



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS
Curso de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados

Dissertação de Mestrado

GEISI ROJAS BARRETO

**NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA POLIDISPERSA ESTABILIZADAS EM
LIPÍDIOS E APLICADAS EM MODELOS DE MEMBRANA**

SANTO ANDRÉ

2013

Curso de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados

Dissertação de Mestrado

GEISI ROJAS BARRETO

**NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA POLIDISPERSA ESTABILIZADAS EM
LIPÍDIOS E APLICADAS EM MODELOS DE MEMBRANA**

Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nanociências e Materiais Avançados, sob orientação do Professor Doutor Frank Nelson Crespilho e coorientação da Professora Doutora Iseli Lourenço Nantes.

SANTO ANDRÉ

2013

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática dos poros de diferentes classes de capilares sanguíneos.....	14
Figura 2. Formação de alinhamento das vesículas magnéticas.....	16
Figura 3. Influência do pH na formação de óxidos de ferro.....	18
Figura 4. Processo de automontagem de moléculas fosfolipídicas.....	21
Figura 5. Estrutura química e representação esquemática de PC, PE e CL.....	22
Figura 6. Estrutura de uma molécula de fosfatidilcolina.....	22
Figura 7. Classificação comumente aplicada para os lipossomos (fora de escala).....	23
Figura 8. Interação lipossoma-célula.....	25
Figura 9. Vesículas gigantes.....	28
Figura 10. Síntese do magnetolipossomo.....	30
Figura 11. Evidência da mobilidade magnetoforética.....	31
Figura 12. Estrutura do marcador fluorescente utilizado MC 540.....	32
Figura 13. Esquema da síntese (Método Micro) em pequena escala.....	36
Figura 14. Montagem do agitador magnético e acessórios.....	37
Figura 15. Preparação dos filmes secos de lipídicos (PC, PCCL ou PCPECL).....	38
Figura 16. Preparação dos magnetolipossomos.....	39
Figura 17. Câmara de eletroformação das GUVs [Adaptada].....	40
Figura 18. Gerador de funções (corrente elétrica alternada).....	41
Figura 19. Efeito de contraste das GUVs.....	41
Figura 20. (A) Difrátogramas para o pó obtido de Fe ₃ O ₄ ; (B) (I) picos de Fe ₃ O ₄ e (B) (II) ficha cristalográfica ICSD-26410 para o padrão de magnetita.....	47
Figura 21. Imagens de MEV-FEG das partículas de Fe ₃ O ₄	48
Figura 22. Processo de formação de magnetita. Mudança de cor com a adição de NH ₄ OH.....	49
Figura 23. (A) Difrátograma para o pó obtido de Fe ₃ O ₄ Método Micro e (B) Fe ₃ O ₄ Método. DC: Diâmetros dos cristalitos.....	50
Figura 24. MEV-FEG de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ . A) 75.000x e B) 100.000x.....	51
Figura 25. Resposta dos magnetolipossomos ao campo magnético externo aplicado.....	52
Figura 26. Distribuição de tamanho (diâmetro nm) e do potencial zeta (mV).....	53
Figura 27. Comparativo dos resultados de (A) distribuição de tamanho (nm) e (B) potencial zeta.....	54
Figura 28. Resultados gráficos de tamanho (nm) (A), índice de polidispersão (B) e potencial zeta (C). Destaque	

em C para a distribuição bimodal de Fe ₃ O ₄ /PCCL.....	56
Figura 29. FTIR-ATR para Fe ₃ O ₄ , Fe ₃ O ₄ /PCCL e Fe ₃ O ₄ /PC.....	57
Figura 30. Microscopia óptica de GUVs de PCPECL.....	58
Figura 31. Suspensão de GUVs. A) Contraste de fase. B) Fluorescência.....	59
Figura 32. GUVs incubadas com LUVs–MC 540. A) Contraste de fase. B) Fluorescência da MC 540.....	59
Figura 33. A) Grupo controle B) após adição de 10µL de Fe ₃ O ₄	60
Figura 34. Grupo controle incubado com Fe ₃ O ₄ polidispersa. A) Contraste de fase e B) Fluorescência da MC 540.....	60
Figura 35. Efeito do campo magnético externo uniforme (400 mT) no grupo controle incubado com Fe ₃ O ₄ polidispersa.....	62
Figura 36. Efeito de alinhamento das partículas de magnetita com aplicação do campo magnético externo uniforme.....	63
Figura 37. Magnetolipossomos–MC 540 incubados em GUVs. A) Contraste de fase; B) Microscopia de fluorescência.....	65
Figura 38. Esquema de fluorescência para 1) GUV, 2) GUV + LUVs–MC 540, 3) GUV + LUVs–MC 540–Magnetita e 4) GUV + LUVs–MC 540–Magnetolipossomo.....	66
Figura 39. Microscopia óptica de GUVs incubadas com 25µL de magnetolipossomos na presença de um campo externo magnético uniforme (400 mT).....	68
Figura 40. Deslocamento da magnetita e da GUV na presença de um campo magnético uniforme.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tamanho da nanopartícula e local de acúmulo no organismo.....	14
Tabela 2. Classificação dos lipossomos.....	24
Tabela 3. Estudos de nanopartículas magnéticas encapsuladas em GUVs.....	33
Tabela 4. Principais diferenças entre os métodos de síntese Micro e Nano.....	38
Tabela 5. Sumário das técnicas de caracterização empregadas.....	42
Tabela 6. Planos cristalinos correspondentes aos picos para Fe_3O_4 e FeOOH	47
Tabela 7. Características físico-químicas das formulações lipossomais.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CL: cardiopina

DLS: espalhamento dinâmico de luz (do inglês, *Dynamic Light Scattering*)

DMSA: ácido dimercaptosuccínico (do inglês, *Dimercaptosuccinic acid*)

DOPE (PE): dioleoilfosfatidiletanolamina

DRX: difração de raios X

EIV: vesículas obtidas por injeção de éter

ELS: Espalhamento Estático da Luz (do inglês, *Electrophoretic Light Scattering*)

FeCl₂.4H₂O: cloreto ferroso tetraidratado

FeCl₃: cloreto férrico

Fe₃O₄: magnetita

FPV: vesículas obtidas em prensa de *French*

FTIC: fluoresceína isotiocianato

FTIR: espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GUV: vesícula unilamelar gigante (do inglês, *Giant Unilamellar Vesicles*)

GMV: vesícula multilamelar gigante (do inglês, *Giant Multilamellar Vesicles*)

ICSD: (do inglês, *Inorganic Crystal Structure Database*)

ITO: substrato de óxido de estanho dopado com índio (do inglês, *Indium Tin Oxide*)

LUV: vesículas unilamelares grandes (do inglês: *Large Unilamellar Vesicles*)

MC: merocianina (MC 540)

MEV-FEG: microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo

MLV: vesículas multilamelares (do inglês: *Multilamellar Large Vesicles*)

PC: fosfatidilcolina

PdI: índice de polidispersão

RES: sistema reticuloendotelial

RITC: rodamina isotiocianato

RM: ressonância magnética

SFM: sistema fagocítico mononuclear

SUV: vesículas unilamelares pequenas (do inglês: *Small Unilamellar Vesicles*)

UV-Vis: espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível

VER: vesículas obtidas por evaporação em fase reversa

LISTA DE SÍMBOLOS

λ : comprimento de onda (nm)

α_{ext} : coeficiente de extinção

α_{abs} : coeficiente de absorção

α_{sca} : coeficiente de espalhamento

θ : ângulo de incidência da radiação (graus)

ζ : potencial zeta

β : largura integral em radianos

hkl : índices de Miller

AGRADECIMENTOS

- Agradeço, em primeiro lugar, essa força Onipotente e Onipresente que nunca me abandonou, fez-me forte nos momentos de fraqueza, acalentou minhas noites e proporcionou-me a felicidade de ter amigos fiéis que sempre me ampararam nos momentos mais difíceis.
- Aos meus pais Gervázio e Cida: são meus exemplos de vida e os responsáveis por todas as minhas conquistas. Sinto orgulho por ser filha de vocês. Amo eternamente!
- A minha irmã Gilsa: a melhor companheira para todos os momentos. Obrigada minha irmã pelos dias abençoados de luta e alegria que está ao meu lado!
- Ao meu companheiro e amigo, Elton, por suportar firme tanto tempo dedicado à pesquisa. Obrigada por preencher os meus dias com tanta felicidade.
- São tantos amigos, que ao longo da caminhada estenderam suas mãos e tornamo-nos cada dia mais fortes: Aryane Tofanello, Elierge Barros, Iorque, Luciana Picazio, Kamila Pagnoncelli, Marcus Martins, Márcio Curvello, Mariana Akemi, Midilaine Sena, Roberta Costa, Sandra Marília, Vera Shukumine e tantos outros anjos que foram essenciais para a realização deste trabalho. Sentirei muita saudade...
- A fantástica, eficiente e amiga equipe da Central de Multiusuários da UFABC, obrigada por sempre colaborar mesmo fora do horário de trabalho. Podem contar comigo!
- A Prof^ª. Dra. Iseli Lourenço Nantes pelas dicas preciosas, pelo apoio constante nos últimos meses e à Cíntia Kawai e Juliana Casares que não mediram esforços para concluir as metas propostas pela professora Iseli.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Frank Nelson Crespilho por estar presente nesta minha trajetória, com muita paciência e sempre se preocupando comigo.
- Ao programa de Pós-graduação em Nanociências e Materiais Avançados pela infraestrutura cedida, primordial para a realização do meu projeto de pesquisa de mestrado. Agradeço também aos ilustres mestres que se dedicaram para compartilhar seus conhecimentos e prover a ciência da forma mas bela.
- Muito obrigada a UFABC e a CAPES pelas bolsas de mestrado fornecidas.

RESUMO

O uso de nanopartículas superparamagnéticas permite o tratamento e o diagnóstico precoce de tumores mediante aplicação focalizada e dirigida de um campo magnético externo para otimizar a liberação controlada de fármacos com o objetivo de aumentar a resposta clínica e diminuir efeitos adversos. Para conferir biocompatibilidade, nanopartículas de magnetita foram encapsuladas com lipossomos (magnetolipossomos). Assim, o objetivo desta dissertação de mestrado é preparar magnetolipossomos, cujos efeitos foram observados em microscopia óptica e de fluorescência quando estudados em um modelo de membrana celular (GUVs). Analisou-se por difração de raios-X, por espalhamento de luz dinâmico e por imagens de microscopia eletrônica de varredura, que pelo método padronizado da síntese permitiu-se obter magnetita polidispersa com tamanhos nanométricos. Conforme observado pela mudança do potencial de carga de superfície e por FTIR, ficou comprovado que houve um recobrimento parcial da magnetita pelo lipídio. Este revestimento melhorou a estabilização e permitiu que as nanopartículas de magnetita polidispersa pudessem ser entregues por modelos de células (GUV e GMV). Duas populações de potencial zeta foram encontradas para os magnetolipossomos, contudo, não houve separação magnética de propósito para ver se recobriu tudo e ficou claro que o lipídio recobriu parcialmente a magnetita. A entrega do marcador fluorescente das LUVs com e sem magnetita para as GUVs indica que estas LUVs são eficientes como carreadores de moléculas exógenas e a magnetita não interfere nesse processo. Estes resultados também sugerem que as propriedades de superfície das nanopartículas polidispersas modificadas são um importante parâmetro da formulação para promover a interação destas com membranas lipídicas. Portanto, em termos gerais, esse sistema, por conter a magnetita, pode ser candidato para direcionamento a um alvo específico no organismo mediante a aplicação de um campo magnético externo. A fusão da LUV com a membrana da célula pode promover uma entrega seletiva de um fármaco para uma célula-alvo. Trata-se, no entanto, de um estudo modelo e fundamental, que não está adaptado e deve ser testado em condições *in vivo*, cujos testes poderão ser realizados no futuro.

Palavras-chave: nanopartícula magnetita polidispersa; lipídios; magnetolipossomos; modelo de membrana; vesículas unilamelares gigantes.

ABSTRACT

Nanobiotechnology allowed major advances in diagnostic imaging devices and cancer therapy. The use of superparamagnetic nanoparticles offers the treatment and early diagnosis of tumors by applying focused and directed in an external magnetic field. However, one of the biggest challenges nowadays is to provide biocompatible magnetic fluids. Thus, the usefulness of this master dissertation is to synthesize magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles encapsulated in liposomes (magnetoliposomes), whose effects were observed by optical microscopy using giant unilamellar vesicles (GUVs). Analyzed by X-ray diffraction, dynamic light scattering and electron microscopy images of scanning, which the standard method of magnetite synthesis allowed to obtain nanometric sizes. As noted by the zeta potential and FTIR, it was proved that partial magnetite was coating by lipid. This improved stability and allowed the polydisperse magnetite nanoparticles could be delivered by cell models (GUV and GMV). Two zeta potential populations of magnetoliposomes were found, however, there was no magnetic separation on purpose in order to see the encapsulation efficiency and it was clear that lipid partially shrouded magnetite. The fluorescent probe delivery of LUVs for GUVs with and without magnetite indicates that these LUVs are efficient carriers of exogenous molecules and magnetite does not interfere in this process. These results also suggest that the nanoparticles polydisperse surface properties modified are an important parameter in the formulation to promote their interactions with lipid membranes. Therefore, in overall view, this system containing magnetite, can be directed to a specific target within the body by applying an external magnetic field. The LUVs fusion with the cell membrane can promote selective drug delivery to a target cell. It is, however, a model and basic study, which is not suitable and should be tested *in vivo* conditions, which might be accomplished in the future.

Keywords: polydisperse magnetite nanoparticles; lipids; magnetoliposomes; model membrane; giant unilamellar vesicles.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	CONTEXTOS: NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS	12
1.2	POSSIBILIDADES E LIMITAÇÕES DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS	13
1.3	MÉTODOS PARA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	17
1.3.1	Método de coprecipitação	17
1.3.2	Funcionalização de nanopartículas de magnetita com lipídio	18
1.4	LIPOSSOMOS	19
1.4.1	Estrutura	20
1.4.2	Classificação	23
1.4.3	Aplicações na Medicina	26
1.4.4	Métodos de Preparação	27
1.4.4.1	Métodos Tradicionais	27
1.4.5	Formação de vesículas unilamelares gigantes (GUVs)	28
1.5	MAGNETOLIPOSSOMOS	29
1.6	APLICAÇÃO EM MODELOS DE MEMBRANA	32
2	OBJETIVOS	34
2.1	OBJETIVOS GERAIS	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	35
3.1	MATERIAIS E REAGENTES	35
3.1.1	Suspensão de magnetita	35
3.1.2	Filmes lipídicos	35
3.1.3	Magnetolipossomos	35
3.1.4	Vesículas unilamelares gigantes (GUVs)	35
3.2	METODOLOGIA	36
3.2.1	Síntese da suspensão de magnetita	36
3.2.1.1	Método Micro	36
3.2.1.2	Método Nano	37
3.2.2	Preparação dos filmes lipídicos e hidratação	38

3.2.3	Formação dos Magnetolipossomos	39
3.2.4	Síntese das vesículas unilamelares gigantes (GUVs)	40
3.3	CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DAS PROPRIEDADES DOS COMPOSTOS	42
3.3.1	Difração de raios X (DR-X)	42
3.3.2	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier	43
3.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura-FEG	43
3.3.4	Microscopia de Fluorescência	43
3.3.5	Potencial Zeta e Tamanho de Partícula	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	DISCUSSÕES GERAIS	44
4.2	MICROPARTÍCULAS DE MAGNETITA	47
4.3	NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA POLIDISPERSA	49
4.4	FORMULAÇÕES DE MAGNETOLIPOSSOMOS	51
4.4.1	Distribuição de tamanho e potencial zeta	51
4.4.2	FTIR–ATR	57
4.5	APLICAÇÕES EM MODELO DE MEMBRANA	58
4.5.1	Determinação do grupo controle	58
4.5.2	GUVs incubadas com nanopartículas de magnetita polidispersa.....	60
4.5.3	GUVs incubadas com magnetolipossomos	64
4.5.4	Esquema ilustrativo para as imagens de fluorescência.....	65
4.5.5	Estudo da magnetoforese em magnetolipossomos.....	67
5	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTOS: NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS

O estudo de nanopartículas com propriedades magnéticas tornou-se alvo de grande interesse nos últimos anos, principalmente devido à possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos e em inúmeras outras aplicações na área da biomedicina¹⁻⁵.

Com o advento da nanociência e nanotecnologia, novas rotas sintéticas para obtenção de nanopartículas com propriedades magnéticas foram obtidas e muito se tem feito a fim de se obter nanopartículas com propriedades específicas em aplicações como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética para o diagnóstico e tratamento do câncer⁶, purificadores⁷, separadores de células do sangue⁸ entre outros.

Embora nanopartículas possam apresentar propriedades magnéticas interessantes do ponto de vista médico e tecnológico, as características funcionais das nanopartículas são de extrema importância e determinam algumas propriedades como estabilidade da solução coloidal⁹, biocompatibilidade¹⁰, nanotoxicidade^{11, 12} e nível de acumulação no organismo^{13, 14}.

Assim, um dos maiores desafios hoje está na preparação de nanomateriais com propriedades magnéticas com alta estabilidade e com alto grau de homogeneidade de tamanho possíveis^{5, 15}.

Tais características são fatores cruciais para que estudos de administração de nanopartículas magnéticas em organismos vivos sejam feitos da maneira mais controlada possível, como no carreamento de fármacos (do inglês: *drug delivery*) em locais específicos pela migração induzida por campo magnético^{16, 17}, como Chertok e colaboradores¹⁸ que utilizaram nanopartículas de óxido de ferro magnéticas como carreadoras de drogas para o tratamento de tumores cerebrais.

Os resultados mostraram que esses tipos de nanopartículas são muito promissores principalmente por apresentarem características não invasivas, sendo que podem ser controladas por métodos clínicos de ressonância magnética. Além disso, alguns estudos apresentam a funcionalização de nanopartículas magnéticas encapsuladas com lipídios para aplicações em sistemas biomédicos (carreamento de fármacos, agentes de contraste e mediadores para hipertermia) e biotecnológicos^{19, 20}.

1.2 POSSIBILIDADES E LIMITAÇÕES DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Sistemas de liberação possuem a grande vantagem de se movimentar livremente na circulação sistêmica e atravessar as barreiras que estão pelo caminho. Tais passagens dão-se pelos vasos sanguíneos na maior parte das vezes, entretanto, o fluxo nos vasos não representa o único obstáculo para a condução de fármacos, visto que estes sistemas almejam alcançar um alvo específico e, muitas vezes, de difícil acesso para o princípio ativo.

Para concluir este propósito é necessário que as paredes dos capilares sejam transpostas para penetrar no fluido extracelular do tecido e alcançar as células-alvo^{21,22}.

Com relação à condução de fármacos em sistemas biológicos, a modificação da superfície de nanopartículas por moléculas orgânicas tem se mostrado atraente. Para isso, a otimização das propriedades de superfície (densidade de carga, hidrofobicidade, área superficial etc.) pode levar a diversos efeitos, como estabilidade em suspensão biológica (pH 7,4 e alta concentração de sais dissolvidos), presença de grupos funcionais, inibição de ligação com o sistema retículo-endotelial (RES), entre outros.

Deste modo é fácil inferir que a permeabilidade da parede é um fator crítico para liberação de agentes por administração intravenosa^{17,23}.

Devido à rapidez na liberação de moléculas ou partículas da corrente sanguínea para o interstício tecidual pela difusão, o tamanho dos poros irá regular diretamente a permeabilidade dos fármacos.

De acordo com o órgão, a estrutura dos capilares é diferente e é classificada em quatro tipos (Figura 1)²⁴ (adaptada):

- 1) (A) capilares de junção estreita: sistema nervoso central;
- 2) (B) capilares contínuos: maioria dos tecidos, tais como, músculo, pulmão e pele;
- 3) (C) capilares fenestrados: rins, intestino e algumas glândulas endócrinas e exócrinas;
- 4) (D) capilares sinusoidais: fígado, baço e medula óssea marrom.

