



Universidade de Aveiro
2012

Departamento de Química

**Maria da Graça
dos Santos
Oliveira**

**Nanocompósitos para a libertação de fármacos
controlada por radiação**



Maria da Graça dos Santos Oliveira **Nanocompósitos para a libertação de fármacos controlada por radiação**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Luísa Daniel da Silva, Investigadora Auxiliar do Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CICECO) da Universidade de Aveiro

“Num monte de terra pode-se encontrar uma pedra preciosa que só precisa de ser polida.”

Mencionada por Jerónimo Nunes

O júri

Presidente

Doutor Carlos Manuel Santos Silva

Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Luísa Daniel da Silva

Investigadora Auxiliar do Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CICECO) da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes

Professora Associada do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Quero aproveitar esta oportunidade para agradecer as pessoas que me ajudaram na realização deste trabalho assim como às que me ajudaram em toda a caminhada realizada até chegar cá.

Começo por agradecer a Doutora Ana Luísa que propôs o tema, por me ter encaminhado, incentivado, ajudado a aumentar a curiosidade pela investigação e por ter depositado confiança no meu trabalho.

Gostaria de agradecer ao Professor Tito Trindade que me possibilitou a integração no grupo de investigação, NanoLab, e pelos cuidados que teve comigo.

Quero agradecer a todo o grupo Nanolab, onde encontrei um ambiente laboratorial que me proporcionou a possibilidade da realização de toda a parte laboratorial. Aproveito para agradecer a ajuda na síntese de nanobastonetes que a Sara Fateixa prestou e a caracterização através de SEM e TEM que a Violeta Girão realizou. E não posso deixar de agradecer o apoio, incentivo e amizade da Filipa Sousa, da Violeta e da Ana Margarida.

Quero agradecer a Mestre Celeste Azevedo pelo apoio técnico na utilização dos aparelhos UV-Vis, FTIR, Raman e pelas análises de DSC.

Agradeço ao laboratório associado CICECO, Pest-C/CTM-LA0011/2011, FSE e POPH.

Quero agradecer a todos os meus colegas que de certa forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. De todos não posso deixar de nomear o que sempre trabalhou comigo, o que teve imensa paciência e que comigo partilhou os seus conhecimentos, Marco Moreno.

Quero agradecer a todos os meus amigos que me fortaleceram e me apoiaram, ao Ricardo Martins, assim como aos Jovens e Leigos Boa Nova.

Quero agradecer à Salomé Nunes pela fraternidade, pelas lágrimas e pelos sorrisos que partilhamos e por fazer parte da minha vida como se uma irmã se tratasse. Aos seus pais, Teresa e Manuel, quero agradecer por me deixarem fazer parte desta família e pelo apoio incondicional que me dão.

Ao Sr. Pina e a Dona Lídia quero agradecer por terem entrado nas nossas vidas, por ajudar e amparar a minha família e a mim.

À Margarida Ribeiro, ao Fernando Morreira, à Conceição Novo e ao Luís Novo por não olharem para mim mas sim olharem por mim.

Aos meus avós quero simplesmente lhes dizer que é possível realizar os nossos sonhos desde que para eles trabalharmos.

Ao Jaimito quero agradecer por me ajudar nas coisas simples da vida.

Aos meus pais quero agradecer por todo o apoio, paciência, tolerância e acima de tudo por terem sempre acreditado em mim, mesmo contra tudo e todos. Aproveito para lhes agradecer também pelos sacrifícios que fazem, pelos exemplos e pelas ferramentas que me dão para eu poder crescer.

Por fim e não menos importante, quero agradecer ao Pedro Martins por me ter mostrado todo o potencial que está mesmo dentro de mim e que eu me recusava a crer, pelo apoio, força, motivação que me têm dado e pelo companheirismo.

Palavras-chave

Hidrogéis, κ -carragenano, nanocompósitos, ouro, nanobastonetes, nanoprismas, liberação controlada

Resumo

Neste trabalho foram preparados filmes nanocompósitos termossensíveis de κ -carragenano contendo nanopartículas de ouro com morfologia e propriedades óticas controladas e testados para a liberação de um fármaco modelo encapsulado, induzida pela aplicação de radiação da zona do infravermelho próximo.

Numa primeira fase procedeu-se ao levantamento da bibliografia referente aos métodos de síntese e caracterização de nanopartículas de ouro que apresentem um máximo de absorção (banda de ressonância do plasmão de superfície) a aproximadamente 1050 nm. Foram sintetizados dois tipos de nanopartículas de ouro com estas propriedades óticas, apresentando morfologias distintas, nomeadamente nanobastonetes e nanoprismas. As nanopartículas foram caracterizadas por espectrofotometria do UV-Vis-NIR e microscopia eletrônica.

Prepararam-se filmes nanocompósitos de κ -carragenano contendo diferentes teores das nanopartículas de ouro utilizando a técnica de preparação *ex-situ*. Os filmes foram caracterizados por espectroscopia FTIR e microscopia eletrônica, tendo sido confirmada a sua termosensibilidade por calorimetria diferencial de varrimento.

Avaliou-se a liberação de um fármaco modelo (azul-de-metileno) encapsulado nos filmes compósitos, por ação da incidência de radiação da zona do infravermelho próximo (1064 nm).

Verificou-se que a incidência da radiação promove a liberação do azul-de-metileno, e este efeito é mais marcante na presença de nanobastonetes de ouro, provavelmente devido ao efeito de conversão fototérmico exercido por estas nanopartículas, que estimula a liberação do azul-de-metileno da matriz termossensível. A cinética de liberação foi estudada para os ensaios realizados à temperatura ambiente.

keywords

Hydrogels, κ -carrageenan, nanocomposite, gold, nanorods, nanoprisms, controlled release.

abstract

In this work, thermosensitive κ -carrageenan nanocomposite films containing gold nanoparticles with controlled morphological and optical characteristics were prepared and tested for the release of an encapsulated model drug, induced by applying radiation in the near-IR region.

Initially, bibliographical information referring to the synthesis and characterization methods of gold nanoparticles which show a maximum absorption (longitudinal surface plasmon resonance band) of approximately 1050 nm was researched. Two types of gold nanoparticles with these optical properties were synthesized, showing different morphologies, namely nanorods and nanoprisms. The nanoparticles were characterized by UV-Vis-NIR spectrophotometry and electronic microscopy.

κ -carrageenan nanocomposite films containing different gold nanoparticles content were prepared using the ex-situ preparation technique. The films were characterized by FTIR spectroscopy and electronic microscopy, and the thermosensitivity of the corresponding hydrogels was confirmed by differential scanning calorimetry (DSC).

An evaluation was done on the release of a model drug (methylene blue) encapsulated in the composite films, by action of radiation incidence in the near-IR region (1064 nm).

It was verified that the radiation incidence promotes the release of methylene blue, and this effect is stronger with the presence of gold nanorods, probably due to the photo-thermic conversion effect done by these nanoparticles, which stimulates the release of methylene blue from the thermosensitive matrix. The release kinetics was studied for the tests performed at room temperature.

Índice

Lista de figuras	XVII
Lista de Tabelas	XXI
Lista de abreviaturas e símbolos.....	XXIII
1. Introdução e Objetivos.....	1
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Hidrogéis nanocompósitos para libertação controlada de fármacos.....	7
2.2. Hidrogéis.....	8
2.2.1. κ -Carragenano	9
2.3. Nanopartículas de ouro	11
2.3.1. Propriedades óticas.....	13
2.3.2. Morfologia.....	14
2.3.4. Aplicações na Biomedicina.....	17
2.4. Modelos Cinéticos da Libertação de Fármacos	18
2.5. Técnicas de Caracterização.....	21
2.5.1. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC).....	21
2.5.2. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)	22
2.5.3. Espectrofotometria UltraVioleta/Visível/Infravermelho Próximo (UV/Vis/NIR).....	22
2.5.4. Microscopia Eletrónica	22
3. Parte Experimental.....	25
3.1. Reagentes	27
3.2. Síntese das nanopartículas de ouro	28
3.2.1. Nanobastonetes.....	28
3.2.2. Nanoprismas.....	29
3.2.2.1. Estabilidade das nanopartículas ao laser.....	29
3.3. Preparação dos filmes nanocompósitos	30
3.4. Intumescimento.....	31
3.5. Ensaio de libertação	32
3.6. Instrumentação.....	33
3.6.1. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC).....	33
3.6.2. Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR-ATR).....	33
3.6.3. Espectroscopia do ultravioleta-visível-infravermelho próximo (UV-Vis-NIR).....	33

3.6.4. Microscopia eletrônica	33
3.6.5. Micrometria.....	34
4. Resultados Experimentais e Discussão.....	35
4.1. Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro.....	37
4.1.1. Nanobastonetes.....	37
4.1.2. Nanoprismas.....	38
4.1.2.1. Estabilidade das nanopartículas ao laser.....	41
4.2. Caracterização dos filmes de κ -carragenano	42
4.2.1. Intumescimento.....	48
4.3. Ensaio de Liberação	49
4.4. Modelos cinéticos de liberação de fármaco.....	53
5. Conclusões e Perspectivas Futuras	55
6. Referências.....	59
7. Anexos	65
Anexo A: Obtenção da reta de calibração do azul-de-metileno.....	67
Anexo B: Modelos cinéticos de liberação de fármaco.....	68
B.1) Modelação da cinética de liberação nos filmes sem nanopartículas e sem serem expostos a radiação.	68
B.2) Modelação da cinética de liberação nos filmes com 0,1% de nanobastonetes e sem serem expostos a radiação.	69
B.3) Modelação da cinética de liberação nos filmes com 0,2% de nanobastonetes e sem serem expostos a radiação.	70

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática de nanopartículas incorporadas nos nanocompósitos e são aplicados em terapêuticas. (adaptada ^[7])	7
Figura 2. Esquema representativo das alterações da estrutura dos hidrogéis assim que expostas a estímulos externos (círculos e os bastonetes simbolizam o fármaco e as nanopartículas, respetivamente).	9
Figura 3. Imagens das algas de onde é extraído o carragenano, <i>Chondrus crispus</i> (à esquerda) e <i>Gigartina stellata</i> (à direita). ^{[16] [17]}	9
Figura 4. Estrutura química do κ - carragenano. ^[19]	10
Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de gelificação κ -carragenano: (i) cadeias dispostas aleatoriamente, (ii) conformação helicoidal, (iii) a agregação de hélices. ^[21]	11
Figura 6. Representação com objetos em pequena escala. a) Barata. b) Um fio de cabelo humano. c) Grão de pólen de <i>Polygonum</i> . d) Células de sangue. e) Nanocristais de cobalto. f) Agregado de conchas de paládio. g) Molécula do ácido acetilsalicílico. ^[23]	12
Figura 7. Diagrama esquemático que ilustra a ressonância de plasmão de superfície. ^[27] ..	13
Figura 8. Diferentes morfologias de nanopartículas de ouro.....	14
Figura 9. Representação da oscilação dos eletrões condutores aquando do efeito de plasmão de superfície transversal e longitudinal. ^[33]	15
Figura 10. Imagem de SEM dos nanoprismas. ^[32]	16
Figura 11. Imagem do filme na caixa de Petri antes e depois da secagem, respetivamente.	31
Figura 12. Espectro de absorção do Vis-NIR de uma solução contendo nanobastonetes... 37	37
Figura 13. Imagens de TEM dos nanobastonetes de ouro a diferentes ampliações.	38
Figura 14. Espectro de absorção de uma solução contendo os nanoprismas.	39
Figura 15. Imagem de TEM de nanoprisma de ouro apresentando banda de plasmão 1012 nm.	39
Figura 16. Imagem de SEM de nanoprismas triangulares com banda de plasmão a 958 nm.	41
Figura 17. Espectro de absorção do Vis-NIR de uma solução de nanobastonetes depois de exposta ao laser durante 1 hora.	41

Figura 18. Valores médios da espessura dos filmes preparados: branco (1), branco com AzM (2), compósitos com 0.1 % e 0.2 % NRs (3 e 4, respetivamente) e compósitos com 0.1 % e 0.2 % NPs (5 e 6, respetivamente).	42
Figura 19. Imagens de SEM dos filmes com diferentes teores de nanopartículas: a) 0.1 % NRs; b) 0.2 % NRs; c) 0.1 % NPs; e d) 0.2 % NPs.....	43
Figura 20. Espectros de FTIR-ATR dos filmes com diferentes concentrações de NRs e NPs.	44
Figura 21. Termogramas de DSC para os géis com as diferentes concentrações e/ou morfologias de nanopartículas.....	45
Figura 22. Espectro Vis-NIR para os hidrogéis com 0,1% de nanobastonetes.....	46
Figura 23. Espectro Vis-NIR dos hidrogéis contendo 0,2% de nanobastonetes.	47
Figura 24. Espectro da absorvância UV-Vis-NIR obtido para os hidrogéis com 0.2 % de nanoprismas de ouro.....	47
Figura 25. Gráfico dos valores médios da razão de intumescimento dos filmes preparados: branco com AzM (2), compósitos com 0.1 % e 0.2 % NRs (3 e 4, respetivamente) e compósitos com 0.1 % e 0.2 % NPs (5 e 6, respetivamente).	48
Figura 26. Espectros de UV-Vis do sobrenadante, após a exposição dos filmes compósitos de 0.2 % NRs ao laser durante 1h e 2h30, e comparação com os espectros obtidos nas mesmas condições na ausência de radiação.	49
Figura 27. Gráfico da percentagem de azul-de-metileno libertado no filmes com nanobastonetes, após um período de exposição ao laser de 1h ou 2h30, e comparação com a libertação efetuada na ausência de laser.	50
Figura 28. Gráfico da percentagem de azul-de-metileno libertado no filmes com nanoprismas, após um período de exposição ao laser de 1h ou 2h30, e comparação com a libertação efetuada na ausência de laser.	51
Figura 29. Representações gráficas da percentagem de fármaco libertada para os diferentes filmes pelo método ON/OFF, sendo às zonas assombreado correspondem aos períodos de laser OFF: branco com AzM (a), compósitos com 0.1 % e 0.2 % NRs (b e c, respetivamente).....	52
Figura A. 1: Reta de calibração do azul-de-metileno.	67
Figura B. 1: Representação dos ajustes realizados aos dados experimentais de libertação para o filme sem nanopartículas, relativamente ao modelo de cinética de ordem zero (em	

cima à esquerda), de primeira ordem (em cima à direita) e Korsmeyer-Peppas (em Baixo).
..... 68

Figura B. 2: Representação dos ajustes realizados aos dados experimentais de libertação para o filme com 0,1% nanobastonetes, relativamente ao modelo de cinética de ordem zero (em cima à esquerda), de primeira ordem (em cima à direita) e Korsmeyer-Peppas (em Baixo). 69

Figura B. 3: Representação dos ajustes realizados aos dados experimentais de libertação para o filme com 0,2% nanobastonetes, relativamente ao modelo de cinética de ordem zero (em cima à esquerda), de primeira ordem (em cima à direita) e Korsmeyer-Peppas (em Baixo). 70

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tabela de correspondência entre os parâmetros n e os respectivos mecanismos de libertação associados ao seu valor, tendo em conta a geometria plana.	21
Tabela 2. Composição dos filmes preparados	30
Tabela 3. Parâmetros cinéticos (k e n) e coeficiente de correlação (r^2) resultantes da aplicação dos modelos cinéticos dos dados de libertação quando não expostos a radiação, para as diferentes concentrações de NRs.....	53

Lista de abreviaturas e símbolos

AFM	Microscopia de força atômica (do inglês <i>Atomic Force Microscopy</i>)
AuNPs	Nanopartículas de ouro
ATR	reflectância total atenuada (do inglês <i>attenuated total reflectance</i>)
AzM	Azul-de-metileno
BDAC	Cloreto de benzildimetilamônio
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DSC	Calorimetria diferencial de varrimento (do inglês <i>Differential scanning calorimetry</i>)
FTIR	Espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
ICP	Plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>inductively coupled plasma</i>)
ko	constante cinética de ordem zero
k	constante cinética
M_o	Quantidade inicial de fármaco na solução
M_T	Quantidade de fármaco libertado no tempo
n	Expoente de libertação
NIR	Infravermelho próximo (do inglês <i>Near Infrared radiation</i>)
NRs	Nanobastonetes (do inglês <i>nanorods</i>)
NPs	Nanoprismas (do inglês <i>nanoprisms</i>)
PBS	Solução tampão de fosfato salina pH 7.4 (do inglês <i>Phosphate Buffered saline solution</i>)
PEG	polietilenoglicol,
SEM	Microscopia eletrônica de varrimento (do inglês <i>scanning electron microscopy</i>)
SPR	Ressonância de plasmão de superfície (do inglês <i>Surface Plasmon Resonance</i>)

TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês <i>Transmission electron microscopy</i>)
T_g	Temperatura de gelificação
UV-Vis	Ultravioleta-visível (do inglês <i>Ultraviolet–visible spectroscopy</i>)
UV-Vis-NIR	Ultravioleta-visível-infravermelho próximo (do inglês <i>Ultraviolet–visible - near-infrared</i>)
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
W_i	massa do filme seco
W_f	massa do filme intumescido

1. Introdução e Objetivos

Cerca de 13% da mortalidade mundial tem como causa as doenças prolongadas incluindo cancro, e na tentativa de diminuir esta tendência têm-se reunido cada vez mais esforços ao nível da investigação nesta área. ^[1]

Para além do cancro ser uma das causas de mortalidade mais alta, os tratamentos a ele associados também têm severos efeitos colaterais, podendo levar mesmo à morte. A quimioterapia é um dos tratamentos mais utilizados para o combate ao cancro, a sua linha de ação visa o ataque às células de rápido crescimento, quer sejam cancerígenas ou saudáveis (células de crescimento rápido que estão localizadas na boca, intestinos, medula óssea e as células de crescimento de cabelo). ^[2] Para além dos inúmeros efeitos colaterais que o tratamento acarreta, a sua forma de administração tem também grande impacto. Como não se trata de um tratamento localizado existe a necessidade de aumentar a quantidade de fármaco administrado para que este chegue à zona afetada, acabando também por atingir grande parte do organismo saudável. Devido a estes efeitos colaterais, a comunidade científica tem vindo a desenvolver trabalhos de investigações de forma a aumentar a eficácia deste tipo de tratamento.

Uma área onde os seus resultados parecem promissores é a nanomedicina. Com o desenvolvimento da nanotecnologia tem sido possível obter imagens médicas mais detalhadas, facilitando o diagnóstico precoce, bem como o desenvolvimento de nanomateriais capazes de tratamentos localizados, apresentando portanto grande potencial na luta contra o cancro. ^[3] Os avanços no fabrico de estruturas com dimensões entre 1 a 100 nanómetros (nm) permitem a obtenção de materiais com uma vasta gama de propriedades que podem ser óticas, elétricas, mecânicas, magnéticas e químicas. ^[4]

Um dos elementos mais promissores na nanotecnologia é o ouro, mais propriamente, as nanopartículas de ouro (AuNPs), que têm vindo a ser exploradas como objetivo de induzir citotoxicidade hipertérmica. Quando expostas a luz com comprimento de onda adequado, estas têm a capacidade de gerar calor (devido ao efeito fototérmico) que é transmitido para as células e tecidos circundantes, promovendo assim o seu aquecimento. Segundo H. Shen, et al ^[5] a termoterapia tem a vantagem de matar células cancerosas, sem causar resistência, independentemente do fundo genético, e assim pode ser aplicada a todos os doentes com cancro. As nanopartículas de ouro podem, por exemplo, ser incorporadas em lipossomas ou em micelas podendo estes serem posteriormente usados como agente de diagnóstico, bem como podem ser incorporadas num compósito polimérico a fim de facilit-

tar a distribuição e libertação controlada de fármacos. É neste último conceito que este trabalho se debruça.

