

Microcápsulas Inteligentes de Híbridos Porfirina-Ouro para libertação acionada pela luz

Tiago José de Ceia Charana

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química

Orientadores: Doutor Pedro Miguel Neves Ribeiro Paulo

Doutora Vanda Isabel Roldão Canelas Vaz Serra

Júri

Presidente: Professor Doutor José Nuno Aguiar Canongia Lopes

Orientador: Doutora Vanda Isabel Roldão Canelas Vaz Serra

Vogais: Doutor Bruno André Cunha de Vallêra Jacques Pedras

Doutora Sandra Isabel Vieira

Novembro 2021

Prefácio

O trabalho apresentado nesta tese foi realizado no Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico (Lisboa, Portugal), durante o período de Abril-Novembro de 2021, supervisionado por Dra. Vanda Isabel Roldão Canelas Vaz Serra e Dr. Pedro Miguel Neves Ribeiro Paulo e no Instituto de Biomedicina (Aveiro, Portugal), durante o período de Outubro-Novembro de 2021, supervisionado por Dra. Sandra Isabel Moreira Pinto Vieira e Dr. Dário Alexandre Martins Trindade.

Declaração

Declaro que o presente documento é um trabalho original da minha autoria e que cumpre todos os requisitos do Código de Conduta e Boas Práticas da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

À Doutora Vanda Vaz Serra, orientadora desta dissertação, agradeço toda a boa disposição, paciência, ensinamentos e palavras de encorajamento, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Doutor Pedro Miguel Paulo, orientador desta dissertação, agradeço por me ter dado a oportunidade de contactar com a área da espectroscopia e fotoquímica, bem como toda a amizade, palavras de incentivo e ensinamentos ao longo deste percurso.

À professora Sílvia Costa, agradeço o interesse demonstrado no acompanhamento do meu trabalho.

Ao colega de laboratório David, agradeço toda a simpatia, partilha de experiências e conselhos acerca do trabalho a desenvolver no laboratório.

À Doutora Sandra Vieira, agradeço por me ter recebido no IBiMED e ter permitido contactar com o mundo da biologia.

Ao Doutor Dário Trindade, agradeço por todos os momentos de amizade e convívio que partilhámos, bem como por me ter acompanhado durante toda a minha estadia no IBiMED e pela preocupação que teve com o meu trabalho e com a minha pessoa.

Aos meus colegas de faculdade, em especial ao Filipe e ao Alex, por me terem acompanhado durante todo este percurso e me terem presenteado com a sua amizade e partilha de momentos inesquecíveis.

Aos meus amigos de Buarcos, por me conhecerem como ninguém, agradeço por guardarem as palavras certas para me motivar nos momentos difíceis deste percurso e por terem proporcionado os momentos mais especiais da minha vida.

À minha família, em especial aos meus pais, por me terem dado a oportunidade de estudar em Lisboa, por todo o amor incondicional, lições de vida e sacrifícios que fizeram com que eu seja a pessoa que sou hoje.

Ao Instituto Superior Técnico e ao Centro de Química Estrutural pela oportunidade de realização desta dissertação.

Resumo

O objetivo desta dissertação consiste no desenvolvimento de um sistema fotoativo de microcápsulas de polieletrólitos com propriedades óticas e estruturais melhoradas, que possibilitam a sua aplicação em sistemas de entrega de compostos ativos, bioimagem e/ou terapia fotodinâmica em tecidos tumorais. Construíram-se sistemas híbridos constituídos por um fotossensibilizador, a porfirina TMPyP (5,10,15,20-tetraquis(4-N-metil-piridínio)) e por nanobastonetes de ouro cujo objetivo é promover o aumento de fluorescência do fotossensibilizador através de efeitos plasmónicos.

A caracterização das propriedades óticas, fotodinâmicas e estruturais dos sistemas híbridos foi avaliada por espectroscopia de absorção UV-Vis e microscopia eletrónica de varrimento (SEM). O principal alvo de estudo destes sistemas prendeu-se com a intensificação de fluorescência originada pela modificação na posição relativa das partículas de ouro e da porfirina. A adsorção das camadas de polieletrólitos foi seguida por medição do potencial zeta. Através da técnica de FLIM, registaram-se fenómenos de intensificação de fluorescência com valores entre 10^4 e 10^5 .

Avaliou-se também a produção de oxigénio singuleto por parte da TMPyP, através da degradação do 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF). Num dos ensaios a porfirina encontrava-se situada no núcleo das microcápsulas e noutros fez-se a adsorção da porfirina depois de se revestir o núcleo com uma bicamada de polieletrólitos, tendo-se chegado à conclusão de que a quantidade de oxigénio singuleto formada é maior neste último.

Realizaram-se ensaios de citotoxicidade utilizando células HeLa, em que num deles as amostras foram irradiadas. Utilizou-se a resazurina como indicador da viabilidade das células, podendo-se inferir que a morte celular é mais efetiva na placa irradiada.

Palavras-Chave: Microcápsulas, Porfirina, Polieletrólitos, Nanobastonetes de Ouro, Oxigénio Singuleto, Citotoxicidade.

Abstract

The aim of this work is the development of a photoactive polyelectrolyte microcapsule system with improved optical and structural properties that enables its application in drug delivery systems, bioimaging and photodynamic therapy of tumor tissues. The hybrid systems were constituted by a porphyrin photosensitizer, TMPyP (5,10,15,20-tetrakis(4-N-methylpyridinium) porphyrin) and gold nanorods that promotes fluorescence increase of the photosensitizer through plasmonic effects.

The characterization of the optical, photodynamic and structural properties of the systems was followed by UV-Vis absorption spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). The main target in the study of these systems is related with fluorescence intensification caused by modifications in relative position of gold nanorods and porphyrin. The adsorption of oppositely charged polyelectrolytes was followed by zeta potential measurements. Using FLIM technique, the values of the fluorescence intensification events were about 10^4 and 10^5 .

The production of singlet oxygen was studied by UV-Vis spectroscopy based on 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) degradation. Singlet oxygen formation was the result of the irradiation of the systems containing porphyrin in the core or in the shell. and we can say that the amount of singlet oxygen formed is greater in the latter.

Two cytotoxicity assays were carried out using HeLa cells. In one of the assays, the plate containing the compounds studied before was irradiated. Resazurin was used as an indicator of cell viability, and it can be inferred that cell death is more effective in the irradiated plate.

Keywords: Microcapsules, Porphyrin, Polyelectrolytes, Gold Nanorods, Singlet Oxygen, Cytotoxicity.

Índice

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
Lista de Tabelas	XV
Lista de Figuras	XVI
Lista de Abreviaturas	XX
1. Introdução.....	1
1.2 – Terapia Fotodinâmica e Bio-imagem.....	2
1.3 – Fotossensibilizadores	4
1.3.1 – TMPyP – Caracterização e Potencialidades de Aplicação.....	6
1.4 – Sistemas de Entrega de Compostos Ativos e Vantagens das Microcápsulas de Polieletrólitos face aos demais.....	8
1.5 – Nanopartículas de Ouro	10
2 Técnicas Experimentais	13
2.1 – Absorção UV-VIS.....	13
2.2 - Fluorescência.....	14
2.3 – Potencial Zeta	16
2.4 – Microscopia Eletrónica de Varrimento.....	17
2.5 – Microscopia Confocal de Fluorescência	18
2.6 – Microscopia de Tempos de Vida de Fluorescência	19
3 Secção Experimental	22
3.1. Materiais.....	22
3.2. Procedimentos	22
3.2.1. Preparação das microcápsulas de CaCO ₃ e PS por adsorção de PAH e PSS	22
3.2.2. Incorporação da TMPyP nas microcápsulas.....	23
3.2.3. Incorporação dos nanobastonetes de ouro (AuNR) nas microcápsulas	23
3.2.4. Crescimento de células HeLa para uso em ensaios de citotoxicidade.....	23

3.3. Métodos.....	24
4 Resultados e Discussão	26
4.1. Preparação de Microcápsulas de Polieletrólitos com núcleos de carbonato de cálcio (CaCO ₃) e revestimento com Polieletrólitos (PSS e PAH).....	28
4.1.1. Preparação Experimental dos vários sistemas envolvidos no estudo da produção do oxigénio singuleto (Sistemas I, II e III)	32
4.1.2. Estudo da Produção de Oxigénio Singuleto pela TMPyP por via Indireta	32
4.1.2.1. Estudo dos Sistemas de Controlo I e II	34
4.1.2.2. Estudo dos Sistemas I, II e III.....	34
4.2. Preparação de Microcápsulas de Polieletrólitos com núcleos de Poliestireno e revestimento com Polieletrólitos (PAH e PSS)	38
4.3. Preparação de Microcápsulas funcionalizadas com Nano híbridos Porfirina-Ouro	39
4.3.1. Revestimento dos AuNR	39
4.3.2. Adsorção dos AuNR às microcápsulas.....	41
4.3.3. Preparação e Caracterização do sistema Híbrido I	42
4.3.4. Preparação e Caracterização do sistema Híbrido II	43
4.3.5. Preparação e Caracterização do sistema Híbrido III	45
4.3.6. Preparação e Caracterização do sistema Híbrido IV.....	48
4.4. Intensificação de Fluorescência por Efeito Plasmónico	49
4.4.1. Intensificação de Fluorescência por Efeito Plasmónico – Análise ao Sistema Híbrido I.....	50
4.4.2. Intensificação de Fluorescência por Efeito Plasmónico – Análise ao Sistema Híbrido II.....	54
4.4.3. Intensificação de Fluorescência por Efeito Plasmónico – Análise ao Sistema Híbrido III	59
4.4.4. Intensificação de Fluorescência por Efeito Plasmónico – Análise ao Sistema Híbrido IV.....	63
5. Ensaio de Citotoxicidade envolvendo células HeLa.....	66
6. Conclusões e Perspetivas Futuras	68
7. Referências Bibliográficas.....	71

8. Anexos 77

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Descrição da Arquitetura dos Sistema Estudados com núcleos de CaCO ₃ (A).	27
Tabela 2 - Descrição da Arquitetura dos Sistemas de Controlo Estudados com núcleos de CaCO ₃ (A).	27
Tabela 3 - Descrição da Arquitetura dos Sistemas Híbridos Estudados com núcleos de PS (B).	27
Tabela 4 - Descrição da Arquitetura dos Sistemas de Controlo Estudados com núcleos de PS (B). ..	28
Tabela 5 - $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção do plasmão longitudinal dos nanobastonetes, ao longo do tempo, e depois de funcionalizados com uma camada do polieletrólito PSS.	41
Tabela 6 – Tempos de Vida de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido I, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 41; Controlo III e Controlo IV.	53
Tabela 7 - Tempos de Vida de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido II, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 47; Controlo I e Controlo II.....	57
Tabela 8 - Tempos de Vida de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido III, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 54 e Controlo V.	62
Tabela 9 - Tempos de Vida de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido IV, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 59 e Controlo III.	65

Lista de Figuras

Figura 1 – Diagrama de Perrin-Jablonski simplificado com representação dos vários estados eletrônicos envolvidos na relaxação de um fotossensibilizador após absorção de radiação [10].	3
Figura 2 – Reações Fotoquímicas e consequente produção de Espécies Reativas de Oxigênio [10].	3
Figura 3 - Estrutura Molecular de alguns Fotossensibilizadores [13].	5
Figura 4 – Estrutura Molecular da porfirina TMPyP [16].	7
Figura 5 – Formação de microcápsula de polieletrólitos de cargas opostas através do processo de LBL, seguida de funcionalização da mesma com nanopartículas de ouro e posterior dissolução da partícula molde [20].	9
Figura 6 – Nanobastonetes (AuNR) com diferentes razões comprimento/largura [25].	11
Figura 7 – Espectro de Absorção UV-VIS de um AuNR para uma determinada razão comprimento/largura [27].	12
Figura 8 - Representação da dupla camada elétrica e plano de deslizamento/cisalhamento, no interior da camada difusa [33].	16
Figura 9 - Componentes de um Microscópio Confocal de Fluorescência [36].	19
Figura 10 – Single-Photon Timing – SPT [38].	20
Figura 11 - Representação Esquemática das Arquiteturas dos Sistemas Estudados constituídos por núcleos de CaCO ₃ (A) ou de PS (B).	27
Figura 12 - Imagem de FLIM (80x80 μm) que compara a fluorescência dos núcleos de CaCO ₃ (A) com os núcleos revestidos por uma bicamada de polieletrólitos (PSS_PAH) (B) ($\lambda_{exc} = 635 \text{ nm}$, $I = 1000 \text{ u.a.}$).	29
Figura 13 - Imagens de FLIM para várias intensidades do laser e ampliações de núcleos de CaCO ₃ ($\lambda_{exc} = 635 \text{ nm}$, $I = 100-92000 \text{ u.a.}$).	30
Figura 14 - Imagens de FLIM para o sistema de CaCO ₃ _PSS ($I = 100-92\ 000 \text{ u.a.}$), salientando-se o baixo grau de agregação do sistema. Nota: Estes sistemas não são fluorescentes a $I = 1000 \text{ u.a.}$ (intensidade usada para a análise dos sistemas híbridos - secção 4.4)	30
Figura 15 - Imagens de FLIM obtidas para o sistema de CaCO ₃ _PSS_PAH ($I = 92\ 000 \text{ u.a.}$), salientando o elevado grau de agregação do sistema. Nota: Estes sistemas não são fluorescentes a $I = 1000 \text{ u.a.}$ (intensidade usada para a análise dos sistemas híbridos - secção 4.4)	31
Figura 16 - Reação de Cicloadição sofrida pelo DPBF na presença do oxigênio Singuleto (¹ O ₂) [45].	33
Figura 17 - Esquema da Montagem Experimental usada nas experiências associadas ao estudo da produção do oxigênio singuleto (¹ O ₂).	33
Figura 18 - Oxidação do DPBF em função do tempo de irradiação para os sistemas de Controlo I e II.	34
Figura 19 - Oxidação do DPBF em função do tempo de irradiação para os Sistema I, II e III e TMPyP em DMF.	35
Figura 20 - Espectros de Emissão da TMPyP (3 μM) em DMF ($\lambda_{exc} = 600 \text{ nm}$ e $\lambda_{exc} = 440 \text{ nm}$).	36
Figura 21 - Espectros de Emissão dos sistemas de microcápsulas (2,87 pM) em DMF. Sistemas II+DMF antes de irradiar para $\lambda_{exc} = 440 \text{ nm}$ (—). Sistemas III+DMF antes de irradiar para os dois λ_{exc} (—). Sistema I+DMF+DPBF ($C_{TMPyP} = 3 \mu\text{M}$), antes (—) e depois de irradiação (—) para $\lambda_{exc} = 440 \text{ nm}$ (A) e	

$\lambda_{exc} = 600$ nm (B). Sistema II+DMF+DPBF ($C_{TMPyP} = 0,08$ μ M), antes (—) e depois de irradiação (—) para $\lambda_{exc} = 440$ nm (C). Sistema III+DMF+DPBF ($C_{TMPyP} = 1,2$ μ M), antes (—) e depois de irradiação (—) para $\lambda_{exc} = 440$ nm (D) e $\lambda_{exc} = 600$ nm (E).	37
Figura 22 - Variação do Potencial Zeta (ξ) do sistema em função do número de camadas de PAH e PSS adsorvidas.	38
Figura 23 - Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema [PS]_PAH_PSS.....	38
Figura 24 - Espectros de Absorção UV-VIS das Nanopartículas de Ouro com e sem revestimento.	39
Figura 25 - Espectros de absorção UV-Vis dos nanobastonetes de ouro em água e depois de revestidos com uma camada do polieletrólito PSS, ao longo do tempo.	40
Figura 26 - Espectro de Absorção UV-Vis do sistema híbrido I (—) e do sobrenadante (—) após adsorção da TMPyP e dos AuNR usado no cálculo da eficiência de adsorção e do número de moles adsorvido.	42
Figura 27 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema híbrido I.	43
Figura 28 - Espectro de Absorção UV-Vis do sistema Híbrido II.	44
Figura 29 - Espectros de Absorção UV-Vis dos sobrenadantes do sistema Híbrido II após adsorção da TMPyP (—) e do PSS (—) usados no cálculo da eficiência de adsorção e do número de moles adsorvido.	44
Figura 30 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema Híbrido II.	45
Figura 31 - Espectro de Absorção UV-Vis do sistema Híbrido III.	46
Figura 32 - Espectro de Absorção UV-Vis do sobrenadante do sistema híbrido III após adsorção da TMPyP usado no cálculo da eficiência de adsorção e do número de moles adsorvido.	46
Figura 33 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema em fase de desenvolvimento, correspondente ao sistema de controlo IV (PS_PAH_PSS_PAH_PSS_PAH_[AuNR_PSS]).	47
Figura 34 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema em fase de desenvolvimento, correspondente ao sistema de controlo V (PS_PAH_PSS_PAH_PSS_PAH_[AuNR_PSS]_PAH_PSS).	47
Figura 35 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema Híbrido III.	48
Figura 36 - Espectro de Absorção UV-VIS do sistema híbrido IV.	48
Figura 37 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema híbrido IV, utilizando AuNR com plasmão longitudinal a 600nm.	49
Figura 38 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μ m x 80 μ m) do sistema Híbrido I.	50
Figura 39 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (5 μ m x 5 μ m) do sistema Híbrido I. .	51
Figura 40 - Perfil de Intensidade de Fluorescência em função da posição na microcápsula para o sistema Híbrido I (—) e para os sistemas de controlo III (—) e IV (—).	51
Figura 41 - Variação da Intensidade de Fluorescência em função do tempo para os sistemas: Híbrido I (—); Controlo III (—) e Controlo IV (—). (A) Em que (B) representa o histograma de intensidade de fluorescência de um evento de curta duração de (A).	52

Figura 42 - Decaimentos de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido I, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 41 (—); Controlo III (—) e Controlo IV (—).....	53
Figura 43 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 µm x 80 µm) do sistema de controlo III.....	54
Figura 44 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 µm x 80 µm) do sistema de controlo IV.	54
Figura 45 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 µm x 80 µm) do sistema Híbrido II.	55
Figura 46 - Perfil de Intensidade de Fluorescência em função da posição na microcápsula para o sistema Híbrido II (—) e para os sistemas de controlo III (—) e IV (—).....	55
Figura 47 - Variação da Intensidade de Fluorescência em função do tempo para os sistemas: Híbrido II (—); Controlo III (—) e Controlo IV (—). (A) Histograma de intensidade de fluorescência de um evento de curta duração de (A).....	56
Figura 48 - Decaimentos de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido II, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 47 (—); Controlo III (—) e Controlo IV (—).....	56
Figura 49 - Retas de Calibração que relaciona a intensidade de fluorescência com a concentração de TMPyP ($y=3,2327 \times 10^7 x - 4,3226$, com $R^2=0,994$).	58
Figura 50 - Retas de Calibração que relaciona o pico de 2ª ordem da difração com o N° de partículas ($y=32,568x + 7,8155 \times 10^7$, com $R^2=0,9985$).	59
Figura 51 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 µm x 80 µm) do sistema de controlo V.	60
Figura 52 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 µm x 80 µm) do sistema Híbrido III.	60
Figura 53 - Perfil de Intensidade de Fluorescência em função da posição na microcápsula para o sistema Híbrido III (—) e para o sistema de controlo V (—).	60
Figura 54 - Variação da Intensidade de Fluorescência em função do tempo para os sistemas: Híbrido III (—) e Controlo V (—). (A) Histograma de intensidade de fluorescência de um evento de curta duração de (A).....	61
Figura 55 - Fotodegradação da TMPyP presente no sistema Híbrido III.....	61
Figura 56 - Decaimentos de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido III, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 54 (—) e Controlo V (—).....	62
Figura 57 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 µm x 80 µm) do sistema Híbrido IV.	63
Figura 58 - Perfil de Intensidade de Fluorescência em função da posição na microcápsula para o sistema Híbrido IV (—) e para os sistemas de controlo III (—) e IV (—).	63
Figura 59 - Variação da Intensidade de Fluorescência em função do tempo para os sistemas: Híbrido IV (—) e Controlo III (—). (A) Histograma de intensidade de fluorescência de um evento de curta duração de (A).....	64
Figura 60 - Decaimentos de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido IV, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 59 (—) e Controlo III (—).....	65

Figura 61 - Ensaio de Citotoxicidade utilizando-se resazurina para a placa não irradiada (A) e irradiada (B) ao fim de 24h (—), 48h (—) e 72h (—)..... 67

Lista de Abreviaturas

AuNR – do inglês Gold Nanorods, Nanobastonetes de Ouro.

BSE - Backscattered Electrons.

CFM – do inglês Confocal Fluorescence Microscopy, Microscopia Confocal de Fluorescência.

CNTs – do inglês Carbon Nanotubes, Nanotubos de carbono.

CTAB – do inglês Cetyltrimethylammonium Bromide, Brometo de Cetiltrimetilamônio.

DMF - Dimetilformamida

DPBF – do inglês 1,3-diphenylisobenzofuran, 1,3-difenilisobenzofurano.

EDL – do inglês Electrical Double Layer. Dupla Camada Elétrica.

EDRE – do inglês Enhanced Permeability and Retention Effect, Efeito de Retenção e Permeabilidade Aprimorada.

EDS – do inglês Energy Dispersive X-ray Spectroscopy, Espetroscopia por Difração de Raios X.

FLIM – do inglês Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, Microscopia de Tempo de Vida de Fluorescência.

HeLa – do inglês Henrietta Lacks, adenocarcinoma em células do colo do útero humano.

Hp – Hematoporfirina.

HpD – Hematoporfirina derivada.

IARC - do inglês International Agency for Research on Cancer, Agência Internacional de Investigação do Cancro.

LBL – do inglês Layer by Layer, Camada sobre Camada.

LSPR – do inglês Localized Surface Plasmon Resonance, Ressonância de Plasmão de Superfície Localizado.

MCF-7 – do inglês Human Mammary Adenocarcinoma, adenocarcinoma em células mamárias humanas.

MF – Partículas Coloidais de Melamina Formaldeído.

MRI – do inglês Magnetic Resonance Imaging, Imagem de Ressonância Magnética.

MWNTs – do inglês Multi-walled carbon nanotubes, Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla.

NIR – do inglês Near-Infrared, Infravermelho próximo.

PAH - Hidrocloro de Polialilamina.

PDT – do inglês Photodynamic Therapy, Terapia Fotodinâmica.

PLA - Poliláctido Láctico (PLA).

PLGA - Poliláctico-co-ácido Glicólico.

PS – do inglês Photosensitizer, Fotossensibilizador.

PSS – Poliestirenosulfonato.

PTT – do inglês Photothermal Therapy, Terapia Fototérmica.

ROS – do inglês Reactive Oxygen Species, Espécies Reativas de Oxigênio.

SEM – do inglês Scanning Electron Microscopy, Microscopia Eletrônica de Varrimento.

SPR – do inglês Surface Plasmon Resonance, Ressonância de Plasmão de Superfície.

SPT – do inglês Single-Photon Timing, Tempo de Fóton Único.

SWNTs – do inglês Single-walled carbon nanotubes, Nanotubos de Carbono de Parede Única.

TCSPC – do inglês Time Correlated Single Photon Counting, Contagem de Fótons Individuais Correlacionada no Tempo.

TEM – do inglês Transmission Electron Microscopy, Microscopia Eletrônica de Transmissão.

TMPyP – do inglês 5,10,15,20-Tetrakis(4-N-methylpyridinium) porphyrin, 5,10,15,20-tetraquis (4-N-metil piridínio) porfirina.

WHO - do inglês World Health Organization, Organização Mundial de Saúde.

1. Introdução

Segundo um estudo feito pela Organização Mundial de Saúde, em 2019 o cancro foi uma das principais causas de morte a nível mundial, situando-se numa posição dianteira relativamente a outras doenças, como é o caso dos acidentes vasculares cerebrais e doenças coronárias. No ano de 2020 registou-se o aparecimento de cerca de 19,3 milhões de novos casos de cancro, dos quais resultaram a morte de 10 milhões de pessoas. De entre o valor total de casos, os tipos de cancro mais vezes registados foram o cancro da mama feminino (11,7%), do pulmão (11,4%), colorretal (10,0%), da próstata (7,3%) e do estômago (5,6%) [1].

Segundo a Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC, do inglês International Agency for Research on Cancer), prevê-se que o número de casos de cancro no ano de 2040 seja de 28,4 milhões, o que corresponde a um aumento de quase 50% face a 2020. Contudo, a análise destas previsões deve ser feita de um modo cauteloso uma vez que este estudo se baseou em informações recolhidas em anos anteriores e, por isso, não teve em conta o impacto resultante da pandemia de COVID-19. Embora o impacto do vírus SARS-CoV-2 varie consoante a zona do globo e com os mecanismos de saúde acionados por cada país no tratamento da pandemia, é esperada uma descida no número de casos de cancro diagnosticados de forma precoce pois grande parte dos meios de saúde destinam-se atualmente ao combate da pandemia. Neste sentido, esta falha na deteção de novos casos faz aumentar o diagnóstico de casos de cancro tardios, o que em última instância faz aumentar a mortalidade [1].

O diagnóstico e conseqüente tratamento do cancro torna-se algo difícil de detetar, na medida em que existem muitas semelhanças entre as células tumorais e as células saudáveis. As técnicas mais utilizadas atualmente, das quais se destacam os raios-X, tomografia computadorizada (TC), mamografia, ressonância magnética (MRI) e ultrassons apresentam uma baixa sensibilidade na diferenciação entre células benignas e células tumorais malignas. A deteção atempada do cancro aumenta a probabilidade de sucesso no tratamento do mesmo, bem como previne o aparecimento de metástases, que consiste na disseminação de células cancerígenas através da corrente sanguínea e sistema linfático até outra zona do corpo ou órgãos, dando-se origem ao aparecimento de um tumor secundário [2].

No que diz respeito ao tratamento do cancro, os métodos aos quais se recorre com maior frequência nos dias de hoje são bastante agressivos para o ser humano pois apresentam vários efeitos secundários e uma série de conseqüências nocivas. De entre esses métodos, destacam-se: cirurgia – envolve a remoção do tecido tumoral que se encontra em estado inicial numa determinada zona do corpo do paciente e, como tal, não é aplicável no tratamento de metástases [3]; quimioterapia – consiste na administração intravenosa de medicamentos que provocam não só a destruição das células cancerígenas, mas também outras células saudáveis adjacentes. Embora os efeitos secundários sentidos por cada paciente variem consoante o tipo de cancro e a dose de fármaco administrada, há a

salientar a perda de cabelo, fadiga, náuseas e vômitos [4]; radioterapia – recorre a radiação ionizante (raios – X ou raios gama) que impede o crescimento e proliferação das células cancerígenas [5].

1.2 – Terapia Fotodinâmica e Bio-imagem

Os efeitos nocivos dos métodos tradicionais de tratamento do cancro advertem para a grande urgência que existe no desenvolvimento e melhoramento de procedimentos que previnam o aumento de mortalidade da mesma. Assim sendo, a terapia fotodinâmica emerge como um dos possíveis métodos de tratamento e deteção do cancro, mas também de outro tipo de doenças cardiovasculares e dermatológicas. A terapia fotodinâmica (*Photodynamic Therapy* – PDT) é um tipo de tratamento médico em que reações fotoquímicas desencadeadas por um fotossensibilizador (*Photosensitizers* – PS) excitado por uma fonte de luz adequada tem como consequência a indução de atividade citotóxica em células cancerígenas [6].

A introdução dos fotossensibilizadores no paciente é feita por injeção intravenosa e o sucesso na chegada destes compostos aos tecidos danificados depende de uma série de fatores, nomeadamente: distribuição de cargas, hidrofiliabilidade, lipofiliabilidade e estrutura tridimensional. Um fotossensibilizador movimenta-se de forma fluida ao longo da corrente sanguínea auxiliado por proteínas (hidrofiliabilidade) sendo que, quanto maior for a sua lipofiliabilidade, maior a probabilidade destes compostos se acumularem e atingirem as células cancerígenas [6][7]. Depois do PS atingir os tecidos danificados, este é irradiado com a ajuda de um laser ou de uma fonte luz incandescente que emite radiação num determinado comprimento de onda ótimo. Este comprimento de onda ótimo é função do tipo de PS que se está a utilizar e do tipo e profundidade de tumor a tratar sendo que, comprimentos de onda na região do vermelho e infravermelho penetram de forma mais eficaz os tecidos do que comprimentos de onda em torno do azul [8].

A absorção de luz por parte do fotossensibilizador faz com que esta molécula passe do estado fundamental (1P_0) para um estado excitado singleto (1P_1) de energia superior. Por se tratar de um estado instável, o fotossensibilizador pode decair diretamente para o estado fundamental, dissipando essa energia sob a forma de calor ou por emissão de fluorescência. Neste caso, se a emissão for expressiva, então o fotossensibilizador pode desempenhar o papel de fluoróforo na deteção das células tumorais (bio-imagem). Em alternativa ao decaimento direto para o estado fundamental pode ocorrer um cruzamento intersistemas em que a molécula passa de um estado singleto excitado para um estado tripleto (3P_1) excitado, cujo tempo de vida é superior [7][9][10]. A partir deste estado tripleto excitado (3P_1) a molécula pode decair para o estado fundamental por emissão de fosforescência, ou através da reação com outras moléculas presentes no meio, segundo dois tipos diferentes de mecanismos. No caso das reações do tipo I, que ocorrem mais frequentemente em condições de hipóxia, verifica-se uma troca de prótons e eletrões entre o 3P_1 e outras moléculas orgânicas existentes, dando-se origem a espécies extremamente reativas como o peróxido de hidrogénio, radicais e compostos iónicos instáveis. Relativamente às reações do tipo II, na presença de grandes quantidades de oxigénio, o 3P_1 reage diretamente com a molécula de oxigénio (3O_2) que transita para um estado de oxigénio singuleto (1O_2) extremamente reativo e com grande citotoxicidade [7][10].

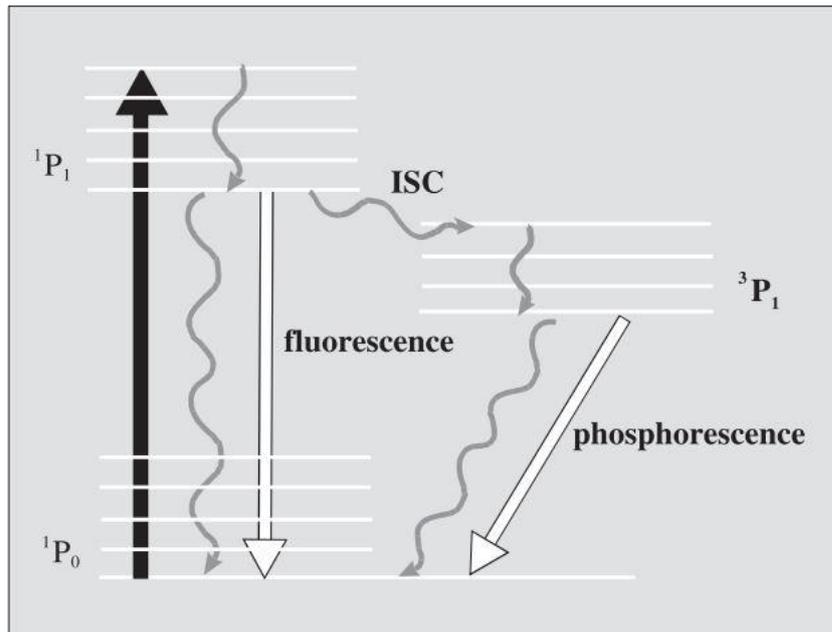


Figura 1 – Diagrama de Perrin-Jablonski simplificado com representação dos vários estados eletrônicos envolvidos na relaxação de um fotossensibilizador após absorção de radiação [10].

Os produtos resultantes destes dois tipos de mecanismos diferentes designam-se por espécies reativas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species – ROS*) e desempenham um papel fulcral na eliminação das células tumorais. Estes tipos de compostos são também produzidos pelo corpo humano em casos de falência biológica, podendo ser induzidos através de práticas de vida pouco saudáveis como é o caso do tabagismo e alcoolismo aliados a um estilo de vida sedentário. Embora o organismo tenha mecanismos de combate contra este tipo de compostos, o aumento de concentração destas espécies pode conduzir a situações de stress oxidativo que originam modificações ao nível do DNA [11].

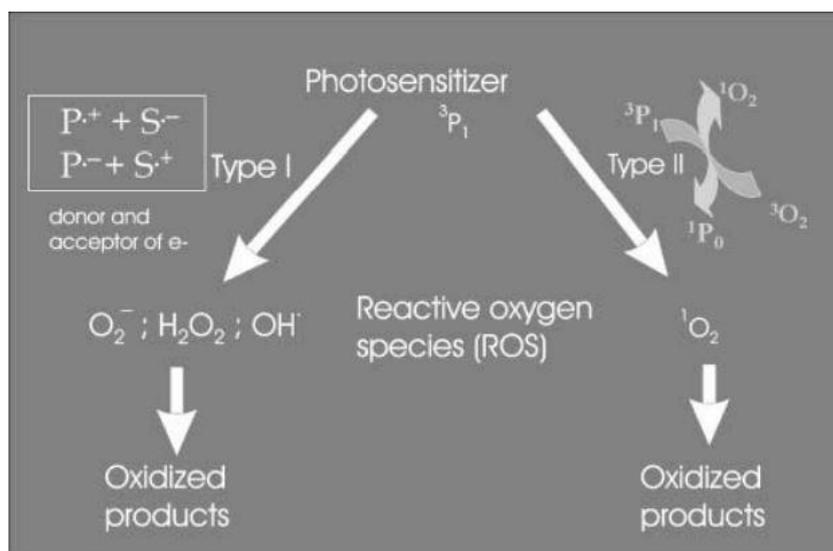


Figura 2 – Reações Fotoquímicas e consequente produção de Espécies Reativas de Oxigénio [10].

Numa perspetiva biológica, salienta-se o facto dos fotossensibilizadores apresentarem diferentes afinidades entre os vários organitos celulares existentes, interferindo preferencialmente no funcionamento da membrana plasmática, mitocôndrias, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático. A

produção de oxigénio singuleto cujo tempo de vida é extremamente curto e o raio de atuação menor do que o tamanho de grande parte dos organitos celulares, aliada à irradiação localizada nos tecidos tumorais, confere uma grande especificidade a esta técnica que varia consoante a dose de PDT utilizada e a localização do PS no interior da célula. Assim sendo, a conjugação destes fatores mencionados anteriormente faz desencadear uma série de processos diferentes que têm como resultado a morte celular [7][8].

