Cancer Nanotechnology." *Nanotechnology, Science and Applications* 2008 (1): 17–32. doi:10.2147/NSA.S3788.
- Cancino, Juliana, Valéria S Marangoni, Instituto De Física, De São Carlos, Universidade De São Paulo, and São Carlos Sp. 2014. "Revisão" 37 (3): 521–26.
- Cao, Guozhong. 2004. *Nanostructures and Nanomaterials - Synthesis, Properties and Applications*. Imperial College Press. doi:10.1142/9781860945960.
- Connor, Ellen E., Judith Mwamuka, Anand Gole, Catherine J. Murphy, and Michael D. Wyatt. 2005. "Gold Nanoparticles Are Taken up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity." *Small* 1 (3): 325–27. doi:10.1002/sml.200400093.
- Correa-Duarte, M.A.; Salgueiriño-Maceira. 2011. "No Title." *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, American Scientific Publishers.
- Cotí, Karla K, Matthew E Belowich, Monty Liong, Michael W Ambrogio, Yuen A Lau, Hussam A Khatib, Jeffrey I Zink, Niveen M Khashab, and J Fraser Stoddart. 2009. "Mechanised Nanoparticles for Drug Delivery." *Nanoscale* 1 (1): 16–39. doi:10.1039/b9nr00162j.
- Crespilho, Frank N., Valtencir Zucolotto, Osvaldo N. Oliveira, and Francisco C. Nart. 2006. "Electrochemistry of Layer-by-Layer Films: A Review." *International Journal of Electrochemical Science* 1 (5): 194–214.
- D. Cornejo-Monroy, J. F. Sánchez-Ramírez*, J. A. Pescador Rojas, J. L. Herrera-Pérez. 2009. "Nanoesferas Monodispersas de SiO₂: Síntesis Controlada Y Caracterización." *Superficies Y Vacío*.
- De Barros, André Luís Branco, Karina Silva de Oliveira Ferraz, Thais Cristina Soares Dantas, Gracielle Ferreira Andrade, Valbert Nascimento Cardoso, and Edésia Martins Barros De Sousa. 2015. "Synthesis, Characterization, and Biodistribution Studies of ^{99m}Tc-Labeled SBA-16 Mesoporous Silica Nanoparticles." *Materials Science and Engineering: C* 56 (August): 181–88. doi:10.1016/j.msec.2015.06.030.
- Douroumis, D, I Onyesom, M Maniruzzaman, and J Mitchell. 2013. "Mesoporous Silica Nanoparticles in Nanotechnology." *Crit Rev Biotechnol* 33 (3). Elsevier B.V.: 229–45. doi:10.3109/07388551.2012.685860.

- Douroumis, Dennis, Ichioma Onyesom, Mohammed Maniruzzaman, and John Mitchell. 2012. "Mesoporous Silica Nanoparticles in Nanotechnology." *Critical Reviews in Biotechnology*, no. JUNE: 1–17. doi:10.3109/07388551.2012.685860.
- Duncan, Bradley, Chaekyu Kim, and Vincent M Rotello. 2010. "Gold Nanoparticle Platforms as Drug and Biomolecule Delivery Systems." *Journal of Control Release* 148 (1): 122–27. doi:10.1016/j.jconrel.2010.06.004.Gold.
- Ehrenhaft, F, and L Lorenz. 1908. "Der Physik. 1."
- Faraday, M. 1857. "AuNP117-The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 147 (0): 145–81. doi:10.1098/rstl.1857.0011.
- Fardim, P. 2002. "Papel E Química de Superfície-Parte I–A Superfície Da Fibra Ea Química Da Parte Úmida." *O Papel*. [http://www.twiki.ufba.br/twiki/pub/IC1010/WebHome/PAPEL_SUPERFICIE_Fardim1_Port_\(1\).pdf](http://www.twiki.ufba.br/twiki/pub/IC1010/WebHome/PAPEL_SUPERFICIE_Fardim1_Port_(1).pdf).
- Freestone, I, N Meeks, M Sax, and C Higgitt. 2007. "The Lycurgus Cup - A Roman Nanotechnology," no. September 2015. doi:10.1007/BF03215599.
- Glomm, Wilhelm R. 2005. "Functionalized Gold Nanoparticles for Applications in Bionanotechnology." *Journal of Dispersion Science and Technology* 26 (3): 389–414. doi:10.1081/DIS-200052457.
- He, Qianjun, and Jianlin Shi. 2011. "Mesoporous Silica Nanoparticle Based Nano Drug Delivery Systems: Synthesis, Controlled Drug Release and Delivery, Pharmacokinetics and Biocompatibility." *Journal of Materials Chemistry* 21 (16): 5845. doi:10.1039/c0jm03851b.
- Huang, Xiaohua, and Mostafa a. El-Sayed. 2010. "Gold Nanoparticles: Optical Properties and Implementations in Cancer Diagnosis and Photothermal Therapy." *Journal of Advanced Research* 1 (1): 13–28. doi:10.1016/j.jare.2010.02.002.
