



**Nicole Silva
Lameirinhas**

**Biofuncionalização de nanocristais de celulose para
o desenvolvimento de novos sistemas para o
tratamento e diagnóstico do cancro**



**Nicole Silva
Lameirinhas**

Biofuncionalização de nanocristais de celulose para o desenvolvimento de novos sistemas para o tratamento e diagnóstico do cancro

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica da Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire Barros, Investigadora Principal do CICECO-Instituto de Materiais de Aveiro, Universidade de Aveiro, e do Doutor Ricardo João Borges Pinto, Investigador de Pós-Doutoramento do CICECO-Instituto de Materiais de Aveiro, Universidade de Aveiro.

"Anything's possible if you've got enough nerve."

J.K. Rowling

O júri

Arguente principal

Doutora Paula Alexandrina de Aguiar Pereira Marques

Investigadora Principal do TEMA – Centro de Tecnologia Mecânica e Automação, Universidade de Aveiro.

Orientadora

Doutora Carmen Sofia da Rocha Freire Barros

Investigadora Principal do CICECO – Instituto de Materiais de Aveiro, Universidade de Aveiro.

Presidente

Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor auxiliar com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Universidade de Aveiro.

Agradecimentos

A Deus, por me abençoar todos os dias.

À Doutora Carmen Freire e ao Doutor Ricardo Pinto pela orientação científica, pela disponibilidade incondicional, confiança e apoio ao longo deste ano, que foram muito importantes tanto para o desenvolvimento deste trabalho como para meu enriquecimento científico.

Também um agradecimento especial à Doutora Carla Vilela pela disponibilidade e apoio incansáveis prestados ao longo deste ano de mestrado e que foram extremamente importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros do grupo de investigação LignoMacro por toda a ajuda prestada, companheirismo e excelente ambiente de trabalho.

Aos meus amigos, vocês sabem melhor que ninguém quem são. Por toda a paciência e apoio nos momentos mais difíceis ao longo destes anos. Por me terem proporcionado os melhores 5 anos que alguma vez poderia desejar e por nunca me deixarem baixar os braços perante os vários desafios que foram aparecendo. Por terem sido um grande pilar com o qual sempre poderei contar. Hoje sou quem sou e muito o devo a vocês. Um grande obrigada!

Às minhas colegas de casa, as Fadinhas do lar, por terem tornado esta caminhada mais fácil de fazer. Por me terem aturado nos momentos mais difíceis e me terem ajudado a sorrir e a lutar pelos meus sonhos com tamanha garra, tarefa essa que só mesmo vocês têm a capacidade de o fazer. Obrigada por serem a melhor segunda família que Aveiro me deu.

E, por fim, e nunca menos importante: à minha família. Aos meus pais e irmã por nunca deixarem de acreditar em mim e darem sempre a força que preciso para continuar esta caminhada. Por me levantarem os braços quando o que mais queria era baixar, por nunca me deixarem de desistir dos meus sonhos, por serem incansáveis em tudo o que fazem.

Muito obrigada!

Palavras-chave

Nanocristais de celulose, ácido fólico, nanopartículas de ouro, isotiocianato de fluoresceína, quitosano, sistema nanoteranóstico, cancro.

Resumo

Anualmente milhões de pessoas são diagnosticadas com cancro. O diagnóstico desta doença pode passar pela realização de análises clínicas, por técnicas de imagiologia e biópsia enquanto o seu tratamento envolve tipicamente quimioterapia, radioterapia e/ou cirurgia. No entanto, a quimioterapia e a radioterapia apresentam efeitos secundários muitas vezes graves, como a queda de cabelo, vômitos e perda de apetite. De forma a reduzir estes efeitos secundários emergiu a nanotecnologia aplicada à medicina, que faz uso de nanomateriais para o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico e tratamento, designados de sistemas nanoteranósticos. A celulose é o polímero natural mais abundante na natureza, sendo os nanocristais de celulose (CNCs), uma das suas formas nanométricas. Estes podem ser funcionalizados com moléculas apropriadas tornando-os interessantes para diversas aplicações biomédicas.

Neste trabalho, os CNCs foram funcionalizados com conjugados de quitosano-ácido fólico (CS-FA) ou quitosano-ácido fólico-isotiocianato de fluoresceína (CS-FA-FITC), tendo-se posteriormente adsorvido nanopartículas de ouro (AuNPs) à sua superfície de forma a preparar novos sistemas nanoteranósticos.

Inicialmente, os conjugados CS-FA e CS-FA-FITC foram preparados e caracterizados por espectroscopia ótica, verificando-se a presença dos máximos de absorção característicos do FA e do marcador fluorescente, respetivamente, o que confirma o sucesso da reação de modificação do CS com estas moléculas. Estes conjugados foram também analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada à reflexão total atenuada (FTIR-ATR), tendo-se também observado a presença das bandas características tanto do CS como do FA e FITC, respetivamente, assim como as bandas características da formação de uma ligação entre o CS e o FA e FITC, respetivamente. Os conjugados CS-FA-FITC foram ainda caracterizados por espectroscopia de fluorescência, detetando-se emissão de radiação a 558 nm quando excitados a 495 nm.

Posteriormente, os CNCs (34 ± 10 nm de largura e 391 ± 60 nm de comprimento e índice de cristalinidade de 59%) foram funcionalizados com os conjugados de CS e com AuNPs por forma a produzir os sistemas nanoteranósticos. Os nanomateriais resultantes foram caracterizados por espectroscopia ótica, verificando-se a presença dos máximos de absorção característicos dos respetivos conjugados. Também por FTIR-ATR foi possível identificar bandas características dos CNCs e dos respetivos conjugados e assim confirmar o sucesso da funcionalização. Estes foram ainda caracterizados por microscopia eletrónica de varrimento em modo de transmissão (STEM), verificando-se a manutenção das dimensões nanométricas e da morfologia em bastonete. Por fim, os materiais revestidos com AuNPs foram caracterizados por STEM, verificando-se, mais uma vez, a manutenção das dimensões nanométricas e a formação das NPs na superfície dos CNCs. Os padrões de difração de raio-X (XRD) destes sistemas permitiram também identificar a presença dos planos cristalográficos característicos das AuNPs. Assim, pode-se concluir que a funcionalização dos CNCs com vista ao desenvolvimento de um novo sistema nanoteranóstico ocorreu com sucesso.

Keywords

Cellulose nanocrystals, folic acid, gold nanoparticles, fluorescein isothiocyanate, chitosan, nanotheranostic systems, cancer.

Abstract

Every day millions of people are diagnosed with cancer. Usually, cancer diagnosis can go through the achievement of clinical analysis, imagiology and biopsy while its treatment typically involves chemotherapy, radiotherapy and surgery. However, chemotherapy and radiotherapy shows serious side effects as hair and appetite and nausea. In this context, nanotechnology emerges as a promising approach to reduce these side effects. Nanotechnology takes advantage of nanomaterials for the development of diagnosis and treatment systems, also called as theranostic systems. Cellulose is the most abundant biopolymer on earth, with cellulose nanocrystals (CNCs) being one of its nanometric forms. CNCs can be functionalized with suitable molecules which makes them interesting for diverse medical applications.

In this work, CNCs were functionalized with folate conjugated chitosan (CS-FA) or isothiocyanate fluorescein-folate conjugated chitosan (CS-FA-FITC). These complexes were then coated with gold nanoparticles (AuNPs) to their surface in order to prepare a new cancer nanotheranostic system.

Initially, the synthesized conjugates were characterized by optical spectroscopy, with the presence of a maximum absorption peak characteristic of FA and of the fluorescent marker, respectively, confirming the successful modification of the CS with these molecules. These conjugates were also analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy coupled with attenuated total reflection (FTIR-ATR), where the presence of characteristic bands of both CS, FA, and FITC, were observed, as well as the characteristic bands of the formation of a link between CS and FA and FITC, respectively. The CS-FA-FITC conjugates were further characterized by fluorescence spectroscopy, detecting the emission of radiation at approximately 558 nm when excited at 495 nm.

Subsequently, CNCs (34 ± 10 nm in width, 391 ± 60 nm in length, and with a crystallinity index of 59%) were functionalized with the CS conjugates and coated with AuNPs to produce the nanotheranostic systems. The resulting nanomaterials were characterized by optical spectroscopy and the characteristic absorption bands of the respective conjugates were observed. It was also possible to identify by FTIR-ATR the characteristic bands of the CNCs and their conjugates confirming the success of the functionalization. These materials were also characterized by scanning transmission electron microscopy (STEM), confirming the preservation of the nanometric dimensions and the rod-like morphology of the functionalized CNCs. Finally, the materials coated with AuNPs were characterized by STEM, showing the preservation of the nanometric dimensions and the formation of the AuNPs at CNCs surface. The X-ray diffraction (XRD) patterns of these systems also allowed to identify the presence of the crystalline structure of the AuNPs. Thus, we can conclude that the functionalization of the CNCs for the development of a new nanotheranostic system has been successful achieved.

Índice

Abreviaturas	III
Índice de figuras	V
Índice de tabelas	IX
1. Contextualização.....	1
2. Introdução	5
2.1. O Cancro	7
2.1.1. Técnicas convencionais de diagnóstico do cancro.....	8
2.1.2. Técnicas convencionais para o tratamento do cancro.....	9
2.1.3. Novas técnicas de tratamento do cancro	11
2.2. Celulose	16
2.2.1. Biossíntese da celulose	17
2.2.2. Formas nanométricas de celulose	18
2.2.2.1. Nanocristais de celulose	19
2.2.2.1.1. Propriedades dos CNCs	20
2.2.2.1.2. Aplicações dos CNCs	20
2.3. Ácido fólico	22
2.3.1. Propriedades e funções do FA	22
2.3.2. O FA no tratamento e diagnóstico do cancro.....	23
2.4. Isotiocianato de fluoresceína	25
2.5. Nanopartículas de ouro	26
2.5.1. Síntese de AuNPs.....	27
2.5.2. Aplicações das AuNPs.....	29
2.6. Objetivo	30
3. Parte experimental	31
3.1. Solventes e reagentes	33
3.2. Síntese do conjugado CS-FA	33
3.3. Síntese do conjugado CS-FA-FITC	34
3.4. Funcionalização dos CNCs	34
3.4.1. Síntese de CNC-CS-FA	34
3.4.2. Síntese de CNC-CS-FA-FITC	34
3.5. Síntese in situ de AuNPs-CNC-CS-FA e AuNPs-CNC-CS-FA-FITC.....	35
3.6. Técnicas de caracterização.....	35

3.6.1. FTIR-ATR	35
3.6.2. STEM.....	35
3.6.3. XRD	36
3.6.3.1. Índice de cristalinidade (CI).....	36
3.6.4. Espectroscopia ótica	36
3.6.5. Espectroscopia de fluorescência	36
3.6.6. DLS.....	36
4. Resultados e discussão	37
4.1. Síntese do conjugado CS-FA	39
4.2. Síntese do conjugado CS-FA-FITC	42
4.3. Funcionalização dos CNCs	47
4.3.1. Síntese de CNC-CS-FA	49
4.3.2. Síntese de CNC-CS-FA-FITC	54
4.4. Síntese in situ de AuNPs-CNC-CS-FA e AuNPs-CNC-CS-FA-FITC.....	60
5. Conclusões	67
6. Bibliografia	71

Abreviaturas

		<i>Do inglês</i>
1FPK	Frutose 1-fosfatocinase	<i>Fructose 1-phosphate kinase</i>
Akt	Proteína cinase B	<i>Protein kinase B</i>
AFM	Microscopia de força atômica	<i>Atomic force microscopy</i>
AuNPs	Nanopartículas de ouro	
ATR	Refletância total atenuada	<i>Attenuated total reflectance</i>
BNC	Nanocelulose bacteriana	<i>Bacterial nanocellulose</i>
CI	Índice de cristalinidade	<i>Crystallinity index</i>
CNCs	Nanocristais de celulose	<i>Cellulose nanocrystals</i>
CNF	Nanofibrilas de celulose ou celulose nanofibrilada	<i>Nanofibrillated cellulose</i>
Csin	Celulose síntase	
CS	Quitosano	<i>Chitosan</i>
DLS	Dispersão dinâmica da luz	<i>Dynamic light scattering</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Ácido desoxorribonucléico	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DOX	Doxorrubicina	
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreto	<i>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide</i>
EGFR	Recetor do fator de crescimento epidérmico	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FBP	Frutose 1,6-bisfosfato fosfatase	<i>Fructose 1,6-bisphosphatase</i>
FA	Ácido fólico	<i>Folic acid</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FTIR	Espectroscopia do infravermelho com transformada de <i>Fourier</i>	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
FK	Frutocinase	<i>Frutokinase</i>
Glc-6-P	Glucose-6-fosfato	<i>Glucose 6-phosphate</i>
Glc-1-P	Glucose-1-fosfato	<i>Glucose 1-phosphate</i>
GK	Hexocinase	<i>Glucokinase</i>
HER2	Recetor 2 do fator de crescimento epidérmico humano	<i>Human Epidermal growth factor receptor 2</i>
IGFR1	Recetor do fator de crescimento semelhante à insulina	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogénio	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MET	Recetor do fator de crescimento do hepatócito	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
MEK	Proteína cinase cinase ativada por mitogénio	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mTOR	Proteína alvo da rapamicina de mamíferos	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NHS	N-hidroxissucinamida	<i>N-Hydroxysuccinimide</i>
NPs	Nanopartículas	
PBS	Tampão fosfato salino	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinase	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>

PGI	Fosfoglucoisomerase			<i>Phosphoglucose isomerase</i>
PGM	Fosfoglucomutase			<i>Phosphoglucomutase</i>
PTS	Sistema de fosfatases			<i>Phosphatase system</i>
p. a.	Para análise			
Raf	Proto-oncogene serina/ treonina proteína cinase			<i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
Ras	Oncogene			
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento			<i>Scanning electron microscopy</i>
STEM	Microscopia eletrónica de varrimento em modo de transmissão			<i>Scanning transmission electron microscopy</i>
TAF	Fator de angiogénese do tumor			<i>Tumor Angiogenesis Factor</i>
TEM	Microscopia eletrónica de transmissão			<i>Transmission electron microscopy</i>
UDPGlc	Uridina difosfato glucose			<i>Uridine diphosphate glucose</i>
UGP	UDPGlc pirofosforilase			
UV	Ultravioleta			
UV-Vis	Espectroscopia do ultravioleta- visível			
VEGFR	Recetor do fator de crescimento endotelial vascular			<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
XRD	Difração de raio-X			<i>X-ray diffraction</i>

Índice de figuras

Figura 1 – À esquerda: exemplo de uma ressonância magnética, onde as setas a branco evidenciam a presença de uma metástase de um melanoma; à direita: exemplo de uma biópsia por agulha para diagnóstico de cancro da mama, recolhendo uma amostra do tecido tumoral.....	9
Figura 2 – Imagem obtida por TEM de um sistema nanoteranóstico baseado em alginato oxidado funcionalizado com polietileno glicol, NPs de carbono fluorescentes e DOX (retirado de (39)).....	13
Figura 3 – Representação da estrutura química do CS, n=grau de polimerização.	13
Figura 4 - Imagem obtida por TEM do sistema nanoteranóstico desenvolvido por Zarrin et al. (41).....	14
Figura 5 - Imagens obtidas por TEM com emissão de campo das células alvo tratadas com o sistema nanoteranóstico (retirado de (42)).	15
Figura 6 - Estrutura molecular da celulose, n=grau de polimerização (retirado de (45)).	16
Figura 7 - Representação da fibra de celulose (adaptado de (51)).	17
Figura 8 - Representação esquemática da biossíntese de celulose (adaptado de (56))...	18
Figura 9 - Representação da estrutura dos CNCs, resultantes de hidrólise ácida com ácido sulfúrico (adaptado de (6)).	19
Figura 10 – Representação da estrutura química do FA.....	22
Figura 11 - Imagem obtida por TEM revelando a presença (setas a preto) das NPs de ferro tanto na superfície interna e externa dos nanotubos de carbono de parede múltipla já funcionalizados com ácido FA (retirado de (78)).....	23
Figura 12 - Esquema da síntese de CNCs conjugados com FA e FITC (retirado de (79)).	24
Figura 13 – Estrutura química do marcador fluorescente FITC.....	25
Figura 14 - Suspensões aquosas de (A) CNCs e (B) CNCs funcionalizados com FITC (retirado de (82)).....	26
Figura 15 – Representação das cores apresentadas por diferentes soluções coloidais de AuNPs (retirado de (87)).	27
Figura 16 – Imagem obtida por TEM das AuNPs sintetizadas pelo método de redução usando citrato de sódio (retirado de (88)).....	28

Figura 17 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varrimento (SEM) das AuNPs com diferentes diâmetros: (A) 3,2; (B) 4,0; (C) 4,8; (D) 4,2; e (E) 5,2 nm (retirado de (90)).	28
Figura 18 – Imagens obtidas por SEM das AuNPs sintetizadas a diferentes temperaturas de reação: (A) 25°C; (B) e (C) a 60°C; e (D) 95°C (retirado de (91)).	29
Figura 19 - Reação de funcionalização do CS com FA segundo o método descrito por Lee et al. (97).	39
Figura 20 – Espetro ótico do FA (em DMSO) e das amostras de água recolhida nos três dias de diálise.	40
Figura 21 – Espetro ótico, em solução, do conjugado CS-FA (numa solução aquosa de ácido acético 1 M), do CS (numa solução aquosa de ácido acético 1 M) e do FA (em DMSO).	40
Figura 22 - Espetro de FTIR-ATR do CS, FA e do conjugado CS-FA.	42
Figura 23 – Reação de funcionalização do conjugado CS-FA com o marcador fluorescente, FITC (98,105).	42
Figura 24 – Espetros óticos do FITC (em etanol) e FA (em DMSO).	43
Figura 25 – Espetros óticos do FITC (em etanol) e das águas de diálise ao longo dos quatro dias.	44
Figura 26 – Espetros óticos do conjugado CS-FA-FITC (numa solução aquosa de ácido acético 1 M), do FITC (em etanol) e CS-FA (numa solução aquosa de ácido acético 1 M).	45
Figura 27 – Espetros de fluorescência (emissão) do conjugado CS-FA-FITC, do FITC e do conjugado CS-FA.	46
Figura 28 - Espetros de FTIR-ATR do FITC, do conjugado CS-FA e do CS-FA-FITC.	47
Figura 29 - Imagens de STEM dos CNCs.	48
Figura 30 – Distribuição em frequência dos tamanhos dos CNCs: a) largura e b) comprimento.	48
Figura 31 – Difratoograma de XRD dos CNCs.	49
Figura 32 – Representação do material final, CNC-CS-FA, obtido por adsorção.	50
Figura 33 – Espetros óticos do conjugado CS-FA (numa solução aquosa de ácido acético a 1 M) e dos sobrenadantes, após cada lavagem dos CNCs funcionalizados.	50
Figura 34 – Espetros óticos, no estado sólido, dos CNCs, CS-FA e CNC-CS-FA.	51

Figura 35 - Espectro de FTIR-ATR dos CNC-CS-FA, dos CNCs e do conjugado CS-FA.	52
Figura 36 - Imagens de STEM dos CNCs: a) não funcionalizados e b) funcionalizados com o conjugado CS-FA.	53
Figura 37 – Distribuição em frequência dos tamanhos do CNC-CS-FA: a) largura e b) comprimento.	53
Figura 38 – Representação do material final, CNC-CS-FA-FITC, obtido por adsorção.	54
Figura 39 - Espectros óticos do conjugado CS-FA-FITC (numa solução aquosa de ácido acético a 1 M) e dos sobrenadantes, após cada lavagem.	55
Figura 40 – Espectros óticos, no estado sólido, dos CNCs, FITC, CS-FA-FITC e CNC- CS-FA-FITC.	56
Figura 41 – Espectro de emissão do CNC-CS-FA-FITC e do FITC.	57
Figura 42 – Espectro de FTIR-ATR dos CNC-CS-FA-FITC, dos CNCs e do conjugado CS-FA-FITC.	58
Figura 43 – Imagens de STEM dos CNCs: a) não funcionalizados e b) funcionalizados com o conjugado CS-FA-FITC.	59
Figura 44 - Distribuição em frequência: a) largura e b) comprimento dos CNCs funcionalizados.	59
Figura 45 – Representação do nanossistema final, AuNPs-CNC-CS-FA, obtido pela síntese in situ das AuNPs.	60
Figura 46 - Imagem da suspensão do nanossistema AuNPs-CNC-CS-FA obtido.	60
Figura 47 – Imagens de STEM do nanossistema AuNPs-CNC-CS-FA.	61
Figura 48 – Distribuição em frequência do diâmetro das AuNPs formadas na superfície dos CNCs.	61
Figura 49 – Distribuição em frequência: a) largura e b) comprimento do material AuNPs- CNC-CS-FA.	62
Figura 50 – Difratoograma de XRD dos nanossistemas AuNPs-CNC-CS-FA.	63
Figura 51 – Representação do nanossistema final, AuNPs-CNC-CS-FA-FITC, obtido pela síntese in situ das AuNPs.	63
Figura 52 - Imagens de STEM do nanossistema final da síntese in situ de AuNPs-CNC- CS-FA-FITC.	64
Figura 53 - Distribuição em frequência do diâmetro das AuNPs que se encontram na superfície dos CNCs.	65

Figura 54 – Distribuição em frequência: a) largura e b) comprimento do AuNPs-CNC-
CS-FA-FITC..... 65

Índice de tabelas

Tabela 1 – Dimensões de largura e comprimento dos CNCs e dos CNCs funcionalizados.	54
Tabela 2 – Dimensões de largura e comprimento dos CNCs e dos CNCs funcionalizados.	59
Tabela 3 – Dimensões de largura e comprimento dos CNCs funcionalizados e respectivos CNCs com AuNPs adsorvidas.....	62
Tabela 4 – Dimensões de largura e comprimento para os CNCs funcionalizados e respetivos CNCs com AuNPs adsorvidas.....	65

1. Contextualização

Durante o ciclo da vida, as células do ser humano crescem e dividem-se de modo a formar novas células, enquanto outras envelhecem e vão morrendo, sendo substituídas por novas células (1). Contudo, este processo pode ser afetado por distintas doenças, como o cancro. Esta doença tem-se revelado como um dos maiores problemas de saúde na atualidade, sendo a segunda maior causa de morte em todo o mundo (2).

Atualmente, as técnicas de diagnóstico do cancro consistem em: (i) análises clínicas; (ii) procedimentos de obtenção de imagens de determinadas áreas do corpo e (iii) biópsias (1). Relativamente aos tratamentos, estes podem incluir cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia. A maioria destes tratamentos são acompanhados por vários efeitos secundários, frequentemente graves, resultado dos danos também causados nas células e tecidos saudáveis (1). Desta forma, é importante desenvolver terapias eficientes que permitam diminuir a ocorrência de efeitos secundários.

Neste sentido a nanotecnologia surgiu como uma área promissora tanto para o tratamento e diagnóstico desta doença, como em outras aplicações biomédicas (3,4). A nanotecnologia faz uso de nanomateriais que, quando usados simultaneamente no diagnóstico e no tratamento de doenças, designam-se como sistemas nanoteranósticos.

Os nanomateriais usados no desenvolvimento destes sistemas podem ser obtidos a partir de polímeros, podendo estes ser sintéticos ou naturais (5). Um exemplo de um polímero natural utilizado em diversas aplicações biomédicas é a celulose. A celulose é o polímero natural mais abundante da natureza, apresentando várias formas nanométricas, também designadas de nanoceluloses (5). As nanoceluloses têm demonstrado ser um material ideal em áreas distintas, nomeadamente na biomedicina, devido às suas propriedades físico-químicas e biológicas únicas.

As formas nanométricas da celulose encontram-se divididas em três grandes grupos: nanocelulose bacteriana (BNC), nanofibrilas de celulose ou celulose nanofibrilada (CNF) e nanocristais de celulose (CNCs) (6). Os CNCs, devido à sua morfologia e capacidade de funcionalização, tornaram-se numa estrutura muito interessante para utilização em diversas aplicações, nomeadamente em sistemas de tratamento e diagnóstico, *i. e.*, sistemas nanoteranósticos. Contudo, por si só, estes nanomateriais não são muito seletivos, exigindo a sua funcionalização com moléculas específicas (6). Neste contexto, o ácido fólico (vitamina B₉) surge como uma molécula apelativa para a funcionalização dos CNCs, uma vez que cerca de 40% das células tumorais/cancerígenas expressam, em quantidades elevadas, recetores do grupo

folato (7,8). No entanto, para se tratar de um sistema nanoteranóstico é necessário que este seja também capaz de detetar e tratar as células cancerígenas (9). Assim, os CNCs devem ser funcionalizados com um marcador fluorescente, como por exemplo o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (10). Estes marcadores são compostos químicos que ao serem excitados com uma radiação de determinado comprimento de onda, emitem radiação a um comprimento de onda mais elevado, permitindo a sua deteção. Adicionalmente, estes nanossistemas devem ser conjugados com um fármaco ou material com atividade antitumoral. Por exemplo, as nanopartículas de ouro (AuNPs) são bastante promissoras para a aplicação em questão devido às suas propriedades únicas, sendo normalmente usadas para tratar células cancerígenas através de uma técnica designada de termoterapia (11).

Portanto, o objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um novo sistema nanoteranóstico baseado em CNCs funcionalizados com ácido fólico (FA), FITC e revestidos com AuNPs. O desenvolvimento deste sistema nanoteranóstico envolveu, sempre que possível, metodologias “amigas do ambiente” e pouco morosas.

Esta dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos. No primeiro capítulo serão aprofundados os aspetos teóricos que são a base do trabalho (capítulo 2). De seguida, serão referidas as metodologias, assim como os materiais, reagentes e métodos de caracterização, usadas para o desenvolvimento e caracterização do sistema nanoteranóstico (capítulo 3). O passo seguinte consistirá na apresentação e discussão dos resultados obtidos (capítulo 4), seguindo-se as principais conclusões e proposta de trabalho futuro (capítulo 5). O último capítulo consistirá na listagem de toda a bibliografia utilizada como base desta dissertação de mestrado.

2. Introdução

2.1. O Cancro

O corpo humano é constituído por triliões de células que se multiplicam por divisão celular (12). Em condições normais a divisão celular trata-se de um processo controlado e ordenado, responsável pela formação, crescimento e regeneração de tecidos saudáveis. No entanto, por vezes, as células perdem a capacidade de limitar e controlar o seu crescimento, dividindo-se e multiplicando-se muito rapidamente e de forma aleatória (1,13). Neste processo podem-se encontrar várias moléculas responsáveis pelo processo de desregulação. Os proto-oncogenes são genes que estão envolvidos no crescimento normal das células (1,13). No entanto, quando estes genes sofrem mutações podem tornar-se em oncogenes, permitindo o crescimento e sobrevivência de células que deveriam morrer, mesmo na ausência de fatores de crescimento. Os genes supressores de tumores são também responsáveis pelo controlo do crescimento e divisão celular, impedindo a proliferação celular (1,14,15). Mutações nestes genes provocam um crescimento descontrolado das células, levando ao aparecimento de tumores. A formação dos tumores poderá ainda estar relacionada com mutações em genes responsáveis pela regulação da apoptose (1). Numa célula adulta, a morte celular por apoptose é um mecanismo de resposta protetora a um conjunto de condições patológicas que contribuem para a malignidade se as células não morrerem. Desta forma, anormalidades nestes genes resultam na diminuição da taxa de apoptose, o que provoca a formação de tumores (1). E, por fim, os genes envolvidos na reparação do DNA são também muitas vezes alvo de mutações. Quando estes genes perdem a sua função, as células perdem também a capacidade de reconhecer e reparar danos genéticos que ocorrem noutros genes, levando à formação de tumores (1).