Tirando partido do efeito fototérmico das nanopartículas de ouro e sabendo que os estudos realizados utilizando matrizes poliméricas para a libertação de fármacos, de onde sobressaem os hidrogéis sensíveis à temperatura, surge a ideia de desenvolver um sistema para libertação de fármacos que envolva estes dois componentes, esperando-se que assim o sistema resultante permita a libertação controlada por ação da luz. A aplicação de radiação na gama adequada deverá originar a um aquecimento localizado promovido pelas nanopartículas de ouro, que por sua vez irá induzir alterações na matriz do hidrogel termossensível, levando consequentemente à libertação controlada dos fármacos incorporados.

Tendo como objetivo desenvolver sistemas de libertação de fármacos controlados remotamente por ação de luz, neste trabalho prepararam-se e caracterizaram-se filmes nanocompósitos sensíveis à temperatura e óticamente ativos. Sendo estes compostos biopolímero κ -carragenano e nanopartículas de ouro com diferentes morfologias (nanobastonetes e nanoprismas), e estudou-se a libertação controlada de um fármaco modelo (azul-de-metileno) em condições *in vitro*, por ação de radiação incidente.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Hidrogéis nanocompósitos para liberação controlada de fármacos

Nanocompósitos constituídos por hidrogéis e nanopartículas (conhecidos também por nanogéis) e têm atraindo atenção devido às propriedades que se combinam em pequenas dimensões como a hidrofiliabilidade e biocompatibilidade, sem que os componentes percam a identidade química. Devido a estas propriedades os nanogéis são escolhidos para incorporarem agentes terapêuticos, respondendo a estímulos exteriores (variações de pH e temperatura) que alteram a rede do gel, as suas dimensões e as interações entre as partículas, levando assim à liberação controlada dos agentes terapêuticos (Figura 1).^[6]

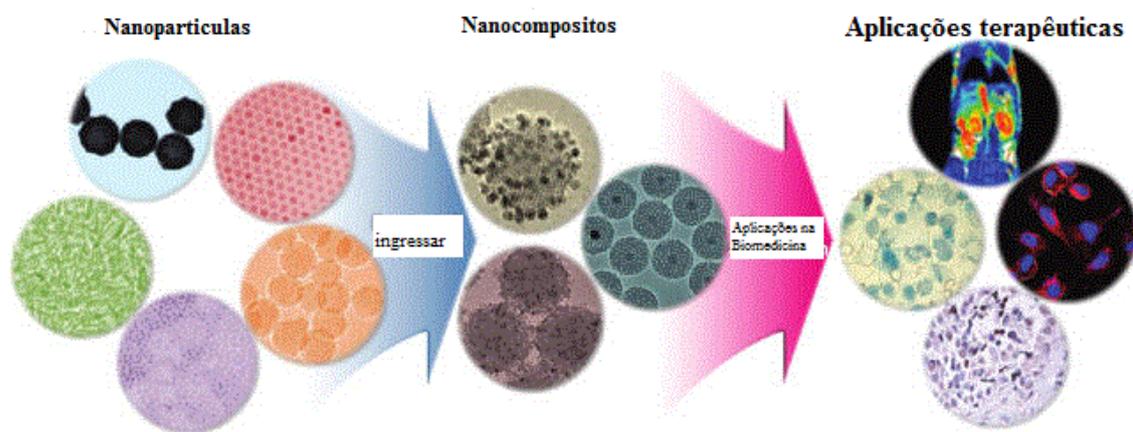


Figura 1. Representação esquemática de nanopartículas incorporadas nos nanocompósitos e são aplicados em terapêuticas. (adaptada ^[7])

Os polissacarídeos derivados de fontes naturais têm vindo a ser utilizados na preparação de nanocompósitos com o objetivo de melhorar a biocompatibilidade, uma vez que não apresentam toxicidade relevante e são hidrofílicos. Estes apresentam na sua estrutura grupos funcionais que podem ser utilizados para promover a adição de grupos reativos e bioativos na superfície de compósitos, aumentando mais a sua aplicabilidade. Uma outra característica com bastante realce é o facto de estes polissacarídeos formarem géis que respondem a estímulos de temperatura, pH e mesmo força mecânica.^[8]

A matriz que incorpora o fármaco e as nanopartículas é no caso em estudo o κ -carragenano, que devido à possibilidade de permitir o controlo da libertação do fármaco e também devido às características acima referidas foi escolhida.

As nanopartículas de ouro exibem efeitos fototérmicos devido ao facto de absorverem seletivamente a luz emitida na gama do infravermelho. Com um estímulo específico, as nanopartículas aquecem a matriz polimérica onde se encontram incorporadas. É de sali-

entar que o aquecimento provocado desta forma permite o intumescimento e aumenta a degradação dos hidrogéis.^[9]

Um dos inconvenientes da utilização das nanopartículas de ouro em terapêuticas reside no seu método de preparação. As nanopartículas de ouro são estabilizadas por ligandos, tensioativos, polímeros, dendrímeros, biomoléculas, entre outros. No entanto os mais estáveis são os que reagem com os tióis, formando uma ligação entre o ouro e o enxofre. Num outro estudo verificou-se que ao se utilizar brometo de cetiltrimetilamónio, CTAB, este forma um revestimento de duas camadas em que as nanopartículas apresentam as extremidades desprotegidas, levando ao crescimento das nanopartículas a partir das extremidades e evitando a agregação destas devido à presença do sal de ouro reduzido. Um outro problema deste método é o facto de o CTAB ser citotóxico, e pelo que outros estudos têm aparecido de forma a dar resposta a este inconveniente, destacando-se o borohidreto de sódio, NaBH₄. Contudo quando se trabalha com o NaBH₄ é necessário controlar a formação de brometo que pode contaminar.^[10]

Elodie Boisselier relata no seu artigo^[10] o tratamento *in vivo* utilizando nanopartículas de ouro, preparados utilizando por tiol e polietilenoglicol, PEG, no qual se incide um laser com o mesmo comprimento de onda que o absorvido pelas nanopartículas e verificasse o aumento da temperatura foi de ± 6.6 °C levando as células a temperaturas superiores a 40 °C, temperatura à qual se dá a danificação dos tecidos.^[10]

2.2.Hidrogéis

Os hidrogéis são redes macromoleculares tridimensionais de polímeros que contêm grupos funcionais (-OH, -COOH, -NH₂, -SO₃H, entre outros) com características hidrofílicas (alta afinidade à água), biocompatibilidade e resistência à tração.^[11-13] Esta matriz polimérica é capaz de absorver água ou soluções orgânicas cerca de duas até centenas de vezes o seu peso molecular. Perante variações de pH, temperatura, campo elétrico, forças iónicas assim como alterações dos solventes, os hidrogéis respondem inchando ou encolhendo como se pode ver na Figura 2.^[13, 14]

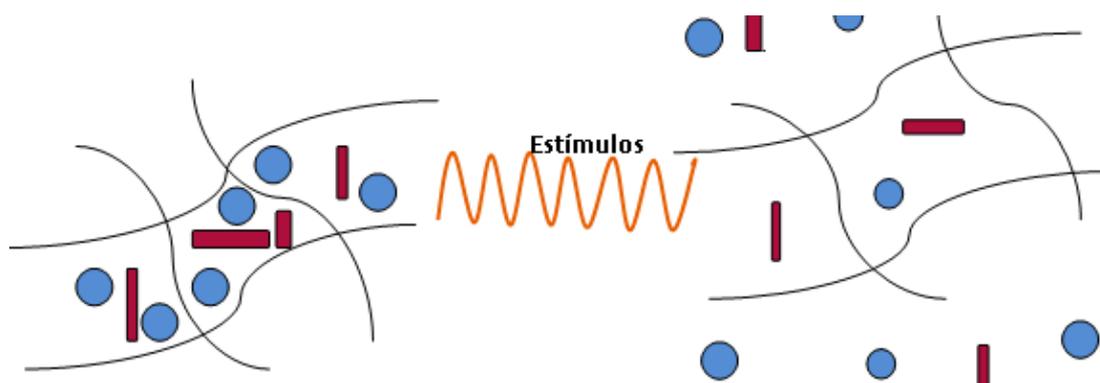


Figura 2. Esquema representativo das alterações da estrutura dos hidrogéis assim que expostos a estímulos externos (círculos e os bastonetes simbolizam o fármaco e as nanopartículas, respetivamente).

São vários os polímeros que podem ser utilizados na preparação de hidrogéis, quer de origem natural quer obtidos sinteticamente. No entanto, como nem todos possuem biodegradabilidade, há a necessidade de após a libertação do fármaco recorrer-se à remoção da matriz polimérica. Os polissacáridos dão uma boa resposta a esta situação, sendo biodegradáveis e biocompatíveis. Este trabalho recorre ao polímero natural κ -carragenano, que tem sido utilizado ao longo dos últimos anos em estudos sobre aplicações biomédicas. [8]

2.2.1. κ -Carragenano

O nome Carragenano é o nome genérico dado a uma família de polissacarídeos extraídos de certas espécies de algas vermelhas, do grupo *Rhodophyta*. Dentro do género as classes mais utilizadas são a *Chondrus crispus* e a *Gigartina stellata*, Figura 3. [15]



Figura 3. Imagens das algas de onde é extraído o carragenano, *Chondrus crispus* (à esquerda) e *Gigartina stellata* (à direita). [16] [17]

Este tipo de polissacarídeos pode ser encontrado em seis formas diferentes, sendo as três formas mais comuns o κ -, ι - e λ - carragenano. Esta nomenclatura torna-se importante no sentido da sua classificação química bem como a nível comercial, pois os distintos tipos de carragenano são extraídos de algas diferentes e apresentam propriedades diferentes. O κ -carragenano é constituído pela unidade de repetição β -D-galactopiranosose-4-sulfato-O-3,6 anidro- α -D-galactopiranosose, Figura 4. ^[18]

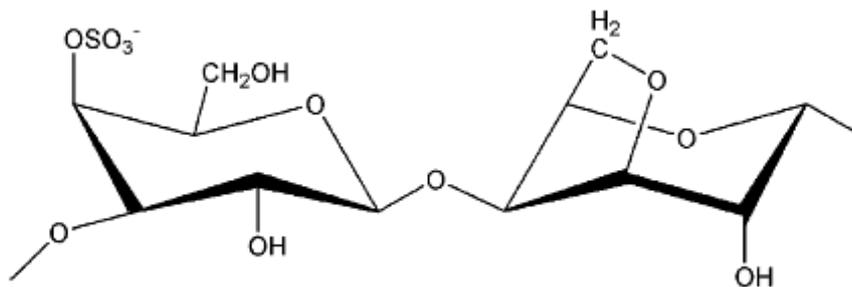


Figura 4. Estrutura química do κ - carragenano. ^[19]

Em meados de 1940, o papel do carragenano na sociedade sobressai por estabilizar a suspensão de chocolate no leite, desde então é uma das macromoléculas mais usadas na indústria alimentar e farmacêutica. ^[20]

Na indústria alimentar o carragenano, para além de ser usado como estabilizante, é também usado devido às suas propriedades físicas. Propriedades como o espessamento e gelificação, aglutinam e controlam a viscosidade bem como a textura e até baixam o teor de gordura dos alimentos. ^[15, 20] Dentro da família dos carragenanos estudados o que contém as melhores propriedades de gelificação é o κ -carragenano, devido a organizar-se em hélices duplas que agregando-se, formam uma rede tridimensional infinita, representada na Figura 5. Com a diminuição de temperatura, as cadeias poliméricas do κ -carragenano que se encontram dispostas de forma aleatória (sol), formam hélices que posteriormente se agregam (gel), sendo este mecanismo favorecido pela presença de determinados iões. Com o aumento da concentração de carragenano e de contra iões verifica-se o aumento da temperatura de gelificação (T_g) que consiste na temperatura a que ocorre a transição de sol para gel. ^[21]

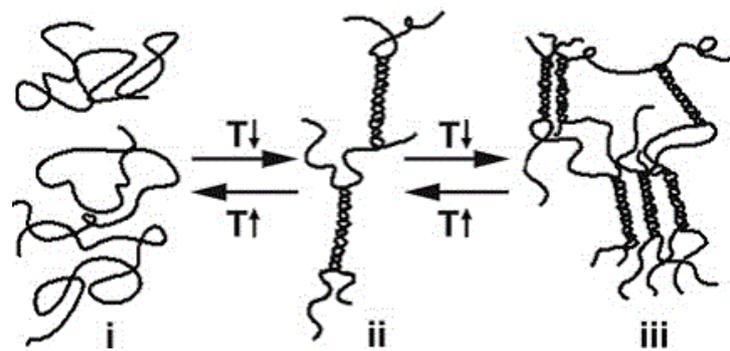


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de gelificação κ -carragenano: (i) cadeias dispostas aleatoriamente, (ii) conformação helicoidal, (iii) a agregação de hélices. ^[21]

O carragenano é usado também na indústria farmacêutica, cosmética, impressões e têxtil. Quando esta macromolécula é incorporada em compressas para feridas, ela absorve os fluidos corporais, sendo também usada em comprimidos como excipiente (substância farmacologicamente inativa usada como veículo para o princípio ativo) devido à boa compatibilidade, alta robustez e boa viscoelasticidade. ^[20] Como se trata de um polissacarídeo de fonte natural, este apresenta vantagens em termos de biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixo custo. ^[8] Devido a estas potencialidades o carragenano será uma boa matriz para o nanocompósito que se pretende estudar.

2.3. Nanopartículas de ouro

Nos últimos anos os nanomateriais têm sido alvo de grandes investigações devido ao facto de melhorarem as falhas que surgem ao nível da sensibilidade das técnicas convencionais. ^[22]

As nanopartículas possuem normalmente dimensões menores que as das células humanas, cerca de 100 a 10000 vezes mais pequenas (Figura 6). Dadas as suas pequenas dimensões, estas podem interagir tanto com o exterior como com o interior das células, ultrapassando os obstáculos biológicos, biofísicos e biomédicos, tornando-se assim um grande aliado no diagnóstico de doença e na libertação controlada de fármacos. ^[3]

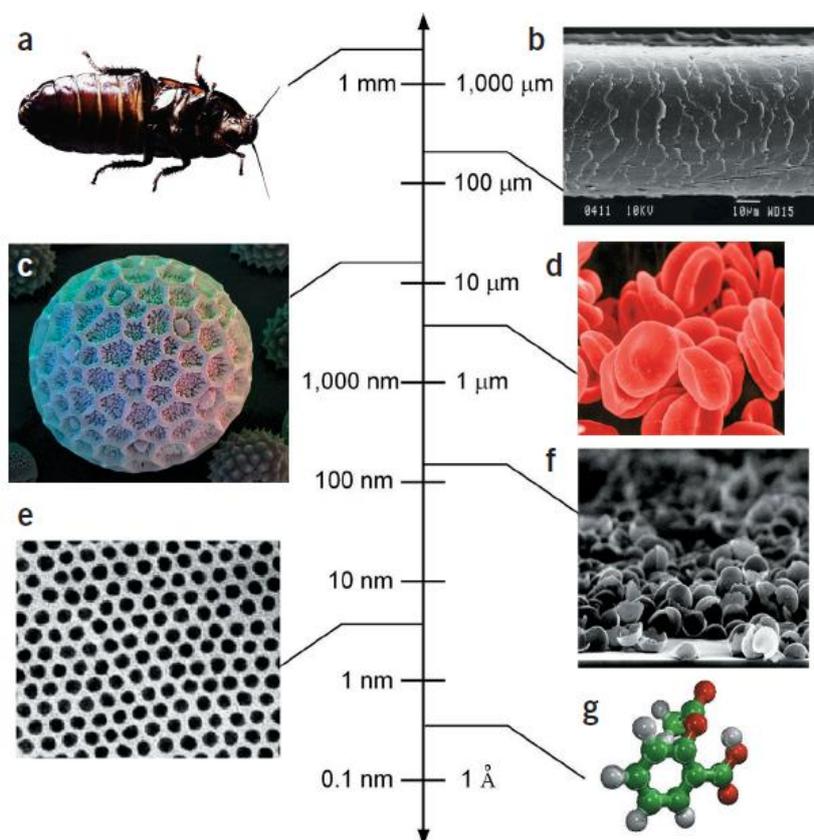


Figura 6. Representação com objetos em pequena escala. a) Barata. b) Um fio de cabelo humano. c) Grão de pólen de *Polygonum*. d) Células de sangue. e) Nanocristais de cobalto. f) Agregado de conchas de paládio. g) Molécula do ácido acetilsalicílico.^[23]

O interesse pelas nanopartículas não se deve apenas ao pequeno tamanho, mas também às diferentes morfologias e estequiometria que se podem obter sendo possível produzir materiais com propriedades de absorção e de dispersão da luz específicas, que fazem destes materiais ideais para a deteção em análises específicas.^[22] A capacidade de absorver e/ou dispersar a luz é característica das nanopartículas metálicas, entre as quais se destacam a platina, prata, cobre e ouro.^[24]

O potencial das nanopartículas de ouro é sobejamente conhecido devido à biocompatibilidade, ópticamente sensíveis e apresentarem excelentes propriedades óticas na gama do espectro de visível.^[24] Também se encontram inúmeras referências onde se discutem vários aspetos das nanopartículas de ouro desde o seu tamanho, forma e propriedades físicas.^[3] As nanopartículas de ouro são relevantes para aplicação na medicina nomeadamente devido ao facto de serem resistentes à oxidação e à sensibilidade da banda de ressonância de plasmão, tóbanda que será abordado mais adiante.^[25]

2.3.1. Propriedades óticas

As propriedades óticas dos materiais dependem da forma como estes reagem quando irradiadas por ondas eletromagnéticas. A origem da maioria das propriedades óticas dos materiais reside na passagem dos elétrons da banda de valência para a banda de condução, conduzindo a corrente elétrica.^[26]

Nas nanopartículas metálicas, a frequência da banda de ressonância de plasmão de superfície (SPR) é a frequência à qual os elétrons condutores da superfície oscilam em torno da partícula como resposta à radiação eletromagnética incidente (Figura 7). Como resultado deste efeito o espectro de absorção das nanopartículas apresenta uma banda proeminente cujo comprimento de onda vai depender do tamanho da partícula, da forma, da densidade de elétrons e o índice de refração no meio circundante. A localização da banda de ressonância de plasmão de superfície localizado é sensível a alterações sensoriais no ambiente onde se encontram. Vários investigadores têm estudado a influência do tamanho, da morfologia e das propriedades dielétricas no efeito de SPR das nanopartículas de ouro.^[27] Os metais, como no caso do ouro, possuem elétrons livres e quando excitados apresentam a banda SPR na zona do visível do espectro.^[28, 29]

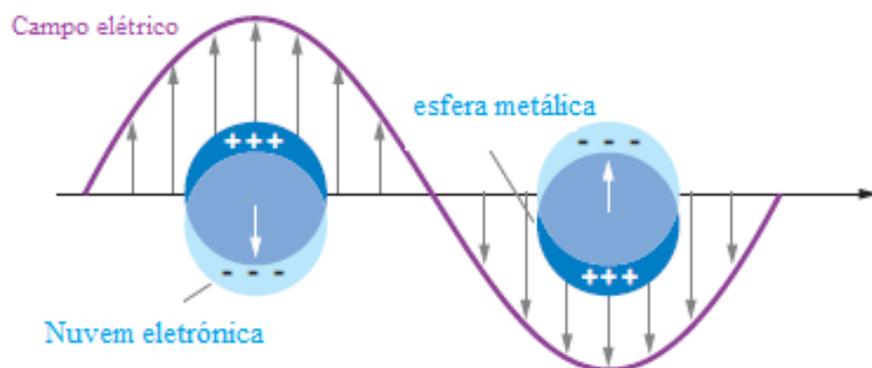


Figura 7. Diagrama esquemático que ilustra a ressonância de plasmão de superfície.^[27]

A SPR das nanopartículas de ouro de formato esférico pode ser observada na gama entre 510-550 nm, no meio do espectro visível, e pode ser desviada até à gama do infravermelho próximo (NIR), para comprimentos de onda entre os 800 e os 1200 nm, alterando o tamanho e a forma da nanopartícula. Para se poder obter efeitos terapêuticos em tecidos humanos a luz incidente deverá ter o comprimento de onda na zona do NIR, idealmente

entre 800 e aproximadamente 1000 nm, onde os tecidos são mais transparentes a esta luz. [21]

Teoricamente é possível calcular a intensidade e a localização da banda de SPR no espectro recorrendo ao eletromagnetismo clássico, com base na equação de Maxwell para a dispersão de luz. [24]

2.3.2. Morfologia

As nanopartículas de ouro podem ser sintetizadas de forma a se obter diferentes morfologias (Figura 8) e apresentarem bandas de plasmão em diferentes zonas do espectro eletromagnético, por exemplo nanoesferas, nanobastonetes, nanoprismas, entre outros.