Além disso, para diferentes tamanhos de nanopartículas conferem-se respostas diferentes de acumulação no organismo.

A ilustração expressa somente a contribuição da morfologia dos poros na permeabilidade de difusão.

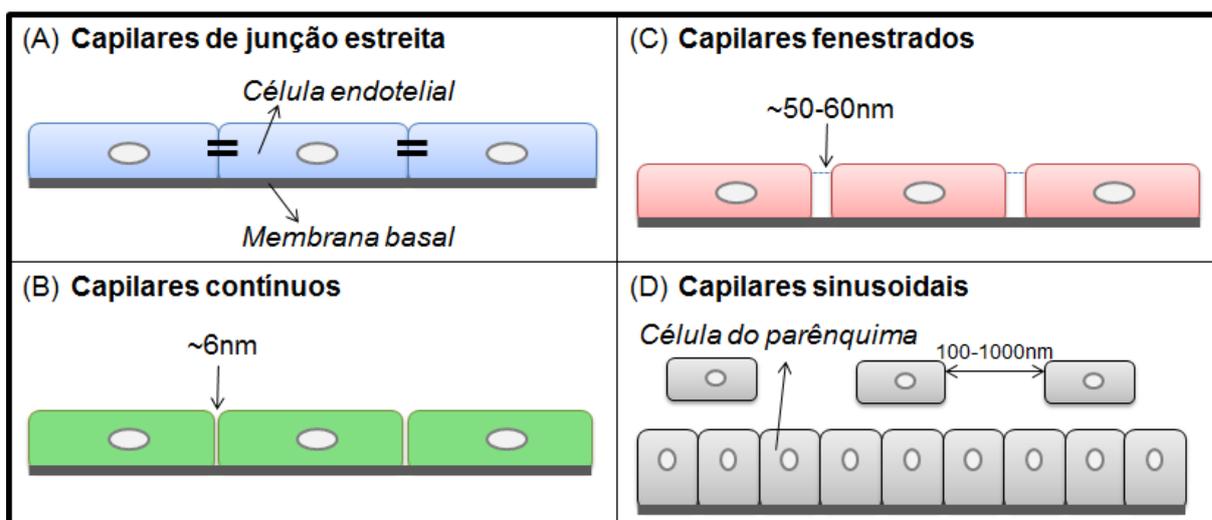


Figura 2. Ilustração esquemática dos poros de diferentes classes de capilares sanguíneos.

Dados interpretados da figura 1 e da tabela 1, ilustram que, no caso de nanopartículas menores que 20 nm^{25, 26}, há a excreção direta pelos túbulos renais, uma vez que os capilares do tipo fenestrados permitem a passagem passiva de estruturas entre 50–60 nm aproximadamente²⁷. No entanto, tamanhos entre 30–150 nm favorecem o acúmulo na medula óssea, coração, rim e estômago^{25, 28}. Quando se trata de nanopartículas maiores (150–300 nm), verifica-se um grande montante em órgãos como fígado e baço²⁹.

Tabela 1. Tamanho de nanopartícula e local de acúmulo no organismo

Tamanho	Local de acúmulo
<20 nm	Excreção renal direta ^{25, 26}
30–150 nm	Medula óssea, coração, rim e estômago ^{25, 28}
150–300 nm	Fígado e baço ²⁹

Recentes pesquisas investigam o comportamento de moléculas biológicas em conjunto com óxidos de nanopartículas metálicas para aplicação no desenvolvimento de estruturas biocompatíveis que podem ser direcionadas para o alvo desejado no corpo^{30, 31}. A funcionalização com biomoléculas (anticorpos monoclonais, peptídeos, oligonucleotídeos ou enzimas) é uma estratégia muito importante para atingir alvos em células ou tecidos específicos³².

Bertorelle e colaboradores (2006)³³ descreveram a preparação e caracterização de nanopartículas bifuncionais contendo óxido magnético no núcleo e DMSA (ácido dimercaptosuccínico) na superfície, além de um marcador fluorescente ligando-se

covalentemente (rodamina B e fluoresceína). As nanopartículas apresentaram alta afinidade para as células (HeLa), o que foi demonstrado através de microscopia de fluorescência e magnetoforese.

A microscopia de fluorescência foi utilizada para monitorar a localização das nanopartículas magnéticas associadas às células. Os resultados evidenciaram a presença de nanopartículas adsorvidas na membrana da célula e internalizadas no interior da célula. Após a internalização, nanopartículas foram confinadas dentro de endossomos, que são vesículas submétricas formadas no processo de endocitose.

Com a aplicação do campo magnético diretamente nos endossomos, comprovou-se que o movimento poderia ser orientado dentro da célula por um campo magnético externo, visto que pequenas cadeias fluorescentes dos endossomos magnéticos foram formadas no citoplasma da célula em direção ao campo magnético aplicado. Ademais, medidas de magnetoforese demonstraram o potencial deste nanomagneto-fluorescente para uso na medicina.

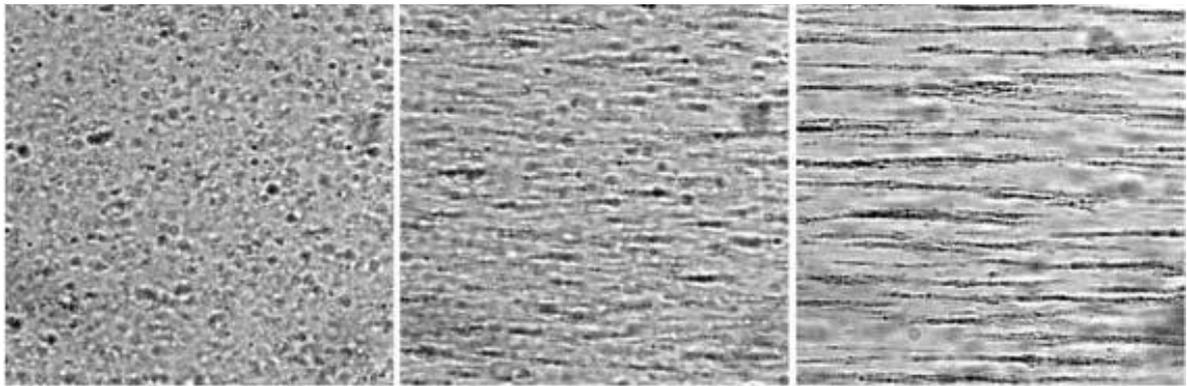
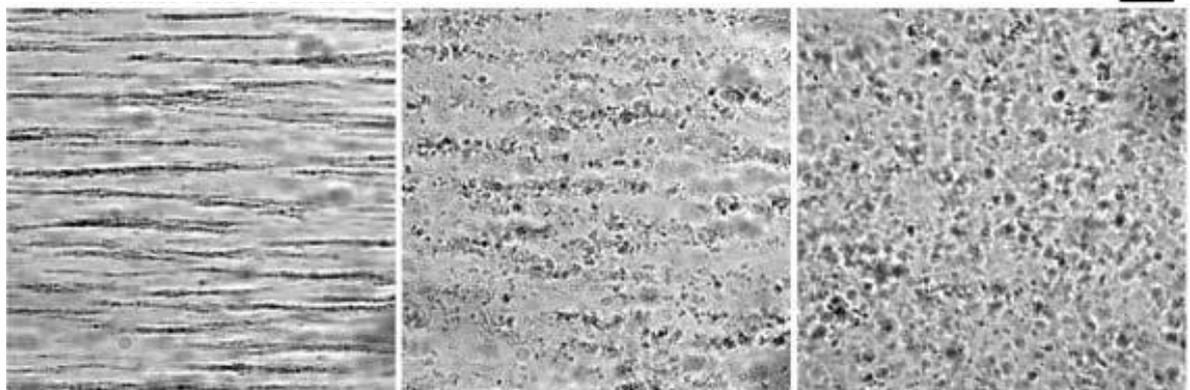
Wilhelm e demais pesquisadores (2008)³⁴ apostaram na formação de vesículas biológicas, formadas pela endocitose e subsequente exocitose de nanopartículas magnéticas, as quais foram sintetizadas sem revestimento.

O objetivo é a aplicação de hipertermia e quimioterapia associadas em um único sistema de liberação para um alvo específico pela atração magnética e monitorado através de método de imagem não invasivo.

As propriedades magnéticas das vesículas foram analisadas na presença de um campo magnético uniforme (100 mT).

Em poucos segundos é possível visualizar, por microscopia óptica com aumento de 63x, a formação de cadeias em direção ao campo magnético devido à interação dipolo-dipolo (Figura 2A).

Após alguns segundos da retirada do campo magnético, percebe-se que as cadeias são reversíveis, pois as vesículas tornam-se aos poucos dispersas e retornando-se à conformação original (Figura 2B). Este fato mostra que as partículas magnéticas foram submetidas à interação repulsiva.

A – Alinhamento das vesículas magnéticas**B – Desintegração das cadeias quando o campo é desligado****Figura 2.** Formação de alinhamento das vesículas magnéticas.

Um estudo mais recente de Wilhelm e outros autores (2010)³⁵ incubaram monócitos e macrófagos com nanopartículas magnéticas revestidas com dois surfactantes diferentes (citrato de sódio aniônico e um grupo glicosil hidrofílico).

O sistema monócito/macrófago apresentou um comportamento dinâmico, com respeito à absorção de óxido de ferro de nanopartículas, permitindo a redistribuição intercelular das partículas magnéticas revestidas. Uma vez interiorizadas pelos monócitos ou macrófagos, as nanopartículas magnéticas podem ser liberadas por células sobre estresse ou ativação. Vesículas de membrana liberadas por células ativadas ou por apoptose transportam os nanomateriais magnéticos pelo espaço extracelular e provocam a sua absorção pelos macrófagos ‘ingênuos’.

A evidência da resposta magnética das microvesículas foi obtida com o auxílio de um ímã (145 mT). Algumas vesículas mostraram movimento dirigido para o ímã após serem liberadas pelas células. A aplicação do campo magnético uniforme resultou também no alinhamento de vesículas na direção de campo, no interior da célula.

No próximo item serão citadas algumas das técnicas de preparação das nanopartículas magnéticas e será explorada melhor a técnica de coprecipitação utilizada neste trabalho de mestrado.

1.3 MÉTODOS PARA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Alguns métodos são apresentados na literatura como sendo promissores do ponto de vista da preparação materiais nanoestruturados magnéticos aplicáveis a estudos de nanotoxicidade e biocompatibilidade^{36, 37}. Nas últimas décadas, um grande número de trabalhos tem se mostrado muito promissores do ponto de vista da preparação de materiais magnéticos funcionalizados^{2, 31, 38, 39}.

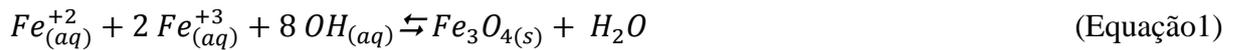
A magnetita é geralmente preparada por três processos: (1) coprecipitação de uma solução aquosa de Fe^{2+} e Fe^{3+} na presença de uma base, usualmente um hidróxido alcalino (NaOH; KOH) ou amônia⁴⁰; (2) decomposição térmica de um complexo de ferro usando um agente oxidante^{41, 42}; e (3) abordagem sonoquímica⁴³.

As nanopartículas de magnetita possuem uma alta relação de área de superfície/volume, a qual provoca agregação da partícula durante formação por van der Waals ou por outra força de atração para reduzir a energia de superfície^{44, 45}. Consequentemente, diversos estudos desenvolvem a síntese mediante a estabilização destas partículas usando diferentes agentes estabilizantes como surfactantes⁴⁶ ou matrizes poliméricas (natural ou sintética)^{47, 48}. Alguns estudos não utilizam agente estabilizante^{42, 49, 50}. Outros acrescentam no final da preparação da magnetita⁵¹⁻⁵³, o qual foi o método de síntese escolhido para esta dissertação.

Dentre os métodos de preparação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, o método de coprecipitação⁴⁶ é um dos mais utilizados devido a sua simplicidade e eficácia^{40, 54}.

1.3.1 Método de coprecipitação

A síntese de magnetita pelo método de coprecipitação consiste basicamente na fabricação de nanopartículas magnéticas em meio alcalino pela adição controlada de uma base que atua como agente de precipitação (Equação 1). Para isso, utiliza-se uma solução de sais ferro a fim de manter uma suspensão de nanopartículas menores⁵⁵ em meio a um polieletrólito⁵⁶ que atua como agente estabilizante das nanopartículas com maior grau de homogeneidade de tamanho e forma^{46, 48, 57}.



A reação pode ocorrer em variações de pH entre 6-14 (Figura 3), as quais resultam diversos composto de óxido de ferro: pH entre 6-7 forma goetita e lepidocrocita. Para pH > 8, obtém-se magnetita e em pH 14, goetita pura é produzida⁵⁵.

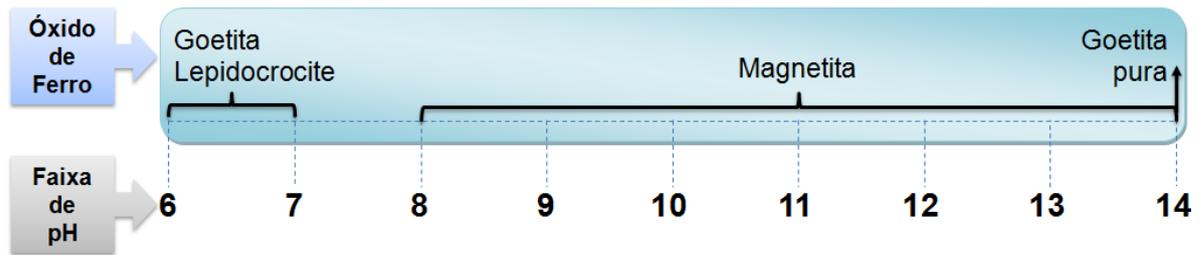


Figura 3. Influência do pH na formação de óxidos de ferro.

Essas suspensões coloidais são conhecidas também como ferrofluidos ou fluidos magnéticos⁵⁴ formados por nanopartículas magnéticas e suas aplicações surgem diretamente de suas características magnéticas. Soluções coloidais de nanopartículas magnéticas são um exemplo clássico, cuja interação com diversos agentes funcionalizantes é amplamente estudado pelos grupos de pesquisa do mundo todo^{15, 58}.

1.3.2 Funcionalização de nanopartículas de magnetita com lipídio

Soluções coloidais como no caso das nanopartículas magnéticas são termodinamicamente instáveis e devem ser estabilizadas em agentes específicos a fim de minimizar os efeitos da energia de superfície⁴⁸.

Uma técnica vastamente explorada na literatura é a formação de lipossomos na presença de suspensão de nanopartículas de magnetita⁵⁹⁻⁶¹.

A seguir serão abordadas condições específicas dos lipossomos: estrutura, classificação, aplicações na medicina, métodos de preparação (tradicionais) e, por fim, tratará da formação de vesículas unilamelares gigantes (GUVs), essenciais para ambientar as nanopartículas de magnetita recobertas com lipídios em um meio biocompativelmente favorável. No tópico 1.5, o assunto da funcionalização de nanopartículas de magnetita com lipídio será um pouco mais explorada.

1.4 LIPOSSOMOS

Em meados dos anos 1960, Alec Bangham e colaboradores⁶² foram pioneiros ao descreverem as propriedades e potenciais aplicações dos lipossomos, também denominados vesículas de fosfolipídios. Demonstraram a capacidade destas vesículas artificiais em tornarem-se barreiras para a difusão de solutos.

Os lipossomos são atóxicos, biodegradáveis e não imunogênicos (não é capaz de produzir reação imune), o que os rotula como eficientes veículos de entrega para compostos biologicamente ativos⁶³ na liberação controlada de fármacos⁶⁴, além do estudo mais aprimorado de membranas biológicas⁶⁵⁻⁶⁷.

Essas vesículas dispõem de uma estrutura esférica e são compostos de moléculas de fosfolipídios que se acumulam organizadamente na forma de bicamada, cuja região central encontra-se delimitada por um volume aquoso⁶⁸.

Podem ser classificadas tanto com relação ao seu tamanho e lamelaridade (vesículas multilamelares (MLV) e vesículas unilamelares pequenas e grandes (SUV e LUV))⁶⁹ e quanto ao seu comportamento perante os fluidos biológicos (lipossomos convencionais, estericamente estabilizados ou “*stealth*”, imunolipossomos ou polimórficos)⁷⁰.

Em virtude do grande número de aplicações dos lipossomos em áreas distintas, surgiram métodos de produção determinados para cada aplicação em específico, como o método laboratorial de Bangham⁶², no qual os lipossomos são formados a partir da hidratação de filmes secos de lipídios.

Resultado da vasta área de aplicação dos lipossomos^{63, 71, 72}, particularmente na área médico-farmacêutica^{69, 72-76}, tais vesículas têm despertado interesse de inúmeros grupos de pesquisa do mundo nos últimos 30 anos⁵⁹.

Assim, com o intuito de promover a entrega de uma determinada substância em um alvo específico, é crescente o emprego, por exemplo, de nanopartículas magnéticas revestidas por lipossomos (magnetolipossomos)²⁰.

O complexo de magnetolipossomos pode ser previamente testado em modelos de membrana (por exemplo, em vesículas unilamelares gigantes)⁷⁷ com o objetivo de prever alterações na membrana e obter resultados preliminares da interação com a membrana biológica.

1.4.1 Estrutura

Os lipossomos podem ser denominados como vesículas lipídicas com formato aproximadamente esférico, cujo volume de água no compartimento central é rodeado por apenas uma ou várias bicamadas lipídicas concêntricas, que são constituídas fundamentalmente por fosfolipídios. A variação de tamanho pode alcançar de nanômetros (nm) até dezenas de micrômetros (μm)^{68, 78, 79}.

Para o entendimento da porção aquosa dos lipossomos, sabe-se que água é um solvente polar, o qual dissolve rapidamente a maioria das biomoléculas, as quais são geralmente compostos polares ou carregadas positiva ou negativamente⁸⁰⁻⁸³.

Compostos dissolvidos facilmente em água, são hidrofílicos, em oposição aos compostos hidrofóbicos (solventes não polares ou apolares), os quais se dissolvem em biomoléculas apolares (lipídios, ceras) como o clorofórmio e benzeno⁸⁴⁻⁸⁶.

No que se refere à composição lipídica, os lipossomos apresentam principalmente na sua estrutura os fosfolipídios, os quais são moléculas de caráter anfifílico (cabeça polar: grupo fosfato ligada a duas cadeias de hidrocarbonetos através de uma molécula de glicerol), visto que esta estrutura possibilita à molécula agregar-se quando em contato com solução aquosa^{87, 88}.

O processo de formação de uma estrutura lipossomal inicia-se com o alinhamento das moléculas coma formação de bicamadas planas, as quais a seguir curvam-se em torno de si mesmas promovendo a estrutura vesicular⁸⁹⁻⁹³. Essa conformação tende a eliminar a interação desfavorável das extremidades expostas às moléculas de água (Figura 4).

Na figura 4 (b) são mostrados os folhetos de bicamadas de membranas e em (c) a transformação em lipossomos. A bicamada (Figura 4 d) apresenta aproximadamente 5 nm de espessura e consiste de moléculas lipídicas dispostas ordenadamente de forma individual com suas caudas hidrofóbicas voltadas uma para a outra e as suas cabeças hidrofílicas voltadas para o meio aquoso interno e externo.

Além das propriedades estruturais, os lipídios apresentam características funcionais amplamente definidos pelo seu tamanho e composição das quatro regiões distintas destacadas no painel (1, 2, 3 e 4).