Em situações onde se verifica a destruição de alguns organitos celulares, com especial destaque para as mitocôndrias, a célula aciona um mecanismo de apoptose, isto é, a própria célula destrói-se a si mesmo abdicando da sua integridade. Se os danos na célula forem de uma gravidade extrema e, como tal, impeçam a ativação do mecanismo de apoptose, os tecidos acabam por morrer e perder todas as suas propriedades – necrose. Por último, em situações em que a carga de PDT não é tão elevada, verifica-se a existência de mecanismos de autofagia em que os lisossomas degradam os outros componentes celulares que foram danificados. A PDT é ainda responsável pela danificação dos vasos sanguíneos que envolvem o tumor, o que faz com que a circulação sanguínea seja deficitária e, conseqüentemente, o crescimento do tumor fica comprometido devido à escassez de nutrientes e oxigénio [7].

A eficácia da PDT foi sendo testada e aprovada ao longo do tempo, tendo sempre apresentado resultados positivos mesmo quando conjugada com outros tratamentos, como a quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Ainda assim, devido à sua natureza localizada, esta técnica não é eficaz no tratamento de metástases, muitos pacientes sentem dores durante o tratamento e são impedidos de estar em contacto com a luz solar uma vez que, face à administração do PS, a pele apresenta uma fotossensibilidade elevada. Apesar destas contrariedades, o investimento em novos centros de PDT, a contratação de pessoal especializado e o estudo de novas substâncias que possam atuar como fotossensibilizadores conjugadas com determinadas fontes de luz cujas características variam de caso para caso têm vindo a contribuir para o melhoramento da PDT, que se prevê que seja uma técnica ainda mais utilizada no tratamento oncológico futuro [7][12]. Ao longo deste trabalho experimental, realizou-se o estudo de um sistema supramolecular envolvendo um fotossensibilizador (porfirina) acoplado a nanopartículas de ouro num sistema de transporte em microcápsulas de polieletrólitos, tendo-se investigado de que modo esse acoplamento pode potenciar as propriedades do fotossensibilizador [8][10].

1.3 – Fotossensibilizadores

Ao longo do tempo, os fotossensibilizadores usados nas áreas da química medicinal foram mudando consoante o tipo de tratamento necessário e os novos desenvolvimentos que foram surgindo nessas áreas. Contudo, de forma a desempenhar a sua função convenientemente, existem um conjunto de propriedades e características estruturais que estes compostos devem possuir. A um fotossensibilizador (PS) efetivo exige-se que seja um composto quimicamente puro, estável, fácil de armazenar e que a sua produção não acarrete grandes custos monetários. Para além disso, após a

injeção intravenosa, o PS deve ter um tempo de vida no organismo suficiente que lhe permita alcançar as células alvo e apresentar um rendimento elevado no processo de formação do oxigénio singuleto (1O_2). Outra propriedade vantajosa que alguns compostos permitem, será utilizar a janela espectral entre os 600 e os 800 nm, pois nesta gama de comprimentos de onda a radiação penetra nos tecidos de forma mais eficaz. Neste sentido, são usados compostos como as porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e ftalocianinas para desempenhar a função de fotossensibilizadores. No entanto, para comprimentos de onda muito superiores a 800 nm a energia fornecida não é suficientemente forte para se obter um rendimento elevado de espécies reativas de oxigénio, fulcrais para a existência da atividade citotóxica. Por último, para efeitos de bio-imagem poderá ainda haver vantagem em que os fotossensibilizadores sejam luminescentes [8][9].

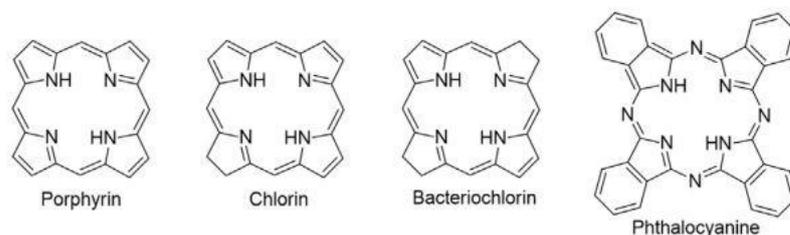


Figura 3 - Estrutura Molecular de alguns Fotossensibilizadores [13].

Fazendo-se uma análise numa perspetiva histórica do desenvolvimento de fotossensibilizadores, o precursor de todas as porfirinas utilizadas nos dias que correm foi a hematoporfirina (Hp) que foi pela primeira vez utilizada no século XIX. O facto de se tratar de uma mistura de compostos bastante heterogénea obrigava à utilização de grandes dosagens de modo a aumentar a seletividade pretendida no tratamento de células tumorais. Posteriormente, a hematoporfirina (Hp) deu origem à hematoporfirina derivada (HpD) que tem como principal vantagem uma maior seletividade para os tecidos tumorais e como principal desvantagem a permanência nos tecidos entre 4 a 6 semanas, trazendo à tona o problema da fotossensibilidade prolongada da pele. Anos mais tarde, surge o porfímero sódico (Photofrin®) que, embora se trate de um composto numa fase mais adiantada de purificação do que os seus antecessores, continua sendo uma mistura de uma grande quantidade de compostos e, como tal, todos os problemas associados à seletividade, dosagem, absorção de radiação e penetração nos tecidos biológicos subsistem [6][7].

Face a todas estas limitações, houve a necessidade de se desenvolverem PS de segunda geração com maior pureza, reprodutibilidade e mais capazes de se acumularem nas células tumorais, o que faz com que a dosagem a utilizar seja menor, passando a fotossensibilidade da pele de semanas para dias. A principal alteração a salientar da primeira para a segunda geração de fotossensibilizadores está relacionada com a estrutura molecular das porfirinas e compostos derivados das porfirinas, isto é, as posições meso das estruturas tetrapirrólicas encontram-se substituídas e/ou os núcleos dos anéis pirrólicos são funcionalizados via coordenação de iões metálicos. Estas alterações estruturais modificam uma série de propriedades, tais como: a estabilidade do próprio composto, a sua anfifilicidade, solubilidade em água, seletividade, distribuição intracelular e comprimento de onda de

absorção, sendo este último um parâmetro preponderante para o tratamento do cancro em tecidos mais profundos [7][9].

De toda uma panóplia de PS de segunda geração, destacam-se o ácido aminolevulínico (ALA) que, por ser instável em solução aquosa e apresentar baixa lipofilicidade, só pode ser usado no tratamento de doenças superficiais como é o caso das queratoses actínicas hipertróficas e o metilaminolevulinato (MAL) que advém do ALA e apresenta uma maior lipofilicidade, o que confere uma maior penetração nos tecidos celulares, estando disponível sob a forma de creme, sendo usado um pouco por todo o mundo no tratamento da doença de Bowen e outros carcinomas na zona da face e couro cabeludo [14].

Embora os PS de segunda geração tenham colmatado algumas das lacunas que se verificavam nos primeiros fotossensibilizadores, existiu a necessidade de se criar uma nova geração de PS que conjuga os PS de segunda geração juntamente com transportadores proteicos, hidratos de carbono, anticorpos, lipossomas e nanopartículas. Esta abordagem permitiu aumentar ainda mais a solubilidade e a seletividade para os tecidos tumorais em detrimento dos tecidos saudáveis, ao mesmo tempo que se diminuiu a dose a utilizar e os efeitos secundários do tratamento. Olhando mais em detalhe para as nanopartículas, dado que se trata de um dos componentes chave nos resultados obtidos ao longo deste trabalho, chega-se à conclusão de que estas nanopartículas aumentam a capacidade dos PS alcançarem as células cancerígenas devido ao efeito de retenção e permeabilidade aprimorada (Enhanced Permeability and Retention Effect – EDRE) que diz que compostos com um determinado tamanho têm mais tendência a acumular-se em células tumorais do que em células saudáveis. Para além disso, as nanopartículas também podem atuar como agentes solubilizantes caso a solubilidade do PS na corrente sanguínea não seja tão elevada [7][15].

1.3.1 – TMPyP – Caracterização e Potencialidades de Aplicação

A porfirina escolhida para a realização deste trabalho foi a porfirina tetra-catiónica 5,10,15,20-tetraquis (4-N-metil piridínio), TMPyP, constituída por quatro grupos substituintes piridínio em posições *meso* (Figura 4), que fazem aumentar a solubilidade do composto. A banda Soret da porfirina TMPyP localiza-se na região do azul, a cerca de 424 nm e as quatro bandas Q situam-se na região do verde e vermelho do espectro eletromagnético, mais concretamente nos comprimentos de onda de 518, 554, 585 e 630 nm [16]. As outras propriedades relevantes da TMPyP que a tornam um agente fotossensibilizador promissor em PDT são: elevado rendimento na produção de oxigénio singuleto após fotoativação ($\Phi = 0,7$) e dois picos de emissão de fluorescência facilmente detetáveis na região do vermelho entre os 649-655 nm e os 715-720 nm, que não interferem com a observação do pico de fosforescência do oxigénio singuleto a 1270 nm e possibilitam o estudo da localização intracelular da porfirina TMPyP [17].

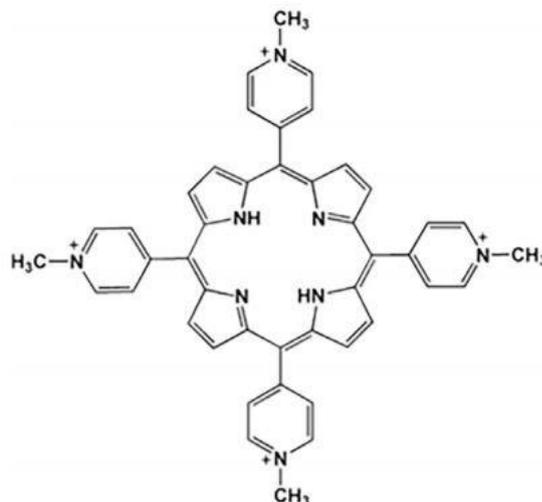


Figura 4 – Estrutura Molecular da porfirina TMPyP [16].

Tal como já foi referido anteriormente, o recurso à PDT induz uma série de mecanismos de morte celular (apoptose, necrose e autofagia) que variam consoante o tipo de PS utilizado, a sua concentração e atuação a nível intracelular. Relativamente à TMPyP, esta acumula-se preferencialmente nos lisossomas e no complexo de Golgi, dois organitos em que a quantidade de oxigénio disponível é bastante elevada, o que permite a obtenção de um elevado rendimento de produção de oxigénio singuleto. Após o processo de endocitose, caso a concentração da porfirina seja bastante elevada ou ocorra um processo de fotoativação, a quantidade de ROS formada provoca a rutura dos lisossomas e a TMPyP desloca-se para o núcleo da célula, ligando-se às cadeias aniónicas do DNA devido à sua natureza catiónica [16]. Para além disto, Cenklová *et al.* corroboraram os resultados obtidos por Juarranz *et al.* relacionados com a alteração da dinâmica do citoesqueleto, demonstrando que a TMPyP induz a desorganização e despolimerização dos microtúbulos através da sua ligação à tubulina, o que em última instância provoca a morte celular [16].

Relativamente aos tratamentos *in vivo*, ainda não tão estudados como os tratamentos *in vitro*, Villanueva *et al.* concluíram que a TMPyP se acumulava preferencialmente em tecidos cancerígenos em detrimento de outros tecidos saudáveis, que apresentavam uma concentração muito baixa da porfirina, 1 hora após a injeção intravenosa numa ratazana com um fibrossarcoma [16].

O tremendo potencial da porfirina TMPyP no tratamento do cancro levou à conjugação deste composto não só com agentes de quimioterapia como, por exemplo, a doxorrubicina, mas também com outros fotossensibilizadores, como é evidenciado por Villanueva *et al.* que ao juntar a TMPyP com a zinco(II)-ftalocianina no interior de um lipossoma, chegou à conclusão de que junção destes dois compostos é mais letal no combate às células HeLa (adenocarcinoma humano) e MCF-7 (adenocarcinoma em células mamárias humanas) do que a utilização de cada um dos compostos separadamente [16].

Outro papel muito importante da porfirina TMPyP prende-se com a sua atuação no processo de libertação controlada de fármacos. A incorporação da porfirina juntamente com outros compostos

biologicamente ativos no interior de nanopartículas permite uma chegada mais eficiente e eficaz até às células tumorais. Após fotoativação, a quantidade de ROS produzida por parte da TMPyP é bastante elevada, o que conduz à degradação da estrutura da nanopartícula e consequente libertação espaçada do fármaco para o interior das células [16].

1.4 – Sistemas de Entrega de Compostos Ativos e Vantagens das Microcápsulas de Polieletrólitos face aos demais

O avanço na biomedicina, nomeadamente no tratamento do cancro e técnicas de bio-imagem, trouxe consigo uma maior exigência relativamente ao transporte e armazenamento de compostos ativos que são introduzidos em organismos vivos. Muitos dos compostos utilizados como fármacos são pouco solúveis em água e instáveis no interior do corpo humano, pois podem reagir com outros compostos e degradam-se caso ocorram variações no pH do meio ou outros fatores externos como, por exemplo, a irradiação. Assim sendo, os sistemas de transporte destes compostos, bem como a sua libertação controlada em torno das células alvo são determinantes no sucesso e eficácia do tratamento, dos quais se destacam os lipossomas, fulerenos, nanotubos de carbono e microcápsulas de polieletrólitos [18][19].

As microcápsulas de polieletrólitos são construídas através da adsorção sequencial de várias camadas de polieletrólitos de carga oposta (*Layer by Layer* – LBL), em torno de uma partícula molde, alternadamente, que é posteriormente dissolvida e lavada de modo a removerem-se todos os produtos restantes da mesma (Figura 5). A escolha dos componentes a utilizar, quer na partícula molde quer no revestimento, deve ser feita tendo em conta a sua biocompatibilidade com o corpo humano, degradação no interior do organismo e possível existência de efeitos secundários resultantes da administração das cápsulas.

A obtenção de uma camada de polieletrólitos com uma espessura específica é feita através da imersão do substrato sólido (partícula molde), alternadamente, em duas soluções poliméricas com cargas positiva e negativa. De salientar ainda que o processo de adsorção LBL é fortemente influenciado pelo pH e força iónica das soluções, devido às variações conformacionais dos polímeros envolvidos, como resultado da presença de sais que blindam as repulsões eletrónicas entre as cadeias poliméricas [20].

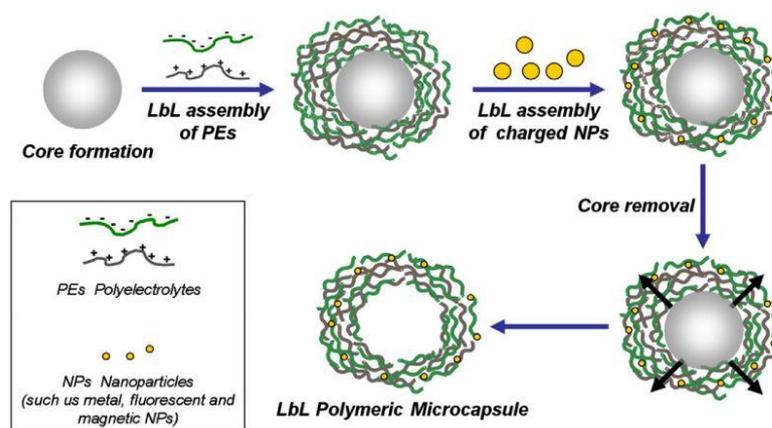


Figura 5 – Formação de microcápsula de polieletrólitos de cargas opostas através do processo de LBL, seguida de funcionalização da mesma com nanopartículas de ouro e posterior dissolução da partícula molde [20].

Alguns dos principais componentes utilizados na construção dos revestimentos das microcápsulas são de origem natural, como é o caso de alguns polissacarídeos, do alginato de sódio e do quitosano, o que favorece a sua movimentação e biocompatibilidade no interior do organismo. Contudo, para obtenção de uma microcápsula mais resistente às diferentes condições do meio, recorre-se muitas das vezes à utilização de polímeros sintéticos, nomeadamente o poliestirenosulfonato (PSS) e o hidrocloreto de polialilamina (PAH) [21]. Estes revestimentos são, na grande maioria das vezes, funcionalizados, isto é, as camadas externas das microcápsulas possuem uma série de grupos funcionais (lípidos, proteínas, anticorpos, hidratos de carbono e nanopartículas) que aumentam a seletividade das cápsulas para as células tumorais, pois estes facilitam a sua identificação, captura e internalização celular. De notar ainda que muitos destes compostos ativos desempenham um papel no interior da célula, uma vez que tendo em conta as suas características e estrutura molecular, atuam preferencialmente em determinadas zonas da célula, bem como em organitos específicos [21]. Lin *et al.* utilizaram microcápsulas de polieletrólitos funcionalizadas com galactose, provando que o facto da galactose ser reconhecida pelos recetores exclusivos das células do parênquima hepático, faz com que estas se acumulem nessa zona permitindo a libertação do composto indicado para o tratamento [20].

No que diz respeito à partícula molde, ao longo dos anos foram utilizados uma série de diferentes compostos, de modo a obter-se as microcápsulas, entre os quais: partículas coloidais de melamina formaldeído (MF), partículas de poliestireno, partículas de sílica, partículas inorgânicas (manganês e carbonato de cálcio), polímeros de ácido láctico [22-24]. Do ponto de vista biológico, o uso de materiais biocompatíveis nas partículas molde constitui uma grande vantagem, visto que após o processo de dissolução, pequenos resquícios das partículas ficam retidas dentro da microcápsula. Assim sendo, recorre-se com mais frequência às partículas de polímeros de ácido láctico (poliácido láctico (PLA), polilático-co-ácido glicólico (PLGA)) e carbonato de cálcio, com especial ênfase para estas últimas que por serem mais atrativas do ponto de vista da biocompatibilidade, biodegradação e económico serão muito utilizadas ao longo deste trabalho. A juntar a tudo isto, a síntese de partículas de carbonato de cálcio pode ser feita sob condições experimentais pouco rígidas e de fácil execução sendo que, a sua dissolução praticamente completa sob condições de pH neutras permite salvaguardar as propriedades essenciais das moléculas encapsuladas no interior da microcápsula [20].

O encapsulamento do fármaco pode ocorrer em simultâneo com a formação da microcápsula ou depois desta já estar concluída. A introdução da molécula pós-encapsulamento é feita através da alteração da permeabilidade do revestimento, o que é conseguido devido essencialmente a modificações no pH, temperatura e polaridade do solvente. Por outro lado, no método de pré-encapsulamento as moléculas precipitam no substrato poroso constituinte da partícula molde. Em ambas as situações, moléculas de alto peso molecular ficam retidas no interior da microcápsula devido às interações electrostáticas com as camadas de polieletrólitos, enquanto os compostos de mais baixo peso molecular se difundem pelas paredes da microcápsula.

Posto isto, pode-se afirmar que as microcápsulas de polieletrólitos destacam-se comparativamente a outros sistemas de entrega de compostos ativos uma vez que a sua síntese não requer condições experimentais extremas, nem o uso de aparelhos tecnológicos extremamente dispendiosos. Para além disso, existe uma grande diversidade de substratos que servem como molde para a construção das camadas de polieletrólitos, que variam desde a ordem de grandeza do nanómetro, até ao micrómetro. Uma outra propriedade bastante importante deste sistema de transporte prende-se com a grande capacidade de carga e libertação doseada do conteúdo no seu interior, dado que as microcápsulas podem ser construídas de maneira a responderem a estímulos externos que promovem essa mesma libertação. Essas microcápsulas podem ser funcionalizadas com compostos moleculares de praticamente todos os tipos, ao mesmo tempo que preserva e protege as propriedades físicas e químicas das moléculas transportadas no seu interior sendo que, a presença de moléculas fluorescentes ou de nanopartículas permite observar a tendência das microcápsulas em ligar-se a células tumorais e a respetiva medição em tempo real deste fenómeno. Nota ainda para o facto de mesmo após a entrada no interior das células, as microcápsulas atuarem em diferentes zonas da mesma, em função dos seus grupos funcionais que influenciam a afinidade com que as cápsulas se ligam aos recetores de determinado organito [20].

1.5 – Nanopartículas de Ouro

O uso de nanopartículas de ouro tem ganho espaço nos tratamentos do cancro pois estas estruturas são fáceis de sintetizar, biocompatíveis, resistentes à degradação e apresentam uma razão área/volume extremamente elevada o que permite funcionalizar a sua superfície com biomoléculas para desempenharem diversas funções [25]. A juntar a todas estas propriedades mencionadas em cima emergem propriedades óticas com grande interesse resultantes do confinamento eletrónico nas nanopartículas, e que podem ser exploradas para as técnicas de bio-imagem e/ou deteção de células tumorais [26].

Estas propriedades óticas resultam, em geral, do fenómeno de Ressonância de Plasmão de Superfície Localizado (*Localized Surface Plasmon Resonance* – LSPR) que consiste numa oscilação coletiva e coerente dos eletrões livres do metal, excitada pelo campo elétrico da luz e confinada pela superfície da nanopartícula. Esta oscilação de eletrões em torno dos núcleos positivos da rede metálica provoca uma polarização da superfície que induz um campo elétrico aumentado na sua vizinhança. A

interação luz-matéria, através do fenómeno de LSPR, está na origem de diversos efeitos que têm vindo a ser explorados nas aplicações de nanopartículas metálicas, entre os quais: efeito de nanoantena ótica em terapia fototérmica (PTT) e em reações fotoquímicas assistidas por plasmão [25][26]. A frequência ótica associada ao fenómeno de LSPR, ou seja, o comprimento de onda ao qual se observa a banda plasmónica devido à forte absorção e/ou difusão da luz, varia consoante a densidade no metal, e também com o tamanho ou forma das nanopartículas. Esta característica permite, dentro de um intervalo alargado, ajustar a resposta ótica destas partículas a uma determinada gama espectral [25].

No caso de partículas de forma anisotrópica, como por exemplo os nanobastonetes, o comprimento de onda de ressonância da oscilação plasmónica longitudinal é proporcional à razão entre o comprimento e largura da partícula (“*aspect ratio*”). Nos nanobastonetes de ouro (AuNR) torna-se possível ajustar a sua resposta ótica, isto é, a frequência de LSPR, na gama do vermelho a infravermelho próximo através do controlo da forma da partícula pelo método de síntese. Sendo assim, estas partículas são particularmente interessantes para aplicações biológicas, na medida em que as suas propriedades óticas podem ser ajustadas em torno da região do NIR (Figura 6).

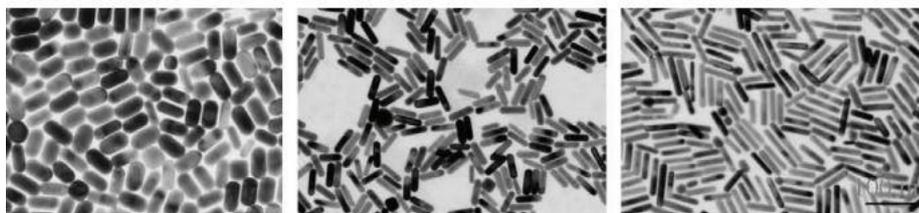


Figura 6 – Nanobastonetes (AuNR) com diferentes razões comprimento/largura [25].

A síntese de nanobastonetes de ouro (AuNR) pode ser realizada segundo duas abordagens diferentes: *bottom-up* ou *top-down*. No que diz respeito à abordagem *bottom-up*, os AuNR são produzidos através da redução de sais de ouro em soluções aquosas e do seu posterior crescimento, através de métodos químicos, eletroquímicos ou de técnicas de redução fotoquímica, destacando-se como o mais utilizado o *seed mediated growth method*. Este método consiste, numa primeira fase, na preparação das sementes através da redução do ácido cloroáurico com borohidreto numa solução aquosa de CTAB (brometo de cetiltrimetilamónio). De seguida, esta solução preparada junta-se a outra solução designada por solução de crescimento, que resulta da redução dos iões Au^{3+} a Au^+ com ácido ascórbico numa solução aquosa de CTAB. A junção das sementes com a solução de crescimento catalisa a redução dos iões complexos de Au^+ para obtenção dos nanobastonetes. Embora a utilização de métodos *bottom-up* promova a formação de nanobastonetes de ouro com dimensões uniformes, dentro de uma certa dispersão de tamanhos, existe alguma dificuldade em reproduzir a mesma forma e tamanho dos AuNR de lote para lote, mesmo quando se segue um procedimento semelhante, o que afeta as suas propriedades óticas. Em alternativa, existem métodos *top-down* que permitem obter AuNR com uma geometria e tamanho controlados, assim como os arranjos entre as partículas, sendo resultado de uma conjugação de processos físicos de fotolitografia e deposição de ouro. Ainda assim, o facto dos métodos *top-down* serem bastante demorados e dispendiosos faz com que sejam

impraticáveis a nível industrial [26]. A cristalinidade das nanopartículas obtidas por métodos de síntese coloidal também é superior àquela obtida por métodos *top-down*.

A forma dos nanobastonetes de ouro faz com que no espectro de absorção UV-VIS se observem duas bandas de ressonância de plasmão de superfície (SPR). Uma delas consiste numa banda forte na região do vermelho ou NIR (600-900 nm) que corresponde ao movimento oscilatório dos eletrões ao longo do eixo longitudinal (anteriormente mencionado), enquanto a outra corresponde à banda transversal, cuja intensidade é mais fraca e se situa na região do visível (520-550 nm), sendo praticamente insensível a variações no tamanho dos AuNR (Figura 7) [25].

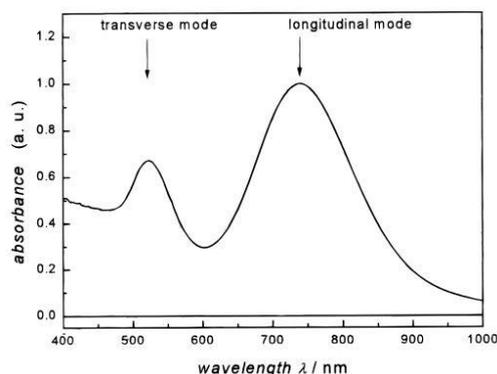


Figura 7 – Espectro de Absorção UV-VIS de um AuNR para uma determinada razão comprimento/largura [27].

Para além destas propriedades óticas de especial interesse, os nanobastonetes de ouro também são capazes de transportar compostos biologicamente ativos, ou fotoativos como é o caso dos fluoróforos. A produção de AuNR é feita maioritariamente tendo por base soluções aquosas de CTAB. As moléculas de CTAB são extremamente citotóxicas e ao libertarem-se das nanopartículas por desorção, são prejudiciais ao organismo pois induzem a destruição das membranas celulares. Posto isto, grande parte das vezes os AuNR são revestidos por camadas externas que melhorem a sua biocompatibilidade, como por exemplo, poli(etileno glicol), sílica ou cadeia de oligonucleótidos. Embora menos frequentemente, os AuNRs também já foram incorporados em microcápsulas de polieletrólito, por exemplo, Chen *et al.* incorporaram AuNR e um composto para o tratamento do cancro numa cápsula de polieletrólitos e mostraram que o controlo e libertação do fármaco pode ser controlado através da incidência de um feixe de luz. A absorção da luz e consequente aquecimento dos nanobastonetes provoca alterações na integridade da cápsula e consequente libertação do material transportado [26]. Por outro lado, Shao *et al.* incorporaram AuNR num sistema de microcápsulas de polieletrólito que, ao ser irradiado na zona do infravermelho próximo, origina a formação de bolhas de vapor capazes de danificar células tumorais [28].

No entanto, as nanopartículas de ouro podem desempenhar outros papéis para além de sistemas de transporte e entrega de fármacos, tal como referidos anteriormente. A forte interação com a luz, nomeadamente a grande capacidade de absorção e dispersão de luz, e ainda a concentração local de campos eletromagnéticos, são propriedades das nanopartículas de ouro que permitem explorá-las como nanoantenas óticas para manipular a emissão de fluoróforos orgânicos. A excitação do LSPR das nanopartículas origina fortes campos eletromagnéticos confinados, que aumentam a probabilidade

de absorção de luz por parte de um fluoróforo que se encontre na proximidade e, conseqüentemente, aumenta também o número de fótons emitidos por fluorescência [26]. Por outro lado, as taxas de decaimento radiativo e não radiativo também podem ser aceleradas pela vizinhança da nanopartícula através da interação com os modos plasmônicos da mesma. Embora o efeito global destas interações no rendimento radiativo do fluoróforo seja mais complexo de analisar, e envolva uma dependência não trivial com a distância entre o fluoróforo e metal, existem situações em que se pode verificar um aumento efetivo da emissão por esta via. O parâmetro que permite avaliar o aumento da intensidade de fluorescência de um sistema designa-se por fator de intensificação (ξ) e define-se como o rácio entre o número de fótons detetados com e sem efeito de nanoantena ótica [29]. O fator (ξ) pode por sua vez ser fatorizado no produto de um termo que contabiliza o aumento da taxa de excitação, por outro que traduz um rendimento quântico relativo de fluorescência com e sem efeito antena. Contudo, tal como foi referido, as nanopartículas metálicas também podem promover o decaimento não radiativo por transferência de energia ressonante, e um aumento muito acentuado na eficiência deste processo pode significar a supressão da fluorescência por parte do fluoróforo [30].

2 Técnicas Experimentais

2.1 – Absorção UV-VIS

A absorção de um feixe de luz num determinado meio e a um dado comprimento de onda, λ , caracteriza-se pela absorvância $A(\lambda)$ ou transmitância $T(\lambda)$, segundo as equações (1) e (2):

$$A(\lambda) = \log \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}} = -\log T(\lambda) \quad (1)$$

$$T(\lambda) = \frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda}^0} \quad (2)$$

onde I_{λ}^0 e I_{λ} representam a intensidade da luz (ou n.º de fótons) que incidem e abandonam o meio de absorção em estudo, respetivamente.

A lei de *Beer-Lambert* relaciona a absorvância com a concentração de espécies que absorvem e o percurso ótico do meio através da equação (3):

$$A(\lambda) = \log \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}} = \varepsilon(\lambda)lc \quad (3)$$

em que $\varepsilon(\lambda)$ representa o coeficiente de absorção molar ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), c representa a concentração das espécies absorventes ($mol \cdot L^{-1}$) e l consiste na espessura do meio absorvente (cm) ou percurso ótico.

Contudo, a equação (3) só é válida para soluções diluídas e luz monocromática e, como tal, para absorção de luz num intervalo de comprimentos de onda, ou quando as interações físicas e

químicas entre as espécies que absorvem são muito acentuadas, não se pode fazer uma aplicação direta desta fórmula [31].

Para o estudo do espectro de absorção das soluções utilizadas ao longo deste trabalho, de modo a contabilizar as perdas de transmissão por refração ou reflexão e outros fenómenos, utilizou-se um espectrofotómetro de feixe duplo que mede a absorvância da solução através da diferença entre a absorvância total da amostra+célula e a absorvância apenas da célula com o solvente (branco).

A absorvância da amostra+célula é dada pela equação (4):

$$A_{A+R}(\lambda) = \log \frac{I_E}{I_S} \quad (4)$$

em que I_E representa a intensidade do feixe de luz que incide na célula (diferente daquela depois de atravessar as paredes da célula) e I_S representa a intensidade do feixe de luz que sai da célula (diferente daquela imediatamente antes da parede de saída da célula). Seguindo-se um raciocínio análogo, caso se substitua a solução pelo solvente e sendo a intensidade do feixe de luz que sai da célula, I_R , obtém-se a equação (5):

$$A_R(\lambda) = \log \frac{I_E}{I_R} \quad (5)$$

A absorvância efectiva da solução pode ser determinada pela equação (6):

$$A(\lambda) = A_{A+R}(\lambda) - A_R(\lambda) = \log \frac{I_R}{I_S} \quad (6)$$

2.2 - Fluorescência

O fenómeno de luminescência de uma determinada espécie química consiste na emissão de luz por parte desta última, após absorção de radiação que excita a molécula para um estado de energia eletrónica acima do estado fundamental, e compreende dois fenómenos distintos: fluorescência e fosforescência [32].

A absorção de luz por parte de uma molécula traduz-se numa alteração nos seus estados eletrónicos, vibracionais e rotacionais, sendo que a quantidade de luz absorvida, ou seja, a probabilidade desta transição entre estados de energia, é proporcional ao valor do coeficiente de absorção molar (ϵ). Após o fenómeno de excitação da molécula, esta eventualmente decai para o estado fundamental, mas nem sempre por um processo radiativo de fluorescência ou fosforescência, isto é, existe uma certa probabilidade de ocorrerem transições não radiativas (conversão interna, cruzamento intersistemas e relaxação vibracional) [32].

A relaxação vibracional consiste numa transição entre um estado vibracional mais energético e um estado vibracional de menor energia, do mesmo estado eletrónico, como resultado da colisão entre as moléculas de fluoróforo e/ou de solvente. Por sua vez, a conversão interna consiste numa transição não radiativa entre dois estados eletrónicos diferentes com a mesma multiplicidade de spin. Tal como já foi dito anteriormente, a perda de energia associada aos fenómenos de relaxação

vibracional e de conversão interna, faz com que os fótons emitidos pela molécula, aquando do processo de decaimento radiativo, tenham uma energia menor do que os fótons absorvidos no processo de excitação. Esta diferença reflete-se num desvio entre os comprimentos de onda do máximo do espectro de absorção e emissão que se designa por desvio de Stokes [32].

Embora as transições entre estados excitados eletrónicos com diferentes multiplicidades de spin sejam proibidas, graças ao acoplamento spin-orbita, a transição entre estados singleto excitados e estados tripleto torna-se possível em grande parte dos fluoróforos. Este processo designa-se por cruzamento intersistemas sendo favorecido quando o nível vibracional de menor energia do primeiro estado excitado é isoenergético com um nível vibracional do estado tripleto [32]. O decaimento a partir de um estado excitado tripleto para o estado fundamental, em geral singuleto, por ser processo proibido ocorre mais lentamente (fosforescência – gama temporal dos microssegundos) do que o decaimento radiativo de um estado excitado singuleto (fluorescência – gama temporal dos nanossegundos) [32].

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) define-se como a fração de espécies excitadas que retornam ao estado fundamental com emissão de fótons e pode ser calculado através do quociente entre a taxa de decaimento radiativo (k_r) e a taxa de decaimento não radiativo (k_{nr}), na qual se inclui a taxa de conversão interna (k_{ic}) e a taxa de cruzamento intersistemas (k_{isc}) [32].