- Ishii, Hirotaaka, Takaaki Ikuno, Atsushi Shimojima, and Tatsuya Okubo. 2015. "Preparation of Core-shell Mesoporous Silica Nanoparticles with Bimodal Pore Structures by Regrowth Method." *Journal of Colloid and Interface Science* 448. Elsevier Inc.: 57–64. doi:10.1016/j.jcis.2015.01.057.
- Jain, Prashant K., Xiaohua Huang, Ivan H. El-Sayed, and Mostafa a. El-Sayed. 2008. "Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine." *Accounts of Chemical Research* 41 (12): 1578–86. doi:10.1021/ar7002804.
- Junior, Miguel Jafelicci, and Laudemir Carlos Varanda. 1999. "O Mundo Dos Colóides." *Química Nova Na Escola*, no. 9: 9–13. <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc09/quimsoc.pdf>.
- Kelly, K. L., K. Lance Kelly, E. Coronado, L. Zhao, Eduardo Coronado, G. C. Schatz, Lin Lin Zhao, and George C. Schatz. 2003. "The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment." *Journal of Physical Chemistry B* 107 (3): 668–77. doi:10.1021/jp026731y.
- Kwon, Sooyeon, Rajendra K Singh, Roman A Perez, Ensanya A Abou Neel, Hae-Won Kim, and Wojciech Chrzanowski. 2013. "Silica-Based Mesoporous Nanoparticles for Controlled Drug Delivery." *Journal of Tissue Engineering* 4 (0): 2041731413503357. doi:10.1177/2041731413503357.
- Li, Yang, Xu Wang, and Junqi Sun. 2012. "Layer-by-Layer Assembly for Rapid Fabrication of Thick Polymeric Films." *Chemical Society Reviews* 41 (18): 5998. doi:10.1039/c2cs35107b.

- Li, Zongxi, Jonathan C. Barnes, Aleksandr Bosoy, J. Fraser Stoddart, and Jeffrey I. Zink. 2012. "Mesoporous Silica Nanoparticles in Biomedical Applications." *Chemical Society Reviews*. doi:10.1039/c1cs15246g.
- Liu, Yang, Hsiangkuo Yuan, Andrew M. Fales, Janna K. Register, and Tuan Vo-Dinh. 2015. "Multifunctional Gold Nanostars for Molecular Imaging and Cancer Therapy." *Frontiers in Chemistry* 3 (August): 1–7. doi:10.3389/fchem.2015.00051.
- Llinàs, Maria C, and David Sánchez-garcía. 2014. "Nanopartículas de Sílice: Preparación Y Aplicaciones En Biomedicina." *Afinidad LXXI* (565): 20–31.
- Manuscript, Author. 2012. "NIH Public Access." *Changes* 29 (6): 997–1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
- Martins, Manuel a., and Tito Trindade. 2012. "Os Nanomateriais E a Descoberta de Novos Mundos Na Bancada Do Qu??mico." *Quimica Nova* 35 (7): 1434–46. doi:10.1590/S0100-40422012000700026.
- Melo, Maurício Alves, Lucas Samuel Soares Santos, Maria Do Carmo Gonçalves, and Ana Flávia Nogueira. 2012. "Preparação de Nanopartículas de Prata E Ouro: Um Método Simples Para a Introdução Da Nanociência Em Laboratório de Ensino." *Quimica Nova* 35 (9): 1872–78. doi:10.1590/S0100-40422012000900030.
- Michel, Marc, Valérie Toniazzo, David Ruch, and Vincent Ball. 2012. "Deposition Mechanisms in Layer-by-Layer or Step-by-Step Deposition Methods: From Elastic and Impermeable Films to Soft Membranes with Ion Exchange Properties." *ISRN Materials Science* 2012: 1–13. doi:10.5402/2012/701695.
- Popiolski, Tatiane M, Renato B Silva, Janaina S Crespo, and Giovanna Machado. 2011. "Obtenção E Caracterização de Filmes Finos de Polieletrólitos Com Nanopartículas de Ouro." *11º CBPOL*, 931–36.
- Pyrrho, Monique, and Fermin Roland Schramm. 2012. "A Moralidade Da Nanotecnologia." *Cadernos de Saúde Pública* 28 (11): 2023–33. doi:10.1590/S0102-311X2012001100002.
- Ran, Zhipeng, Yang Sun, Baisong Chang, Qingguang Ren, and Wuli Yang. 2013. "Silica Composite Nanoparticles Containing Fluorescent Solid Core and Mesoporous Shell with Different Thickness as Drug Carrier." *Journal of Colloid and Interface Science* 410. Elsevier Inc.: 94–101. doi:10.1016/j.jcis.2013.08.015.
- Rezende, Scheila, Silvia Stanisçuaski, Liane De Lucca, and Adriana Raffin. 2003. "Revisão" 26 (5): 726–37.