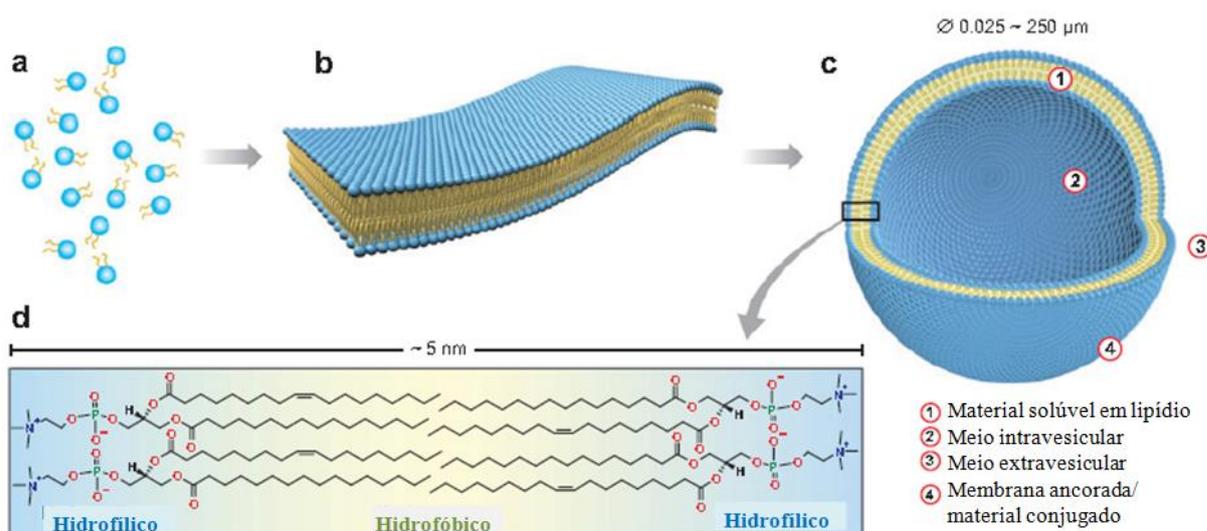


Figura 4. Processo de automontagem de moléculas fosfolípicas.

Nesse momento é possível comparar a estrutura resultante com a membrana celular tanto pela composição lipídica quanto no que se diz respeito às suas funções^{66, 67}. Com a inserção de moléculas dotadas de funções específicas de reconhecimento na estrutura do lipossoma, verifica-se o aumento da sua semelhança com a membrana celular⁹⁴⁻⁹⁷.

Os fosfolipídios (grupo das fosfatidilcolinas, também denominada de lecitina) são os lipídios mais empregados na preparação de lipossomos, uma vez que são o principal lipídio estrutural tanto em membranas biológicas quanto biomédicas, além de apresentarem baixo custo de aquisição se comparado com os demais fosfolipídios e pelo fato de serem quimicamente inertes.

Alguns exemplos desta classe são a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e a cardiolipina (CL) (Figura 5)⁹⁸.

Uma característica interessante da lecitina está na manutenção do perfil de neutralidade em todos os valores de pH fisiológico, decorrente da presença da amônia quaternária na cabeça do lipídio.

De origem sintética ou natural, as fosfatidilcolinas provenientes de extração natural (fonte animal, gema de ovo e vegetal, soja) são compostas de misturas de fosfolipídios com diferentes cadeias (tamanho e grau de insaturação). A estabilidade da estrutura formada pode ser proveniente tanto da adição de açúcares e esteróis (colesterol) quanto da ligação covalente de moléculas de reconhecimento no caso do grupo das fosfatidiletanolaminas, que carregam na superfície grupos amina, que permite a ligação. Algumas moléculas que podem aumentar a estabilidade cinética dos lipossomos são os anticorpos e polímeros como o polietilenoglicol⁹⁹.

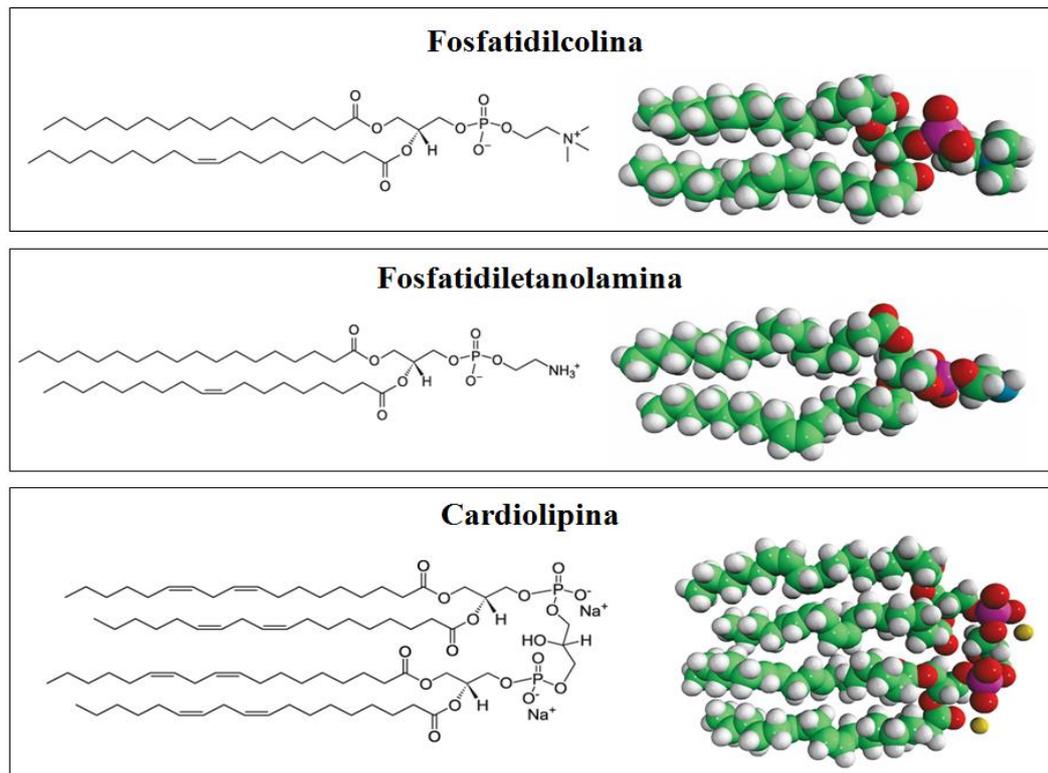


Figura 5. Estrutura química e representação esquemática de PC, PE e CL.

Na Figura 6 destacam-se as porções hidrofóbica (grupos polares) e hidrofílicas (grupos apolares) da estrutura geral da molécula de fosfatidilcolina.

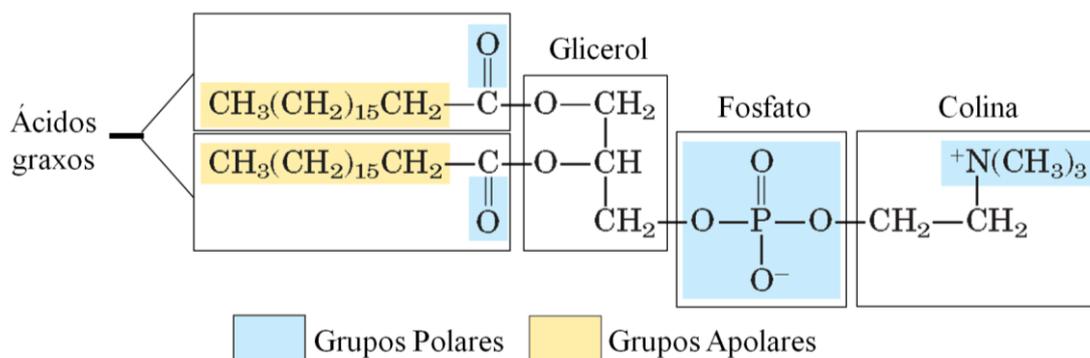


Figura 6. Estrutura de uma molécula de fosfatidilcolina.

O fosfolípido aniônico cardiolipina (difosfatidilglicerol) é encontrado na membrana plasmática de muitos tipos de bactérias gram-negativas e gram-positivas e na mitocôndria e cloroplasto de membranas dos eucariotos. A cardiolipina é relativamente a menor porção (≤ 10 mol%) da composição lipídica total da membrana, onde sua principal função está relacionada às proteínas de membrana¹⁰⁰.

1.4.2 Classificação

Lipossomos são vesículas promissoras como carreadores de fármacos, pois permitem o encapsulamento de compostos hidrofóbicos entre suas bicamadas lipídicas^{85, 101}, como também de substâncias hidrofílicas devido seus compartimentos internos aquosos^{80, 102}. Além desta habilidade, os lipossomos possuem versatilidade estrutural em termos de dimensão, composição, carga de superfície e fluidez da membrana^{103, 104}.

Os lipossomos podem ser classificados de diversas formas⁶³ (Figura 6):

- a) Camadas lipídicas: única bicamada (unilamelar) ou bicamadas múltiplas (multilamelar) em torno do compartimento aquoso.
- b) Tamanho das vesículas:
 - lipossomos unilamelares pequenos – SUVs (do inglês: *Small Unilamellar Vesicles*);
 - lipossomos unilamelares grandes – LUVs (do inglês: *Large Unilamellar Vesicles*);
 - lipossomos unilamelares gigantes – GUVs (do inglês: *Giant Unilamellar Vesicles*).
- c) Método de preparação: VER (vesículas obtidas por evaporação em fase reversa), FPV (vesículas obtidas em prensa de *French*) e EIV (vesículas obtidas por injeção de éter).

Pela Figura 7 é possível visualizar esquematicamente os lipossomos com relação às camadas bilipídicas e de acordo com o tamanho.

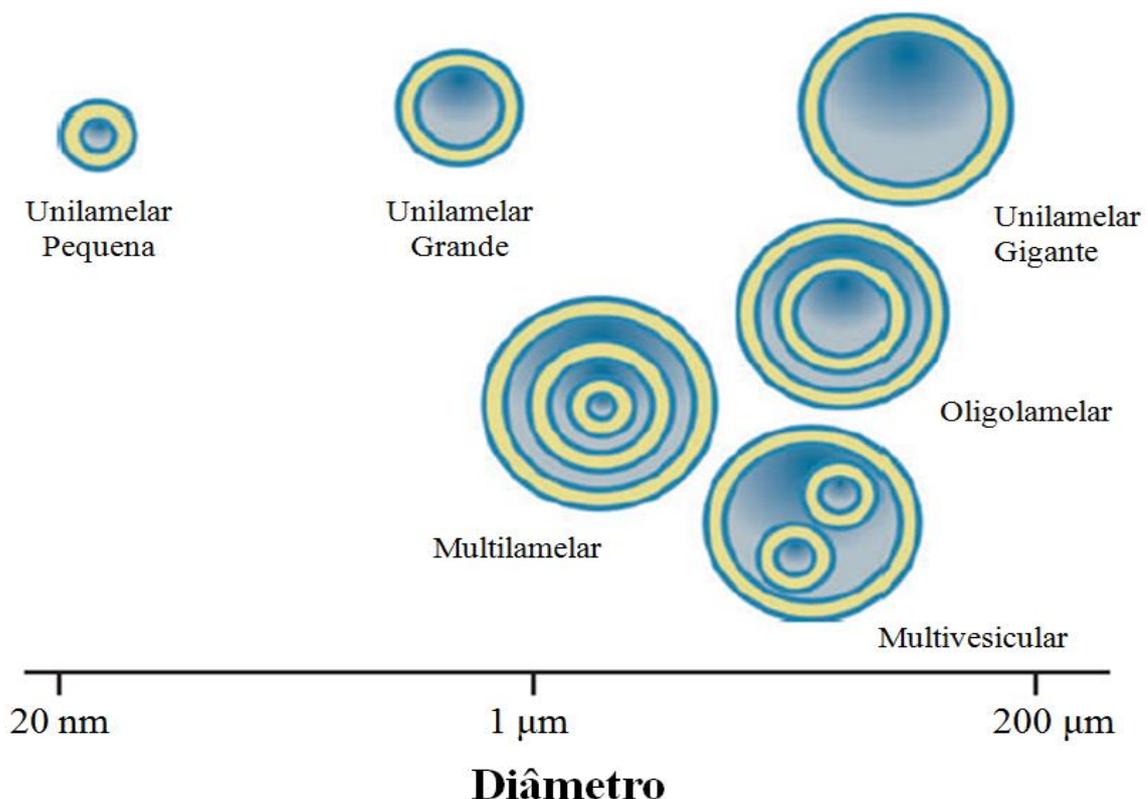


Figura 7. Classificação comumente aplicada para os lipossomos (fora de escala).

Vesículas unilamelares pequenas variam de $\sim 0,02 \mu\text{m}$ a $\sim 0,2 \mu\text{m}$, as vesículas unilamelares grandes de $\sim 0,2 \mu\text{m}$ a $\sim 1 \mu\text{m}$. Vesículas unilamelares gigantes ($> 1 \mu\text{m}$) são os três grupos mais importantes para aplicações analíticas. Vesículas multilamelares são frequentemente usadas em aplicações cosméticas e farmacêuticas. Vesículas multivesiculares são vesículas gigantes encapsulando lipossomos menores e tem sido utilizado na montagem de nanorreatores e como ferramenta de entrega de fármacos⁶³.

De acordo com o tamanho, lipossomos são utilizados ou como modelos celulares¹⁰⁵ (GUVs) ou para aplicações *in vivo*^{106, 107} (LUVs e SUVs).

Tabela 2. Classificação dos lipossomos

TIPOS DE LIPOSSOMOS	
TAMANHO	Vesículas unilamelares pequenas Vesículas unilamelares grandes Vesículas unilamelares gigantes Lipossomos multilamelares grandes
CIRCULAÇÃO <i>in vivo</i>	Lipossomos clássicos ou convencionais Lipossomos estericamente estabilizados (<i>stealth</i>)
LAMELAS	Unilamelar Multilamelar
APLICAÇÃO	Diagnóstico Terapêutico
CARGA DE SUPERFÍCIE	Aniônico Catiônico/Vetor lipossomal de DNA Neutro
LIPOSSOMOS ESPECÍFICOS	ATP lipossomos Hemoglobina lipossomal Imunolipossomos Terapia fotodinâmica Magnetolipossomos Transfersomos Virossomos

Entretanto, a classificação não está relacionada somente ao tamanho dos lipossomos, mas também ao tempo de circulação *in vivo*, à quantidade de lamelas, à carga de superfície, ao

tipo de aplicação, assim como aos lipossomos específicos¹⁰⁸⁻¹¹⁵, os quais são acoplados moléculas peculiares para dinamizar a entrega do lipossomo no sistema biológico (Tabela 2) [Adaptada]^{59, 69}.

Os lipossomos são fáceis de sintetizar, biocompatíveis e atóxicos⁶⁹, além de tornarem-se magnéticos pelo encapsulamento de nanopartículas magnéticas¹⁹ ou fluorescentes quando incorporados fluoróforos na fração lipídica da membrana^{116, 117}.

Com o surgimento de avançados sistemas de carreadores de fármacos, certas alterações foram realizadas na estrutura básica dos lipossomos permitindo ampla aplicação terapêutica e melhorias das formas de interação com a célula, como pode ser observado na Figura 8⁶⁹.

O fármaco pode estar acoplado ao lipossomo especificamente (**a**) ou inespecificamente (**b**) sobre a superfície da célula. Lipossomos também podem fundir-se à membrana da célula (**c**) e liberar seu conteúdo para o citoplasma da célula ou pode ser desestabilizada por certos componentes da membrana da célula adsorvidos na superfície (**d**) de modo que o fármaco liberado possa entrar na célula por micropinocitose.

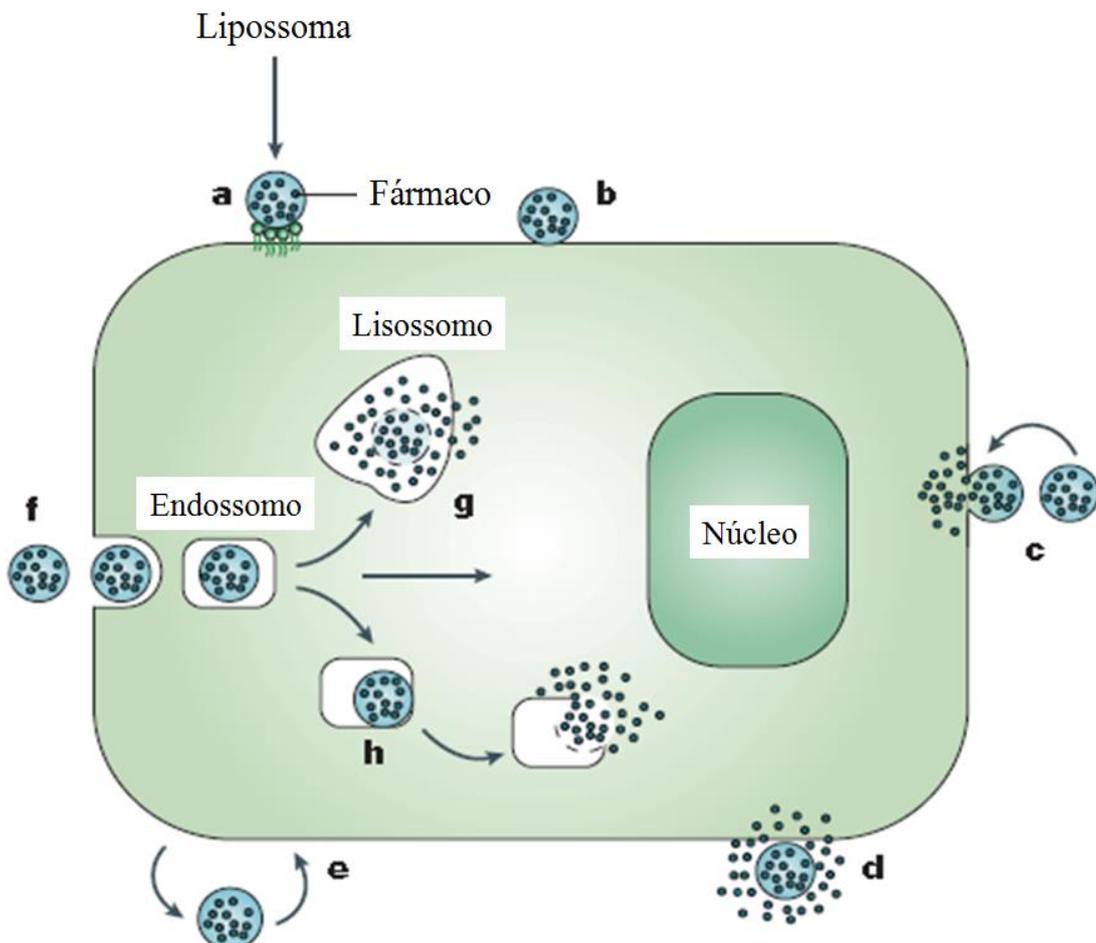


Figura 8. Interação lipossoma-célula.

O lipossomo pode sofrer a troca direta ou transferência mediada por proteína dos componentes lipídicos com a membrana da célula (e) ou ser submetido a uma endocitose específica ou inespecífica (f). No caso da endocitose, um lipossoma pode ser transportado por um endossomo para o interior de um lisossomo (g) ou ao invés de ir para o lisossomo, o lipossoma pode provocar uma desestabilização no endossomo (h), a qual resulta na liberação do fármaco no citoplasma da célula.

1.4.3 Aplicações na Medicina

Lipossomos também são usados para terapia gênica, como vetores de entrega de DNA o que os torna alvo de grandes esforços e de esperanças da pesquisa médica^{96, 118-123}. Recentemente, o desenvolvimento de veículos de vacinação com DNA utilizando lipossomos¹²⁴⁻¹²⁷ possibilitou o aumento da resposta imune⁹⁷.

A principal vantagem do uso de lipossomos em sistemas de entrega de fármacos em tumores é a possibilidade de reduzir os efeitos tóxicos dos fármacos¹²⁸⁻¹³² e aumentar o tempo de circulação¹³³⁻¹³⁸ e, dessa forma, eficiência dos fármacos.

O contato do lipossomo com a circulação sanguínea pode ser por um curto período de tempo (poucos minutos) ou por muitas horas (até dias) caso sejam estáveis (requisito alcançado primordialmente através da compreensão das características físico-químicas e interação com fluidos biológicos⁶³) e não sejam reconhecidos pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM)¹³⁹⁻¹⁴³.