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (7)$$

$$k_{nr} = k_{ic} + k_{isc} \quad (8)$$

O tempo-de-vida da molécula no estado excitado define-se como o tempo médio que a molécula permanece no estado excitado e depende das constantes cinéticas de decaimento radiativo e não-radiativo, tal como indicado na equação (9). Através desta definição, o rendimento quântico de fluorescência pode ser expresso como o produto entre o tempo-de-vida e a constante cinética de decaimento radiativo (equação (10)):

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (9)$$

$$\Phi_F = \tau \cdot k_r \quad (10)$$

A intensidade de fluorescência (I_F), obtida através da equação (11), é proporcional à população do estado excitado do fluoróforo, à intensidade de luz absorvida $I_A(\lambda_E)$ ao comprimento de onda de excitação, λ_E , e à função de distribuição de probabilidade, $F_\lambda(\lambda_F)$, para a transição eletrónica entre os níveis vibracionais do primeiro estado excitado (S_1) e o estado fundamental (S_0) através de um parâmetro experimental k . O parâmetro k varia consoante as características do espectrofluorímetro utilizado, mais concretamente o ângulo em que é feita a recolha da luz, diferença de potencial do fotomultiplicador e largura dos monocromadores [32].

$$I_F = k F_\lambda(\lambda) I_A(\lambda_E) \quad (11)$$

De ressaltar ainda que devido a esta dependência instrumental, na grande maioria das vezes, o espectro de emissão de fluorescência é traçado com base em unidades arbitrárias pois o valor numérico da intensidade de fluorescência não tem significado.

2.3 – Potencial Zeta

O potencial zeta, também chamado de potencial eletrocinético, é um parâmetro bastante importante no estudo das interações electroestáticas em soluções coloidais e dispersão de partículas, fornecendo informações importantes acerca da estabilidade das dispersões. Quando uma partícula se encontra dispersa numa solução, verifica-se a formação de uma dupla camada elétrica (*Electrical Double Layer* - EDL) através do fenómeno de adsorção sendo que, a camada interna, designada por camada de Stern, é constituída por iões de carga contrária à da partícula dispersa, enquanto que a camada mais exterior, também chamada de camada difusa, é uma camada dinâmica formada por iões de ambas as cargas e que sofre alterações tendo em conta a concentração da solução, força iónica e pH [33].

Ao aplicar-se um campo elétrico através de um par de eléctrodos em contacto com a amostra em estudo, consegue-se proceder à separação de cargas existentes na camada difusa, uma vez que as mesmas se movem em direcção ao eléctrodo de carga oposta (técnica de eletroforese). No interior da camada difusa, por entre as partículas em movimento e o meio dispersante existe um plano hipotético, designado por plano de deslizamento/cisalhamento, cujo potencial elétrico corresponde ao potencial zeta. Entende-se como potencial elétrico de superfície, o trabalho requerido para trazer uma carga unitária positiva do infinito para essa superfície, sem qualquer aceleração [33].

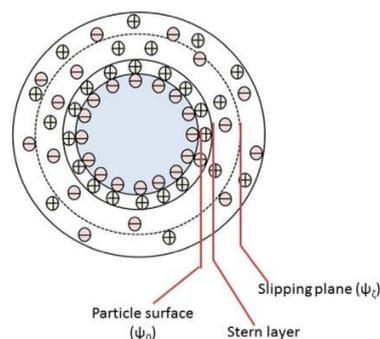


Figura 8 - Representação da dupla camada elétrica e plano de deslizamento/cisalhamento, no interior da camada difusa [33].

A velocidade de migração das partículas carregadas em direcção aos eléctrodos designa-se por mobilidade eletroforética e vem expressa na equação (12), em que V significa a velocidade da partícula ($\mu\text{m/s}$) e E a força do campo elétrico aplicado (V/cm).

$$\mu_E = \frac{V}{E} \quad (12)$$

O valor do potencial zeta, ζ , é obtido de forma indireta recorrendo-se à equação de Henry, equação (13):

$$\mu_E = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (13)$$

em que ε_r corresponde à constante dielétrica, ε_0 corresponde à permissividade do vácuo, $f(ka)$ é a função de Henry e η trata-se da viscosidade da solução à temperatura de medição.

O parâmetro correspondente à função de Henry pode tomar valores fixos consoante o tamanho das partículas, a espessura da EDL formada e concentração da dispersão. Assim sendo, para partículas de elevadas dimensões (raio superior a 1 μm) e cuja EDL seja muito inferior a este último valor, $f(ka)$ toma o valor de 1,5. Para partículas de pequenas dimensões (raio inferior a 100 nm) em que a espessura da EDL é muito superior ao raio da partícula, o valor de $f(ka)$ é aproximadamente igual à unidade [33].

2.4 – Microscopia Eletrónica de Varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (*Scanning Electron Microscopy* – SEM) é uma das técnicas instrumentais mais versáteis para o estudo e análise da morfologia, estrutura cristalina e composição química de uma amostra [34].

Nesta técnica laboratorial, de forma a obter-se uma imagem de grande resolução, faz-se passar um feixe de eletrões ao longo da superfície da amostra de uma forma sistemática, produzindo-se uma série de sinais eletrónicos resultantes da interação entre os eletrões bombardeados e as espécies, sendo posteriormente tratados e exibidos num tubo de raios catódicos. As interações verificadas entre o feixe de eletrões e as espécies em estudo podem ser divididas em dois tipos diferentes: interações elásticas e interações inelásticas [34].

As interações elásticas caracterizam-se pela deflexão dos eletrões incidentes segundo uma grande amplitude, provocada pelos núcleos dos átomos da amostra ou por outros eletrões da camada mais externa e cuja energia é semelhante. Embora a energia despendida nestas interações seja desprezável, os eletrões que são dispersos segundo ângulos superiores a 90° designam-se por Backscattered Electrons (BSE), sendo bastante importantes para a obtenção de imagens da amostra com grande resolução. Por seu turno, as interações inelásticas resultam de grandes interações conjuntas entre os eletrões incidentes e todos os átomos e eletrões da amostra, cuja transferência de energia seja apreciável. A quantidade de energia em jogo depende da força da ligação dos eletrões aos átomos da amostra e se estes são excitados individualmente ou coletivamente. Neste sentido, a ionização dos átomos da amostra leva ao surgimento de eletrões secundários (SE) resultantes da excitação dos átomos da amostra. De notar ainda que o volume e profundidade da penetração é tanto maior, quanto mais energético for o feixe de luz e tanto menor, quanto maior for o número atómico dos componentes da amostra uma vez que átomos com maior número atómico têm mais partículas capazes de impedir a penetração [34].

Os elétrons secundários possuem baixa energia e são atraídos por um detetor, funcionando como agentes de contraste topográfico para visualização da textura e rugosidade da superfície, enquanto os BSE para além de fornecerem informação topográfica, a análise destes elétrons recolhida no detetor possibilita determinar a composição química e estrutura cristalina da amostra. Contudo, a recolha de informação referente à composição química de uma amostra é obtida recorrendo-se principalmente a um sistema de análise de espectroscopia por difração de raios X (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy – EDS), que permite identificar materiais e estimar a concentração relativa dos mesmos na superfície da amostra. Estes raios-X são emitidos por parte dos átomos ionizados que, ao perderem um elétron das suas camadas mais internas, faz com que outro elétron presente numa camada mais superficial tome o seu lugar de modo a restabelecer-se o equilíbrio de cargas. Para além da emissão destes raios-X, o excesso de energia característico e resultante deste processo pode ser transportado por elétrons de Auger, fornecendo informações acerca da composição química da superfície da amostra. Caso a amostra seja fina o suficiente ($\leq 1 \mu\text{m}$), parte dos elétrons podem ser transmitidos através da amostra e juntamente com a técnica de espectroscopia por difração de raios X, obter-se uma análise mais pormenorizada dos elementos da amostra, e qual a sua distribuição ao longo da mesma [34].

2.5 – Microscopia Confocal de Fluorescência

A microscopia confocal de fluorescência (*Confocal Fluorescence Microscopy* - CFM) permite obter imagens tridimensionais através do varrimento de imagens a diferentes profundidades (tomografia) com elevada resolução através da rejeição de sinais ou ruído vindo de fora do plano focal[35].

Numa primeira fase, o feixe de luz laser é refletida num espelho dicróico e posteriormente focado através de uma objetiva do microscópio para um determinado ponto da amostra. Após a absorção de luz por parte do fluoróforo, verifica-se a emissão de fluorescência por parte do mesmo em qualquer direção a comprimentos de onda superiores ao de excitação. Parte dessa fluorescência é captada pela objetiva e depois passa através de um pinhole, que está colocado num plano que conjuga o plano focal da objetiva do microscópio e o ponto de excitação do laser definido pelo pinhole de excitação, em direção ao detetor [35].

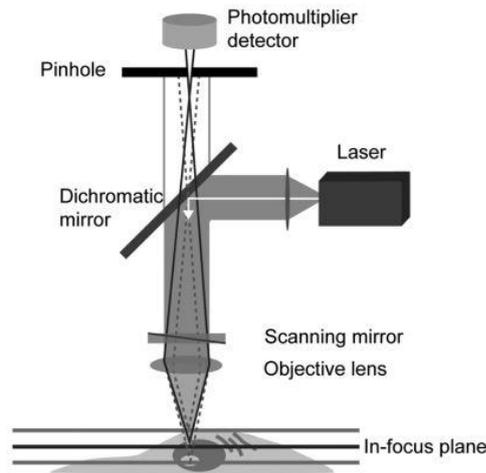


Figura 9 - Componentes de um Microscópio Confocal de Fluorescência [36].

De salientar ainda que a utilização desta técnica analisa um ponto específico da amostra de cada vez e, como tal, para se estudar a amostra na sua totalidade existem duas soluções distintas. A primeira delas consiste em manter parado o laser que emite o feixe de luz, fazendo passar a amostra pelo ponto de excitação. A outra abordagem, muito mais eficaz e utilizado a nível laboratorial, consiste em fazer percorrer o laser ao longo de toda a amostra que permanece imóvel [35].

Num microscópio confocal de fluorescência, as resoluções axiais e laterais são limitadas pela difração de luz, podendo as mesmas ser calculadas com recurso às equações (14) e (15), respetivamente:

$$R_{axial} = \frac{1,4 \cdot \lambda \cdot \eta}{(NA)^2} \quad (14)$$

$$R_{lateral} = \frac{0,4 \cdot \lambda}{NA} \quad (15)$$

onde λ corresponde ao comprimento de onda de emissão, η corresponde ao índice de refração do meio e NA simboliza a abertura numérica da objetiva [36].

2.6 – Microscopia de Tempos de Vida de Fluorescência

Nos últimos anos o uso da fluorescência permitiu o desenvolvimento de novas técnicas no âmbito da medicina (caracterização de tecidos), da biologia (estudo de interações entre moléculas, mudanças conformacionais e do ambiente celular) e da ciência dos materiais (caracterização e avaliação de propriedades de materiais). Para que tal fosse possível, em muito contribuiu a técnica de Microscopia de Tempos de Vida de Fluorescência (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* – FLIM) que faz uso das diferenças do tempo-de-vida do estado excitado de fluoróforos como mecanismo de contraste para a criação de imagens [37].

O tempo-de-vida de fluorescência define-se como o tempo médio que uma molécula demora, após absorção de radiação, a regressar ao estado fundamental proveniente, em regra geral, do primeiro estado singuleto excitado. Este tempo-de-vida é uma propriedade intrínseca dos fluoróforos e, como

tal, é insensível a mudanças na focagem do microscópio, na intensidade da fonte de emissão e no caminho ótico, bem como no que diz respeito à fotodegradação e variações na concentração e espessura da amostra. Por outro lado, face à componente não radiativa do decaimento, o tempo-de-vida de fluorescência é sensível a variações no microambiente em que se encontra o fluoróforo e, por isso, o mesmo sofre modificações dependendo da temperatura, pH, concentração de oxigênio, polaridade, concentração de íões em solução e existência de colisões e agregados moleculares.[39] Assim sendo, esta técnica não só possibilita a aquisição dos parâmetros físicos e químicos de um determinado microambiente, como também serve para discriminar diferentes frações do mesmo fluoróforo em interação com o microambiente [39].

A técnica de FLIM pode ser usada tendo por base dois modos diferentes, um deles no domínio do tempo e outro no domínio da frequência. O modo de frequência (FD) é mais adequado para avaliação de decaimentos multiexponenciais, sendo o modo do tempo (TD) aquele que vai ser usado neste trabalho de dissertação [38].

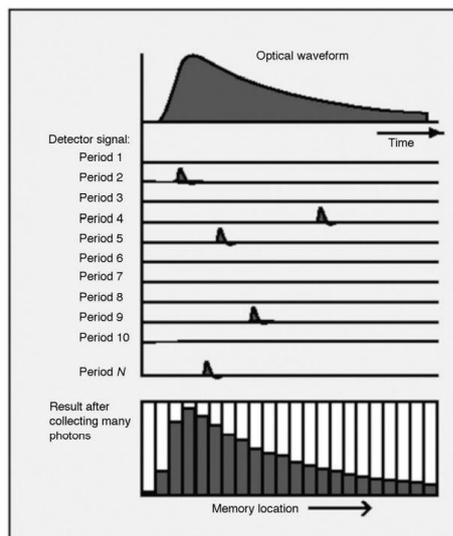


Figura 10 – Single-Photon Timing – SPT [38].

No domínio temporal considera-se que a emissão de fluorescência é proporcional ao número de moléculas existentes no estado excitado, e o estudo do decaimento e tempos de vida de fluorescência é feito com recurso à técnica de Tempo de Fotão Único (*Single-Photon Timing – SPT*) em que se assume que a probabilidade de deteção de um fóton num intervalo de tempo t após a excitação é proporcional à intensidade de fluorescência nesse tempo t . Neste sentido, mede-se o tempo entre a excitação da amostra com a ajuda de um laser pulsado e deteção do primeiro fóton numa série de intervalos de tempo Δt . De uma forma repetida, a amostra é excitada por um laser pulsado, e num histograma representa-se o número de eventos para uma diferença de tempos entre a excitação e a emissão, ou seja, o número de fótons detetados nesse intervalo de tempo, o que permite reconstruir o perfil de decaimento de fluorescência.

3 Secção Experimental

3.1. Materiais

Poliestirenosulfonato de sódio [PSS (MM≈75000 g/mol, 18% %m/v)] e hidrocloreto de polialilamina [PAH (MM≈50000 g/mol) ou (MM≈17500 g/mol)] da Sigma Aldrich. Cloreto de Sódio [NaCl (MM≈58,44 g/mol, >=99,5%)] da Fisher Chemical. Micropartículas de poliestireno [PS, 1,04 μm, SD=0,035 μm, 10% w/v, d=1,05 g/cm³] da microparticles GmbH Forschungs- und Entwicklungslaboratorium. Hidróxido de Sódio [NaOH (MM≈40000 g/mol)] e ácido clorídrico [HCl (7 %)] da Sigma Aldrich para ajuste do pH. Porfirina 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il) porfirina [TMPyP (MM≈1363,6 g/mol)] da Sigma Chemicals. Nanobastonetes de ouro estabilizados por CTAB, da Nanopartz: (a) - diâmetro=25 nm, comprimento=71nm, largura/altura=2,8, número de produto A12-25-650-CTAB-DIH-1-25, lote 12G72-10253 ($\lambda_{\text{TSPR}}=516$ nm e $\lambda_{\text{LSPR}}=659$ nm); (B) - diâmetro=25 nm, comprimento=57nm, largura/altura=2,3, número de produto A12-25-600-CTAB-DIH-1-25, lote 12G70-10253 ($\lambda_{\text{TSPR}}=523$ nm e $\lambda_{\text{LSPR}}=614$ nm). 10% FBS DMEM (NaHCO₃, piruvato de sódio e antibióticos e antimicóticos, ajustado para um pH=7,3). Solução de resazurina (0,1 mg/mL).

3.2. Procedimentos

3.2.1. Preparação das microcápsulas de CaCO₃ e PS por adsorção de PAH e PSS

Para obtenção dos núcleos de CaCO₃ promove-se uma reação de precipitação dos iões cálcio (Ca²⁺) e carbonato (CO₃²⁻), sendo que para isso se misturam simultaneamente 100 μL de uma solução de CaCl₂ (0,33 M) e 100 μL de uma solução de Na₂CO₃ (0,33M) contendo PSS (88 μM). A solução permanece sobre agitação vigorosa durante 30s e, de seguida, deixa-se em repouso durante 15 min. Posteriormente procede-se a 3 ciclos de lavagem/centrifugação (3000 rpm, 5 minutos) e os núcleos de CaCO₃ são em seguida dispersos numa solução aquosa de PSS (1 mL, C_{PSS}=3 mg/mL, 0,5M NaCl, pH=6,5), deixando-se a adsorver durante 15 minutos sob forte agitação. Procede-se novamente a 3 ciclos de lavagem/centrifugação com o intuito de remover o excesso de polieletrólito existente. Posto isto, os núcleos foram dispersos numa solução de PAH (1 mL, C_{PAH}=3 mg/mL, 0,5M NaCl, pH=6,5), repetindo-se o procedimento descrito em cima para a adsorção da camada de PSS, com exceção do tempo de adsorção que em vez de ser de 15 minutos durou cerca de 1 hora.

Para a preparação de microcápsulas de polieletrólito tendo como base micropartículas comerciais de PS, retiraram-se 50 μL (8,09x10⁹ partículas) da solução aquosa e adicionou-se 5 mL do polieletrólito positivo PAH (C_{PAH}=3 mg/mL, 0,5M NaCl, pH=6,5). Estes núcleos foram mantidos sob agitação constante à temperatura ambiente e ao fim de 15 minutos a mistura foi centrifugada (6000 rpm, 10 minutos ou 20 minutos, caso não se tenha verificado a deposição dos núcleos revestidos). Este procedimento experimental foi repetido para adsorção do polieletrólito de carga negativa, adicionando-se 10 mL de PSS (C_{PSS}=3 mg/mL, 0,5M NaCl, pH=6,5). Para a construção do escudo de polieletrólitos por metodologias de Layer-by-layer, foram feitas adsorções sucessivas de polieletrólito positivo e negativo, de acordo com o procedimento descrito anteriormente. O número e a disposição das camadas de polieletrólito adsorvido variou de acordo com a arquitetura do sistema (Figura 11).

3.2.2. Incorporação da TMPyP nas microcápsulas

No caso das microcápsulas de CaCO_3 , a porfirina TMPyP é introduzida no núcleo através de um processo de co-precipitação, que ocorre ao mesmo tempo que se formam os núcleos de CaCO_3 . Adiciona-se 50 μL de uma solução de porfirina TMPyP ($C=2,3 \times 10^{-5}$ M) aquando da adição das soluções de CaCl_2 e Na_2CO_3 descritas na secção anterior.

Relativamente às microcápsulas constituídas pelo núcleo de poliestireno, uma vez preparado o escudo de polieletrólito, procedeu-se à adsorção da porfirina tetracatiónica TMPyP ($C=4,6 \times 10^{-6}$ M) à camada de polieletrólito negativo PSS. Para tal, adicionou-se uma solução de adsorção preparada para um volume total de 500 μL (100 μL de porfirina TMPyP ($C=2,3 \times 10^{-5}$ M) + 400 μL H_2O) e adicionada diretamente às microcápsulas, deixando-se a adsorver durante 1h. Após esse período, procedeu-se a duas etapas de centrifugação/lavagem com água destilada (2 mL, 6000 rpm, 10 minutos) de modo a remover parte da porfirina que não foi adsorvida. Os sobrenadantes bem como as águas de lavagem foram recolhidas de forma a proceder ao cálculo da fração de porfirina adsorvida.

3.2.3. Incorporação dos nanobastonetes de ouro (AuNR) nas microcápsulas

Os nanobastonetes de ouro (AuNR) foram incorporados nas microcápsulas de forma idêntica às camadas de polieletrólitos, ou seja, através de uma reação de adsorção. Estas nanopartículas encontram-se dispersas numa solução de CTAB que atua como agente estabilizador e confere uma carga positiva à nanopartícula de ouro. Neste sentido, para que se verifique o processo de adsorção dos nanobastonetes de ouro à última camada de polieletrólitos da microcápsulas, cuja carga é positiva, revestiram-se os AuNR com uma camada de um polieletrólito negativo (PSS). Optou-se por utilizar o PSS no revestimento dos AuNR por ser o polieletrólito usado na construção das microcápsulas.

Primeiramente, retirou-se 1 mL de AuNR ($\text{OD}=1$) da solução mãe que foi centrifugada (6000 rpm, 15 minutos). De seguida, o *pellet* foi disperso numa solução aquosa de PSS (1 mL, 1,7 mg/mL, 1 mM NaCl) e submetido a agitação intensa durante 1h. Posto isto, seguiram-se 3 etapas de centrifugação/lavagem com água destilada (5000 rpm, 10 minutos) com o intuito de se obter os nanobastonetes funcionalizados.

Para adsorção dos AuNR funcionalizados às microcápsulas de poliestireno previamente revestidas com uma camada de PAH, centrifugou-se cerca de 2,5 mL de cápsulas ($4,045 \times 10^9$ partículas), que foram ressuspendidas no volume residual após recolha do sobrenadante. Esse volume residual foi adicionado a 250 μL ($2,5 \times 10^{10}$ partículas) dos AuNR funcionalizados, deixando-se sob agitação intensa e à temperatura ambiente cerca de 1h. A recuperação das cápsulas com AuNR foi feita depois submetido o sistema a um ciclo de centrifugação/lavagem com água destilada (6000 rpm, 10 minutos).

3.2.4. Crescimento de células HeLa para uso em ensaios de citotoxicidade

As células HeLa foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% FBS (*fetal bovine serum*) e uma mistura de antibióticos e antimicóticos, a 37°C e numa atmosfera contendo 5% de CO_2 . Para preparar o ensaio de citotoxicidade, a cultura de células foi lavada 1 vez com uma solução de PBS (*phosphate buffer saline*), tendo-se posteriormente adicionado tripsina e colocado a

placa numa incubadora a 37°C durante 2-3 minutos de forma a destacar as células do fundo da placa. Adicionou-se 5 mL de meio de cultura para interromper essa reação e transferiram-se as células para um *falcon*. Centrifugou-se a suspensão celular durante 3 minutos a 1000 rpm, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 8 mL de meio DMEM completo. Desta suspensão adicionou-se a cada poço de uma placa de 96 poços o volume correspondente a $1,5 \times 10^4$ células, ajustando-se o volume final para 170 μ L com DMEM completo. As placas ficaram a incubar 24 horas a 37°C e 5% CO₂, antes do início do ensaio.

3.3. Métodos

Os espectros de absorção UV-Vis foram adquiridos num espectrofotómetro de UV/VIS Lambda 35 da PerkinElmer e a emissão de fluorescência quantificada num espectralfluorímetro Fluorolog FL-1040 Horiba Jobin Yvon com lâmpada de xénon de 450 W.

O pH das soluções de polieletrólitos foi medido num sensor de pH Denver Instrumental Model 15 e o elétrodo de pH Mettler Toledo AG 30281915 Rev A, a 25°C.

As medições do potencial zeta foram feitas com recurso ao equipamento Zetasizer Nano ZS da Malvern Instruments Ltd.

As imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) foram obtidas pelo microscópio de varrimento Hitachi S2400 com resolução de 25kV.

As imagens de microscopia confocal de fluorescência, os decaimentos observados e os respetivos tempos de vida foram obtidos com recurso ao microscópio confocal de fluorescência resolvida no tempo MicroTime 200 da PicoQuant GmbH e analisados no software SymPhoTime versão 5.3.2.2. Para análise dos sistemas em estudo, utilizou-se um laser de díodo pulsado a 635 nm e com uma taxa de repetição de 20 MHz. A amostra foi colocada perpendicularmente ao percurso da luz de excitação e a fluorescência recolhida e enviada através de um espelho dicróico, um filtro de emissão e um *pinhole* (50 μ m). O filtro passa-banda utilizado foi o 695 AF55, centrado em 695 nm e com uma janela de transmissão de 55 nm. A fluorescência dos sistemas foi medida por dois detetores SPAD (SPAD 1 e 2) da Perkin-Elmer com contagem de fóton único e o sinal processado pelo TimeHarp 200 TC-SPC PCboard da PicoQuant no modo de operação time-tagged time resolved (TTTR). O microscópio invertido Olympus IX 71 acoplado com uma objetiva de imersão 60 x Olympus UPlanSApo permitiu obtenção de imagens de fluorescência.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados numa câmara de biossegurança de nível 2.

A absorvância a comprimentos de onda definidos foi medida com o aparelho Tecan Infinite 200 Pro.

4 Resultados e Discussão

O principal objetivo desta dissertação é a construção de um sistema fotoativo dual com potencialidades de aplicação em terapia fotodinâmica/ fotodiagnóstico de células tumorais. Com base neste objetivo, procedeu-se à conjugação de um fotossensibilizador tetrapirrólico com baixo rendimento quântico de fluorescência (porfirina) com nanoantenas óticas (nanobastonetes de ouro) num único sistema de entrega (microcápsulas de polieletrólito). Estas microcápsulas são constituídas por um núcleo (micropartículas de poliestireno) revestidos por camadas de polieletrólito às quais são adsorvidas as duas entidades. Foram consideradas diferentes arquiteturas (híbridos I a IV) que diferem entre si na posição relativa da porfirina (híbridos I a III) ou no tamanho da nanopartícula de ouro (híbrido IV). Posteriormente realizaram-se ensaios biológicos com o intuito de avaliar a citotoxicidade destes híbridos.

De acordo com a literatura, a intensificação da fluorescência do fotossensibilizador por parte da nanopartícula metálica está associada à existência de *hotspots*, isto é, zonas em que existe um campo elétrico muito intenso e onde as taxas de excitação são aumentadas devido à maior absorção de luz por parte da molécula. Porém, caso a distância entre o fluoróforo e a nanopartícula metálica seja muito curta, verifica-se a ocorrência do fenómeno inverso, isto é, uma supressão da fluorescência devido à transferência de energia não radiativa para o plasmão de superfície da nanopartícula [40]. Posto isto, convém evitar distâncias muito curtas entre o fluoróforo e a nanopartícula, e para o efeito definiu-se uma distância entre os 2 e os 3 nm correspondente à adsorção de uma bicamada de polieletrólitos (PAH/PSS), que foi mantida constante ao longo do vários sistemas [23].

Para além disso, na observação de fenómenos de intensificação exige-se a sobreposição dos espetros de absorção e emissão do fluoróforo com o plasmão de ressonância da nanopartícula metálica[40]. Essa intensificação atinge o valor máximo quando o $\lambda_{\text{máx}}$ do plasmão se encontra ligeiramente desviado para menores comprimentos de onda face ao $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão do fluoróforo [42]. Neste sentido, e como já foi mencionado anteriormente na secção 1.3.1., a porfirina TMPyP foi escolhida para ser implementada neste sistema, uma vez que preenche os requisitos mencionados no parágrafo anterior em que se espera que ocorram fenómenos de intensificação. O seu espetro de absorção em água apresenta várias bandas na zona do visível: a banda Soret a 424 nm e quatro bandas Q situadas entre os 500-700 nm. O espetro de emissão apresenta uma banda mal resolvida entre os 600 e 800 nm [16]. Relativamente aos nanobastonetes de ouro de 25 nm de diâmetro, os mesmos apresentam duas bandas no espetro de absorção a $\lambda=516$ e $\lambda=659$ nm, correspondentes ao plasmão transversal e longitudinal, respetivamente.

Na Figura 11-(A) estão representadas as estruturas das microcápsulas dopadas com porfirina, que serviram de base para o estudo da produção de oxigénio singuleto por parte da TMPyP, tendo-se preparado também os respetivos controlos. As estruturas dos sistemas híbridos que conjugam as microcápsulas de polieletrólitos juntamente com a porfirina e os nanobastonetes de ouro estão esquematizados na Figura 11-(B) e diferem entre si no número de camadas de polieletrólitos adsorvidas e na posição relativa da porfirina e nanobastonetes de ouro sendo que, prepararam-se ainda sistemas de controlo contendo apenas um dos componentes individualmente.

Para mais fácil compreensão e leitura do documento, adotou-se a nomenclatura que vem expressa nas tabelas de 1 a 4 em que se explicita a constituição de cada um dos sistemas estudados.

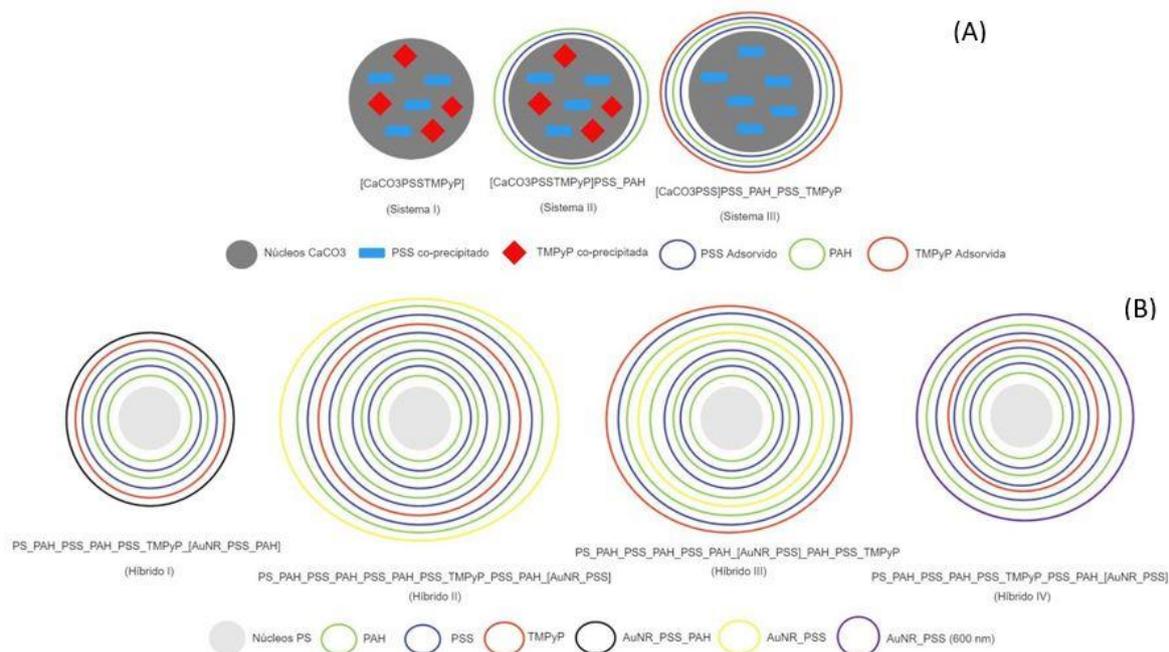


Figura 11 - Representação Esquemática das Arquiteturas dos Sistemas Estudados constituídos por núcleos de CaCO_3 (A) ou de PS (B).

Tabela 1 - Descrição da Arquitetura dos Sistema Estudados com núcleos de CaCO_3 (A).

Estrutura Base: [Core]_(PSS_PAH) _m X
Sistema I: Core = $\text{CaCO}_3\text{PSSTMPyP}$; m=0; X=0
Sistema II: Core = $\text{CaCO}_3\text{PSSTMPyP}$; m=1; X=0
Sistema III: Core = CaCO_3PSS ; m=1; X=PSS_TMPyP

Tabela 2 - Descrição da Arquitetura dos Sistemas de Controlo Estudados com núcleos de CaCO_3 (A).

Estrutura Base: [Core]_(PSS_PAH) _m
Controlo I: Core = CaCO_3PSS ; m=0
Controlo II: Core = CaCO_3PSS ; m=1

Tabela 3 - Descrição da Arquitetura dos Sistemas Híbridos Estudados com núcleos de PS (B).

Estrutura Base: [Core]_(PAH_PSS) _m X_(PAH_PSS) _n (PSS_PAH) _r Y
Híbrido I: Core = PS; m=2; X=TMPyP; n=0; r=0; Y=[AuNR_PSS_PAH], LSPR(AuNR)=650 nm
Híbrido II: Core = PS; m=3; X=TMPyP; n=0; r=1; Y=[AuNR_PSS], LSPR(AuNR)=650 nm
Híbrido III: Core = PS; m=2; X=PAH_[AuNR_PSS]; n=1; r=0; Y=TMPyP
Híbrido IV: Core = PS; m=2; X=TMPyP; n=0; r=1; Y=[AuNR_PSS], LSPR(AuNR)=600 nm

Tabela 4 - Descrição da Arquitetura dos Sistemas de Controlo Estudados com núcleos de PS (B).

Estrutura Base: [Core]_(PAH_PSS) _m _X_(PAH_PSS) _n _(PSS_PAH) _r
Controlo III: Core = PS; m=2; X=TMPyP; n=0; r=1
Controlo IV: Core = PS; m=2; X=PAH_[AuNR_PSS], n=0; r=0 LSPR(AuNR)=650 nm
Controlo V: Core = PS; m=2; X=PAH_[AuNR_PSS]; n=1; r=0, LSPR(AuNR)=650 nm

A avaliação da eficácia de funcionamento dos híbridos estudados ao longo desta dissertação exige um estudo aprofundado da eficiência de adsorção de cada um dos componentes, bem como das propriedades óticas dos constituintes individualmente e em conjunto num sistema. Assim sendo, a otimização das condições experimentais para conceção destes sistemas foi uma parte bastante importante e morosa deste trabalho, sendo a mesma discutida mais adiante neste documento (secções 4.1 e 4.2) onde se procede à caracterização fotofísica, espectroscópica, morfológica e biológica dos sistemas. De forma a relacionar as arquiteturas dos sistemas, com especial ênfase na posição da porfirina na estrutura da microcápsula, com o possível efeito fotodinâmico, procedeu-se também ao estudo da produção de oxigénio singuleto dos sistemas explicitados nas tabelas 1 e 2.

4.1. Preparação de Microcápsulas de Polieletrólitos com núcleos de carbonato de cálcio (CaCO₃) e revestimento com Polieletrólitos (PSS e PAH)

Numa fase inicial desta dissertação, tentou-se otimizar as condições experimentais de preparação das microcápsulas não funcionalizadas ([CaCO₃PSS](PSS_PAH)_n), em que n representa o número de bicamadas de polieletrólito presentes no escudo de polieletrólitos. Idealmente, estas microcápsulas deverão ser uniformes em tamanho e forma, estáveis e biocompatíveis [24].