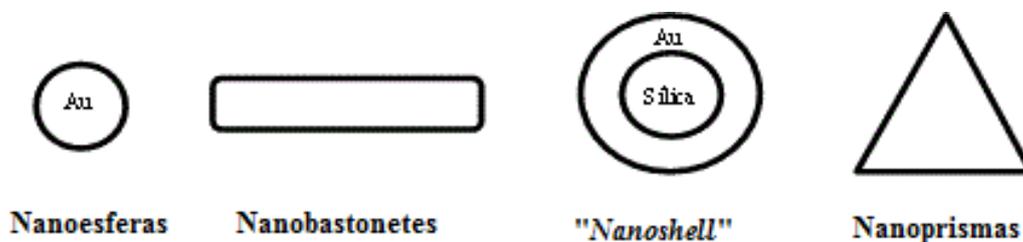


Figura 8. Diferentes morfologias de nanopartículas de ouro.

2.3.2.1. Nanoesferas

As nanoesferas de ouro sob a forma coloidal podem apresentar diâmetros tipicamente entre os 2 nm e os 100 nm, podendo-se controlar o seu tamanho através das condições experimentais, tais como a concentração da solução aquosa de ácido cloroáurico e utilizando diferentes agentes redutores usados na síntese destas nanopartículas. Para se obter nanoesferas com tamanhos superiores é aconselhado usar-se concentrações mais pequenas dos agentes redutores. O máximo do espectro de absorção das nanoesferas de ouro (banda SPR) localiza-se na gama do visível entre 510 e os 550 nm, encontrando-se mais deslocada para comprimentos de onda superiores quando o tamanho das nanoesferas aumenta. [3]

2.3.2.2. Nanobastonetes

Para os nanobastonetes (NRs), da mesma forma que para as nanopartículas, estão disponíveis vários métodos de síntese a partir dos quais se obtêm propriedades anisotrópicas. Para os caracterizar é pertinente conhecer-se o seu comprimento e a largura para posteriormente se calcular a razão de aspeto, que consiste na razão entre eles. Para a síntese dos nanobastonetes com a razão de aspeto maior (no máximo 16^[30]) o método aconselhado é o método conhecido pelo método das “sementes”. Neste método inicialmente procede-se à redução do sal de ouro (que vai originar as “sementes” que servem de núcleo para o crescimento de nanobastonetes) e posteriormente à adição de mais solução de sal de ouro na presença de agentes redutores mais fracos, de modo a promover o crescimento dos bastonetes. A razão de aspeto é ajustada pela relação entre a quantidade de sementes de ouro e a concentração da solução de sal de ouro que se adiciona posteriormente.^[31] Mais recentemente, alguns autores consideram que este crescimento, se deve, às propriedades do metal em causa independentemente das condições e dos surfatantes usados durante o mesmo. Desta forma, podem-se utilizar outro tipo de agentes redutores, embora quanto menor o carácter redutor do agente redutor mais anisotrópicas serão as nanopartículas formadas.^[31] Neste trabalho o surfatante usado para a síntese de nanobastonetes foi o brometo de cetiltrimetilamónio, CTAB. Ópticamente os nanobastonetes de ouro absorvem em duas gamas diferentes de comprimento de onda, apresentando por isso duas bandas de plasmão, Figura 9. Na gama entre os 510 e os 550 nm, localiza-se um banda que corresponde banda de plasmão transversal. A outra gama, observada entre (700-1300 nm), corresponde ao plasmão longitudinal, e está relacionada com o comprimento dos nanobastonetes. Quanto maior for a razão de aspeto dos nanobastonetes, mais desviada se encontra a banda de plasmão longitudinal para a zona do NIR.^[3, 30, 32]

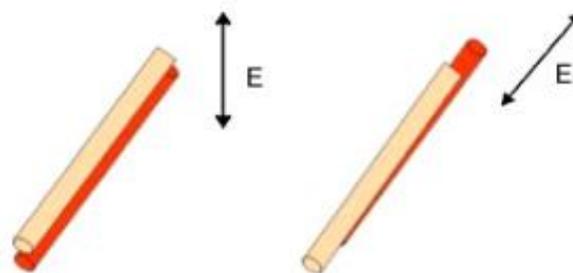


Figura 9. Representação da oscilação dos elétrons condutores aquando do efeito de plasmão de superfície transversal e longitudinal.^[33]

2.3.2.3. “Nanoshell”

As nanopartículas de ouro utilizadas na síntese de estruturas do tipo de um invólucro, também conhecidas por “*nanoshells*”, são utilizadas como agentes de contraste, em imagiologia médica. A partir das “*nanoshell*” de ouro obtêm-se ressonâncias de plasmão de superfície (SPR) que geram banda de absorção que vão desde a região do visível até à região do infravermelho próximo. Esta variação é conseguida através da alteração da composição e das dimensões do involucro.^[3]

2.3.2.4. Nanoprismas

Os nanoprismas triangulares de ouro (aqui designados unicamente por nanoprismas, NPs) são nanopartículas que mais recentemente estão a ter destaque por parte da comunidade científica. São anisotrópicas e absorvem radiação na zona do infravermelho próximo, apresentando por isso vantagens para várias aplicações. Os nanoprismas podem ser sintetizados a partir de sementes de ouro e posteriormente ocorrer crescimento por deposição eletroquímica nas nanopartículas.^[34] Idealmente, os nanoprismas são constituídos por 3 vértices bem definidos que lhes conferem certas propriedades óticas e eletrónicas (Figura 10). No entanto na prática apresentam frequentemente arredondamentos nas pontas o que pode indicar que o crescimento dos prismas foi incompleto e podem apresentar morfologias mais próximas de prismas hexagonais. A razão entre o comprimento das arestas e a espessura dos nanoprismas indica a razão de aspeto. As propriedades de SPR variam da mesma forma que nos nanobastonetes, ou seja, quanto maior a razão de aspeto maior é a distância entre as bandas de plasmão.^[32, 35]

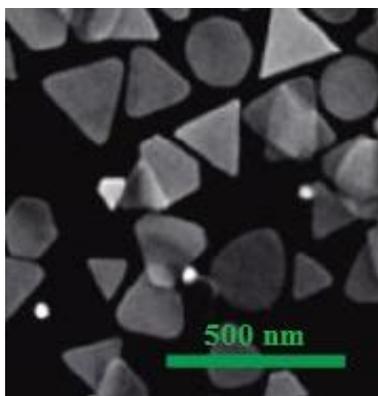


Figura 10. Imagem de SEM dos nanoprismas.^[32]

2.3.3. Efeito fototérmico

Devido ao efeito de ressonância de plasmão de superfície que as nanopartículas de ouro apresentam, quando a luz incide sobre elas parte é absorvida provocando o aquecimento das nanopartículas resultando num aumento localizado de temperatura. Este efeito é conhecido como efeito fototérmico e tem sido explorado em terapias, como no caso de tratamento de cancro.^[21]

Tal como referido anteriormente, quando o intuito é a aplicação no corpo humano, é conveniente que o comprimento de onda de absorção máximo das nanopartículas se encontre no infravermelho próximo (NIR), sendo deste modo possível a penetração da radiação nos tecidos vivos, e a excitação das nanopartículas que absorvem nessa gama.^[10, 25, 36] Desta forma, minimiza-se a absorção de fótons pelos componentes dos tecidos, evitando queimaduras da exposição à radiação. A possibilidade de excitar as nanopartículas na zona do NIR abre portas a um número considerável de aplicações biomédicas, incluindo terapia fototérmica, libertação controlada de fármacos e técnicas de imagiologia.^[36]

2.3.4. Aplicações na Biomedicina

As nanopartículas de ouro têm sido bastante investigadas no diagnóstico de doenças por serem muito pequenas, não tóxicas, melhorarem o contraste das imagens e superfícies alcançadas, sendo que o seu índice de refração depende das propriedades espectroscópicas. Doenças como cancro, Alzheimer, VIH, hepatite B, tuberculose e diabetes podem ser diagnosticadas com o auxílio destas nanopartículas.^[5]

Das propriedades que as nanopartículas apresentam, duas destacam-se em termos das suas aplicações em fins terapêuticas: a capacidade da superfície das nanopartículas para se ligar a anticorpos ou outras moléculas biológicas e as propriedades óticas particulares (efeito de ressonância plasmão de superfície). Com a combinação destas propriedades é possível um aquecimento localizado, radioterapia, e à libertação de fármacos, adequada para aplicações terapêuticas, quimioterapia.^[5, 21]

São conhecidos alguns tratamentos realizados através de radioterapia conjugados com nanopartículas de ouro, em que estas passam aberturas de 150 nm do endotélio (camada simples de células epiteliais) do fígado.^[21]

A superfície das nanopartículas de ouro pode ser alterada podendo-se adicionar anticorpos ou, um ligando com afinidade ao alvo a tratar, de modo a que o sistema imunitá-

rio não seja capaz de o detetar. Assim que as nanopartículas de ouro se encontram no sítio desejado podem ser ativadas por meio de radiação (de comprimento de onda apropriado) e dependendo da partícula poderá gerar calor localizado ou provocar a libertação localizada de um produto químico. [21]

Em imagiologia foi possível identificar células cancerosas acopladas a nanobastonetes de ouro por fotoluminescência com um sinal três ordens de magnitude mais elevado que o verificado na ausência dos nanobastonetes. [18]

Outros estudos fazem referência ao potencial fototérmico que as nanopartículas apresentam. O calor como forma de tratamento é bem conhecido em tratamentos médicos, no entanto a fonte de energia para tal levanta alguns problemas na medida em que o calor gerado tem que chegar à região desejada. Uma forma de resolver esta limitação é utilizar as nanopartículas que absorvem a radiação na região espectral do NIR para que o aquecimento seja localizado provocando destruição térmica irreversível das células cancerígenas, como já foi referido anteriormente. [21]

Para além dos tratamentos que já foram descritos anteriormente encontram-se na literatura relatos de tratamentos de angiogênese (crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes), artrite reumatoide, antibacteriano, entre outros.

2.4. Modelos Cinéticos da Libertação de Fármacos

A libertação controlada de fármacos depende essencialmente da natureza do sistema em que é incorporado o fármaco (matriz) e/ou o tipo de mecanismo de controlo.

No caso deste trabalho, a matriz que incorpora o fármaco trata-se de um hidrogel. Os hidrogéis, como referido anteriormente, consistem em matrizes poliméricas hidrofílicas com tendência a absorver água. Estes apresentam propriedades distintas dependendo da fase:

-Na fase sólida, os hidrogéis são constituídos por uma rede polimérica hidrofílica reticulada por ação de ligações covalentes, Van der Waals, pontes de hidrogénio, interações electrostáticas, entrelaçamento físico, etc;

-Na fase intersticial líquida (poros da matriz polimérica), que confere propriedades elásticas ao hidrogel dando-lhe semelhanças ao tecido humano;

-Na fase iónica, onde habitam os iões nas ligações entre grupos ionizados dos polímeros e das suas cadeias.

As fases descritas variam conforme a natureza do hidrogel, quer seja neutro (sem grupos iónicos) ou iónico, homopolímero ou copolímero, etc.

O modo pelo qual se pode incorporar o fármaco na matriz de hidrogel consiste na aplicação *in-situ* ou após a sua formação. No método *in-situ*, a formação do hidrogel, juntamente com a inserção dos fármacos é feita em simultâneo, dependendo a libertação da difusão, do intumescimento do hidrogel, das interações do fármaco com o polímero ou da degradação das ligações covalentes do mesmo. Na aplicação pós-hidrogel, o fármaco é absorvido pela matriz polimérica, dependendo assim da libertação por difusão ou intumescimento do hidrogel.

A forma do compósito também influencia a libertação dos fármacos, podendo variar desde um filme fino, esfera, cilindro ou uma forma irregular. O facto de a matriz ser macroporosa, microporosa ou não-porosa, também afeta a maneira como os fármacos são libertados do hidrogel.

O mecanismo de libertação do fármaco a partir do hidrogel pode ser complexo e envolver vários fenómenos em simultâneo. De modo a simplificar esta análise recorreu-se a modelos matemáticos adequados para a libertação de fármacos em que a matriz é um hidrogel. Estes podem ser classificados de acordo com o passo limitante da velocidade de libertação que pode basear-se em:

- Controlo por difusão;
- Controlo por intumescimento;
- Controlo químico.^[37, 38]

O mecanismo da libertação controlada por difusão é descrito pela Lei de Fick. O coeficiente de difusão do fármaco pode ser determinado empiricamente ou estimado *a priori*, através de teorias baseadas no volume livre, hidrodinâmico, entre outros.^[38]

O mecanismo de libertação controlada por intumescimento ocorre quando a rede polimérica demora mais tempo a expandir-se (intumescimento) do que a difusão, e portanto limita a libertação do fármaco. A modelação deste mecanismo tem em conta as condições de fronteira onde ocorre a libertação, ou seja na zona de interface do hidrogel intumescido.^[38]

O mecanismo de controlo químico descreve a libertação do fármaco do interior da matriz devido à ocorrência de reações químicas. As reações típicas dos hidrogéis são as reações de clivagem das cadeiras poliméricas por degradação hidrolítica ou enzimática, ou

reações reversíveis ou irreversíveis entre o polímero e o fármaco libertado. O passo que controla neste caso é a erosão da superfície ou do interior do hidrogel.^[38]

Na literatura têm sido propostos vários modelos para a análise do mecanismo da cinética de libertação de fármacos. Para o trabalho em causa, e tendo em conta as características do sistema, foram selecionados os seguintes: cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem e o modelo de Korsmeyer-Peppas.

Na cinética de ordem zero, considera-se que a libertação não depende da concentração do fármaco libertado/dissolvido. Este tipo de cinética é característico de sistemas cuja dissolução do fármaco não desagrega o gel e que libertam o fármaco lentamente.

$$Mt = Mo + ko.t \quad (1)$$

A equação (1) corresponde ao modelo de ordem zero onde Mt é a quantidade de fármaco libertado ou dissolvido decorrido o tempo t , Mo a quantidade inicial de fármaco em solução e ko a constante cinética de ordem zero.^[37, 39]

Quanto à cinética de primeira ordem, esta difere da anterior no sentido que, tem em conta a concentração de fármaco libertado. Este modelo é mais usado em libertação de fármacos solúveis em água a partir de matrizes porosas.

$$\ln\left(\frac{Mt}{Mo}\right) = k.t \quad (2)$$

A equação (2) corresponde à cinética de primeira ordem onde Mt é a quantidade de fármaco libertado ou dissolvido decorrido o tempo t , Mo a quantidade inicial de fármaco em solução e k a constante cinética de primeira ordem.^[37, 39]

O outro modelo matemático em estudo, o modelo de Korsmeyer-Peppas, é um modelo semi-empírico usualmente utilizado para descrever o comportamento da libertação um fármaco encapsulado num sistema polimérico.

$$\frac{Mt}{Mo} = k.t^n \quad (3)$$

A equação (3) corresponde ao modelo de Korsmeyer-Peppas onde Mt/Mo é a fração cumulativa de fármaco em solução decorrido no tempo t e k a constante estrutural/

geométrica que depende do sistema de libertação e n é designado como o expoente de libertação e indica o mecanismo de libertação. Este modelo só se aplica para valores de libertação inferiores a 60%. [37, 39]

O modelo de transporte que gere a libertação do fármaco é determinado a partir do valor n . Este valor está dependente da geometria do veículo de libertação, podendo ser plano, cilindro ou esférico. No caso deste trabalho trata-se de um veículo de transporte de geometria plana e os valores ao qual corresponde o mecanismo de libertação estão referido na tabela abaixo. [37, 39]

Tabela 1. Tabela de correspondência entre os parâmetros n e os respetivos mecanismos de libertação associados ao seu valor, tendo em conta a geometria plana.

n	Mecanismo de Libertação
< 0.5	Quasi Fickiano
0.5	Fickiano (controlo por difusão) Caso I
$0.5 < n < 1$	Anómalo
1	Não Fickiano, Caso II (libertação segundo o modelo ordem zero) (controlo por intumescimento)
$n > 1$	Não Fickiano Super Caso II

2.5. Técnicas de Caracterização

De seguida apresenta-se uma breve descrição das principais técnicas experimentais utilizadas na caracterização dos vários materiais preparados no âmbito deste trabalho.

2.5.1. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

Uma das técnicas de caracterização de materiais capazes de analisar as propriedades térmicas dos materiais é a Calorimetria diferencial de varrimento (do inglês *Differential Scanning Calorimetry*, DSC). O DSC é usado na caracterização de vasta gama de materiais, dos quais os polímeros. Esta técnica consiste no registo do fluxo de energia calorífica associada à transição do material em função da temperatura. Com esta análise é possível medir em função do tempo/temperatura a diferença de energia calorífica entre uma substância e um material de referência. Aplica-se esta técnica para o estudo das temperaturas

características (fusão, cristalização, transição vítrea), o grau de cristalinidade de um polímero, grau de pureza, estabilidade térmica e oxidativa, entre outros.

2.5.2. Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho, ou FTIR (*Fourier Transform Infrared spectroscopy*), é um tipo de técnica que se baseia na interação entre as moléculas e a radiação na zona do infravermelho médio (gama 4000-400 cm^{-1}). As moléculas absorvem as ondas propagadas na zona do infravermelho, dando lugar a diferentes modos de vibração moleculares. A determinação da frequência de vibração permite identificar a existência de determinados grupos funcionais característicos de certas moléculas.