Uma das dificuldades relacionadas aos lipossomos é quando há a rápida liberação no sangue, devido à adsorção de proteínas plasmáticas (opsoninas) com a membrana fosfolipídica^{144, 145}, assim como o reconhecimento e captação dos lipossomos pelos macrófagos¹³⁰.

A depuração plasmática (capacidade de retirada, pelos rins, de alguma substância da corrente sanguínea) de lipossomos clássicos aumenta de forma diretamente proporcional ao tamanho^{106, 146} e na presença de carga de superfície¹⁴⁷.

As vesículas maiores são rapidamente removidas da circulação por macrófagos, enquanto lipossomos menores (≤ 100 nm) circulam por mais tempo, pois demoram um pouco mais para serem reconhecidos e fagocitados, cuja penetração nos tecidos é favorecida^{133, 148}. Assim, é possível conferir propriedades farmacológicas mais avançadas aos lipossomos que encapsulam fármacos e vacinas em comparação aos medicamentos tradicionais^{69, 97}.

Na terapia fotodinâmica, por exemplo, ocorre o direcionamento ativo de fotossensores por lipossomos provocando um acúmulo do fármaco no tumor. O efeito desejado é a

potencialização da ação fotodinâmica mediante a internalização celular do fotossensor, reduzindo os efeitos colaterais intrínsecos da terapia fotodinâmica aplicada na atualidade¹¹³.

1.4.4 Métodos de Preparação

As propriedades favoráveis dos lipossomos como carreadores de fármacos foram primeiramente reconhecidas nos anos de 1970 e 1980 e o número de aplicações biofarmacêuticas aumentou rapidamente desde então¹⁴⁹.

A necessidade por formulações de carreadores lipossomais de fármacos tem estimulado a investigação de procedimentos de preparação de lipossomos. Há, pelo menos, quatro metodologias em uso na atualidade, incluindo métodos baseados em filmes secos ou emulsões de lipídios e métodos envolvendo o uso de formação de micelas detergentes ou os princípios da injeção de solventes⁷⁸.

1.4.4.1 Métodos Tradicionais

Para o carreamento de fármacos, os lipossomos podem ser formulados como uma suspensão, como um aerosol ou em uma formulação (semi) sólida como um gel e creme; *in vivo*, podem ser administrados topicamente^{93, 150-154} ou de forma parenteral^{63, 155, 156}.

Há uma vasta diversidade de métodos convencionais para produzir lipossomos¹⁵⁷, incluindo o método de Bangham ou método de evaporação de camada fina⁶², método de evaporação em fase reversa (REV)⁸⁹, método de remoção de detergentes¹⁵⁸, método de injeção de éter/álcool etílico^{89, 159}, o método de emulsão¹⁶⁰ e o método de hidratação do filme seco¹⁶¹.

O método de hidratação do filme seco de lipídios consiste na solubilização de um ou mais lipídios em solvente orgânico seguida de evaporação deste solvente a vácuo. O filme seco, formado no fundo de um balão de vidro ou um tubo de ensaio, é hidratado com solução aquosa contendo o composto hidrofílico a ser encapsulado. Sob agitação, os lipossomos são eficientemente formados gerando uma população heterogênea e dispersa de MLVs, a qual pode ser obtida com menor tamanho e com distribuição estreita caso as vesículas multilamelares sejam submetidas à sonicação (tamanhos menores) ou passadas pelo extrusor (distribuição mais estreita de tamanhos)^{162, 163}.

A hidratação do filme pode ser realizada com água ou solução tampão, sob agitação magnética vigorosa. O encapsulamento do ativo pode suceder pela incorporação na solução tampão (hidrofílicos) ou dissolvido na mistura lipídica (lipofílicos). A maior desvantagem

deste sistema, contudo, é a baixa encapsulação para fármacos hidrofílicos⁶⁴, os quais poderiam ser sintetizados por rotas alternativas como injeção de solventes voláteis¹⁶⁴.

1.4.5 Formação de vesículas unilamelares gigantes (GUVs)

As membranas artificiais, como modelo para o complexo de membranas biológicas, têm sido amplamente exploradas no desenvolvimento de pesquisas biomoleculares da membrana, dessa forma, entre os sistemas disponíveis para microscopia óptica, GUVs representam uma excelente escolha¹⁶⁵. Os artefatos presentes nas membranas biológicas são totalmente ausente em GUVs, além de possibilitarem a visualização de uma única esfera, cuja curvatura é semelhante à de uma célula (Figura 9), com tamanho que varia de 5 até 200 μm de diâmetro¹⁶⁶.

A água está presente na parte interna e externa da bicamada lipídica (Figura 9), na qual vários modos de microscopia óptica podem ser usados para visualizar as vesículas gigantes, incluindo contraste por interferência diferencial, fluorescência e contraste de fase¹⁶⁶.

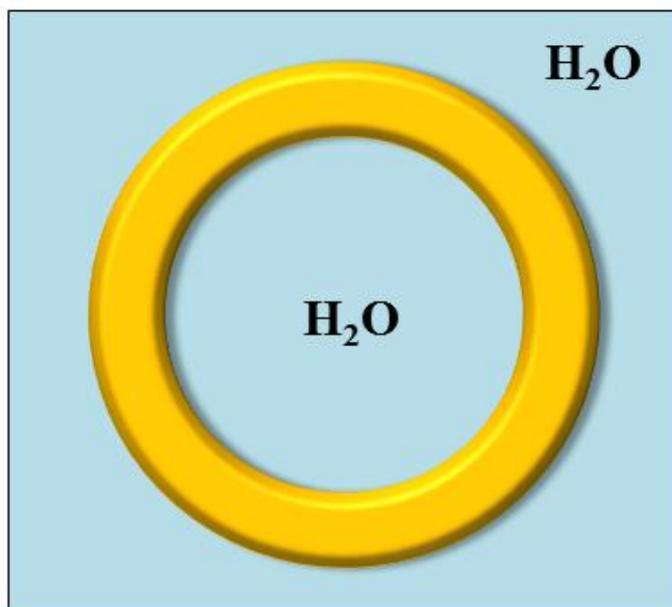


Figura 9. Vesículas gigantes.

Por causa do seu tamanho, GUVs podem ser observadas pelo microscópio de luz e de fluorescência, ao passo que lipossomos convencionais necessitam do microscópio eletrônico (transmissão e varredura) para visualização¹⁶⁷.

GUVs têm sido investigada em vários aspectos de aplicação, incluindo mapeamento de diagrama de fases^{168, 169}, investigação da interação proteína-lipídios¹⁷⁰, investigação das transições de fase 2D e determinação da tensão de superfície entre domínios lipídicos¹⁷¹.

GUVs na presença de nanopartículas magnéticas (GUVs magnéticas) são usadas como modelo celular para testar as propriedades da membrana pela deformação gerada nas GUV com o campo magnético ou para estudar a formação de poros. Assim, com o intuito de melhor visualizar as deformações do lipossomo e medir a permeabilidade da membrana, adiciona-se um corante fluorescente no interior aquoso do lipossomo^{115, 172}.

O presente trabalho descreve o processo de incubação de nanopartículas que são magnéticas e fluorescentes (adição de rodamina) na GUV. A principal vantagem desse procedimento é a obtenção de partículas bifuncionais que podem apresentar comportamentos, que podem ser registrados pela microscopia confocal em tempo real. Isso permite um estudo da relação entre a deformação do sistema quando um campo magnético é aplicado.

1.5 MAGNETOLIPOSSOMOS

A incorporação da suspensão magnética^{173, 174} no núcleo dos lipossomos (bicamada fosfolipídica) produz magnetolipossomos^{20, 175}, que podem ser atraídos no conteúdo de uma suspensão usando um ímã e são considerados estruturas fisiologicamente estáveis.

Há um interesse crescente na utilização de magnetolipossomos aplicados na área biomédica, pois oferecem grande versatilidade e biocompatibilidade típicos de sistemas lipossomais²⁰. Além disso, têm recebido atenção especial, pois podem ser guiados para um alvo específico mediante a aplicação de um campo magnético externo¹⁷⁶.

Desde a década de 1980, inúmeros pesquisadores trabalham na síntese e caracterização de magnetolipossomos^{177; 178}, com o intuito de torná-los viáveis como dispositivos para entrega de fármacos^{19, 179-184}.

Para gerar essas estruturas, como pode ser visualizado na figura 10, a suspensão magnética hidrofílica pode ser sintetizada, entre diversas técnicas no processo de fabricação dos magnetolipossomos^{20, 185}, por coprecipitação (1), método no qual os sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} são precipitados na presença de uma base forte (NH_4OH)¹⁸⁶.

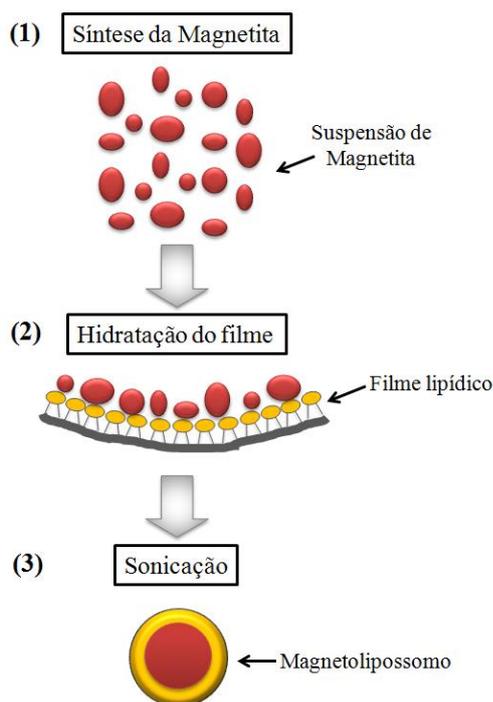


Figura 10. Síntese do magnetolipossomo.

A suspensão magnética é injetada em um filme de lipídios (2), com composição previamente determinada, cujo banho de ultrassom permite o descolamento da parede do tubo de ensaio dessa camada lipídica auxiliando na formação das vesículas contendo a partícula de magnetita.

A sonicação aplica alta energia, na forma de ondas ultrassônicas, para dispersar as vesículas lipossômicas. As bicamadas lipídicas são ‘quebradas’ em partes menores. Seguindo o mesmo mecanismo de formação dos lipossomos, pequenos fragmentos de bicamadas se rearranjam para gerar novas vesículas. Apesar da baixa energia do ultrassom de banho (35–80 W), este foi o método preferencial, pois há um sério problema de contaminação pelo metal do ultrassom de ponta. Assim, é comum gerar SUVs com baixa homogeneidade¹⁸⁷.

O entrapamento da suspensão de magnetita no núcleo do lipossomo produz os magnetolipossomos (3), os quais podem ser facilmente capturados da suspensão usando um campo magnético e aplicados em testes com modelos de membranas como mencionado no tópico anterior.

Algumas das mais exploradas aplicações para os magnetolipossomos foram relatadas no artigo de revisão de Soenen, Hodenius e De Cuyper (2009)²⁰, que engloba o uso na biomedicina e na biotecnologia, na qual os magnetolipossomos são eficientemente utilizados para detectar ou capturar moléculas ou células específicas, além de constituírem estruturas

extraordinárias para abrigar enzimas purificadas de membranas e podem ser aplicados com sucesso em vários tipos de biorreatores magneticamente controlados.

Na área biomédica, os autores ainda enfocam o uso em ressonância magnética (RM), na qual núcleos de óxidos de ferro ligados em uma bicamada lipídica causam partículas muito mais estáveis e uma melhora na biocompatibilidade, permitindo em longo prazo um monitoramento celular por RM. Por outro lado, a natureza versátil de recobrimentos por lipídios propiciam a interação tanto com fármacos hidrofóbicos quanto hidrofílicos. Assim, direcionamentos específicos da estrutura fármaco-magnetolipossomo podem gerar um aumento na captação celular e um aprimoramento no efeito terapêutico.

A terceira e última aplicação na área biomédica é a hipertermia. As propriedades magnéticas dos magnetolipossomos permitem o tratamento do câncer por hipertermia, enquanto o revestimento versátil com lipídios aperfeiçoa a eficiência e a especificidade. Promove assim, a terapia combinada da liberação de fármacos por efeitos termossensíveis e atividades antitumorais imunológicas²⁰.

Em 2005, um grupo de pesquisa da França¹⁸⁸, estabilizou estericamente por cadeias de PEG (polietilenoglicol) lipossomos unilamelares com diâmetro de 200 nm contendo partículas superparamagnéticas de maghemita com concentração variada. Os magnetolipossomos (LUVs) apresentaram alta estabilidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*, atoxicidade e maior duração na corrente sanguínea. Uma consequência importante desses resultados é que a encapsulação com lipossomos preservou o comportamento superparamagnético da suspensão magnética, demonstrado por curvas de magnetização antes e depois do recobrimento.

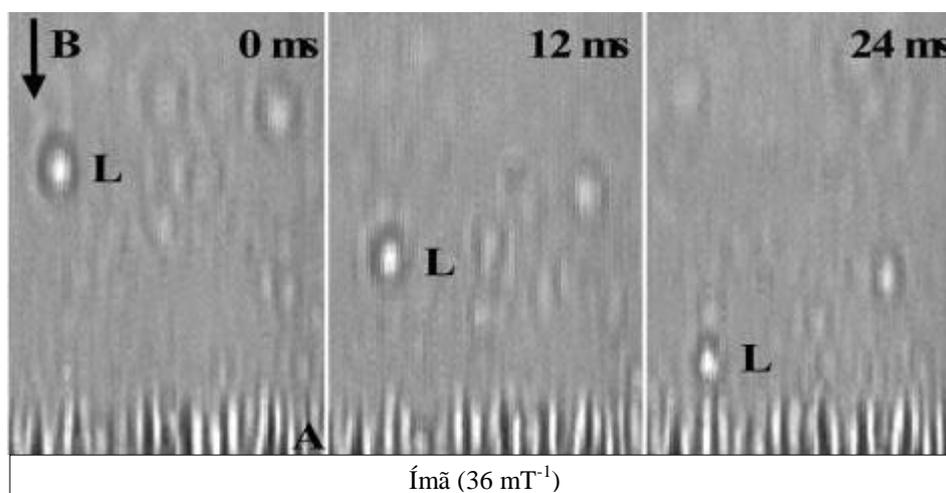


Figura 11. Evidência da mobilidade magnetoforética.

A evidência da mobilidade magnetoforética foi comprovada quando os magnetolipossomos incubados em células foram submetidos a um gradiente de campo magnético (Figura 11) de 36 T/m (campo magnético B de 360 mT).

Tanto a acumulação de lipossomos (L) alinhados ao longo das linhas do campo magnético (A) quanto o tempo (ms) são indicados na figura 11.

Este estudo encorajou para o grupo inúmeros outros *in vitro* (células humanas de adenocarcinoma prostático¹⁸⁹; cinética de interação entre magnetolipossomos revestido com PEG incubados em macrófagos¹⁹⁰) e *in vivo* (monitoramento por RM de magnetolipossomos em tumores sólidos¹⁹¹ e por microscopia confocal de fluorescência¹⁹² e obtenção de imagens dinâmicas da ação intravascular cerebral específica de suspensões magnéticas encapsuladas por lipossomos¹⁹³) com a aplicação de magnetolipossomos.

1.6 APLICAÇÃO EM MODELOS DE MEMBRANA

As LUVs, devido ao diâmetro submicrométrico, são utilizadas comumente para aplicações *in vivo*, enquanto as GUVs, com um diâmetro entre 1 – 100 um, mas com arranjo da bicamada lipídica idêntico, podem ser aplicadas em modelos de membrana¹⁹⁴ com visualização por técnicas de microscopia óptica das perturbações na membrana que ocorrem depois da aplicação de um estímulo externo^{195, 196}.

Os agentes que respondem são partículas magnéticas, que podem ser facilmente encapsuladas no interior de vesículas lipídicas e dirigirem-se para locais específicos do corpo sob a força de um campo magnético externo^{197, 198}.

GUVs magnéticas são usadas como modelo de membrana para testar as propriedades de membrana pela sua deformação em um campo magnético¹⁹⁹ ou para estudar as formações de poros³³. Inserir um marcador fluorescente no interior aquoso do lipossomo permite medir a permeabilidade da membrana²⁰⁰ e visualizar melhor as deformações no lipossomo¹⁹⁵.

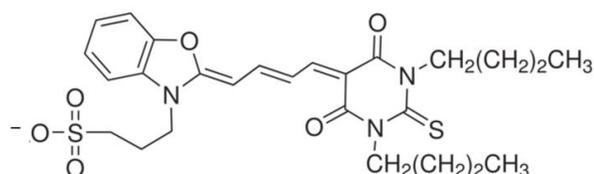


Figura 12. Estrutura do marcador fluorescente MC 540.

A merocianina 540 (MC 540) é um marcador fluorescente (Figura 12), cujas propriedades ópticas dependem da polaridade do meio. Na presença de uma bicamada

lipídica, MC 540 liga-se à superfície da membrana e altera simultaneamente as suas propriedades de fluorescência²⁰¹.

Na literatura, outros marcadores são acoplados à nanopartícula magnética, como a rodamina B, a fluoresceína isotiocianato (FITC) e a rodamina isotiocianato (RITC). A tabela 3 descreve algumas pesquisas desenvolvidas recentemente com o interesse de estudar os efeitos no modelo de membrana caracterizado pela GUV.

Tabela 3. Estudos de nanopartículas magnéticas encapsuladas em GUVs.

Nanopartícula Magnética	Marcador Fluorescente	Lipossomos Preparados	Ref.
Ferrita de cobalto	Rodamina B	GUVs na presença da nanopartícula magnética	202
Maghemita	Rodamina B	GUVs na presença da nanopartícula magnética	203
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{@SiO}_2$	RITC e FITC	GUVs preparadas em separado Adição da NM depois	204
Maghemita	Rodamina B	GUVs na presença da nanopartícula magnética	205

Estes resultados representam o panorama geral com relação às nanopartículas magnéticas associadas a modelos de membrana. Inicialmente, pode-se observar que as nanopartículas magnéticas são sintetizadas em um primeiro momento (com diversos agentes funcionalizantes diferentes, no entanto, não são funcionalizadas com lipossomos nestes processos de síntese) e, logo em seguida, liga-se a um marcador fluorescente (rodamina B, RITC, FITC, entre outros). Finalizada essa primeira etapa, a nanopartícula magnética é encapsulada em vesículas gigantes de duas formas distintas: durante o processo de eletroformação da GUV ou a NM é incubada em um meio já contendo as GUVs. Em ambos os momentos, a GUV final é denominada GUV magnética. Com relação aos efeitos na membrana quando o campo magnético é aplicado nos testes de magnetoforese, é notável o alinhamento das nanopartículas magnéticas dentro da vesícula lipídica em alguns casos. Ainda sob a influência do campo magnético, na maioria, perturbações na membrana podem ser visualizadas com a alteração do formato da GUV²⁰²⁻²⁰⁵.

Neste contexto, vislumbra-se o desenvolvimento de nanopartículas de magnetita encapsuladas com lipídios para aplicação em modelo de membrana constituído por vesículas unilamelares gigantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos principais desta dissertação foram sintetizar e caracterizar nanopartículas de magnetita e desenvolver o encapsulamento das nanopartículas de magnetita em lipossomos, gerando os magnetolipossomos (LUVs). Além de avaliar o comportamento dos magnetolipossomos em modelos de membrana representado pelas vesículas unilamelares gigantes (GUV).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em particular, objetivou-se conferir biocompatibilidade à suspensão de magnetita com a promoção da interação entre a magnetita e os filmes lipídicos. Por fim, almejou-se verificar a existência de fusão entre LUVs e GUVs.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

3.1.1 Suspensão de magnetita

Cloreto férrico 98% (FeCl_3 anidro), cloreto ferroso tetraidratado 98% ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), provenientes da Sigma Aldrich; hidróxido de amônio 27% (NH_4OH), adquirido da VETEC. Agitador mecânico 2.000 rpm; cilindro N_2 ; manta aquecedora; medidor de bancada de pH.