O procedimento usado na preparação das partículas de CaCO₃ foi o descrito num trabalho de dissertação anterior, otimizado por este grupo de trabalho, e envolve a reação de precipitação de iões cálcio (Ca²⁺) e carbonato (CO₃²⁻), presentes em soluções de cloreto de cálcio e carbonato de sódio, respetivamente, e na presença de um polieletrólito forte (PSS). O desenrolar desta reação ocorre sob forte agitação, a velocidade constante, com o objetivo de promover a formação da estrutura polimórfica da vaterite, que incorpora vários tipos de substâncias na sua matriz e as liberta mediante alterações do meio [23]. De notar ainda que a preparação destes mesmas microcápsulas foi feita na presença de um polieletrólito (PSS) que, segundo a literatura, promove uma maior estabilidade e tem um papel fundamental no controlo do tamanho e forma das cápsulas por complexação dos seus grupos sulfonatos com os iões cálcio em solução [42]. Na ausência de PSS, ao fim de 24h, se os núcleos de vaterite não forem revestidos por polieletrólitos evoluem para a sua forma mais estável (calcite), tornando a amostra mais polidispersa.

Após a preparação dos núcleos de CaCO₃ procedeu-se ao revestimento das micropartículas por adsorção de camadas consecutivas de polieletrólitos de carga oposta (PSS e PAH). A adsorção de

cada uma das camadas de polieletrólito é feita tendo por base as interações eletrostáticas que se estabelecem entre os polieletrólitos e, como tal, fatores como a concentração de polieletrólitos, temperatura, pH de adsorção e força iônica influenciam sobremaneira a eficiência da adsorção.

Em primeiro lugar, preparou-se uma solução de PSS (MM = 75000 g/mol, 3 mg/mL, 0,5 M NaCl a pH=6,5) e uma solução de PAH (MM = 17500 g/mol, 13 mg/mL, 0,5M NaCl a pH=6,5). Nestas condições experimentais, a adsorção das camadas de polieletrólitos foi eficiente visto que, após a primeira adsorção do polieletrólito de carga negativa (PSS), o valor lido para o potencial zeta era cerca de -40 mV, enquanto que no fim da adsorção do polieletrólito de carga positiva (PAH), observou-se a reversão do potencial zeta do sistema para o valor superior de +38 mV. Estes valores estão de acordo com os resultados existentes na literatura em que o valor de potencial zeta após adsorção de uma camada de PSS e PAH é cerca de -42 mV e +50 mV, respetivamente [43]. Na observação microscópica das microcápsulas já revestidas observa-se que estas permanecem monodispersas e homogêneas.

Ao contrário do esperado, para o mesmo valor de intensidade, as microcápsulas revestidas com o PAH de baixo peso molecular (Figura 12-B) apresentam um sinal de fluorescência significativo, provavelmente devido à presença de uma impureza fluorescente no polieletrólito PAH adsorvido. Posto isto, numa tentativa de eliminar este problema, substituiu-se o frasco de PAH. Em preparações posteriores foi usado um novo PAH, com peso molecular superior (MM = 50000 g/mol) e livre desta contaminação.

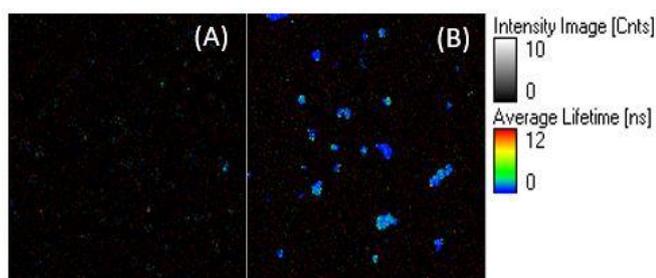


Figura 12 - Imagem de FLIM (80x80 μm) que compara a fluorescência dos núcleos de CaCO_3 (A) com os núcleos revestidos por uma bicamada de polieletrólitos (PSS_PAH) (B) ($\lambda_{\text{exc}} = 635 \text{ nm}$, $I = 1000 \text{ u.a.}$).

De seguida, procedeu-se à preparação de novas cápsulas em que a concentração da solução de PAH utilizada é inferior à descrita em cima e igual à da solução de PSS (3 mg/mL).

A figura 13 mostra algumas imagens obtidas por FLIM das micropartículas de CaCO_3 obtidas segundo o procedimento descrito. Nesta imagem é possível distinguir estruturas micrométricas, esféricas e não emissivas nas condições experimentais usadas posteriormente para a caracterização dos sistemas.

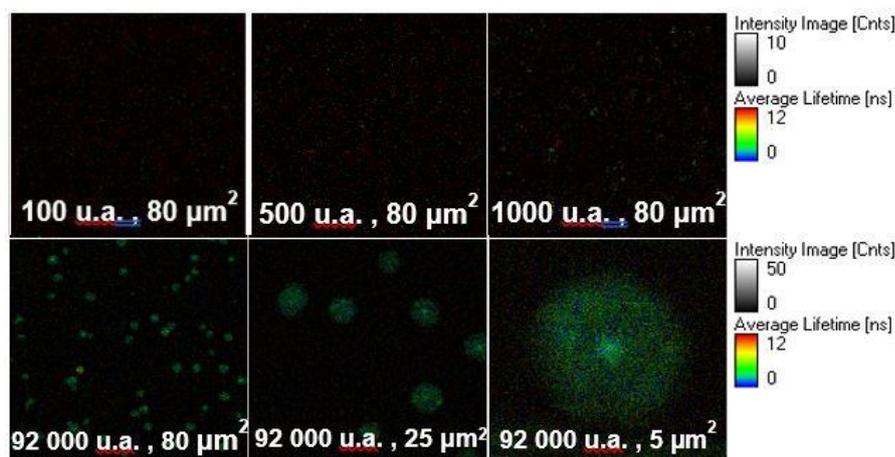


Figura 13 - Imagens de FLIM para várias intensidades do laser e ampliações de núcleos de CaCO_3 ($\lambda_{\text{exc}} = 635 \text{ nm}$, $I = 100\text{-}92000 \text{ u.a.}$).

Após adsorção da primeira camada de polieletrólito PSS seguida de centrifugação e respetivas lavagens, é possível observar a formação de um *pellet* branco de fácil separação do sobrenadante. As imagens de FLIM obtidas nesta fase do processo mostram a formação de cápsulas homogêneas e bem individualizadas, como esperado (Figura 14).

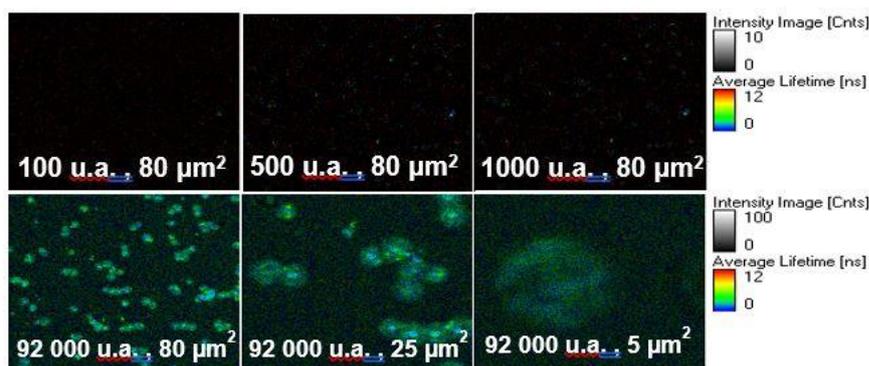


Figura 14 - Imagens de FLIM para o sistema de $\text{CaCO}_3\text{-PSS}$ ($I = 100\text{-}92\ 000 \text{ u.a.}$), salientando-se o baixo grau de agregação do sistema. Nota: Estes sistemas não são fluorescentes a $I = 1000 \text{ u.a.}$ (intensidade usada para a análise dos sistemas híbridos - secção 4.4)

No entanto, a adsorção da primeira camada de PAH ($MM = 50000 \text{ g/mol}$), nas mesmas condições experimentais que as descritas para o PAH ($MM = 17500 \text{ g/mol}$), provoca um elevado grau de agregação das microcápsulas (Figura 15) que impossibilita a continuação da construção vertical do sistema polimérico. As tentativas de desagregação por recurso a vórtex e ultrassons mostraram-se insuficientes.

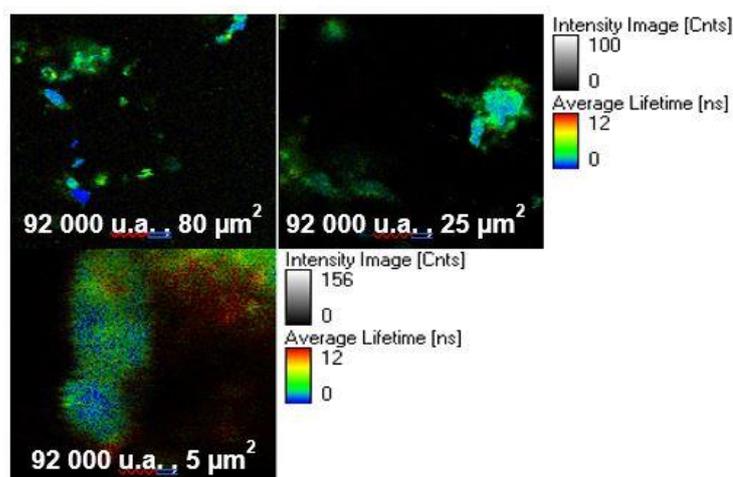


Figura 15 - Imagens de FLIM obtidas para o sistema de CaCO_3 _PSS_PAH ($I = 92\,000$ u.a.), salientando o elevado grau de agregação do sistema. Nota: Estes sistemas não são fluorescentes a $I = 1000$ u.a. (intensidade usada para a análise dos sistemas híbridos - secção 4.4)

A força iónica é um fator primordial no processo de layer-by-layer, pois intervém nas interações eletrostáticas existentes. No caso da força iónica ser demasiado baixa, as cadeias de polieletrólitos tornam-se menos flexíveis e, por isso, a cobertura da superfície das microcápsulas é menos eficiente. Valores elevados de força iónica poderão levar ao cancelamento de fenómenos de repulsão por efeito de blindagem, contribuindo para um maior grau de agregação [44]. Neste sentido, tentou-se otimizar a obtenção de um sistema homogéneo e monodisperso, efetuando-se uma série de alterações ao procedimento experimental, de onde se destacam as lavagens com soluções de NaCl 1 mM e 0,05 M em vez de água destilada, no entanto, não se observou a melhoria pretendida.

Posteriormente, realizou-se a mesma experiência utilizando uma solução de adsorção de PAH com o valor de pH igual ao da solução de adsorção de PSS (pH=6,5), que resultou num menor grau de agregação devido à maior estabilidade dos núcleos de carbonato de cálcio. Para valores de pH mais baixos, verifica-se a destruição gradual dos núcleos de CaCO_3 e libertação de CO_2 ($\text{CaCO}_3 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{Ca}^{2+} + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$). No entanto, também neste caso o rendimento final foi baixo.

Com o objectivo de aumentar a quantidade de cápsulas disponíveis no fim do processo, fez-se em seguida um *scale-up* do sistema aumentando 5 vezes a quantidade de cada um dos reagentes envolvidos. Porém, logo após a adição de PAH a solução adquire um aspeto floculado, indicativo de agregação.

Apesar do baixo rendimento obtido, o procedimento anteriormente descrito (pequena escala e PAH (MM = 50000 g/mol) a pH 6,5) foi usado para a preparação de cápsulas dopadas com porfirina. Considerando a potencial aplicação em terapia fotodinâmica ou em fotodiagnóstico, nesta fase inicial do trabalho era importante perceber de que forma o encapsulamento da porfirina ou a sua localização na estrutura da microcápsula influenciam o seu possível efeito citotóxico. Assim, prepararam-se microcápsulas de duas formas diferentes: com porfirina co-precipitada no núcleo (Figura 11(A)-Sistemas I e II) e adsorvida à última camada de polieletrólito PSS (Figura 11(A)-Sistema III) - Secção

4.1.1. Na secção 4.1.2 avaliou-se espectroscopicamente a eficiência das microcápsulas na produção de oxigénio singuleto.

4.1.1. Preparação Experimental dos vários sistemas envolvidos no estudo da produção do oxigénio singuleto (Sistemas I, II e III)

Para preparação dos núcleos de CaCO_3 prepararam-se duas soluções de CaCl_2 (0,33 M) e de Na_2CO_3 (0,33 M), esta última contendo PSS (4 g/L). Adicionou-se igual volume destas soluções e, no caso dos sistemas que contêm porfirina (0,3 mM) no núcleo, a mesma foi incorporada através de uma reação de co-precipitação em que o volume de TMPyP adicionado foi metade do das soluções referidas em cima. A mistura foi agitada vigorosamente durante 30 segundos e, de seguida, deixada em repouso durante 15 minutos. Posteriormente, os núcleos de carbonato de cálcio foram purificados através de 3 ciclos de centrifugação/lavagem com H_2O destilada (3000 rpm, 5 minutos).

A uma parte destes núcleos de CaCO_3 , adsorveram-se duas camadas de polieletrólitos. Primeiramente, as microcápsulas foram dispersas em 1 mL de uma solução de PSS ($C_{\text{PSS}}=3$ mg/mL, 0,5M NaCl, pH=6,5), deixando-se a adsorver durante 15 minutos de agitação. O excesso de PSS foi removido em três ciclos de lavagem/centrifugação (3000 rpm, 5 minutos) com H_2O destilada, entre os quais as microcápsulas foram sujeitas a agitação vórtex e ultrassons. Finda a adsorção da primeira camada de polieletrólito, as cápsulas foram dispersas em 1 mL de uma solução de PAH ($C_{\text{PAH}}=3$ mg/mL, 0,5M NaCl, pH=6,5). Depois de 1 hora de agitação, procedeu-se aos processos de lavagem/centrifugação habituais, recorrendo-se a uma solução aquosa de NaCl (0,05 M). Após a lavagem com a solução do sal, esperou-se 4 min de modo a deixar assentar algumas microcápsulas que ainda pudessem estar em suspensão. De forma a reverter completamente o valor da carga da última camada, medido por potencial zeta, procedeu-se a uma segunda adsorção de PAH, de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

Nos sistemas com a porfirina na parte mais superficial da microcápsula, as microcápsulas constituídas pelo núcleo de carbonato de cálcio e revestidas com a camada de polieletrólitos, voltaram a ser dispersas numa solução aquosa de PSS idêntica à referida no parágrafo anterior, seguindo-se o habitual processo de lavagem/centrifugação já descrito em cima. Posto isto, promoveu-se a adsorção da porfirina à última camada de PSS. Após 45 minutos de forte agitação, efetuaram-se 3 ciclos de lavagem/centrifugação com o intuito de retirar parte da porfirina que não foi adsorvida.

4.1.2. Estudo da Produção de Oxigénio Singuleto pela TMPyP por via Indireta

A avaliação do desempenho da TMPyP como agente fotossensibilizador tem por base a capacidade desta molécula em gerar oxigénio singuleto, uma espécie bastante reativa e citotóxica.

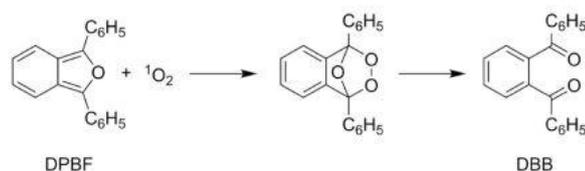


Figura 16 - Reação de Cicloadição sofrida pelo DPBF na presença do oxigênio Singuleto ($^1\text{O}_2$) [45].

A produção de $^1\text{O}_2$ pelos sistemas microcápsula-porfirina foi avaliada qualitativamente através da monitorização da fotodecomposição do 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF). O DPBF apresenta um máximo de absorção para $\lambda=416$ nm e na presença de $^1\text{O}_2$ sofre facilmente reações de cicloadição dando origem a endoperóxidos instáveis que se decompõem de forma irreversível em compostos do tipo 1,2-dibenzoilbenzeno (Figura 16) [45].

O solvente escolhido para o desenrolar da reação foi a dimetilformamida (DMF) visto que quer o DPBF, quer a porfirina são solúveis neste solvente. Para além disso, a dimetilformamida não altera as características morfológicas e estruturais das microcápsulas. A concentração de DPBF utilizada ao longo de todas as experiências foi $25 \mu\text{M}$ e a sua degradação foi monitorizada com recurso às técnicas de espectroscopia de absorção UV-Vis, medida ao comprimento de onda máximo de absorção.

A formação de oxigênio singuleto por parte da porfirina é promovida através da irradiação da mesma com recurso a uma lâmpada de luz branca que incide sobre a amostra, agitada a uma velocidade constante e na presença de oxigênio (célula aberta), e cuja montagem experimental é mostrada na Figura 17:

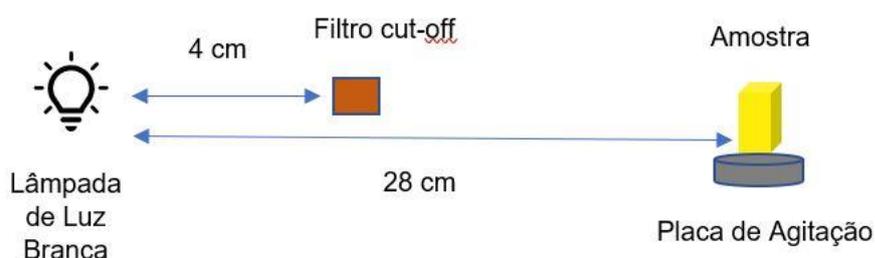


Figura 17 - Esquema da Montagem Experimental usada nas experiências associadas ao estudo da produção do oxigênio singuleto ($^1\text{O}_2$).

As distâncias entre o início da lâmpada e o filtro e o início da lâmpada e o centro da célula de quartzo permaneceram inalteradas de modo que a potência de irradiação fosse constante ($\approx 6,50 \text{ mW/cm}^2$). A irradiação da amostra foi acompanhada ao longo do tempo, em intervalos de 1 e/ou 5 min, entre 15 e/ou 40 min. A colocação de um filtro cut-off na montagem experimental prende-se com a fotossensibilidade do DPBF que se degrada caso seja exposto a radiação com comprimentos de onda correspondentes à zona do azul. Neste sentido, somente a radiação cujo comprimento de onda seja superior a 550 nm atinge a amostra, garantindo-se assim que a degradação do DPBF se deve apenas à reação com o oxigênio singuleto gerado pelo fotossensibilizador (TMPyP).

4.1.2.1. Estudo dos Sistemas de Controlo I e II

O estudo da produção de oxigénio singuleto foi iniciado pela avaliação dos sistemas de controlo (Núcleos de CaCO_3 -Controlo I e núcleos de CaCO_3 revestidos por uma bicamada de polieletrólitos PSS_PAH-Controlo II), assim como pela avaliação da decomposição do DPBF na ausência de fotossensibilizador (Figura 18). Tal como reportado na literatura [46], a estabilidade do DPBF nas condições experimentais usadas e na ausência de um agente gerador de oxigénio singuleto é bastante elevada (apenas 2% de degradação que podem ser atribuídos a alguma fotodegradação).

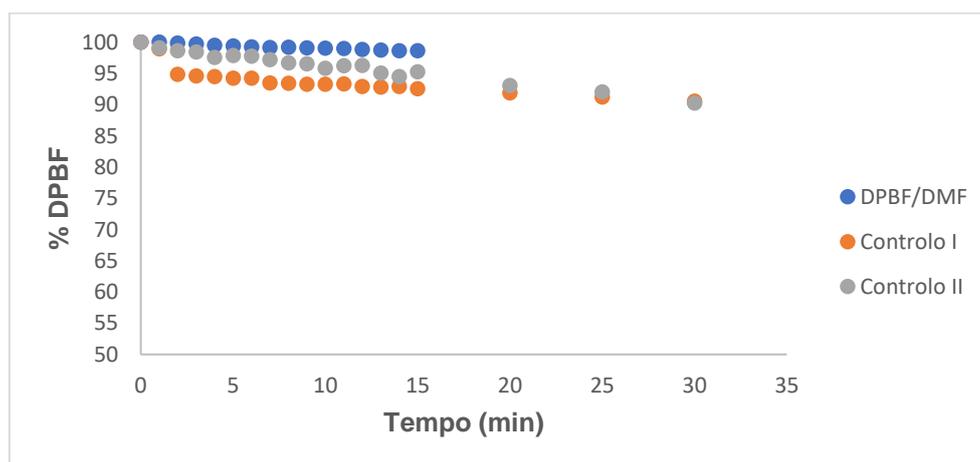


Figura 18 - Oxidação do DPBF em função do tempo de irradiação para os sistemas de Controlo I e II.

No caso dos Controlos I e II, a diminuição da absorvância a 416 nm é ligeiramente superior ao caso anterior (10%). Uma vez que estes sistemas não contêm porfirina, o aumento da degradação do DPBF, ainda que pouco expressivo, não era esperado. Dada a natureza porosa do núcleo e da bicamada de polieletrólito, a adsorção de uma pequena fração de DPBF à sua superfície poderá estar na origem da diminuição da absorvância observada.

4.1.2.2. Estudo dos Sistemas I, II e III

Após o estudo dos sistemas de controlo, efetua-se a mesma experiência nos sistemas contendo porfirina (Sistemas I a III), com concentração em microcápsulas igual a 2,87 μM . O encapsulamento de porfirina foi efetuado de acordo com os procedimentos descritos anteriormente, usando soluções de adsorção com uma concentração em TMPyP de 0,3 mM. A concentração da porfirina encapsulada (calculada pela diferença entre a absorção medida no máximo da banda Soret dos sobrenadantes antes e após adsorção) variou com a arquitetura dos sistemas: Sistema I (3 μM) > Sistema III (1,2 μM) > Sistema II (0,08 μM).

Na Figura 19 são apresentados os resultados obtidos neste estudo. A cor e o tipo de marcador identificam a experiência: para a mesma cor, o marcador delineado designa a % de degradação do DPBF na presença do sistema (I a III) e o marcador preenchido representa a mesma grandeza medida na presença de soluções de TMPyP de concentração igual à encapsulada nos respetivos sistemas.

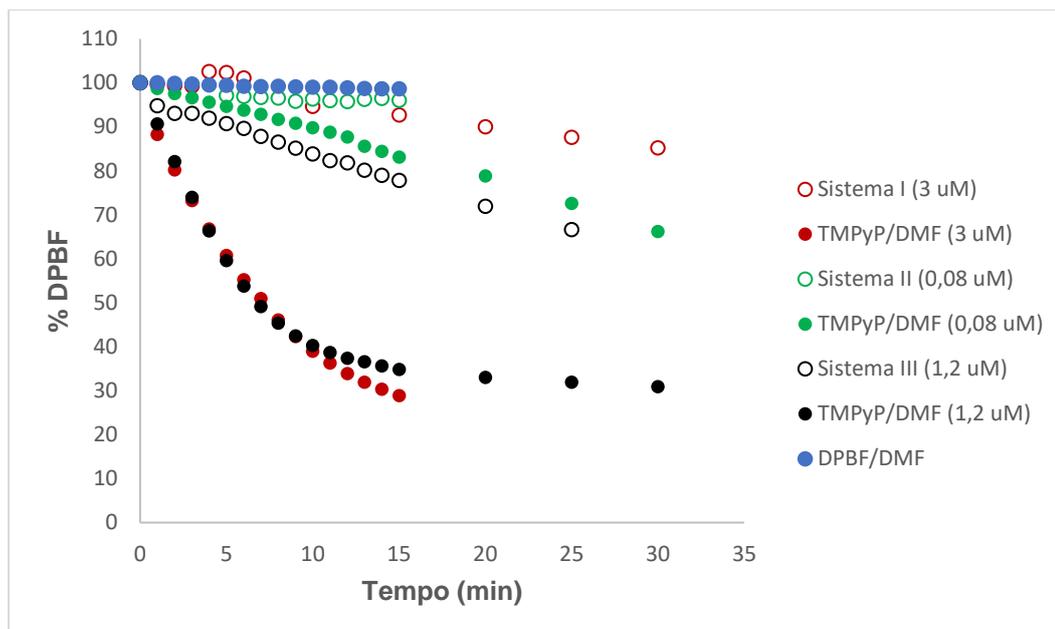


Figura 19 - Oxidação do DPBF em função do tempo de irradiação para os Sistema I, II e III e TMPyP em DMF.

No sistema constituído pela TMPyP co-precipitada no núcleo não escudado por camadas de polieletrólito (Sistema I – vermelho no gráfico), chega-se à conclusão de que ao fim de 30 minutos de irradiação 13% do DPBF inicial sofreu oxidação. Por sua vez, para a solução de TMPyP de igual concentração (3 μM), 70% do DPBF inicial já tinha sido degradado após apenas 15 minutos de irradiação.

Para o sistema em que a TMPyP está localizada na camada superficial da microcápsula (Sistema III – preto no gráfico), a quantidade de DPBF degradada ao fim de 30 minutos de irradiação (34%) é superior relativamente ao Sistema I em que a porfirina está co-precipitada no núcleo (13%). Esta diferença observada não deverá ser relacionada com a concentração de porfirina adsorvida, uma vez que esta é superior para o Sistema I (3 μM vs. 1.2 μM). Tendo em consideração as diferenças na arquitetura dos dois sistemas é possível que esteja a ocorrer alguma lixiviação da porfirina e que esta seja favorecida pela sua localização à superfície (Sistema III). Por último, o sistema II é o sistema menos eficiente na produção de oxigénio singuleto. De acordo com Skovsen *et al.*, tendo por base o valor do coeficiente de difusão do O_2 em água ($D = 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$), para um tempo médio de vida de 6 μs , o oxigénio singuleto é capaz de se difundir até uma distância de cerca de 268 nm [47], pelo que, a espessura da bicamada de polieletrólito (2-3 nm) [39] não deverá ser impeditiva da sua difusão. No entanto, é também de salientar que este é o sistema com menor concentração de porfirina (0,08 μM).

Em jeito de conclusão, pode-se inferir que a localização da porfirina na estrutura da microcápsula tem um efeito expressivo na sua capacidade de gerar oxigénio singuleto e poderá ser determinante para a sua aplicação. O sistema mais eficiente foi o sistema em que a porfirina foi adsorvida na última camada de polieletrólito (Sistema III). Verificou-se ainda que todos os sistemas preparados (I a III) são geradores de oxigénio singuleto menos eficientes que a respetiva porfirina não encapsulada.

De modo a avaliar-se a fotoestabilidade da porfirina, traçaram-se os espectros de emissão da TMPyP em DMF juntamente com o DPBF para os comprimentos de onda de excitação de 600 nm e 440 nm. Para ambos os comprimentos de onda os espectros de emissão mostram uma resolução vibracional, sendo visíveis duas bandas vibracionais a aproximadamente 650 nm e 720 nm (Figura 20), que são resultado da capacidade de estabilização das cargas positivas da TMPyP por parte da DMF [47].

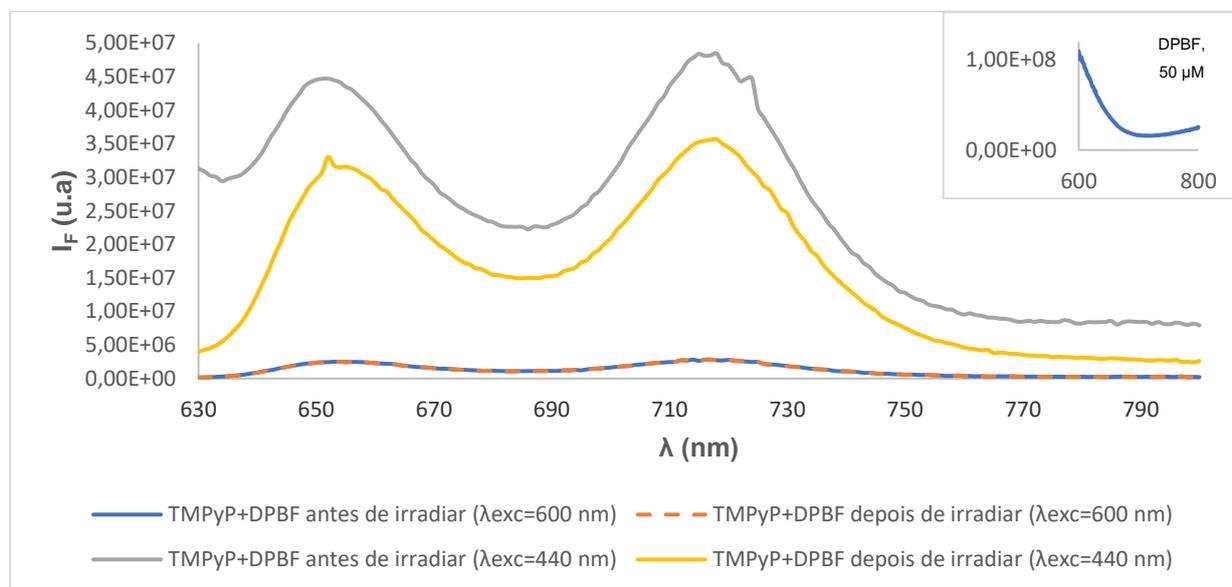


Figura 20 - Espectros de Emissão da TMPyP (3 μM) em DMF ($\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$).

O comprimento de onda de excitação de 600 nm é correspondente à zona das bandas Q da porfirina sendo que, os espectros de emissão da solução de TMPyP em DMF com DPBF associados a esse comprimento de onda, antes e depois da irradiação são sobreponíveis, o que comprova que a porfirina é fotoestável.

O máximo de absorção da porfirina corresponde ao comprimento de onda de 420 nm (banda Soret), no entanto, para efeitos de excitação da amostra, utilizou-se um comprimento de onda mais desviado para o vermelho ($\lambda = 440 \text{ nm}$), onde $A < 0,1$, evitando fenómenos de *self-quenching* e filtro interno. O espectro de absorção UV-VIS do DPBF em DMF apresenta uma banda de absorção em torno de $\lambda = 420 \text{ nm}$, próximo do λ_{exc} escolhido. Para além disso, para λ próximos de 630 nm verifica-se a emissão de fluorescência por parte do DPBF em DMF [46]. Face a estas evidências, a intensidade do sinal no espectro antes de irradiar é resultado da emissão de fluorescência por parte da porfirina e do DPBF. Depois da irradiação, obtém-se na mesma as duas bandas Q típicas do espectro de emissão da porfirina. A intensidade do sinal obtido é inferior porque o DPBF já foi degradado pelo oxigénio singuleto produzido pela TMPyP e, como tal, a intensidade da emissão registada está associada somente à porfirina, o que comprova a sua fotoestabilidade.

À semelhança do que foi feito para a solução de TMPyP livre, traçaram-se os espectros de emissão das microcápsulas em DMF juntamente com o DPBF, antes e depois da irradiação da amostra

(Figura 21). Em qualquer um dos espectros está evidenciada a resolução vibracional das duas bandas Q da porfirina que sugere a localização da TMPyP num ambiente menos polar [49][50].

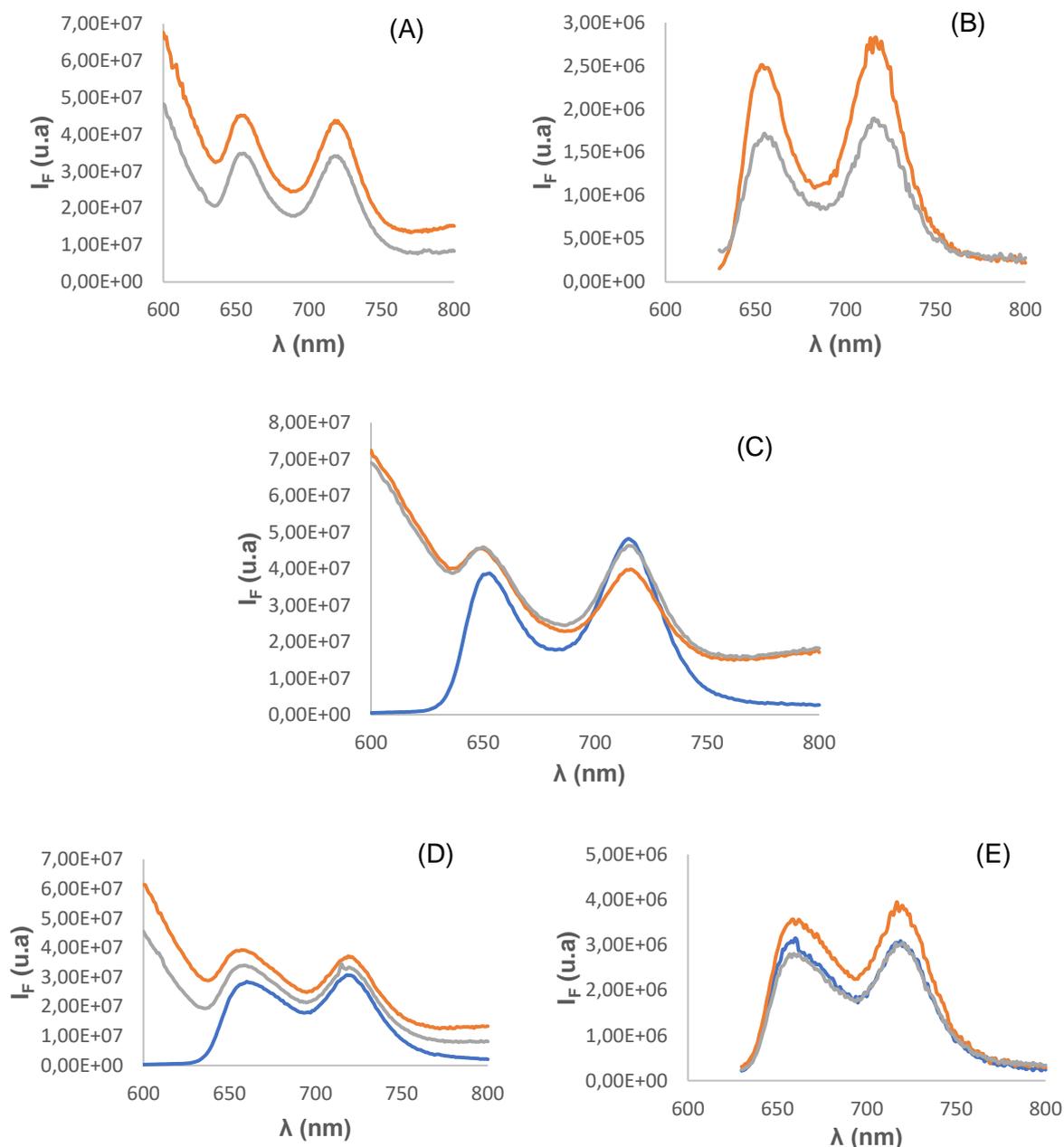


Figura 21 - Espectros de Emissão dos sistemas de microcápsulas (2,87 μM) em DMF. Sistemas II+DMF antes de irradiar para $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ (—). Sistemas III+DMF antes de irradiar para os dois λ_{exc} (—). Sistema I+DMF+DPBF ($C_{\text{TMPyP}} = 3 \mu\text{M}$), antes (—) e depois de irradiação (—) para $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ (A) e $\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$ (B). Sistema II+DMF+DPBF ($C_{\text{TMPyP}} = 0,08 \mu\text{M}$), antes (—) e depois de irradiação (—) para $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ (C). Sistema III+DMF+DPBF ($C_{\text{TMPyP}} = 1,2 \mu\text{M}$), antes (—) e depois de irradiação (—) para $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ (D) e $\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$ (E).