Os tumores formados podem ser classificados em tumores benignos ou malignos (1,13,16). Um tumor é considerado benigno quando a sua aparência microscópica assim o indica, implicando que este se manterá localizado, não se espalhando para outras zonas do organismo e sendo possível a sua remoção cirurgicamente. Os tumores malignos, comumente designados de cancro, apresentam a capacidade de invadir e destruir tecidos adjacentes e espalhar-se para zonas do organismo mais distantes, formando as metástases (1,13,16).

Assim, sugere-se que todos os tipos de cancro sofram oito alterações fundamentais na fisiologia celular, sendo estas alterações consideradas as características do cancro (1,13,16). Estes são: autossuficiência celular para os fatores de crescimento, a falta

de sensibilidade para os inibidores de crescimento, o metabolismo celular alterado, a apoptose, o potencial de replicação ilimitado, a angiogénese, a capacidade de invadir e metastizar e a capacidade de alterar a resposta imune do hospedeiro. Estes oito sinais são também responsáveis por tornar o cancro resistente aos tratamentos muitas vezes administrados. Sendo assim, a prevenção e o diagnóstico precoce são os principais desafios para o tratamento desta doença (1,13,16).

2.1.1. Técnicas convencionais de diagnóstico do cancro

As técnicas de diagnóstico devem esclarecer a natureza das doenças e como estas poderão responder aos vários tipos de terapias disponíveis (15). O diagnóstico do cancro pode passar por análises clínicas, técnica que consiste na recolha de sangue, urina e/ou outros fluidos (17). Determinadas substâncias, designadas de marcadores tumorais, presentes nestas amostras corporais, dão uma indicação de existência ou não de tumor. Assim, o aparecimento ou alterações nas suas concentrações estão relacionados com a génese e crescimento de células tumorais (17). No entanto, este teste não deve ser utilizado isoladamente, uma vez que estes marcadores não são totalmente específicos de um tipo particular de cancro. Assim, as análises clínicas podem ser conjugadas com técnicas que permitem obter imagens do tumor, sendo estas designadas por técnicas de imagiologia (16,18). A ressonância magnética, representada na Figura 1, é um método não invasivo muito utilizado para deteção de tumores no qual é aplicado um pulso de uma determinada radiofrequência, na presença de um campo magnético estático, permitindo a obtenção de uma imagem. A tomografia computadorizada é outro exemplo e baseia-se no princípio que os raios-X que atravessam os vários tecidos vão sendo diferencialmente atenuados gerando uma imagem com contrastes distintos dependendo da composição dos tecidos analisados (16,18). A tomografia por emissão de positrões é também uma técnica de imagiologia que consiste na utilização de um isótopo radioativo que emite um positrão quando se desintegra. Este positrão, ao ser detetado, permite formar imagens (16,18). Normalmente, utiliza-se glucose ligada a fluor radioativo, de forma a identificar o tumor. As regiões que estão a metabolizar glucose em excesso, como os tumores, irão aparecer como um ponto luminoso (16,18). Em alternativa, pode-se realizar uma biópsia (Figura 1), em que uma amostra do tecido tumoral é removida e posteriormente analisada ao microscópio (17). Esta observação por microscópio permite determinar a natureza (benigno ou maligno) do tumor e identificá-lo.

No entanto, como as características moleculares e clínicas evoluem ao longo do tempo e variam de paciente para paciente, estas devem ser reavaliadas em intervalos de tempo específicos, de forma a ajustar a terapia escolhida (15). À medida que os tumores avançam as variações vão sendo cada vez mais acentuadas e, frequentemente, o mesmo tipo de cancro poderá consistir em diferentes fenótipos. Assim, a oncologia requer técnicas de monitorização eficientes que consigam acompanhar o progresso dos tumores e auxiliem na definição de uma estratégia terapêutica (15).

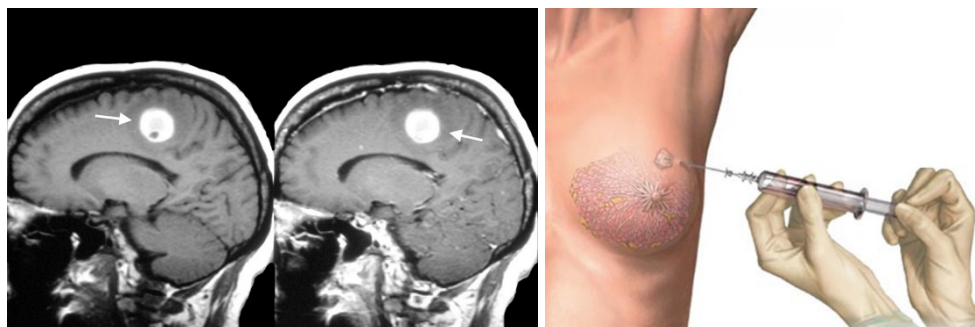


Figura 1 – À esquerda: exemplo de uma ressonância magnética, onde as setas a branco evidenciam a presença de uma metástase de um melanoma; à direita: exemplo de uma biópsia por agulha para diagnóstico de cancro da mama, recolhendo uma amostra do tecido tumoral.

2.1.2. Técnicas convencionais para o tratamento do cancro

Após o diagnóstico do cancro surgem dois grandes problemas: poderá um tumor diagnosticado ser tratado, e se sim, quais são as terapias mais apropriadas para o subtipo de tumor identificado (15)? Esta decisão é muitas vezes simplificada, passando quase sempre por tratar todos os tumores de forma agressiva para reduzir ao máximo a possibilidade de ocorrer progresso clínico. A natureza do desenvolvimento do cancro, principalmente a noção de que os tumores primários se podem espalhar em metástases, tem sido o conceito central na terapia anticancerígena desde o século XIX (19,20). O objetivo é impedir as células cancerígenas de se multiplicarem, invadirem, formarem metástases e, por último, matar o hospedeiro (paciente). No entanto, a escolha do tipo de tratamento deverá ter em conta vários fatores, como o tipo de cancro, o estágio de evolução do mesmo e a faixa etária do paciente (21). Apesar do tipo de tratamento variar consoante os diferentes fatores anteriormente referidos, a radioterapia, a quimioterapia e a cirurgia são os tratamentos mais comumente utilizados.

A radioterapia surgiu no final do século XIX, pouco depois da descoberta dos raios-X (1895), enquanto a quimioterapia só surgiu após a segunda guerra mundial, no século XX (19,20). Durante grande parte do século XIX, a cirurgia era a única forma de

terapia que oferecia alguma esperança de reverter a doença. Atualmente ainda se recorre à cirurgia para remoção de tumores mas, muitas vezes, combina-se este tratamento com a quimioterapia e/ou radioterapia (19,20).

A radioterapia consiste no uso de radiação, normalmente de raios-X, para o tratamento do cancro (19,20). Esta técnica destrói as células cancerígenas por dano do DNA das mesmas. Uma vez que a técnica não é específica apenas para as células cancerígenas, as células saudáveis são também afetadas, podendo surgir efeitos secundários, como irritação da pele, náuseas, vômitos (19,20). No entanto, estas células mantêm a capacidade de se reparar, pelo que não são destruídas como é o caso das células cancerígenas.

Porém, a quimioterapia continua a ser a principal terapia usada para tratamento do cancro (21,22). Distintamente da radioterapia, esta técnica permite destruir as células cancerígenas que se afastaram do tumor principal (metástases). Geralmente esta técnica usa um ou mais fármacos anticancerígenos, designados de agentes quimioterapêuticos (como o paclitaxel e a doxorrubicina (DOX)), que atuam essencialmente ao nível do ciclo celular (19,20). As células cancerígenas tendem a formar novas células a uma rapidez superior às células saudáveis, tornando-as assim em alvos fáceis para os agentes quimioterapêuticos. Mas, como a multiplicação celular é também uma característica comum às células saudáveis, estes agentes quimioterapêuticos atuam também nas células saudáveis, levando ao aparecimento de efeitos secundários indesejáveis, como infertilidade, alterações endócrinas, dores, náuseas, vômitos, queda de cabelo e fadiga (23–25).

Assim, e de forma a superar este problema, têm sido desenvolvidas outras abordagens que envolvem a coadministração de agentes citotóxicos e agentes que têm como alvo o recetor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), o recetor do fator de crescimento endotelial (EGFR), a proteína cinase ativada por mitogénio (MAPK), o fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) ou a proteína alvo da rapamicina de mamíferos (mTOR) (22,26–29). A combinação de dois ou mais alvos numa única via permite a sua máxima inibição, pois possibilita que a terapia administrada atue seletivamente na via relacionada com o aparecimento do tumor. A via do oncogene Ras/ fator de angiogénese do tumor/ proteína cinase ativada por mitogénio/ cinase regulada por sinal extracelular (Ras/TAF/MEK/ERK) é a via responsável pela transferência de sinais de crescimento extracelular para o núcleo, estimulando a proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular, sendo que anormalidades nesta via são comuns

em vários tipos de cancro (22,26–29). Os fatores de crescimento como EGFR, VEGFR, MET e IGF1R podem ativar Ras, assim como o proto-oncogene serina/ treonina proteína cinase (Raf) e MEK. Muitos estudos de combinação foram realizados entre fatores de crescimento e Raf/MEK e entre Raf e MEK, isoladamente, resultando na inibição do crescimento, antiangiogénese e supressão das metástases (22,26–29). A via PI3K/proteína cinase B (Akt)/mTOR pode ser ativada por uma variedade de fatores, como recetores tirosina-cinase, integrinas, recetores de citocinas, sendo responsável por diversas funções, como a síntese proteica, sobrevivência celular, proliferação e metabolismo da glucose. A ativação persistente da via PI3K/Akt foi observada em vários tipos de cancro, sendo que a combinação de estratégias que envolvem esta via crucial também revelou a diminuição das funções anteriormente referidas (22,26–29).

Como visto, a coadministração de agentes citotóxicos e agentes que tenham como alvo as vias metabólicas, permite que haja uma inibição mais seletiva das vias que são responsáveis pelo aparecimento de tumores (22,26–29). Assim, é necessário o desenvolvimento de técnicas de tratamento do cancro que sejam direcionadas apenas para as células cancerígenas, permitindo a diminuição dos efeitos secundários observados.

2.1.3. Novas técnicas de tratamento do cancro

Vários são os obstáculos que as terapias anticancerígenas devem ultrapassar, desde a heterogeneidade do cancro, resistência adaptativa aos tratamentos administrados, aos efeitos secundários que surgem devido à falta de seletividade das terapias seleccionadas (30). De forma a solucionar este problema surgiram os sistemas nanoteranósticos (9). O termo “nanoteranóstico” refere-se ao uso de nanomateriais (materiais em que, pelo menos uma das suas dimensões se encontra na escala nanométrica, ou seja, entre 1-100 nm) que combinem o uso de agentes de deteção (diagnóstico) com sistemas de libertação controlada de fármacos (terapêutica), ou seja, estes sistemas permitem simultaneamente diagnosticar e tratar o cancro. O uso de nanomateriais mostrou ser útil em imagiologia e aplicações terapêuticas, uma vez que ao apresentarem dimensões reduzidas, conseguem penetrar facilmente nas células alvo, apresentam uma elevada área superficial e a possibilidade de serem funcionalizados (9).

Dos diferentes tipos de nanomateriais que podem ser utilizados para desenvolvimento dos sistemas nanoteranósticos, surgem as nanopartículas (NPs) como um dos mais estudados (9). Estas podem ser obtidas a partir de polímeros naturais, como os polissacarídeos e as proteínas, apresentando uma excelente biocompatibilidade e

degradando-se em componentes não tóxicos e não imunogénicos (31–33). Na natureza, os polissacarídeos podem derivar das algas (ex.: alginato), das plantas (ex.: celulose), ser de origem microbiana (ex.: dextrano) ou de animais (ex.: quitina e o seu derivado quitosano). Os polissacarídeos têm um número considerável de grupos reativos/funcionais, uma gama variada de pesos moleculares assim como de composição química, o que contribui para uma variabilidade de estruturas e propriedades (31–33). Estes podem ser facilmente modificados resultando numa elevada quantidade de derivados de polissacarídeos; são estáveis, hidrofílicos, não apresentam toxicidade e são bons para o desenvolvimento de materiais biocompatíveis a utilizar na libertação controlada de fármacos.

Desde que Ringsdorf propôs a utilização de polímeros farmacologicamente ativos contendo vários grupos funcionais, como sondas para obtenção de imagens, houve um grande desenvolvimento de sistemas nanoteranósticos (34). Várias moléculas com grupos funcionais específicos têm sido covalentemente conjugadas com polímeros de forma a permitir a libertação de fármacos, de forma controlada e direcionada, respondendo a estímulos ambientais como a temperatura, pH, enzimas, radiação, *stress* mecânico e campos elétricos. Outras biomoléculas funcionais, como péptidos e proteínas, podem também ser usadas com funções similares (35,36). Esta funcionalização das NPs permite manter ou otimizar as propriedades biológicas dos fármacos usados, diminuindo a dosagem necessária e, acima de tudo, a funcionalização com ligandos específicos favorece a interação com as células cancerígenas e, portanto, a eficácia da terapêutica e a diminuição dos efeitos secundários associados às terapias convencionais (35,36).

Por exemplo, o alginato é um polissacarídeo natural e linear, tipicamente obtido a partir das algas castanhas, e apresenta baixa toxicidade, baixo custo, podendo ser usado em diversas aplicações, como em sistemas nanoteranósticos (37,38). Devido à sua elevada versatilidade, este biopolímero apresenta um grande potencial na produção de sistemas para a libertação controlada de fármacos, assim como em técnicas de imagiologia. Como exemplo, Jia *et al.* (39) desenvolveram um sistema nanoteranóstico baseado em alginato oxidado funcionalizado com polietileno glicol, NPs de carbono fluorescentes e DOX, como se encontra representado na Figura 2. Estudos de citotoxicidade revelaram que o sistema desenvolvido, sem a presença do fármaco, não afeta a viabilidade celular das células cancerígenas mesmo na concentração mais elevada de 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando compatibilidade celular. No entanto, quando o fármaco se encontra no sistema nanoteranóstico a viabilidade celular diminui, indicando que o

sistema nanoteranóstico é eficiente (39). O estudo de fluorescência, por espectroscopia de fluorescência, permitiu concluir que este sistema apresenta potencial para a aplicação no tratamento e diagnóstico do cancro.

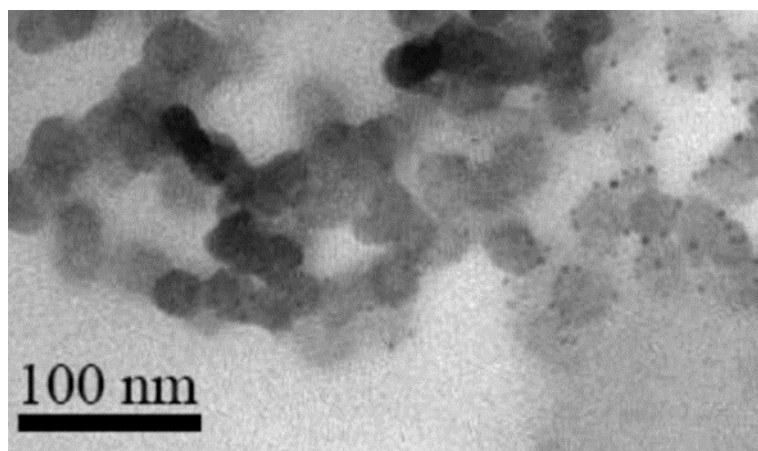


Figura 2 – Imagem obtida por TEM de um sistema nanoteranóstico baseado em alginato oxidado funcionalizado com polietileno glicol, NPs de carbono fluorescentes e DOX (retirado de (39)).

Outro polissacarídeo bastante usado no desenvolvimento de sistemas nanoteranósticos é o quitosano (CS), que se obtém por desacetilação da quitina e é, provavelmente, um dos mais estudados atualmente (40). Este polissacarídeo, de estrutura química representada na Figura 3, apresenta uma excelente biocompatibilidade, baixa toxicidade e capacidade de ser funcionalizado, o que aumentou o interesse na sua aplicação na área biomédica.

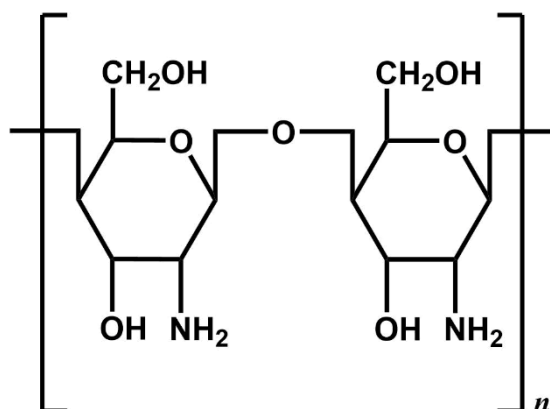


Figura 3 – Representação da estrutura química do CS, n =grau de polimerização.

Tal como com o alginato foram desenvolvidos vários complexos constituídos por CS para aplicações em sistemas nanoteranósticos. Zarrin *et al.* (41) sintetizaram dois sistemas nanoteranósticos, um consistindo em CS funcionalizado com FA, NPs de óxido de ferro superparamagnéticas e DOX (Figura 4) e outro apenas com CS funcionalizado

com as NPs superparamagnéticas e DOX. Este sistema foi desenvolvido de forma a ter a capacidade de localizar o tumor através de ressonância magnética de contraste, no qual as NPs de óxido de ferro superparamagnéticas funcionam como agente de contraste. O FA funcionou como agente de direcionamento do sistema nanoteranóstico para as células cancerígenas alvo, enquanto a DOX funcionou como agente terapêutico (41). Os resultados obtidos permitiram verificar uma elevada eficiência de ligação e liberação do fármaco quando se usava o sistema nanoteranóstico com ácido fólico. Foram também realizados ensaios de citotoxicidade, os quais indicaram que até à concentração de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o sistema nanoteranóstico não afetou a viabilidade celular das células de fibroblasto de murganho (sem recetores de FA na superfície), indicando que o sistema irá apenas afetar as células alvo (41). Os testes *in vitro* de ressonância magnética de contraste permitiram concluir que o sistema nanoteranóstico tem a capacidade de emitir sinal, mesmo quando em concentrações mais baixas como $25 \mu\text{M}$.

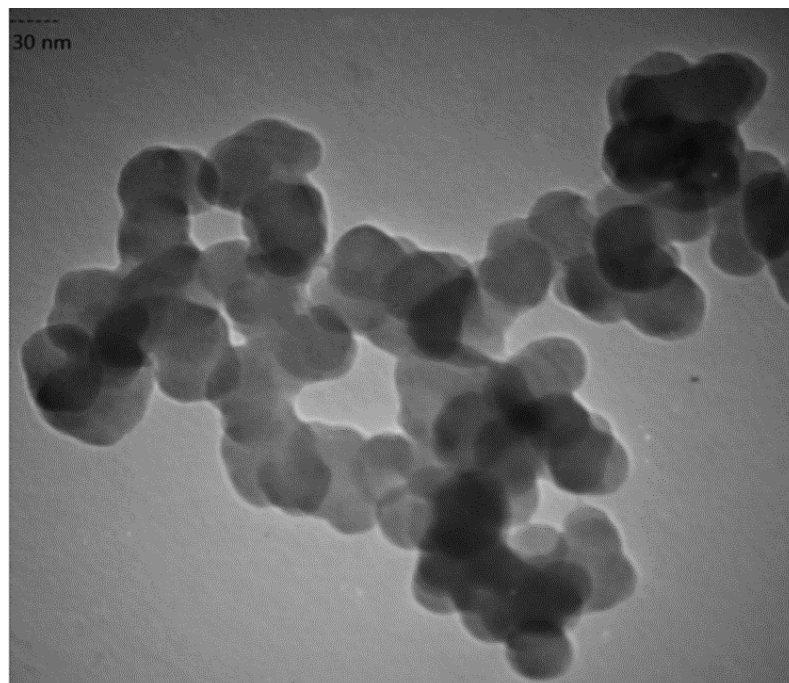


Figura 4 - Imagem obtida por TEM do sistema nanoteranóstico desenvolvido por Zarrin *et al.* (41).

Sachdev *et al.* (42) desenvolveram um hidrogel composto por CS funcionalizado com NPs de carbono fluorescentes e revestido com um fármaco anticancerígeno, nomeadamente o 5-fluorouracilo, de forma a construir um sistema nanoteranóstico. As NPs de carbono por apresentarem uma elevada fluorescência foram usadas como agente de diagnóstico (42). Estudos de liberação do fármaco mostraram que este era

libertado mais rapidamente num ambiente ácido que num ambiente com pH 7.4. Este facto foi considerado vantajoso, uma vez que as células cancerígenas têm um ambiente ácido (42). As imagens representadas na Figura 5 permitiram verificar a presença de corpos apoptóticos, indicando capacidade terapêutica do sistema nanoteranóstico desenvolvido. Os ensaios de citotoxicidade permitiram concluir que o sistema desenvolvido sem o fármaco não afeta a viabilidade celular das células cancerígenas em estudo (42). No entanto, quando o sistema contém o fármaco a viabilidade celular diminui, o que é de esperar, já que o fármaco tem como função provocar a apoptose destas células. Os estudos de fluorescência microscópica permitiram verificar que as NPs de carbono ajudaram na identificação dos fenómenos de apoptose instigados pelo fármaco (42).

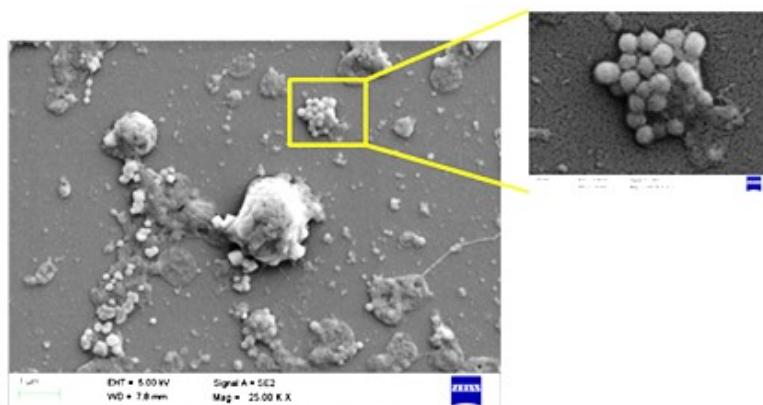


Figura 5 - Imagens obtidas por TEM com emissão de campo das células alvo tratadas com o sistema nanoteranóstico (retirado de (42)).

Os estudos anteriormente referidos utilizavam alginato ou CS na forma de nanopartículas esféricas ou de hidrogéis. Apesar de os resultados obtidos em cada estudo serem promissores, estes podem ser melhorados se a forma do nanomaterial a utilizar for alongada, já que esta morfologia facilita a penetração dos sistemas nanoteranósticos nas células alvo (5,6,43,44). Desta forma, o objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de um sistema nanoteranóstico que faça uso de um nanomaterial com estrutura alongada. Assim, surge a celulose como um biopolímero promissor, nomeadamente uma das suas formas nanométricas, os nanocristais de celulose (CNCs) que conjugam a morfologia em forma de bastonete e a utilização de um recurso natural (5,6).

2.2. Celulose

A celulose é o biopolímero mais abundante na natureza, sendo produzidas cerca de $1,5 \times 10^{12}$ toneladas por ano (45). Este biopolímero é o principal constituinte da parede celular das plantas (responsável por conferir suporte), encontrando-se também em bactérias, fungos, algas e até mesmo em animais marinhos, tendo, a sua composição molecular, sido descoberta e determinada por Anselme Payen, em 1838 (45–47). No entanto, mesmo antes da sua descoberta, a celulose da madeira, do algodão e de outras fibras de plantas já era usada como fonte de energia, vestuário, pasta de papel, encontrando-se, assim, muito presente no quotidiano das pessoas.

Este biopolímero, de fórmula química $(C_6H_{10}O_5)_n$ e cuja estrutura se encontra representada na Figura 6, é um polímero linear constituído por unidades de D-anidroglicopirranose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1→4) (45,48,49). De forma a promover as pontes acetal com os ângulos de ligação preferenciais, cada anel é rodado 180° em relação ao primeiro.

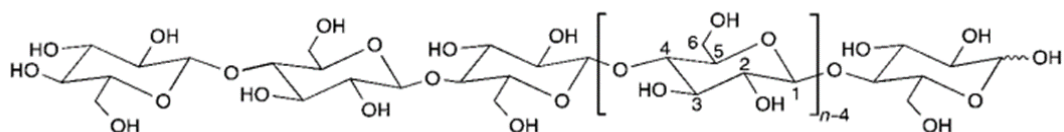


Figura 6 - Estrutura molecular da celulose, n =grau de polimerização (retirado de (45)).

Assim, dois anéis de glucopirranose adjacentes definem uma unidade de celobiose, que aparece repetida ao longo da estrutura de celulose (46). Dependendo da sua origem, as cadeias de celulose podem conter entre 300 a 10000 unidades de glucose (45,50). Os grupos hidroxilo presentes nestas cadeias são responsáveis pelo estabelecimento de pontes de hidrogénio intra e intermoleculares, promovendo a sua agregação em fibras. Ou seja, as cadeias de celulose quando ligadas por pontes de hidrogénio formam microfibrilas de celulose que exibem regiões cristalinas e amorfas (51). As regiões cristalinas são zonas altamente ordenadas que vão alternando com zonas amorfas (zonas desordenadas) como se encontram representadas na Figura 7.

A literatura reporta quatro polimorfismos diferentes para a celulose: celulose I, II, III e IV (51). A celulose I é a celulose nativa, ou seja, a forma que se encontra na natureza, ocorrendo em dois alomorfismos: $I\alpha$ e $I\beta$, que coexistem em diferentes proporções dependendo da fonte de celulose (6). O alomorfismo $I\alpha$ é dominante na celulose das algas

e bactérias, enquanto o alomorfismo I β é abundante na celulose das paredes celulares de plantas e tunicados.

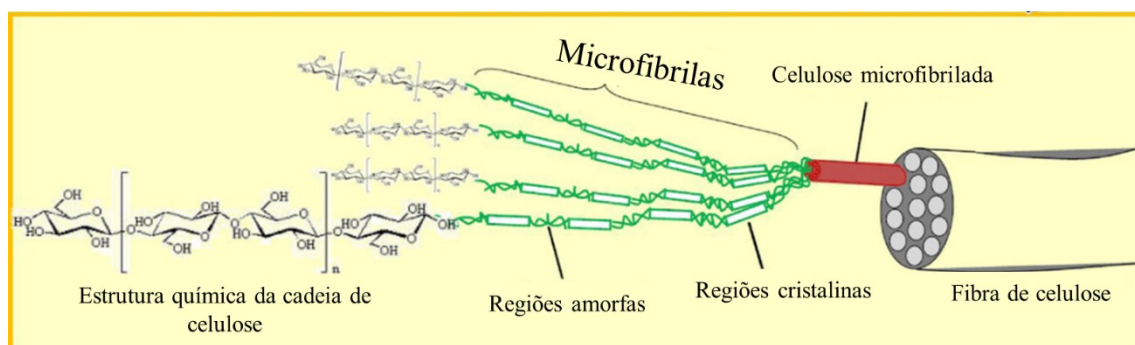


Figura 7 - Representação da fibra de celulose (adaptado de (51)).