3.1.2 Filmes lipídicos

Lipídios: Fosfatidilcolina (PC) 20 mg/mL – gema do ovo (P.M. 760,09 g/mol); Dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE – lipídio neutro) (P.M. 744,03 g/mol); Cardiolipina (CL) (P.M. 1450,00 g/mol) adquiridos na Avanti Polar (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL); clorofórmio. Ultrassom de banho (Potência e frequência de sonicação 40 W máx, 40 kHz) para preparar vesículas fosfolipídicas; tubos de ensaio; cilindro de N_2 .

3.1.3 Magnetolipossomos

Suspensão de magnetita (1,2 mg/mL) preparada com a ressuspensão do pó de magnetita em meio aquoso; filme lipídico (PC, PCCL e PCCLPE); vórtex e ultrassom de banho.

3.1.4 Vesículas unilamelares gigantes (GUVs)

Lipídios: Fosfatidilcolina 20 mg/mL (P.M. 760,09 g/mol); Fosfatidiletanolamina (PE), Cardiolipina (P.M. 1450,00 g/mol), obtidos pela Avanti Polar (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL). Clorofórmio; merocianina 540 (MC 540: sódio 3-[(2Z)-2-[(E)-4-(1,3-Dibuill-2,4,6-trioxo-5-hexahidropirimidinalidena)but-2-enilideno]-1,3-benzoxazol-3-yl]propa no-1-sulfonato) procedente da Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, EUA); solução de sacarose 0,2 M (P.M. 342,30 g/mol); solução de glicose 0,2 M (P.M. 180,16 g/mol). Gerador de funções (MFG-4202; Minipa); espaçador de teflon; lâmina de vidro recoberta com uma fina camada de ITO ($\text{In}_2\text{O}_3/\text{SnO}_2$ 90%/10%); microscópio óptico invertido Axiovert 200 (Carl Zeiss, Jena, Germany), objetiva FS15 de 20x e 40x. As imagens foram obtidas utilizando o programa *AxioCam HSm Digital Camera* (Carl Zeiss).

3.2 METODOLOGIA

Os processos envolvidos nesta dissertação compreendem a síntese e caracterização da magnetita, a preparação dos filmes lipídicos para confecção de magnetolipossomos (suspensão de magnetita + filme lipídico), os quais foram visualizados por microscopia óptica na presença e ausência de campo magnético quando misturados em um meio contendo vesículas unilamelares gigantes. As imagens representativas das sínteses são meramente ilustrativas e não estão em escala.

3.2.1 Síntese da suspensão de magnetita

Foram elaborados dois métodos de síntese de magnetita com o objetivo de obter nanopartículas de magnetita polidispersa. O primeiro método testado gerou partículas micrométricas de magnetita sendo denominado neste trabalho de Método Micro. Para alcançar a meta desta parte inicial, um método diferente foi aplicado, no qual resultou na geração de nanopartículas de magnetita polidispersa. Os detalhes de cada etapa e suas diferenças estão citados nos dois subitens seguintes.

3.2.1.1 Método Micro

Micropartículas de Fe_3O_4 foram obtidas por coprecipitação em uma reação de alcalinização controlada⁴⁰, a partir da adição de 5 mL de NH_4OH concentrado (27%) em 50 mL de solução de cloreto de ferro II tetra-hidratado (FeCl_2 , 25 mmol L^{-1}) e 50 mL de cloreto de ferro III (FeCl_3 , 50 mmol L^{-1}) sob agitação com o auxílio de um agitador magnético (coloquialmente denominado peixinho) durante 30 minutos.

A visualização do processo de síntese pode ser observada na Figura 13.

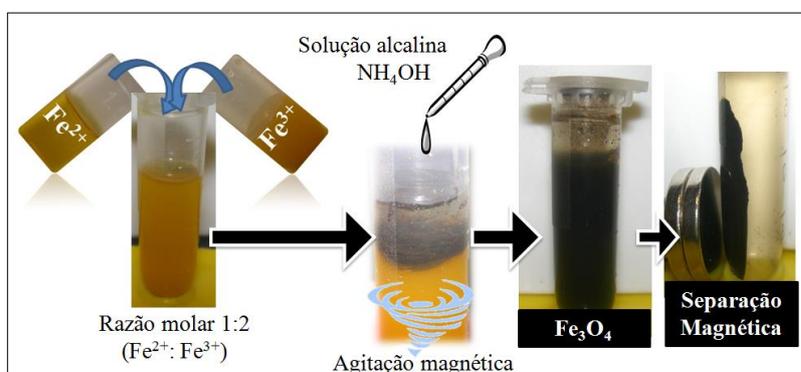


Figura 13. Esquema da síntese (Método Micro) em pequena escala.

Não foi acrescentado agente estabilizante (surfactante) durante o processo de síntese. A formação do precipitado negro (suspensão de magnetita) foi observada, cuja separação foi feita através de um ímã, lavando-o até que o sobrenadante resultasse em um $\text{pH} \approx 6,5$ e a seguir foi seco em estufa a 60°C e armazenado sob a forma de pó em temperatura ambiente.

3.2.1.2 Método Nano

O método de síntese das nanopartículas de Fe_3O_4 polidispersa advém da seleção de várias técnicas^{50, 53, 186} até obter o processo assim como descrito abaixo.

Nanopartículas de Fe_3O_4 polidispersa foram obtidas por coprecipitação em uma reação de alcalinização controlada, a partir da adição de 33,5 mL de NH_4OH concentrado (27%) em 100 mL de solução de cloreto de Fe^{2+} tetra-hidratado ($\text{FeCl}_2 - 25 \text{ mmol L}^{-1}$) e 100 mL de cloreto de Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3 - 50 \text{ mmol L}^{-1}$) durante 30 minutos. O sistema foi previamente aquecido a uma temperatura variando de 40 a 60°C , sob forte agitação com o auxílio de um agitador mecânico (2.000 rpm) e com desgaseificação com fonte de N_2 por 10 minutos antes de iniciar a adição da base. A base para de ser adicionada quando o pH apresenta-se em torno de 10 – 12 (Figura 14). O sistema reacional foi mantido em atmosfera inerte borbulhando-se gás nitrogênio, até completar meia hora de agitação após o início da adição da base. Como realizado no método Micro, não foi adicionado durante o processo de síntese agente estabilizante (surfactante).



Figura 14. Montagem do agitador magnético e acessórios.

A formação do precipitado negro (suspensão de magnetita) foi observada, cuja separação foi feita através de um ímã, lavando-o até que o sobrenadante resultasse em um pH $\approx 6,5$. A seguir, assim como no Método Micro, o precipitado negro foi seco a 60°C em estufa e armazenado sob a forma de pó em temperatura ambiente para caracterizações posteriores. As principais diferenças entre os dois métodos podem ser observadas na tabela 4.

Tabela 4. Principais diferenças entre os métodos Micro e Nano

MÉTODO	AGITAÇÃO	TEMPERATURA	pH	ATMOSFERA	TEMPO DE REAÇÃO*
MICRO	Agitador Magnético	Ambiente	Sem controle	Ambiente	~ 2 minutos
NANO	Agitador Mecânico (2.000 rpm**)	40 – 60 °C	10 – 12	N ₂	30 minutos

* Consiste no tempo desde quando se inicia a adição da base na solução de sais de ferro até o momento em que o sistema reacional (agitação) é desligado. ** Rotação por minuto.

3.2.2 Preparação dos filmes lipídicos e hidratação

Através do método de hidratação do filme seco dos lipídios PC 20 mg/mL (100%), PCCL (75%/15%) e PCPECL (65%/20%/15%) foram dissolvidos em clorofórmio e adicionou-se os volumes (PC: 75 μL ; PCCL: 63,75 μL e 11,25 μL ; PCPECL) em cada tubo de ensaio, individualmente, os quais foram submetidos ao processo de evaporação com o auxílio de um cilindro de gás nitrogênio, para secar a solução (Figura 15). Logo em seguida o filme foi ressuscitado com uma suspensão de magnetita (processo detalhado no próximo tópico).

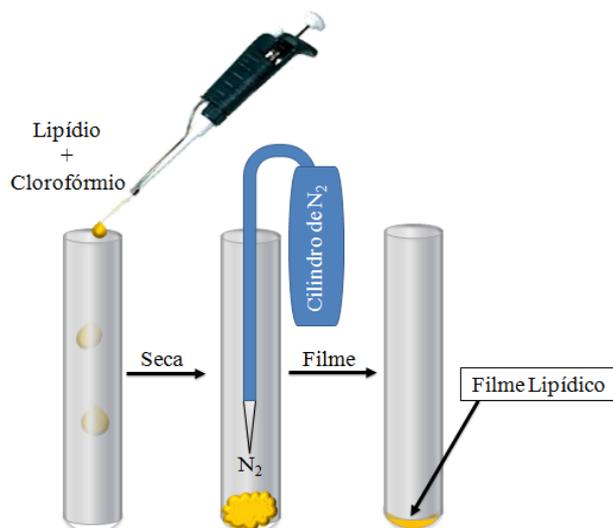


Figura 15. Preparação dos filmes secos de lipídicos (PC, PCCL ou PCPECL).

Para hidratar os filmes de lipídios, agitou-se vigorosamente o tubo de ensaio por cerca de 10 segundos em vórtex com o solvente adequado (glicose: para gerar a solução controle de lipossomos; suspensão de magnetita: para formação de magnetolipossomos), acompanhada de um posterior banho de ultrassom por 30 minutos.

Amostras que continham somente os lipossomos (controle) foram confeccionadas em separado (seguindo o método de hidratação de filme seco) para permitir a correlação dos resultados de estabilidade (potencial zeta) com os dos magnetolipossomos.

O filme de PCPECL será utilizado somente durante os testes com os modelos de membrana.

3.2.3 Formação dos Magnetolipossomos

Um volume de 2 mL da suspensão de magnetita (1,2 mg/mL) foi adicionado ao filme lipídico, o qual foi previamente preparado (tópico 3.2.2). De acordo com a figura 16, durante aproximadamente 10 segundos a amostra no tubo de ensaio foi agitada com vigor (vórtex), seguida da incubação em um ultrassom de banho (temperatura ambiente), durante 30 minutos, para hidratar os lipídios auxiliando na formação dos magnetolipossomos.

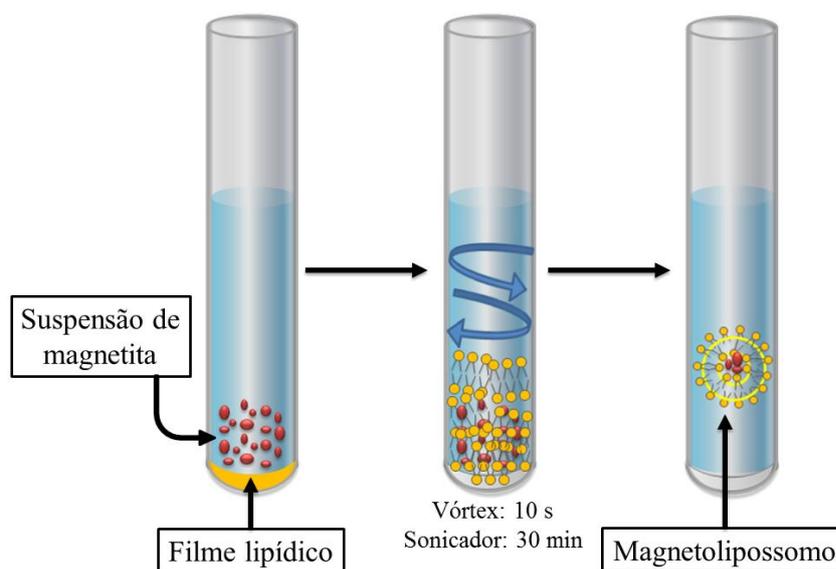


Figura 16. Preparação dos magnetolipossomos.

Os experimentos foram realizados com dois tipos diferentes de magnetolipossomos: $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PC}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCCL}$, exceto nas aplicações com GUV, na qual os testes foram conduzidos com a formulação de PCPECL tanto para a formação da vesícula gigante quanto para a mistura lipídica utilizada para encapsular as nanopartículas de magnetita.

3.2.4 Síntese das vesículas unilamelares gigantes (GUVs)

As vesículas gigantes foram preparadas pelo método de eletroformação similar ao descrito inicialmente por Angelova e colaboradores²⁰⁶ com as seguintes concentrações de lipídios: PC (65%), PE (20%) e CL (15%).

Dessa forma, em duas placas de vidro, ambas contendo uma superfície condutora (ITO), adicionou-se a solução em clorofórmio da mistura dos lipídios (10 μL) com o auxílio de uma microsseringa de modo a deixar uniforme e laminar a distribuição de lipídios nas placas (Figura 17).

Dois prendedores mantêm as duas lâminas fixas ao espaçador. O compartimento foi preenchido com solução de sacarose e um campo de corrente alternada (tipicamente 1.0 V pico-a-pico) foi aplicado às superfícies de ITO para iniciar a eletroformação²⁰⁷.

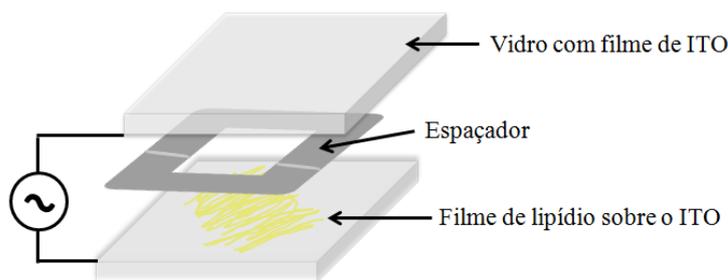


Figura 17. Câmara de eletroformação das GUVs [Adaptada].

Por um espaçador de teflon (2 mm de espessura), as lâminas de vidro ficaram separadas e a seguir foram presas com pregadores. Deixou-se um espaço mínimo em ambos os lados das placas para conectar os contatos elétricos.

Após a montagem desta câmara de eletro-inchamento de vesículas foi completado com solução de sacarose 0,2 M (2,0 – 2,5 mL) e conectado a um gerador de funções (Minipa MFG-4202) com 1 V e 10 Hz de frequência por no mínimo 2 horas. Na figura 18 é possível visualizar o equipamento montado com os acessórios.

Ao término dos 120 minutos, a solução de vesículas foi extraída e diluída em 10 vezes numa solução de glicose 0,2 M. A formação de assimetria de açúcares entre o interior e o exterior das vesículas é primordial para sua visualização no microscópio.

Para realizar as imagens de microscopia de contraste de fase, preparou-se um compartimento de observação com a solução estoque de GUVs diluída em 600 μL de glicose 0,2 M, cuja estabilização por gravidade das vesículas ocorreu em poucos minutos decorrente da diferença na densidade e índice de refração entre as soluções empregadas de sacarose e glicose.



Figura 18. Gerador de funções (corrente elétrica alternada).

Assim, as vesículas sedimentaram no compartimento e foi possível um melhor contraste quando observadas no microscópio. O efeito de contraste é obtido para um meio interno de 0.2 M sacarose e o meio externo de 0.2 M glicose (Figura 19).

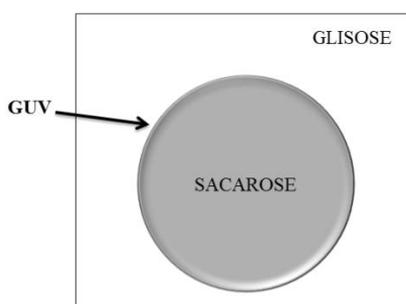


Figura 19. Efeito de contraste das GUVs.

Para as imagens de fluorescência, preparou-se as GUVs com a adição de 25 μM de merocianina^{208, 209} extraída da solução estoque a 1 mM em etanol 50 %.

A preparação das vesículas lipídicas pode gerar a formação tanto de vesículas gigantes unilamelares quanto de multilamelares (GMVs). A presença de GMVs deve-se ao fato de um leve estresse osmótico na diluição, o que leva ao fenômeno de vesiculação interna²¹⁰. Essa composição mista de GUV e GMV não invalida os experimentos, pois a vesícula mostra-se íntegra. Além disso, a GMV está sendo utilizada como modelo celular e a GMV se aproxima mais deste modelo, uma vez que células eucarióticas possuem organelas em seu interior.

Dessa forma, padronizou-se a nomenclatura GUV para referenciar tanto a própria GUV quanto a GMV.

3.3 CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DAS PROPRIEDADES DOS COMPOSTOS

Investigou-se o tamanho e formato da partícula de magnetita por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV – FEG).

A estabilidade da formulação e o mecanismo de interação entre a magnetita e os lipossomos por potencial zeta (ζ) e espectroscopia no infravermelho, respectivamente, e a estrutura cristalina da magnetita por difração de raios X (Tabela 5).

Para avaliar a interação dos compostos sintetizados com as vesículas gigantes, realizou-se as medidas de fluorescência através do microscópio de fluorescência de acordo com os quatro passos:

- (1) GUV → visualiza
- (2) Adiciona Lipossomo–MC 540 na GUV → visualiza (grupo controle);
- (3) Incuba (2) com Magnetita → visualiza na Ausência e Presença de campo magnético;
- (4) Incuba uma nova lâmina de GUV com magnetolipossomos–MC 540 → visualiza na Ausência e Presença de campo magnético.

Tabela 5. Sumário das técnicas de caracterização empregadas

TÉCNICA	EQUIPAMENTO (modelo/marca)	OBJETIVO
Difração de raios X (DR-X)	D8-Focus / BRUKER	Obter informações cristalográficas da magnetita.
Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)	VARIAN®	Identificar os grupos químicos.
Microscopia de Fluorescência	Cary Eclipse / VARIAN®	Quantificação da fluorescência.
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV – FEG)	JMS-6701F – Alta Resolução / JEOL	Obter o tamanho médio e morfologia da magnetita.
Potencial Zeta	Zetasizer Nano ZS / MALVERN INSTRUMENTS	Determinar a estabilidade coloidal.
Tamanho de Partícula	Zetasizer Nano ZS/ MALVERN INSTRUMENTS	Avaliar o diâmetro hidrodinâmico.

3.3.1 Difração de raios X (DR-X)

Os difratogramas de Raios – X foram registrados em um difratômetro Bruker modelo D8-Focus usando radiação de Cu (40KV e 40 mA), K_{α} ($K_{\alpha 1} + K_{\alpha 2}$), ou seja, radiação

dicromática, desta forma o valor do comprimento de onda utilizado para os cálculos de tamanho de cristalito foi de 1,5418 Å, no intervalo de 10 a 80° (2θ) e um segundo de tempo de passagem, utilizando o método do pó.

3.3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Foi utilizado no modo de ATR (do inglês, *Attenuated Total Reflection*), marca Varian, acoplado ao Microscópio AIM 8800 para as formulações lipossomais e da magnetita com o intuito de estudar possíveis novas interações químicas, por meio dos deslocamentos das bandas e picos de absorção características das mesmas.

3.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura-FEG

As micrografias eletrônicas de varredura foram registradas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol, modelo JMS-6701F com FEG (*Field Emission Gun*) acoplado. As amostras foram espalhadas (pó de magnetita em água e sonicado por 30 min) em diferentes substratos (*fita de carbono*: método micro; *lâmina de silício*: método nano).

3.3.4 Microscopia de Fluorescência

O contraste de fase e imagens de fluorescência das GUVs foram obtidas com um microscópio invertido Varian, modelo Cary Eclipse, com o qual os sinais de fluorescência foram detectados. Para capturar as imagens usou-se as ampliações de 20x e 40x. O espectro de emissão para a MC 540 foi coletado no comprimento de onda de 540 nm (excitação) e 550 – 700 nm (emissão)²¹¹.

3.3.5 Potencial Zeta e Tamanho de Partícula

Tamanho (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersão (PDI) e análise do potencial zeta (ζ) para as formulações foram obtidas usando o equipamento Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments). Cada análise de tamanho durou 120 segundos (25°C) e foi obtida com um ângulo de detecção de 173° e o tamanho médio das partículas foi determinado por DLS (do inglês, *Dynamic Light Scattering*), espalhamento de luz dinâmico. Para determinar o potencial zeta, as amostras foram colocadas em célula eletroforética, na qual um potencial de ± 150 mV foi estabelecido. Os valores potenciais foram calculados pela média dos valores da mobilidade eletroforética utilizando a Equação de Smoluchowski^{212, 213}.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DISCUSSÕES GERAIS

Antes de iniciar a sessão de resultados e discussão, algumas considerações precisam ser abordadas. A respeito da síntese a suspensão de magnetita, consiste em duas etapas distintas. O desenvolvimento de um método simples, de baixo custo e ambientalmente amigável para preparar nanopartículas magnéticas monodispersas, com revestimento biocompatível e atóxicas em meio aquoso é uma meta importante desde o início do trabalho.