2.5.3. Espectrofotometria UltraVioleta/Vísivel/Infravermelho Próximo (UV/Vis/NIR)

A espectroscopia eletrônica (UV-Vis) baseia-se na deteção da transição dos eletrões intra-atômicos ou moleculares entre orbitais, responsáveis pela absorção de radiação na região do ultravioleta (200-400 nm), no visível (400-800 nm) e no infravermelho próximo (800 nm – 2500 nm).

O espectro de absorção de um material é obtido pela fração absorvida, em cada frequência, após a radiação ter passado pela amostra. Segundo a Lei de Lambert-Beer, a intensidade da absorção é proporcional à quantidade de amostra que absorve presente no material e aplicando esta lei é possível quantificar compostos aplicando esta técnica. ^[40]

2.5.4. Microscopia Eletrónica

Este método recorre a microscópios eletrónicos que conseguem obter imagens através do comportamento de um feixe de eletrões quando interage com a amostra. A resolução da imagem obtida depende do tipo de focagem que a lente eletromagnética, que atua sobre o feixe dos eletrões, consegue alcançar, bastante superior a qualquer microscópio ótico. ^[40]

Em microscopia eletrónica de transmissão (TEM) os eletrões atravessam a amostra e são desviados, uns mais que outros, consoante a composição da amostra. A forma como o coletor recebe a onda de eletrões após ter interagido com a amostra é que proporci-

ona a imagem. Se a onda de elétrons não possuir alterações a imagem obtida é “invisível”. A resolução atingida depende por exemplo da natureza eletromagnética das lentes mas, de um modo geral, é possível atingir limites de resolução de 0.1 nm.^[40] Este tipo de técnica consegue obter imagens que apresentam detalhes ínfimos como colunas de átomos, sendo ideal para a análise de formas e a nível de nanotecnologia

Com a microscopia eletrónica de varrimento (SEM) é possível visualizar filmes com espessuras maiores. Este método de análise é bastante similar ao anterior variando na maneira como os elétrons se comportam na superfície da amostra. Neste caso, os elétrons em vez de atravessarem a amostra colidem com a superfície desta o que permite obter uma vista tridimensional da superfície.^[40] Com esta técnica pode-se obter imagens da superfície da amostra com uma resolução bastante alta da ordem dos 10 nm (mas menor que no caso do TEM).

Parte Experimental

3.1. Reagentes

Para o procedimento experimental foram utilizados os reagentes descritos abaixo:

- κ - Carragenano (Fluka);
- Ácido ascórbico, $C_6H_8O_6$ (José M. Vaz Pereira S.A);
- Ácido cloroáurico (III) trihidratado, $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, pureza 99,9% (Sigma-Aldrich);
- Azul-de-metileno (AzM), $C_{16}H_{18}N_3SCl$, (Riedel-de-Haën);
- Brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), $C_{19}H_{42}BrN$, pureza 99%, (Sigma-Aldrich);
- Borohidreto de sódio, $NaBH_4$ (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de benzildimetilamónio (BDAC), $C_{25}H_{46}ClN$ (Sigma-Aldrich);
- Cloreto de potássio, KCl , pureza 90%, (Sigma-Aldrich);
- Nitrato de prata, $AgNO_3$ (José M. Vaz Pereira S.A);
- Solução tampão de fosfato salina pH 7.4, (PBS) (Sigma-Aldrich);
- Tiosulfato de sódio, $Na_2S_2O_3$ (Sigma-Aldrich);

3.2. Síntese das nanopartículas de ouro

3.2.1. Nanobastonetes

A síntese dos nanobastonetes de ouro foi executada segundo o método de crescimento de sementes descrito na referência ^[30]. O procedimento utilizado permite preparar nanobastonetes com a razão de aspeto maior, à qual corresponde a banda de plasmão longitudinal localizada com o comprimento de onda maior, na zona do NIR. Este método envolve duas etapas. A primeira consiste na redução do sal de ouro e na formação de pequenas nanopartículas de ouro, designadas por sementes. A etapa seguinte consiste no crescimento das sementes até obter nanobastonetes com a razão de aspeto e as respetivas propriedades óticas desejadas. Para este trabalho pretendeu-se preparar nanobastonetes de ouro apresentando o máximo de banda de plasmão longitudinal localizado a cerca de 1050 nm.

Para a preparação da solução de sementes (etapa 1) adicionou-se 5 mL de solução aquosa de CTAB (0.20 M) a 5 mL de solução aquosa de H_{Au}Cl₄ (0.5 mM) e colocou-se sob agitação. Posteriormente acrescentou-se 0.60 mL de NaBH₄ (0.010 M), tendo-se verificado o amarelecimento da amostra. Após agitação durante 2 minutos, guardou-se a solução de sementes à temperatura de 25 °C.

Para a obtenção dos nanobastonetes de ouro com a banda de plasmão longitudinal perto dos 1050 nm (etapa 2), preparou-se primeiro 5 mL de uma solução aquosa de BDAC (0.15 M) e adicionou-se 0.010 g de CTAB. Os surfatantes foram dissolvidos com o auxílio do banho de ultra-sons, durante 20 minutos, à temperatura de 40 °C. Posteriormente adicionou-se 200 µL de solução aquosa de AgNO₃ (4 mM) e de seguida 5 mL de solução aquosa de H_{Au}Cl₄ (1 mM). Após uma suave agitação acrescentou-se 70 µL de solução aquosa de C₆H₈O₆ (0.0778 M) e 12 µL da solução de sementes. A solução resultante foi mantida em repouso durante um período de 7 dias conforme recomenda a referência ^[30], para que ocorresse o crescimento dos nanobastonetes.

Com o propósito de retirar os surfatantes procedeu-se a 3 lavagens, centrifugou-se a amostra durante 30 minutos a 6000 rpm, retirou-se o sobrenadante e substituiu-se pela mesma quantidade de água ultra pura, agitou-se de forma a ter uma dispersão homogénea, repetiu-se o mesmo procedimento para as restantes lavagens. Na última lavagem, a centrifugação foi realizada durante 60 minutos a 10000 rpm, retirou-se o sobrenadante e fez-se o volume com água ultrapura.

Com o intuito de verificar se os nanobastonetes apresentam as propriedades óticas e a morfologia desejada procedeu-se à sua análise recorrendo a espectroscopia UV-Vis-NIR e microscopia eletrónica de transmissão (TEM).

3.2.2. Nanoprismas

O método utilizado para produzir nanoprismas de ouro está descrito na referência ^[41]. As condições experimentais foram selecionadas com o intuito de obter os nanoprismas em que a banda de plasmão longitudinal se localiza perto dos 1050 nm (do mesmo modo que na síntese dos nanobastonetes).

Para a preparação dos nanoprismas juntou-se 10 mL de solução aquosa de HAuCl_4 (2 mM) a 12 mL de solução aquosa de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0.35 mM) e deixou-se em agitação (700 rpm) durante 9 minutos. Após 5 minutos, observa-se a mudança da cor da mistura de amarelo para castanho. Passados os 9 minutos procedeu-se à adição de 5 mL de solução aquosa de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0.35 mM) e manteve-se com a mesma agitação até perfazer um total de 90 minutos de reação.

Seguidamente, com o propósito de tirar o excesso de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ existente na solução, procedeu-se a uma centrifugação a 8000 rpm, durante 5 minutos, retirou-se o sobrenadante e perfez-se com o mesmo volume de água ultrapura, 27 mL.

À semelhança do efetuado para os nanobastonetes, analisou-se o espectro de absorção UV-Vis-NIR e as imagens da microscopia eletrónica de transmissão (TEM) para averiguar as propriedades dos nanoprismas.

3.2.2.1. Estabilidade das nanoparticulas ao laser

Com o fim de observar o comportamento ótico da solução de ouro depois de esta ser exposta à radiação, colocou-se num tubo de vidro (diâmetro 0.70 cm) 1 mL da solução de nanoparticulas de ouro e fez-se incidir na solução um laser monocromático com comprimento de onda a 1064 nm e potência de 400 mW. A solução foi exposta ao laser durante períodos de 1 hora (equivalente a 1000 scans), posteriormente analisou-se a solução por espectrofotometria UV-Vis para avaliar a localização dos bandas de absorção.

3.3. Preparação dos filmes nanocompósitos

Os filmes nanocompósitos de κ -carragenano foram preparados a partir de soluções aquosas de κ -carragenano (20 mg/ml) diferenciando-se entre si pelo teor e tipo de fase dispersa (nanobastonetes ou nanoprismas de ouro). Foram preparados filmes com os teores mássicos de 0.1 e 0.2% m/m (massa de nanopartículas por massa de polímero). O procedimento realizado teve a sequência descrita em seguida, denotando que os volumes para as diferentes concentrações variam e encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Composição dos filmes preparados

<i>Tipo de nanopartículas</i>	<i>Branco</i>	<i>Nanobastonetes</i>		<i>Nanoprismas</i>	
% Au nos filmes	0.00%	0.10%	0.20%	0.10%	0.20%
κ-carragenano (± 0.1 mg)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
H₂O (± 0.001 mL)	4.181	4.104	4.104	5.000	5.000
Solução de nanopartículas (± 0.01 mL)	0.000	0.077	3.884	0.008	0.250
AzM (± 0.01 mL)	0.410	0.410	0.410	0.500	0.500
KCl (± 0.01 mL)	0.410	0.410	0.410	0.500	0.500

A massa de κ -carragenano foi pesada num erlenmeyer e adicionou-se água ultrapura, tapando-o. Deixou-se a dissolver num banho de água, à temperatura de 80-90 °C (temperatura superior a temperatura de gelificação), sob o efeito de agitação suave.

Posteriormente adicionou-se a solução dos nanopartículas de ouro, assim como o azul-de-metileno, AzM (0.3 mg/ml), e o KCl (1M). Após se ter adicionado estes componentes, voltou-se a tapar o erlenmeyer e deixou-se durante 30 minutos no banho de água, nas mesmas condições, de maneira a garantir que a mistura final seja o mais homogênea possível. De seguida, colocou-se 3mL da solução obtida numa caixa de Petri (diâmetro 5.00 ± 0.05 cm) e deixou-se arrefecer de modo a induzir a formação de um gel (Figura 11). Posteriormente tapou-se a caixa de Petri com *parafilm* e colocou-se na estufa a 25°C, de modo a que a secagem seja a mais controlada possível e para que o filme obtido não adira ao vidro. A secagem demora cerca de 10 a 15 dias.

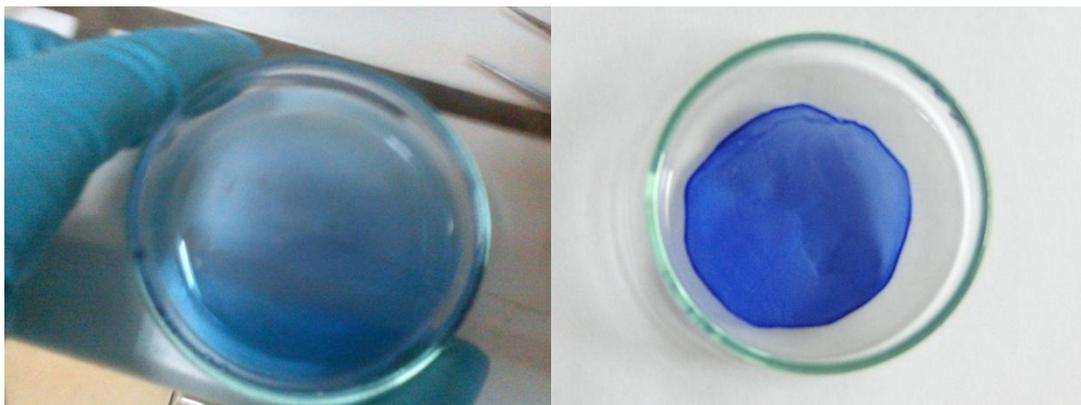


Figura 11. Imagem do filme na caixa de Petri antes e depois da secagem, respetivamente.

De forma a apurar a conformidade da espessura e da microestrutura dos filmes, estes foram medidos com o micrómetro e analisados por microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Os filmes foram caracterizados por espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR-ATR). O teor em ouro nos filmes compósitos foi determinado por análise química (ICP). A sensibilidade dos géis à temperatura foi avaliada por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) dos filmes após intumescimento em PBS.

Procedeu-se à preparação de novos géis nas mesmas condições que os géis preparados anteriormente com a exceção do volume de AzM que foi substituído por água. Após a preparação dos géis estes foram colocados em células de plástico, arrefecidas e analisados no espectrofotómetro para se poder observar o comportamento ótico do hidrogel compósito.

3.4. Intumescimento

Os filmes foram expostos a ensaios de intumescimento do modo descrito em seguida. Os filmes usados foram cortados com o auxílio de um cortante de forma rectangular, com dimensões de 10×2 mm, obtendo-se o filme com áreas e pesos o mais uniforme possível. Estes filmes foram pesados e colocados num *ependorf*. De seguida, adicionou-se 0,4mL de PBS e fecharam-se os *ependorf*. Após 2h30min, o excesso de PBS foi retirado e os filmes foram novamente pesados.

Posteriormente procedeu-se ao cálculo da razão de intumescimento (Q) segundo a equação:

$$Q = \frac{W_f - W_i}{W_i} \quad (4)$$

Em que W_f e W_i é a massa do filme intumescido e a massa do filme seco, respetivamente.

3.5. Ensaios de libertação

Os ensaios de libertação concretizados neste trabalho têm como objetivo avaliar se a libertação de moléculas de azul-de-metileno encapsuladas nos nanocompósitos de ouro pode ser promovida pela incidência de radiação na zona do infravermelho próximo (NIR).

O fármaco modelo utilizado é o azul-de-metileno devido a ser um corante catiónico que é solúvel em água. O azul característico do composto deve-se ao seu estado oxidado, e apresenta um máximo de absorvância a comprimentos de onda entre 609 e 668nm, podendo ser facilmente detetado por análise de espectrofotometria da região do visível. São conhecidas algumas aplicações deste fármaco como por exemplo no tratamento de infeções bacterianas e virais, no tratamento de cancro e doenças da área da neurológica (exemplo, Alzheimer) [42]. Pelos motivos descritos anteriormente e devido ao facto de se tratar de um composto barato e de fácil acesso, foi selecionado para se utilizar neste trabalho.

Os filmes usados foram cortados com o auxílio de um cortante de forma retangular, com dimensões de 10×2 mm, obtendo-se o filme com áreas o mais uniforme possível.

Para a realização dos ensaios de libertação colocou-se um filme cortado dentro de um tubo de vidro (diâmetro 0.70 cm) e adicionou-se 0,4 mL de PBS. Fez-se incidir na amostra imersa um laser monocromático com comprimento de onda a 1064nm e potência de 400 mW. As amostras foram expostas ao laser durante períodos de 1h e 2h30min (equivalente a 1000 e a 2500 varrimentos, respetivamente).

Concluído o período de exposição, retirou-se o solvente onde se encontrava o filme e analisou-se por espectrofotometria UV-Vis para determinar a quantidade de azul metileno libertado. Como controlo realizaram-se ensaios de libertação em condições idênticas mas sem exposição ao laser.

Um outro método usado para verificar o comportamento de libertação do fármaco, aqui designado por “ON/OFF”, teve como método o procedimento anteriormente descrito com períodos de exposição de 1h alternados com períodos sem exposição de 1h, até que o filme apresentasse degradação. Após cada período de exposição ao laser analisou-se o sol-

vente por espectrofotometria UV-Vis. A concentração de AzM do solvente foi também determinada a meio do tempo de repouso e no fim deste (antes de se fazer incidir o laser) para se avaliar se o comportamento de libertação se altera durante os períodos de repouso (sem exposição ao laser).

3.6. Instrumentação

3.6.1. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

O calorímetro diferencial de varrimento usado foi o DSC 50 Shimadzu. Os termogramas foram adquiridos no intervalo de aquecimento de 20 a 80 °C a uma velocidade de 2 °C/minuto.

3.6.2. Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Para a caracterização dos filmes recorreu-se à leitura dos espectros de infravermelho. Para tal foi utilizado um espectrofotómetro de infravermelho FTIR Brucker Tensor 27. Os espectros foram registados com 256 varrimentos e com uma resolução de 4 cm⁻¹, utilizando o acessório de refletância total atenuada (ATR).

3.6.3. Espectroscopia do ultravioleta-visível-infravermelho próximo (UV-Vis-NIR)

As nanopartículas foram examinadas recorrendo aos espectros de absorção UV-Vis, obtidos no espectrofotómetro UV-Vis-NIR Shimadzu UV-3100 e também no espectrofotómetro UV-Vis Hitachi U-2000. Para os respetivos registos utilizou-se células de quartzo e como solvente de referência a água destilada.

Para o estudo da quantidade de azul metileno libertado obtiveram-se os espectros de absorção no espectrofotómetro UV-Vis Jasco V-560 utilizando células de quartzo e água destilada como solvente de referência.

3.6.4. Microscopia eletrónica

A microscopia eletrónica da transmissão (TEM) foi utilizada para a análise das nanopartículas de ouro. O microscópio utilizado foi Hitachi H-9000, operado a 300kV. As

amostras foram preparadas depositando uma gota de uma solução aquosa diluída de nanopartículas de ouro sobre uma grelha de cobre revestida com um filme de carbono.

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM) foi empregada para observar os filmes, utilizando-se um microscópio Hitachi SU-70 operado a 15 kV. Para a preparação das amostras procedeu-se à sua fixação num suporte de alumínio com fita-cola de carbono, sendo posteriormente revestidas com carbono.

3.6.5. Micrometria

A espessura dos filmes foi medida utilizando o micrómetro Mitutoyo, que mede no intervalo entre os 0 e 25mm com um erro de 0.001mm.

4. Resultados Experimentais e Discussão

4.1. Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro

4.1.1. Nanobastonetes

Após a síntese dos nanobastonetes de ouro analisou-se se estes apresentavam as características pretendidas, ou seja, que a banda longitudinal se encontra na zona dos 1050 nm. Para tal procedeu-se à sua caracterização utilizando espectroscopia do Vis-NIR e TEM. Na Figura 12

Figura 12 apresenta-se o espectro de absorção do Vis-NIR de uma solução de nanobastonetes de ouro.

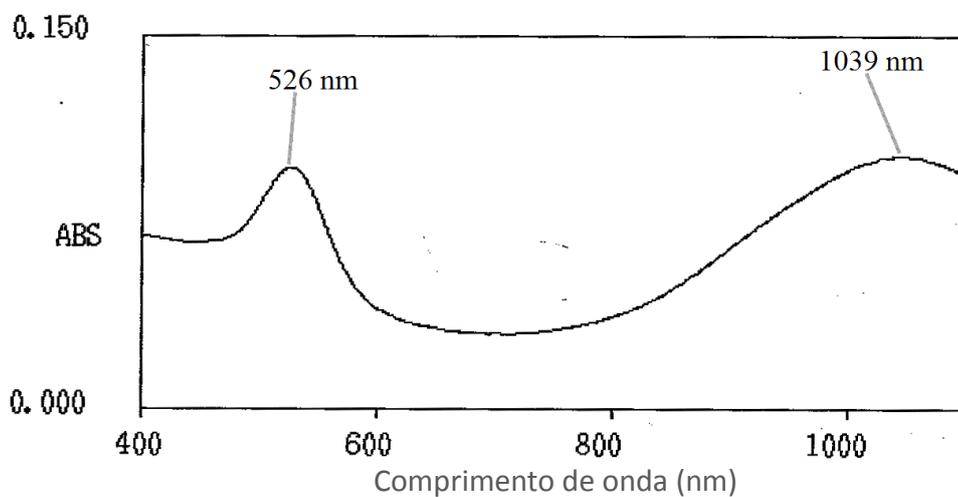


Figura 12. Espectro de absorção do Vis-NIR de uma solução contendo nanobastonetes.