2.2.1. Biossíntese da celulose

A biossíntese da celulose (Figura 8) pode ocorrer por duas vias diferentes, dependendo da sua origem (plantas ou microrganismos) (52–55). Nas plantas, a biossíntese de celulose está associada ao processo de fotossíntese, necessitando de água e dióxido de carbono para produzir glicose (principal fonte de celulose). Nos microrganismos, uma vez que estes não têm a capacidade de realizar a fotossíntese, é necessário a presença de açúcares ou outras fontes de carbono, como a glicose, para a produção de celulose (52–55).

Contudo, em ambos os casos, o processo de produção de celulose envolve os mesmos passos, após a obtenção de glicose, os quais incluem um grande número de enzimas, complexos catalíticos e proteínas reguladoras (56). Este processo envolve a formação de uridina difosfato glicose (UDPGlc), precursor na formação de celulose. A formação de UDPGlc envolve a fosforilação de glicose a glicose-6-fosfato (Glc-6-P), catalisado pela hexocinase (56). De seguida, ocorre uma isomerização deste intermediário formando glicose-1-fosfato (Glc-1-P), um processo catalisado pela fosfoglucomutase. Após este passo, ocorre a conversão deste produto formado em UDPGlc, pela UDPGlc pirofosforilase (56). A enzima 4- β -glucosiltransferase transforma os sucessivos resíduos de glucopiranosose do UDPGlc em novas cadeias deste polissacarídeo. A celulose sintase é responsável pela síntese das cadeias β -(1 \rightarrow 4) - glucanas, através da polimerização das unidades de glicose (56).

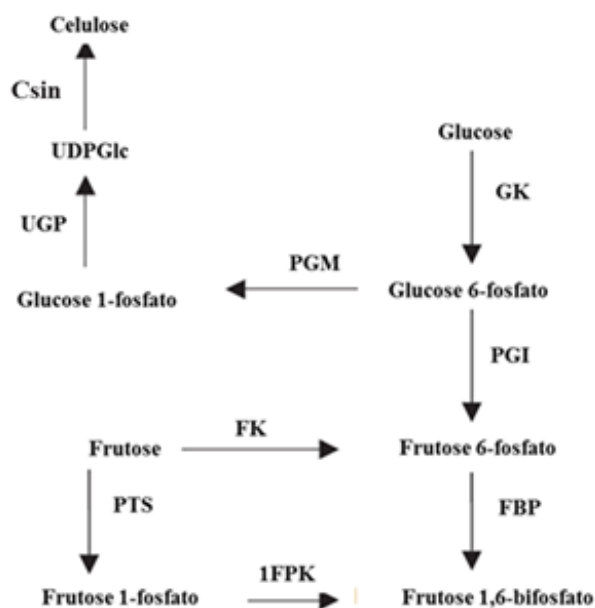


Figura 8 - Representação esquemática da biossíntese de celulose (adaptado de (56)).

2.2.2. Formas nanométricas de celulose

O termo nanocelulose refere-se às formas de celulose que têm pelo menos uma das dimensões na escala nanométrica, fazendo parte desta categoria as nanofibrilas de celulose ou celulose nanofibrilada (CNF), a nanocelulose bacteriana (BNC) e os nanocristais de celulose (CNCs) (5,6). É importante notar que cada tipo de nanocelulose tem dimensões e morfologia que lhe são características. Isto ocorre como resultado de vários fatores, como (i) a variabilidade dos processos biológicos; (ii) o tipo e a severidade do processo de produção; e (iii) as diferenças na técnica de medição usada e a qualidade da análise dos dados (5,6).

A CNF tem entre 4-20 nm de largura e 500-2000 nm de comprimento (5,6,51). Estas nanofibras podem conter tanto, regiões amorfas como cristalinas, sendo obtidas por desintegração mecânica das fibras de celulose, como elevada pressão e tratamentos ultrassônicos de elevada intensidade. A CNF pode ser utilizada em aplicações para libertação de fármacos e em ligamentos artificiais ou substitutos de tendões (5,6,51). Pode também ser aplicada como reforço de materiais têxteis, na indústria do papel e em embalagens.

As nanofibras de BNC são secretadas por várias bactérias, contudo de todas as espécies produtoras, a mais conhecida é *Acetobacter xylinus* (5,6,57–59). A bactéria *A. xylinus* produz fibras de BNC que têm entre 6-10 nm de largura e 30-50 nm de comprimento, no entanto neste caso, as fibras encontram-se numa rede tridimensional.

Este tipo de nanocelulose é um nanomaterial promissor em aplicações biotecnológicas, médicas, farmacêuticas e alimentares (5,6,57–59). Apesar das suas aplicações biomédicas, o desenvolvimento de processos eficientes e baratos para a sua produção em larga escala continua a ser um desafio a superar.

2.2.2.1. Nanocristais de celulose

Os CNCs, também designados de celulose nanocristalina e representados na Figura 9, apesar de terem sido descobertos em 1949, (60) só mais tarde, em 1992, é que começaram a ser estudados pela comunidade científica (61). Estes são resultado da hidrólise ácida das fibras de celulose, realizada em condições controladas de temperatura, agitação e tempo (43,62). Nestas condições, as regiões desordenadas ou amorfas das fibras de celulose são preferencialmente hidrolisadas, enquanto as regiões cristalinas, que têm uma elevada resistência ao ataque ácido, mantêm-se intactas. Do processo de hidrólise ácida resulta uma suspensão que, após sucessivas lavagens, permite obter os CNCs isolados (43,62).

O ácido clorídrico (HCl) e o ácido sulfúrico (H₂SO₄) são os mais utilizados na hidrólise ácida (62,63). Contudo, quando se usa HCl, a capacidade de dispersar os CNCs numa suspensão fica comprometida e as suspensões tendem a flocular. No entanto, quando se usa H₂SO₄, este reage com os grupos hidroxilo da celulose, via esterificação, dando origem a ésteres de sulfato (62,63). Estes grupos conferem carga negativa à superfície dos CNCs, permitindo a sua conjugação com biomoléculas catiónicas além de permitir também a sua dispersão em água, dando origem a suspensões mais estáveis.

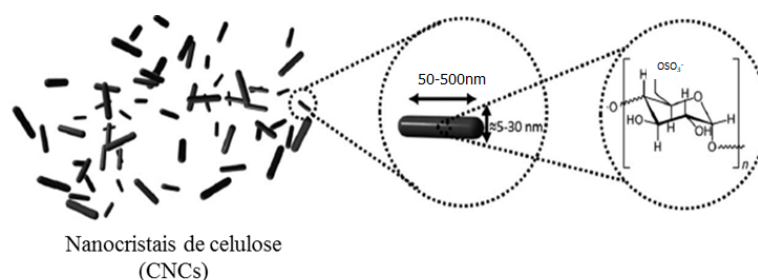


Figura 9 - Representação da estrutura dos CNCs, resultantes de hidrólise ácida com ácido sulfúrico (adaptado de (6)).

2.2.2.1.1. Propriedades dos CNCs

Os CNCs são os candidatos ideais para aplicação em sistemas nanoteranósticos devido à sua estrutura alongada, à sua abundância, biodegradabilidade e multifuncionalidade (5,6,64). Os CNCs possuem uma forma em bastonete com cerca de 5-30 nm de largura e 50-500 nm de comprimento, sendo altamente cristalinos (5,6,43,44). Uma vez que a síntese dos CNCs hidrolisa as zonas amorfas das fibras de celulose, os nanocristais de celulose são altamente cristalinos (54-88%), sendo ricos no alomorfismo I_{β} (68-94%) (6). Esta forma nanométrica da celulose apresenta uma forma afunilada nas terminações dos cristais, resultado do processo de hidrólise ácida das fibras de celulose, que os torna interessantes para a aplicação em questão, uma vez que facilita a sua penetração nas células alvo (5,6,43,44).

Como referido anteriormente, os CNCs podem apresentar carga negativa (62,63). A introdução de cargas negativas permite que os CNCs sejam funcionalizados posteriormente com moléculas desejáveis, permitindo o aumento da sua seletividade para determinadas células alvo, como por exemplo as células cancerígenas. Em termos de propriedades térmicas, os CNCs apresentam uma temperatura de degradação a, aproximadamente, 260°C, pelo que se mantêm estáveis às temperaturas de esterilização (150°C) (62,63,65).

2.2.2.1.2. Aplicações dos CNCs

Desde a sua descoberta que os CNCs têm atraído um grande interesse em diversas áreas científicas (5,62). Estes têm sido propostos para uso como matrizes para imobilização de enzimas/proteínas, uma vertente que tem ganho muita atenção na área biomédica. Um exemplo desta aplicação é o trabalho realizado por Yan *et al.* (66) onde foram sintetizados CNCs revestidos com AuNPs, recorrendo a uma metodologia “amiga do ambiente”, não usando, portanto, reagentes e procedimentos tóxicos. Através de vários testes de caracterização como TEM, UV-Vis, foi possível verificar que recorrendo a esta metodologia é possível sintetizar AuNPs-CNCs com um grande potencial para aplicações industriais e médicas, uma vez que a associação destes nanomateriais com AuNPs origina excelentes plataformas híbridas, permitindo aumentar a área superficial dos CNCs, devido ao aumento das zonas de ligação com as enzimas e consequente eficiência de ligação (66).

Estes nanomateriais têm sido propostos para utilização em técnicas de imagiologia através de ligação covalente a marcadores fluorescentes, como por exemplo a fluoresceína- 5'- isotiocianato (FITC) (5,67). Além do já referido, esta nanoestrutura, quando modificada/funcionalizada, pode também ser utilizada em aplicações biomédicas nomeadamente como agentes antibacterianos (quando funcionalizada com NPs de óxido de zinco ou prata) e agentes fotobactericidas (quando conjugada com porfirinas catiónicas) (68–70).

Com o avanço da nanotecnologia, os CNCs têm sido eleitos para o desenvolvimento de sistemas nanoteranósticos tem vindo a despertar um enorme interesse na comunidade científica pois apresentam uma elevada área superficial, permitindo a sua funcionalização com moléculas de interesse (5,31,67,71). A funcionalização da superfície destes pode ser categorizada em três grupos distintos: (i) funcionalização nativa dos CNCs, *i.e.*, de acordo com os seus processos de obtenção, onde estes podem adquirir diferentes grupos funcionais na sua superfície; (ii) adsorção de partículas à sua superfície; e (iii) ligação covalente de moléculas na sua superfície (6). Posto isto, vários são os estudos realizados com CNCs funcionalizados com o intuito de direcionar os nanomateriais baseados nesta nanoestrutura celulósica para as células alvo. Por exemplo, Burt *et al.* (72) averiguaram a potencialidade de usar estas nanoestruturas como um sistema nanoteranóstico para libertação controlada de DOX. Os CNCs foram funcionalizados com um catião surfactante, o brometo de cetrimônio, assim como com um agente fluorescente, a fluoresceína. A ligação com este catião permitiu criar um domínio hidrofóbico para o aprisionamento de fármacos anticancerígenos hidrofóbicos (72). Neste estudo, verificou-se ainda que quantidades significativas de fármacos anticancerígenos se ligavam aos CNCs por interações hidrofóbicas e que a libertação dos fármacos ocorria de uma forma controlada durante cerca de 2 dias. Estudos de fluorescência revelaram uma forte associação do complexo (CNCs e fármacos anticancerígenos) com as células cancerígenas, havendo também evidências de captação dos fármacos (72).

Contudo, de forma a diminuir os efeitos secundários severos, é necessário funcionalizar estes nanomateriais com moléculas que os tornem seletivos para as células cancerígenas, evitando que os fármacos anticancerígenos exerçam os seus efeitos nas células saudáveis. Assim, e tendo em conta que em cerca de 40% dos tipos de cancro, as células tumorais apresentam uma elevada expressão de recetores do grupo folato, torna-se interessante funcionalizar os CNCs com ácido fólico (73).

2.3. Ácido fólico

2.3.1. Propriedades e funções do FA

O ácido fólico, também conhecido como vitamina B₉, é uma molécula que se encontra envolvida em muitos processos bioquímicos e metabólicos nos seres humanos, como a multiplicação celular e produção de células, atuando maioritariamente na sua forma iônica (ião folato) (7). A descoberta do FA ocorreu em 1930, quando Wills verificou que havia uma substância presente em leveduras que prevenia a anemia megaloblástica (74). Contudo, o termo “ácido fólico” surgiu apenas em 1941, derivando da palavra *folium*, do Latim, que significa folha, uma vez que este se encontra presente em grandes quantidades nas folhas verdes (75).

A estrutura química do FA, representada na Figura 10, pode ser dividida em três componentes principais: o ácido glutâmico, o ácido *p*-aminobenzóico e a pterina (7). A pterina encontra-se ligada ao ácido *p*-aminobenzóico através de uma ponte de metileno e, por sua vez, o ácido *p*-aminobenzóico encontra-se ligado ao ácido glutâmico através de uma ligação peptídica, formando, assim, o ácido fólico.

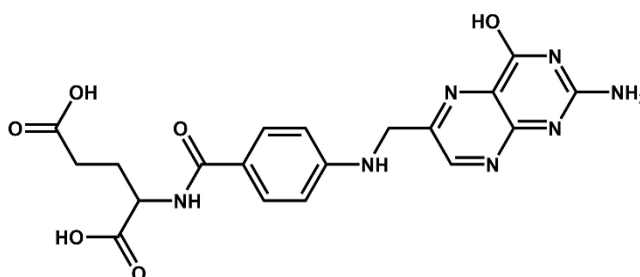


Figura 10 – Representação da estrutura química do FA.

O FA, de fórmula química C₁₉H₁₉N₇O₆, tem um peso molecular de 441,37 g.mol⁻¹, e aparência amarelada com ponto de fusão a 250°C, indicando que também é estável à temperatura de esterilização (7,8). Esta molécula, apresenta uma baixa solubilidade em água, sendo praticamente insolúvel a 25°C, uma vez que se trata de um composto apolar. Esta molécula tem várias propriedades que a tornam apelativa para usar na funcionalização de outras moléculas ou materiais, uma vez que apresenta uma grande estabilidade, uma conjugação química simples, elevada afinidade para os seus recetores e uma rápida internalização nas células (7,76,77).

O FA apresenta um papel importante na síntese de purinas e pirimidinas (componentes essenciais dos ácidos nucleicos), no metabolismo da homocisteína, na replicação e metilação do DNA, na metilação de proteínas e lípidos e na produção de

hemácias (7,76,77). Esta molécula é também importante para o desenvolvimento normal dos tecidos, principalmente dos que estão associados a uma rápida divisão celular. A maioria das células cancerígenas apresentam uma elevada expressão de grupos folato na sua superfície, como já referido anteriormente (73). Estas células exigem uma rápida replicação, necessitando de sintetizar DNA a uma taxa superior à das células normais. Tendo em conta que o FA está envolvido nestes dois processos é de esperar que as células cancerígenas expressem, na sua superfície, recetores para o FA em maior quantidade que nas células saudáveis, de forma a responder às suas necessidades (73).

2.3.2. O FA no tratamento e diagnóstico do cancro

Como referido anteriormente, os recetores de FA são uma boa opção para direccionar os sistemas nanoteranósticos para as células cancerígenas de forma a permitir o diagnóstico e tratamento do cancro. Li *et al.* (78) prepararam nanotubos de carbono de parede múltipla (Figura 11) para a formação de um sistema nanoteranóstico consistindo em FA e NPs de ferro para a libertação controlada de DOX. Os testes de citotoxicidade revelaram que o sistema, sem o fármaco, não afeta a viabilidade celular das células cancerígenas. Na presença do fármaco anticancerígeno, o sistema torna-se citotóxico, indicando que o sistema desenvolvido é eficiente (78). A presença das NPs de ferro aumenta o efeito do fármaco anticancerígeno, na presença de um campo magnético. Desta forma é possível concluir que o sistema desenvolvido apresenta potencialidade em ser aplicado na área em questão (78).

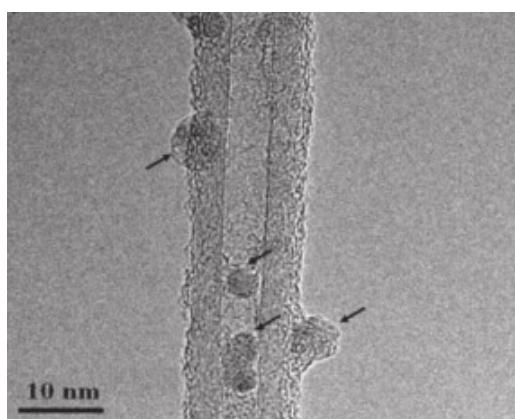


Figura 11 - Imagem obtida por TEM revelando a presença (setas a preto) das NPs de ferro tanto na superfície interna e externa dos nanotubos de carbono de parede múltipla já funcionalizados com ácido FA (retirado de (78)).

Dong *et al.* (79) sintetizaram um complexo consistindo em CNCs funcionalizados com FA e FITC. Após a síntese dos CNCs, estes sofreram um processo de aminação,

usando para tal a epícloridrina (79). O passo seguinte consistiu na funcionalização do produto obtido com FITC, seguindo-se a conjugação com FA. O sistema obtido foi caracterizado por FTIR, UV-Vis, microscopia de força atômica (AFM) e difração de raio-X (XRD) (79). Estas análises permitiram verificar que ocorreu a funcionalização dos CNCs tanto com o FITC como com o FA. Estudos de ligação e internalização nas células revelaram que a ligação deste complexo às células cancerígenas e a sua captação pelas mesmas, ocorria de uma forma muito mais rápida do que quando se usava apenas os CNCs (79). No entanto, o processo utilizado por Dong *et al.* (79) é muito moroso, com muitos passos, como se observa na Figura 12, em que alguns apresentam durações de cerca de 40 h. Para além de morosa, esta metodologia faz uso de reagentes muito perigosos e nocivos para o meio ambiente, como a epícloridrina (80).

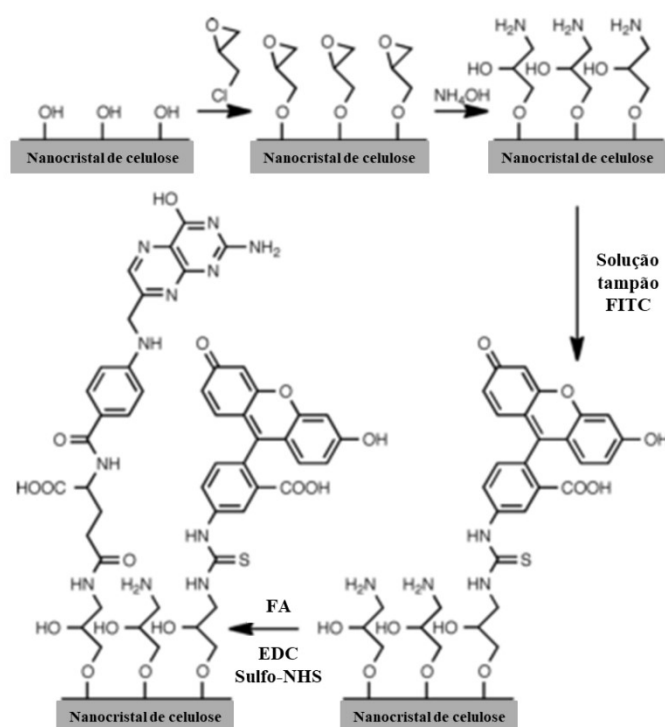


Figura 12 - Esquema da síntese de CNCs conjugados com FA e FITC (retirado de (79)).

Até agora, os estudos apresentados apenas permitiram concluir que o FA é uma molécula promissora para a funcionalização de nanomateriais, nomeadamente dos CNCs, uma vez que permite um direcionamento dos complexos sintetizados para as células alvo (47,48,49). No entanto, pretende-se desenvolver um sistema nanoteranóstico que, como visto anteriormente, tenha a capacidade de detetar e tratar o cancro. Desta forma, surge, como candidato, o marcador fluorescente FITC.

2.4. Isotiocianato de fluoresceína

O uso de marcadores fluorescentes é muito importante na investigação científica, pois permite identificar vias ou localizar determinado composto, sendo detetáveis mesmo em baixas concentrações (10). A aplicação de marcadores fluorescentes traz vantagens em termos de preço (baixo custo), não são tóxicos, podendo ser utilizados a nível clínico. Os marcadores fluorescentes, também designados de fluoróforos ou fluorocromos, são compostos químicos que, ao serem excitados a determinado comprimento de onda (que lhes é característico), emitem radiação a um comprimento de onda mais elevado (10). Este processo é conhecido como fluorescência. Os marcadores fluorescentes podem ser classificados em quatro categorias: proteínas e péptidos, compostos orgânicos pequenos, polímeros sintéticos e sistemas de vários componentes (10). Dentro destas categorias existem vários marcadores fluorescentes que podem ser utilizados nas mais diversas aplicações, sendo um deles o FITC (81). Este marcador, com estrutura química representada na Figura 13 e fórmula química $C_{21}H_{11}NO_5S$, tem um peso molecular de $389,38 \text{ g.mol}^{-1}$. Este composto apresenta uma cor alaranjada, sendo solúvel em metanol, etanol e dimetilsulfóxido e em água, apenas quando em concentração reduzida (81).

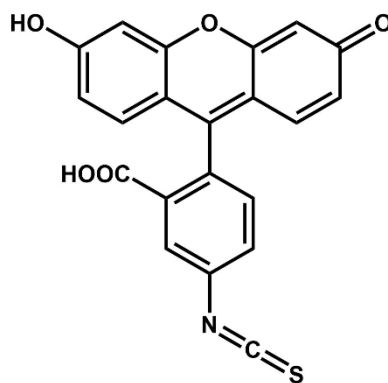


Figura 13 – Estrutura química do marcador fluorescente FITC.

Como referido anteriormente, os marcadores fluorescentes podem ser utilizados nas mais variadas aplicações, como por exemplo na deteção de células alvo. Dong *et al.* (82) desenvolveram uma metodologia de funcionalização dos CNCs com FITC, de forma a estudar a internalização celular e a sua biodistribuição. Para se obter CNCs funcionalizados com o marcador fluorescente, os nanocristais de celulose foram primeiramente sujeitos a uma reação com epícloridrina e hidróxido de amónia para introduzir grupos amina na superfície dos CNCs e permitir a sua funcionalização com FITC (82). A Figura 14 mostra a diferença de coloração observada quando se funcionaliza

os CNCs com o marcador fluorescente. Por espectroscopia ótica foi possível verificar a presença dos máximos de absorção característicos do marcador fluorescente, indicando a presença do FITC na superfície dos CNCs e que a funcionalização ocorreu com sucesso (82).

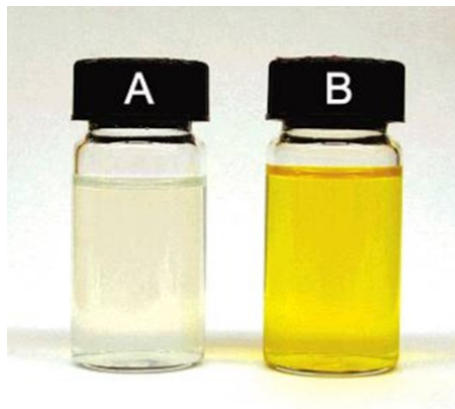


Figura 14 - Suspensões aquosas de (A) CNCs e (B) CNCs funcionalizados com FITC (retirado de (82)).

Noutro estudo, Dong *et al.* (79) aplicaram a metodologia anteriormente desenvolvida para o desenvolvimento de um sistema consistindo em CNCs funcionalizados com FITC e FA para posterior funcionalização com um fármaco anticancerígeno e aplicação do sistema nanoteranóstico no cancro. A funcionalização dos CNCs com o marcador fluorescente foi necessária para os estudos de internalização celular, os quais revelaram que a presença do FA no nanomaterial promove uma taxa de internalização bastante superior que quando se realiza o mesmo estudo apenas com CNC-FITC (79). Desta forma, é possível verificar que o FITC desempenha um papel muito importante na deteção de células cancerígenas.

2.5. Nanopartículas de ouro

O ouro, enquanto metal, tem sido usado no tratamento de algumas doenças nomeadamente na cultura chinesa e indiana para o tratamento da impotência masculina e com o intuito de aumentar o poder vital (83,84). Já as AuNPs são inertes, não apresentam nenhuma natureza tóxica, são biocompatíveis, tornando-as úteis e atrativas para aplicações biomédicas, nomeadamente em sistemas nanoteranósticos (83,84).

As AuNPs são interessantes para aplicações em biologia e imagiologia, devido às suas propriedades físico-química únicas (11,85,86). Estas propriedades são conferidas pela interação da luz com os eletrões na superfície das AuNPs. A um comprimento de onda específico, a oscilação destes eletrões dá origem a um fenómeno designado de

ressonância plasmônica de superfície (11,85,86). O comprimento de onda a que este fenômeno ocorre é dependente do tamanho das AuNPs (Figura 15), assim como do estado de aglomeração e da forma ou geometria destas. Por exemplo, uma solução vermelha, é característica de AuNPs com cerca de 13 nm, e tem um pico de absorção a cerca de 520 nm (11,85,86). Contudo, quando o tamanho das AuNPs aumenta, este pico de absorção desloca-se para comprimentos de onda mais elevados. A mudança de coloração para cores mais escuras, como o azul, indica aglomeração ou pequena distância entre AuNPs (11,85,86). Além do referido anteriormente, estas NPs possuem também uma elevada razão área de superfície/volume, excelente biocompatibilidade e baixa toxicidade.

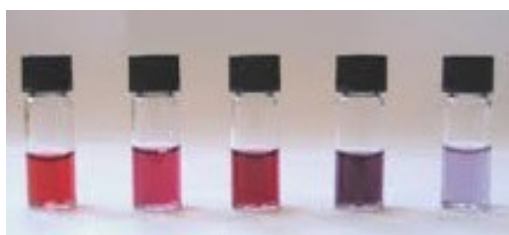


Figura 15 – Representação das cores apresentadas por diferentes soluções coloidais de AuNPs (retirado de (87)).

2.5.1. Síntese de AuNPs

As AuNPs podem ser preparadas por métodos físicos, como irradiação microondas, radiação UV, processos fotoquímicos e por métodos químicos que consistem em reações químicas que formam AuNPs por processos de redução (84). Dentro destes procedimentos, as AuNPs podem ser preparadas a partir da redução de sais como o ácido cloroáurico (HAuCl_4) com distintos agentes redutores (83). O agente redutor adicionado promove a redução dos iões Au^{3+} a Au^0 (83). À medida que se vão formando mais átomos neutros de ouro vai ocorrendo a nucleação e crescimento de partículas com dimensões na escala nanométrica. Nesta metodologia de síntese de AuNPs por redução do sal de ouro podem ser usados agentes estabilizantes, com grupos carboxilatos, aminas, tióis ou polímeros, de forma a prevenir fenómenos de aglomeração ou promover a formação de outras morfologias (83,84).