Os testes iniciaram com o intuito de produzir nanopartículas de magnetita com o mínimo de etapas e reagentes possíveis e pela rota mais simples adotada na literatura, como descrito por Li e colaboradores (2008)⁴⁰, seguida de algumas alterações, como podem ser observadas no tópico da metodologia. A síntese empregada distingue-se, principalmente, por não apresentar a adição de um agente estabilizante durante a reação de formação.

A primeira etapa do desenvolvimento da metodologia mais adequada para a síntese de magnetita obteve micropartículas de magnetita, uma vez que foram controlados somente a estequiometria de formação dos sais de ferro e da base forte, com agitação leve do meio reacional. Por difração de raios X, as partículas foram identificadas como estruturas cúbicas de espinélio inverso com tamanho médio do cristalito de 9,2 nm, obtido pela aproximação da equação de Scherrer. Caracterizou-se forma e tamanho por microscopia de varredura com emissão de campo, na qual foi possível observar (aumento de 4000x) inúmeros agregados de formato irregular com tamanhos de até 10 μm . Uma magnificação maior (100.000x), no entanto, pode detalhar melhor a superfície dessas partículas micrométricas, as quais se revelam, com foco um pouco distorcido, nanopartículas de magnetita formando um aglomerado gigante.

A dificuldade em gerar nanopartículas de magnetita monodispersa é o desafio de sucessivas pesquisas na área de liberação controlada de fármacos, biodetecção, diagnóstico por imagem, entre outros¹⁵. Assim, a metodologia inicial sofreu algumas alterações com o objetivo de alcançar o melhor resultado possível com as ferramentas disponíveis e adequar-se à proposta inicial.

Uma tendência na literatura, muito bem estabelecida, é a encapsulação de magnetita com lipídios, formando os magnetolipossomos. Há um interesse crescente na utilização de magnetolipossomos aplicados na área biomédica, pois oferecem grande versatilidade e biocompatibilidade típicos de sistemas lipossomais²⁰. Além disso, têm recebido atenção

especial, pois podem ser guiados para um alvo específico mediante a aplicação de um campo magnético externo¹⁷⁶.

Nessa perspectiva, aliou-se os esforços para preparar nanopartículas magnéticas que futuramente tivessem características compatíveis para serem recobertas com lipídios e aplicadas em sistemas biológicos^{2, 53}.

Assim, a técnica de coprecipitação foi mantida, contudo, alterou-se a **agitação** (de agitador magnético para agitador mecânico com 2.000 rpm de rotação), a **temperatura** (de temperatura ambiente para 40 – 60 °C), o pH (10 – 12), a **atmosfera** (de ambiente para controlada com N₂) e o **tempo de reação** (o anterior era mantido até obter o precipitado negro, modificou para 30 minutos com borbulhamento de gás nitrogênio), segundo dados da tabela 4.

A estrutura cristalina do material obtido também é cúbica de espinélio inverso, todavia, houve uma diminuição no valor estimado do diâmetro do cristalito para 8,8 nm. Tratando-se de uma aproximação, os valores estão muito próximos, não sendo possível inferir diferenças representativas. A maior alteração foi percebida nas imagens de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, apontando para uma formação monodispersa de nanopartículas de magnetita com formato esférico e tamanho estimado em 15 nm quando em solução, antes da secagem.

O processo de secagem em estufa e a ausência de um surfactante levaram à formação de aglomerados, podendo ser denominados de nanopartículas polidispersas quando ressuspenda em meio aquoso. Assim, procedeu-se a encapsulação das partículas de magnetita com lipídios com a finalidade de dispersar novamente e oferecer biocompatibilidade ao sistema. Filmes lipídicos foram preparados em tubos de ensaio com composições diferentes (PC e PCCL) e hidratados¹⁶¹ com suspensão de magnetita (1,2 mg/mL), sendo inicialmente agitados por alguns segundos em vórtex, com subsequente banho de ultrassom por 30 minutos.

O resultado foi caracterizado em espectroscopia de infravermelho (FTIR) e por espalhamento de luz eletroforético (ELS), principalmente. A espectroscopia de infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas. Portanto, a banda relativa especificamente à vibração da magnetita em 535 cm⁻¹ (grupo Fe–O), possui um deslocamento em Fe₃O₄/PC e Fe₃O₄/PCCL para 668 cm⁻¹. Assim, os resultados indicam que os lipídios recobriram as nanopartículas de Fe₃O₄.

Para comparar com esse resultado, ensaios de mobilidade eletroforética foram conduzidos. O potencial zeta de Fe₃O₄ (– 8,9 mV) foi deslocado para –13,4 mV (Fe₃O₄/PC) e

para $-24,3$ mV (magnetita recoberta) / $-54,5$ mV (lipossomo livre na suspensão) ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCCL}$). É importante destacar que os valores dos potenciais zeta dos lipossomos também sofreram alteração quando em contato com as partículas de Fe_3O_4 . Deste modo, a formação dos magnetolipossomos gerou uma modificação no potencial zeta das partículas de Fe_3O_4 , o que corrobora com os resultados de FTIR, confirmando o recobrimento de Fe_3O_4 pelos lipídios. Nota-se pelos potenciais de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCCL}$ que a magnetita foi parcialmente recoberta, pois apresenta um pico de potencial da superfície dos lipossomos.

Uma vez comprovada a formação dos magnetolipossomos, surgiu o interesse em investigar a interação entre a membrana celular e os magnetolipossomos. No presente estudo, foram preparadas vesículas unilamelares gigantes, com tamanho semelhante ao de uma célula humana, para mimetizar a membrana celular. Este artifício é muito comum na literatura e propicia em conjunto com a técnica de microscopia confocal de fluorescência imagens em tempo real das modificações resultantes^{167, 214}.

Nanopartículas de Fe_3O_4 polidispersas não modificadas foram adicionadas na câmara contendo somente GUVs e um campo magnético uniforme (400 mT) foi aplicado sob visualização simultânea com o microscópio óptico invertido. Aguarda-se alguns segundos para estabilizar o sistema, mas não é possível visualizar modificações no ambiente. As GUVs mantiveram-se intactas e não apresentaram sinais de movimento.

Igualmente, novas GUVs da mesma solução estoque foram incubadas com magnetolipossomos e, em seguida, aproximou-se o ímã na posição mantida para o experimento controle. Milésimos de segundo são necessários para visualizar a movimentação das vesículas unilamelares gigantes em direção ao campo magnético uniforme (Figura 38).

Portanto, conclui-se que houve recobrimento efetivo de Fe_3O_4 com os lipídios na formação dos magnetolipossomos pela evidência da magnetoforese e dos resultados de potencial zeta e espectroscopia de infravermelho. Esses resultados também sugerem que as propriedades de superfície das nanopartículas polidispersas modificadas são um importante parâmetro da formulação para promover a interação destas com membranas lipídicas.

Diversos estudos investigam as prováveis interações para magnetolipossomos e modelos de membrana (GUV e/ou GUVs magnéticas) separadamente. Porém, até o momento, não há pesquisas que demonstrem o deslocamento de GUVs incubadas com magnetolipossomos, previamente preparada com sacarose no seu interior, apresentar sinais de mobilidade aparente quando na presença de um campo magnético uniforme. Portanto, a associação de um fármaco a esse sistema torna-o promissor para ser conduzido a um tecido alvo e entregar para células específicas.

4.2 MICROPARTÍCULAS DE MAGNETITA

Caracterizou-se a estrutura cristalina do óxido de ferro formado utilizando difração de raios X, cujo difratograma para o pó de Fe_3O_4 (Figura 20a) revela a presença de picos atribuídos para as fases Fe_3O_4 e FeOOH .

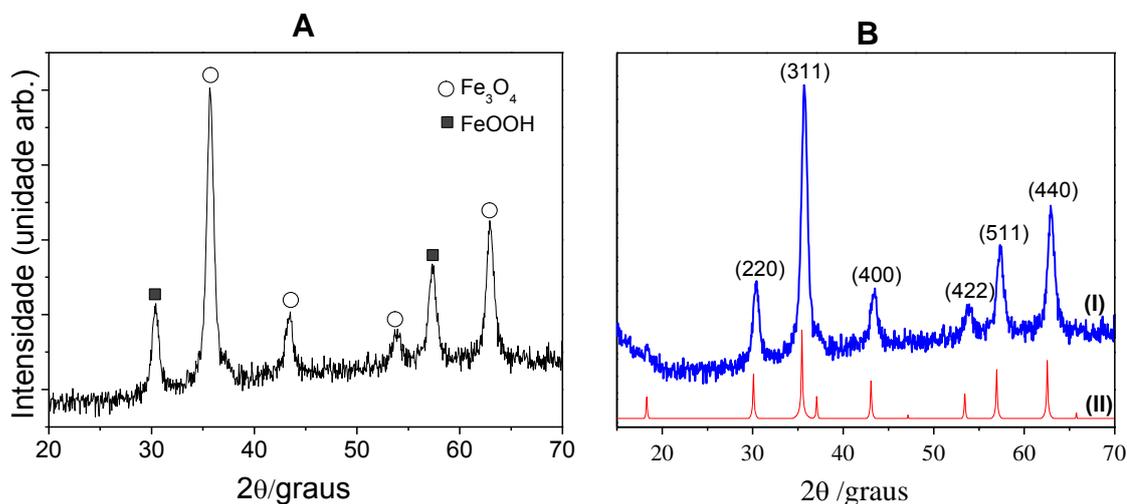


Figura 20. (A) Difratogramas para o pó obtido de Fe_3O_4 ; (B) (I) picos de Fe_3O_4 e (B) (II) ficha cristalográfica ICSD-26410 para o padrão de magnetita.

Os dados foram comparados com os padrões da ficha catalográfica obtida a partir da Base de Dados da Estrutura de Cristais Inorgânicos (ICSD), como mostra a figura 20b (II).

Na tabela 6 estão identificados os picos presentes do Fe_3O_4 e do FeOOH , além de especificar qual é o plano cristalino correspondente⁴⁹.

Tabela 6. Planos cristalinos correspondentes aos picos para Fe_3O_4 e FeOOH

PLANO CRISTALINO	(2 2 0)	(3 1 1)	(4 0 0)	(4 2 2)	(5 1 1)	(4 4 0)
PICO (graus)	30,4	35,7	43,4	53,9	57,4	62,9
ÓXIDO DE FERRO	FeOOH	Fe_3O_4	Fe_3O_4	Fe_3O_4	FeOOH	Fe_3O_4

Pela equação de Mitchell²¹⁵, é possível extrair informações, as quais garantem que se trata da estrutura cúbica de espinélio inverso pela comparação entre o resultado experimental e o padrão para magnetita. De acordo com a equação de Scherrer (equação 2), o tamanho dos cristalitos pode ser estimado, partindo-se do princípio de que as partículas sejam esféricas.

$$D_{(hkl)} = \frac{k \cdot \lambda}{\Delta\theta \cdot \cos\theta} \quad (\text{Equação 2})$$

$$D_{(hkl)} = 9,2 \text{ nm}$$

Onde k é uma constante relacionada ao formato das partículas (0,94 para as esféricas), λ é comprimento de onda para o $\text{CuK}\alpha$ (0,15405 nm), β é a largura do pico máximo a meia altura e 2θ é dado como o ângulo de difração.

Embora os resultados de difração revelem tamanhos de cristalitos em torno de 9,2 nm, observou-se que ao analisar o pó, as partículas encontram-se na forma de grandes aglomerados. Esse fato foi observado pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura do pó da magnetita depositado em substrato de carbono (Figura 21) com magnificação de 4000x e 100.000x.

Nota-se que há uma diversidade de forma e tamanho considerável de partículas, cujas dimensões variam de poucos nanômetros até 100 μm . A heterogeneidade apresentada pelo sistema pode estar intrinsecamente ligada à quantidade de parâmetros controlados (observar tabela 4) no método de síntese empregado (coprecipitação) e, não menos importante, pela ausência de matriz estabilizante.

Essas situações distintas podem contribuir para a formação de agregados e crescimento além das nanopartículas de magnetita (micropartículas).

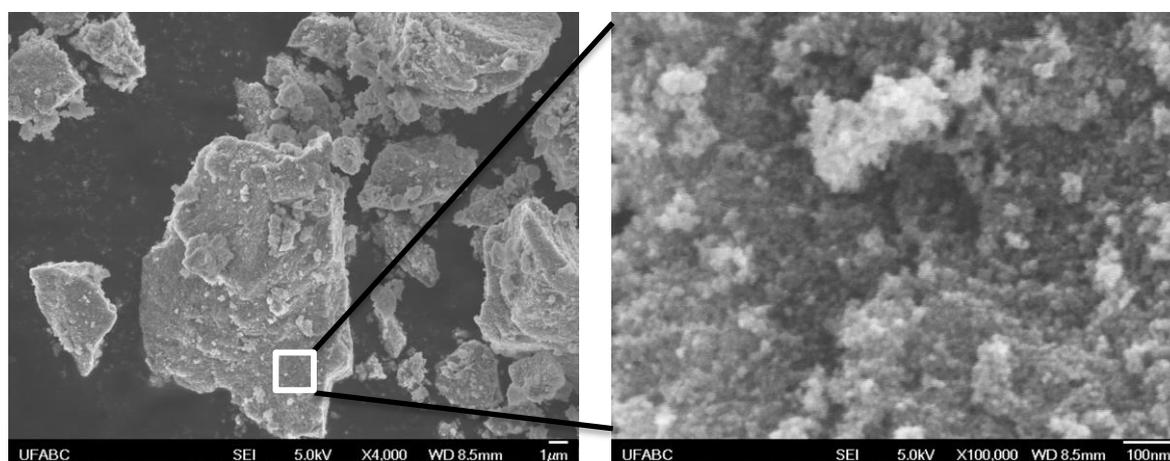


Figura 21. Imagens de MEV-FEG das partículas de Fe_3O_4 .

O resultado da síntese Método Micro, no entanto, como mencionado no início, não foi satisfatório para as metas propostas, uma vez que para alcançar o interior das células biológicas ou, até mesmo, capilares com poros nanométricos, é primordial um sistema nanoparticulado. Mediante este impasse, propôs-se uma nova rota de síntese (Método Nano) que implicasse na geração de nanopartículas de magnetita, como apresentada no tópico a seguir.

4.3 NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA POLIDISPERSA

Alguns fatores durante a síntese foram controlados minuciosamente para que se formassem nanoestruturas de magnetita, mesmo na presença de agregados, os quais foram: pH, atmosfera de nitrogênio, temperatura e agitação. Previamente estabelecido na literatura^{54, 216}, gerenciar tais parâmetros é essencial para obtenção de partículas mais uniformes e com tamanho nano. O aumento da temperatura (40 – 60° C), aquisição de um pH entre 10 – 12 e uma agitação constante e vigorosa alcançando 2.000 rpm foi o suficiente para produzir nanopartículas magnéticas com potencial aplicação em sistemas biológicos.

Na figura 22, é nítida a mudança de coloração de A para D, cujo tempo foi de aproximadamente 3 minutos, até a geração do precipitado negro. Mesmo após o término da adição da base, quando o pH desejado foi alcançado (pH 10 – 12), o sistema foi mantido sob agitação até concluir os 30 minutos.

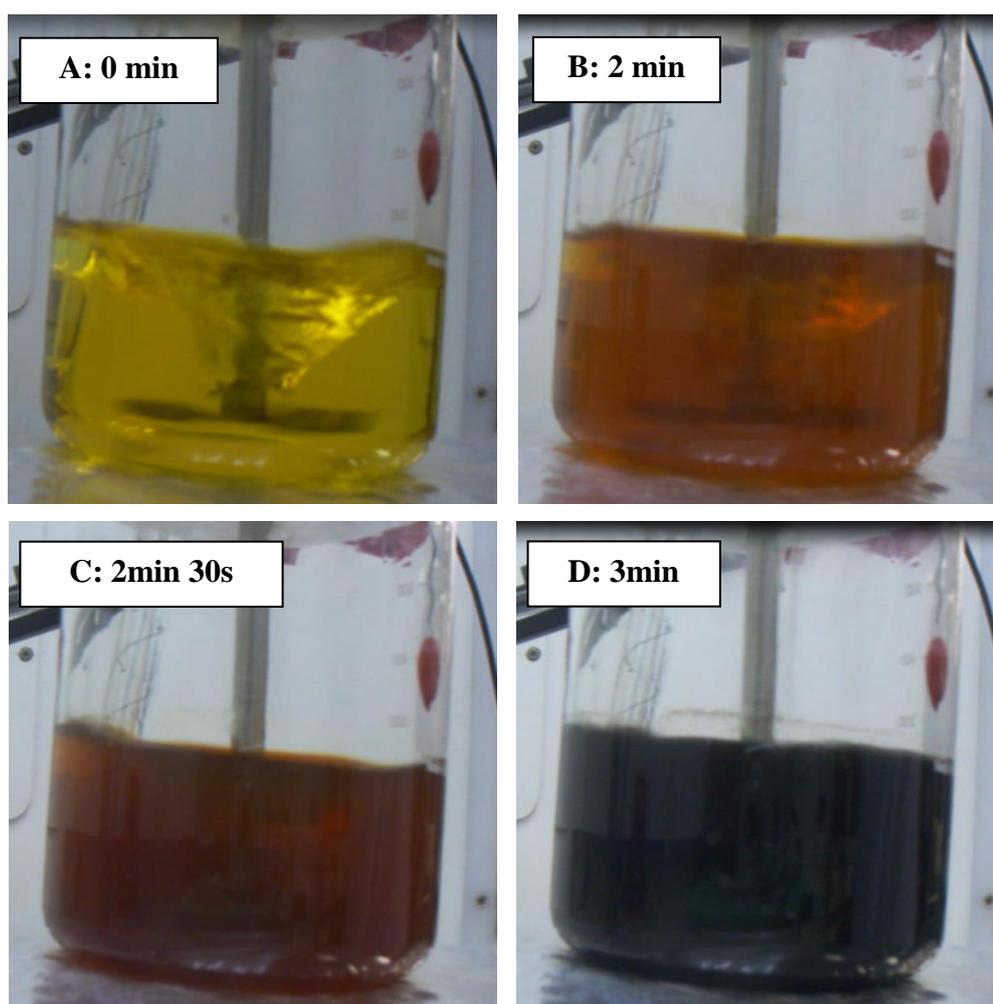


Figura 22. Processo de formação de magnetita. Mudança de cor com a adição de NH_4OH .

Partindo-se do princípio de que as partículas obtidas na síntese do Método Nano sejam esféricas, o tamanho dos cristalitos podem ser estimados pela equação de Scherrer (equação 2) a partir de um difratogramas de difração de raios X (Figura 23B).

O pico utilizado para os cálculos está na posição aproximada de $35,7^\circ$ (2θ), que é o mais intenso. Os valores da largura integral foram obtidos por uma deconvolução dos picos no programa Origin Pro 8.0. O valor encontrado para o diâmetro do cristalito (DC) foi convertido para nanômetros, o qual resultou em 8,8 nm para as partículas do Método Nano.