No espectro podem ser identificados duas bandas relevantes, um com máximo a 526 nm e que corresponde à banda de plasmão transversal e o outro com máximo a 1039 nm e que corresponde à banda de plasmão longitudinal. Os resultados são indicativos de que as propriedades óticas se encontram na gama do pretendido.

Para observar a morfologia e calcular a razão de aspeto dos nanobastonetes utilizou-se a técnica de microscopia eletrónica da transmissão (TEM) tendo-se obtido as imagens apresentadas na Figura 13.

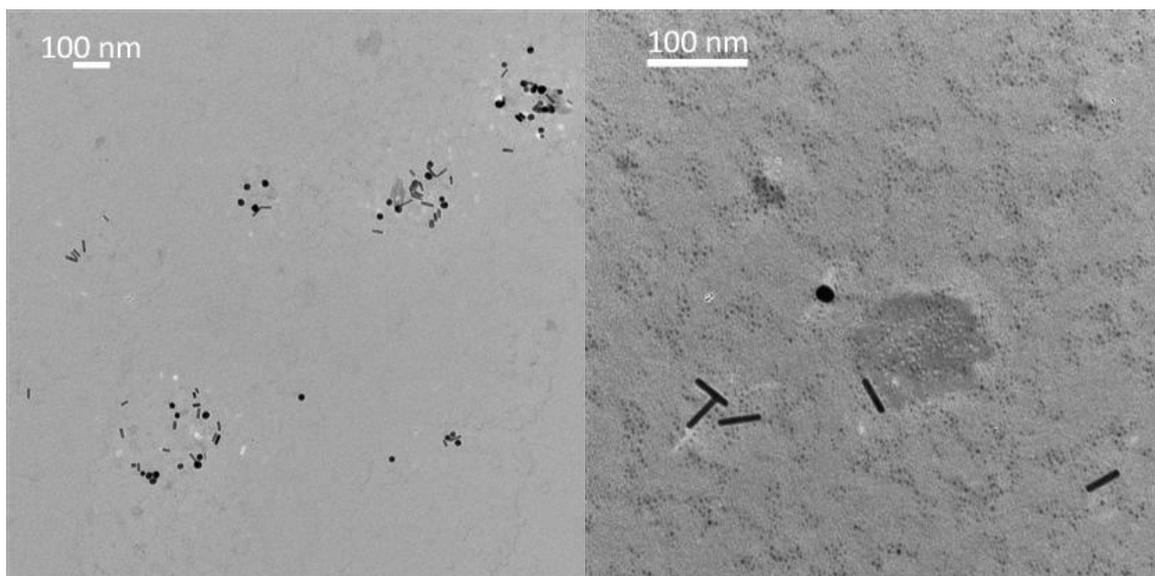


Figura 13. Imagens de TEM dos nanobastonetes de ouro a diferentes ampliações.

A partir das imagens obtidas pelo TEM e com o auxílio do programa ImageJ verificou-se que o comprimento medio dos nanobastonetes é de 40.3 ± 8.4 nm e a largura 10.4 ± 3.6 nm. A razão de aspeto (quociente entre o comprimento e a largura) é de 3.9 ± 0.8 .

Como se pode verificar tanto pela intensidade da banda situada a 526 nm, Figura 12, como na imagem obtida no TEM, Figura 13, a amostra obtida contém uma quantidade significativa de esferas. No intuito de aumentar a quantidade de nanobastonetes obtidos e diminuir o número de partículas esféricas, procedeu-se a inúmeras experiências. Estudou-se o efeito da variação da temperatura tanto durante a experiência, como no tempo de repouso (etapa de crescimento). Executou-se o procedimento com e sem agitação durante o tempo de repouso, na presença de luz e na ausência desta e com temperaturas diferentes. Apesar dos esforços efetuados não foi possível obter uma amostra com menor proporção de nanoesferas em relação aos nanobastonetes.

4.1.2. Nanoprismas

Os nanoprismas de ouro foram analisados da mesma forma que os nanobastonetes, ou seja, foram averiguadas as características óticas utilizando espectroscopia UV-Vis-NIR e as características morfológicas através de TEM.

Na Figura 14 apresenta-se o espectro de absorção do Vis-NIR de uma solução de nanoprismas de ouro.

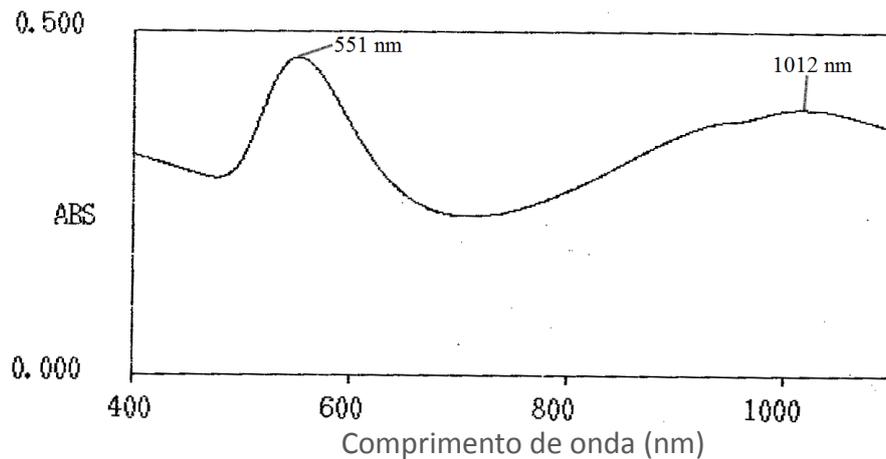


Figura 14. Espectro de absorção de uma solução contendo os nanoprismas.

No espectro da Figura 14 são reconhecidos duas bandas relevantes, uma banda que corresponde a banda de plasmão transversal aos 551 nm e um outro banda ao qual corresponde a banda de plasmão longitudinal na região dos 1012nm. Foi portanto possível sintetizar nanoprismas com uma banda de plasmão na zona dos 1050 nm, tal como pretendido. No entanto verifica-se novamente através dos valores de absorvância que ainda se encontra grandes concentrações de nanopartículas que absorvem na zona dos 551 nm em comparação com as que absorvem na gama dos 1012 nm, sendo a absorvância inferior.

Para nos certificarmos que as nanopartículas, que contêm as características óticas pretendidas, apresentam a forma de prismas recorreu-se à microscopia eletrónica de transmissão (TEM), Figura 15.

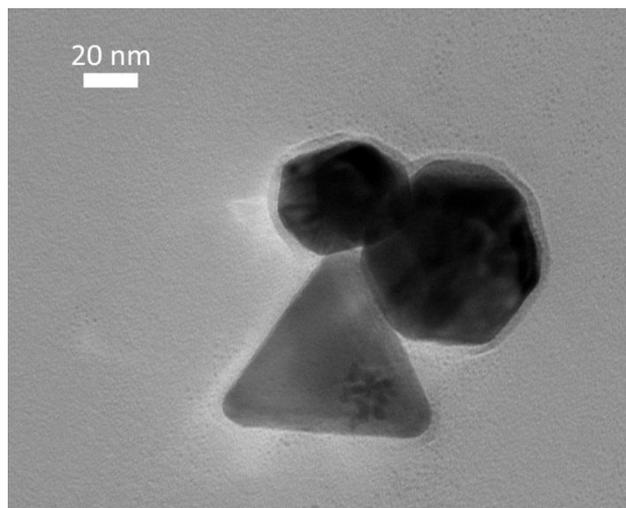


Figura 15. Imagem de TEM de nanoprisma de ouro apresentando banda de plasmão 1012 nm.

Com o auxílio do TEM certificou-se que a forma das nanopartículas eram prismas, triangulares e hexagonais como se esperava. É importante mencionar que, mesmo após lavagem dos nanoprismas, se observou algum desvio da banda de plasmão para comprimentos de onda menores nos dias subsequentes à síntese. Isto indica alguma instabilidade do sistema. Por essa razão houve a necessidade de congelar a amostra imediatamente após a realização da síntese e lavagem, para posterior análise por TEM. A quantidade de nanoprismas observada foi pequena e sendo assim não foi possível calcular a razão de aspecto de modo fiável.

É de salientar que, a reprodução exata das condições experimentais indicadas na referência ^[41] não permitiu obter os nanoprismas com a banda longitudinal na gama dos 1050 nm, ao contrário do esperado. Para a sua obtenção houve a necessidade de ajustar a concentração do tiosulfato de sódio, e de determinar qual a velocidade de agitação que era mais apropriada, assim como ajustar o tempo reacional a que decorre a segunda adição do tiosulfato de sódio. Pode-se verificar que quando a temperatura ambiente era mais baixa ($\pm 6^\circ\text{C}$) a viragem da cor não se verificava aos 5 minutos mas sim passados mais uns minutos, sendo a reação mais lenta houve a necessidade de se esperar mais uns minutos, na mesma proporção de 5:9, para realizar a segunda adição do tiosulfato de sódio. Após a reação terminada, com o intuito de eliminar excessos de sal e de nanoesferas em solução procedeu a uma lavagem das nanopartículas com uma centrifugação a 8000 rpm e durante 5 minutos. Verificou-se que o aumento do número de rotações e/ou do tempo de centrifugação, era prejudicial, conduzindo ao desvio da banda de plasmão para valores menores de comprimentos de onda.

Dado que os nanoprismas não eram muito estáveis, executou-se de imediato a síntese dos filmes com o intuito que as nanopartículas se dispersassem na solução de κ -carragenano e não perdessem as suas propriedades óticas.

De notar que no decorrer das várias tentativas de síntese, foi possível obter nanoprismas triangulares mais estáveis e em quantidade significativa (Figura 16). No entanto estes não apresentavam as propriedades óticas adequadas aos objetivos deste trabalho dado que a banda de plasmão se encontrava a 958 nm.

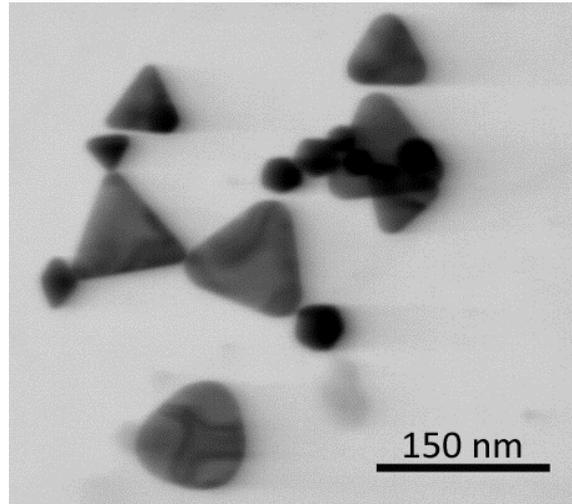


Figura 16. Imagem de SEM de nanoprismas triangulares com banda de plasmão a 958 nm.

4.1.2.1. Estabilidade das nanoparticulas ao laser

Após se ter exposto a solução de nanobastonetes ao laser verifica-se que a banda de plasmão longitudinal se desloca para valores inferiores ao inicial, Figura 17. Este desvio pode indicar a ocorrência de agregação ou uma ligeira alteração da morfologia dos nanobastonetes, como resultado da exposição ao laser.

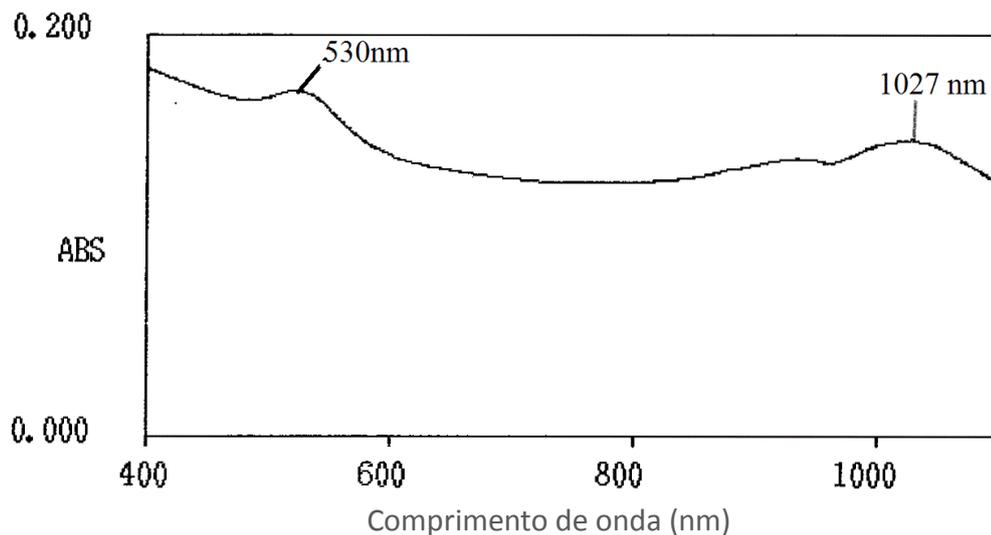


Figura 17. Espectro de absorção do Vis-NIR de uma solução de nanobastonetes depois de exposta ao laser durante 1 hora.

A estabilidade dos nanoprismas após exposição ao laser não foi avaliada dado que o sistema mostrou sinais de instabilidade logo após a síntese, tal como referido antes.

4.2. Caracterização dos filmes de κ -carragenano

Tal como descrito anteriormente os filmes foram preparados em caixas de petri e a secagem foi efetuada em condições de temperatura controlada. Os filmes produzidos possuem pequenas variações na espessura como se pode verificar na Figura 18. A espessura média dos filmes preparados é de aproximadamente 50 μm .

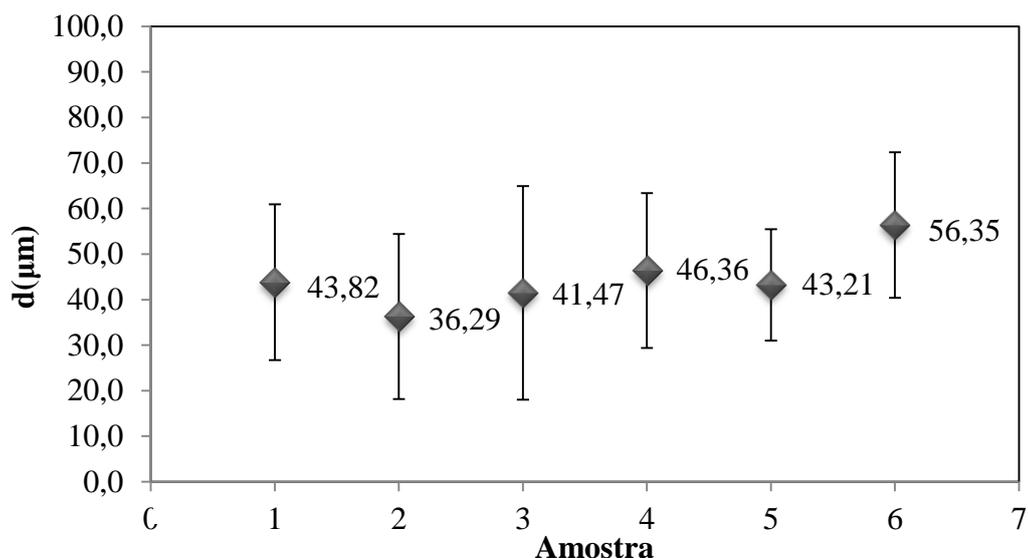


Figura 18. Valores médios da espessura dos filmes preparados: branco (1), branco com AzM (2), compósitos com 0.1 % e 0.2 % NRs (3 e 4, respetivamente) e compósitos com 0.1 % e 0.2 % NPs (5 e 6, respetivamente).

De forma a facilitar a leitura, quando neste relatório se diz que é branco indica que se trata do filme de carragenano que não contém nanopartículas e quando é 0.1 % e 0.2 % de NRs estes referem-se à percentagem mássica de NRs calculada com base na quantidade de polímero (massa de nanobastonetes de ouro por massa de polímero no filme). De modo semelhante quando se menciona 0.1 % e 0.2 % de NPs estes referem-se à percentagem mássica de nanoprismas de ouro no filme, calculada de modo idêntico.

Com o auxílio da microscopia eletrónica de varrimento (SEM) foram obtidas as imagens da Figura 19, onde se pode verificar que as microestruturas da superfície dos filmes não se alterou quando se adicionou diferentes concentrações e/ou morfologias das nanopartículas.

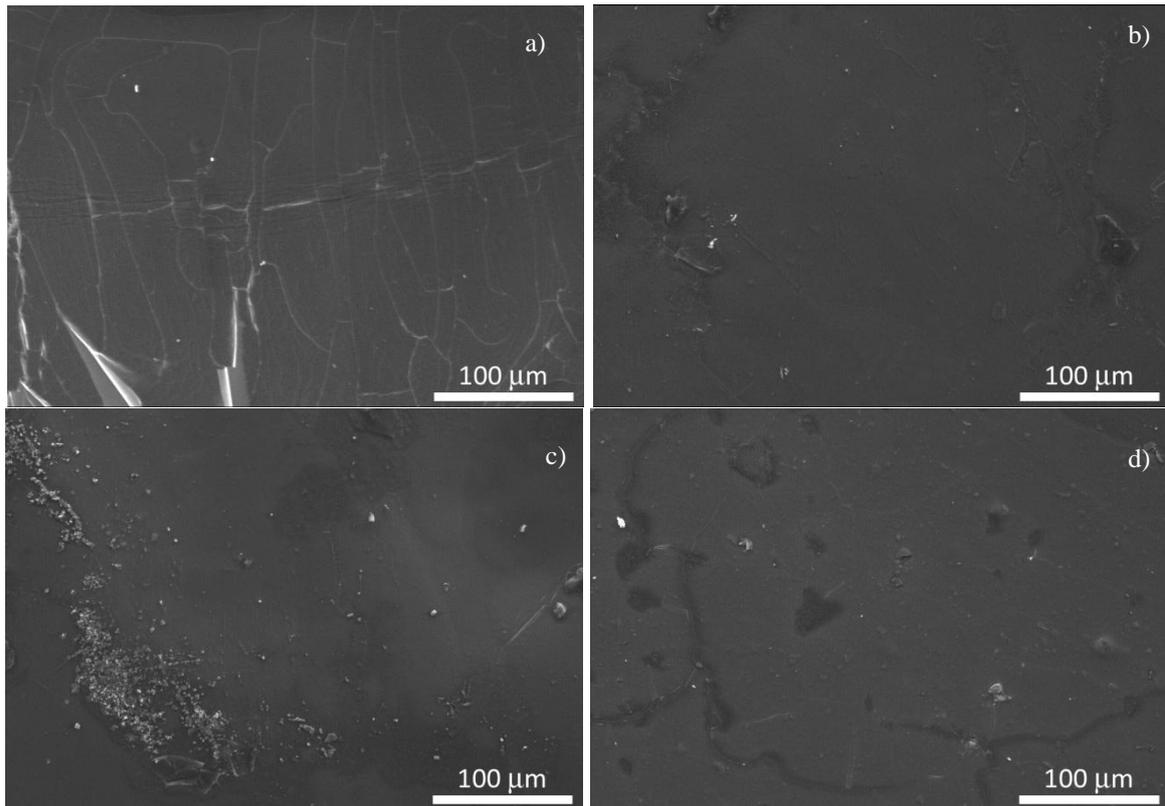


Figura 19. Imagens de SEM dos filmes com diferentes teores de nanopartículas: a) 0.1 % NRs; b) 0.2 % NRs; c) 0.1 % NPs; e d) 0.2 % NPs.