4.2. Preparação de Microcápsulas de Polieletrólitos com núcleos de Poliestireno e revestimento com Polieletrólitos (PAH e PSS)

De forma a contornar a instabilidade dos sistemas preparados anteriormente, optou-se por substituir os núcleos de CaCO_3 por núcleos comerciais de poliestireno, mais estáveis nas nossas condições experimentais.

Na primeira tentativa, retirou-se $2 \mu\text{L}$ de micropartículas ($3,23 \times 10^8$ partículas) diretamente do frasco e fez-se o volume até 1 mL. Depois da centrifugação e desperdício do sobrenadante adsorveram-se alternadamente camadas de PAH e PSS em torno da micropartícula. De salientar que o valor de potencial zeta obtido para os núcleos de poliestireno é de $-33,8 \text{ mV}$, pelo que se adsorveu em primeiro lugar o polieletrólito positivo PAH. Contudo, com o intuito de obter uma maior quantidade de amostra de modo a compensar as muitas perdas de microcápsulas que ocorrem durante os processos de centrifugação/lavagem, optou-se por aumentar a escala do sistema retirando-se $50 \mu\text{L}$ do frasco ($8,09 \times 10^9$ partículas), aos quais se adicionou diretamente 5 mL da solução de PAH referida anteriormente.

O volume de solução de PSS utilizado foi o dobro do da solução de PAH e as cápsulas foram ressuspendidas em 5 mL de H_2O após lavagem/centrifugação.

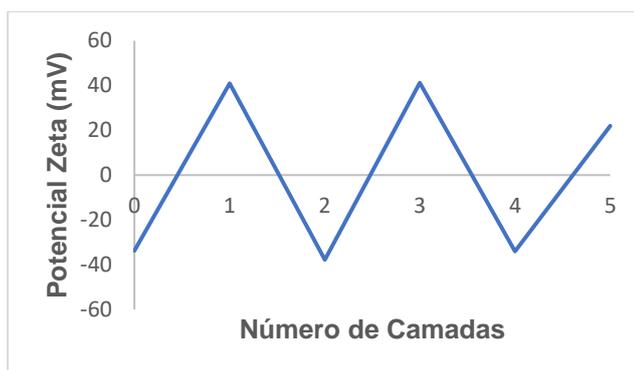


Figura 22 - Variação do Potencial Zeta (ξ) do sistema em função do número de camadas de PAH e PSS adsorvidas.

Na figura 23 é apresentada uma imagem de SEM do sistema obtido onde se distinguem microcápsulas esféricas e de aproximadamente $2 \mu\text{m}$ de diâmetro.

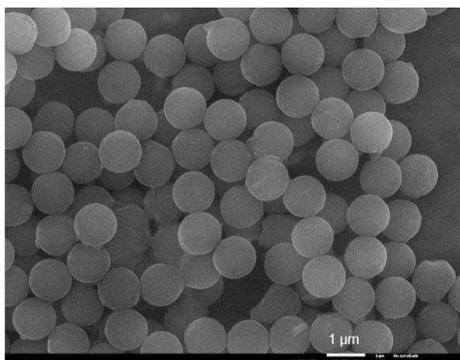


Figura 23 - Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema [PS]_PAH_PSS.

4.3. Preparação de Microcápsulas funcionalizadas com Nano híbridos Porfirina-Ouro

Após a otimização das condições experimentais de preparação de microcápsulas de polieletrólito com núcleo de poliestireno, procedeu-se à preparação dos híbridos porfirina-ouro propostos (Híbridos I a IV). A formação dos sistemas híbridos foi confirmada por espectroscopia de absorção e microscopia eletrônica de varrimento (SEM).

4.3.1. Revestimento dos AuNR

Depois da otimização do processo de produção das microcápsulas em que a adsorção dos polieletrólitos foi feita com recurso a processos de automontagem (LbL), procedeu-se à adsorção das nanopartículas de ouro.

Os nanobastonetes de ouro são comercializados numa solução de CTAB, cujo objetivo é estabilizar as nanopartículas. A bicamada de CTAB é citotóxica e facilmente removida em processos de lavagem alterando a estabilidade das nanopartículas. Para minimizar este problema, os nanobastonetes comerciais foram revestidos com polieletrólitos segundo duas abordagens diferentes: (A) - Revestimento com polieletrólito negativo PSS, adequado para adsorção a microcápsulas carregadas positivamente (última camada de PAH) e (B) - Revestimento sequencial de duas camadas de polieletrólito (PSS_PAH), adequado para adsorção a microcápsulas com carga superficial negativa (última camada PSS).

Após a remoção de grande parte do CTAB presente no sobrenadante resultante da centrifugação dos nanobastonetes, os nanobastonetes de ouro foram dispersos numa solução de PSS ([PSS]=1,7 mg/mL, 1mM NaCl), deixando-se a adsorver sob forte agitação durante 1 hora, seguindo-se dois ciclos de centrifugação/lavagem com água destilada [51][52]. Estes sistemas foram usados como base para adsorção da segunda camada de polieletrólito ([PAH]=1,7 mg/mL, 1 mM NaCl) seguindo o mesmo procedimento experimental.

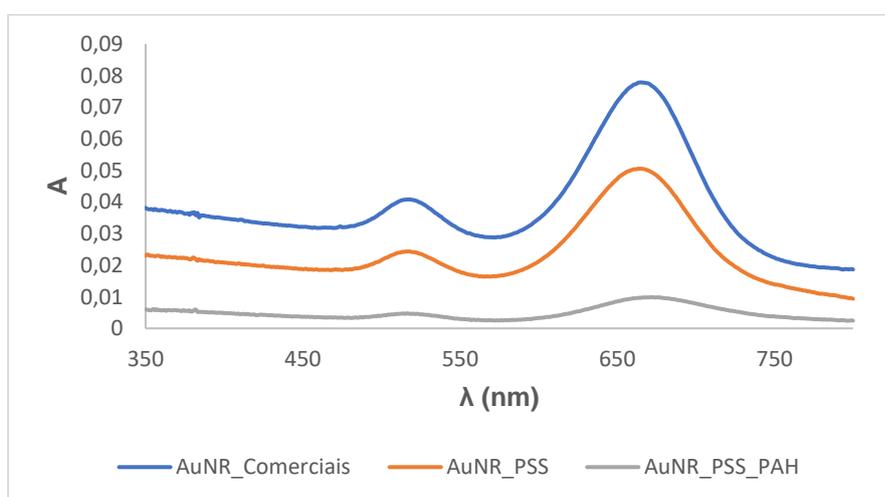


Figura 24 - Espectros de Absorção UV-VIS das Nanopartículas de Ouro com e sem revestimento.

Fazendo uma análise à figura 24 chega-se à conclusão de que após a adsorção do PAH os nanobastonetes de ouro têm tendência a agregar (desaparecimento da banda longitudinal do plasmão). Uma explicação possível para o fenómeno de agregação reside na possibilidade do PAH provocar a lixiviação do PSS adsorvido às nanopartículas, e assim diminuindo a sua estabilidade coloidal. Em simultâneo, através de medidas de potencial zeta obtém-se o valor de $\xi = -29,9$ mV após o revestimento com o PSS, ao passo que depois de se adsorver o PAH obtém-se o valor de $\xi = 14,4$ mV. Este valor encontra-se dentro do intervalo de -20 mV e +20 mV, que é indicativo da pouca meta-estabilidade do sistema. Deste modo, com o intuito de reverter a carga da superfície para um valor superior a +20 mV, procedeu-se a uma segunda adsorção de PAH, tendo-se obtido um valor ainda mais baixo do que o primeiro ($\xi = 8,99$ mV). Contudo, para se comprovar as suspeitas levantadas na leitura destes valores de potencial zeta, decidiu-se construir uma arquitetura (Híbrido I) em que se tenta adsorver nanopartículas revestidas por uma bicamada de polieletrólitos (PSS_PAH) em microcápsulas cuja última camada é constituída pelo polieletrólito PSS. De notar que a quantidade de moléculas de polieletrólito existente na solução de adsorção ([PSS] = 1,7 mg/mL) é muito superior à quantidade de nanopartículas disponíveis ([AuNR = 0,060 mg/mL), de modo a obter-se nanopartículas completamente estáveis e saturadas pelas cadeias de polímero [44].

Para o caso dos AuNR revestidos com PSS, mais estáveis, procedeu-se a um teste de estabilidade com o intuito de avaliar durante quanto tempo as nanopartículas de ouro revestidas com o PSS permaneciam estáveis em solução.

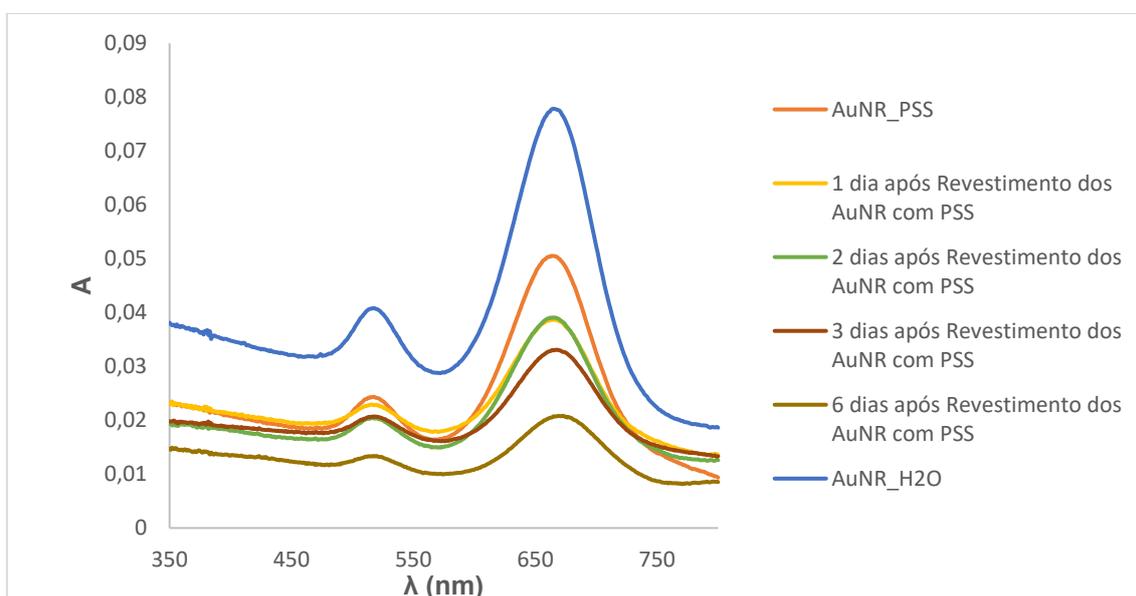


Figura 25 - Espectros de absorção UV-Vis dos nanobastonetes de ouro em água e depois de revestidos com uma camada de polieletrólito PSS, ao longo do tempo.

De acordo com Mayya *et al.*, verifica-se um desvio para valores de λ superiores do plasmão longitudinal das nanopartículas sempre que ocorre a adsorção de uma camada de polieletrólitos devido a alterações no valor da constante dielétrica local das nanopartículas. Nos dados da tabela 5 verifica-se um desvio de 3 nm no $\lambda_{m\acute{a}x}$ dos AuNR em água e após a adsorção de uma camada de PSS [53]. Para além disso, verifica-se uma diminuição do valor da absorvância após adsorção da camada de

PSS quando comparado com o valor lido sem revestimento. Essa diferença é mais acentuada com o passar do tempo desde o dia em que foi feita a adsorção. Simultaneamente, observa-se um ligeiro alargamento da banda do plasmão longitudinal, o que é indicativo da existência de agregados de nanopartículas [54].

Tabela 5 - $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção do plasmão longitudinal dos nanobastonetes, ao longo do tempo, e depois de funcionalizados com uma camada do polieletrólito PSS.

	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
AuNR_H2O	660
AuNR_PSS	663
1 dia após Revestimento dos AuNR com PSS	665
2 dias após Revestimento dos AuNR com PSS	665
3 dias após Revestimento dos AuNR com PSS	668
6 dias após Revestimento dos AuNR com PSS	673

Neste sentido, de forma a evitar ao máximo a adsorção de espécies já agregadas nas microcápsulas, o revestimento dos nanobastonetes de ouro com PSS foi sempre feito pouco antes da adsorção destes às microcápsulas.

4.3.2. Adsorção dos AuNR às microcápsulas

Finalizado o revestimento dos AuNR com o polieletrólito, procedeu-se à adsorção dos nanobastonetes às microcápsulas em que a última camada de PAH lhe confere uma carga positiva. Os AuNR funcionalizados foram ressuspensos num volume de água destilada igual a metade do volume da solução mãe (OD=2). Nas primeiras tentativas de construção do híbrido, seguiu-se o procedimento descrito numa outra dissertação deste grupo, no entanto, nestas condições a adsorção dos dois elementos do sistema não era eficaz e após 1h de adsorção a solução continuava com uma cor azulada que sugere uma quantidade de nanobastonetes em excesso.

Posto isto, houve a necessidade de se alterar o procedimento, passando a usar-se uma menor quantidade de nanobastonetes no processo de adsorção. Relativamente à quantidade de cápsulas, embora estas tenham sido ressuspensas em 5 mL de água destilada, para adsorção aos AuNR, retirou-se cerca de 2,5 mL ($1,65 \times 10^9$ partículas), centrifugou-se essa quantidade de amostra e as cápsulas foram ressuspensas no volume residual após o descarte do sobrenadante. Este volume residual ($\approx 100 \mu\text{L}$) foi diretamente adicionado a 250 μL de AuNR, tendo-se deixado a agitar durante 1h. No fim da adsorção, a solução deixou de apresentar uma cor azulada passando a incolor, sendo visível o aparecimento de vários pontos negros no fundo do microtubo correspondentes à formação do sistema microcápsulas+AuNR, que foi lavado só uma vez com 1 mL de água destilada.

4.3.3. Preparação e Caracterização do sistema Híbrido I

O sistema híbrido I resultou da junção simultânea, seguida de agitação vigorosa durante 1h, de núcleos de poliestireno revestidos por uma dupla camada de PAH_PSS ($4,60 \times 10^9$ partículas), de uma solução de TMPyP de concentração igual a $2,3 \mu\text{M}$ e de AuNR (1×10^{11} partículas) previamente revestidos por uma camada PSS e outra de PAH.

Começou-se por medir o espectro de absorção do sistema híbrido após os ciclos de centrifugação/lavagens, garantindo-se assim que o sistema se encontrava livre de porfirina e polieletrólitos não adsorvidos. A subida dos espectros relativamente à linha de base recolhida pode ser explicada pelo efeito de dispersão de luz por parte das microcápsulas. Ainda assim, é visível uma banda de absorção ao comprimento de onda de 432 nm, característica da banda Soret da porfirina num ambiente de polieletrólitos.

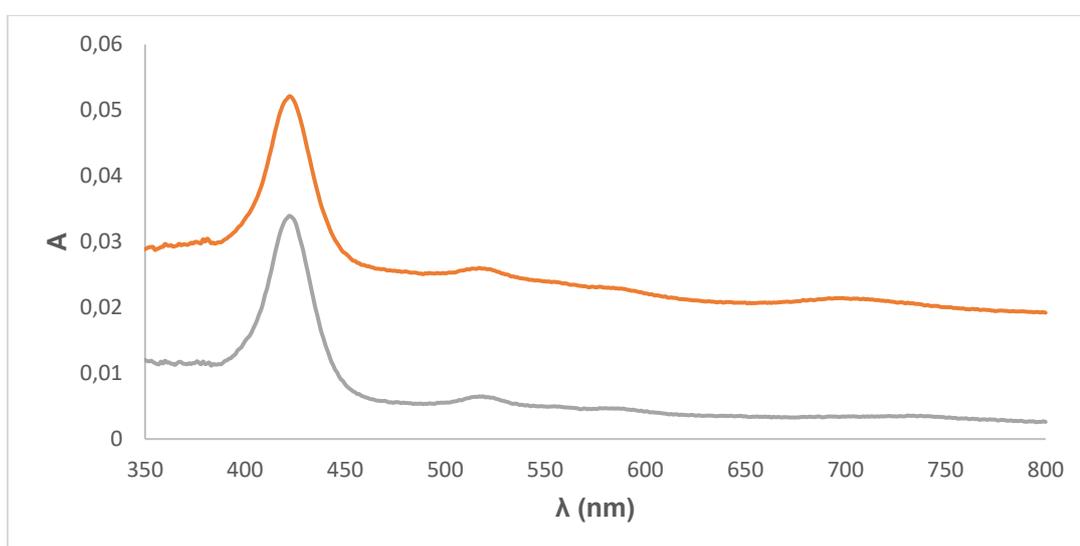


Figura 26 - Espectro de Absorção UV-Vis do sistema híbrido I (—) e do sobrenadante (—) após adsorção da TMPyP e dos AuNR usado no cálculo da eficiência de adsorção e do número de moles adsorvido.

De modo a calcular-se a eficiência/capacidade de adsorção (EA) deste sistema através da equação (16), bem como o número de moles de porfirina adsorvida, mediu-se a absorvância das soluções de sobrenadante.

$$EA = \frac{n_{ads}}{n_{ini}} \times 100 \quad (16)$$

Onde n_{ads} corresponde ao número de moles adsorvida e n_{ini} corresponde ao número de moles de porfirina na solução de adsorção.

Com base nos dados do gráfico da Figura 26, os valores obtidos para o número de moles adsorvido e eficiência de adsorção foram de $4,69 \times 10^{-10}$ mol e 40,7 % da quantidade inicialmente disponível em solução, respetivamente. De realçar que os cálculos para obtenção do número de moles adsorvidos (n_{ads}) têm como ponto de partida a lei de Lambert-Beer, em que se considerou que o valor do ϵ da porfirina em água é aproximadamente igual ao ϵ da porfirina num ambiente rico em polieletrólitos.

Nas imagens de SEM obtidas para este híbrido (Figura 27) é possível observar a presença de estruturas micrométricas fracamente revestidas com nanopartículas de ouro e nanopartículas de ouro fortemente agregadas nas áreas circundantes às microcápsulas e, como tal, não adsorvidas.

Estas imagens estão concordantes com a instabilidade quer das nanopartículas de ouro funcionalizadas pela dupla camada de polieletrólitos e já evidenciada pelo seu espectro de absorção (Figura 24). Outro fator que poderá estar na origem dos resultados obtidos é um revestimento incompleto da superfície das cápsulas ($\xi = 8,99$ mV).

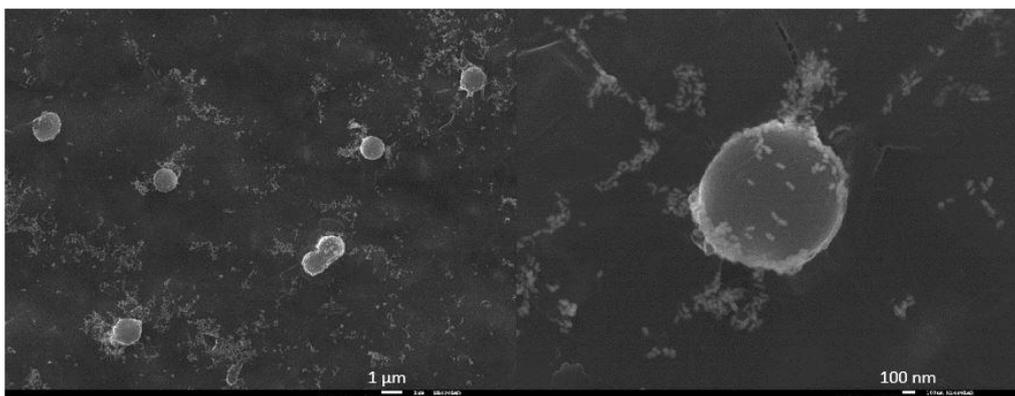


Figura 27 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema híbrido I.

Tendo como base os resultados experimentais obtidos, face à grande quantidade de nanopartículas de ouro que agregam e/ou que se perdem em cada adsorção e ciclo de centrifugação/lavagem, obrigou a que nos outros sistemas estudados à posteriori se revestisse os nanobastonetes de ouro somente com uma camada de PSS.

4.3.4. Preparação e Caracterização do sistema Híbrido II

Neste sistema as nanopartículas de ouro foram revestidas por uma camada de polieletrólito PSS e a TMPyP foi incorporada no sistema através de interações eletrostáticas em que os grupos piridínio se adsorvem à camada negativa de PSS das microcápsulas. Como solução de adsorção utilizou-se uma solução com concentração igual a $4,6 \mu\text{M}$, tendo-se guardado o sobrenadante de modo a conseguir avaliar a quantidade de porfirina adsorvida.

A análise do espectro de absorção UV-Vis do sistema preparado (Figura 28) permite identificar a existência de uma banda bem definida ao comprimento de onda de 430 nm (banda Soret) que está associada à existência de TMPyP complexada com o polieletrólito PSS, uma banda em torno do valor de 532 nm que corresponde ao plasmão transversal dos nanobastonetes de ouro e uma outra banda larga centrada nos 720 nm que poderá corresponder ao plasmão longitudinal.

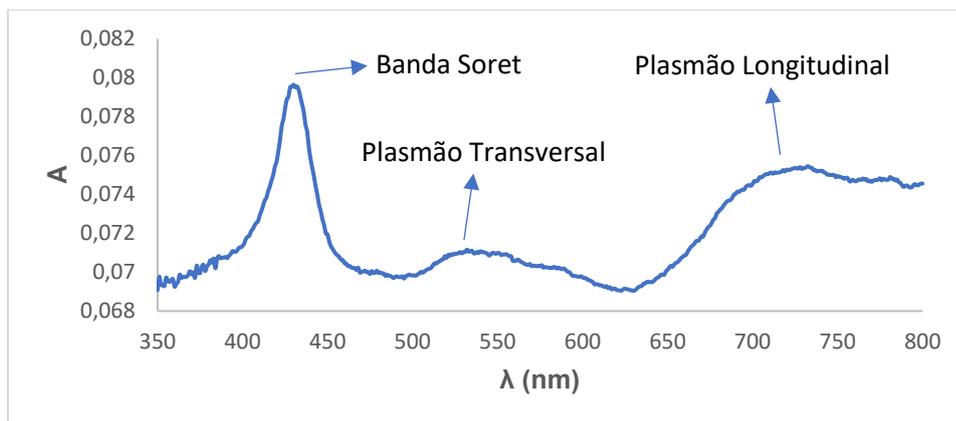


Figura 28 - Espectro de Absorção UV-Vis do sistema Híbrido II.

Também para este sistema se calculou os valores da eficiência de adsorção (EA) e o número de moles de porfirina adsorvida (n_{ads}), tendo por base a equação 16. Os valores obtidos para a eficiência de adsorção e número de moles adsorvido foram 0,576 % e $1,32 \times 10^{-11}$ mol, respectivamente.

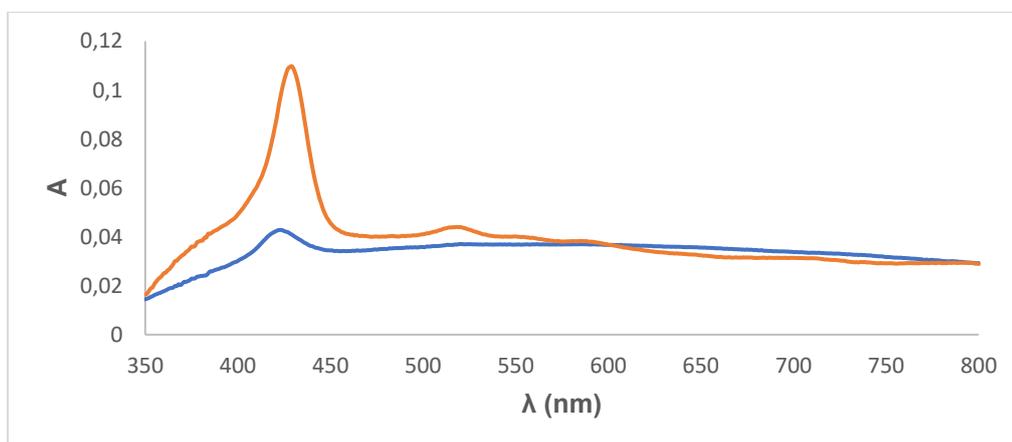


Figura 29 - Espectros de Absorção UV-Vis dos sobrenadantes do sistema Híbrido II após adsorção da TMPyP (—) e do PSS (—) usados no cálculo da eficiência de adsorção e do número de moles adsorvido.

Pela análise dos espectros de absorção dos sobrenadantes retirados após a adsorção da TMPyP ($\lambda_{m\acute{a}x} = 428$ nm) e do PSS ($\lambda_{m\acute{a}x} = 433$ nm), infere-se que o PSS provocou a lixiviação da porfirina. As interações eletrostáticas que se estabelecem entre as camadas sucessivas de PSS e entre o PSS que está a ser adsorvido e a TMPyP são suficientemente fortes para causar a desadsorção da TMPyP. O sobrenadante depois da adsorção do PAH era incolor e, por esse motivo, assumiu-se que a adsorção deste polieletrólito não provocou a lixiviação significativa de porfirina.

Comparativamente com o sistema Híbrido I, obteve-se um valor de eficiência de adsorção da porfirina mais baixo, como resultado da lixiviação da TMPyP depois da adsorção do PSS.

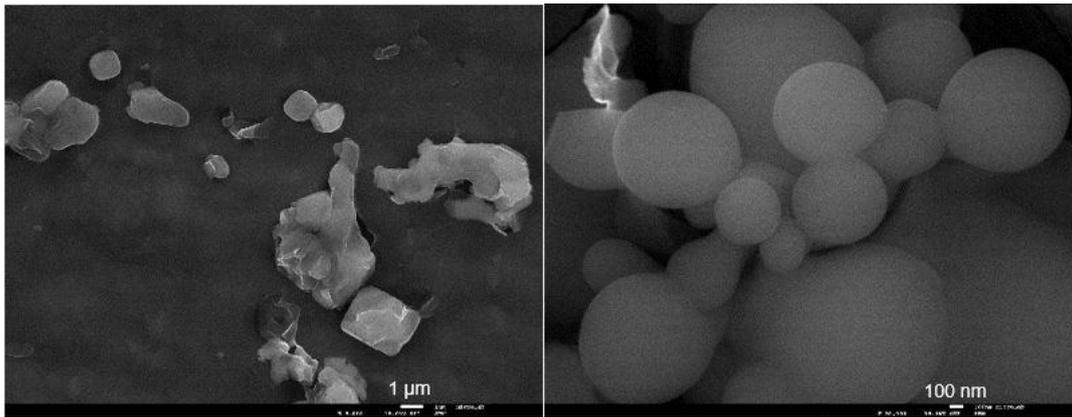


Figura 30 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema Híbrido II.

Paralelamente, tal como foi feito para o sistema anterior, recorreu-se à microscopia eletrónica de varrimento (SEM) para se obter informações acerca da morfologia do sistema (Figura 30). Contrariamente ao que seria de esperar, as imagens captadas através de SEM demonstram que parte das cápsulas colapsou. A solução do híbrido após os habituais procedimentos de centrifugação e lavagem estava incolor, o que juntamente com o espetro de absorção (Figura 28) e os resultados obtidos na técnica de FLIM, indica que muito provavelmente os AuNR se adsorveram com sucesso às microcápsulas. A explicação para as imagens de SEM poderá estar relacionada com alguma irregularidade aquando da preparação da amostra.

4.3.5. Preparação e Caracterização do sistema Híbrido III

À semelhança do que aconteceu na construção do sistema híbrido II, também neste caso a solução de adsorção de TMPyP tinha uma concentração de cerca de 4,6 µM e o revestimento dos AuNR foi feito de igual forma.

Tal como para o sistema híbrido II, a análise ao espetro de absorção UV-Vis do sistema preparado (Figura 31) evidencia a existência de uma banda bem definida ao comprimento de onda de 428 nm (banda Soret) que está associada à existência de TMPyP complexada com o polieletrólito PSS. É notório também uma banda mal definida a comprimento de onda de 522 nm que corresponde ao plasmão transversal dos nanobastonetes de ouro e uma outra banda mal definida por volta dos 720 nm associada ao plasmão longitudinal. Estas diferenças nos valores do plasmão transversal e longitudinal estão associadas ao facto dos AuNR não estarem livres em solução, mas sim inseridos na superfície das microcápsulas em microambientes heterogéneos e com algum grau de interação entre partículas.

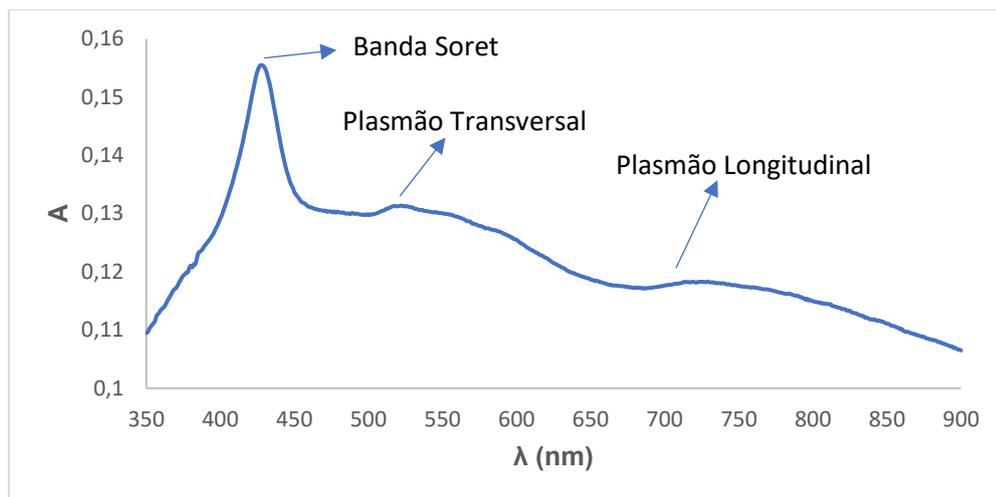


Figura 31 - Espectro de Absorção UV-Vis do sistema Híbrido III.

O espectro de absorção UV-Vis do sobrenadante permite tirar as mesmas conclusões que nos sistemas anteriores. A presença de porfirina no sobrenadante vem expressa numa banda bem definida ao comprimento de onda de 422 nm que indica que a TMPyP estabeleceu interações com moléculas de PSS e que uma parte das moléculas de porfirina não se adsorveram. De notar ainda que entre os comprimentos de onda 500 nm e 650 nm visualizam-se pelo menos duas bandas mal definidas, representativas das bandas Q da porfirina.

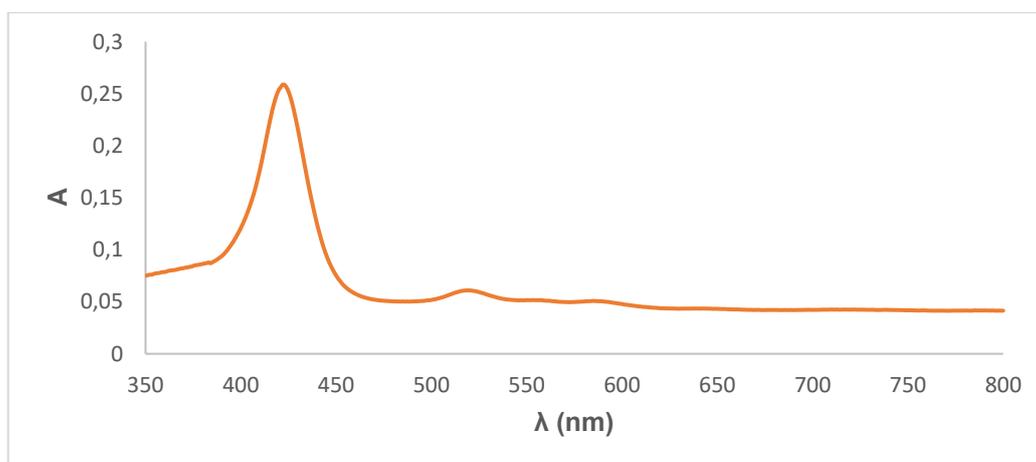


Figura 32 - Espectro de Absorção UV-Vis do sobrenadante do sistema híbrido III após adsorção da TMPyP usado no cálculo da eficiência de adsorção e do número de moles adsorvido.

Os cálculos para os valores da eficiência de adsorção (EA) e o número de moles adsorvidos de porfirina (n_{ads}) resultaram em 78,8 % e $1,81 \times 10^{-9}$ mol, respetivamente. A quantidade de porfirina adsorvida é muito superior à obtida para o Híbrido II, abordado na secção anterior, o que pode ser explicado pela arquitetura do próprio sistema. Neste caso, a porfirina é a camada mais superficial do híbrido e, como nenhuma camada de polieletrólito foi adicionada posteriormente, a TMPyP não tem tanta tendência a sofrer lixiviação.

Para este sistema foram adquiridas imagens de SEM em três fases distintas da sua preparação: após adsorção das nanopartículas de ouro (Figura 33), após o revestimento das anteriores com uma bicamada de PAH_PSS (Figura 34) e, por último, após adsorção da porfirina - Híbrido III (Figura 35).