- Saini, Rajiv, Santosh Saini, and Sugandha Sharma. 2010. "Nanotechnology: The Future Medicine." *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* 3 (1): 32–33. doi:10.4103/0974-2077.63301.
- Santos, J M, S M Rodrigues, D M Ribeiro, and J V Prior. 2014. "Perspetivas de Utilização de Nanomateriais Em Nanodiagnóstico Prospectives for the Use of Nanomaterials in Nanodiagnostic" 3: 2–12.
- Slowing, I I, B G Trewyn, S Giri, and V S Y Lin. 2007. "Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Biosensing Applications." *Advanced Functional Materials* 17 (8): 1225–36. doi:10.1002/adfm.200601191.
- Slowing, I I, J L Vivero-Escoto, C W Wu, and V S Y Lin. 2008. "Mesoporous Silica Nanoparticles as Controlled Release Drug Delivery and Gene Transfection Carriers." *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (11): 1278–88. ISI:000258313900006.

- Slowing, Igor I., Brian G. Trewyn, and V. S Y Lin. 2007. "Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Delivery of Membrane-Impermeable Proteins." *Journal of the American Chemical Society* 129 (28): 8845–49. doi:10.1021/ja0719780.
- Souza, Silva. 2010. "Processos De."
- Tang, Fangqiong, Linlin Li, and Dong Chen. 2012. "Mesoporous Silica Nanoparticles: Synthesis, Biocompatibility and Drug Delivery." *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)* 24 (12): 1504–34. doi:10.1002/adma.201104763.
- Tang, Zhiyong, Ying Wang, Paul Podsiadlo, and Nicholas a. Kotov. 2006. "Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering." *Advanced Materials* 18 (24): 3203–24. doi:10.1002/adma.200600113.
- Turkevich, John. 1985. "Colloidal Gold. Part II." *Gold Bulletin* 18 (4): 125–31. doi:10.1007/BF03214694.
- Uskoković, Vuk. 2013. "Entering the Era of Nanoscience: Time to Be so Small." *Journal of Biomedical Nanotechnology*. doi:10.1166/jbn.2013.1642.
- V. Valtchev, L. Tosheva Chem. Rev. 113 (2013) 6734–6760. n.d. "Porous Nanosized Particles: Preparation, Properties, and Applications." *Chemical Society Reviews*.
- Vélez, Campillo, Beatriz Eugenia, León Zuleta Salas, Beatriz Eugenia, Campillo Vélez, Pbro Guillermo, and León Zuleta. 2014. "Bioética Y Nanotecnología *." *REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACIÓN* 11 (1): 63–69.
- Vivero-Escoto, Juan L, Igor I Slowing, Brian G Trewyn, and Victor S-Y Lin. 2010. "Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery." *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 6 (18): 1952–67. doi:10.1002/smll.200901789.
- Wang, Ying, Qinfu Zhao, Ning Han, Ling Bai, Jia Li, Jia Liu, Erxi Che, et al. 2015a. "Mesoporous Silica Nanoparticles in Drug Delivery and Biomedical Applications." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11 (2). Elsevier Inc.: 313–27. doi:10.1016/j.nano.2014.09.014.
- . 2015b. "Mesoporous Silica Nanoparticles in Drug Delivery and Biomedical Applications." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 11 (2). Elsevier B.V.: 313–27. doi:10.1016/j.nano.2014.09.014.
- Wich, Peter R. 2015. "Baukasten Der Natur." *Nachrichten Aus Der Chemie* 63: 128–32. doi:10.1002/nadc.201590046.
- Wu, Si-Han, Chung-Yuan Mou, and Hong-Ping Lin. 2013. "Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticles." *Chemical Society Reviews* 42 (9): 3862–75. doi:10.1039/c3cs35405a.
- Xu, Zhi Chuan, Cheng Min Shen, Tian Zhong Yang, Huai Ruo Zhang, Hu Lin Li, Jian Qi Li, and Hong Jun Gao. 2005. "From Aqueous to Organic: A Step-by-Step Strategy for Shape Evolution of Gold Nanoparticles." *Chemical Physics Letters* 415: 342–45. doi:10.1016/j.cplett.2005.09.023.
- Zhang, Xiaoying. 2015. "Gold Nanoparticles: Recent Advances in the Biomedical Applications." *Cell Biochemistry and Biophysics* 72 (3): 771–75. doi:10.1007/s12013-015-0529-4.
- Zhang, Yanzhuo, Zhuangzhi Zhi, Tongying Jiang, Jinghai Zhang, Zhanyou Wang, and Siling Wang. 2010. "Spherical Mesoporous Silica Nanoparticles for Loading and Release of the Poorly Water-Soluble Drug Telmisartan." *Journal of Controlled Release* 145 (3). Elsevier B.V.: 257–63. doi:10.1016/j.jconrel.2010.04.029.