Com o propósito de examinar a estrutura química e possíveis alterações provocadas pela adição das nanopartículas, para as diferentes concentrações, nos filmes κ -carragenano procedeu-se à sua análise por espectroscopia FTIR-ATR.

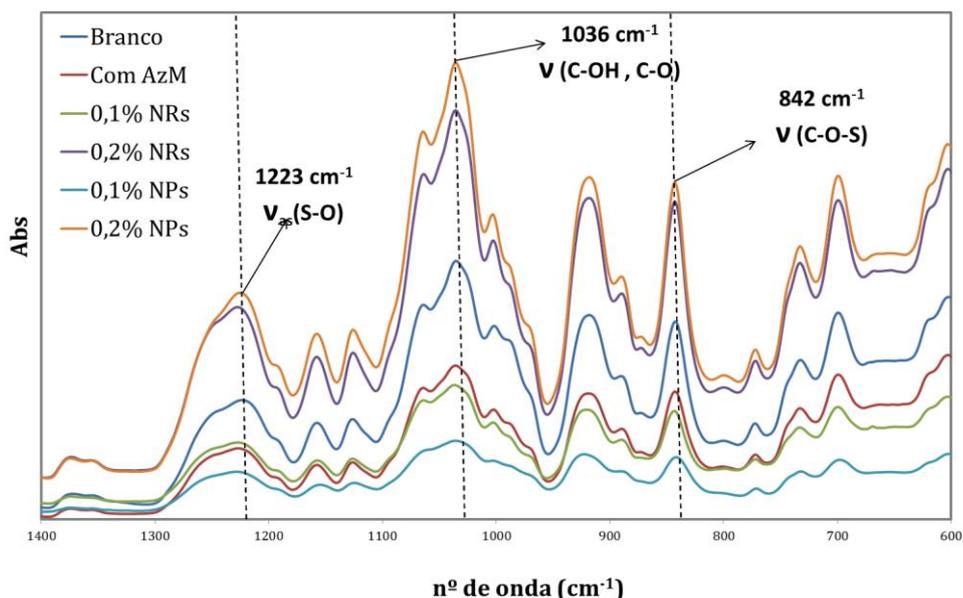


Figura 20. Espectros de FTIR-ATR dos filmes com diferentes concentrações de NRs e NPs.

Ao examinar o espectro de infravermelho, Figura 20, é possível verificar que todas as bandas identificadas correspondem às bandas da vibração do hidrogel utilizado, κ -carragenano. A banda em 1236 cm⁻¹ corresponde à vibração de alongação assimétrica da ligação S-O. A banda aos 1039 cm⁻¹ é própria da vibração simétrica das ligações C-O e C-OH. E num outro banda significativo encontra-se na banda dos 845 cm⁻¹ é resultante da vibração C-O-S na unidade $\alpha(1-3)$ -D-galactose [19, 20]. Dado que não se observou o desvio das bandas ou o aparecimento de novas bandas de vibração, é possível concluir que a estrutura química não é alterada, pelo menos significativamente, aquando da adição das diferentes concentrações de nanopartículas, nanobastonetes ou nanoprismas.

Com o intuito de se observar as variações das propriedades térmicas que podem ocorrer quando se alteram a morfologia e/ou a concentração das nanopartículas procedeu-se à análise dos termogramas de DSC (Figura 21). Tal como descrito anteriormente, a análise de DSC foi efetuada aos filmes na forma de gel, após a imersão do filme seco em PBS.

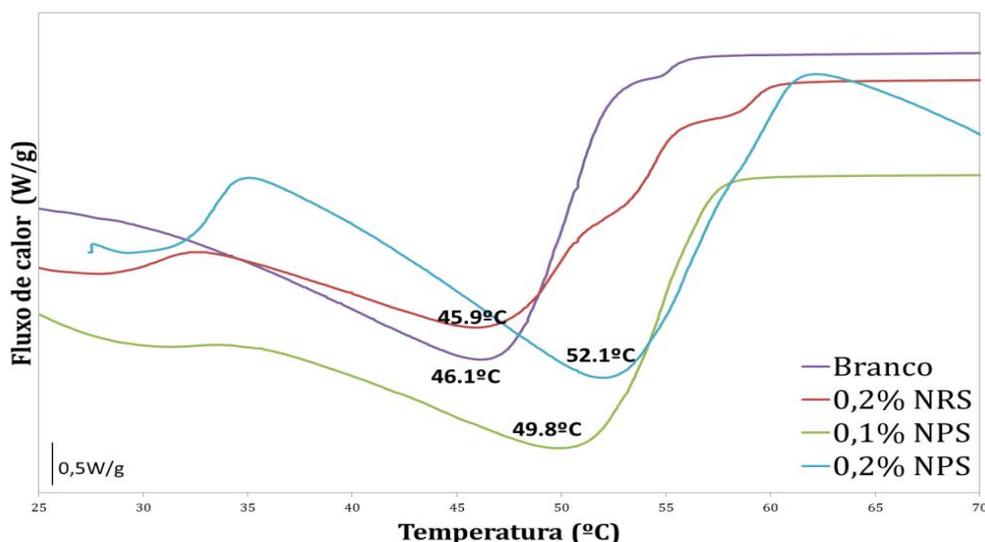


Figura 21. Termogramas de DSC para os géis com as diferentes concentrações e/ou morfologias de nanopartículas.

Na Figura 21 é possível ver que todas as curvas de DSC das amostras analisadas apresentam um pico endotérmico. Este pico corresponde à transição de gel para sol, pois é necessário ceder calor para que se verifique esta transição. A temperatura de fusão, a temperatura ao qual corresponde ao pico principal, para o branco é de 46.1 °C. Com a adição de nanoprismas nos filmes pode-se observar um aumento da temperatura de fusão do mesmo modo que é relatado na literatura para outras nanopartículas de ouro ^[43]. Com a introdução dos nanobastonetes, não se observou variação significativa da temperatura de fusão do gel. Os resultados de DSC mostram que os filmes preparados, quando na forma de hidrogel, são sensíveis à temperatura, propriedades que é imprescindível para a sua utilização na aplicação em estudo.

Para estudar as propriedades óticas dos hidrogéis compósitos, estes foram preparados na ausência de AzM e procedeu-se a sua análise por espectroscopia de UV-Vis-NIR.

Para a concentração de 0.1 % de nanopartículas, independentemente de se tratar de nanobastonetes ou nanoprismas, não foi possível detetar nenhuma banda característica das nanopartículas de ouro, tal como indicado na Figura 22.

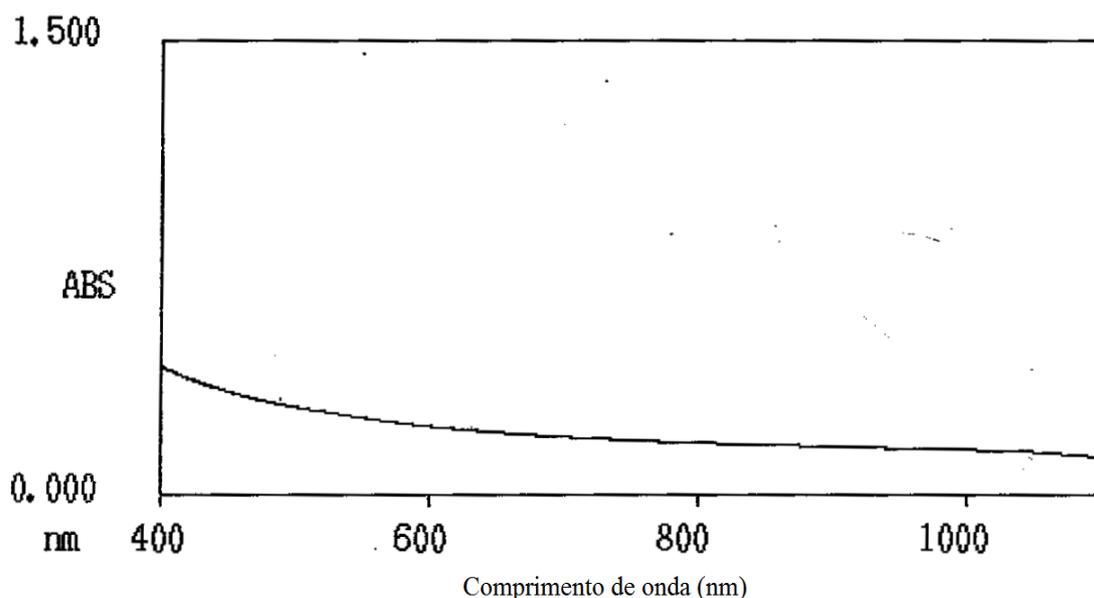


Figura 22. Espectro Vis-NIR para os hidrogéis com 0,1% de nanobastonetes.

Ao observar os espectros obtidos pode questionar se a concentração é suficiente para que se consiga observar as bandas de plasmão das nanopartículas. Nesse caso, e mesmo assumindo que as nanopartículas se encontram homogeneamente distribuídas no filme, podem estar suficientemente afastadas de tal forma que o feixe do espectrómetro UV-Vis-NIR teria incidido numa zona onde não se encontravam nanopartículas de ouro.

No caso dos hidrogéis preparados com a concentração de 0,2 % de nanopartículas já foi possível identificar bandas características das nanopartículas de ouro. Os hidrogéis com nanobastonetes apresentaram um espectro onde podem ser identificados a banda de plasmão transversal aos 526 nm e a banda longitudinal aos 999 nm, Figura 23. Tendo em conta que a banda longitudinal antes da solução de nanobastonetes ser adicionada ao hidrogel se encontrava nos 1039 nm, observa-se um desvio de 40nm. Este desvio pode dever-se a várias razões: à alteração do índice de refração do meio devido à presença do hidrogel, à agregação de alguns nanobastonetes lado-a-lado, diminuindo a sua razão de aspecto, ou a um efeito da temperatura, uma vez que durante a preparação dos géis os nanobastonetes estão sujeitos a temperaturas entre os 80-90 °C. No entanto apesar da banda se ter deslocado, por se tratar de uma banda larga, o hidrogel continua a absorver no comprimento de onda pretendido, a 1064 nm.

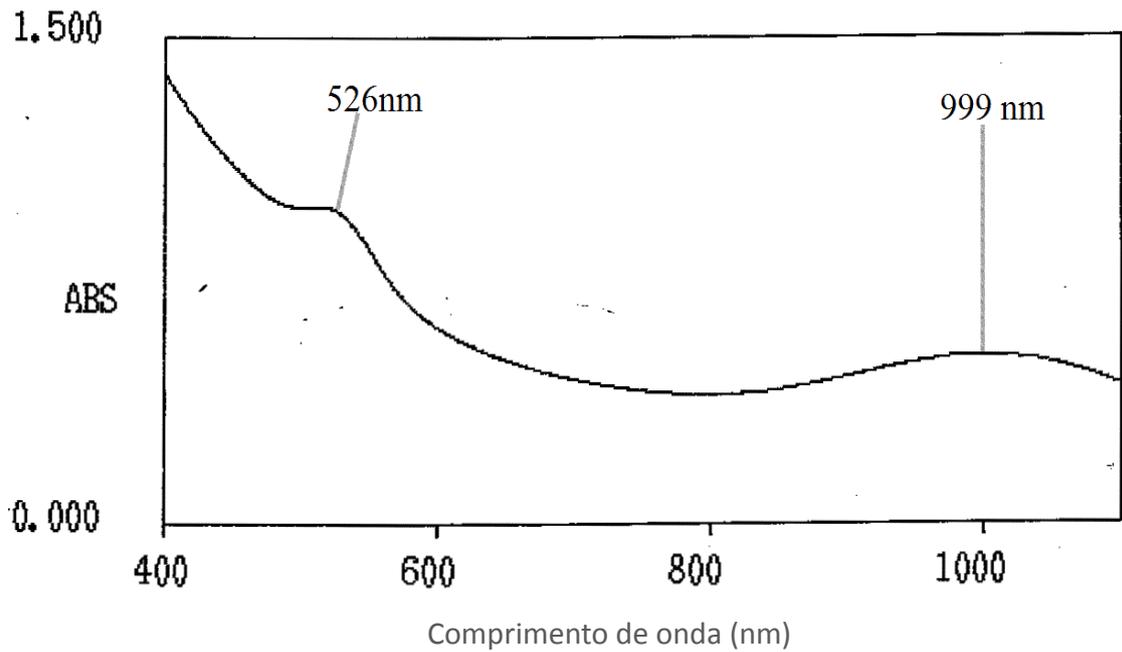


Figura 23. Espectro Vis-NIR dos hidrogéis contendo 0,2% de nanobastonetes.

No caso dos hidrogéis com 0.2 % de nanoprismas a banda de plasmão longitudinal é quase impercetível tal como se pode verificar na Figura 24.

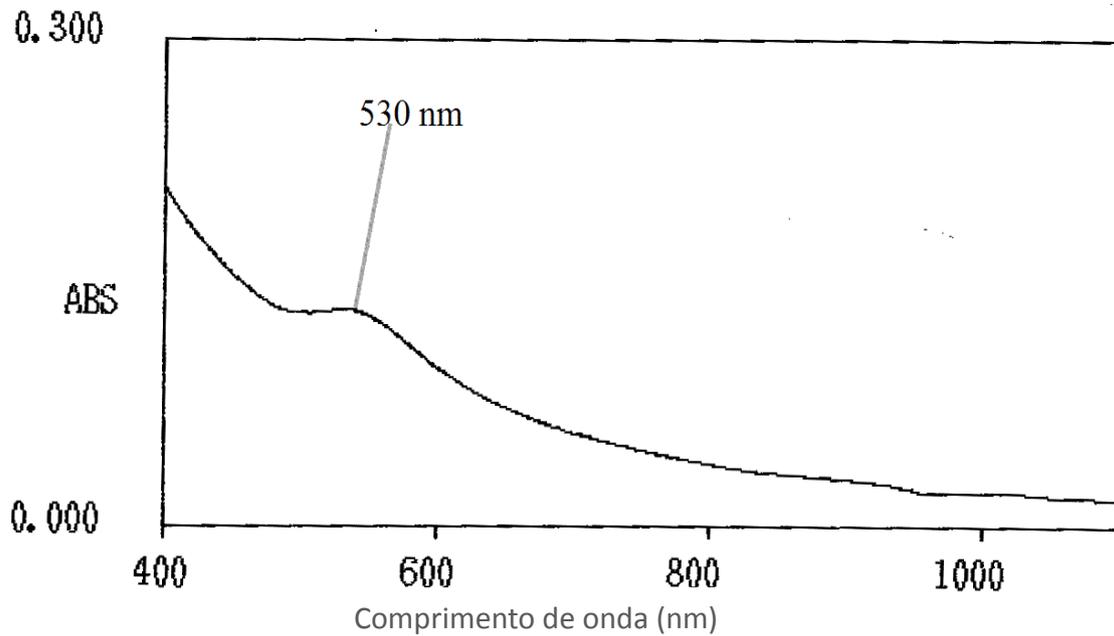


Figura 24. Espectro da absorvância UV-Vis-NIR obtido para os hidrogéis com 0.2 % de nanoprismas de ouro.

4.2.1. Intumescimento

A razão de intumescimento do filme branco com AzM é de 18.4 ± 2.0 . Com a adição de 0.1% de nanobastonetes o intumescimento é próximo ao do branco e quando se aumenta a concentração de nanobastonetes para 0.2 % o intumescimento diminui para 13.6 ± 1.9 . No entanto, quando se trata dos filmes com nanoprismas os resultados observados na Figura 25 mostram que a razão de intumescimento é superior à do branco (24.3 ± 2.6 para 0.1 % de nanoprismas), e que diminui para 21.0 ± 2.1 quando se aumenta a concentração de prismas para 0.2 %.

Com base em outros estudos sabe-se que a introdução de nanopartículas em géis de carragenano pode aumentar ou diminuir a razão de intumescimento do gel, conforme promove ou não a entrada de água no gel. Os resultados dos hidrogéis com nanobastonetes estão de acordo com os resultados descritos na literatura ^[43], em que se verificou uma diminuição da razão de intumescimento do gel de κ -carragenano com a introdução de nanobastonetes longos acima de uma concentração de 480 ppm e podem significar que a estrutura do gel se tornou mais forte (reticulada) limitando a expansão da rede polimérica para a entrada de moléculas de água.

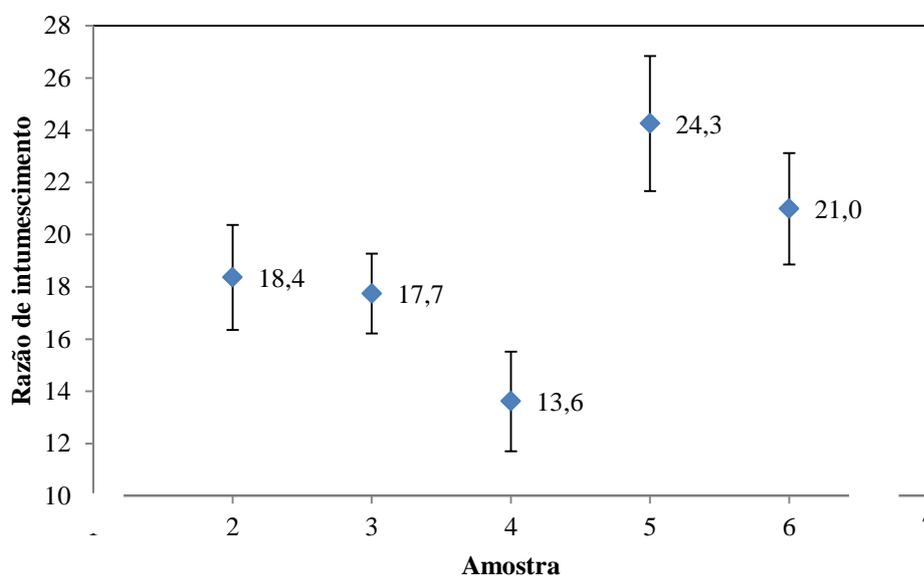


Figura 25. Gráfico dos valores médios da razão de intumescimento dos filmes preparados: branco com AzM (2), compósitos com 0.1 % e 0.2 % NRs (3 e 4, respetivamente) e compósitos com 0.1 % e 0.2 % NPs (5 e 6, respetivamente).