O protocolo mais utilizado para a síntese de AuNPs é o método descrito por Turkevich *et al.* (88). Neste método para a redução de um sal de ouro usa-se citrato de sódio, que funciona como agente redutor e estabilizante, ocorrendo a reação a uma temperatura de 80°C . Seguindo esta metodologia é possível obter AuNPs com 10-20 nm de diâmetro em cerca de 1 h, como representado na Figura 16 (88).

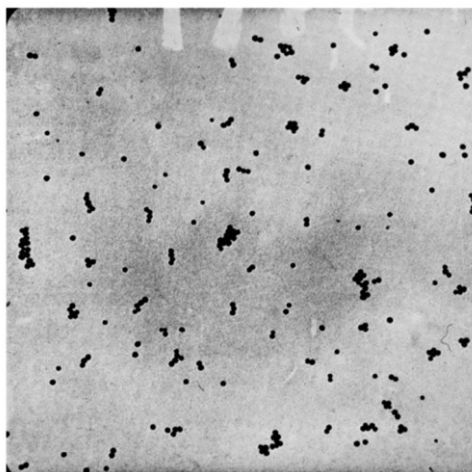


Figura 16 – Imagem obtida por TEM das AuNPs sintetizadas pelo método de redução usando citrato de sódio (retirado de (88)).

No entanto, existem outros métodos de síntese de AuNPs. Um exemplo é o método utilizado por Creighton *et al.* (89), no qual as AuNPs são sintetizadas a partir da redução de HAuCl_4 usando borohidreto de sódio. Através deste método produzem-se AuNPs estavelmente dispersas, mesmo sem a presença de um agente estabilizador. Segundo Martin *et al.* (90) este método necessita apenas de aproximadamente 10 min para sintetizar AuNPs com diâmetro entre 3,2 e 5,2 nm, como se observa na Figura 17.

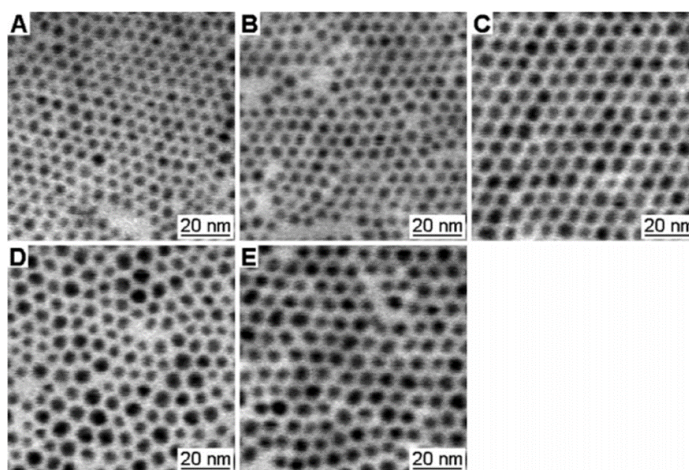


Figura 17 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varrimento (SEM) das AuNPs com diferentes diâmetros: (A) 3,2; (B) 4,0; (C) 4,8; (D) 4,2; e (E) 5,2 nm (retirado de (90)).

As AuNPs podem também ser produzidas por métodos biológicos, fazendo uso de fungos, bactérias, extratos de plantas (83). Os métodos biológicos têm sido usados como alternativa ao uso de solventes orgânicos, tornando este procedimento “amigo do ambiente”. Por exemplo, Song *et al.* (91) fizeram uso dos extratos de folhas de magnólia e de dióspiro para produzir AuNPs. Deste processo resultaram AuNPs com diâmetros

entre 50-100 nm, uma vez que o poder redutor dos compostos presentes no extrato das folhas, como polióis, compostos heterocíclicos solúveis em água, não é tão forte como o dos agentes redutores referidos nos métodos anteriores. No entanto, quando se aumenta a temperatura de reação verifica-se que o diâmetro das AuNPs pode ser reduzido como se observa na Figura 18 (91).

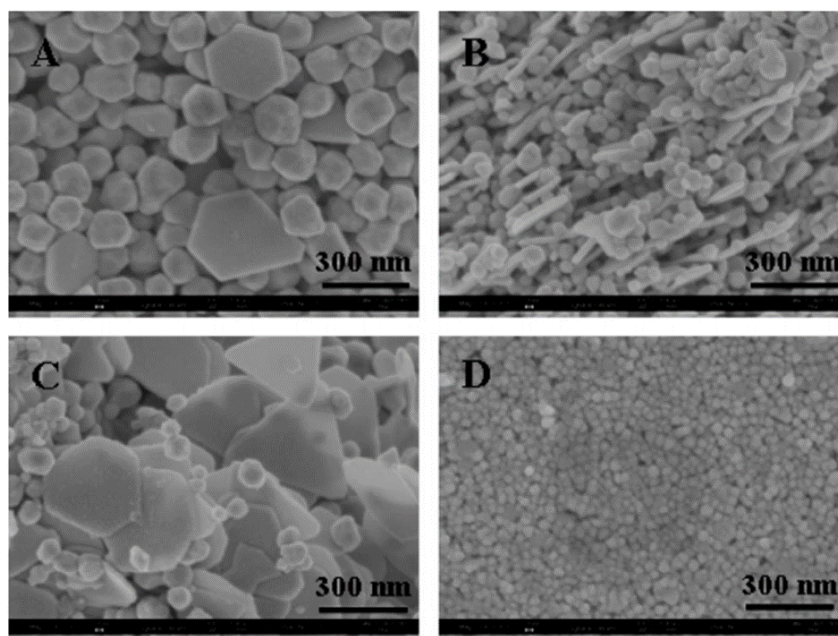


Figura 18 – Imagens obtidas por SEM das AuNPs sintetizadas a diferentes temperaturas de reação: (A) 25°C; (B) e (C) a 60°C; e (D) 95°C (retirado de (91)).

2.5.2. Aplicações das AuNPs

Devido às suas propriedades únicas, as AuNPs podem ser aplicadas nas mais diversas áreas, como a biomédica (11). As AuNPs têm sido conjugadas com anticorpos ou oligonucleótidos para a detecção de biomoléculas alvo, permitindo o diagnóstico de doenças como o cancro. Nesta área as AuNPs são conjugadas com anticorpos específicos para a célula alvo, permitindo a detecção da célula e a sua identificação (11). Como exemplo desta aplicação, Mirkin *et al.* (92) ligaram covalentemente um anticorpo específico do antígeno da próstata às AuNPs. O sistema desenvolvido apresentou a capacidade de detetar o antígeno específico da próstata a concentrações de 330 fg.mL⁻¹. A capacidade de detecção deste sistema é 300 vezes superior aos sistemas comerciais habitualmente usados (92).

As AuNPs têm também sido usadas como transportadores de agentes terapêuticos para o tratamento das células alvo (11). Cheng *et al.* (93) sintetizaram AuNPs funcionalizadas com polietilenoglicol e um fármaco de terapia fotodinâmica para tratamento do cancro. O mecanismo de transporte e biodistribuição do fármaco pelas

AuNPs foi investigado por fluorescência, indicando que este sistema se acumulava preferencialmente nas células tumorais (93).

As AuNPs podem também ser utilizadas em termoterapia (11,94). As AuNPs produzem calor quando excitadas com radiação na gama de 700-800 nm, permitindo erradicar as células tumorais alvo. Au *et al.* (95) preparam AuNPs conjugadas com anticorpos monoclonais para tratamento do cancro da mama. As células alvo foram irradiadas com radiação infravermelha próxima, respondendo imediatamente à radiação incidente. Verificou-se que o dano celular era irreversível e que a percentagem de células mortas aumentava com o tempo de exposição, atingindo um máximo, no qual se mantinha estável, indicando que as AuNPs são promissoras para a aplicação em questão (95).

Estas NPs têm também sido utilizadas como sondas, já que permitem a dispersão da luz e têm a capacidade de produzir uma gama de cores quando em microscopia de fundo escuro (11). Gobin *et al.* (96) desenharam nanocápsulas de sílica revestidas com nanopartículas de ouro para aplicar em técnicas de imagiologia. Os resultados obtidos por tomografia de coerência ótica permitiram constatar que ocorreu um aumento no contraste ótico quando se injeta este nanomaterial nos ratos usados para o estudo, indicando que as AuNPs conseguem promover este aumento de contraste no local onde se acumulam, nomeadamente nas células cancerígenas.

2.6. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo a funcionalização dos CNCs com ácido fólico, FITC e revestimento com AuNPs para o desenvolvimento de um novo sistema de tratamento e diagnóstico do cancro, *i. e.*, um sistema nanoneteranóstico. Apresenta também, como objetivo, a caracterização dos nanomateriais obtidos ao longo do desenvolvimento deste nanossistema.

3. Parte experimental

Neste capítulo serão descritos os materiais utilizados neste trabalho, assim como os protocolos utilizados para a síntese dos conjugados CS-FA e CS-FA-FITC, funcionalização dos CNCs com estes conjugados e posterior revestimento com AuNPs. As metodologias de caracterização dos nanomateriais obtidos serão também descritas.

3.1. Solventes e reagentes

Neste trabalho foi utilizado ácido fólico (97%, Sigma Aldrich), quitosano (85%, Polysciences Inc), hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Sigma Aldrich), isotiocianato de fluoresceína (90%, Sigma Aldrich), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (99,9%, Sigma–Aldrich), citrato de sódio (99%, BDH) e hidróxido de sódio (98%, Sigma Aldrich). Os nanocristais de celulose utilizados para o desenvolvimento do sistema nanoteranóstico foram gentilmente cedidos pelo Doutor Stefan Spirk da Universidade de Graz, Áustria, tendo estes sido preparados por hidrólise ácida com ácido sulfúrico.

Foi também utilizado ácido acético (97%, Sigma Aldrich), dimetilsulfóxido (DMSO) (reagente analítico, Labscan), metanol (p. a., Fischer Chemical) e etanol (absoluto anidro, Carlo Erba).

3.2. Síntese do conjugado CS-FA

A síntese do conjugado CS-FA baseou-se na metodologia descrita na literatura por Lee *et al.* (97). Especificamente, 50 mg de CS foram dissolvidos em 10 mL de uma solução aquosa de ácido acético a 1 M e 10 mg de FA foram dissolvidos em 5 mL de DMSO. A esta segunda solução, foram adicionados 10 mg de EDC, deixando-se a reagir durante 90 min, à temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, a solução com o FA ativado foi adicionada à solução de CS, gota a gota, e o pH foi ajustado para 6, usando, para isso, uma solução aquosa de NaOH a 1 M. A reação ocorreu à temperatura ambiente, no escuro, durante 48 h e sob agitação. No fim da reação realizou-se uma diálise em água destilada, durante três dias, com uma manga de diálise com porosidade específica de 6-8 kDa. O produto (CS-FA) que se encontrava no interior da manga foi congelado e seguidamente liofilizado, sendo depois armazenado num exsiccador.

3.3. Síntese do conjugado CS-FA-FITC

A ligação do marcador FITC ao conjugado CS-FA seguiu a metodologia descrita por Huang *et al.* (98). Assim, preparou-se uma solução contendo 25 mg de CS-FA dissolvidos em 7,5 mL de uma solução aquosa de ácido acético a 1 M. A esta solução adicionou-se, gota a gota, uma solução contendo 5 mg de FITC dissolvidos em 7,5 mL de metanol. A reação decorreu durante 24 h, à temperatura ambiente, no escuro e sob agitação. No final da reação o pH da solução foi ajustado para 10 usando uma solução aquosa de NaOH a 1 M. No entanto, como o FA é solúvel em NaOH, realizou-se uma diálise em água destilada (durante 4 dias) com manga de diálise de porosidade específica de 6-8 kDa, de acordo com a metodologia utilizada por Soliman *et al.* (98), sendo o produto obtido (CS-FA-FITC) congelado, liofilizado e armazenado num exsiccador.

3.4. Funcionalização dos CNCs

3.4.1. Síntese de CNC-CS-FA

A funcionalização dos CNCs com o conjugado CS-FA ocorreu por adsorção deste conjugado à superfície dos CNCs. Assim, a uma solução contendo 5 mg de CS-FA em 2 mL de uma solução aquosa de ácido acético a 1 M, adicionou-se, gota a gota, uma suspensão contendo 5 mg de CNCs (1 mg.mL^{-1}). A suspensão permaneceu em agitação, no escuro e à temperatura ambiente, durante 1 h. De seguida, centrifugou-se a suspensão obtida a 13400 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento dispersado em água destilada, voltando-se a centrifugar a 13400 rpm durante 5 min. Este passo foi repetido até se deixar de observar a presença da coloração característica do CS-FA no sobrenadante, sendo a suspensão obtida congelada, liofilizada e armazenada num exsiccador.

3.4.2. Síntese de CNC-CS-FA-FITC

A funcionalização de CNCs com o conjugado CS-FA-FITC também ocorreu por adsorção deste conjugado à superfície dos CNCs, seguindo uma metodologia semelhante à descrita anteriormente. Também neste caso foi preparada uma solução de 5 mg de CS-FA-FITC em 2 mL de uma solução aquosa de ácido acético a 1 M, à qual se adicionou, gota a gota, uma suspensão contendo 5 mg de CNCs (1 mg.mL^{-1}). A suspensão final foi congelada, liofilizada e armazenada num exsiccador.

3.5. Síntese *in situ* de AuNPs-CNC-CS-FA e AuNPs-CNC-CS-FA-FITC

1 mg de CNC-CS-FA foi dispersado em 5 mL de uma solução aquosa de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a 0,24 mM. Após dispersão dos CNCs funcionalizados aqueceu-se a solução até 80°C adicionando-se seguidamente, gota a gota, 94 μL de uma solução aquosa de citrato de sódio a 0,085 mM, deixando-se reagir durante 1 h. No final da reação, centrifugou-se a suspensão obtida a 6000 rpm durante 5 min, removendo-se o sobrenadante e dispersando os CNCs em água destilada. A suspensão final foi armazenada a 4°C. A síntese *in situ* foi também realizada na presença de CNC-CS-FA-FITC seguindo o mesmo procedimento.

3.6. Técnicas de caracterização

Os CNCs utilizados, bem como os materiais obtidos ao longo deste trabalho foram caracterizados por várias técnicas, nomeadamente espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier acoplada à reflexão total atenuada (FTIR-ATR), microscopia eletrónica de varrimento em modo de transmissão (STEM), difração de raio-X (XRD), espectroscopia ótica, espectroscopia de fluorescência e dispersão dinâmica da luz (DLS).

3.6.1. FTIR-ATR

Todos os espectros de FTIR-ATR foram obtidos usando um espectrofotómetro *Perkin Elmer FT-IR System Spectrum BX*, equipado com uma célula horizontal *Golden Gate ATR*. Foram realizados 32 *scans* entre 4000-400 cm^{-1} , com uma resolução de 4,0 cm^{-1} .

3.6.2. STEM

As imagens de STEM dos CNCs foram obtidas usando o equipamento *HR-FESEM SU-70 Hitachi*, operado a 15 kV. Umas gotas das suspensões de CNCs foram depositadas em grelhas de cobre e posteriormente secas antes da sua visualização por STEM. O tamanho das nanoestruturas foi determinado utilizando o *software Fiji*. Para cada análise foram consideradas no mínimo 50 NPs.

3.6.3. XRD

A difração de raios-X foi efetuada à temperatura ambiente usando um difractor Philips *X'Pert MPD* usando radiação Cu-K α ($\lambda=1,54178 \text{ \AA}$) a 40kV/50mA. As amostras foram prensadas e seguidamente depositadas num substrato de Si antes de analisadas.

3.6.3.1. Índice de cristalinidade (CI)

O índice de cristalinidade da amostra de CNCs foi calculado de acordo com o método descrito por Segal *et al.* (99), de acordo com a seguinte equação:

$$CI = \frac{I_t - I_a}{I_t} \times 100,$$

em que CI é o índice de cristalinidade, I_t representa a intensidade total do pico, a $2\theta=22^\circ$, e I_a representa a intensidade da banda, a $2\theta=16^\circ$.

3.6.4. Espectroscopia ótica

Os espectros óticos das amostras em solução foram obtidos usando um espectrofotómetro *UV-Visible Spectrophotometer Evolution 220*. O varrimento foi realizado entre 190-650 nm. Os espectros óticos das amostras sólidas foram obtidos usando um espectrofotómetro *Jasco V-560 UV-Vis Spectrophotometer*. O varrimento foi realizado entre 250-600 nm.

3.6.5. Espectroscopia de fluorescência

Os espectros de fluorescência foram adquiridos usando um espectralfluorómetro *Jasco spectrofluorometer FP-8300*. O varrimento foi realizado entre 505-700 nm, com excitação a 495 nm.

3.6.6. DLS

A medição do potencial Zeta das suspensões foi realizada usando um *ZetaSizer Nano ZS (green badge)* modelo *Zen3500* da *Malvern*.

4. Resultados e discussão

Este capítulo consiste na apresentação dos resultados obtidos ao longo deste trabalho assim como da sua discussão. Sempre que possível estes resultados foram comparados com o descrito na literatura.

4.1. Síntese do conjugado CS-FA

A síntese do conjugado CS-FA realizou-se com base numa reação de amidação (Figura 19), seguindo a metodologia descrita por Lee *et al.* (97). A carbodiimida (EDC) tem como papel a ativação do grupo carboxilo do FA de forma a ocorrer a formação de uma ligação amida com a amina primária do CS, originando o conjugado CS-FA.

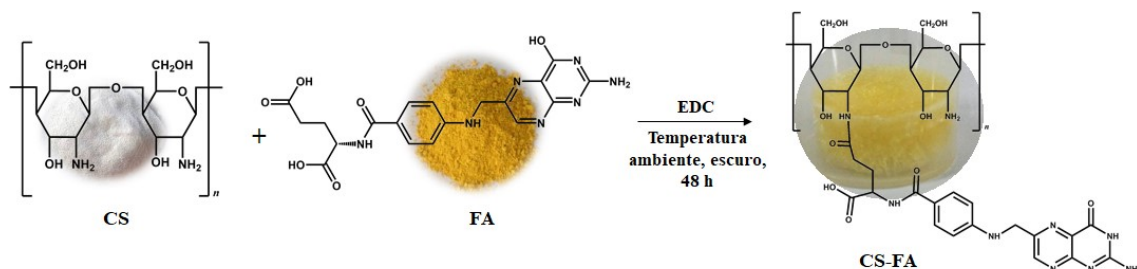


Figura 19 - Reação de funcionalização do CS com FA segundo o método descrito por Lee *et al.* (97).

Após a reação, a amostra do conjugado CS-FA foi sujeita a diálise de modo a remover o excesso de FA. De forma a perceber se o FA livre estava a ser removido eficientemente, obteve-se o espectro ótico das águas recolhidas nos diferentes dias de diálise. Os resultados obtidos foram comparados com o espectro, em solução, do FA que apresenta máximos de absorção a 217, 280 e 352 nm, encontrando-se de acordo com a literatura (100). Observando a Figura 20 verificou-se que as águas de lavagem não apresentaram máximos de absorção na gama do visível, surgindo apenas uma banda a 217 nm. Ao longo dos diferentes dias de diálise verificou-se que ocorreu uma diminuição na sua intensidade, sendo esta mais elevada no primeiro dia. A amostra do conjugado após diálise manteve a cor amarela, podendo ser indicativo de que ocorreu, com sucesso, a funcionalização do CS com FA.

O conjugado CS-FA foi posteriormente caracterizado por espectroscopia ótica de forma a confirmar a presença do FA (Figura 21). Obtiveram-se também os espectros, em solução, do CS e FA para comparação. O espectro ótico do CS não apresentou nenhum máximo de absorção, uma vez que este não apresenta coloração, estando de acordo com a literatura (101). Finalmente, o espectro ótico do conjugado CS-FA sintetizado apresentou

picos de absorção com máximos a 225, 290 e 360 nm, característicos do FA, pelo que se pode concluir que ocorreu funcionalização do CS com FA.

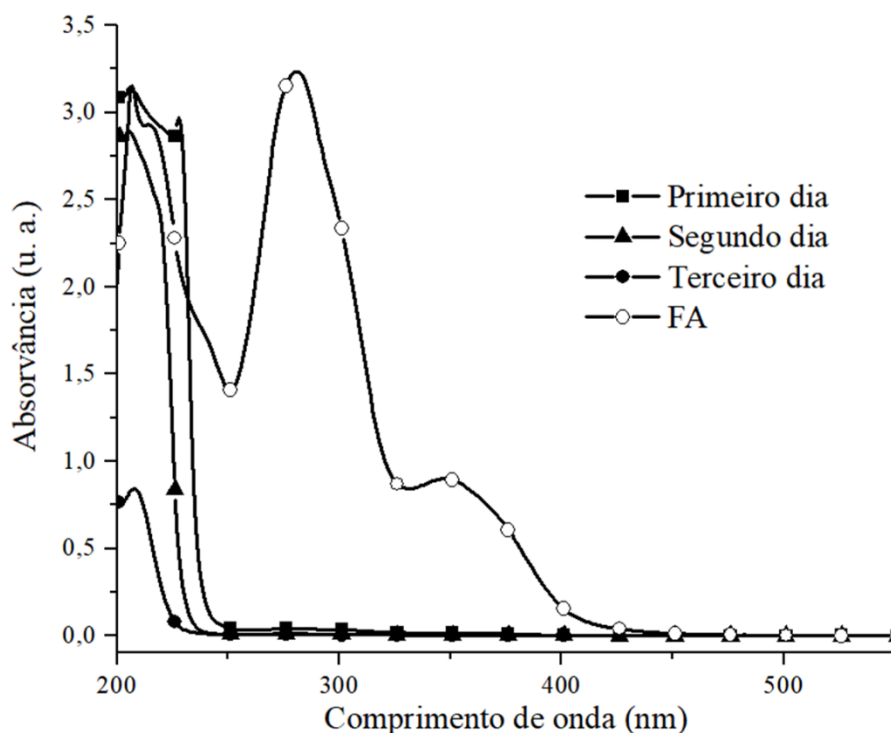


Figura 20 – Espectro óptico do FA (em DMSO) e das amostras de água recolhida nos três dias de diálise.

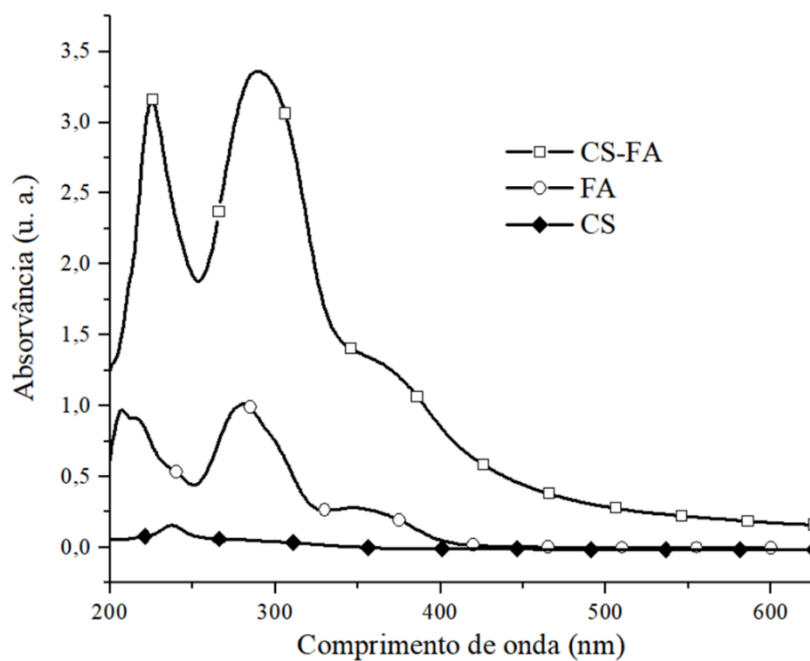


Figura 21 – Espectro óptico, em solução, do conjugado CS-FA (numa solução aquosa de ácido acético 1 M), do CS (numa solução aquosa de ácido acético 1 M) e do FA (em DMSO).

Contudo, a coloração do conjugado CS-FA e o seu espectro ótico não permitem concluir se ocorreu formação de uma ligação covalente entre o CS e o FA. Assim, o conjugado e os respectivos precursores foram também caracterizados por FTIR- ATR, encontrando-se os espectros na Figura 22. A banda observada a 3326 cm^{-1} , no espectro do CS, corresponde à vibração de alongação dos grupos OH e coincide com a vibração de alongação simétrica dos grupos NH_2 (41,102–104). A 2875 cm^{-1} surge a banda associada à vibração de alongação dos grupos CH, enquanto a banda a 1445 cm^{-1} corresponde à deformação angular do grupo CH_2 . Por fim, ainda foi possível identificar bandas a 1150 , 1065 e 1024 cm^{-1} que correspondem às vibrações de alongação e deformação do grupo C-O-C e a 890 cm^{-1} associada à vibração de flexão fora do plano do grupo CH do anel (41,102–104).

O espectro do FA apresenta bandas a 3414 , 3326 e 3095 cm^{-1} correspondentes à vibração de alongação do grupo OH do resíduo de ácido glutâmico e dos NH_2 do anel da pterina (41,104). A 1687 cm^{-1} surge a banda que está associada à vibração de alongação do grupo C=O do grupo carboxílico, enquanto a 1650 cm^{-1} surge a banda associada à vibração de alongação do grupo C=O do grupo amida. Foi também possível observar uma banda a 1630 cm^{-1} que é atribuída à vibração de alongação da ligação C=N. As bandas a 1602 , 1517 e 1485 cm^{-1} correspondem à vibração dos grupos C=C presentes nos anéis aromáticos da estrutura do FA (41,104).

Quanto ao espectro do conjugado CS-FA verificou-se a presença das bandas características tanto do CS como do FA, estando de acordo com o descrito na literatura (41,103,104). A banda que surge a 3290 cm^{-1} apresenta-se mais larga no espectro do conjugado que no do FA, uma vez que resulta da sobreposição das vibrações dos grupos OH e NH_2 . Por outro lado, a banda que surge a 1572 cm^{-1} no espectro do CS não é visível no espectro do conjugado, surgindo uma nova banda a 1633 cm^{-1} indicando a formação de uma ligação amida entre o CS e o FA (41,103,104). Desta forma, é possível concluir que a funcionalização do CS com o FA ocorreu com sucesso.