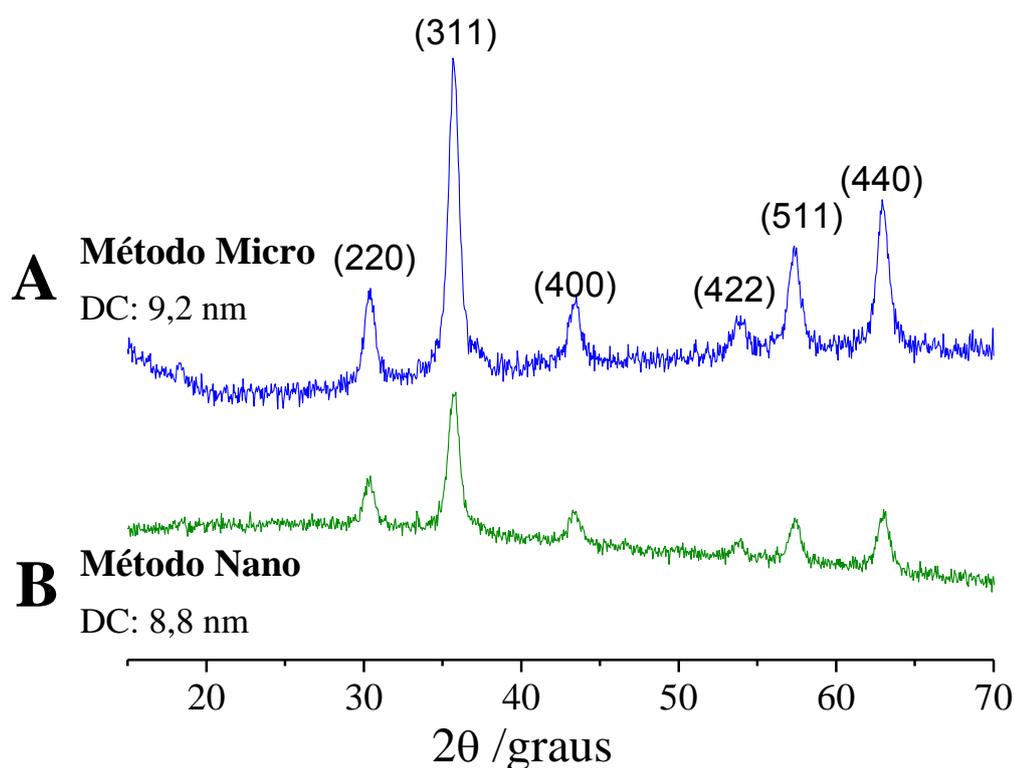


Figura 23. (A) Difratograma para o pó obtido de Fe_3O_4 Método Micro e (B) Fe_3O_4 Método. DC: Diâmetros dos cristalitos.

Na figura 23A, estão comparados os difratogramas do Método Micro e Nano, cujos picos da última coincidem exatamente com os da primeira, previamente caracterizada. Pode-se inferir que se trata da mesma estrutura cristalina.

É possível extrair informações pela equação de Mitchell ²¹⁵, as quais permitem inferir as nanopartículas possuem estrutura cúbica de espinélio inverso pela comparação entre o resultado experimental e o padrão para magnetita, exatamente como foi realizado para a magnetita do Método Micro.

O resultado do tamanho do cristalito das nanopartículas (8,8 nm) está próximo dos resultados encontrados em imagens de microscopia de varredura (Figura 24) indicam estruturas nanométricas esféricas com diâmetro médio estimado de 15 nm.

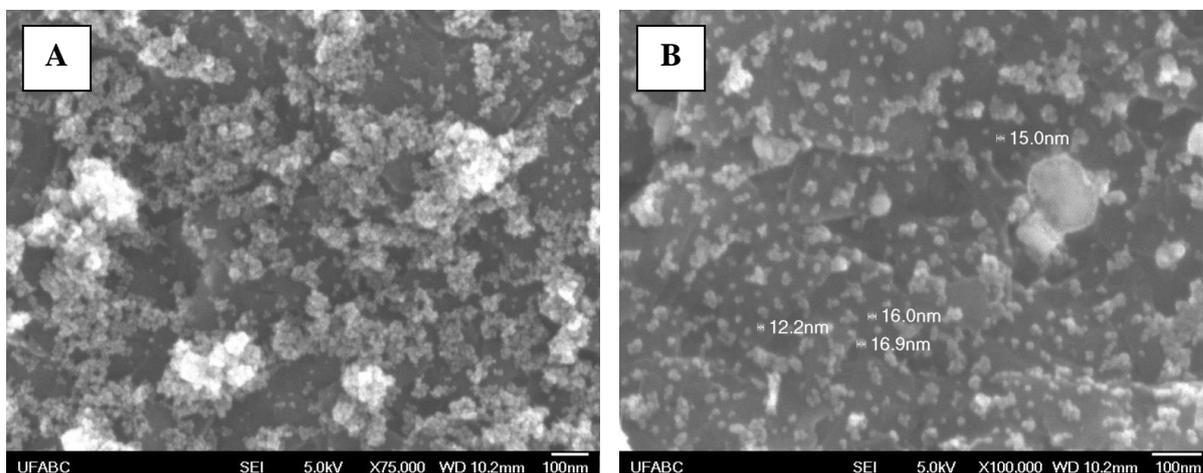


Figura 24. MEV-FEG de nanopartículas de Fe_3O_4 . A) 75.000x e B) 100.000x

Uma vez almejado o tamanho ideal das partículas obtidas, realizou-se a incorporação da magnetita em lipossomos, cujas formulações foram incubadas em soluções de GUV para avaliar o comportamento das nanopartículas mediante a presença de um campo magnético.

A seguir, estão relatados os resultados em modelo de membrana tanto da magnetita proveniente do Método Micro quanto do Método Nano (magnetolipossomos).

4.4 FORMULAÇÕES DE MAGNETOLIPOSSOMOS

É importante ressaltar que, cálculos do potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico, PDI e da análise dos grupos funcionais presentes em cada formulação, foram realizados com as formulações de lipossomos como controle e de magnetolipossomos, todos sem incubar em GUVs. A cor dos lipossomos alterou-se de um transparente opaco para um castanho pálido, devido às características de coloração da suspensão de magnetita (marrom).

4.4.1 Distribuição de tamanho e potencial zeta

Os magnetolipossomos e os lipossomos (amostra controle) foram caracterizados por DLS (espalhamento de luz dinâmico). As amostras de magnetolipossomos foram preparadas de acordo com os procedimentos relatados no tópico 3.2.3 da Metodologia. As nanopartículas de magnetita polidispersa nas formulações de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PC}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCCL}$ ainda apresentam

resposta ao campo magnético aplicado como demonstra a figura 25. As amostras foram deixadas em repouso até a precipitação das partículas ocorrer para então aplicar o campo.

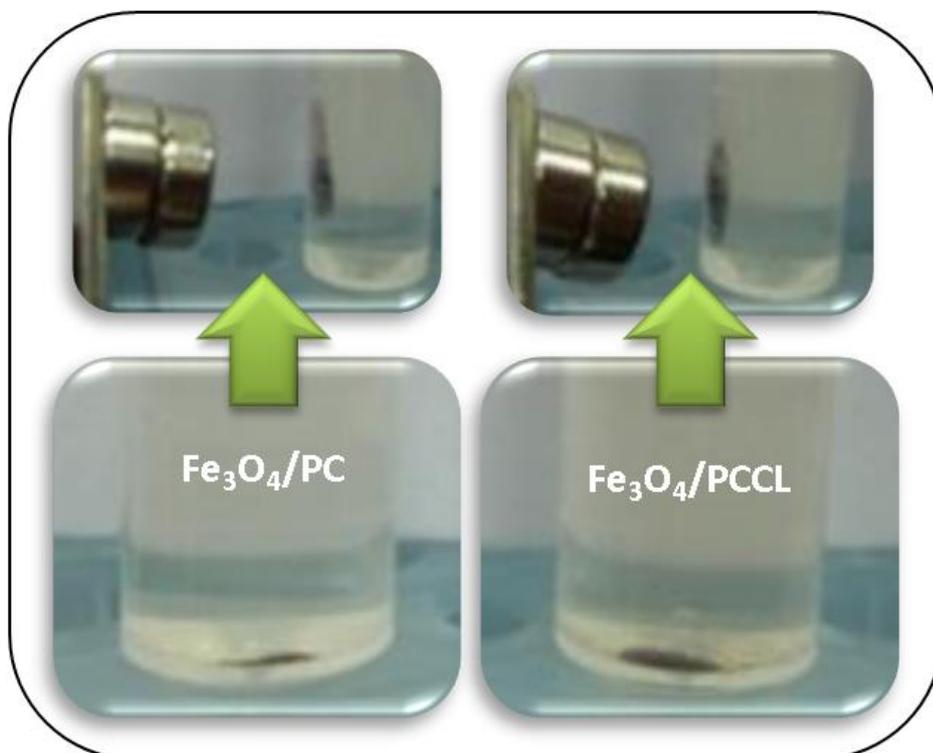


Figura 25. Resposta dos magnetolipossomos ao campo magnético externo aplicado.

Para estabelecer algumas características físico-químicas dessas amostras, calculou-se o potencial zeta, o tamanho hidrodinâmico (diâmetro) e o PDI.

As funções de autocorrelação foram ajustadas com a análise dos cumulantes e o D_H obtidos estão variando entre 186–721 nm e 35–4202 nm para os lipossomos constituídos por PC e PCCL, respectivamente. A polidispersividade varia de acordo com a Tabela 7. Os primeiros resultados foram da magnetita e dos lipossomos de PC e PCCL analisados separadamente.

Nota-se pela análise da figura 26, que a Fe_3O_4 possui um valor de potencial zeta muito semelhante aos lipossomos de PC ($-9,7$ mV e $-10,8$ mV, respectivamente). Por outro lado, o lipossomo de PCCL destaca um valor de $-55,7$ mV e é o que possui menor valor de tamanho médio (diâmetro hidrodinâmico em nm) na escala do maior para o menor: $Fe_3O_4 > PC > PCCL$.

Avaliar os parâmetros de possíveis interações das formulações Fe_3O_4/PC e $Fe_3O_4/PCCL$ e, logo após, investigar possíveis interações destas em modelos de membrana

(GUVs) tornou-se o principal objetivo do trabalho a partir de agora. Vários resultados interessantes surgiram ao longo dos experimentos de tamanho hidrodinâmico e potencial zeta.

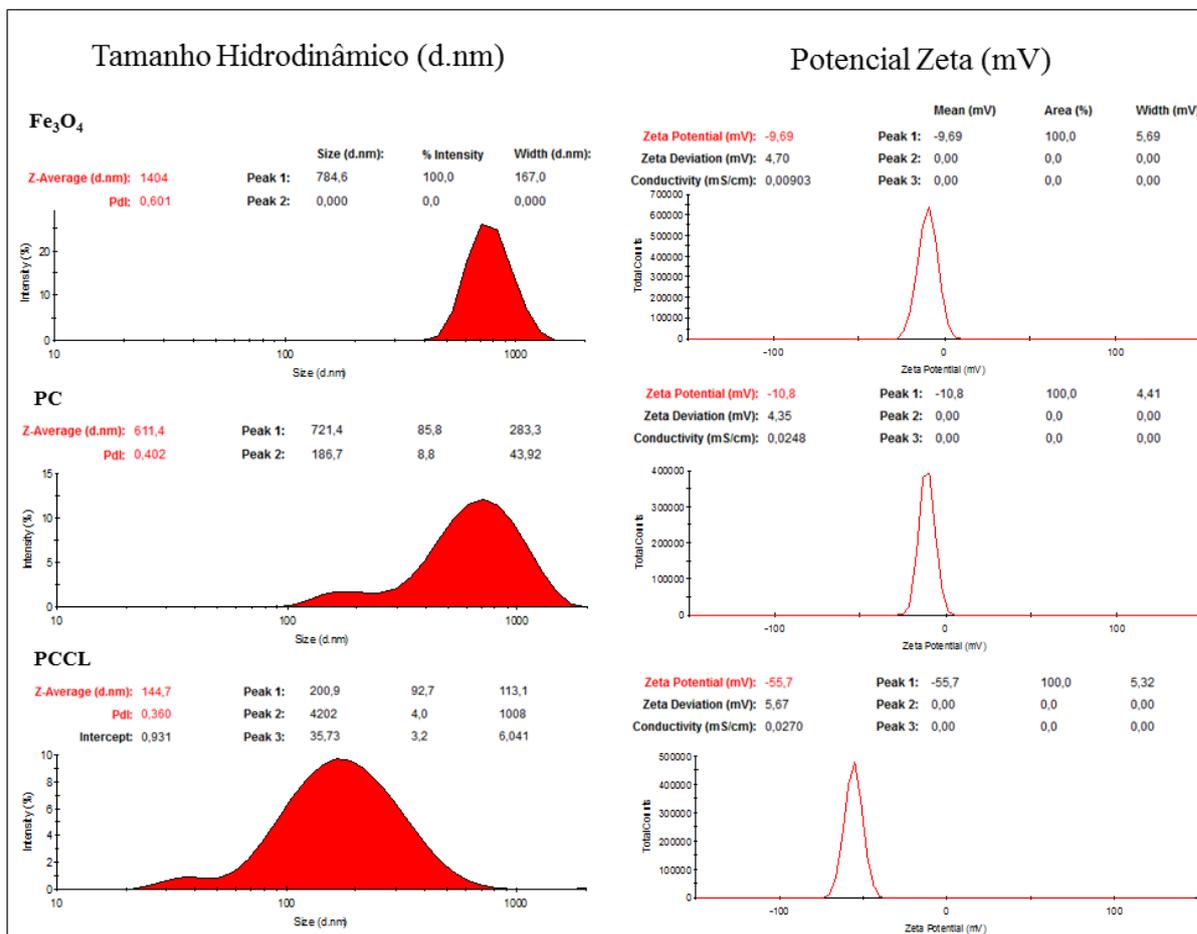


Figura 26. Distribuição de tamanho (diâmetro nm) e do potencial zeta (mV).

Com um olhar focado para as amostras de Fe₃O₄/PC, após análise com a técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS), observa-se que o tamanho hidrodinâmico final é maior que os valores de Fe₃O₄ e PC em separado, contudo, há uma diminuição significativa da polidispersão. São partículas maiores, mas com tamanhos mais uniformes (Figura 27A).

No que se refere à amostra Fe₃O₄/PCCL, o mesmo não acontece. A polidispersão aumenta com relação ao lipossomo de origem e diminui em comparação à Fe₃O₄. Surge uma distribuição bimodal (Figura 27A) com um tamanho médio de 285 nm de diâmetro, apesar de que as partículas de menor tamanho (91 nm) correspondem a apenas 28% do todo.

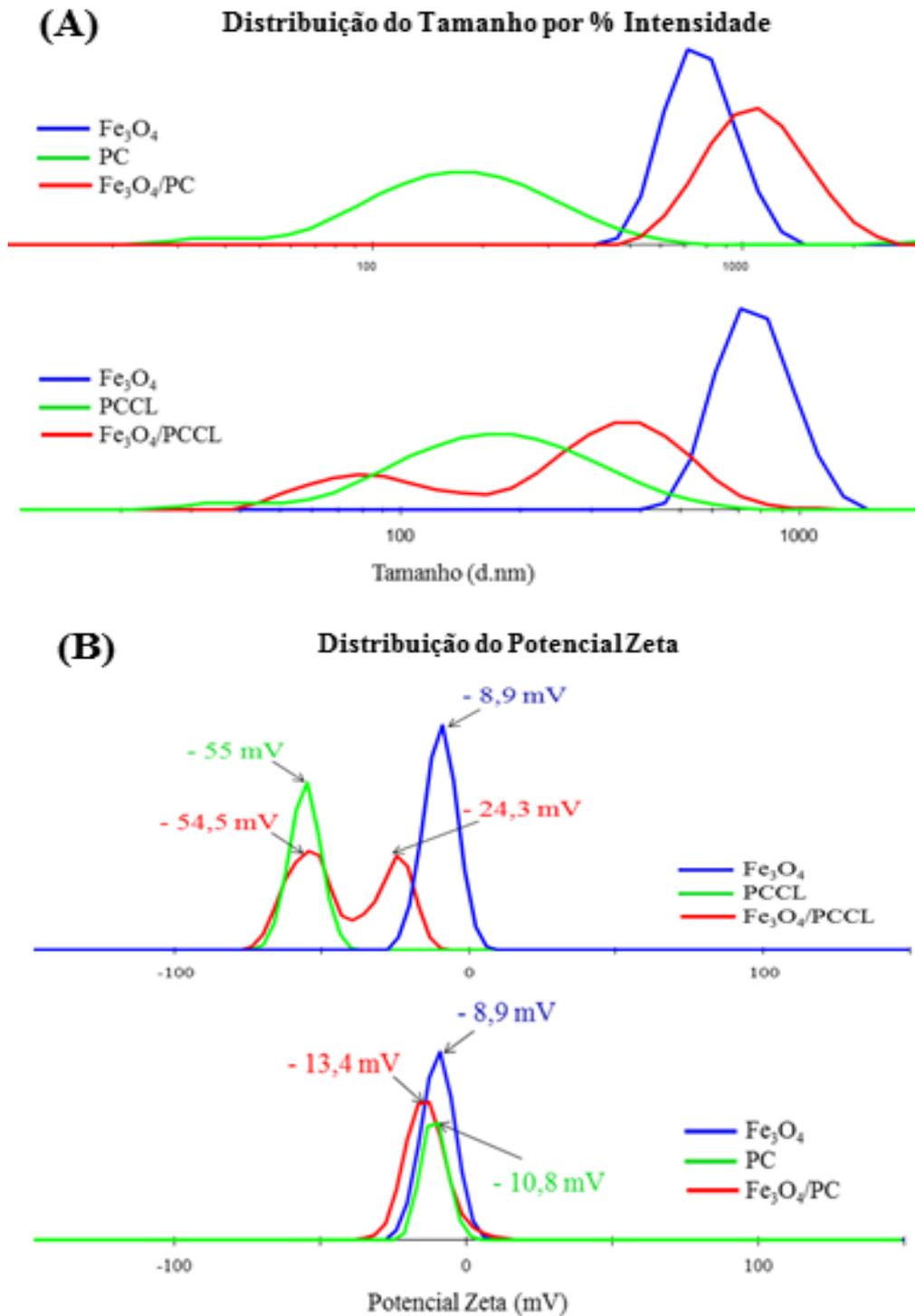


Figura 27. Comparativo dos resultados de (A) distribuição de tamanho (nm) e (B) potencial zeta.

Por outro lado, na figura 28B, é possível notar o aparecimento de um potencial zeta bimodal (Tabela 6) para a formulação de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCCL}$. O lipossomo de PCCL apresenta uma carga monomodal em -55 mV quando sozinho, no entanto, ao encapsular a nanopartícula de magnetita polidispersa em seu interior, os resultados alteram para $-54,5$ e $-24,3 \text{ mV}$.

A carga de $-24,3 \text{ mV}$ caracteriza Fe_3O_4 recoberta por lipídio. Contudo, há uma população de lipossomos de PCCL livre na suspensão, definindo uma característica importante do sistema, na qual se pode diagnosticar um recobrimento parcial de Fe_3O_4 pelo lipídio.

O mesmo não acontece com as amostras de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PC}$, que apresentam um aumento negativo da distribuição de potencial zeta para $-13,4 \text{ mV}$. Esse acréscimo pode determinar uma melhora na estabilidade da suspensão e por possuir apenas uma distribuição no valor do potencial, pode-se inferir que houve, neste caso, um recobrimento total das partículas de magnetita, visto que não apresenta mais o potencial do lipossomo e nem da magnetita.

Tabela 7. Características físico-químicas das formulações lipossomais

FORMULAÇÃO	TAMANHO (D-nm)	PdI	POTENCIAL ZETA (mV)
Fe_3O_4	784,6	0,601	-8,9
PC	617,4	0,551	-10,8
PCCL	144,7	0,360	-55,7
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PC}$	1134,0	0,344	-13,4
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCCL}$	285,1	0,464	-54,5 e -24,3

Na tabela 7 pode-se observar que a magnetita apresenta o maior índice de polidispersão devido à presença de partículas maiores (escala micrométrica), sedimentação ou agregados. No entanto, quando recoberta com lipossomos, os valores da polidispersividade possuem uma queda considerável (Figura 28), principalmente no caso dos magnetolipossomos feitos com PC ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PC}$), cuja melhora na dispersão alcança os 43%.

Extraídos da tabela 5, os gráficos da figura 28 expressam uma visualização mais clara do que está acontecendo no sistema com relação aos três itens discutidos: tamanho, potencial zeta e PdI.