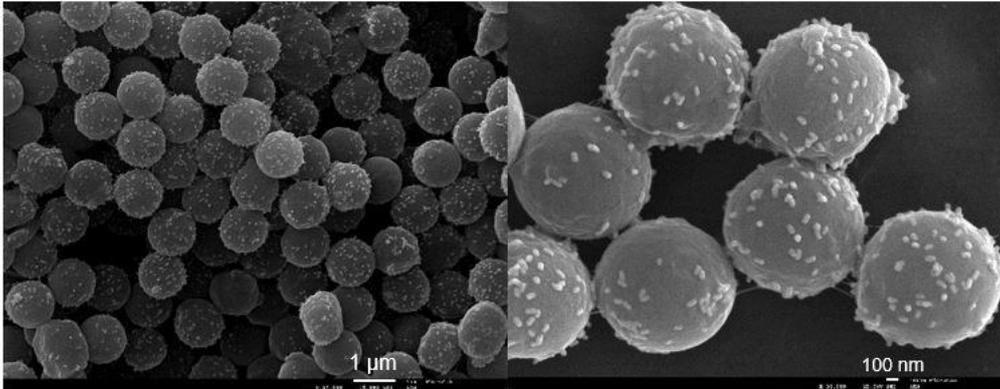


Figura 33 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema em fase de desenvolvimento, correspondente ao sistema de controlo IV (PS_PAH_PSS_PAH_PSS_PAH_[AuNR_PSS]).

As imagens captadas através de SEM (Figura 33) mostram microcápsulas revestidas pelas nanopartículas de ouro, não sendo visível a presença de AuNR em solução.

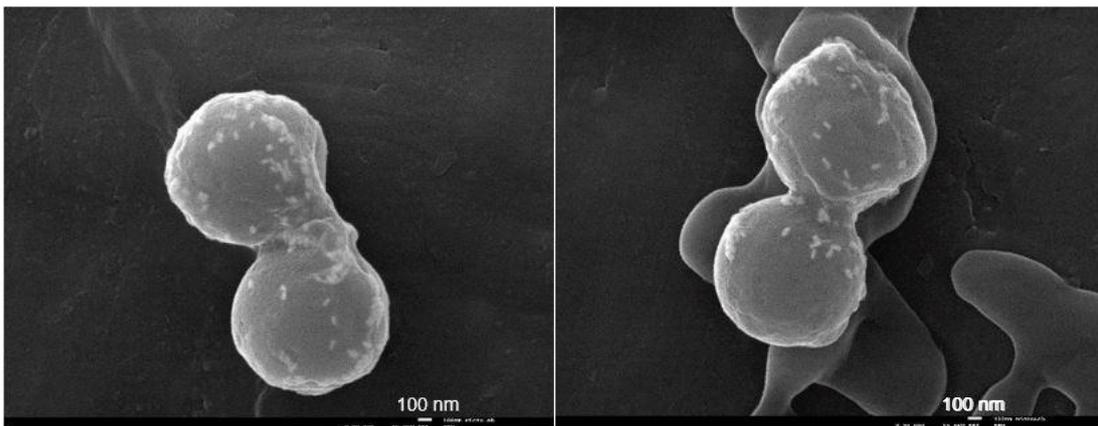


Figura 34 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema em fase de desenvolvimento, correspondente ao sistema de controlo V (PS_PAH_PSS_PAH_PSS_PAH_[AuNR_PSS]_PAH_PSS).

Nesta fase da construção do sistema, as imagens de SEM (Figuras 34) retratam uma amostra de microcápsulas funcionalizadas com nanobastonetes de ouro mais agregada, em que as estruturas dos nanobastonetes de ouro estão menos nítidas dado que foram adsorvidas duas camadas de polieletrólitos (PAH e PSS) a seguir aos AuNR. Após adsorção da TMPyP, o mesmo é observado nas imagens de SEM do sistema híbrido III (Figura 35).

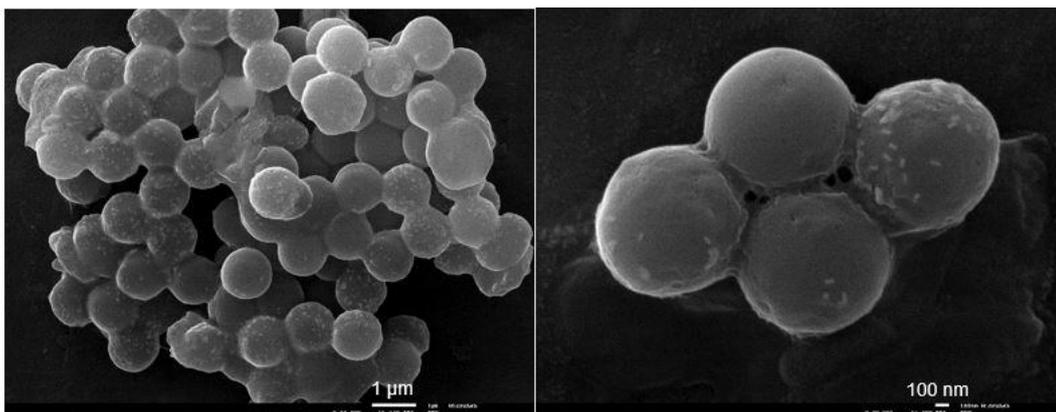


Figura 35 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema Híbrido III.

4.3.6. Preparação e Caracterização do sistema Híbrido IV

Ao analisar-se os espectros de absorção UV-VIS dos sistemas híbridos II e III, observa-se que a adsorção dos nanobastonetes de ouro é acompanhada pelo aparecimento de uma banda alargada na zona do vermelho do espectro eletromagnético. Para que ocorra intensificação de fluorescência da porfirina, é necessário que haja uma sobreposição entre o espectro de absorção do plasmão e os espectros de absorção e emissão da porfirina sendo que, os fenômenos de absorção e intensificação são máximos para o comprimento de onda máximo do plasmão [55]. Na tentativa de obter um sistema com características espectrais mais adequadas à observação do fenômeno de intensificação de fluorescência por efeito plasmônico, o híbrido IV foi preparado segundo um procedimento experimental semelhante ao anteriormente descrito para o híbrido II, mas usando-se desta vez nanopartículas de ouro com *aspect ratio* =2,3 e caracterizadas por um plasmão longitudinal a 614 nm.

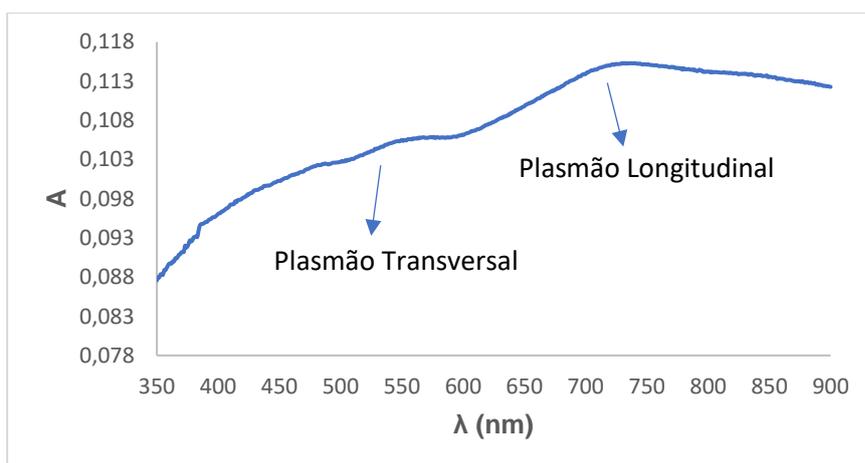


Figura 36 - Espectro de Absorção UV-VIS do sistema híbrido IV.

Ao contrário do esperado, a alteração do tamanho dos nanobastonetes de ouro não se traduz em diferenças significativas no espectro obtido para o híbrido correspondente. Também neste caso, o máximo da banda alargada dos nanobastonetes adsorvidos tem um desvio para $\lambda \approx 750$ nm.

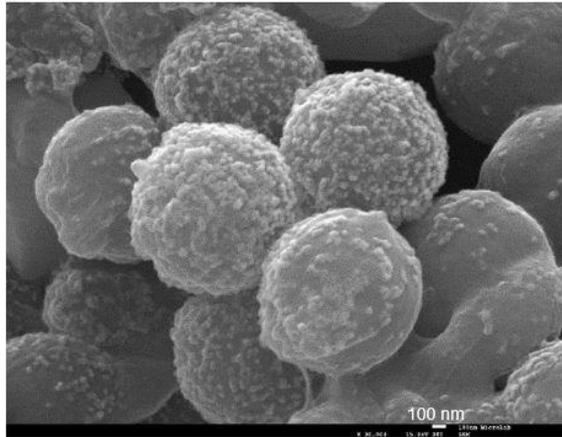


Figura 37 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM) do sistema híbrido IV, utilizando AuNR com plasmão longitudinal a 600nm.

Neste caso não foi possível calcular eficiência de adsorção (EA) da porfirina devido a um processo ineficiente de separação do sobrenadante.

4.4. Intensificação de Fluorescência por Efeito Plasmônico

Nesta secção, a influência da arquitetura dos sistemas preparados na intensificação da fluorescência da porfirina TMPyP usando nanobastonetes de ouro como nanoantenas óticas será avaliada por microscopia de tempos de vida de fluorescência (FLIM), com excitação a $\lambda_{exc} = 635$ nm. Para cada um dos sistemas preparados foram adquiridas imagens varrendo inicialmente várias áreas de dimensões 80 x 80 μm das quais foram escolhidas aleatoriamente algumas microcápsulas individuais, representativas da população em análise e cujas imagens estão em anexo. Para cada uma das microcápsulas escolhidas foi adquirida uma imagem de FLIM (5 x 5 μm) e foram medidos vários traços de fluorescência em diferentes pontos da microcápsula também eles escolhidos aleatoriamente.

Os fenómenos de intensificação foram seguidos segundo duas perspetivas diferentes. A primeira, de carácter global, tem como objetivo comparar a intensidade de fluorescência emitida por cada cápsula do híbrido com a soma da intensidade de fluorescência de cada um dos controlos (microcápsulas contendo apenas porfirina ou apenas nanopartículas de ouro à mesma concentração que o híbrido). Neste caso, foram traçados perfis de intensidade de fluorescência ao longo do diâmetro de uma cápsula individual e comparados com os obtidos para os sistemas de controlo. Paralelamente, procedeu-se à identificação de fenómenos pontuais de fluorescência que podem ou não ser traduzidos numa intensificação global. Mediram-se traços de fluorescência para pontos específicos das microcápsulas, tendo-se comparado os mesmos com os sistemas de controlo. No último caso, a avaliação da intensificação de fluorescência por efeito plasmônico foi feita tendo por base a análise dos eventos de emissão pontual muito intensa (ou “fluorescence bursts”), também conhecido como o método de *cherry-picking*. Segundo este método, os valores dos fatores de intensificação ($\frac{F}{F_0}$) são calculados com recurso à equação (17):

$$\frac{F}{F_0} = \frac{I_e - I_{bg}}{I_{ne}} \quad (17)$$

Em que I_e corresponde ao valor de intensidade de fluorescência mais elevado existente num determinado traço de fluorescência, I_{bg} corresponde ao valor das contagens de fundo do aparelho contabilizadas pelos detetores e I_{ne} simboliza o valor de intensidade de fluorescência do fotossensibilizador não intensificado que, para o caso de TMPyP é um valor constante e igual a 0,8 cnts/s [56].

4.4.1. Intensificação de Fluorescência por Efeito Plasmônico – Análise ao Sistema Híbrido I

Na figura 38 mostram-se as imagens de FLIM obtidas para o sistema Híbrido I, que envolveu a junção simultânea da solução de porfirina e dos nanobastonetes de ouro revestidos por uma bicamada de polieletrólitos (PSS/PAH).

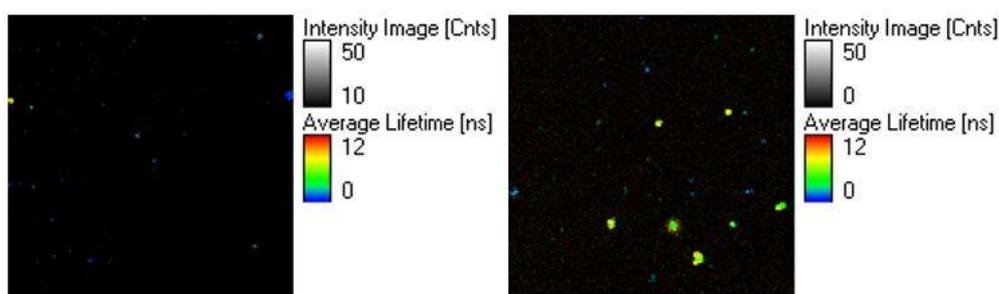


Figura 38 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μm x 80 μm) do sistema Híbrido I.

Nestas imagens é possível observar a presença de estruturas esféricas e micrométricas de acordo com as imagens obtidas por SEM para este híbrido (Figura 38). No entanto, a análise de FLIM mostra que estas estruturas podem ser agrupadas de acordo com os tempos de vida de fluorescência medidos:

- Microcápsulas com tempos de vida da ordem dos 12 ns, representadas na Figura 39-A em que, segundo a literatura, este tempo de vida é o medido para o complexo de TMPyP-PSS não se observa evidência de que as nanopartículas de ouro tenham adsorvido nestes objetos [50].
- Microcápsulas com tempos de vida muito curtos, representadas na Figura 39-B e que podem representar as estruturas contendo porfirina e nanobastonetes de ouro, pois estes últimos têm tempos de emissão muito curtos e também aceleram o decaimento de corantes orgânicos.
- Microcápsulas com tempos de vida na ordem dos 5 ns (Figura 39-C). Segundo a literatura, o tempo de vida da TMPyP em água é de 5 ns, pelo que deve ser considerada a hipótese deste tipo de microcápsulas conter porfirina num ambiente mais aquoso do que associada ao polieletrólito [50].

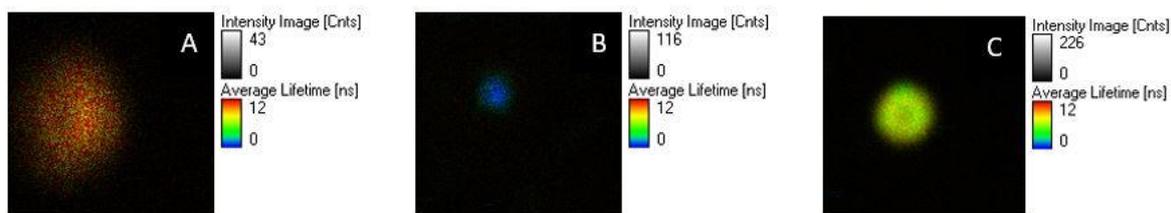


Figura 39 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (5 μm x 5 μm) do sistema Híbrido I.

A Figura 40 mostra os perfis de intensidade de fluorescência obtidos para as cápsulas representadas na figura 39-B e a respectiva comparação com os sistemas de controlo. Pela análise desta figura é possível concluir que apesar da intensidade de fluorescência medida para o híbrido ser superior à medida para os controlos, a mesma não é significativamente superior à soma das anteriores, pelo que o efeito plasmónico na intensificação global de fluorescência será desprezável. Com base na conjugação dos resultados obtidos por SEM e por FLIM, pode-se concluir que a ausência do fenómeno de intensificação global deverá ser causada por uma fraca densidade de nanopartículas de ouro adsorvidas à superfície das cápsulas. O fraco revestimento das microcápsulas com as nanopartículas de ouro pode dever-se à agregação preferencial destas últimas ou a uma eventual competição com a porfirina pelos grupos sulfonato do polieletrólito negativo, dado que, neste caso, a última camada adsorvida aos AuNR era o PAH (polieletrólito positivo).

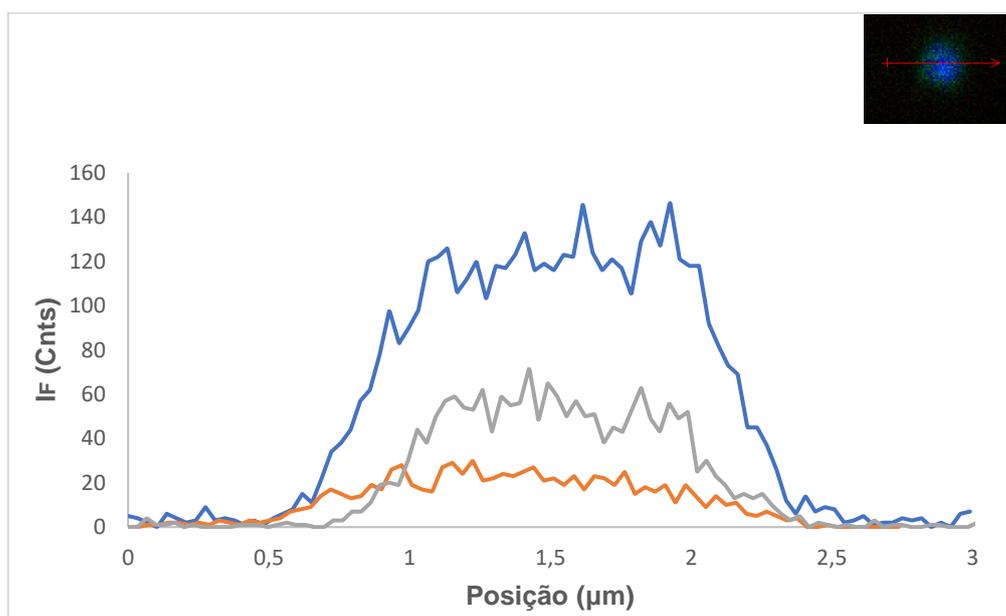


Figura 40 - Perfil de Intensidade de Fluorescência em função da posição na microcápsula para o sistema Híbrido I (—) e para os sistemas de controlo III (—) e IV (—).

Para além disso, também não é perceptível qual a ordem pela qual ocorreu o processo de adsorção, isto é, a porfirina por apresentar carga positiva pode ter ficado adsorvida entre as microcápsulas e os nanobastonetes revestidos com PSS e PAH ou, por outro lado, os AuNR adsorveram-se imediatamente às microcápsulas visto que a constante de equilíbrio entre o PAH e o PSS é alta ($pK_{eq} \approx 10,3$) [57]. Ainda assim, seria de esperar a existência de alguns fenómenos de

intensificação mais frequentes e prolongados dada a proximidade do fluoróforo com os nanobastonetes e, por conseguinte, com os *hotspots*.

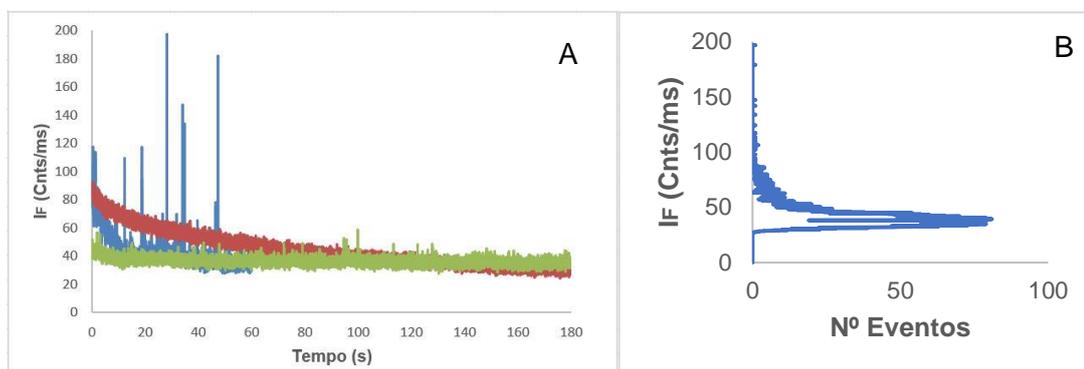


Figura 41 - Variação da Intensidade de Fluorescência em função do tempo para os sistemas: Híbrido I (—); Controlo III (—) e Controlo IV (—). (A) Em que (B) representa o histograma de intensidade de fluorescência de um evento de curta duração de (A).

Mediram-se os traços de fluorescência para o sistema contendo a porfirina e os nanobastonetes de ouro em simultâneo e para os dois sistemas de controlo, isto é, um deles contendo somente a TMPyP e outro só com AuNR. Não se verificam fenómenos de intensificação nos dois sistemas de controlo, sendo que no caso do sistema em que só existe porfirina no meio das camadas de polieletrólito ocorre a fotodegradação da mesma, visível através de uma diminuição acentuada do número de contagens no início da medição.

As intensificações observadas no minuto inicial para o sistema híbrido I ocorrem durante tempos muito curtos e correspondem a uma passagem breve por parte da TMPyP num *hotspot* localizado entre duas nanopartículas adsorvidas às microcápsulas [56]. Posto isto, calcularam-se os valores de $\frac{F}{F_0}$ que se situam entre os $1,59 \times 10^4$ e $7,72 \times 10^5$, sendo que a média dos fatores de intensificação obtidos para este sistema é cerca de $1,36 \times 10^5$. De acordo com o reportado na literatura, para um sistema de dímeros de nanopartículas esféricas, obtiveram-se fatores de intensificação entre 10^5 e 10^6 [56]. O sistema estudado neste dissertação é estruturalmente diferente do exemplo da literatura, uma vez que se usam nanobastonetes de ouro e não nanopartículas esféricas, ainda assim, a obtenção de valores mais baixos no cálculo de $\frac{F}{F_0}$ pode estar associado à arquitetura do sistema, dado que pelas imagens de SEM é visível que grande parte da superfície das cápsulas não está substituída e existe uma grande quantidade de nanopartículas de ouro na área circundante. Deste modo, a probabilidade de uma molécula de TMPyP passar num *hotspot* entre duas nanopartículas é mais reduzida, o que faz com que os fenómenos de intensificação não sejam tão frequentes.

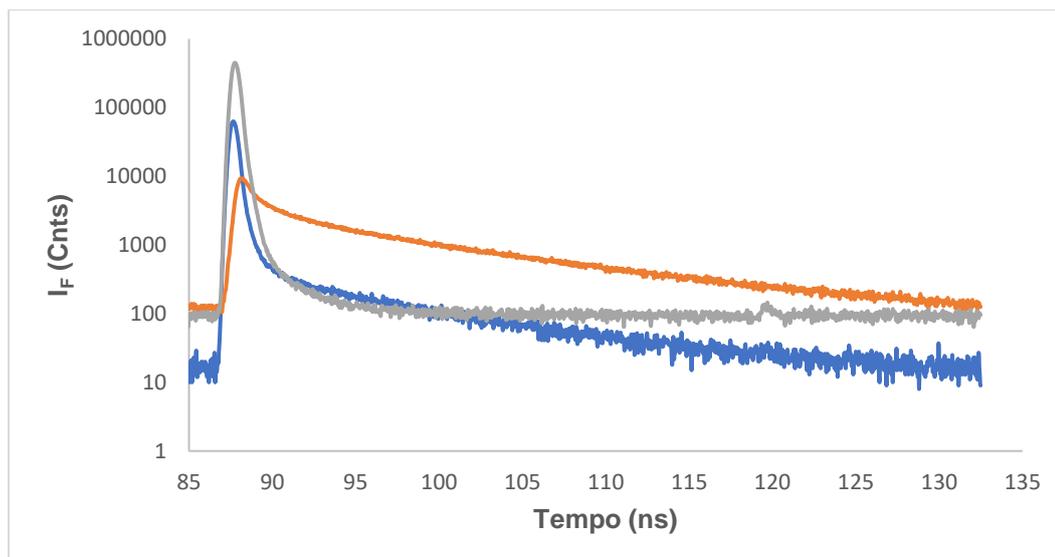


Figura 42 - Decaimentos de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido I, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 41 (—); Controlo III (—) e Controlo IV (—).

Os decaimentos de fluorescência obtidos são bastante complexos de analisar e para que haja um ajuste com elevado grau de confiança é necessário recorrer a uma função tri-exponencial, cujos parâmetros vêm expressos na tabela 6. Ainda assim, cada componente da função tri-exponencial pode traduzir o valor médio da contribuição de uma população não homogênea. Contudo, assume-se que tempos de vida com valores bastante diferentes devem representar populações também elas diferentes.

O tempo de vida médio de fluorescência foi calculado a partir da equação 18:

$$\tau_{\text{médio}} = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i} \quad (18)$$

Em que α_i se define como o fator pré-exponencial do decaimento e τ_i como o tempo de vida do estado excitado.

Tabela 6 – Tempos de Vida de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido I, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 41; Controlo III e Controlo IV.

	τ_1 (ns)	A_1 (%)	τ_2 (ns)	A_2 (%)	τ_3 (ns)	A_3 (%)	χ^2	$\tau_{\text{médio}}$
Híbrido I	9,4	7,6	1,3	14,0	0,3	78,4	1,023	1,1
Controlo III	11,6	49	4,5	36	1,1	15	1,030	7,5
Controlo IV	2,1	1,1	0,3	48,7	0,1	50,2	1,167	0,2

O tempo de vida de fluorescência do sistema híbrido apresenta uma componente bastante expressiva muito curta (0,3 ns), que está relacionada com a existência de nanopartículas de ouro na superfície das microcápsulas. Embora não seja muito pronunciada, a componente $\approx 9,4$ ns pode ser atribuída à complexação da TMPyP com outras moléculas de polieletrólitos, o que é indicativo da adsorção de alguma quantidade de porfirina às microcápsulas [50].

A junção simultânea da TMPyP e das nanopartículas de ouro não é a adequada para que haja uma adsorção eficiente destes dois componentes e, como tal, construíram-se novos sistemas que foram caracterizados nas secções anteriores com o intuito de explorar a posição relativa entre o fluoróforo e o nanobastonete de ouro.

4.4.2. Intensificação de Fluorescência por Efeito Plasmónico – Análise ao Sistema Híbrido II

No que diz respeito a este sistema, seguiu-se um raciocínio semelhante ao demonstrado na secção 4.4.1 em que se obtiveram uma série de imagens através da técnica de FLIM do sistema híbrido II e dos sistemas de controlo III e IV.

Na figura 43 visualizam-se microcápsulas com tempos de vida da ordem dos 12 ns, o que corresponde ao complexo formado pela TMPyP e pelo PSS [50]. Este resultado está concordante com o resultado esperado uma vez que a figura 43 corresponde ao sistema de Controlo III, que contém somente porfirina adsorvida às microcápsulas.

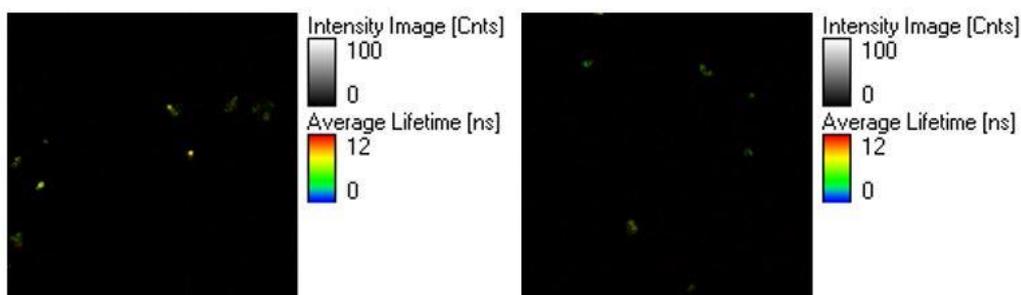


Figura 43 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μm x 80 μm) do sistema de controlo III.

Como era expectável, a figura 44 referente ao sistema de controlo IV revela cápsulas com um tempo de vida de emissão nas imagens FLIM das cápsulas é muito curto ($\approx 1\text{-}2$ ns) uma vez que estas possuem somente os nanobastonetes de ouro na sua estrutura.

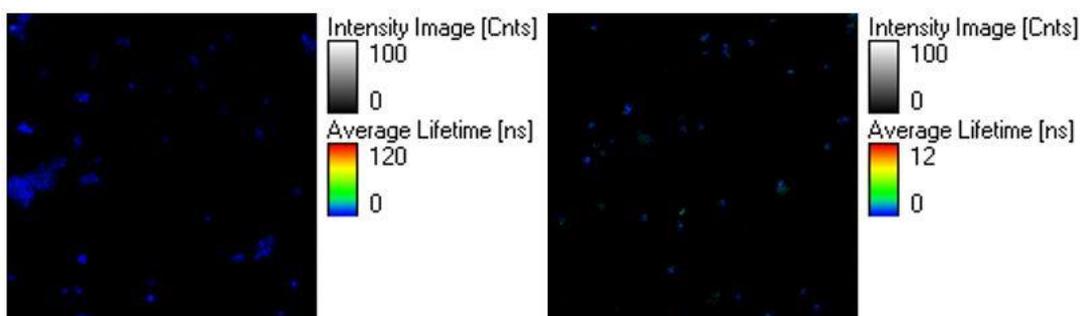


Figura 44 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μm x 80 μm) do sistema de controlo IV.

No que diz respeito às imagens de FLIM obtidas para o híbrido II (Figura 45), observa-se a existência de estruturas micrométricas, pouco agregadas e com um tempo médio de vida compreendido entre os 1-2 ns e os 12 ns. Esta observação está relacionada com a presença simultânea de porfirina e nanopartículas de ouro.

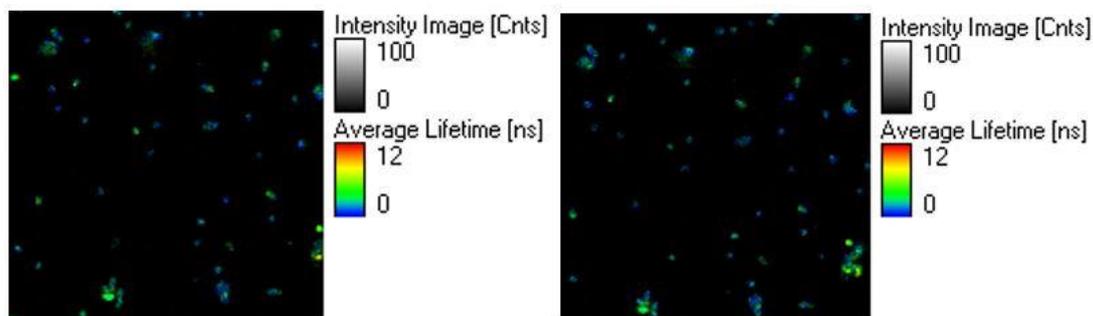


Figura 45 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μm x 80 μm) do sistema Híbrido II.

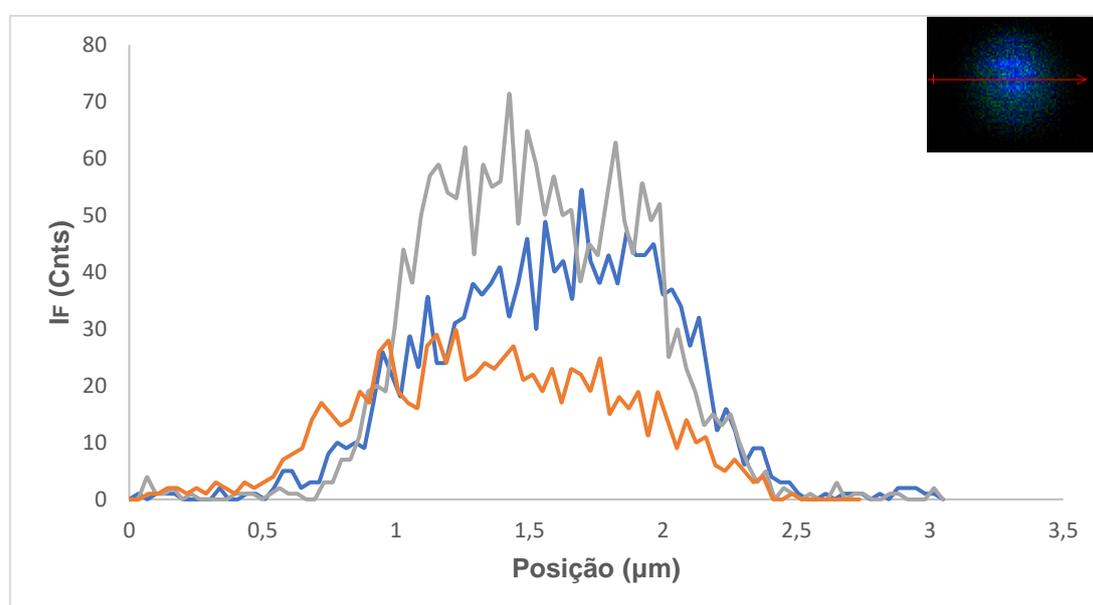


Figura 46 - Perfil de Intensidade de Fluorescência em função da posição na microcápsula para o sistema Híbrido II (—) e para os sistemas de controlo III (—) e IV (—).

Tal como foi feito para o sistema anterior, fez-se uma avaliação da intensidade de fluorescência em vários pontos das microcápsulas, nos sistemas de controlo e no híbrido. Neste caso, a intensidade de fluorescência do sistema híbrido é semelhante à intensidade de fluorescência que se obteve para o sistema de controlo contendo somente os nanobastonetes de ouro e ligeiramente superior ao valor da intensidade de fluorescência obtida para o sistema de controlo contendo somente porfirina e, como tal, espera-se que efeito plasmónico na intensificação global de fluorescência seja desprezável. O valor obtido para a intensidade de fluorescência do Híbrido II pode ser explicado pela grande quantidade de TMPyP que é lixiviada aquando da adsorção do PSS e resulta num valor muito baixo de eficiência de adsorção.

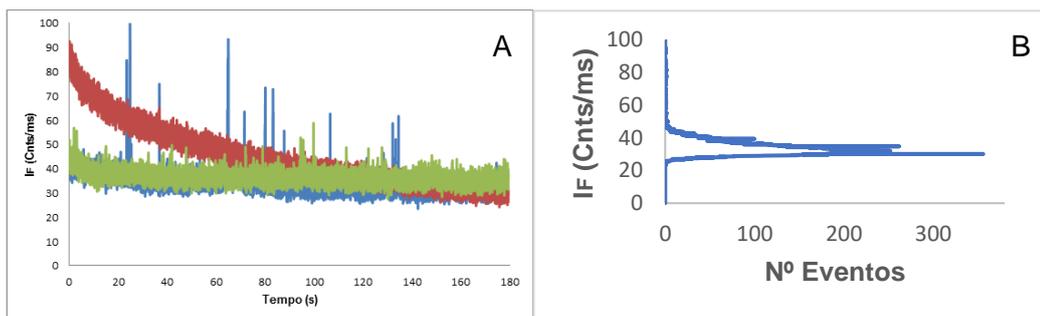


Figura 47 - Variação da Intensidade de Fluorescência em função do tempo para os sistemas: Híbrido II (—); Controlo III (—) e Controlo IV (—). (A) Histograma de intensidade de fluorescência de um evento de curta duração de (A).