4.3. Ensaio de Libertação

Os filmes nanocompósitos foram imersos em PBS e expostos à incidência de radiação com o comprimento de onda de 1064 nm, durante os períodos de 1 hora e de 2 horas e 30 minutos. Com o objetivo de quantificar a quantidade de azul metileno libertada para o meio envolvente (PBS) este foi analisado por espectroscopia do UV-Vis. O azul-de-metileno tem um máximo de absorção a cerca de 664 nm e a intensidade da banda está diretamente relacionada com a sua concentração em solução. Na Figura 26 mostra-se a título de exemplo os espectros obtidos após a irradiação dos filmes compósitos contendo 0.2 % de nanobastonetes, e comparam-se com os espectros que se obtiveram em ensaios de controlo realizados para o mesmo tempo mas na ausência de radiação, à temperatura ambiente.

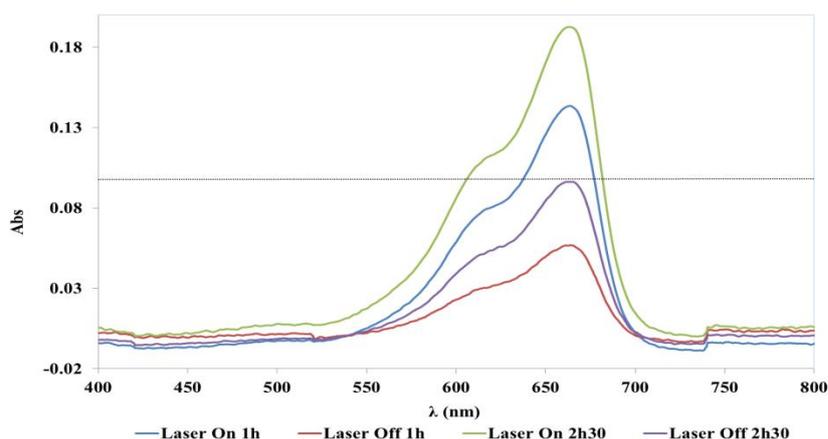


Figura 26. Espectros de UV-Vis do sobrenadante, após a exposição dos filmes compósitos de 0.2 % NRs ao laser durante 1h e 2h30, e comparação com os espectros obtidos nas mesmas condições na ausência de radiação.

É possível observar que mesmo na ausência de radiação (Laser OFF) e à temperatura ambiente (24.5 °C), há libertação de azul-de-metileno, e que a sua concentração aumenta com o tempo. Este comportamento era já esperado, e está de acordo com estudos anteriores ^[6] onde se observou a libertação gradual de azul-de-metileno a partir de plataformas de hidrogéis de κ -carragenano, mesmo à temperatura ambiente e em condições isotérmicas. Quando o filme é exposto à radiação (Laser On) a concentração de azul-de-metileno libertada aumenta e quanto maior o tempo de exposição maior é também a concentração. Estes resultados indicam que a libertação de azul-de-metileno a partir destes filmes compósitos pode ser promovida pela incidência de radiação NIR.

Observou-se um comportamento idêntico nos ensaios de libertação dos restantes filmes com nanobastonetes. Dado que existe uma relação direta entre a absorvância e a concentração de azul-de-metileno, através de uma curva de calibração (Anexo A) foi possível quantificar o azul-de-metileno libertado. Sabendo a massa de azul metileno existente inicialmente em cada filme, calculou-se a percentagem de azul-de-metileno libertado pelos diferentes filmes, Figura 27.

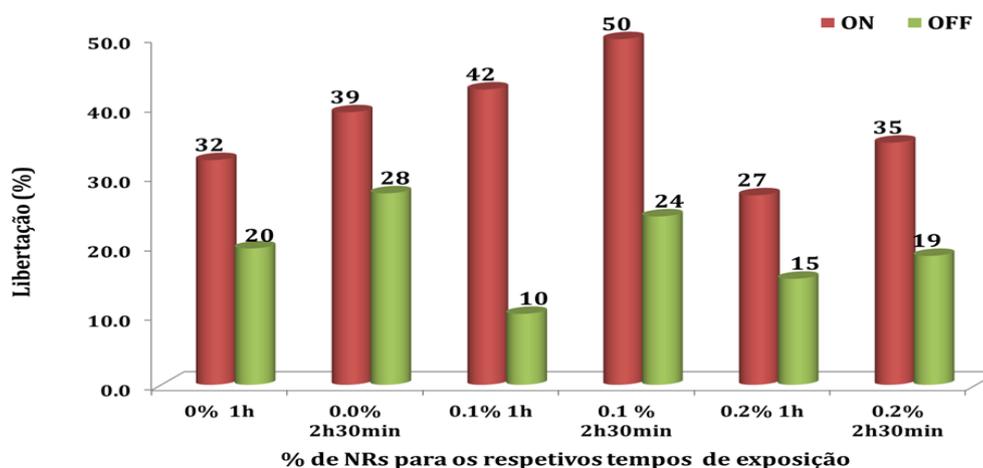


Figura 27. Gráfico da percentagem de azul-de-metileno libertado no filmes com nanobastonetes, após um período de exposição ao laser de 1h ou 2h30, e comparação com a libertação efetuada na ausência de laser.

Com a observação da Figura 27 pode-se verificar que na ausência das nanopartículas de ouro existe libertação de fármaco, independentemente de este ser exposto à radiação ou não, este comportamento pode ser explicado pelo efeito de difusão e intumescimento. Por outro lado, quando o polímero é exposto ao laser o que se verifica é o aumento da percentagem de fármaco libertado, este efeito deve-se ao facto de aumento de temperatura ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) que se verifica no sistema (filme e solvente) por exposição ao laser.

Para os filmes contendo 0.1 % nanobastonetes, Figura 27, verifica-se que existe um aumento de libertação de AzM quando o filme é exposto à radiação. No entanto, na ausência de exposição observa-se que existe redução da libertação, em relação ao branco. Quando se aumenta a percentagem de nanobastonetes para 0.2 %, observou-se que uma inibição da libertação tanto na presença como na ausência de radiação.

No caso dos filmes constituídos por nanoprismas o comportamento de libertação é alterado drasticamente.

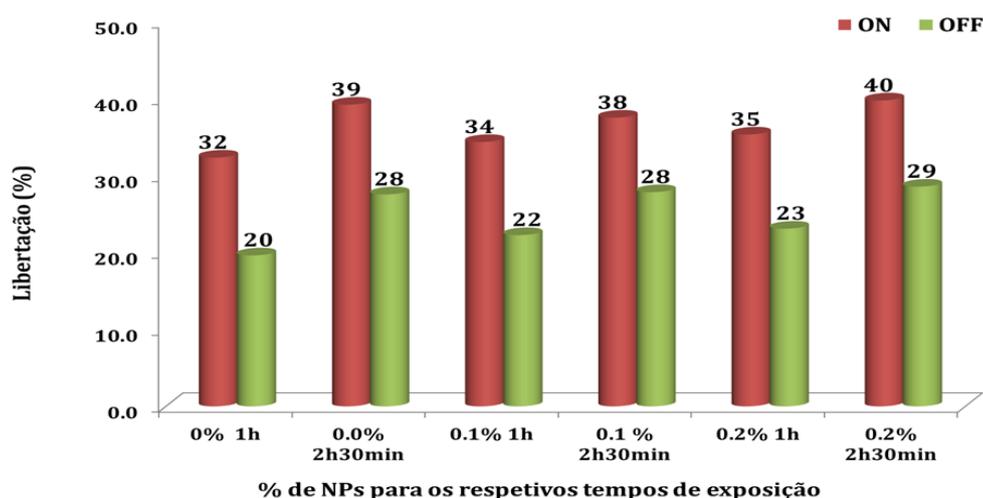


Figura 28. Gráfico da percentagem de azul-de-metileno libertado no filmes com nanoprismas, após um período de exposição ao laser de 1h ou 2h30, e comparação com a libertação efetuada na ausência de laser.

Como se pode verificar na Figura 28 em todos os casos há um aumento da libertação de AzM quando o filme é exposto ao laser. No entanto a percentagem de libertação a partir dos compósitos é idêntica à observada a partir dos filmes sem nanopartículas. Dos resultados mostrados anteriormente verificou-se que os hidrogéis contendo nanoprismas não apresentavam banda de plasmão a 1050nm, o que pode justificar estes resultados.

Os nanoprismas foram sintetizados sem se adicionar um agente estabilizante, como recomendado na literatura^[41] polietilenoglicol, PEG, na expectativa que o κ -carragenano os estabilizasse. No entanto devido a exposição a temperaturas mais elevadas, aquando da preparação os hidrogéis, observa-se alteração das propriedades óticas, provavelmente devido a agregação das nanopartículas. Apesar de se ter observado nanoprismas em TEM estes não se encontravam em grande quantidade e foram congeladas com o intuito de que a cinética da reação após a síntese fosse quase nula. O que é de surpreender é que na análise de DSC e de intumescimento aos filmes com nanoprismas verificou-se melhores resultados do que para as nanobastonetes.

Foi também estudada a libertação de azul-de-metileno dos filmes quando sujeitos a períodos de exposição ao laser (Laser ON) alternado com períodos em que interrompia esta exposição (Laser OFF). Em paralelo realizaram-se ensaios de libertação na total ausência da incidência do laser. Estes ensaios foram realizados apenas para o branco e filmes contendo nanobastonetes. A percentagem de libertação foi calculada e os resultados encontram-se na Figura 29.

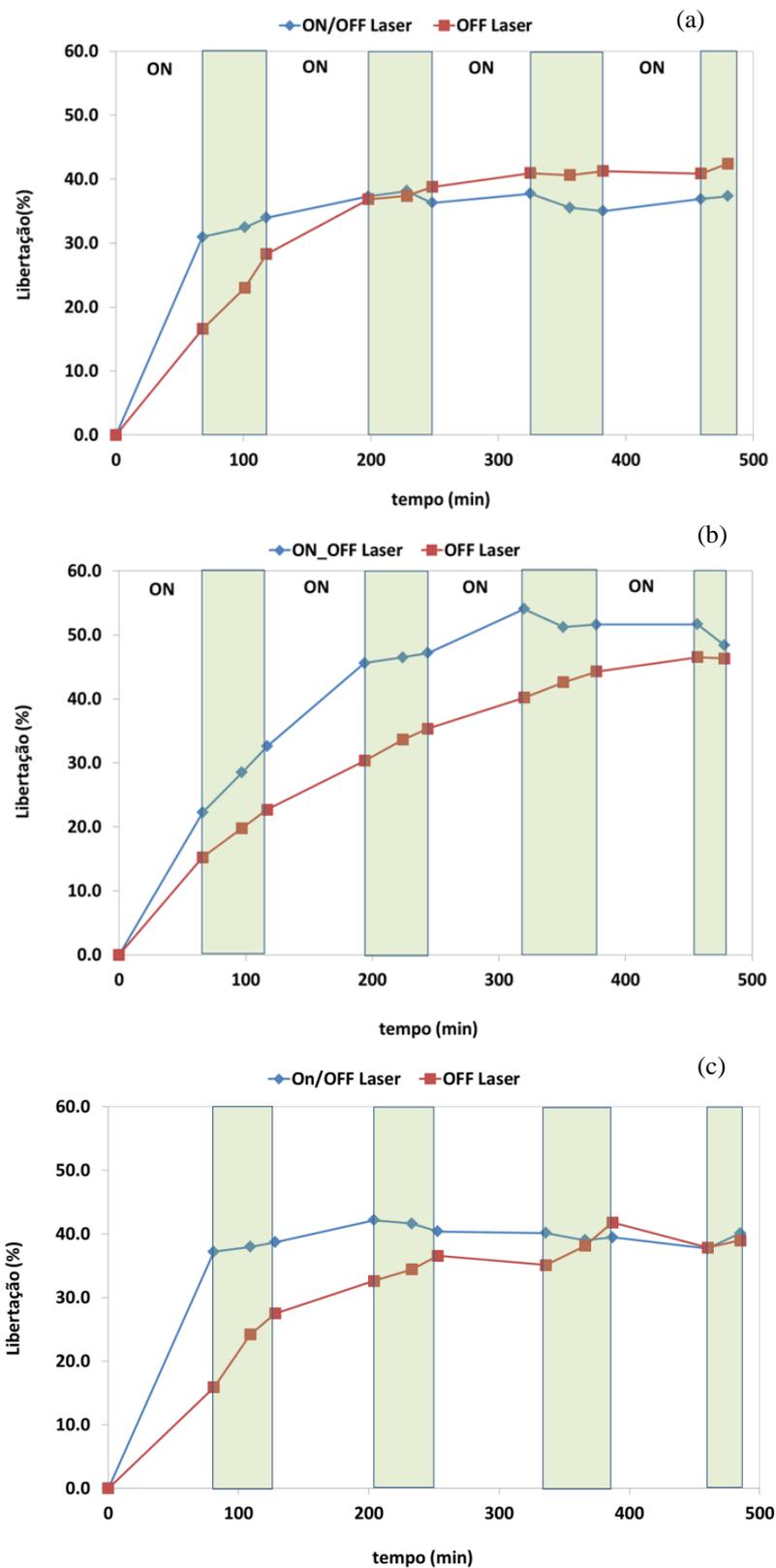


Figura 29. Representações gráficas da percentagem de fármaco libertada para os diferentes filmes pelo método ON/OFF, sendo às zonas assombreado correspondem aos períodos de laser OFF: branco com AzM (a), compositos com 0.1 % e 0.2 % NRs (b e c, respetivamente).

Na ausência de exposição ao laser a libertação de AzM é gradual. A incidência do laser aumenta a velocidade de libertação, em particular nas primeiras horas, mesmo no filme que não contem nanobastonetes. No entanto o efeito do laser na aceleração da libertação é mais evidente nos filmes compósitos. De um modo geral a interrupção da exposição ao laser após 60 min leva ao abrandamento da libertação. No entanto para tempos superiores a diferença de velocidade entre os períodos ON e OFF não é tão significativa. Com a exposição ao laser os sistemas tendem mais rapidamente para o estado estacionário de libertação.

4.4. Modelos cinéticos de libertação de fármaco

Posteriormente ao cálculo da percentagem de libertação de fármaco procedeu-se aos estudos cinéticos segundo os modelos analisados no capítulo revisão bibliográfica. Os gráficos relativamente à modelação cinética dos dados, para cada modelo, encontram-se no Anexo B e os parâmetros cinéticos estimados, assim como o coeficiente de determinação encontram-se na tabela seguinte. O estudo cinético foi realizado apenas para os filmes do branco e compósitos contendo nanobastonetes.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos (k e n) e coeficiente de correlação (r^2) resultantes da aplicação dos modelos cinéticos dos dados de libertação quando não expostos a radiação, para as diferentes concentrações de NRs.

		Ordem Zero	1ª Ordem	Korsmeyer-Peppas
Branco	r^2	0.7701	0.6967	0.9329
	k	$4.794 \times 10^{-4} \text{ mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$1.602 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$7.303 \times 10^{-1} \text{ s}^{-n}$
	n	-	-	0.1210
0.1 % NRs	r^2	0.9472	0.8757	0.9896
	k	$7.569 \times 10^{-4} \text{ mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$2.488 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$1.464 \times 10^{-2} \text{ s}^{-n}$
	n	-	-	0.5716
0.2 % NRs	r^2	0.7263	0.6486	0.8299
	k	$4.272 \times 10^{-4} \text{ mg}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	$1.480 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$3.449 \times 10^{-2} \text{ s}^{-n}$
	n	-	-	0.4052

Ao analisar-se os coeficientes de correlação que se obteve com os dados experimentais, o modelo que melhor se adapta a este sistema de libertação é o modelo de Korsmeyer-Peppas.

Ao comparar os valores obtidos do parâmetro n , Tabela 3, com os valores da Tabela 1 é possível concluir que para o filme sem nanopartículas o mecanismo de libertação é controlado por difusão Quasi Fickiano, assim como para o filme com 0.2 % de NRs. No entanto para os filmes com 0.1 % de NRs o mecanismo que descreve a libertação é anómalo, significando que há uma contribuição de fenómenos de difusão e de intumescimento do gel no controlo da velocidade da libertação.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

Com a elaboração deste trabalho confirmou-se que é possível sintetizar nanopartículas de ouro com morfologias diferentes apresentando propriedades óticas semelhantes, mais concretamente uma banda de absorção com máximo próximo dos 1050 nm. Na síntese dos nanobastonetes pode-se identificar uma banda com o máximo aos 526 nm e um outro aos 1039 nm na banda de plasmão. Aquando a síntese dos nanobastonetes houve a necessidade de utilizar surfatantes, com carácter tóxico, no entanto investigações relatam que seria possível preparar nanopartículas com propriedades óticas semelhantes mas sem recorrer a estes compostos. Foi então possível sintetizar os nanoprismas de ouro sem utilizar CTAB e obteve-se nanopartículas com as bandas de plasmão localizadas aos 551 nm e 1012 nm, bandas próximas das observadas para os nanobastonetes. Apesar da síntese dos nanoprismas ser uma síntese “mais biocompatível” as partículas resultantes apresentarem alguns problemas de estabilidade, observando-se variação das suas propriedades óticas com o tempo, havendo necessidade de averiguar uma estratégia que garanta a estabilidade das nanopartículas por períodos maiores.

Os filmes foram obtidos a partir do mesmo modo no entanto com teores de nanopartículas e com morfologias diferentes. Para as diferentes concentrações e/ou morfologias das nanopartículas os filmes apresentaram a mesma estrutura física e química. No entanto as propriedades térmicas alteram-se, com o aumento da concentração de nanopartículas aumenta a temperatura de fusão do hidrogel. E através dos ensaios de intumescimento do gel de κ -carragenano verificou-se que com a introdução de nanobastonetes longos a estrutura do gel torna-se mais forte (reticulada) limitando a expansão da rede polimérica para a entrada de moléculas de água.

Com este trabalho foi possível verificar que quando os nanocompósitos que incorporam nanobastonetes são expostos à radiação na zona do infravermelho próximo a libertação do fármaco modelo, azul-de-metileno, aumenta pelo menos em 10% em relação à libertação observada a partir dos filmes nanocompósitos com a mesma composição não expostos à radiação.

Para finalizar, realizou-se o estudo da libertação de azul-de-metileno dos filmes quando sujeitos a períodos de exposição ao laser alternando com períodos em que se interrompia esta exposição. Com este estudo verificou-se que após se ter incidido o laser durante uma hora a concentração de libertação de fármaco foi maior tendendo mais rapidamente para o estado estacionário de libertação. E com os resultados deste estudo procedeu-se a

modelação cinética , verificando que o modelo que melhor se adapta à libertação na ausência de radiação é o modelo de Korsmeyer-Peppas.