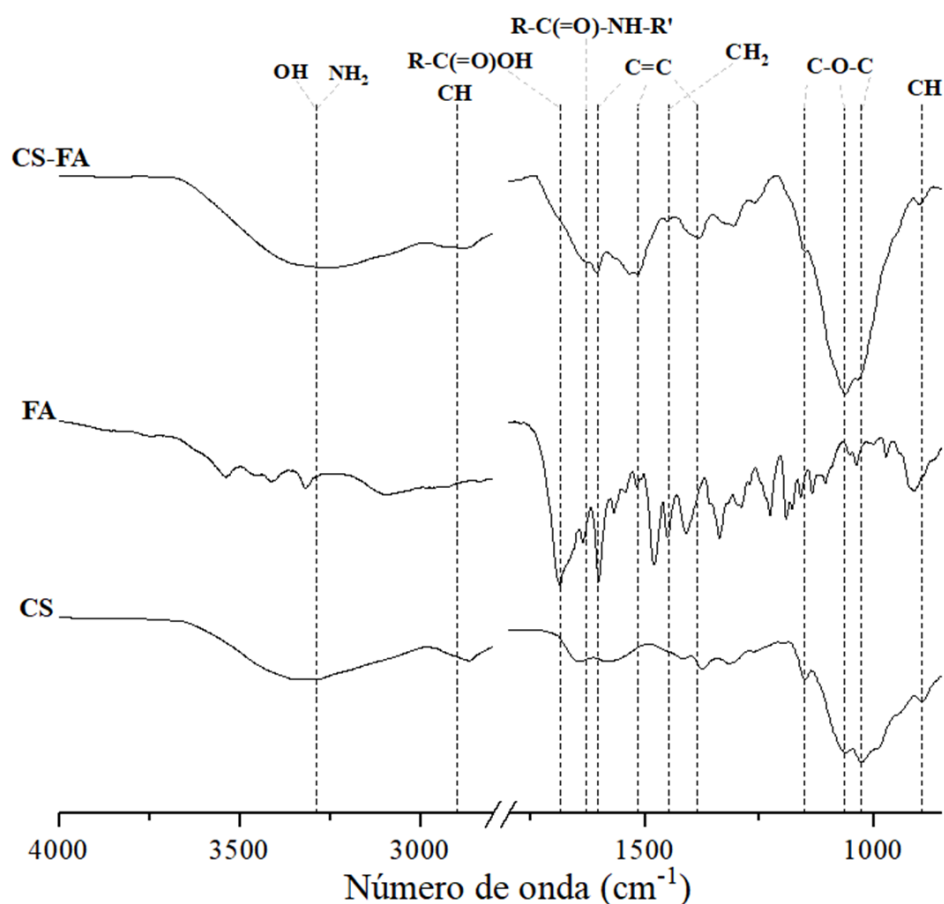


Figura 22 - Espectro de FTIR-ATR do CS, FA e do conjugado CS-FA.

4.2. Síntese do conjugado CS-FA-FITC

A síntese do conjugado CS-FA-FITC ocorreu de acordo com as metodologias descritas por Huang *et al.* (98) e Soliman *et al.* (105). Segundo estas abordagens, o grupo isotiocianato presente na estrutura do FITC reage espontaneamente com os grupos amina presentes na estrutura do CS, não sendo necessário a presença de agentes que promovam esta reação (106). Na Figura 23 encontra-se representada a reação de síntese deste conjugado.

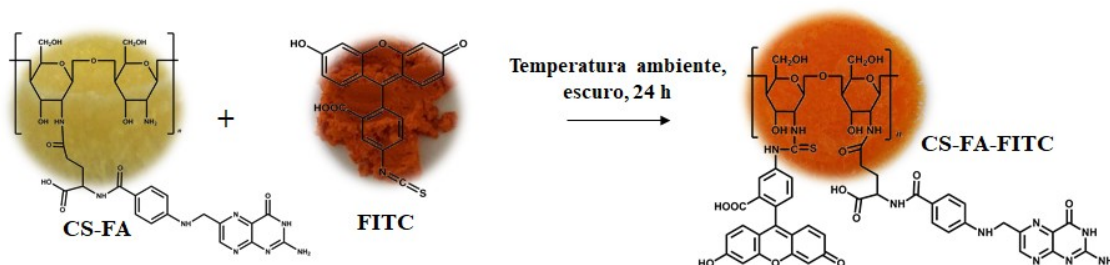


Figura 23 – Reação de funcionalização do conjugado CS-FA com o marcador fluorescente, FITC (98,105).

Como o FITC foi adicionado em excesso ao conjugado CS-FA recorreu-se, também, a uma etapa de diálise para remover o FITC que não reagiu. As águas de diálise foram recolhidas e analisadas por espectroscopia ótica ao longo de quatro dias para confirmar quando terminava a libertação do marcador fluorescente livre. Contudo, a aquisição dos espectros de absorção das águas de diálise foi efetuada na gama 300-600 nm porque, embora o FITC apresente máximos de absorção entre 200-300 nm estes sobrepõem-se aos máximos de absorção do FA, como se encontra representado na Figura 24, pelo que nesta zona a confirmação da presença de FITC que não reagiu na água recolhida seria mais duvidosa (100,107). Assim, as leituras foram efetuadas entre 300-600 nm, focando-se nas bandas de absorção observadas nesta gama.

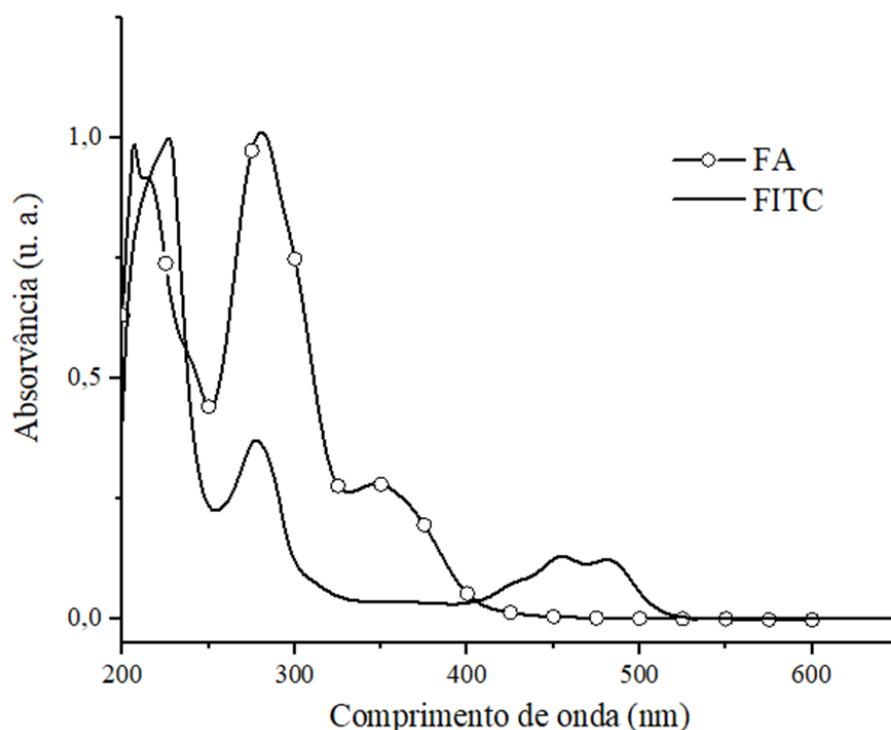


Figura 24 – Espectros óticos do FITC (em etanol) e FA (em DMSO).

Os espectros de absorção das águas de diálise obtidas durante quatro dias estão representados na Figura 25. Os espectros obtidos foram comparados com o espectro ótico, em solução, do FITC, que apresenta máximos de absorção a 455 e 485 nm, na gama escolhida, estando de acordo com a literatura (107). Para o primeiro dia de diálise verificou-se a presença das bandas características do marcador fluorescente, indicando a libertação de FITC livre. Ao longo dos restantes dias de diálise verificou-se que a intensidade de absorção relativa ao marcador fluorescente foi diminuindo até ao último dia onde praticamente já não se observa. No final da diálise o conjugado CS-FA-FITC

manteve a coloração laranja que apresentava no início, indicando que deverá ter ocorrido, com sucesso, funcionalização do CS-FA com o FITC.

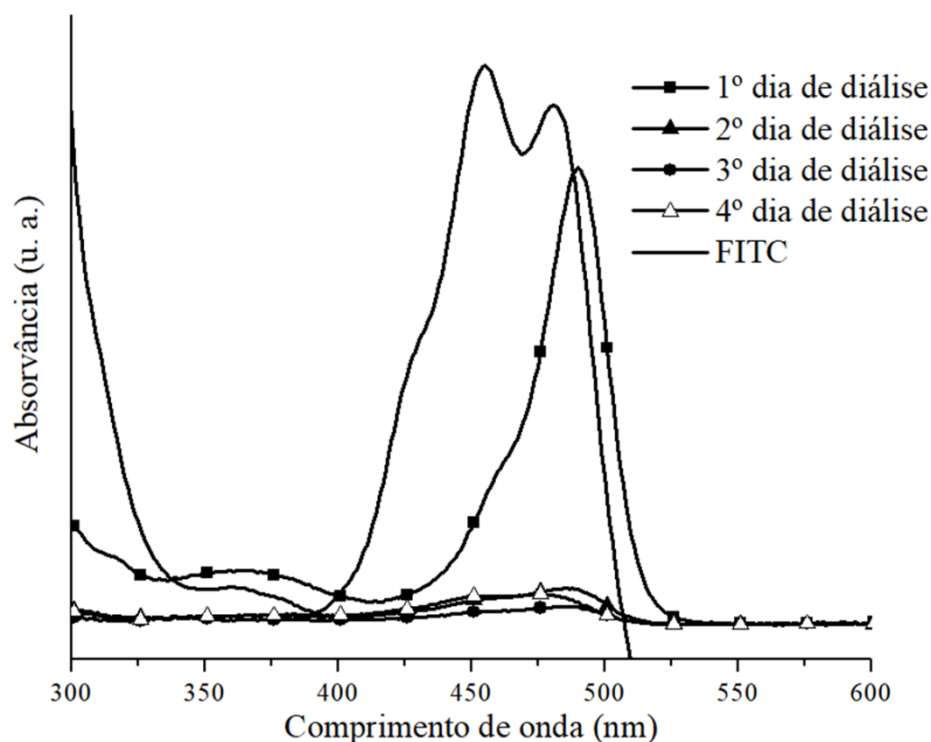


Figura 25 – Espectros óticos do FITC (em etanol) e das águas de diálise ao longo dos quatro dias.

O conjugado CS-FA-FITC foi também caracterizado por espectroscopia ótica para confirmação da presença do FITC (Figura 26). O espectro do FITC apresenta máximos de absorção a 226, 277, 455 e 485 nm, estando de acordo com a literatura (107). Como visto anteriormente, na gama entre 200 e 300 nm os máximos de absorção do FITC e do conjugado CS-FA sobrepõem-se, não se podendo concluir claramente acerca da presença do marcador fluorescente no conjugado final. No entanto, foi possível observar no espectro do conjugado obtido a presença de um máximo de absorção a 375 nm que é característico do conjugado CS-FA e a presença de máximos de absorção a 456 e 486 nm, característicos do FITC. A presença dos máximos de absorção típicos do CS-FA e FITC confirma, assim, a presença do marcador fluorescente no conjugado final.

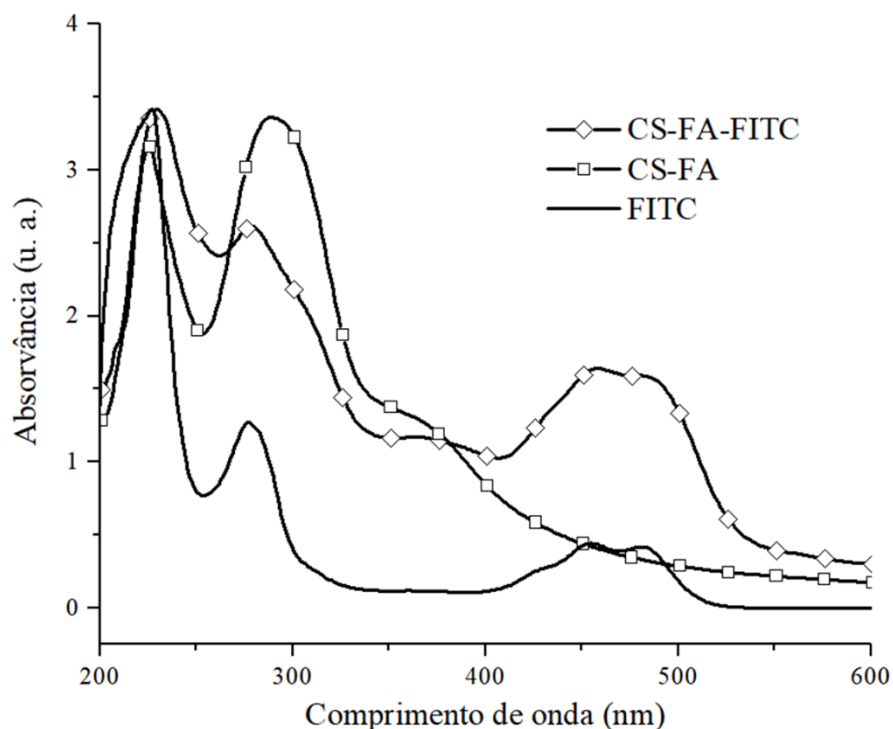


Figura 26 – Espectros óticos do conjugado CS-FA-FITC (numa solução aquosa de ácido acético 1 M), do FITC (em etanol) e CS-FA (numa solução aquosa de ácido acético 1 M).

Os marcadores fluorescentes, como o FITC, emitem radiação quando excitados a determinados comprimentos de onda (10). Assim, o conjugado CS-FA-FITC foi caracterizado por espectroscopia de fluorescência. O FITC e o conjugado CS-FA também foram caracterizados para comparação. Observando o espectro de fluorescência do FITC (Figura 27), detetou-se a presença de uma única banda de emissão a 558 nm quando este foi excitado a 495 nm. É de salientar que este valor se encontra desviado relativamente ao descrito por Dave *et al.* (107), nomeadamente a 518 nm. Contudo, este desvio pode ser explicado pelo facto de a leitura da emissão de fluorescência do FITC neste trabalho ter sido realizada no estado sólido, enquanto frequentemente na literatura os espectros de fluorescência referem-se a soluções. Como seria de esperar, no espectro de fluorescência do conjugado CS-FA não se observa nenhum máximo de emissão indicando que este não possui fluorescência. Quanto ao espectro do conjugado CS-FA-FITC observa-se um máximo de emissão a 558 nm. A emissão de radiação ao mesmo comprimento de onda que o FITC é também uma forte evidência de que a funcionalização deste conjugado com o marcador fluorescente ocorreu com sucesso.

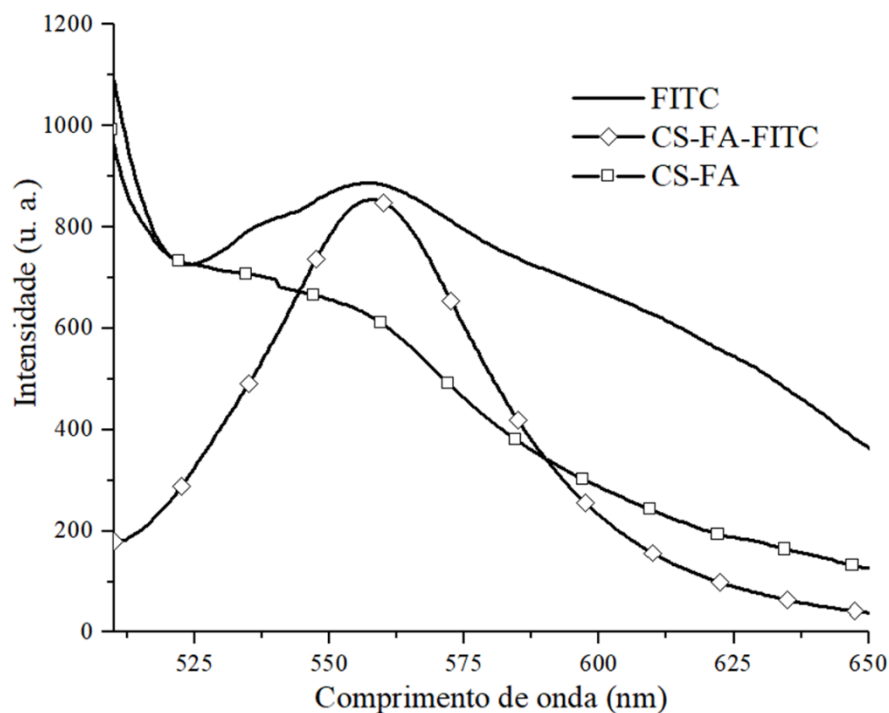


Figura 27 – Espectros de fluorescência (emissão) do conjugado CS-FA-FITC, do FITC e do conjugado CS-FA.

Contudo, é de salientar que também neste caso a presença dos máximos de absorção característicos do conjugado CS-FA e do FITC, nos espectros óticos, assim como a emissão de fluorescência não indica se ocorreu a formação de uma ligação covalente entre o CS-FA e o FITC. Assim, o conjugado CS-FA-FITC obtido foi também caracterizado por FTIR-ATR (Figura 28). Os espectros do FITC e do conjugado CS-FA também foram incluídos para comparação. O espectro do FITC apresenta uma banda pequena a 3635 cm^{-1} que corresponde à vibração de alongação dos grupos OH existentes na estrutura do marcador fluorescente (98,108). Também se observa uma banda mais acentuada a 2026 cm^{-1} que corresponde à vibração de alongação do grupo isotiocianato ($\text{N}=\text{C}=\text{S}$) e a 1638 cm^{-1} a banda associada à vibração de alongação do grupo carbonilo. As bandas que surgem a 1592 , 1535 e 1458 cm^{-1} estão associadas à alongação das ligações duplas dos anéis aromáticos e as bandas que surgem a 1204 , 1168 e 1081 cm^{-1} estão relacionadas com a vibração do grupo C-O-C (98,108). Observam-se ainda bandas a 1391 , 1312 e 905 cm^{-1} tipicamente atribuídas às vibrações dos grupos CH presentes na estrutura do marcador fluorescente.

No espectro do conjugado CS-FA-FITC identificaram-se bandas características tanto do conjugado CS-FA como do FITC (98,108). As bandas que surgem a 1562 e 1512 cm^{-1} apresentam-se ligeiramente desviadas relativamente às bandas correspondentes

no espectro do FITC, podendo indicar o sucesso da funcionalização do conjugado CS-FA com o marcador fluorescente. Foi ainda possível verificar o desaparecimento, no espectro do conjugado obtido, da banda que surge a 2026 cm^{-1} e o surgimento de uma banda a 1463 cm^{-1} associada à vibração do grupo -N-C=S (98,108). Esta banda indica que ocorreu a formação de uma ligação química entre o conjugado CS-FA e o FITC, revelando sucesso na síntese do conjugado CS-FA-FITC.

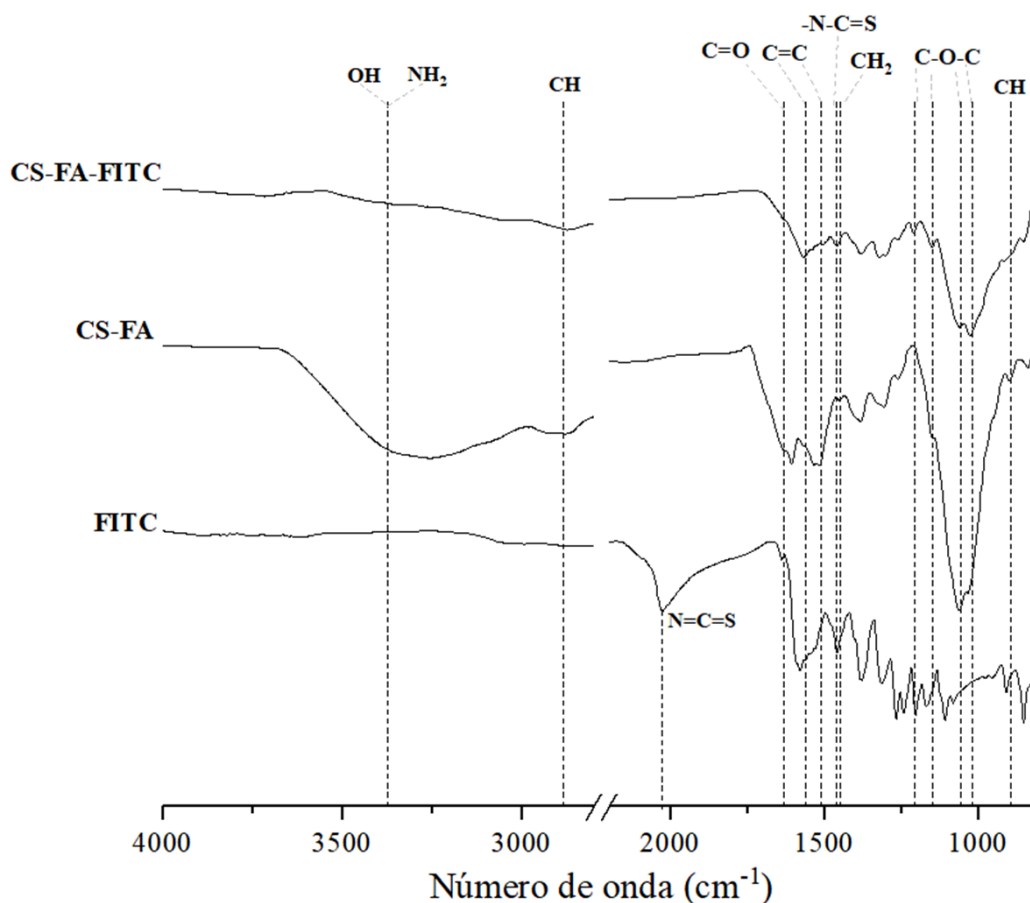


Figura 28 - Espectros de FTIR-ATR do FITC, do conjugado CS-FA e do CS-FA-FITC.

4.3. Funcionalização dos CNCs

Os CNCs utilizados neste trabalho para desenvolvimento do sistema nanoteranóstico foram caracterizados por STEM para determinar o seu tamanho e a sua morfologia. Através da análise da Figura 29 foi possível observar que os CNCs apresentam uma morfologia alongada, em bastonete, muito importante para a aplicação em questão, já que facilita a entrada dos sistemas nanoteranósticos nas células alvo (5,6,64). Além do referido foi também possível verificar que estes se encontram bem dispersos e de forma individualizada, indicando que o processo de isolamento destes nanomateriais foi bem-sucedido.

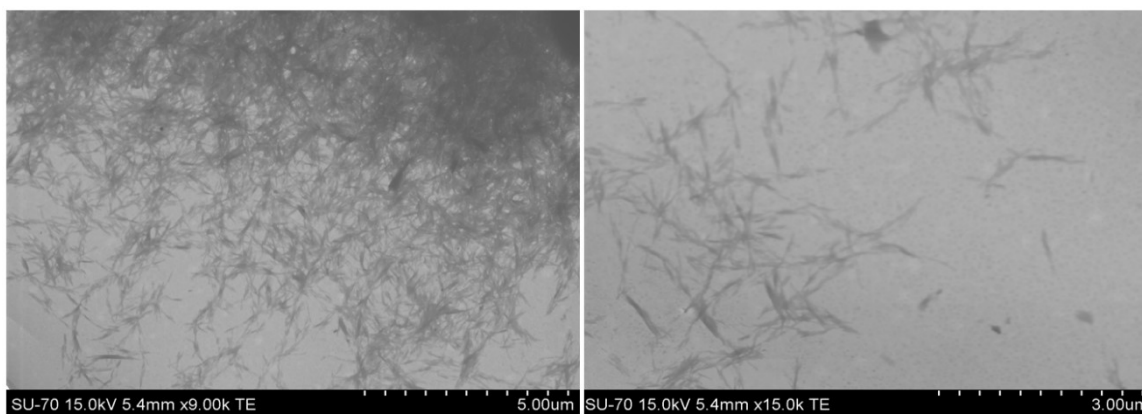


Figura 29 - Imagens de STEM dos CNCs.

Outra característica muito importante para a aplicação pretendida neste trabalho para os CNCs está relacionada com as suas dimensões nanométricas, principalmente a largura. De forma a perceber se os CNCs utilizados para a realização deste trabalho apresentam tamanho na escala nanométrica, as imagens de STEM foram analisadas. Na Figura 30 encontram-se representados os gráficos de distribuição das dimensões da largura e comprimento dos CNCs, tendo-se verificado que estes apresentaram cerca de 34 ± 10 nm de largura e 391 ± 60 nm de comprimento, apresentando dimensões de largura na escala nanométrica, conforme desejado. Assim, foi possível concluir que os CNCs reúnem todas as características desejáveis para a aplicação em questão como largura na escala nanométrica, estrutura alongada e dispersos numa suspensão homogénea.

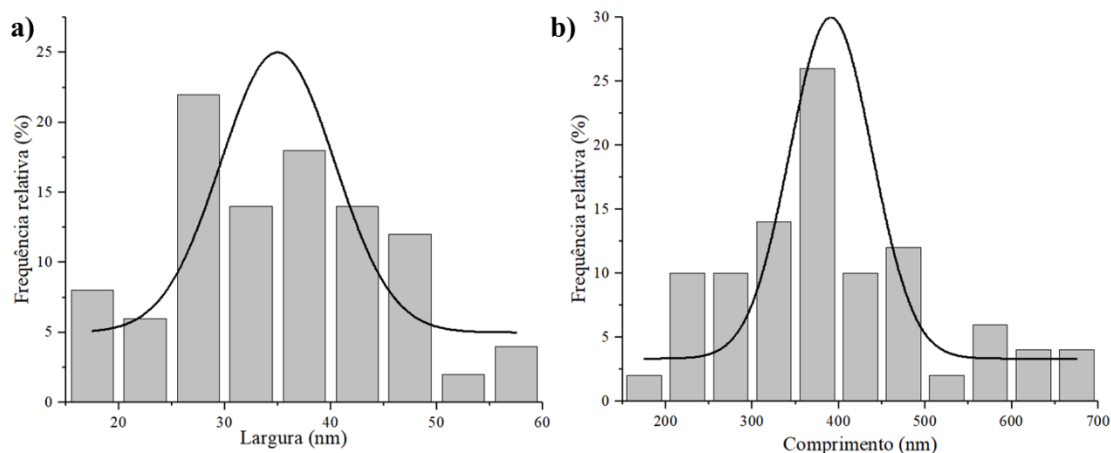


Figura 30 – Distribuição em frequência dos tamanhos dos CNCs: a) largura e b) comprimento.

Além das imagens de STEM, os CNCs foram também analisados por XRD, tendo-se obtido o padrão de difração que se encontra representado na Figura 31. Pela análise do padrão de difração obtido foi possível identificar os picos a $2\theta=14,9^\circ$, $16,4^\circ$, $22,8^\circ$ e $34,6^\circ$. O padrão de difração obtido é concordante com a literatura, pelo que os picos obtidos

correspondem aos planos cristalográficos $(1\bar{1}0)$, (110) , (200) e (040) , típicos da celulose $(109,110)$. O índice de cristalinidade dos CNCs foi calculado segundo a equação desenvolvida por Segal *et al.* (99), sendo de 59%. Este valor é bastante mais baixo que o descrito na literatura por Dong *et al.* (79), que apresentam um índice de cristalinidade de 89%, o que poderá ser explicado pela possibilidade de ainda existirem zonas amorfas nos CNCs utilizados (110).