A medição dos traços de fluorescência para os dois sistemas de controlo mostra a ausência de fenómenos de intensificação. No sistema de controlo contendo porfirina observa-se a fotodegradação da TMPyP, visível através de uma diminuição do número de contagens no início da medição. Relativamente ao traço de fluorescência do sistema Híbrido II, observam-se eventos muito curtos de intensificação de fluorescência, ao longo dos 3 minutos de aquisição. Estes eventos de intensificação resultaram em valores de $\frac{F}{F_0}$ situados entre $1,66 \times 10^4$ e $3,93 \times 10^5$, sendo que, a média destes valores é de cerca de $1,14 \times 10^5$. Mais uma vez, os valores obtidos são inferiores aos referidos na literatura e da mesma ordem de grandeza dos obtidos para o sistema híbrido I [57]. Pelo espectro de absorção do híbrido, prevê-se que a adsorção dos nanobastonetes de ouro tenha sido eficiente, ainda assim, os valores de intensificação de fluorescência podem ser justificados pelo número de moles adsorvido neste sistema ser mais baixo ($1,32 \times 10^{-11}$ mol) do que nos restantes sistemas. Neste sentido, a quantidade baixa de porfirina existente no sistema diminui a probabilidade de uma molécula de porfirina atravessar um *hotspot* situado entre duas nanopartículas de ouro e, por conseguinte, da ocorrência de fenómenos de intensificação.

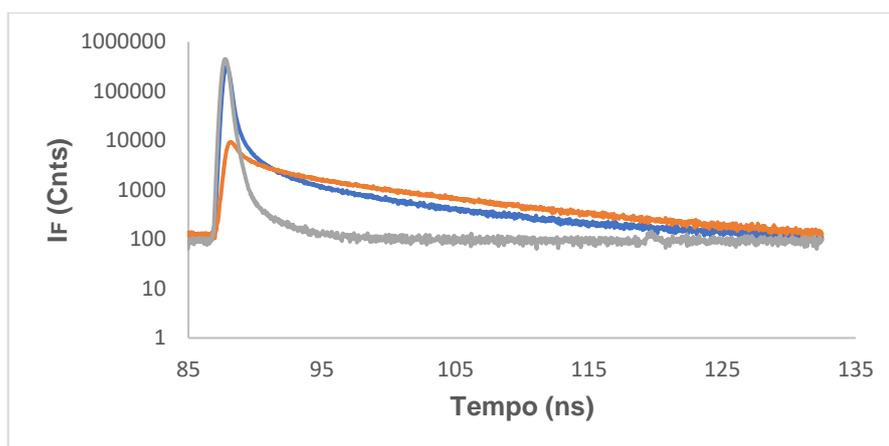


Figura 48 - Decaimentos de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido II, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 47 (—); Controlo III (—) e Controlo IV (—).

Os componentes da função tri-exponencial que traduz os decaimentos de fluorescência estão expressos na tabela 7.

Tabela 7 - Tempos de Vida de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido II, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 47; Controlo I e Controlo II.

	τ_1 (ns)	A ₁ (%)	τ_2 (ns)	A ₂ (%)	τ_3 (ns)	A ₃ (%)	χ^2	$\tau_{\text{médio}}$
Híbrido II	8,8	7,1	1,5	27,7	0,3	65,2	1,174	1,2
Controlo III	11,6	49	4,5	36	1,1	15	1,030	7,5
Controlo IV	2,1	83,8	0,3	11,9	0,1	4,3	1,167	0,2

No que diz respeito ao sistema de controlo III, constituído somente por porfirina, observa-se uma componente expressiva e com um tempo de vida de cerca de 11,6 ns, que é indicativo da complexação da TMPyP com PSS [50]. Por seu turno, no sistema de controlo constituído pelos nanobastonetes de ouro destaca-se uma componente com um tempo de vida curto ($\approx 0,1$ ns) típico da existência de nanobastonetes adsorvidos às microcápsulas.

Relativamente ao decaimento de fluorescência do sistema híbrido, o mesmo pode ser subdividido em três componentes distintas: uma componente bastante expressiva curta, que é representativa da existência de nanopartículas de ouro na superfície das microcápsulas ($\approx 0,3$ ns), uma outra que ronda os 8,8 ns e que está associada à complexação da TMPyP com o PSS e, por último, uma terceira componente cujo tempo de vida é intermédio (1,5 ns) [50].

De modo a aumentar a ocorrência de fenómenos de intensificação de fluorescência equacionaram-se alterações na estrutura do sistema, nomeadamente, uma segunda adsorção de TMPyP, um aumento da concentração de porfirina na solução de adsorção e uma inversão da posição dos AuNR e da porfirina nas microcápsulas.

Neste sentido, construíram-se dois sistemas que respeitam a estrutura de base expressa na tabela 3, e respetivos controlos, com o intuito de realizar ensaios biológicos que permitissem avaliar a citotoxicidade dos sistemas. Em ambos os sistemas adsorveram-se duas bicamadas de polieletrólitos (PAH_PSS) em torno das micropartículas de poliestireno. Num dos sistemas, a adsorção da porfirina foi feita partindo-se de uma solução de adsorção com concentração igual a 9,2 μM , seguida da adsorção de uma camada de PAH (Híbrido II.I). No que diz respeito ao outro sistema, fez-se duas adsorções consecutivas de porfirina, cuja concentração da solução de adsorção era cerca de 4,6 μM . Entre a 1ª e a 2ª adsorção da porfirina procedeu-se à adsorção de uma camada do polieletrólito PSS e depois da 2ª adsorção da porfirina, adsorveu-se uma camada do polieletrólito PAH (Híbrido II.II). Para ambos os sistemas, depois da adsorção da TMPyP e da camada de polieletrólito PAH, procedeu-se à adsorção das nanopartículas de ouro previamente revestidas com PSS.

Neste caso, o cálculo do número de moles de porfirina adsorvida (n_{ads}) foi determinado com recurso a uma reta de calibração média que relaciona a intensidade de fluorescência obtida (I_F) com a concentração de TMPyP ($[\text{TMPyP}]$) sendo que, para a construção das várias retas de calibração utilizaram-se 5 soluções de TMPyP em água com concentração conhecida.

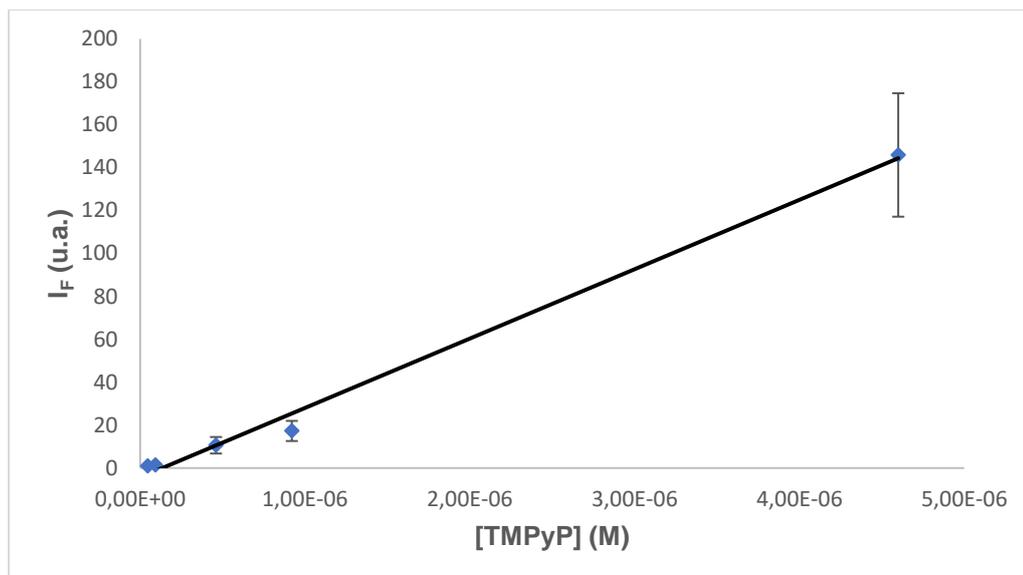


Figura 49 - Reta de Calibração que relaciona a intensidade de fluorescência com a concentração de TMPyP ($y=3,2327 \times 10^7 x - 4,3226$, com $R^2=0,994$).

Mediram-se os valores de intensidade de fluorescência dos sobrenadantes após a adsorção da TMPyP e dos sobrenadantes que resultam da adsorção das camadas de polieletrólitos que sucedem à adsorção da porfirina. O número de moles adsorvido (n_{ads}) para ambos os sistemas híbridos foi cerca de $2,76 \times 10^{-9}$ mol.

Para além do cálculo do número de moles de porfirina adsorvida, os ensaios biológicos também requerem o conhecimento do número de partículas existente em cada amostra. Mais uma vez, o número de partículas foi obtido tendo por base a luz dispersa medida através do pico da segunda ordem de difração, medido num espectrofluorímetro. A reta de calibração média (Figura 50) foi construída a partir de 3 retas de calibração diferentes representativas da intensidade da difração em função do número de partículas [58]. Na construção das retas de calibração, retirou-se $7 \mu\text{L}$ ($1,13 \times 10^9$ partículas) do frasco de núcleos de poliestireno comerciais e perpez-se para um volume de $700 \mu\text{L}$. Todos os pontos que constituem as retas de calibração são diluições desta solução original.

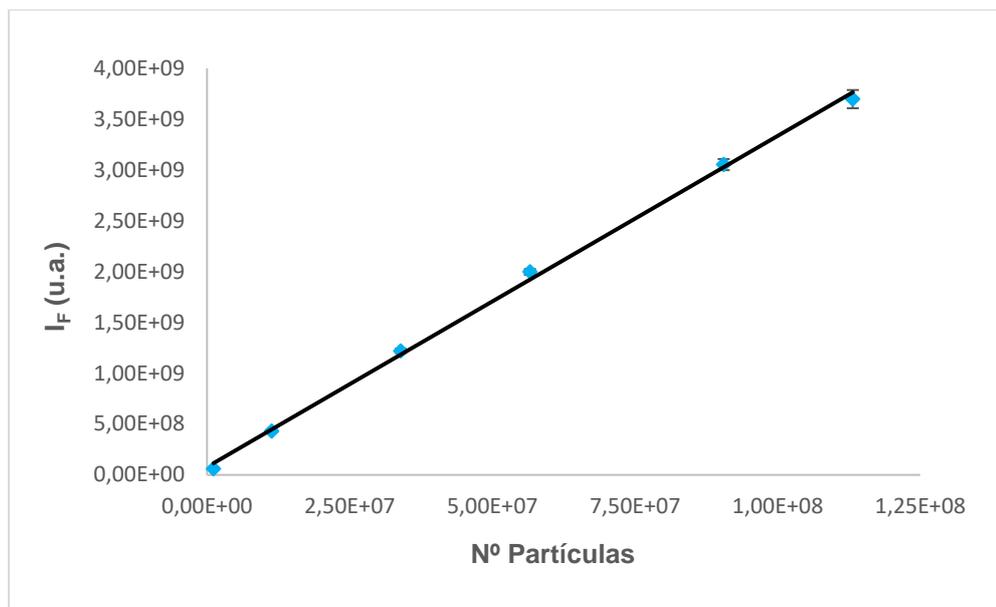


Figura 50 - Reta de Calibração que relaciona o pico de 2ª ordem da difração com o Nº de partículas ($y=32,568x+7,8155 \times 10^7$, com $R^2=0,9985$).

Na construção dos sistemas híbridos e de controlo partiu-se de um volume de cerca de 50 μL de micropartículas de poliestireno correspondente a cerca de $8,09 \times 10^9$ partículas. No entanto, ao longo dos sucessivos processos de adsorção, alguma quantidade de cápsulas vai-se perdendo nos processos de centrifugação e lavagem. Essa perda é mais acentuada no início do processo em que os núcleos são mais leves e, como tal, o processo de centrifugação não é tão eficiente. Após a adsorção da bicamada de polieletrólitos o número de partículas calculado é cerca de $4,60 \times 10^9$ partículas, o que significa que antes da adsorção da TMPyP perdem-se 43% das partículas iniciais. Posto isto, retira-se metade do volume de microcápsulas ($2,3 \times 10^9$ partículas) e procede-se à adsorção da porfirina. Depois de se adsorver a TMPyP o número de microcápsulas existente era cerca de $1,89 \times 10^9$ partículas, o que equivale a uma perda de mais 20% comparativamente com o valor de microcápsulas depois de se recolher metade do volume.

4.4.3. Intensificação de Fluorescência por Efeito Plasmónico – Análise ao Sistema Híbrido III

Numa tentativa de se observar um maior número de fenómenos de intensificação, inverteu-se a posição dos componentes do sistema, ou seja, os nanobastonetes de ouro passaram a estar posicionados entre duas camadas de PAH e a TMPyP passou a ocupar a posição mais superficial da microcápsula.

Mais uma vez, sob forma de controlo do sistema, observam-se na figura 51 microcápsulas esféricas e com um tempo de vida médio de fluorescência bastante curto.



Figura 51 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μm x 80 μm) do sistema de controlo V.

Do ponto de vista morfológico e da heterogeneidade do sistema, as microcápsulas encontram-se maioritariamente monoméricas e a quantidade de agregados existente é bastante reduzida. As imagens da Figura 52 apresentam microcápsulas individualizadas e com um tempo de vida compreendido entre o tempo de vida da TMPyP complexada com o PSS (≈ 12 ns) e o tempo de vida dos AuNR adsorvidos ($\ll 1$ ns). Esta constatação vai ao encontro das imagens de SEM, onde se observa que as microcápsulas estão revestidas com as nanopartículas e não nas áreas circundantes.

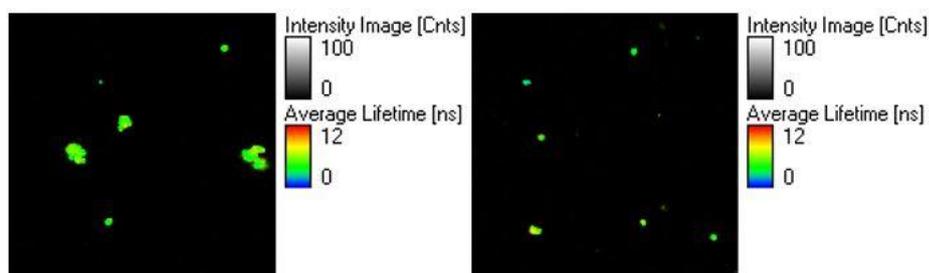


Figura 52 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μm x 80 μm) do sistema Híbrido III.

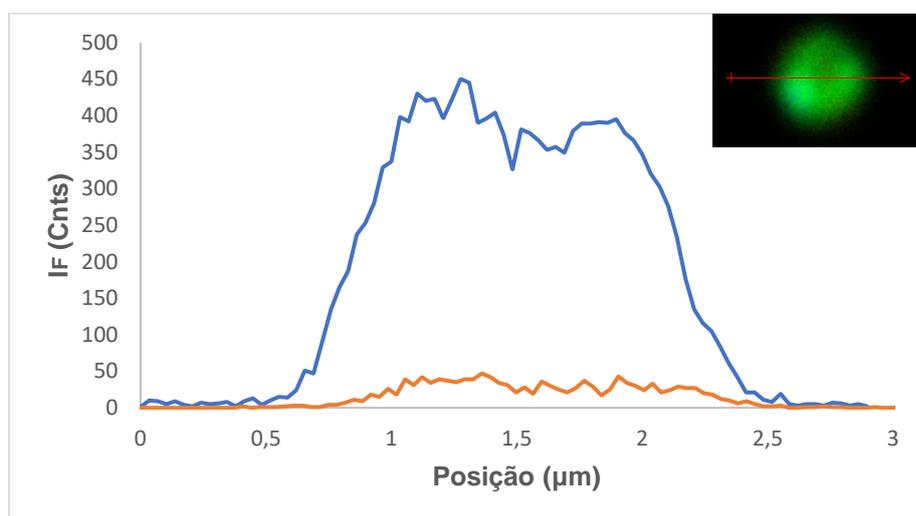


Figura 53 - Perfil de Intensidade de Fluorescência em função da posição na microcápsula para o sistema Híbrido III (—) e para o sistema de controlo V (—).

Neste caso, a intensidade de fluorescência do sistema híbrido em função da posição na microcápsula é muito superior, quando comparada com a do sistema de controlo que contém só os AuNR (Figura 53). Embora não se tenha estudado o sistema de controlo correspondente a este sistema,

com a porfirina adsorvida à última camada de polieletrólito, estima-se que o valor medido para a fluorescência deverá ser da mesma ordem de grandeza que o híbrido.

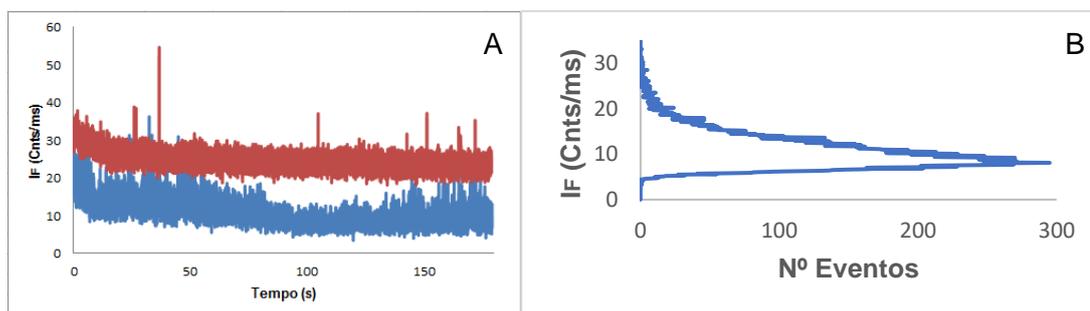


Figura 54 - Variação da Intensidade de Fluorescência em função do tempo para os sistemas: Híbrido III (—) e Controlo V (—). (A) Histograma de intensidade de fluorescência de um evento de curta duração de (A).

A medição do traço de fluorescência do sistema de controlo revela ausência de fenómenos de intensificação. Para o sistema híbrido III não se visualizam fenómenos de intensificação, sendo os traços de fluorescência do controlo e do híbrido comparáveis (Figura 54-A). Embora as imagens de SEM mostrem que as microcápsulas se encontram revestidas pelos AuNR e se tenham adsorvido cerca de $1,81 \times 10^{-9}$ mol de porfirina, o número reduzido de eventos de intensificação de fluorescência pode ser explicado pela fotodegradação da porfirina que, por se situar na parte mais externa da microcápsula, é rapidamente degradada nos primeiros instantes da irradiação (Figura 55).

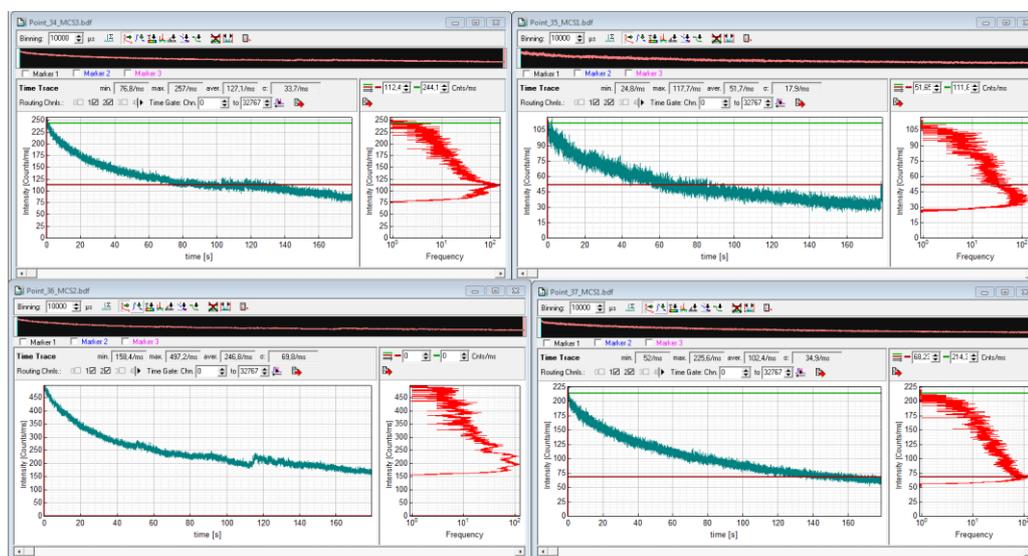


Figura 55 - Fotodegradação da TMPyP presente no sistema Híbrido III

Ainda assim, calcularam-se os valores de $\frac{F}{F_0}$ através da equação 17, que se situam entre $3,64 \times 10^4$ e $3,51 \times 10^4$. Os valores do fator de intensificação obtidos para esta arquitetura são inferiores aos sinais obtidos para os sistemas estudados nas secções anteriores. Contudo, a amostragem envolvida nos cálculos para este sistema foi muito mais reduzida (valores correspondentes à aquisição do traço de fluorescência de 4 microcápsulas), uma vez que grande parte das microcápsulas apresentava uma fotodegradação intensa nos primeiros segundos da aquisição, o que impossibilitava a recolha e o estudo rigoroso do traço de fluorescência da microcápsula.

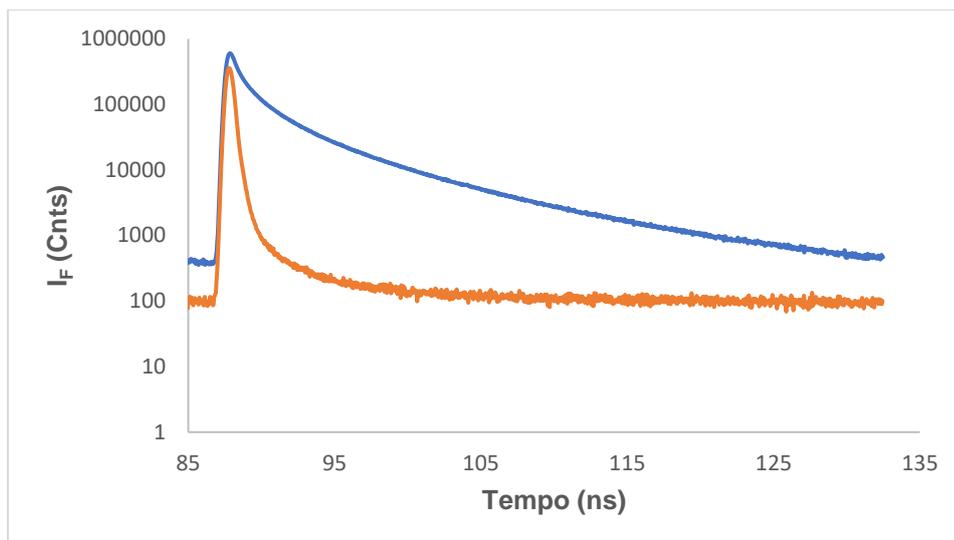


Figura 56 - Decaimentos de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido III, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 54 (—) e Controlo V (—).

O decaimento de fluorescência para este sistema pode ser descrito por uma função tri-exponencial cujos parâmetros vêm descritos na tabela 8.

Tabela 8 - Tempos de Vida de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido III, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 54 e Controlo V.

	τ_1 (ns)	A_1 (%)	τ_2 (ns)	A_2 (%)	τ_3 (ns)	A_3 (%)	χ^2	$\tau_{\text{médio}}$
Híbrido III	8,1	15,9	2,8	44,8	0,9	39,3	1,578	2,9
Controlo V	6,4	1,2	1,2	8,6	0,3	90,2	1,043	0,4

Como seria de esperar, no sistema de controlo V verifica-se que a componente maioritária é a correspondente à existência de AuNR adsorvidos às microcápsulas. O decaimento de fluorescência do sistema híbrido é muito semelhante ao do sistema inverso, isto é, com a porfirina localizada no interior da microcápsula entre duas camadas de PSS e os AuNR na parte mais superficial da mesma, dado que também aqui se observa que um maior peso da componente mais curta face à componente que ronda os 8 ns e que está associada ao complexo TMPyP-PSS [50].

Ainda que na construção deste sistema se tenha obtido microcápsulas monoméricas e com uma distribuição de tamanhos homogénea, bem como uma adsorção eficiente dos nanobastonetes de ouro e da porfirina, a fotodegradação severa da porfirina impossibilita o estudo rigoroso e preciso do sistema com recurso a técnicas de fluorescência e, como tal, optou-se por retomar a construção das microcápsulas com os nanobastonetes situados na região mais periférica destas últimas.

4.4.4. Intensificação de Fluorescência por Efeito Plasmônico – Análise ao Sistema Híbrido IV

À semelhança do que foi feito para o sistema descrito na secção 4.4.2, cujas diferenças para esta arquitetura residem na existência de somente 2 bicamadas de polieletrólitos a anteceder a porfirina e na utilização de nanobastonetes de ouro em que o $\lambda_{\text{máx}}$ do plasmão é cerca de 600 nm, também neste caso se mediram os traços de fluorescência e o tempo médio de vida do sistema.

As imagens do sistema de controlo contendo somente a porfirina já foram anteriormente apresentadas (Figura 43) e o sistema de controlo contendo somente os nanobastonetes de ouro não foi realizado por escassez de tempo, porém, assume-se que para este caso em concreto as conclusões serão em tudo idênticas às retiradas para os sistemas de controlo contendo somente os AuNR em outras arquiteturas.

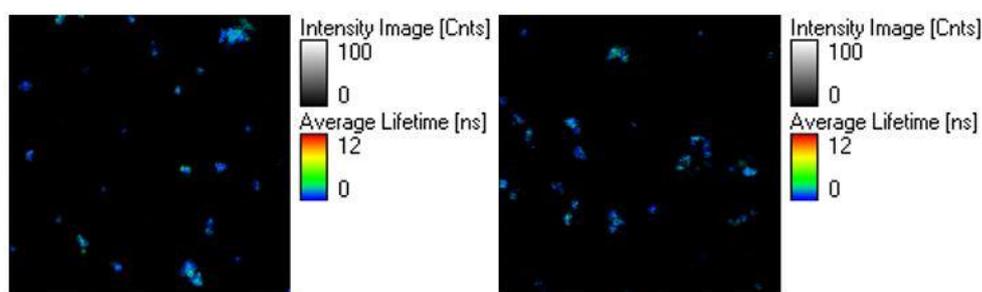


Figura 57 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μm x 80 μm) do sistema Híbrido IV.

Nas imagens da Figura 57, para além das microcápsulas individuais, observam-se também alguns agregados de micropartículas, sem que haja nanobastonetes em solução.

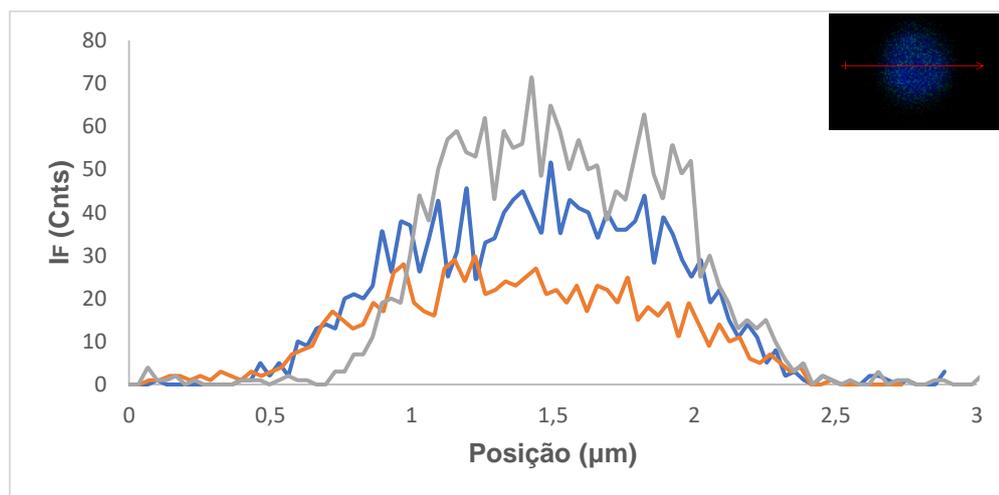


Figura 58 - Perfil de Intensidade de Fluorescência em função da posição na microcápsula para o sistema Híbrido IV (—) e para os sistemas de controlo III (—) e IV (—).

O estudo da intensidade de fluorescência para vários pontos na micropartícula (Figura 58) revela que a intensidade de fluorescência do sistema híbrido é semelhante à intensidade de

fluorescência obtida para o sistema de controlo contendo somente os nanobastonetes de ouro, e superior à do sistema de controlo da porfirina. Tal como sucedera no sistema constituído pelos AuNR com SPR= 650 nm (Híbrido II), também se espera que neste caso o efeito plasmónico na intensificação global de fluorescência seja diminuto. Embora não tenha sido possível calcular o número de moles de porfirina adsorvida, após adsorção de PSS e lavagens/centrifugação, o sobrenadante apresentava uma cor alaranjada e, como tal, o valor de intensidade de fluorescência registado para o Híbrido IV está novamente associado à grande quantidade de TMPyP que é lixiviada aquando da adsorção do PSS.

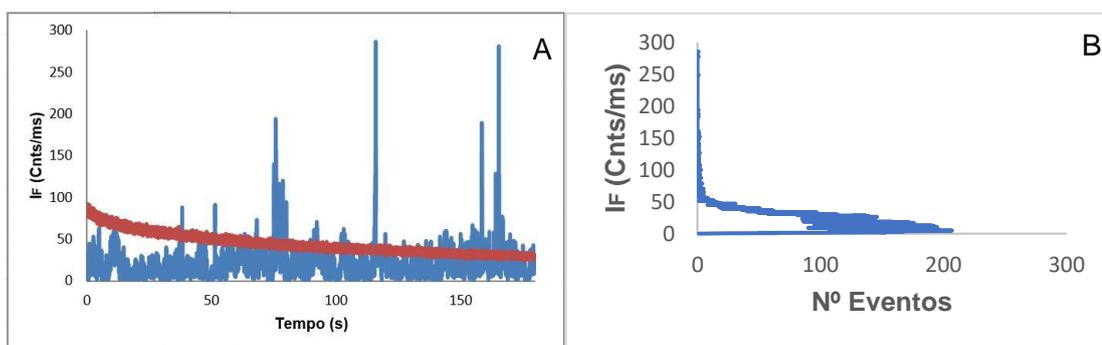


Figura 59 - Variação da Intensidade de Fluorescência em função do tempo para os sistemas: Híbrido IV (—) e Controlo III (—). (A) Histograma de intensidade de fluorescência de um evento de curta duração de (A).

Ao longo do tempo de aquisição observa-se a ocorrência de vários fenómenos de intensificação de fluorescência, cujos fatores de intensificação ($\frac{F}{F_0}$) estão compreendidos entre $2,48 \times 10^4$ e $7,86 \times 10^5$ e possuem um valor médio de $1,39 \times 10^5$. Apesar da existência destes fenómenos de intensificação chega-se à conclusão de que a grande maioria do número de eventos contabilizados ao longo do tempo apresenta valores de intensidade de fluorescência que rondam as 20-30 Cnts/ms (Figura 59-B). A ordem de grandeza dos fatores de intensificação obtidos é semelhante à dos restantes sistemas estudados sendo que, pelas imagens recolhidas no SEM, as microcápsulas encontram-se amplamente revestidas pelos AuNR, logo, a explicação para os valores obtidos prende-se com a quantidade de porfirina lixiviada, que torna mais improvável a passagem de moléculas pelos *hotspots* entre as nanopartículas.

O decaimento de fluorescência para este sistema vem representado na Figura 60 e pode ser descrito por uma função tri-exponencial cujos parâmetros vêm expressos na tabela 9.

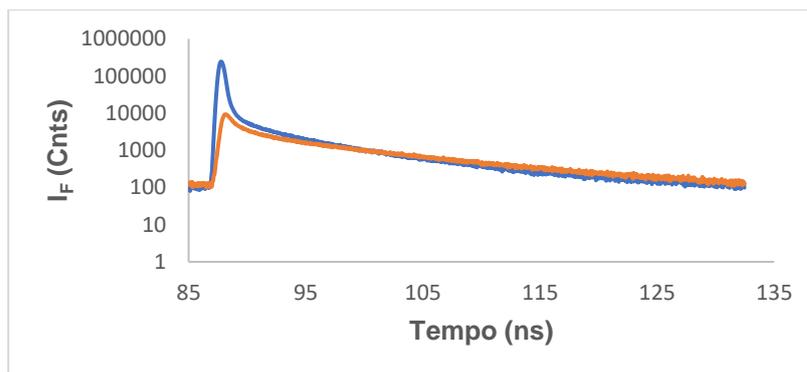


Figura 60 - Decaimentos de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido IV, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 59 (—) e Controle III (—).

Tabela 9 - Tempos de Vida de Fluorescência dos Sistemas: Híbrido IV, correspondente a um dos eventos de curta duração expressos na Figura 59 e Controle III.

	τ_1 (ns)	A_1 (%)	τ_2 (ns)	A_2 (%)	τ_3 (ns)	A_3 (%)	χ^2	$\tau_{\text{médio}}$
Híbrido IV	8,3	16,9	2,1	21,8	0,3	61,3	1,147	2,0
Controlo III	11,6	49	4,5	36	1,1	15	1,030	7,5

O decaimento de fluorescência do sistema híbrido é típico de um sistema que na sua constituição apresenta TMPyP complexada com o PSS ($\approx 8,3$ ns) e nanobastonetes de ouro ($\approx 0,3$ ns). Fazendo uma comparação entre este sistema e o seu semelhante (Híbrido II – secção 4.4.2), é visível que embora o híbrido também apresente sinais da TMPyP complexada ao PSS, o peso relativo desta componente na função tri-exponencial é mais baixo, o que pode ser indicativo de uma maior quantidade de porfirina lixiviada no processo. Seguindo-se um raciocínio análogo, chega-se à conclusão de que para os nanobastonetes de ouro revestidos com PSS, a sua componente da função tri-exponencial é menos pronunciada, o que pode significar uma adsorção mais eficiente por parte dos AuNR com SPR a 650 nm em vez de 600 nm.

No que diz respeito ao tempo de vida médio de fluorescência do sistema, as conclusões que se retiram são as mesmas que para o sistema semelhante constituído por AuNR com SPR= 650 nm (secção 4.4.2), ou seja, obtém-se um valor muito curto que é indicativo da existência de nanopartículas de ouro adsorvidas, tal como se comprova com as imagens de SEM. No entanto, esperava-se um valor superior devido à presença da porfirina no sistema.