6. Referências

-
- [1] "Cancer Fact sheet " 14/04/2012, 2012; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
- [2] "what is cancer?," 15/04/2012, 2012; <http://www.cancer.gov/>.
- [3] W. Cai, T. Gao, H. Hong *et al.*, "Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology," *Nanotechnology, Science and Applications*, vol. I, pp. 17-32, 2008.
- [4] J. P. Conde, "Nanomateriais," http://www.spq.pt/boletim/docs/boletimSPQ_097_057_09.pdf, [23/11/2011.
- [5] H. Shen, J. You, G. Zhang *et al.*, "Cooperative, Nanoparticle-Enabled Thermal Therapy of Breast Cancer," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 1, no. 1, pp. 84-89, 2012.
- [6] A. L. Daniel-da-Silva, L. Ferreira, A. M. Gil *et al.*, "Synthesis and swelling behavior of temperature responsive kappa-carrageenan nanogels," *J Colloid Interface Sci*, vol. 355, no. 2, pp. 512-7, Mar 15, 2011.
- [7] J. E. Lee, N. Lee, T. Kim *et al.*, "Multifunctional Mesoporous Silica Nanocomposite Nanoparticles for Theranostic Applications," *Accounts of Chemical research*, vol. 44, no. 10, pp. 893-902, 01/02/2011.
- [8] A. L. Daniel-da-Silva, S. Fateixa, A. J. Guiomar *et al.*, "Biofunctionalized magnetic hydrogel nanospheres of magnetite and kappa-carrageenan," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 35, pp. 355602, Sep 2, 2009.
- [9] N. S. Satarkar, D. Biswal, and J. Z. Hilt, "Hydrogel nanocomposites: a review of applications as remote controlled biomaterials," *Soft Matter*, vol. 6, no. 11, pp. 2364, 2010.
- [10] E. Boisselier, and D. Astruc, "Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity," *Chem Soc Rev*, vol. 38, no. 6, pp. 1759-82, Jun, 2009.
- [11] A. F. R. Márcia R. Moura, Edvani C. Muriz, "Hidrogéis Semi-IPN Baseados em Rede de ALginato-Ca⁺² com PNIPAAm Entrelaçado: Propriedades Hidrofílicas, Morfológicas e Mecânicas," *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 18, pp. 132-137, 2008.
- [12] T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecchi *et al.*, "Polysaccharide hydrogels for modified release formulations," *J Control Release*, vol. 119, no. 1, pp. 5-24, May 14, 2007.
- [13] F. O. M. d. S. Abreu, "Síntese e caracterização de hidrogéis biodegradáveis à base de quitosana com morfologia controlada com potencial aplicação como criadores de fármacos," Departamento de Materiais da Escola de Engenharia e no departamento de Biofísica do Instituto de Biociências Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
-

- [14] N. S. Satarkar, and J. Zach Hilt, "Hydrogel nanocomposites as remote-controlled biomaterials," *Acta Biomater*, vol. 4, no. 1, pp. 11-6, Jan, 2008.
- [15] T. R. Bhardwaj, M. Kanwar, R. Lal *et al.*, "Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers," *Drug Dev Ind Pharm*, vol. 26, no. 10, pp. 1025-38, Oct, 2000.
- [16] M. D. Guiry. "algaeBASE," Outubro 2012.
- [17] W. Rühle. "Artenliste der Bretagne-Exkursion," Outubro 2013.
- [18] L. Pereira. "Extracção, caracterização e utilização das carragenanas," Outubro, 2012.
- [19] A. L. Daniel-da-Silva, T. Trindade, B. J. Goodfellow *et al.*, "In situ synthesis of magnetite nanoparticles in carrageenan gels," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 8, pp. 2350-7, Aug, 2007.
- [20] L. Pereira, A. M. Amado, A. T. Critchley *et al.*, "Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman)," *Food Hydrocolloids*, vol. 23, no. 7, pp. 1903-1909, 2009.
- [21] A. L. Daniel-da-Silva, F. Pinto, J. A. Lopes-da-Silva *et al.*, "Rheological behavior of thermoreversible kappa-carrageenan/nanosilica gels," *J Colloid Interface Sci*, vol. 320, no. 2, pp. 575-81, Apr 15, 2008.
- [22] N. L. Rosi, and C. A. Mirkin, "Nanostructures in Biodiagnostics," *American Chemical Society*, 03/23/3005, 2004.
- [23] G. M. Whitesides, "The 'right' size in nanobiotechnology," *Nature Biotechnology*, vol. 21, pp. 1162-1165, 2003.
- [24] J.-H. Kim, and T. Randall Lee, "Discrete thermally responsive hydrogel-coated gold nanoparticles for use as drug-delivery vehicles," *Drug Development Research*, vol. 67, no. 1, pp. 61-69, 2006.
- [25] D. Pissuwan, S. M. Valenzuela, and M. B. Cortie, "Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles," *Trends Biotechnol*, vol. 24, no. 2, pp. 62-7, Feb, 2006.
- [26] M. C. Gonçalves, "Propriedades ópticas dos materiais," *Arquiterura e vida*, 1/3/2006, 2004.
- [27] K. A. Willets, and R. P. Van Duyne, "Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing," *Annu Rev Phys Chem*, vol. 58, pp. 267-97, 2007.
- [28] A. Chhatre, P. Solasa, S. Sakle *et al.*, "Color and surface plasmon effects in nanoparticle systems: Case of silver nanoparticles prepared by microemulsion route," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 404, pp. 83-92, 2012.

-
- [29] A. Liang, Q. Liu, G. Wen *et al.*, "The surface-plasmon-resonance effect of nanogold/silver and its analytical applications," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 37, pp. 32-47, 2012.
- [30] B. Nikoobakht, and M. A. El-Sayed, "Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method.," *Chemistry of Materials*, vol. 15(10), pp. 1957-1962, 2003.
- [31] A. Sugunan, A. A. Desai, P. D. Chanchana Thanachayanont *et al.*, "A Facile Process for Charge-Stabilized Gold Nanotriangles and Nanorods," *Chemical Physics Letters*.
- [32] B. Pelaz, V. Grazu, A. Ibarra *et al.*, "Tailoring the synthesis and heating ability of gold nanoprisms for bioapplications," *Langmuir*, vol. 28, no. 24, pp. 8965-70, Jun 19, 2012.
- [33] V. Sharma, K. Park, and M. Srinivasarao, "Colloidal dispersion of gold nanorods: Historical background, optical properties, seed-mediated synthesis, shape separation and self-assembly," *Materials Science and Engineering*, vol. 65, pp. 1-38, 15/05/2009, 2009.
- [34] P. R. Sajanlal, and T. Pradeep, "Electric-Field-Assisted Growth of Highly Uniform and Oriented Gold Nanotriangles on Conducting Glass Substrates," *Advanced Materials*, vol. 20, no. 5, pp. 980-983, 2008.
- [35] J. E. Millstone, S. J. Hurst, G. S. Metraux *et al.*, "Colloidal gold and silver triangular nanoprisms," *Small*, vol. 5, no. 6, pp. 646-64, Mar, 2009.
- [36] C. Bao, N. Beziere, P. Del Pino *et al.*, "Gold Nanoprisms as Optoacoustic Signal Nanoamplifiers for in Vivo Bioimaging of Gastrointestinal Cancers," *Small*, Sep 24, 2012.
- [37] S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath *et al.*, "Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems," *Acta Poloniae Pharmaceutica*, vol. 67, pp. 217-223, 2010.
- [38] C. C. Lin, and A. T. Metters, "Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 58, no. 12-13, pp. 1379-408, Nov 30, 2006.
- [39] P. Costa, and J. M. S. Lobo, "Modeling and comparison of dissolution profiles," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 13, pp. 123-133, 2001.
- [40] D. I. Bower, "An Introduction to Polymer Physics," Cambridge University Press, 2002.
- [41] B. Pelaz, V. Grazu, A. Ibarra *et al.*, "Tailoring the Synthesis and Heating Ability of Gold Nanoprisms for Bioapplications," *Langmuir, ACS Publications*, vol. 28, pp. 8965-8970, 2012.
- [42] M. Oz, D. E. Lorke, and G. A. Petroianu, "Methylene blue and Alzheimer's disease," *Biochemical Pharmacology*, vol. 78, no. 8, pp. 927-932, 2009.
-

Referências

- [43] A. M. Salgueiro, A. L. Daniel-da-Silva, S. Fateixa *et al.*, “kappa-Carrageenan hydrogel nanocomposites with release behavior mediated by morphological distinct Au nanofillers,” *Carbohydr Polym*, vol. 91, no. 1, pp. 100-9, Jan 2, 2013.

7. Anexos

Anexo A: Obtenção da reta de calibração do azul-de-metileno

Ao analisar-se o azul-de-metileno no espectro UV-Vis verifica-se que o seu máximo de absorção apresenta-se nos 663nm. Ao analisar-se soluções com diferentes concentrações de azul-de-metileno observou-se a que absorvância aos 663nm, obtendo-se o seguinte gráfico:

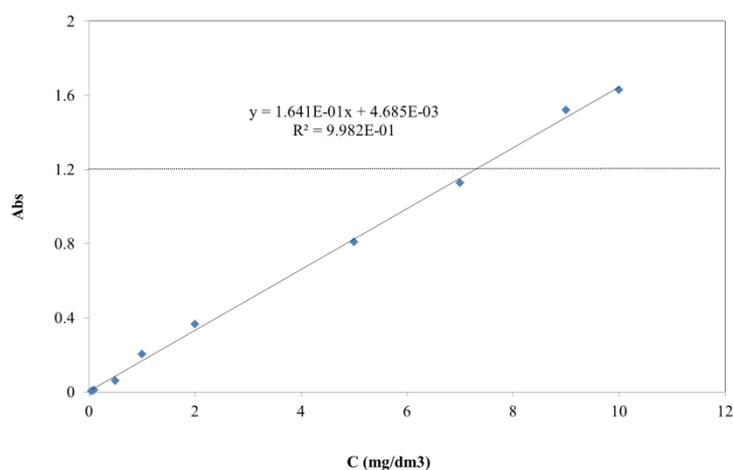


Figura A. 1: Reta de calibração do azul-de-metileno.

A partir desta correlação dos dados chegou-se à seguinte equação que relaciona a concentração do azul-de-metileno com a absorção:

$$Abs = 1.641 \times 10^{-1}C + 4.685 \times 10^3 \quad (A.1)$$

Em que a Abs é absorção na gama dos 663nm e a C é a concentração do azul-de-metileno.

Anexo B: Modelos cinéticos de libertação de fármaco

B.1) Modelação da cinética de libertação nos filmes sem nanopartículas e sem serem expostos a radiação.

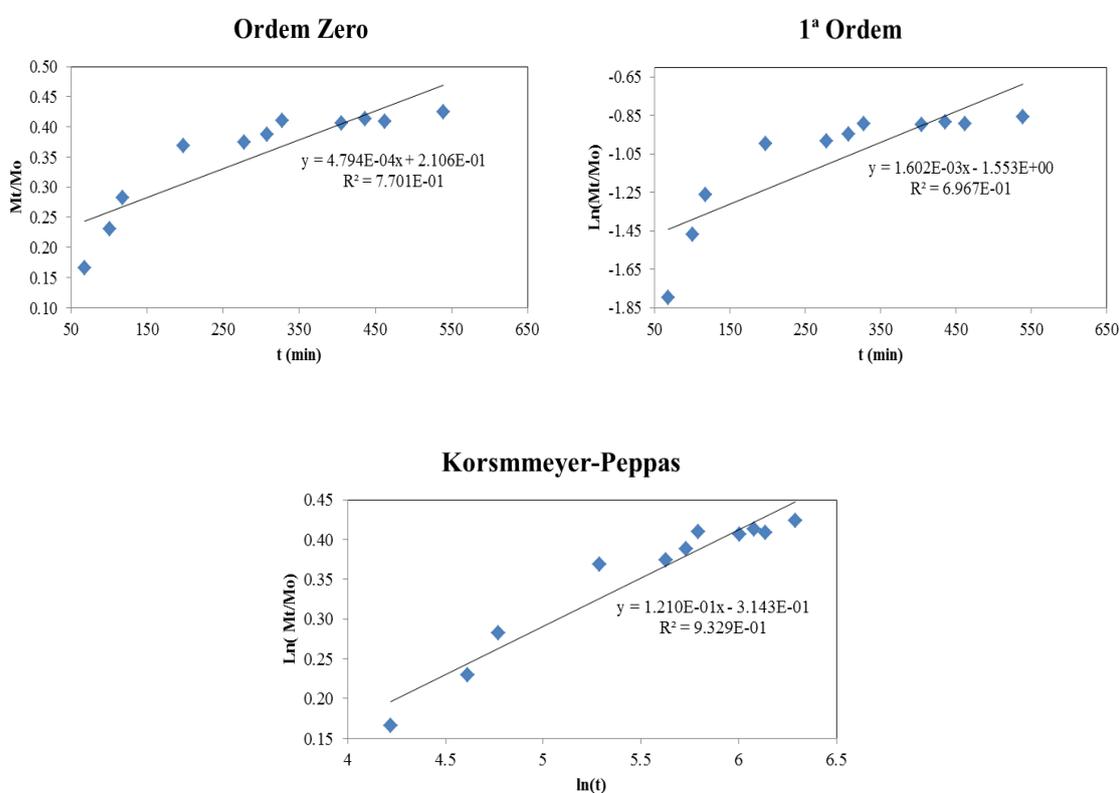


Figura B. 1: Representação dos ajustes realizados aos dados experimentais de libertação para o filme sem nanopartículas, relativamente ao modelo de cinética de ordem zero (em cima à esquerda), de primeira ordem (em cima à direita) e Korsmeyer-Peppas (em Baixo).

B.2) Modelação da cinética de libertação nos filmes com 0,1% de nanobastonetes e sem serem expostos a radiação.

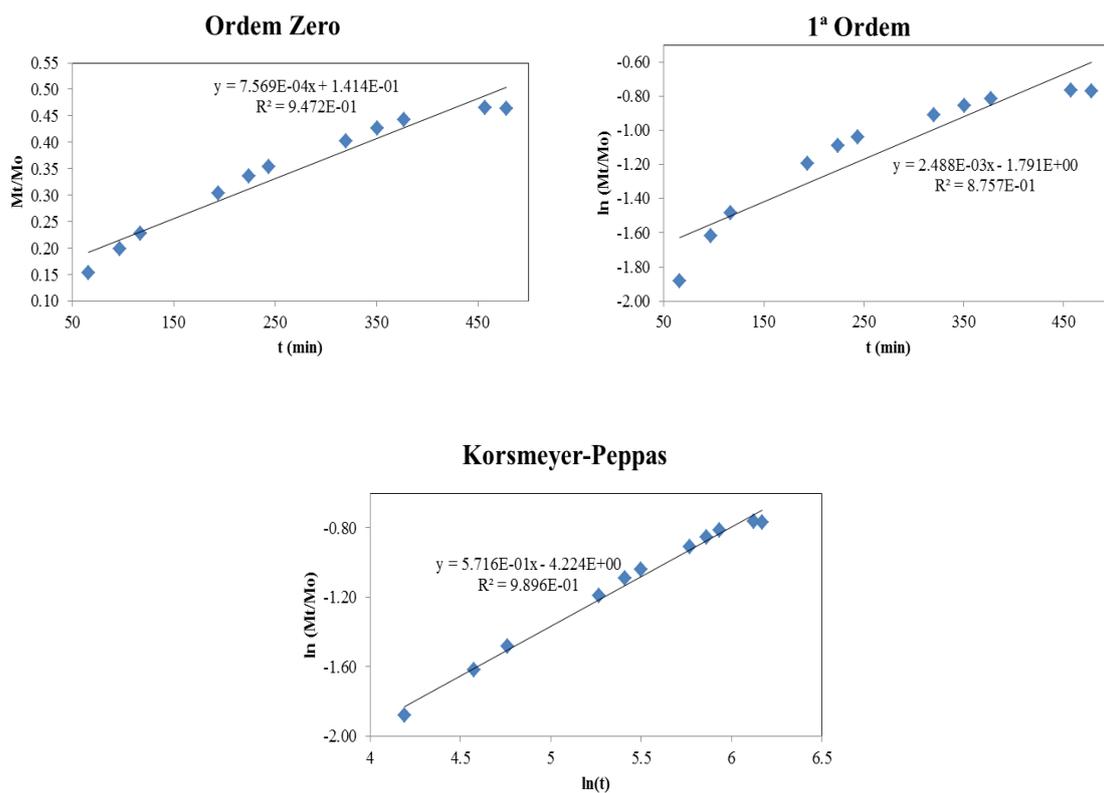


Figura B. 2: Representação dos ajustes realizados aos dados experimentais de libertação para o filme com 0,1% nanobastonetes, relativamente ao modelo de cinética de ordem zero (em cima à esquerda), de primeira ordem (em cima à direita) e Korsmeyer-Peppas (em Baixo).

B.3) Modelação da cinética de libertação nos filmes com 0,2% de nanobastonetes e sem serem expostos a radiação.

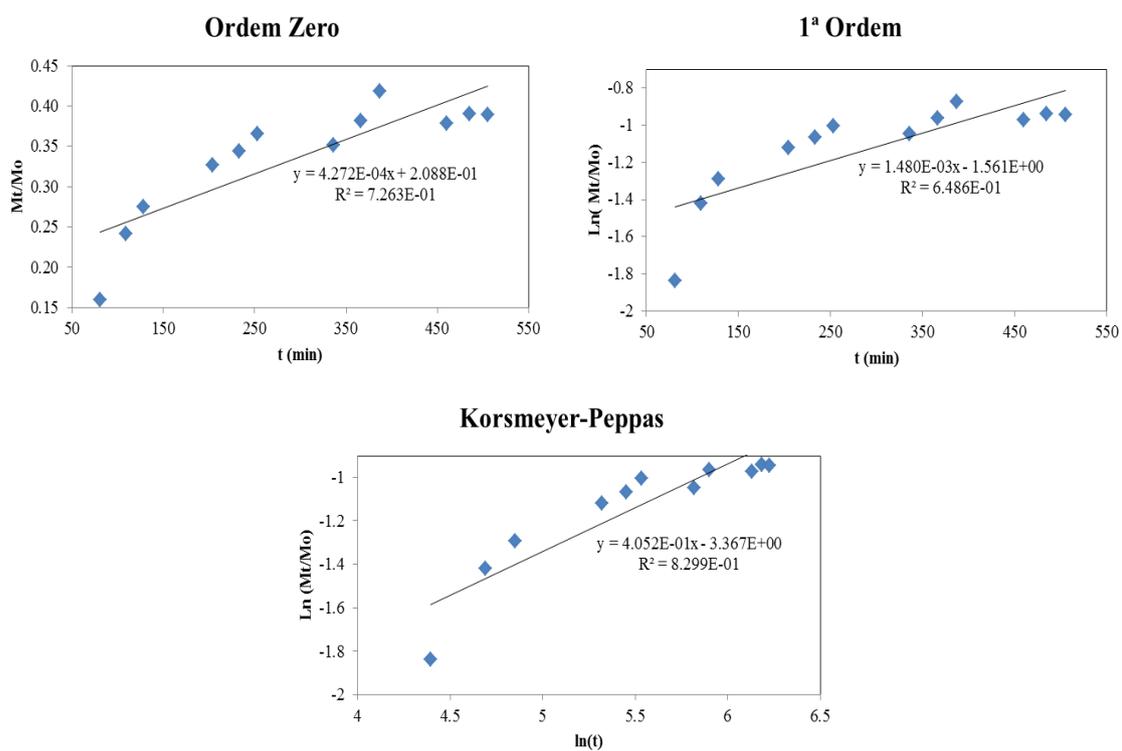


Figura B. 3: Representação dos ajustes realizados aos dados experimentais de libertação para o filme com 0,2% nanobastonetes, relativamente ao modelo de cinética de ordem zero (em cima à esquerda), de primeira ordem (em cima à direita) e Korsmeyer-Peppas (em Baixo).