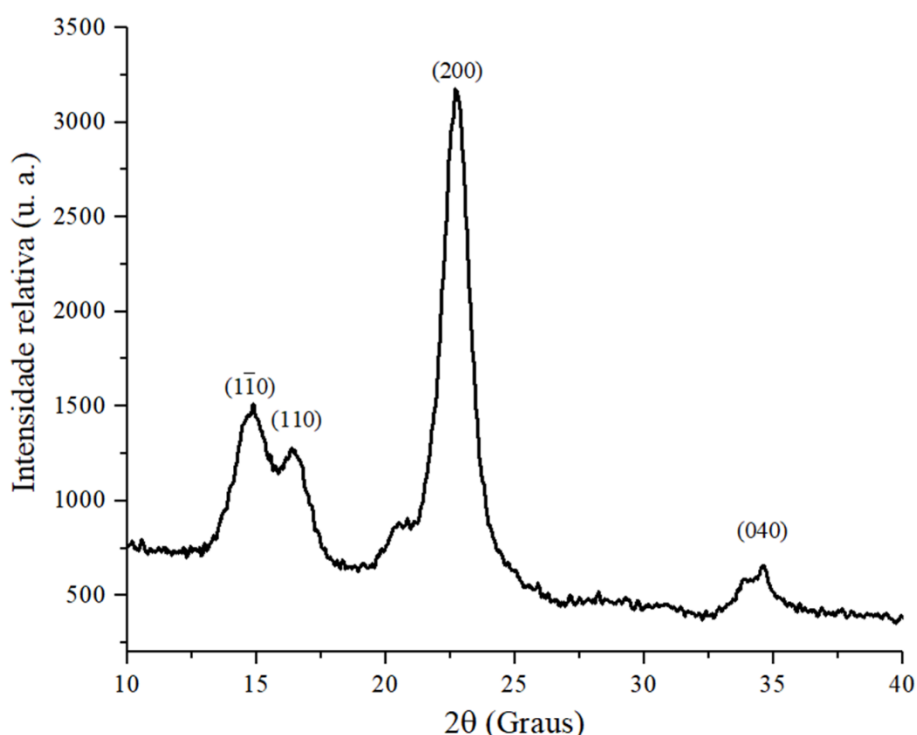


Figura 31 – Difratograma de XRD dos CNCs.

4.3.1. Síntese de CNC-CS-FA

Os CNCs foram funcionalizados com o conjugado CS-FA por adsorção, como se encontra representado na Figura 32. De forma a verificar a viabilidade deste processo, a carga de ambos os componentes foi medida por potencial Zeta. A carga obtida para os CNCs utilizados neste estudo, a pH 7, foi de $-11,5 \pm 0,7$ mV. O facto de estes apresentarem carga negativa está associado à presença de grupos sulfato ($-\text{OSO}_3^-$) na sua superfície, que são introduzidos durante o processo de hidrólise da celulose com ácido sulfúrico (111). Por outro lado, o conjugado CS-FA, a pH 3, apresentou um potencial Zeta de $+57,0 \pm 4,4$ mV. A carga positiva deste conjugado está associada à presença dos grupos $-\text{NH}_2$ do CS que estão protonados numa solução aquosa de ácido acético (97). Desta forma, foi confirmada a carga oposta de ambos os componentes e a viabilidade do processo.

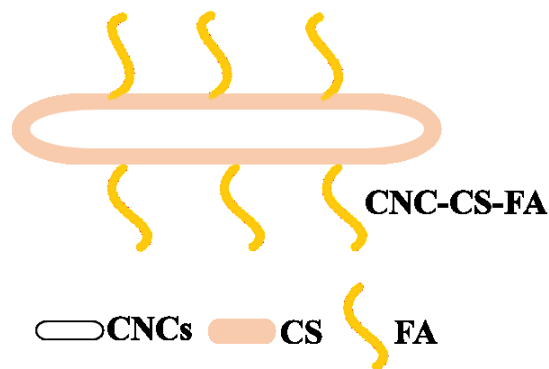


Figura 32 – Representação do material final, CNC-CS-FA, obtido por adsorção.

Uma vez que o conjugado CS-FA foi adicionado em excesso foi necessário lavar os CNCs funcionalizados diversas vezes (quatro centrifugações) de forma a remover os conjugados CS-FA que não se ligaram aos CNCs. Após cada lavagem o sobrenadante foi recolhido, tendo-se adquirido os espectros óticos (Figura 33), de forma a verificar a eficiência das lavagens. Na primeira água de lavagem foi possível verificar a presença de CS-FA, uma vez que se verificou a presença dos máximos de absorção característicos deste conjugado. A partir da segunda lavagem verificou-se uma diminuição na intensidade das bandas de absorção deste conjugado, deixando de serem praticamente visíveis nas águas da quarta lavagem. No final deste processo observou-se também que a coloração amarela, característica dos CNCs funcionalizados, se manteve, podendo este facto ser indicativo de que a funcionalização ocorreu com sucesso.

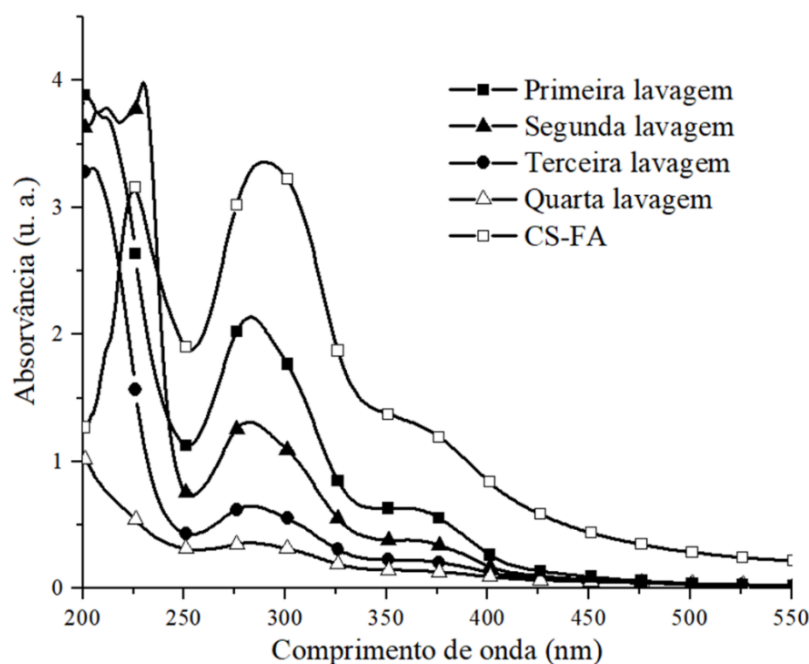


Figura 33 – Espectros óticos do conjugado CS-FA (numa solução aquosa de ácido acético a 1 M) e dos sobrenadantes, após cada lavagem dos CNCs funcionalizados.

Uma vez que o material obtido apresentava coloração amarela, este foi caracterizado por espectroscopia ótica, no estado sólido, com intuito de confirmar a presença do conjugado CS-FA. Esta caracterização foi realizada em estado sólido, pois os CNCs funcionalizados não são solúveis em nenhuma solução, formando apenas soluções coloidais. Os espectros óticos dos CNCs funcionalizados e dos seus precursores estão representados na Figura 34. No espectro dos CNCs não se observou a presença de nenhum máximo de absorção, uma vez que se trata de um composto de coloração branca que reflete toda a radiação incidente (82). O conjugado CS-FA apresentou máximos de absorção a 298, 337 e 390 nm. Estes máximos encontram-se desviados relativamente aos valores anteriormente descritos para este conjugado, uma vez que esta caracterização foi realizada no estado sólido, não se podendo efetuar comparações. Tendo isto em conta, verificou-se que o CNC-CS-FA, apresentam máximos de absorção a 298, 333 e 389 nm, todos característicos do conjugado CS-FA. Assim, pôde-se concluir que ocorreu funcionalização dos CNCs com o conjugado CS-FA.

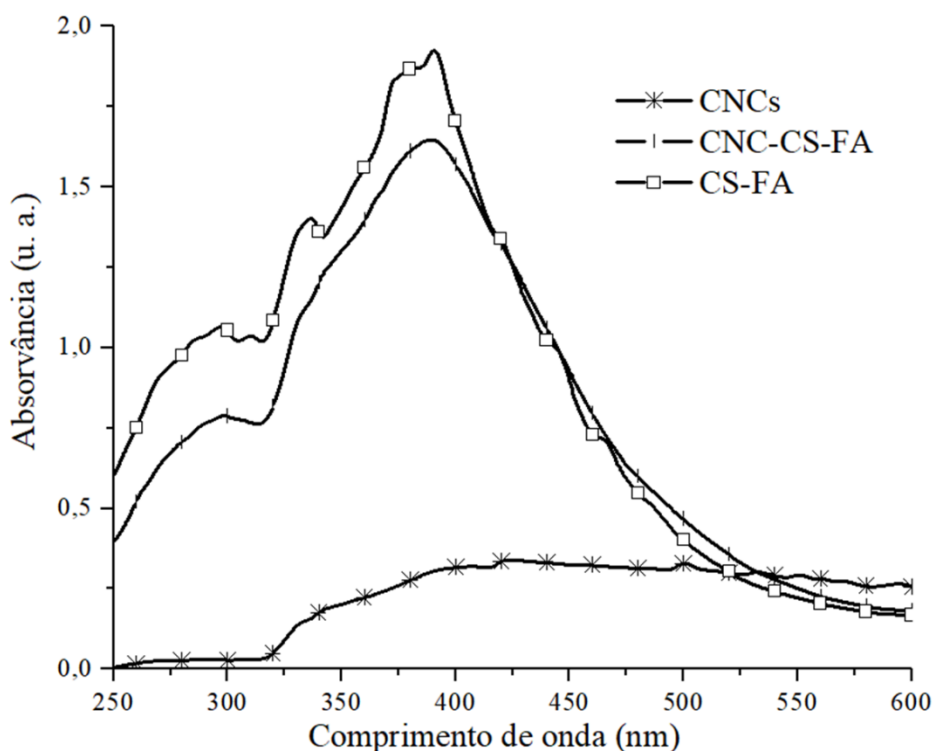


Figura 34 – Espectros óticos, no estado sólido, dos CNCs, CS-FA e CNC-CS-FA.

Os CNCs funcionalizados foram também caracterizados por FITR-ATR para confirmar a adsorção do conjugado CS-FA nos CNCs, encontrando-se os espectros do CNC-CS-FA e respetivos precursores representados na Figura 35. O espectro obtido para os CNCs apresentou bandas a 3778, 3665 e 3312 cm^{-1} características da elongação dos

grupos OH (112,113). As bandas que surgem a 2875 cm^{-1} correspondem à vibração de alongação dos grupos CH presentes no anel, enquanto a banda que surge a 1431 cm^{-1} corresponde à deformação angular do grupo CH_2 . A 1108 e 1053 cm^{-1} aparecem bandas associadas à vibração de alongação e deformação dos grupos C-O-C dos anéis de piranose (112,113). A banda a 1163 cm^{-1} é atribuída à vibração de alongação dos grupos sulfato ($-\text{OSO}_3^-$) e a 897 cm^{-1} corresponde à flexão fora do plano dos grupos CH do anel.

No espectro do CNC-CS-FA observou-se a presença das bandas características tanto dos CNCs como do conjugado CS-FA. A banda característica da vibração do grupo carbonilo da ligação amida formada entre o CS e o FA encontra-se ligeiramente desviada relativamente à banda correspondente no conjugado CS-FA, podendo dever-se à funcionalização dos CNCs com este conjugado. A 1539 cm^{-1} surge uma banda característica da vibração dos grupos $\text{C}=\text{C}$ dos anéis do FA, apresentando também um desvio relativamente à banda do conjugado. A presença, no espectro dos CNCs funcionalizados, das bandas características dos CNCs e do conjugado CS-FA é também indicativa de que ocorreu, com sucesso, esta funcionalização.

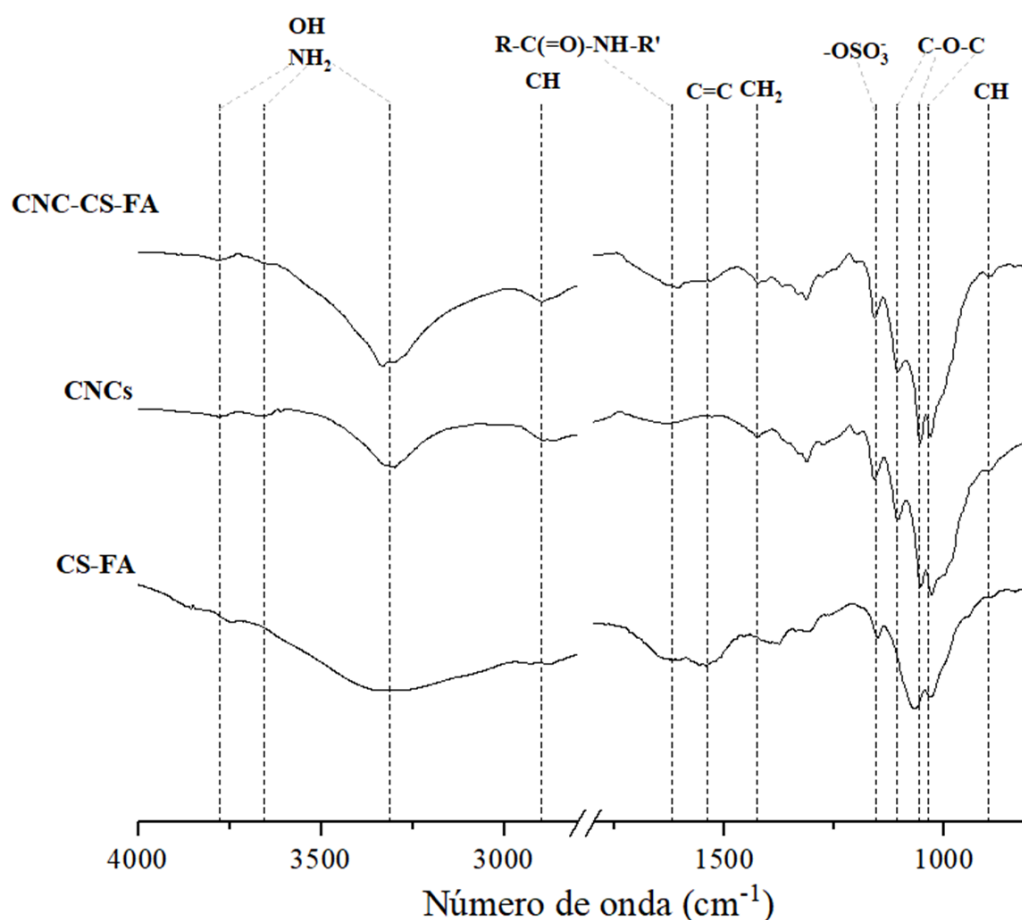


Figura 35 - Espectro de FTIR-ATR dos CNC-CS-FA, dos CNCs e do conjugado CS-FA.

Os CNCs funcionalizados com o conjugado CS-FA foram também caracterizados por STEM, de forma a perceber se a funcionalização provocou alguma alteração na sua estrutura/morfologia. Os CNCs apresentam uma morfologia alongada e tamanho nanométrico, características essenciais a reter na “construção” do sistema nanoteranóstico, tendo em conta a aplicação que se pretende dar (5,6,64). Observando as imagens obtidas (Figura 36), verificou-se que os CNCs funcionalizados mantiveram a sua morfologia alongada. No entanto, comparando com os CNCs não funcionalizados estes apresentam-se mais largos.

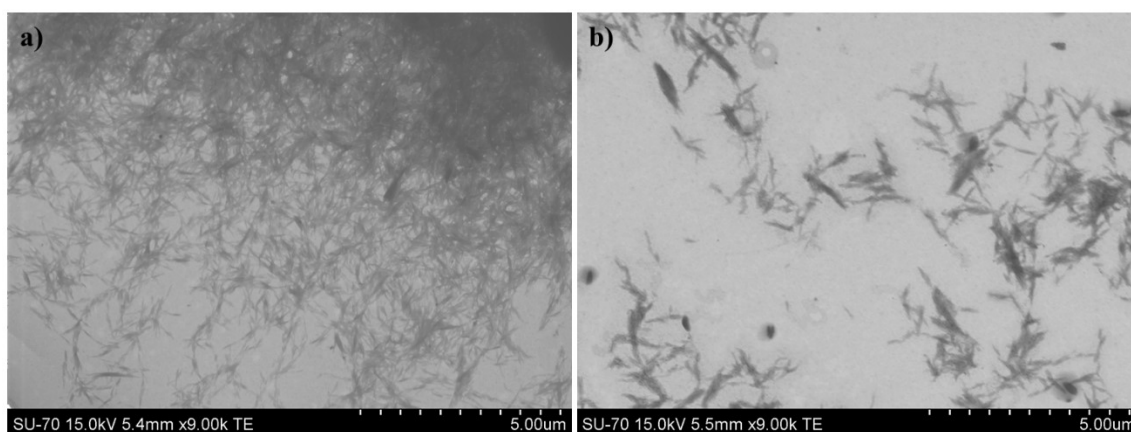


Figura 36 - Imagens de STEM dos CNCs: a) não funcionalizados e b) funcionalizados com o conjugado CS-FA.

As imagens dos CNCs funcionalizados foram analisadas de forma a determinar a sua largura e comprimento. Os resultados (Figura 37) obtidos mostraram que estes apresentam em média, 59 ± 16 nm de largura, praticamente duas vezes superior aos não funcionalizados. Contudo, não se observaram alterações significativas no comprimento, já que estes apresentam, em média, 381 ± 89 nm. É de salientar que o aumento da largura dos CNCs funcionalizados não provocou perda das dimensões nanométricas.

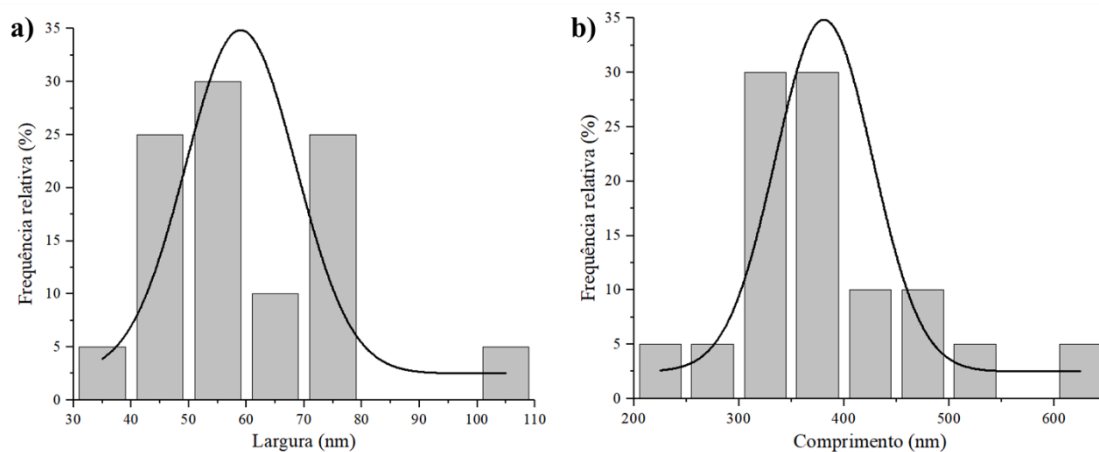


Figura 37 – Distribuição em frequência dos tamanhos do CNC-CS-FA: a) largura e b) comprimento.

A manutenção da morfologia é muito importante, pois é uma característica que desempenha um papel fundamental na entrada dos CNCs no interior das células alvo (5,6,64). Além da morfologia, a manutenção da largura com dimensões na escala nanométrica é também muito importante pois permite a formação de uma solução coloidal. Na Tabela 1 encontra-se o resumo das dimensões de largura e comprimento dos CNCs funcionalizados, assim como dos CNCs não funcionalizados.

Tabela 1 – Dimensões de largura e comprimento dos CNCs e dos CNCs funcionalizados.

Dimensões	CNCs	CNC-CS-FA
Largura (nm)	34 ± 10	59 ± 16
Comprimento (nm)	391 ± 60	381 ± 89

4.3.2. Síntese de CNC-CS-FA-FITC

Os CNCs foram também funcionalizados com o conjugado CS-FA-FITC, como se encontra representado na Figura 38. Tal como no ponto anterior (4.3.1) a funcionalização dos CNCs ocorreu por adsorção já que os conjugados também apresentaram carga oposta. O conjugado CS-FA-FITC, a pH 3, apresentou um potencial Zeta de +51,9 ± 3,6 mV. A carga positiva deste conjugado deve-se também à protonação dos grupos -NH₂ na solução aquosa de ácido acético (97).

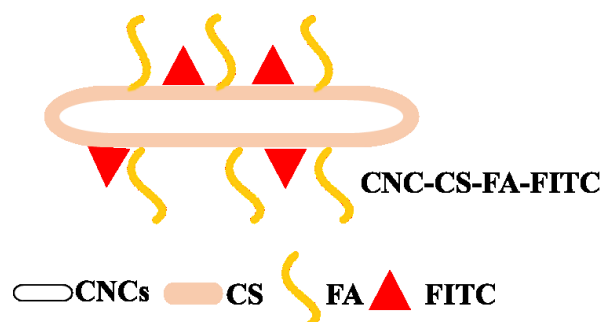


Figura 38 – Representação do material final, CNC-CS-FA-FITC, obtido por adsorção.

Uma vez que o conjugado CS-FA-FITC foi adicionado em excesso, o material obtido foi lavado (quatro centrifugações) de forma a remover o CS-FA-FITC que não adsorveu na superfície dos CNCs. Na primeira lavagem (Figura 39) verificou-se a presença de conjugado livre, pela observação dos máximos de absorção característicos deste. Ao longo das lavagens seguintes a intensidade destes máximos de absorção foi diminuindo, indicando que o conjugado CS-FA-FITC foi removido eficientemente. No

final das lavagens verificou-se a manutenção da coloração característica do conjugado, podendo ser indicativo de que a funcionalização ocorreu com sucesso.

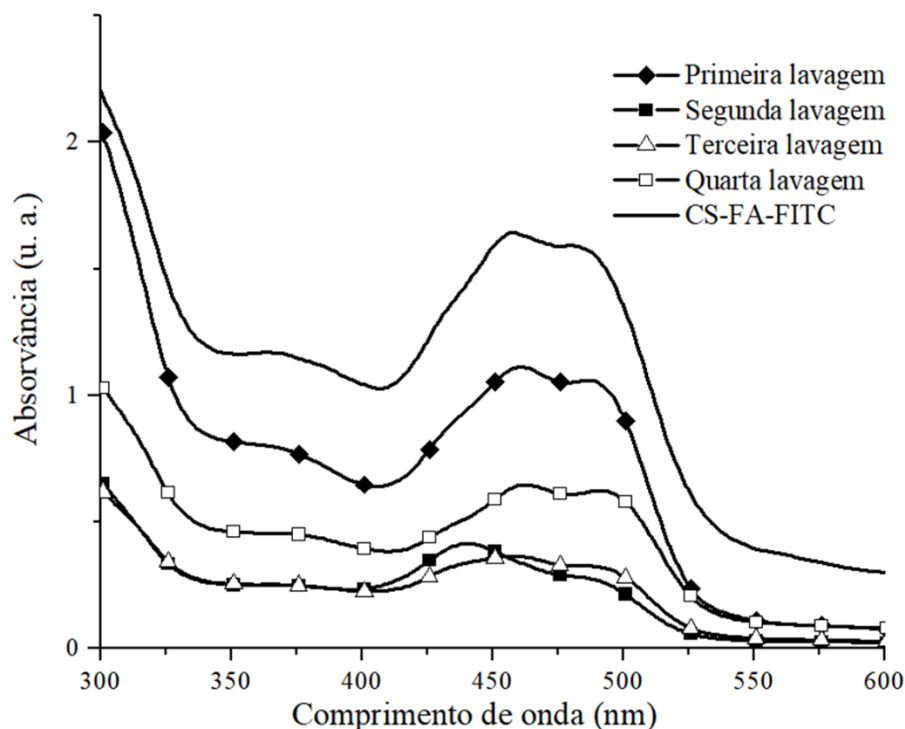


Figura 39 - Espectros óticos do conjugado CS-FA-FITC (numa solução aquosa de ácido acético a 1 M) e dos sobrenadantes, após cada lavagem.

Como o material obtido apresentava coloração característica do CS-FA-FITC este foi caracterizado por espectroscopia ótica, no estado sólido, por forma a confirmar a presença do conjugado nos CNCs. Os espectros do CNC-CS-FA-FITC e respetivos precursores encontram-se representados na Figura 40. O espectro do FITC apresentou máximos de absorção a 266, 294, 334, 396 e 506 nm, enquanto o espectro do CS-FA-FITC apresentou máximos a 266, 294, 334 nm e um máximo de absorção largo a 486 nm, também diferentes dos obtidos para o mesmo conjugado em solução. O espectro do CNC-CS-FA-FITC apresentou máximos de absorção a 280, 290, 378, 465 e 493 nm, característicos do conjugado CS-FA-FITC. A presença destes máximos de absorção no conjugado final é indicativo de que ocorreu a funcionalização dos CNCs com o conjugado em questão.

O CNC-CS-FA-FITC foi também caracterizado por espectroscopia de fluorescência com o objetivo de comprovar a presença do CS-FA-FITC nos CNCs. Os espectros de fluorescência do CNC-CS-FA-FITC e FITC encontram-se representados na Figura 41, sendo possível observar que os CNCs funcionalizados emitem radiação a 524 nm quando

excitados a um comprimento de onda de 495 nm. Neste caso, o máximo de emissão de fluorescência surge a um comprimento de onda mais baixo que o do FITC (558 nm), podendo ser indicativo que realmente ocorreu funcionalização dos CNCs com o conjugado CS-FA-FITC.

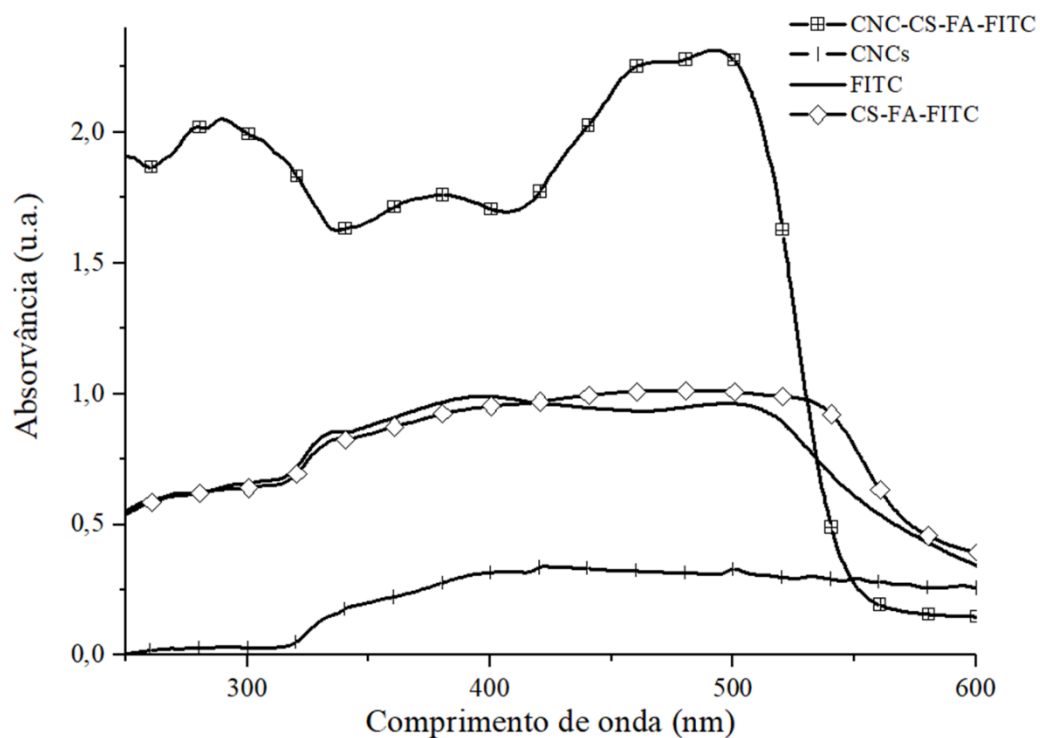


Figura 40 – Espectros óticos, no estado sólido, dos CNCs, FITC, CS-FA-FITC e CNC-CS-FA-FITC.