Em suma, pode-se concluir que os fenómenos de intensificação obtidos são da mesma ordem de grandeza e, por isso, fazendo-se uma avaliação de todos os fatores existentes a favor ou contra cada uma dessas arquiteturas, optou-se por desenvolver microcápsulas em que a porfirina está situada entre as camadas de polieletrólito e os AuNR com SPR= 650 nm na parte mais exterior da microcápsula para a realização dos ensaios de citotoxicidade.

5. Ensaio de Citotoxicidade envolvendo células HeLa

De modo a avaliar o potencial destas nanopartículas para uma possível fototerapia anti-câncer, testou-se a sua capacidade citotóxica *in vitro*. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com recurso a células HeLa originárias de adenocarcinoma humano. Para além do estudo dos sistemas híbridos (II.I e II.II) e respetivos controlos, avaliou-se também o efeito da adição em separado de cada um dos componentes que constituem o sistema, isto é, micropartículas de poliestireno, nanopartículas de ouro e porfirina. Procedeu-se a dois ensaios diferentes, em que a diferença de um para o outro reside na irradiação das amostras. Em ambos os casos foram realizadas 3-4 réplicas e adicionado um volume equivalente a 1×10^6 partículas por poço.

Após a junção dos sistemas às células, ao fim de 24h, 48h ou 72h, adicionou-se 20 μL de uma solução de resazurina (0,1 mg/mL). A resazurina é amplamente utilizada como indicador da viabilidade de células, sendo um composto de cor azul, pouco fluorescente e que se difunde para o interior da célula onde é reduzida a resorufina (composto cor-de-rosa e muito fluorescente) por ação de enzimas existentes no interior das células [59]. A resazurina apresenta um $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção a 600 nm e é convertida pelas células metabolicamente ativas em resorufina, cujo $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção se situa nos 570 nm [60]. Assim sendo, para cada um dos 3 dias, ao fim de 4h de incubação após adição da resazurina mediu-se a absorvância das amostras existentes em cada um dos poços aos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm. O rácio entre os valores médios de absorvância ($\frac{A_{570}}{A_{600}}$) é normalizado fazendo-se a média da diferença entre o valor de absorvância lido e o valor de absorvância do controlo, isto é, de um poço contendo o respetivo composto em estudo e meio de cultura (sem células).

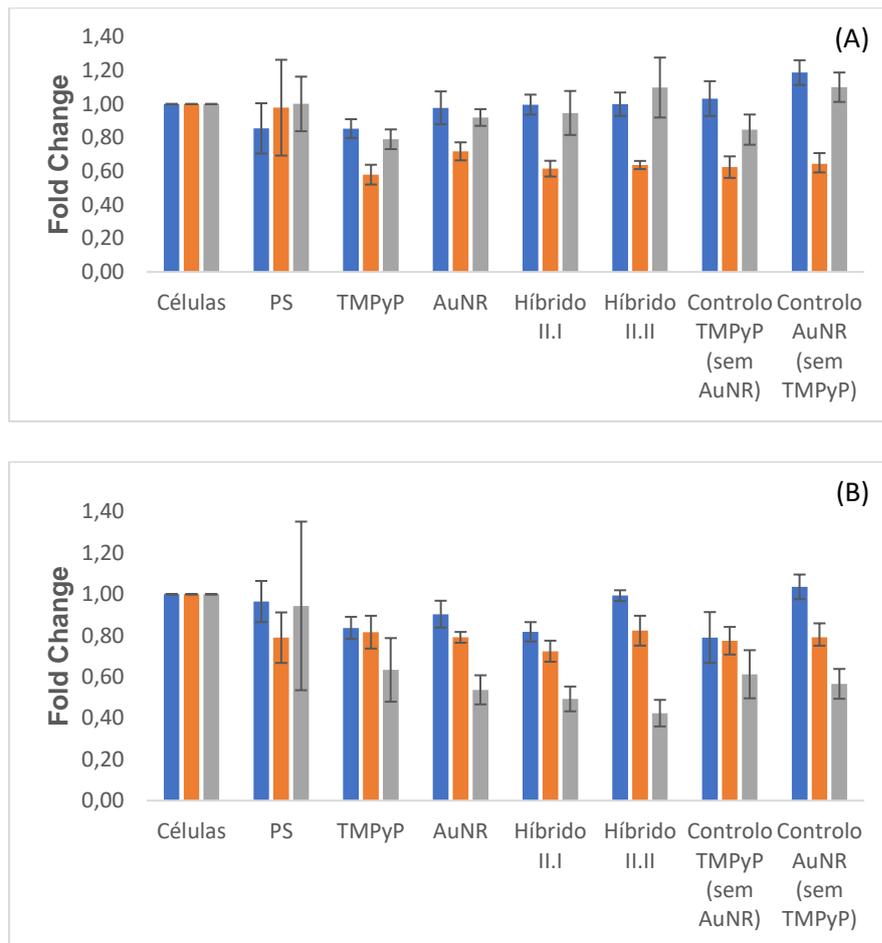


Figura 61 - Ensaio de Citotoxicidade utilizando-se resazurina para a placa não irradiada (A) e irradiada (B) ao fim de 24h (—), 48h (—) e 72h (—).

Para o ensaio em que não houve irradiação da amostra (Figura 61-A), utilizou-se uma solução de porfirina em água com uma concentração igual a 5 μ M.

Ao fim de 24h pode-se inferir que praticamente toda a resazurina foi convertida a resorufina, com exceção das micropartículas de poliestireno e da TMPyP em que se observou uma diminuição de 15% no valor da viabilidade celular. Ao fim de 48h verifica-se um valor de cerca de 35% de morte celular em quase todas as condições testadas, que pode ter sido induzida por alguma citotoxicidade associada às moléculas de polieletrólitos que existem, quer nos sistemas híbridos, quer nos controlos. A diferença no valor da percentagem de viabilidade após 24h e 48h pode não se dever exclusivamente à morte celular de algumas das células. Existe a possibilidade de se estabelecerem interações entre as cargas positivas da porfirina tetracatiónica e carga negativa de um dos oxigénios existentes da molécula de resazurina, o que pode fazer com que nem todas as moléculas de resazurina se convertam em resorufina, resultando numa diminuição do rácio ($\frac{A_{570}}{A_{600}}$). A morte celular que ocorre nos poços contendo AuNR pode dever-se ao facto destes serem preparados em soluções aquosas de CTAB, citotóxicas para o organismo pois induzem a destruição das membranas celulares [26]. Ao fim de 72h é visível uma recuperação na viabilidade celular, sendo possível que o efeito citotóxico observado às 48h tenha

estagnado e sido suplantado pelo crescimento das células que sobreviveram durante o ensaio e iniciaram o seu processo de divisão.

No ensaio em que se procedeu à irradiação das amostras (Figura 61-B), repetiram-se as restantes condições experimentais explicitadas em cima para o ensaio não irradiado, com exceção da concentração de porfirina. Neste caso usou-se uma concentração 200 vezes inferior ($0,024 \mu\text{M}$) com o intuito de replicar a concentração de porfirina existente nos sistemas híbridos. O aparelho experimental utilizado não permite a irradiação da amostra a um comprimento de onda definido, ainda assim o papel celofane usado atua como um filtro à passagem da radiação, passando somente parte da energia com λ próximos da zona do vermelho do espectro visível. Tendo por base a literatura, optou-se por irradiar a amostra durante 20 min, o que considerando a potência da lâmpada nas condições experimentais referidas corresponde a uma potência de $17,59 \text{ mW/cm}^2$ ($21,11 \text{ J/cm}^2$) [61].

A placa foi apenas irradiada no início do ensaio e para as primeiras 24h de ensaio, as conclusões que se podem retirar são semelhantes às da experiência não irradiada. Relativamente aos sistemas contendo porfirina, é notório um aumento da citotoxicidade ao longo do tempo, com especial ênfase das 48h para as 72h, o que pode ser explicado pela geração de oxigénio singuleto por parte da TMPyP. Embora não seja claro se os sistemas híbridos e de controlo são internalizados nas células, a molécula de oxigénio singuleto é capaz de se difundir até cerca de 268 nm, que é uma distância superior à espessura da membrana celular ($\approx 75\text{-}100 \text{ \AA}$), acumulando-se preferencialmente no complexo de Golgi e nos lisossomas provocando a sua rutura [16][47].

A diminuição da viabilidade celular após irradiação em poços contendo AuNR e na ausência de TMPyP pode estar associada a um fenómeno de terapia fototérmica, isto é, a radiação que incide sobre a placa é absorvida pelos nanobastonetes de ouro, sendo posteriormente convertida em calor. Dada a proximidade destes compostos com as células, o aquecimento local como resultado da libertação de calor pode ter originado alguma morte celular [62].

6. Conclusões e Perspetivas Futuras

Neste trabalho desenvolveram-se dois procedimentos diferentes para obtenção de microcápsulas de polieletrólitos. Os dois conjuntos de microcápsulas distinguem-se entre si pelo tipo de núcleos que serviu de base à adsorção das moléculas de polieletrólitos (poliestireno ou CaCO_3).

As microcápsulas de poliestireno fotoativas apresentam um formato esférico e a adsorção da porfirina tetra-catiónica TMPyP, bem como dos nanobastonetes de ouro foi feita no revestimento das microcápsulas. As propriedades espectroscópicas foram avaliadas por espectroscopia de absorção UV-VIS e a fluorescência foi estudada através de microscopia de tempos de vida de fluorescência (FLIM).

Fez-se variar a posição relativa destes dois componentes no sistema com o intuito de promover a intensificação de fluorescência da porfirina por ação do efeito de antena plasmónico característico dos AuNR. Efetuou-se também um ensaio com nanobastonetes de ouro cujo $\lambda_{\text{máx}}$ do plasmão era cerca de 600 nm com o mesmo propósito. Embora pouco conclusivos, o sistema com a porfirina adsorvida

entre as camadas de polieletrólito e os nanobastonetes adsorvidos na camada mais superficial das microcápsulas é aquele que apresenta maior número de eventos de intensificação, sem que ocorra fotodegradação da porfirina. Futuramente, é importante explorar a concentração de porfirina que potencia a intensificação de fluorescência do fluoróforo, bem como a quantidade de nanopartículas necessária para que haja um revestimento eficiente das microcápsulas.

No caso das microcápsulas de CaCO_3 , fizeram-se experiências em que a porfirina foi incorporada no núcleo e outras em que a mesma foi adsorvida após revestimento de uma bicamada de polieletrólito na parte mais superficial da microcápsula. Com estes sistemas procedeu-se ao estudo da produção do oxigénio singuleto por parte da porfirina, analisado através da degradação do DPBF, tendo os resultados sido acompanhados por espectroscopia de emissão de fluorescência e UV-VIS. Chegou-se à conclusão de que o sistema com a porfirina situada na parte mais superficial da microcápsula produz uma quantidade de oxigénio singuleto de, pelo menos, 2,3 vezes superior à dos sistemas em que a porfirina se encontra no núcleo. Como perspetiva futura sugere-se um estudo que retrate a produção de oxigénio singuleto em função da concentração de porfirina utilizada, com o intuito de perceber qual a concentração de porfirina que maximiza essa mesma produção.

Ao longo das várias observações microscópicas realizadas para ambos os conjuntos de microcápsulas, observou-se algum grau de agregação dos sistemas, principalmente no momento da adsorção do polieletrólito PAH de alto peso molecular e, por isso, sugere-se a tentativa de mudança para outro polieletrólito como, por exemplo, o PDADMAC. Nesta linha de raciocínio, outra hipótese que emerge implica a troca de ambos os polieletrólitos utilizados (PAH e PSS) por outro par de polieletrólitos (quitosano/alginato).

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com recurso a células HeLa originárias de adenocarcinoma humano, tendo-se utilizado a resazurina como indicador da viabilidade das células. Num dos ensaios a placa não foi irradiada, enquanto no outro fez-se incidir sobre a placa radiação com um comprimento de onda da zona do vermelho. Avaliou-se a citotoxicidade de sistemas de microcápsulas híbridos e respetivos controlos, assim como o efeito da adição de cada um dos componentes do sistema individualmente. Destes ensaios pode concluir-se que se verifica uma maior perda de viabilidade celular quando a amostra é irradiada, o que é resultado da geração de oxigénio singuleto por parte da TMPyP e da possível existência de efeito fototérmico provocado pelas nanopartículas de ouro. Num trabalho futuro, seria interessante repetir os ensaios utilizando um meio de cultura sem soro para que não se observe o crescimento celular e se possa avaliar com mais rigor o efeito da citotoxicidade dos compostos para tempos de ensaio mais longos. Ao mesmo tempo, seria interessante avaliar a internalização dos sistemas híbridos nas células, sendo que para isso se poderia proceder ao revestimento das microcápsulas com ácido fólico para que a internalização nas células seja mais eficiente ou revestir as nanopartículas de ouro com outro tipo de compostos (ex: anticorpos) que contribuem para a deteção e acumulação nas células cancerígenas [63].

7. Referências Bibliográficas

- [1] – Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 1-2.
- [2] – Chinen, A. B., Guan, C. M., Ferrer, J. R., Barnaby, S. N., Merkel, T. J., Mirkin, C. A. (2015). Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells and Tissues by Fluorescence. *Chemical Reviews*, 115(19), 10530-10539.
- [3] – Cofrey, J. C., Wang, J. H., Smith, M. J. F., Bouchier-Hayes, D., Cotter, T. G., Redmond, H. P. (2003). Excisional surgery for cancer cure: therapy at a cost. *The Lancet Oncology*, 4, 760-768.
- [4] – Swain, S. M. (2011). Chemotherapy: Updates and New Perspectives, *The Oncologist*, 16, 30-39.
- [5] – Castaneda, S. A., Strasser, J. (2017). Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy. *Surgical Oncology Clinics*, 16, 371-382.
- [6] – Alisson, R. R., Sibata, C. H. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7, 61-75.
- [7] – Van Straten, D., Mashayekhi, V., Brujin, H. S., Oliveira, S., Robinson, D. J. (2017). Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. *Cancers*, 9, 1-54.
- [8] – Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., Golab, J. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61, 250-281.
- [9] – Aggarwal, A., Samaroo, D., Jovanovic, I. R., Singh, S., Tuz, M. P., Machiewicz, M. R. (2019). Porphyrinoid-based photosensitizers for diagnostic and therapeutic applications: An update. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 23, 1-37.
- [10] – Berg, K., Selbo, P. K., Weyergang, A., Dietze, A., Prasmickaite, L., Bonsted, A., Engesaeter, B. Ø., Angellpetersen, E., Warloe, T., Frandsen, N., Høgset, A. (2005). Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *Journal of Microscopy*, 218(2), 133-147.
- [11] – Halliwell, B. (1991). Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. *The American Journal of Medicine*, 91, 14-23.
- [12] – Brown, S. B., Brown, E. A., Walker, I. (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The Lancet Oncology*, 5, 497-508.

[13] – Zhang, J., Jiang, C., Longo, J. P. F., Azevedo, R. B., Zhang, H., Muehlmann, L. A. (2018). An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(2), 137-146.

[14] – Wan, M. T., Lin, J. Y. (2014). Current Evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 7, 145-163.

[15] – Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kedzierska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., Kulkacka, J. (2018). Photodynamic Therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106, 1098-1107.

[16] – Garcia-Sampedro, A., Tabero, A., Mahamed, I., Acedo, P. (2019). Multimodal use of the porphyrin TMPyP: From cancer therapy to antimicrobial applications. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 23, 1-17.

[17] – Snyder, J. W., Lambert, J. D. C., Ogilby, P. R. (2006). 5,10,15,20-Tetrakis(N-Methyl-4-Pyridyl)-21H, 23H-Porphine (TMPyP) as a Sensitizer for Singlet Oxygen Imaging in Cells: Characterizing the Irradiation-dependent Behavior of TMPyP in a Single Cell. *Photochemistry and Photobiology*, 82, 177-184.

[18] – Vergaro, V., Scarlino, F., Bellomo, C., Rinaldi, R., Vergara, D., Maffia, M., Baldassarre, F., Giannelli, G., Zhang, X., Lvov, Y. M., Leporatti, S. (2011). Drug-loaded polyelectrolyte microcapsules for sustained targeting of cancer cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 847-864.

[19] – Borodina, T. N., Rumsh, L. D., Kunizhev, S. M., Sukhorukov, G. B., Vorozhtsov, G. N., Feldman, B. M., Markvicheva, E. A. (2008). Polyelectrolyte Microcapsules as the Systems for Delivery of Biologically Active Substances. *Biochemistry (Moscow) Supplement Serie B: Biomedical Chemistry*, 2, 88-93.

[20] – Del Mercato, L. L., Ferraro, M. M., Baldassarre, F., Mancarella, S., Greco, V., Rinaldi, R., Leporatti, S. (2014). Biological applications of LbL multilayer capsules: From drug delivery to sensing. *Advances in Colloid and Interface Science*. 207, 139-154.

[21] – De Geest, B. G., De Koker, S., Sukhorukov, G. B., Kreft, O., Parak, W. J., Skirtach, A. G., Demeester, J., De Smedt, S. C., Hennink, W. E. (2009). Polyelectrolyte microcapsules for biomedical applications, *Soft Matter*, 5, 282-291.

[22] – Dai, Z., Voigt, A., Leporatti, S., Donath, E., Dähne, L., Möhwald, H. (2001). Layer-by-Layer Self-Assembly of Polyelectrolyte and Low Molecular weight Species into Capsules, *Advanced Materials*, 13, 1339-1342.

[23] – Sukhorukov, G. B., Donath, E., Lichtenfeld, H., Knippel, E., Knippel, M., Budde, A., Möhwald. (1998). Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloids and Surfaces*. 137, 253-266.

[24] - [41] – Svenskaya, Y., Pavlov, A. M., Gorin, D. A., Gould, D. J., Parakhonskiy, B. V., Sukhorukov, B. V. (2016). Photodynamic therapy platform based on localized delivery of photosensitizer by vaterite submicron particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 171-179.

[25] – Huang, X., El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy, *Journal of Advanced Research*, 1, 13-28.

[26] – Chen, H., Shao, L., Li, Q., Wang, J. (2013). Gold nanorods and their plasmonic properties, *The Royal Society of Chemistry*, 42, 2679-2724.

[27] – Link, S., Mohamed, M. B., El-Sayed, M. A. (1999). Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant, *American Chemical Society*, 103, 3073-3077.

[28] – Shao, J., Xuan, M., Dai, L., Si, T., Li, J., He, Q. (2015). Near-Infrared-Activated Nanocalorifiers in Microcapsules: Vapor Bubble Generation for In Vivo Enhanced Cancer Therapy, *Angew. Chem*, 54, 12787-12787.

[29] – Khatua, S., Paulo, P. M. R., Yuan, H., Gupta, A., Zijlstra, P., Orrit, M. (2014). Resonant Plasmonic Enhancement of Single-Molecule Fluorescence by Individual Gold Nanorods, *ACS Nano*, 5, 4440-4449.

[30] – Bardhan, R., Grady, N. K., Cole, J. R., Joshi, A., Halas, N. J. (2009). Fluorescence Enhancement by Au Nanostructures: Nanoshells and Nanorods, *ACS Nano*, 3, 744-752.

[31] – Sommer, L. (1989). Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet: The Principles, *Elsevier Science Publishers*, 8ª edição.

[32] – Valeur, B. (2009). Molecular Fluorescence, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, 3, 477-532.

[33] – Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not. *Journal of Control Release*, 235, 337-351.

[34] – Zhou, W., Apkarian, R. P., Wang, Z. L., Joy, D. (2006). Fundamentals of Scanning Electron Microscopy, *Springer*, 1-40.

[35] – Müller, M. (2006). *Introduction to Confocal Fluorescence Microscopy*, *SPIE PRESS*, 2ª edição.

[36] – Elliott, A. D. (2019). Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices, *Current Protocols in Cytometry*, 92, 1-11.

[37] – Trautmann, S., Buschmann, V., Orthaus, S., Koberling, F., Ortmann, U., Erdmann, R. Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) in Confocal Microscopy Applications: An Overview, *PicoQuant GmbH*, 1-14.

[38] – Chang, C. W., Sud, D., Mycek, M. A. (2007). Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, *Methods in Cell Biology*, 81, 495-524.

[39] – Teixeira, R., Serra, V. V., Paulo, P. M. R., Andrade, S. M., Costa, S. M. B. (2015). Encapsulation of photoactive porphyrinoids in polyelectrolyte hollow microcapsules viewed by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM), *Royal Society of Chemistry Advances*, 5, 79050-79060.

[40] – Munechika, K., Chen, Y., Tilack, A. F., Kulkarni, A.P., Plante, I. J., Munro, A. M., Ginger, D. S. (2010). Spectral Control of Plasmonic Emission Enhancement from Quantum Dots near Single Silver Nanoprisms. *Nano Letters*, 10(7), 2598-2603.

[41] – Chen, Y., Munechika, K., Ginger, D. S. (2007). Dependence of Fluorescence Intensity on the Spectral Overlap between Fluorophores and Plasmon Resonant Single Silver Nanoparticles. *Nano Letters*, 7(3), 690-696.

[42] – Jada, A., Jradi, K. (2006). Role of polyelectrolytes in crystallogenesis of calcium carbonate. *Macromolecular Symposia*. 233, 147-151.

[43] – Tong, W., Dong, W., Gao, C., Möhwald, H. (2005). Charge-Controlled Permeability of Polyelectrolyte Microcapsules. *American Chemical Society*, 109, 13159-13165.

[44] – Fuller, M., Köper, I. (2018). Polyelectrolyte-coated gold nanoparticles: The Effect of salt and polyelectrolyte concentration on colloidal stability. *Polymers*, 10(12).

[45] – Entradas, T., Waldron, S., Volk, M. (2020). The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 204, 1-11.

[46] – Zhang, X. F., Li, X. (2011). The Photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran. *Journal of Luminescence*, 131, 2263-2266.

[47] – Skovsen, E., Snyder, J. W., Lambert, J. D. C. Ogilby, P. R. (2005). Lifetime and Diffusion of Singlet Oxygen in a Cell. *The Journal of Physical Chemistry*, 109, 8570-8573.

[48] – Kano, K., Nakajima, T., Takei, M., Hashimoto, S. (1987). Self Aggregation of Cationic Porphyrin in Water. *The Chemical Society of Japan*, 60, 1281-1287.

[49] - Vergeldt, F. J., Koehorst, R. B. M., Van Hoek, A., Schaafsma, T. J. (1995). Intramolecular interactions in the ground and excited state of tetrakis(N-methylpyridyl)porphyrins. *Journal of Physical Chemistry*, 99(13), 4397-4405.

[50] - Serra, V. V., Teixeira, R., Andrade, S. M., Costa, S. M. B. (2016). Design of polyelectrolyte core-shells with DNA to control TMPyP binding. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146, 127-135.

- [51] – Chen, L., Jiang, L., Wang, Y., Qian, J., He, S. (2010). Multilayered polyelectrolyte-coated gold nanorods as multifunctional optical contrast agents for cancer cell imaging. *Journal of Zhejiang University Science B*, 11(6), 417-422.
- [52] – Wilson, C. G., Sisco, P. N., Gadala-Maria, F. A., Murphy, C. J., Goldsmith, E. C. (2009). Polyelectrolyte-Coated Gold Nanorods and their interactions with Type I Collagen. *Biomaterials*, 30(29), 5639-5648.
- [53] – Mayya, K. S., Schoeler, B., Caruso, F. (2003). Preparation and Organization of Nanoscale Polyelectrolyte-Coated Gold Nanoparticles. *Advanced Functional Materials*, 13, 183-188.
- [54] – Gole, A., Murphy, C. J. (2005). Polyelectrolyte-Coated Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Immobilization. *Chemistry of Materials*, 17(6), 1325-1330.
- [55] – Jung, B. J., Yoo, H., Stellaci, F., Jung, H. (2010). Two-Photon Excited Fluorescence Enhancement for Ultrasensitive DNA Detection on Large-Area Gold Nanopatterns, *Advanced Materials*, 22, 2542-2546.
- [56] – Francisco, A. P., Botequim, D., Prazeres, D. M. F., Serra, V. V., Costa, S. M. B., Laia, C. A. T., Paulo, P. M. R. (2019). Extreme Enhancement of Single-Molecule Fluorescence from Porphyrins Induced by Gold Nanodimer Antennas. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 10, 1542-1549.
- [57] – Petrov, A. I., Antipov, A. A., Sukhorukov, G. B. (2003). Base-Acid Equilibria in Polyelectrolyte Systems: From Weak Polyelectrolytes to Interpolyelectrolyte Complexes and Multilayered Polyelectrolyte Shells, *Macromolecules*, 36, 10079-10086.
- [58] – <https://www.edinst.com/blog/second-order-diffraction/>, consultado em Setembro 2021.
- [59] – Chen, J. L., Steele, T. W. J., Stuckey, D. C. (2017). Metabolic Reduction of resazurina; location within the cell for cytotoxicity assays. *Biotechnology and Bioengineering*, 115, 351-358.
- [60] – Rezende, N., Jayme, C. C., Brassesco, M. S., Tedesco, A. C., Oliveira, H. F. (2019). Standardization of a resazurina-based assay for the evaluation of metabolic activity in oral squamous carcinoma and glioblastoma cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 26, 371-374.
- [61] – Serra, V. V., Camões, F., Vieira, S. I., Faustino, M. A. F., Tomé, J. P. C., Pinto, D. C. G. A., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Silva, A. M. S., Silva, E. F. C., Cavaleiro, J. A. S. (2009). Synthesis and Biological Evaluation of Novel Chalcone-Porphyrin Conjugates. *Acta Chim Slov*, 56, 603-611.
- [62] – Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W., El-Sayed, M. A. (2006). Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *American Chemical Society*, 128, 2115-2120.
- [63] – Villaverde, G., Baeza, A. (2019). Targeting strategies for improving the efficacy of nanomedicine in oncology. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 10, 168-181.

8. Anexos

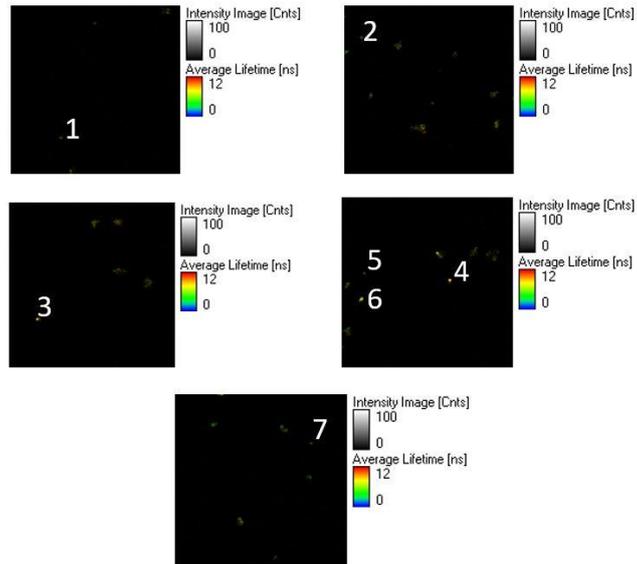


Figura 1 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μm x 80 μm) de algumas microcápsulas analisadas, referentes ao sistema de controle III.

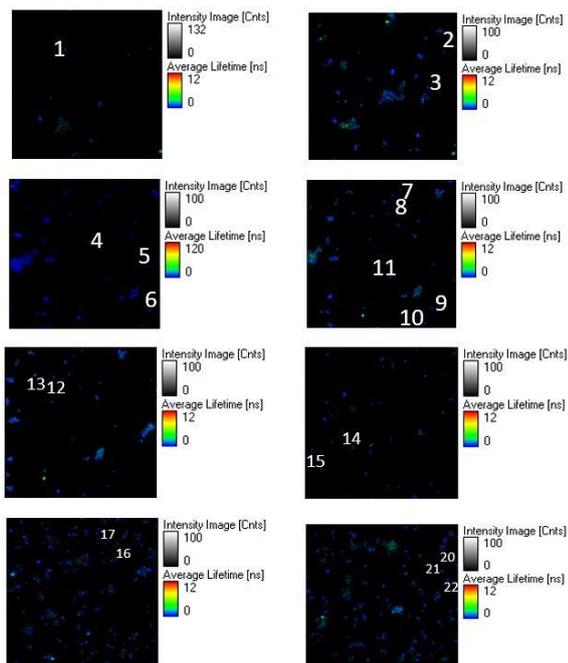


Figura 2 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μm x 80 μm) de algumas microcápsulas analisadas, referentes ao sistema de controle IV.

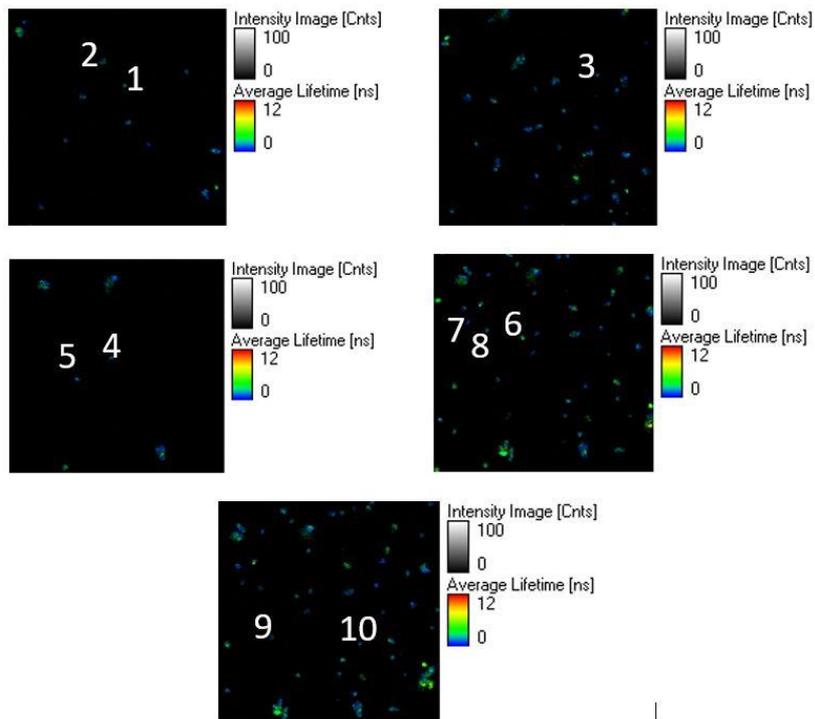


Figura 3 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μm x 80 μm) de algumas microcápsulas referentes ao sistema Híbrido II.

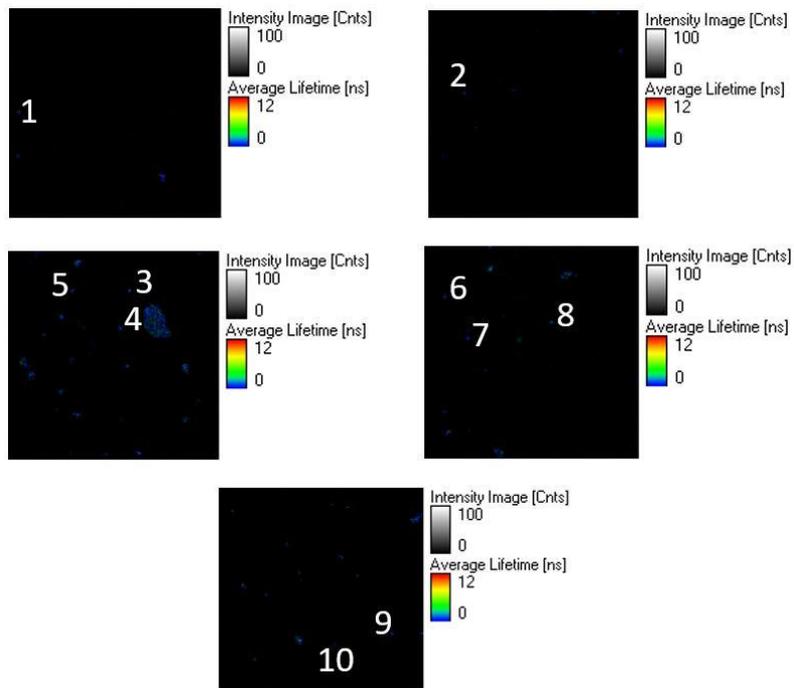


Figura 4 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μm x 80 μm) de algumas microcápsulas referentes ao sistema de controle V.

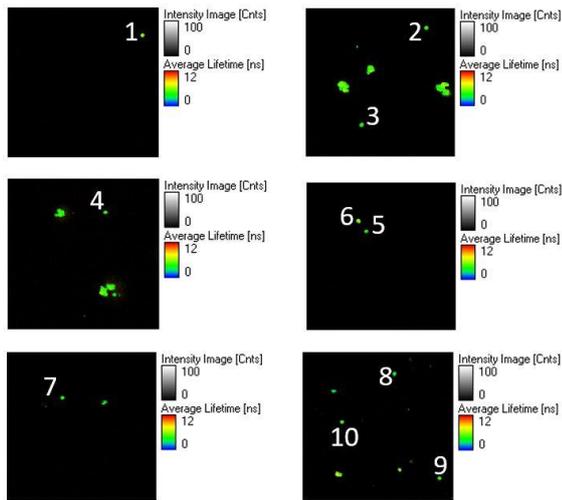


Figura 5 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μm x 80 μm) de algumas microcápsulas referentes ao sistema Híbrido III.

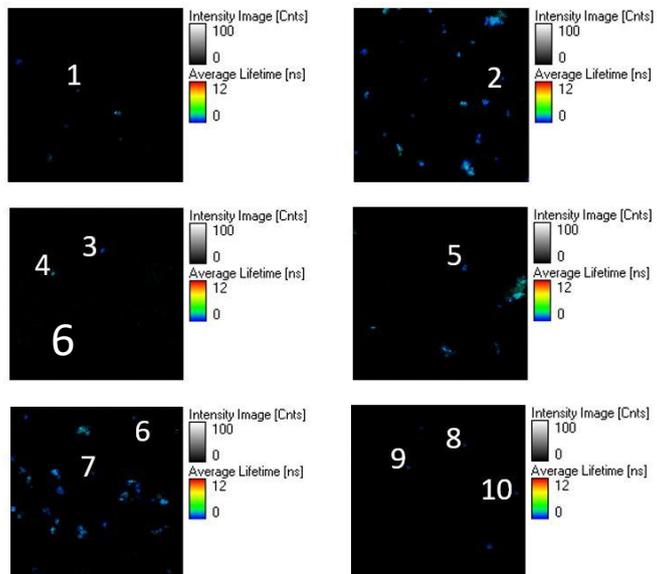


Figura 6 - Imagens de microscopia confocal de fluorescência (80 μm x 80 μm) de algumas microcápsulas referentes ao sistema Híbrido IV.