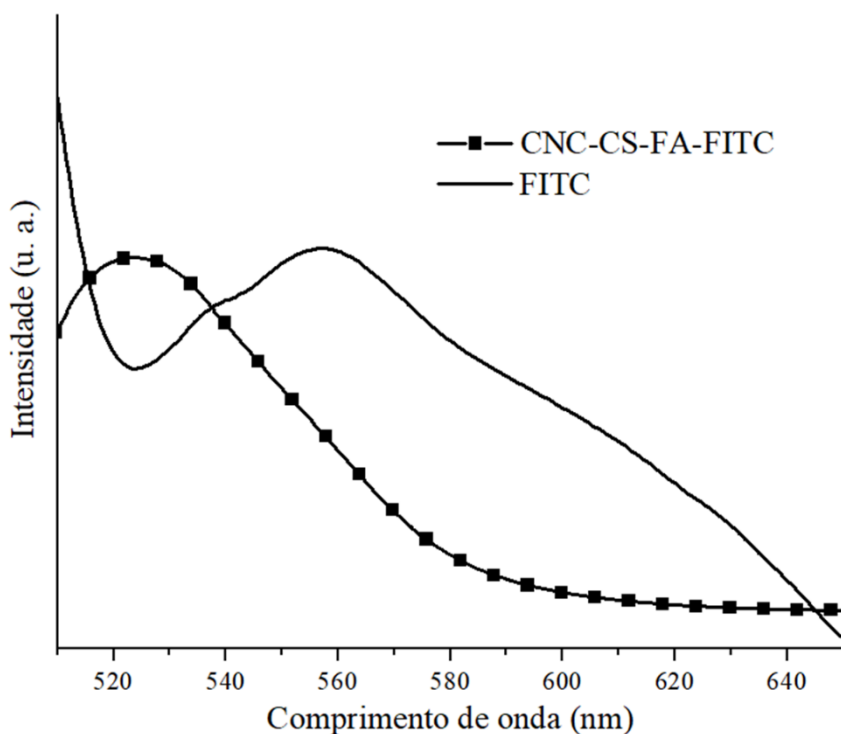


Figura 41 – Espectro de emissão do CNC-CS-FA-FITC e do FITC.

Os CNCs funcionalizados foram também caracterizados por FITR-ATR para confirmar a adsorção do conjugado CS-FA-FITC nos CNCs, encontrando-se os espectros dos CNCs funcionalizados e respectivos precursores representados na Figura 42. No espectro do CNC-CS-FA-FITC observou-se a presença das bandas características tanto dos CNCs como do conjugado CS-FA-FITC. A banda característica da formação do grupo $-N-C=S$ entre o CS-FA e o FITC encontra-se com um ligeiro desvio (1450 cm^{-1}) relativamente à mesma banda no espectro do conjugado CS-FA-FITC, que surge a 1463 cm^{-1} , o que poderá ser explicado pela funcionalização dos CNCs com este conjugado. Desta forma, pode-se concluir que a funcionalização dos CNCs com o conjugado em questão foi bem-sucedida.

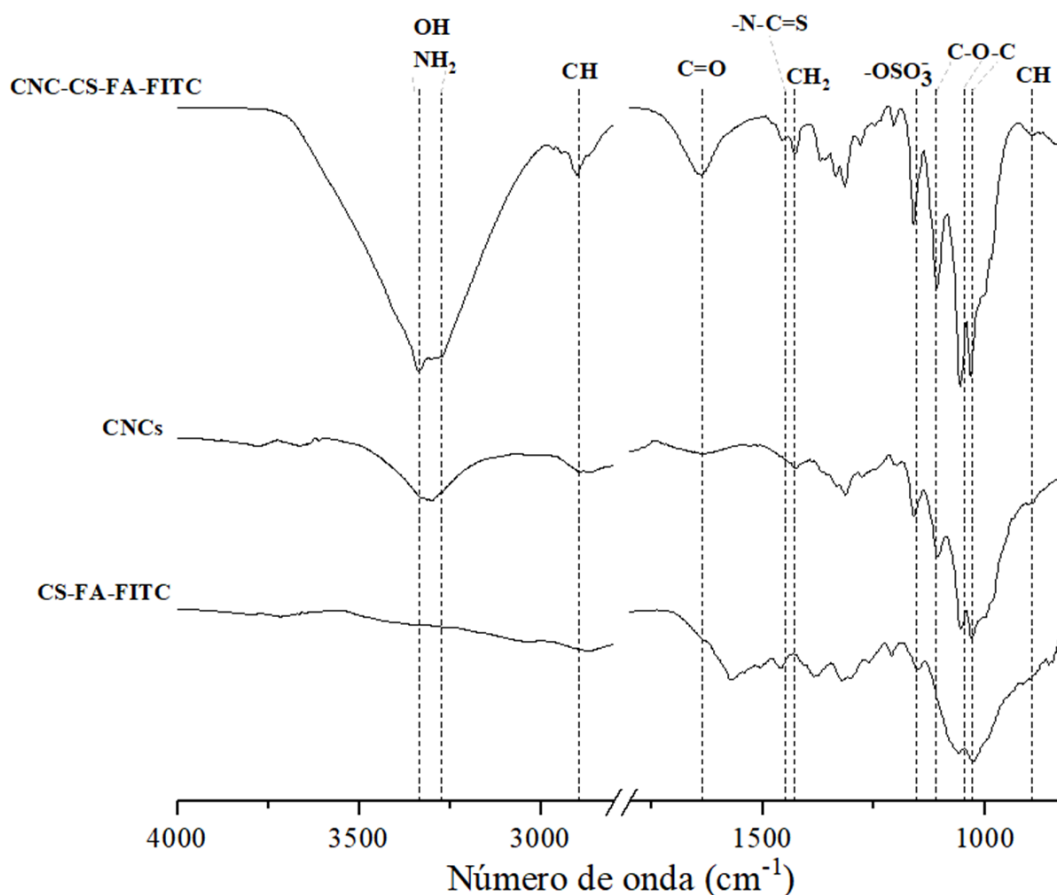


Figura 42 – Espectro de FTIR-ATR dos CNC-CS-FA-FITC, dos CNCs e do conjugado CS-FA-FITC.

Os CNCs funcionalizados obtidos foram também caracterizados por STEM, de forma a perceber igualmente se a funcionalização dos CNCs provocava alguma alteração na sua estrutura/morfologia. Pela análise das imagens obtidas (Figura 43) verificou-se que a funcionalização dos CNCs com o conjugado em questão não alterou a sua morfologia alongada. Ao contrário do CNC-CS-FA, o material obtido não é mais largo que os CNCs não funcionalizados. Uma possível explicação para o sucedido pode estar associada ao facto do conjugado CS-FA-FITC ter um menor número de grupos -NH₂ disponíveis para que ocorra a adsorção deste conjugado na superfície dos CNCs.

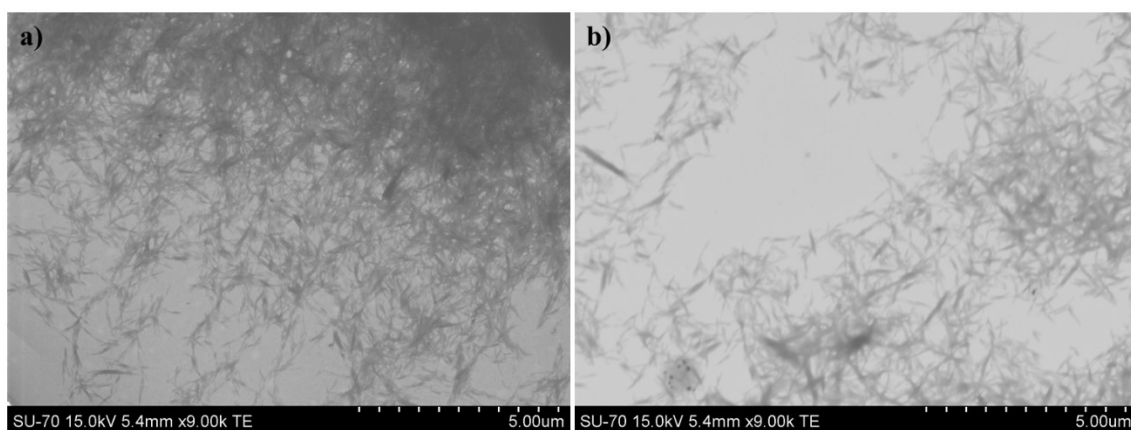


Figura 43 – Imagens de STEM dos CNCs: a) não funcionalizados e b) funcionalizados com o conjugado CS-FA-FITC.

Mais uma vez as imagens dos CNCs funcionalizados foram analisadas de forma a determinar o seu comprimento e largura. Os resultados obtidos (Figura 44) mostraram que os CNCs funcionalizados têm, em média, 39 ± 9 nm de largura. A funcionalização dos CNCs com o conjugado em questão não provocou grandes alterações no comprimento dos CNCs funcionalizados, já que estes apresentam, em média, 350 ± 112 nm de comprimento. Assim, foi possível concluir que a funcionalização dos CNCs não provocou grandes modificações nas dimensões nem na morfologia destes. A Tabela 2 resume as dimensões de largura e comprimento obtidas tanto para os CNCs funcionalizados como os não funcionalizados.

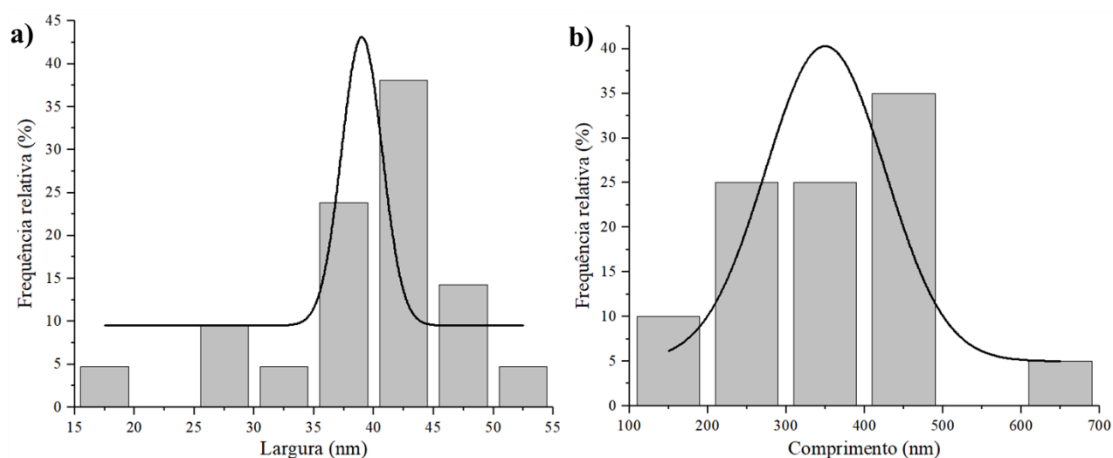


Figura 44 - Distribuição em frequência: a) largura e b) comprimento dos CNCs funcionalizados.

Tabela 2 – Dimensões de largura e comprimento dos CNCs e dos CNCs funcionalizados.

Dimensões	CNCs	CNC-CS-FA-FITC
Largura (nm)	34 ± 10	39 ± 9
Comprimento (nm)	391 ± 60	350 ± 112

4.4. Síntese *in situ* de AuNPs-CNC-CS-FA e AuNPs-CNC-CS-FA-FITC

O revestimento do CNC-CS-FA com as AuNPs teve por base a síntese *in situ* destas NPs. Este procedimento baseia-se na formação das AuNPs na presença dos CNCs funcionalizados, resultando no nanossistema representado na Figura 45.

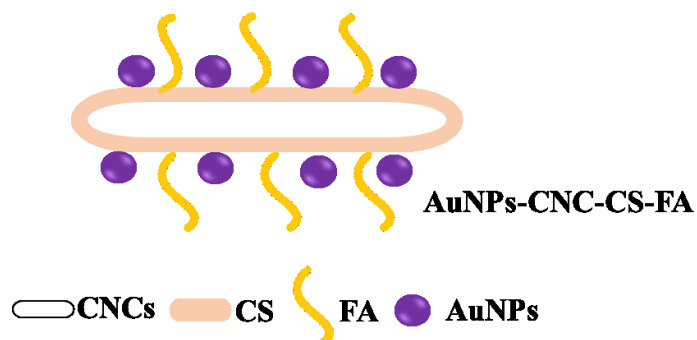


Figura 45 – Representação do nanossistema final, AuNPs-CNC-CS-FA, obtido pela síntese *in situ* das AuNPs.

No final da reação verificou-se que se formava uma suspensão avermelhada (Figura 46), indicando que as AuNPs formadas se encontram dispersas na superfície dos CNCs funcionalizados (11,85,86). O nanossistema foi lavado várias vezes, por centrifugação, de modo a remover as AuNPs que não se encontravam ligadas aos CNCs funcionalizados. Ao longo das lavagens verificou-se que a coloração avermelhada se manteve, sendo uma forte evidência que o seu revestimento com as AuNPs ocorreu com sucesso.



Figura 46 - Imagem da suspensão do nanossistema AuNPs-CNC-CS-FA obtido.

Os nanossistemas obtidos foram caracterizados por STEM para confirmar a presença das AuNPs na superfície dos CNCs funcionalizados e a manutenção da morfologia do

material final, estando as imagens representadas na Figura 47. Após análise das imagens obtidas constatou-se que as AuNPs se encontravam maioritariamente adsorvidas na superfície dos CNCs, tendo a síntese *in situ* destas ocorrido com sucesso. Verificou-se ainda que os CNCs mantinham a sua morfologia alongada como era pretendido.

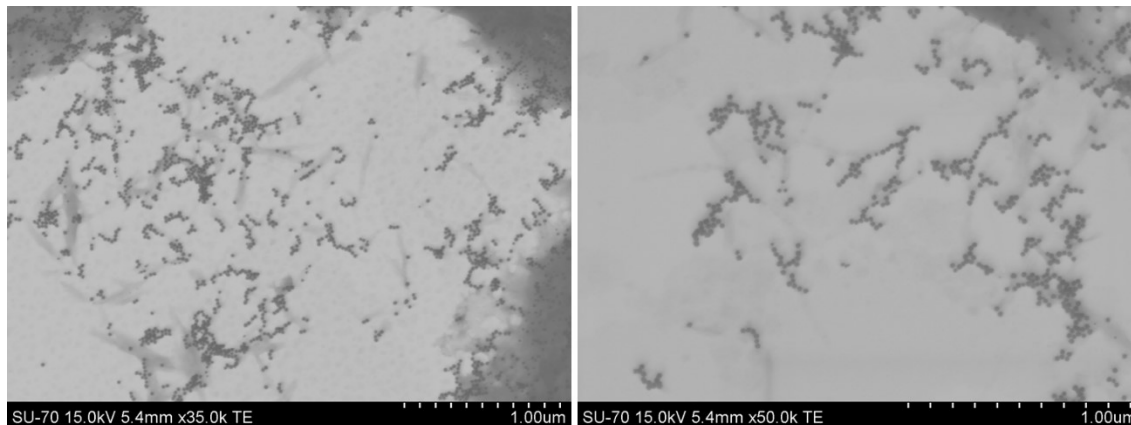


Figura 47 – Imagens de STEM do nanossistema AuNPs-CNC-CS-FA.

O diâmetro das AuNPs presentes na superfície dos CNCs (Figura 48) foi medido, verificando-se que estas apresentam 27 ± 5 nm de diâmetro. As AuNPs apresentaram um diâmetro na escala nanométrica indicando que estas não perderam a capacidade de serem aplicadas em termoterapia. Os CNC-CS-FA revestidos com as AuNPs apresentaram 68 ± 13 nm de largura e 309 ± 124 nm de comprimento (Figura 49).

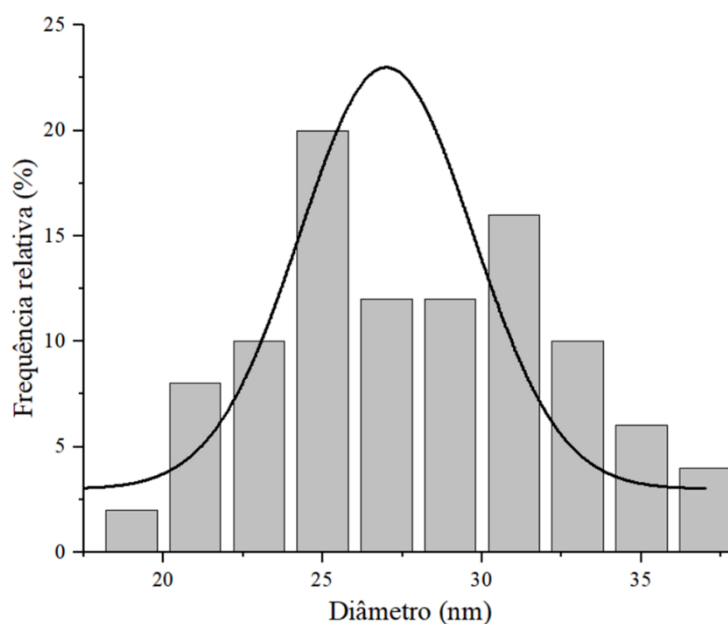


Figura 48 – Distribuição em frequência do diâmetro das AuNPs formadas na superfície dos CNCs.

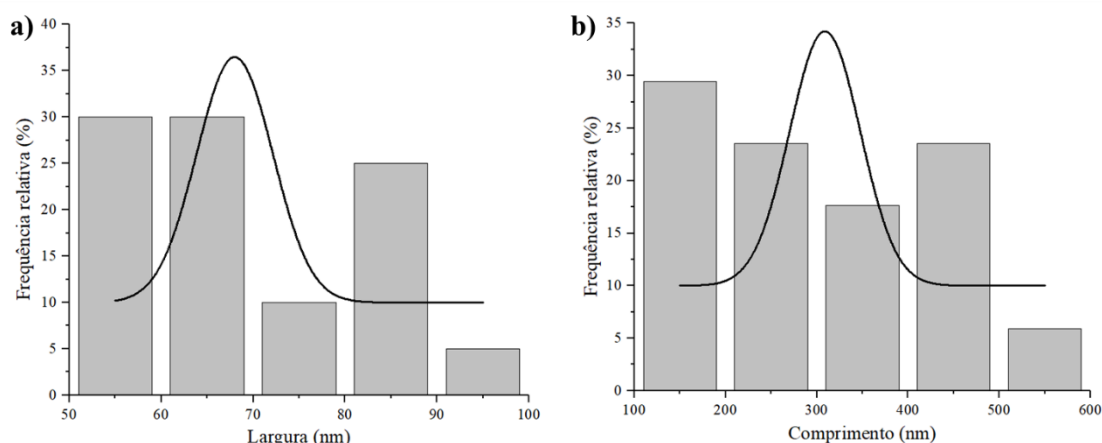


Figura 49 – Distribuição em frequência: a) largura e b) comprimento do material AuNPs-CNC-CS-FA.

Comparando os valores obtidos com os do CNC-CS-FA verificou-se que a largura aumentou, apesar de ligeiramente, o que pode ser explicado pela adsorção das AuNPs à superfície dos CNCs funcionalizados. Apesar de ter ocorrido um aumento na largura do material final este mantém as dimensões na escala nanométrica que, como visto anteriormente é essencial para a aplicação em questão. Quanto ao comprimento, verificou-se que ocorreu uma diminuição relativamente ao comprimento do CNC-CS-FA (381 ± 89 nm). A Tabela 3 representa a dimensões obtidas para o nanossistema desenvolvido e respetivo precursor.

Tabela 3 – Dimensões de largura e comprimento dos CNCs funcionalizados e respetivos CNCs com AuNPs adsorvidas.

Dimensões	CNC-CS-FA	AuNPs-CNC-CS-FA
Largura (nm)	59 ± 16	68 ± 13
Comprimento (nm)	381 ± 89	309 ± 124

Os nanossistemas obtidos foram ainda caracterizados por XRD, tendo-se obtido os seus padrões de difração de forma a confirmar a cristalinidade das AuNPs sintetizadas. O seu padrão de difração encontra-se representado na Figura 50, sendo possível verificar a presença de picos a $2\theta=14,80^\circ$, $16,41^\circ$, $22,80^\circ$, $34,5^\circ$, $38,28^\circ$, $44,43^\circ$, $64,84^\circ$ e $73,77^\circ$. Os primeiros quatro picos observados correspondem aos planos cristalográficos $(1\bar{1}0)$, (110) , (200) e (040) dos CNCs estando, assim, de acordo com o descrito na literatura (109,110). Os picos observados a $2\theta=38,28^\circ$, $44,43^\circ$, $64,84^\circ$ e $73,77^\circ$ correspondem aos planos (111) ,

(200), (220) e (311), respectivamente, da estrutura cúbica de faces centradas das AuNPs (114). Assim, foi possível confirmar a presença de AuNPs cristalinas no material final.

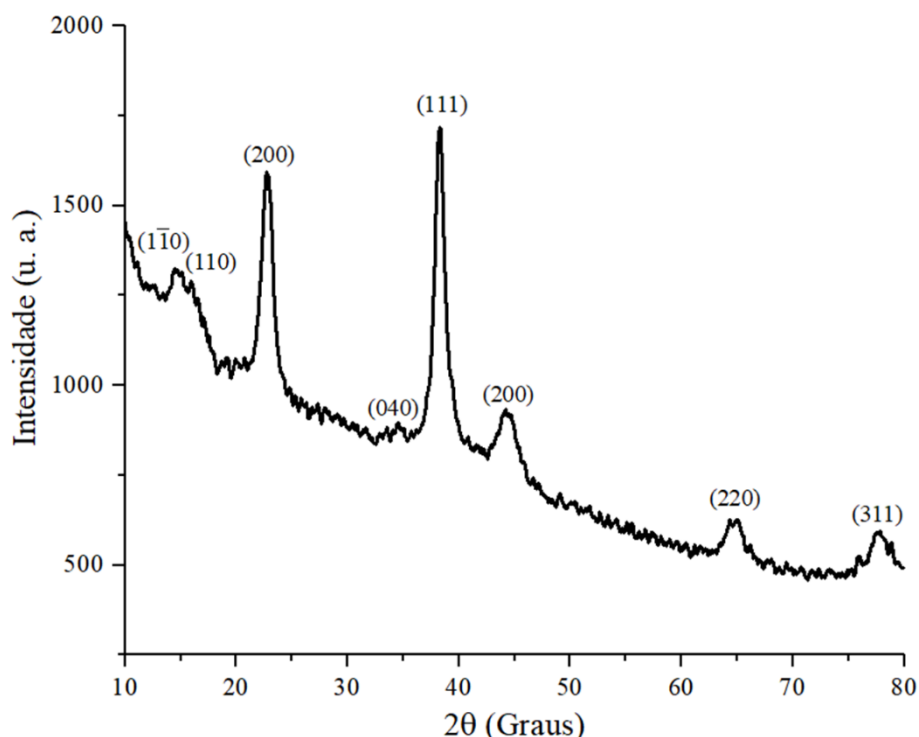


Figura 50 – Difratoograma de XRD dos nanossistemas AuNPs-CNC-CS-FA.

Uma vez que a metodologia de síntese de AuNPs-CNC-CS-FA ocorreu com sucesso, esta foi também aplicada para a síntese de AuNPs-CNC-CS-FA-FITC. A reação decorreu similarmente à anterior (Figura 51). No final da reação também se verificou a formação de uma suspensão de cor avermelhada. Ao longo das lavagens verificou-se sempre a presença de um sedimento de coloração avermelhada, indicando que o provável revestimento dos CNCs funcionalizados pode ter ocorrido com sucesso.

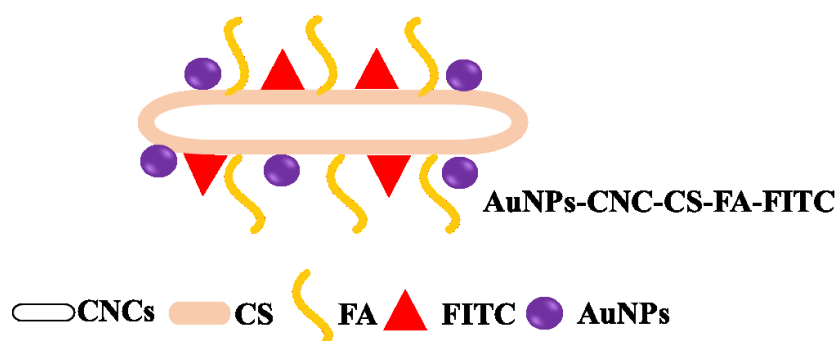


Figura 51 – Representação do nanossistema final, AuNPs-CNC-CS-FA-FITC, obtido pela síntese *in situ* das AuNPs.

Nas imagens representadas na Figura 52 é possível observar que as AuNPs se formaram na superfície dos CNCs. No entanto, a quantidade de AuNPs é menor que as que adsorveram à superfície dos CNC-CS-FA, para as mesmas condições experimentais. Uma vez que os CNCs se encontram funcionalizados, para além do FA, também com FITC deverá existir menos espaço para a nucleação e crescimento das AuNPs na superfície destes. Foi também possível verificar que o material final apresenta uma estrutura alongada, conforme pretendido.

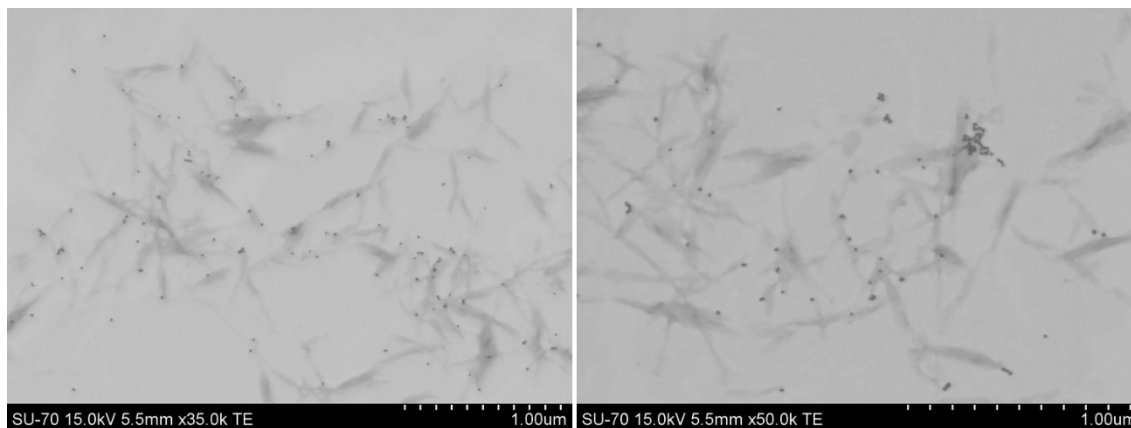


Figura 52 - Imagens de STEM do nanossistema final da síntese *in situ* de AuNPs-CNC-CS-FA-FITC.

Mais uma vez, o diâmetro das AuNPs formadas na superfície dos CNCs foi determinado, encontrando-se o gráfico da distribuição em frequência representado na Figura 53. Analisando o gráfico verificou-se que estas apresentavam um diâmetro de 21 ± 5 nm. A largura dos nanossistemas obtidos também foi adquirida (Figura 54), assim como o seu comprimento. O material obtido apresentava 47 ± 16 nm de largura, encontrando-se também na escala nanométrica. Quanto ao comprimento, este material apresentava 340 ± 77 nm, ligeiramente mais pequeno que no CNC-CS-FA-FITC (350 ± 112 nm), como se pode visualizar na Tabela 4. No entanto, são menos largos que os nanossistemas AuNPs- CNC- CS- FA, o que pode ser explicado pelo facto de nos nanossistemas sintetizados ter adsorvido uma quantidade menor de AuNPs, como se constatou anteriormente. Apesar disso, os CNCs mantêm a sua estrutura alongada e dimensões na escala nanométrica, tal como anteriormente referido, mantendo as características essenciais para a sua aplicação em sistemas nanoteranósticos.

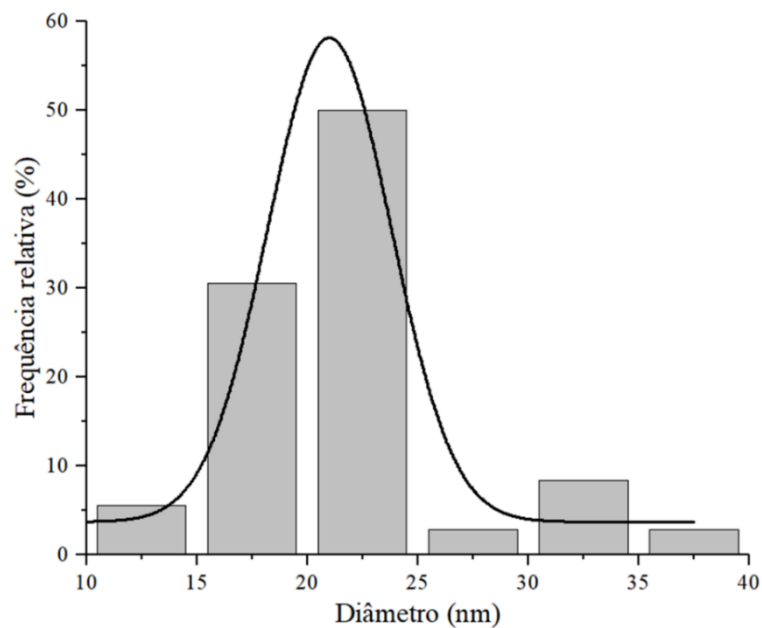


Figura 53 - Distribuição em frequência do diâmetro das AuNPs que se encontram na superfície dos CNCs.

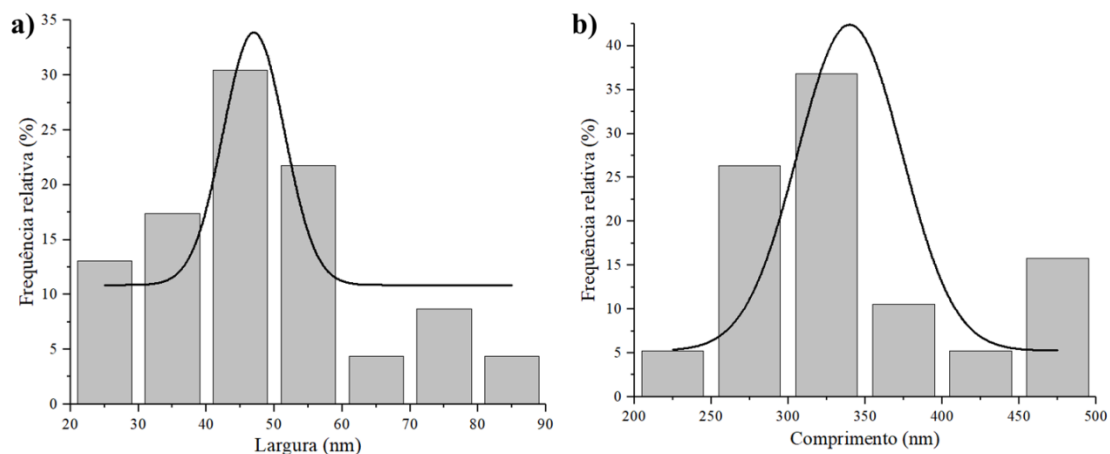


Figura 54 – Distribuição em frequência: a) largura e b) comprimento do AuNPs-CNC-CS-FA-FITC.

Tabela 4 – Dimensões de largura e comprimento para os CNCs funcionalizados e respectivos CNCs com AuNPs adsorvidas.

Dimensões	CNC-CS-FA	AuNPs-CNC-CS-FA-FITC
Largura (nm)	59 ± 16	47 ± 16
Comprimento (nm)	381 ± 89	340 ± 77

5. Conclusões

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um sistema nanoteranóstico constituído por CNCs funcionalizados com os respetivos conjugados e posteriormente revestidos com AuNPs, usando metodologias não tóxicas e pouco morosas.

Inicialmente o conjugado CS-FA foi caracterizado por espectroscopia ótica, tendo-se identificado os máximos de absorção característicos do FA. O conjugado foi também caracterizado por FTIR-ATR observando-se a presença das bandas características tanto do CS como do FA, assim como a banda característica da formação de uma ligação amida entre os dois compostos. Desta forma, concluiu-se que a funcionalização do CS com FA ocorreu com sucesso.

O passo seguinte consistiu na funcionalização do conjugado obtido com FITC. O material obtido foi caracterizado por espectroscopia ótica, verificando-se a presença das bandas de absorção características tanto do conjugado CS-FA como do FITC. Por espectroscopia de fluorescência foi possível identificar apenas uma banda de emissão, indicando a presença do FITC no conjugado final. O conjugado obtido foi também caracterizado por FTIR-ATR tendo-se identificado, no espectro do conjugado, as bandas características tanto do FITC como do conjugado CS-FA, assim como a banda característica da formação de uma ligação entre o CS-FA e o FITC. Desta forma, foi possível concluir que a funcionalização ocorreu com sucesso.

Na segunda parte deste trabalho procedeu-se à funcionalização dos CNCs com os conjugados CS-FA e CS-FA-FITC, respetivamente, por adsorção. Por espectroscopia ótica observou-se a presença das bandas de absorção do CS-FA e do CS-FA-FITC, respetivamente. Os espectros de FTIR-ATR de ambos os conjugados permitiram identificar a presença das bandas características dos CNCs e dos conjugados CS-FA e CS-FA-FITC. As imagens obtidas por STEM permitiram concluir que os CNCs funcionalizados mantiveram a sua estrutura alongada. No entanto, os CNC funcionalizados com CS-FA apresentaram uma largura ligeiramente superior aos não funcionalizados, contrariamente aos funcionalizados com CS-FA-FITC onde não se verificou grandes alterações na largura. É de salientar que o comprimento dos CNCs funcionalizados praticamente não se alterou. O CNC-CS-FA-FITC foi ainda caracterizado por espectroscopia de fluorescência tendo-se verificado a emissão de uma única banda, indicando a presença de FITC no conjugado final. Desta forma, foi possível concluir que ocorreu com sucesso a funcionalização dos CNCs com os conjugados em questão e que esta funcionalização não alterou a morfologia dos CNCs.

Para concluir o desenvolvimento do sistema nanoteranóstico, revestiu-se os CNCs funcionalizados com AuNPs, respetivamente. Os sistemas obtidos foram caracterizados por STEM tendo-se verificado a presença das AuNPs na superfície dos CNCs. O revestimento dos CNC-CS-FA com AuNPs provocou um aumento na largura, enquanto o comprimento diminuiu. Nos nanossistemas AuNPs-CNC-CS-FA-FITC não se verificou um aumento de largura muito acentuado nem diminuição do comprimento. Os CNC- CS- FA revestidos com AuNPs foram ainda caracterizados por XRD tendo-se verificado a estrutura cristalina das AuNPs. Desta forma, foi também possível concluir que ocorreu com sucesso o revestimento dos CNCs funcionalizados com as AuNPs.

Assim, podemos concluir que o desenvolvimento do sistema nanoteranóstico pretendido recorrendo a metodologias não tóxicas e pouco morosas permitiu a construção deste sistema sem ter comprometido as características dos CNCs que os tornam tão interessantes para a aplicação em questão.

No futuro será necessário completar este trabalho com a quantificação dos conjugados, CS-FA e CS-FA-FITC, que ficam adsorvidos na superfície dos CNCs. Também será importante realizar estudos de estabilidade dos CNCs funcionalizados, a diferentes pHs, por forma a perceber se há libertação dos respetivos conjugados para o meio. Caso se verifique a libertação de uma quantidade elevada de conjugados dever-se-á alterar a metodologia de funcionalização dos CNCs para uma que permita a formação de uma ligação química entre os conjugados e os CNCs. Será também necessário realizar estudos de citotoxicidade, bem como de internalização celular do sistema nanoteranóstico desenvolvido e ainda testar a viabilidade de aplicação do sistema desenvolvido em termoterapia. Por fim, deverá ser estudada a sua aplicabilidade para tratamento e diagnóstico do cancro em modelos animais, como ratinhos, recorrendo a estudos de citotoxicidade e internalização celular.

6. Bibliografia

1. Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins and Cotran pathologic basis of diseases. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2015.
2. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2016 Jan;66(1):7–30.
3. Kunjachan S, Jayapaul J, Mertens M, et al. Theranostic systems and strategies for monitoring nanomedicine-mediated drug targeting. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2012 Mar;13(4):609–22.
4. Ma Y, Huang J, Song S, et al. Cancer-targeted nanotheranostics: Recent advances and perspectives. *Small*. 2016 May;12(36):4936–54.
5. Sunasee R, Hemraz U, Ckless K. Cellulose nanocrystals: A versatile nanoplatform for emerging biomedical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2016 Apr;13(9):1243–56.
6. Moon R, Martini A, Nairn J, et al. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*. 2011 Sep;40(1):3941–94.
7. Gazzali A, Lobry M, Colombeau L, et al. Stability of folic acid under several parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016 Jul;93(1):419–30.
8. Samadian H, Hosseini-Nami S, Kamrava S, et al. Folate-conjugated gold nanoparticle as a new nanoplatform for targeted cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2016 Jan;142(11):2217–29.
9. Caldorera-Moore M, Liechty W, Peppas N. Responsive theranostic systems: Integration of diagnostic imaging agents and responsive controlled release drug delivery carriers. *Accounts of Chemical Research*. 2011 Jul;44(10):1061–70.
10. D'Alpino P, Pereira J, Svizero N, et al. Use of fluorescent compounds in assessing bonded resin-based restorations: A literature review. *Journal of Dentistry*. 2006;34(9):623–34.

11. Yeh Y, Creran B, Rotello V. Gold Nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale*. 2012 Mar;4(6):1871–80.
12. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007 Nov;117(11):3155–63.
13. Hanahan D, Weinberg R. The immune hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57–70.
14. Ruddon R. *Cancer biology*. 4th ed. Michigan: Oxford University Press, Inc.; 2007.
15. Weinberg R. *Biology of the cancer*. 2nd ed. New York: Garland Science; 2014.
16. Glunde K, Pathak A, Bhujwala Z. Molecular-functional imaging of cancer: to image and imagine. *Trends in Molecular Medicine*. 2007 Jun;13(7):287–97.
17. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nature Reviews*. 2002 Mar;2(1):210–9.
18. Glasspool R, Evans T. Clinical imaging of cancer metastasis. *European Journal of Cancer*. 2000 May;36(13):1661–70.
19. Perry M. *The chemotherapy source book*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
20. Skeel R, Khleif S. *Handbook of cancer chemotherapy*. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
21. Li F, Zhao C, Wang L. Molecular-targeted agents combination therapy for cancer: Developments and potentials. *International Journal of Cancer*. 2014 Feb;134(6):1257–69.
22. Rizzo P, Osipo C, Foreman K, et al. Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene*. 2008 Sep;27(38):5124–31.
23. Karatas F, Sahin S, Sever A, et al. Management of hair loss associated with endocrine therapy in patients with breast cancer: an overview. *SpringerPlus*. 2016

- May;5(1):585–8.
24. Morean D, Cherney L. Screening for cognitive impairment associated with chemotherapy for breast cancer. *Current Breast Cancer Reports*. 2016 Jul;8(1):151–7.
 25. Ray M, Rogers L, Trammell R, et al. Fatigue and sleep during cancer and chemotherapy: Translational rodent models. *Comparative Medicine*. 2008 Jun;58(3):234–45.
 26. McCubrey J, Steelman L, Chappell W, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007 Sep;1773(8):1263–84.
 27. Shelton J, Steelman L, White E, et al. Synergy between PI3K/Akt and Raf/MEK/ERK pathways in IGF-1R mediated cell cycle progression and prevention of apoptosis in hematopoietic cells. *Cell Cycle*. 2004 Mar;3(3):372–9.
 28. Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, et al. AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell*. 2011 Jan;19(1):58–71.
 29. Eichhorn P, Gili M, Scaltriti M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Research*. 2008 Nov;68(22):9221–30.
 30. Sumer B, Gao J. Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine*. 2008 Apr;3(2):137–40.
 31. Jorfi M, Foster E. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*. 2015 Jul;132(14):1–19.
 32. Liu Z, Jiao Y, Wang Y, et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008 Jul;60(15):1650–62.
 33. Sinha V, Kumria R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International*

- Journal of Pharmaceutics. 2001 Mar;224(1):19–38.
34. Jung H, Park K, Yang J, et al. Theranostic systems assembled in situ on demand by host-guest chemistry. *Biomaterials*. 2011 Jun;32(30):7687–94.
 35. Jiang D, England C, Cai W. DNA nanomaterials for preclinical imaging and drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2016 Jul;239(1):27–38.
 36. Moreira A, Dias D, Correia I. Stimuli-responsive mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy: A review. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2016 Jul;236(1):141–57.
 37. Shilpa A, Agrawal S, Ray A. Controlled delivery of drugs from alginate matrix. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*. 2003 Feb;43(2):187–221.
 38. Lee K, Mooney D. Alginate : properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2012 Jan;37(1):106–26.
 39. Jia X, Pei M, Zhao X, et al. PEGylated oxidized alginate-DOX prodrug conjugate nanoparticles cross-linked with fluorescent carbon dots for tumor theranostics. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 2016 Aug;2(9):1641–8.
 40. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006 Jun;31(7):603–32.
 41. Zarrin A, Sadighian S, Rostamizadeh K, et al. Design, preparation, and in vitro characterization of a trimodally-targeted nanomagnetic onco-theranostic system for cancer diagnosis and therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;500(1–2):62–76.
 42. Sachdev A, Matai I, Gopinath P. Carbon dots incorporated polymeric hydrogels as multifunctional platform for imaging and induction of apoptosis in lung cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016 Nov;141(1):242–52.
 43. George J, Sabapathi S. Cellulose nanocrystals: Synthesis, functional properties, and applications. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2015 Nov;8(1):45–

- 54.
44. Dufresne A. Nanocellulose: A new ageless bionanomaterial. *Materials Today*. 2013 Jun;16(6):220–7.
 45. Klemm D, Heublein B, Fink H, et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2005 May;44(1):3358–93.
 46. Huber T, Müssig J, Curnow O, et al. A critical review of all-cellulose composites. *Journal of Materials Science*. 2012;47(3):1171–86.
 47. OSullivan A. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*. 1997 May;4(1):173–207.
 48. Wertz J, Bédué O, Mercier J. *Cellulose science and technology*. 1st ed. Lausanne, Switzerland: CRC Press; 2010.
 49. Huber T, Müssig J, Curnow O, et al. A critical review of all-cellulose composites. *Journal of Materials Science*. 2012 Feb;47(3):1171–86.
 50. Kalia S, Dufresne A, Cherian B, et al. Cellulose-based bio- and nanocomposites: A review. *International Journal of Polymer Science*. 2011 Jun;2011(1):1–35.
 51. Lavoine N, Desloges I, Dufresne A, et al. Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2012 Feb;90(1):735–64.
 52. Brown R. Cellulose structure and biosynthesis : what is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science*. 2004 Feb;42(1):487–95.
 53. Brown R, Saxena I. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2000 Jun;38(1–2):57–67.
 54. Shoda M, Sugano Y. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2005 Nov;10(1):1–8.

55. Somerville C. Cellulose synthesis in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2006 Jul;22(1):53–78.
56. Chawla P, Bajaj I, Survase S, et al. Microbial cellulose: Fermentative production and applications. *Food Technology and Biotechnology*. 2009 Nov;47(2):107–24.
57. Jozala A, de Lencastre-Novaes L, Lopes A, et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016 Sep;100(5):2063–72.
58. Freire C, Fernandes S, Silvestre A, et al. Novel cellulose-based composites based on nanofibrillated plant and bacterial cellulose: Recent advances at the University of Aveiro - A review. *Holzforschung*. 2013 Jul;67(6):603–12.
59. Rajwade J, Paknikar K, Kumbhar J. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015 Nov;99(6):2491–511.
60. Rånby B. Aqueous colloidal solutions of cellulose micelles. In Uppsala: *Acta Chemica Scandinavica*; 1949. p. 649–50.
61. Revol J, Bradford H, Giasson J, et al. Helicoidal self-ordering of cellulose microfibrils in aqueous suspension. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1992 Jan;14(3):170–2.
62. Habibi Y, Lucia L, Rojas O. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical Reviews*. 2010 Oct;110(6):3479–500.
63. Benavides E. Cellulose nanocrystals: properties and applications in renewable nanocomposites. All dissertations. Clemson University; 2011.
64. Ching Y, Ali M, Abdullah L, et al. Rheological properties of cellulose nanocrystal-embedded polymer composites: a review. *Cellulose*. 2016 Sep;23(1):1011–30.
65. Qiu Q-Q, Sun W-Q, Connor J. Sterilization of biomaterials of synthetic and biological origin. In: *Comprehensive Biomaterials*. London: Elsevier Ltd.; 2011. p. 127–44.

66. Yan W, Chen C, Wang L, et al. Facile and green synthesis of cellulose nanocrystal-supported gold nanoparticles with superior catalytic activity. *Carbohydrate Polymers*. 2016;140(1):66–73.
67. Plackett D, Letchford K, Jackson J, et al. A review of nanocellulose as a novel vehicle for drug delivery. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*. 2014 Jan;29(1):105–18.
68. Xiong R, Lu C, Zhang W, et al. Facile synthesis of tunable silver nanostructures for antibacterial application using cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*. 2013;95(1):214–9.
69. Azizi S, Ahmad M, Mahdavi M, et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activities of ZnO nanoparticles/cellulose nanocrystal nanocomposites. *BioResources*. 2013;8(2):1841–51.
70. Feese E, Sadeghifar H, Gracz H, et al. Photobactericidal porphyrin-cellulose nanocrystals: Synthesis, characterization, and antimicrobial properties. *Biomacromolecules*. 2011 Aug;12(10):3528–39.
71. Lin N, Dufresne A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *European Polymer Journal*. 2014 May;59(1):302–25.
72. Jackson J, Letchford K, Wasserman B, et al. The use of nanocrystalline cellulose for the binding and controlled release of drugs. *International Journal of Nanomedicine*. 2011 Feb;6(1):321–30.
73. Leamon C, Jackman A. Exploitation of the folate receptor in the management of cancer and inflammatory disease. In: Leamon C, Jackman A, editors. *Vitamins and Hormones*. 1st ed. Indiana: Elsevier Inc.; 2008. p. 203–33.
74. Wills L. Treatment of “pernicious anaemia of pregnancy” and “tropical anaemia.” *British Medical Journal*. 1931 Jun;3676(1):1059–1064.
75. Mitchell H, Snell E, Williams R. The concentration of folic acid. *Journal of the American Chemical Society*. 1941 Sep;63(1):2284–2284.

76. Off M, Steindal A, Porojnicu A, et al. Ultraviolet photodegradation of folic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2005 Jan;80(1):47–55.
77. Kennedy D. B vitamins and the brain: Mechanisms, dose and efficacy—A review. *Nutrients*. 2016 Sep;8(1):68–97.
78. Li R, Wu R, Zhao L, et al. Folate and iron difunctionalized multiwall carbon nanotubes as dual-targeted drug nanocarrier to cancer cells. *Carbon*. 2011 Sep;49(5):1797–805.
79. Dong S, Cho H, Lee Y, et al. Synthesis and cellular uptake of folic acid-conjugated cellulose nanocrystals for cancer targeting. *Biomacromolecules*. 2014 Oct;15(5):1560–7.
80. Lawrence W, Malik M, Autian J. Toxicity profile of epichlorohydrin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1972 Nov;61(11):1712–7.
81. Sabnis R. Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC). In: John Wiley & Sons, editor. *Handbook of fluorescent dyes and probes*. New Jersey: Wiley InterScience; 2015.
82. Dong S, Roman M. Fluorescently labeled cellulose nanocrystals for bioimaging applications. *Journal of the American Chemical Society*. 2007;129(45):13810–1.
83. Khan MS, Vishakante GD, Siddaramaiah H. Gold nanoparticles: A paradigm shift in biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2013 Nov;199–200(1):44–58.
84. Jazayeri MH, Amani H, Pourfatollah AA, et al. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-Sensing Research*. 2016 Jul;9(1):17–22.
85. Priyadarshini E, Pradhan N. Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric detection of toxic metal ions: A review. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 2017 Jan;238(1):888–902.
86. Kim D, Jon S. Gold nanoparticles in image-guided cancer therapy. *Inorganica Chimica Acta*. 2012 Dec;393(1):154–64.

87. nanoComposix. Aqueous gold spheres [Internet]. 2017 [cited 2017 Nov 27]. Available from: <http://nanocomposix.eu/collections/gold-spheres>
88. Turkevich J, Stevenson P, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of Faraday Society*. 1951 May;11(1):55–75.
89. Creighton J, Blatchford C, Albrecht M. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2*. 1978 Jul;75(1):790–8.
90. Martin M, Basham J, Chando P, et al. Charged gold nanoparticles in non-polar solvents: 10-min synthesis and 2D self-assembly. *Langmuir*. 2010 Jun;26(10):7410–7.
91. Song J, Jang H, Kim B. Biological synthesis of gold nanoparticles using *Magnolia kobus* and *Diopyros kaki* leaf extracts. *Process Biochemistry*. 2009 Jan;44(10):1133–8.
92. Thaxton C, Elghanian R, Thomas A, et al. Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines “undetectable” PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Sep;106(44):18437–42.
93. Cheng Y, Meyers J, Broome A, et al. Deep penetration of a PDT drug into tumors by noncovalent drug-gold nanoparticle conjugates. *Journal of the American Chemical Society*. 2011 Sep;133(8):2583–91.
94. Sigma Aldrich [Internet]. Gold Nanoparticles: Properties and Applications. [cited 2017 May 21]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html#ref>
95. Au L, Zheng D, Zhou F, et al. A quantitative study on the photothermal effect of immuno gold nanocages targeted to breast cancer cells. *American Chemical Society*. 2008 Jun;2(8):1645–52.

96. Gobin A, Lee M, Halas N, et al. Near-Infrared resonant nanoshells for combined optical imaging and photothermal cancer therapy. *Nano Letters*. 2007 Mar;7(7):1929–34.
97. Lee D, Lockey R, Mohapatra S. Folate Receptor-Mediated Cancer Cell Specific Gene Delivery Using Folic Acid-Conjugated Oligochitosans. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2006 Sep;6(9):2860–6.
98. Huang Y, Boamah P, Gong J, et al. Gd (III) complex conjugate of low-molecular-weight chitosan as a contrast agent for magnetic resonance/fluorescence dual-modal imaging. *Carbohydrate Polymers*. 2016 Jun;143(1):288–95.
99. Segal L, Creely J, Martin A, et al. Empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*. 1958 Oct;29(10):786–94.
100. Mohd A, Lobry M, Colombeau L, et al. Stability of folic acid under several parameters. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016 Oct;93(1):419–30.
101. Valentin R, Molvinger K, Quignard F, et al. Supercritical CO₂ dried chitosan: an efficient intrinsic heterogeneous catalyst in fine chemistry. *New Journal of Chemistry*. 2003 Aug;27(12):1690–2.
102. Branca C, D'Angelo G, Crupi C, et al. Role of the OH and NH vibrational groups in polysaccharide-nanocomposite interactions: A FTIR-ATR study on chitosan and chitosan/clay films. *Polymer*. 2016 Sep;99(1):614–22.
103. Li P, Wang Y, Zeng F, et al. Synthesis and characterization of folate conjugated chitosan and cellular uptake of its nanoparticles in HT-29 cells. *Carbohydrate Research*. 2011 Sep;346(6):801–6.
104. Yang S, Lin F, Tsai K, et al. Folic acid-conjugated chitosan nanoparticles enhanced protoporphyrin IX accumulation in colorectal cancer cells. *Bioconjugate Chemistry*. 2010 Nov;21(4):679–89.

105. Soliman G, Zhang Y, Merle G, et al. Hydrocaffeic acid-chitosan nanoparticles with enhanced stability, mucoadhesion and permeation properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014 May;88(3):1026–37.
106. Hermanson G. Fluorescein Isothiocyanate (FITC). In: *Fluorescent Probes*. 3rd ed. Rockford, IL: Bioconjugate Techniques; 2013.
107. Dave K, Dhayal M. Fluorometric estimation of amino acids interaction with colloidal suspension of FITC functionalized graphene oxide nanoparticles. *Applied Surface Science*. 2017 Aug;396(1):978–85.
108. Jiang L, Li X, Liu L, et al. Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified pullulan nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2013 May;8(1):1825–34.
109. Taflick T, Schwendler L, Rosa S, et al. Cellulose nanocrystals from acacia bark – Influence of solvent extraction. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017 Jul;101(1):553–61.
110. Gu J, Hu C, Zhong R, et al. Isolation of cellulose nanocrystals from medium density fiberboards. *Carbohydrate Polymers*. 2017 Jan;167(1):70–8.
111. Pal N, Dubey P, Gopinath P, et al. Combined effect of cellulose nanocrystal and reduced graphene oxide into poly-lactic acid matrix nanocomposite as a scaffold and its anti-bacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017 Nov;95(1):94–105.
112. Ooi S, Ahmad I, Amin M. Cellulose nanocrystals extracted from rice husks as a reinforcing material in gelatin hydrogels for use in controlled drug delivery systems. *Industrial Crops and Products*. 2016 Oct;93(1):227–34.
113. Popescu M. Structure and sorption properties of CNC reinforced PVA films. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017 Dec;101(1):783–90.
114. Irfan M, Ahmad T, Moniruzzaman M, et al. Size and stability modulation of ionic liquid functionalized gold nanoparticles synthesized using *Elaeis guineensis* (oil

palm) kernel extract. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017 Nov;1–13.