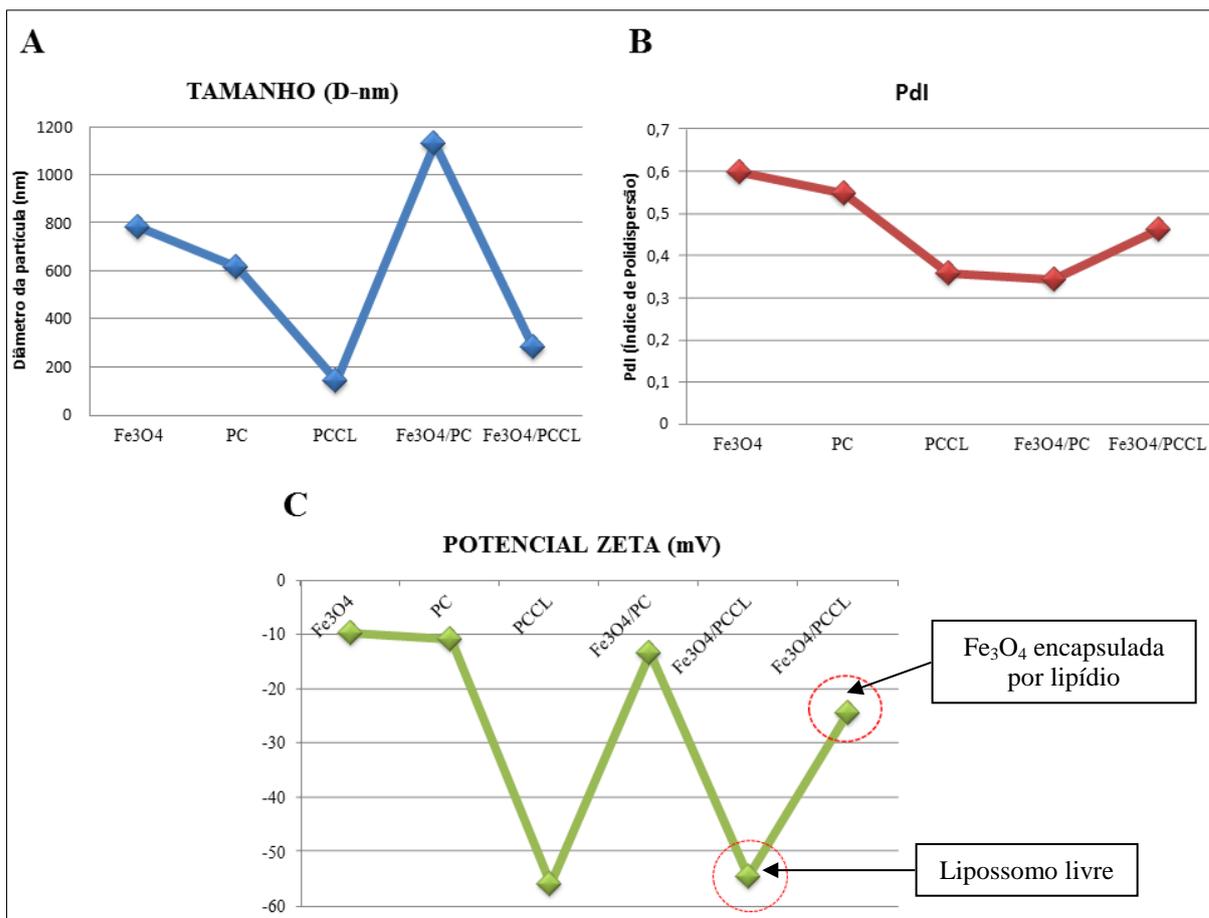


Figura 28. Resultados gráficos de tamanho (nm) (A), índice de polidispersão (B) e potencial zeta (C). Destaque em C para a distribuição bimodal de Fe₃O₄/PCCL.

Entende-se que houve uma melhora satisfatória na estabilidade da formulação Fe₃O₄/PCCL, pois a magnetita alterou sua carga de superfície de quase -10 mV para pelo menos -24 mV , quando recoberta por lipídio.

O restante da amostra manteve-se com potencial em torno de -55 mV , cujo valor é semelhante quando o potencial zeta é calculado somente do lipossomo em separado. No gráfico da figura 28C, estão destacadas as duas distribuições de potencial zeta para as populações presentes na formulação após a síntese do magnetolipossomo.

Um processo simples de separação magnética ao final da síntese resolveria essa distribuição bimodal, restando na suspensão apenas a magnetita recoberta, no entanto, foi essencial notar a eficiência de encapsulação, mesmo que por método qualitativo.

4.4.2 FTIR-ATR

As formulações de magnetita, magnetita com fosfatidilcolina ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PC}$) e com fosfatidilcolina e cardioplipina ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCCL}$) também foram acompanhadas com medidas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

Experimentos conduzidos para avaliar mudanças na carga de superfície dos compostos em conjunto com a técnica de FTIR podem fornecer informações importantes na caracterização das formulações. As amostras de magnetolipossomos (40 μL cada) foram depositadas em substrato de platina via *drop coating* e colocadas para evaporar a vácuo durante uma hora. O espectro da magnetita foi obtido na forma de pó.

Os espectros de FTIR (Figura 29) foram adquiridos para Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PC}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCCL}$ entre 4000 e 650 cm^{-1} . A água adsorvida foi caracterizada pelas bandas em 3342 e 3391 cm^{-1} , que foram atribuídas ao estiramento $\nu\text{O-H}$ e aos modos de vibração de $\delta\text{H-O-H}$. O grupo $-\text{OH}$ usualmente forma uma larga banda²¹⁷ na região entre o comprimento de onda 3100–3700 cm^{-1} . Os espectros para $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PC}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCCL}$ consistem de bandas em 2919 e 2847 cm^{-1} , as quais são atribuídas às vibrações simétrica e assimétrica do metileno ($-\text{CH}_2-$) e metil ($-\text{CH}_3$)²¹⁸. Os picos em 1079 e 1232 cm^{-1} são resultado dos modos vibracionais para PO_2 ²¹⁹.

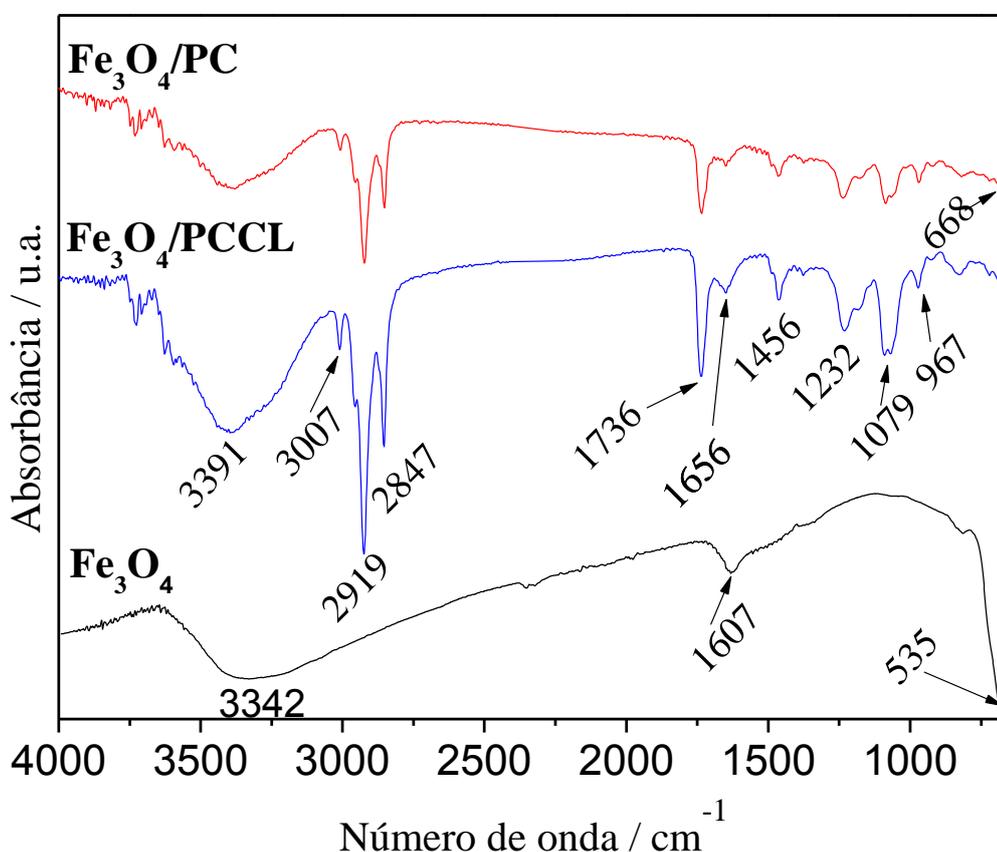


Figura 29. FTIR-ATR para Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCCL}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PC}$.

Vibrações carbonila (C=O) em torno de 1736 cm^{-1} e vibrações assimétricas de amônio quaternário ($\text{CN}^+-(\text{CH}_3)_3$) em 967 cm^{-1} foram observadas para $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PC}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCCL}$ ²²⁰.

A banda atribuída em 535 cm^{-1} refere-se à vibração da ligação $\text{Fe}-\text{O}$ ^{47, 221} da magnetita e possui um deslocamento em $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PC}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{PCCL}$ para 668 cm^{-1} . Os resultados indicam que os lipídios recobriram as nanopartículas de Fe_3O_4 com sucesso.

Após a caracterização dos compostos por diferentes técnicas, os magnetolipossomos foram incubados em vesículas unilamelares gigantes para obter resultados em modelos de membrana, que representa uma fração lipídica da membrana celular.

4.5 APLICAÇÕES EM MODELO DE MEMBRANA

As vesículas unilamelares gigantes foram confeccionadas com PCPECL (65/20/15), pois após testes com membranas de PCCL, identificou melhor estabilidade ao longo do tempo quando era adicionada certa porcentagem de PE. A seguir estão demonstrados os resultados para nanopartículas de magnetita sem lipídio e com lipídio (magnetolipossomos) incubados em vesículas lipídicas gigantes.

4.5.1 Determinação do grupo controle

Foi realizado um estudo preliminar da interação das micropartículas de magnetita com as células, usando GUVs como modelos de membranas celulares (imagens de GUVs foram extraídas de um microscópio óptico, conjugado a um microscópio de fluorescência). A magnificação escolhida para obter as imagens com menor e maior amplificação foi de 20x e 40x, respectivamente. As vesículas só puderam ser visualizadas por imagens de contraste de fase por causa da diferença de osmolaridade entre a glicose e a sacarose, conforme detalhado no tópico de síntese das vesículas unilamelares gigantes (3.2.4) e ilustrado na figura 19.

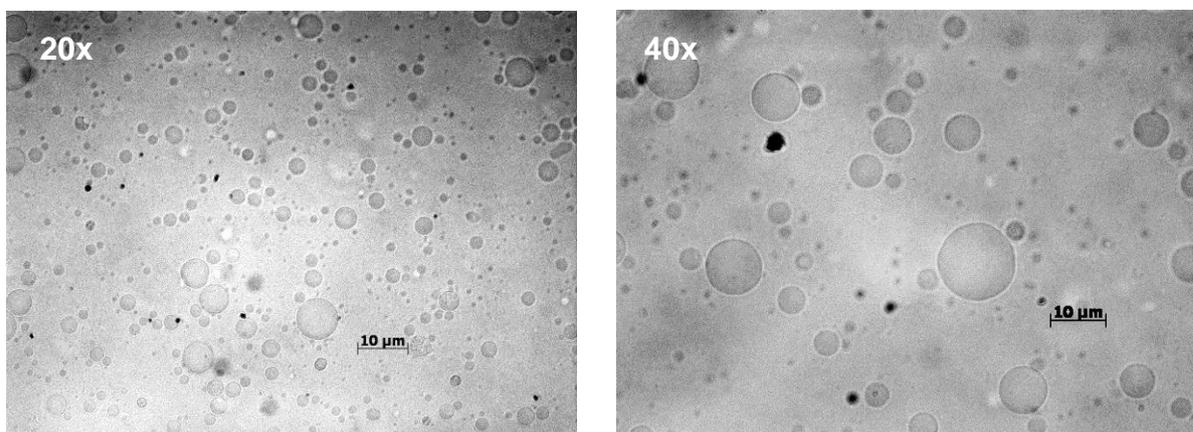


Figura 30. Microscopia óptica de GUVs de PCPECL.

Na figura 30, foi registrado um panorama geral do meio contendo 100% de GUVs (contraste de fase da amostra controle). Na magnificação de 40x, nota-se que as maiores GUVs estão na faixa de 10 – 20 μm e que há uma de tamanho. Contudo, esta polidispersividade não é um limitante para as análises, pois é importante neste momento avaliar a interação com as formulações sintetizadas da camada lipídica da GUV, a qual se demonstra íntegra.

Na suspensão de GUVs não é possível visualizá-las no modo de fluorescência, pois nesta condição não há inserção de um marcador fluorescente (Figura 31).

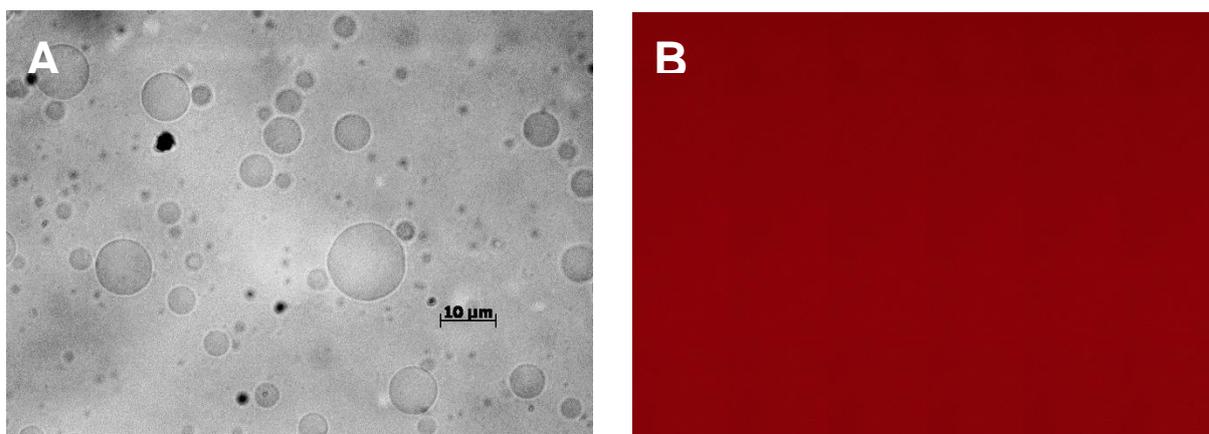


Figura 31. Suspensão de GUVs. A) Contraste de fase. B) Fluorescência ligada.

A seguir, realiza-se a caracterização do grupo controle, constituído por GUV (50 μL) incubada com 25 μM de lipossomos (LUVs de PCPECL; 65/20/15) marcados com 25 μM do fluóforo MC 540. Foram obtidas imagens de contraste de fase (Figura 32A) e, ao passar para o modo de fluorescência, as GUVs podem ser visualizadas como estruturas fluorescentes (Figura 32B).

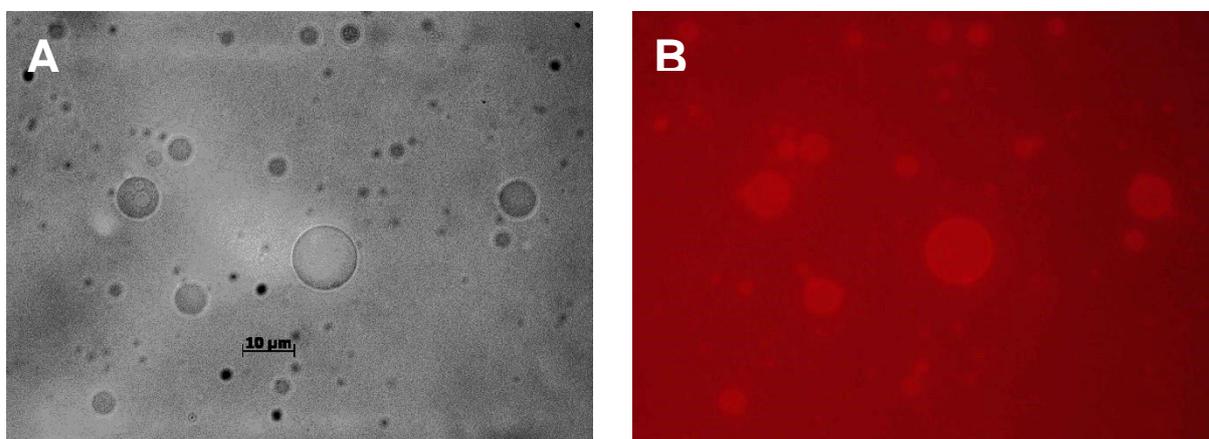


Figura 32. GUVs incubadas com LUVs–MC 540. A) Contraste de fase. B) Fluorescência da MC 540.

Desta forma, resultados controle foram estabelecidos e os testes com partículas de magnetita polidispersa puderam ser obtidos, como descrito no próximo tópico.

4.5.2 GUVs incubadas com nanopartículas de magnetita polidispersa

No compartimento contendo o grupo controle (GUVs e LUVs–MC 540) foi adicionado um volume de 10 μ L de Fe₃O₄ polidispersa sem revestimento. Na figura 32, aumento de 20x, é visível a modificação da aparência constitucional do meio de A (composto apenas por GUVs) para B, pela presença das Fe₃O₄ polidispersas, as quais estão representadas desde por nanopartículas, não visíveis nesta magnificação, até por enormes agregados na escala micrométrica, visíveis nestas imagens como sendo os pontos pretos levemente arredondados (Figura 32B). Alguns artefatos da imagem podem ser confundidos com as partículas de magnetita, porque possuem formato e cor semelhantes (Figura 32A), no entanto, quando se move a lâmina ou na presença do ímã, eles permanecem imóveis.

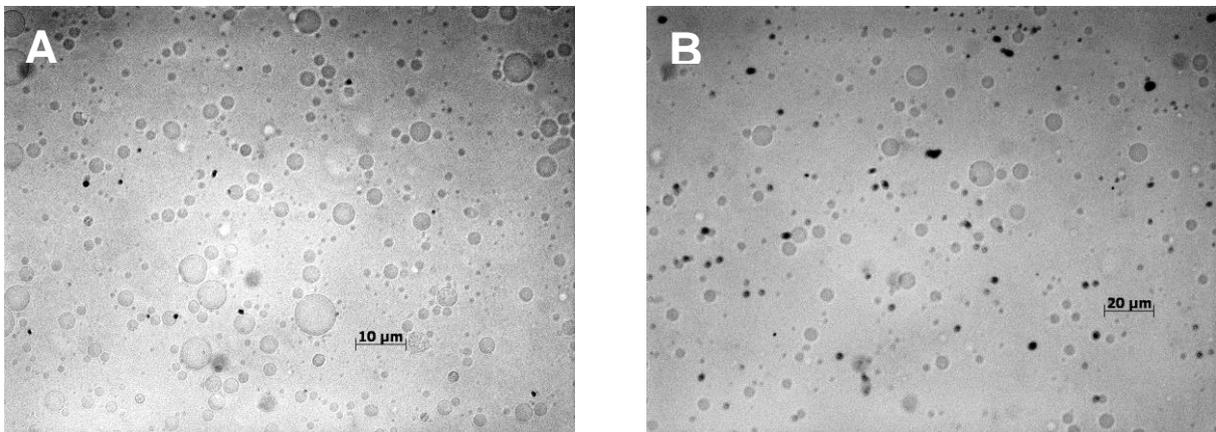


Figura 33. A) Grupo controle B) após adição de 10 μ L de Fe₃O₄.

Inicialmente, observando o sistema não foi possível visualizar perturbações na membrana das GUVs quando a magnetita foi adicionada. Contudo, buscando ao longo da lâmina (aumento de 40x), foram encontradas algumas alterações, inclusive, capturadas por imagens de fluorescência.

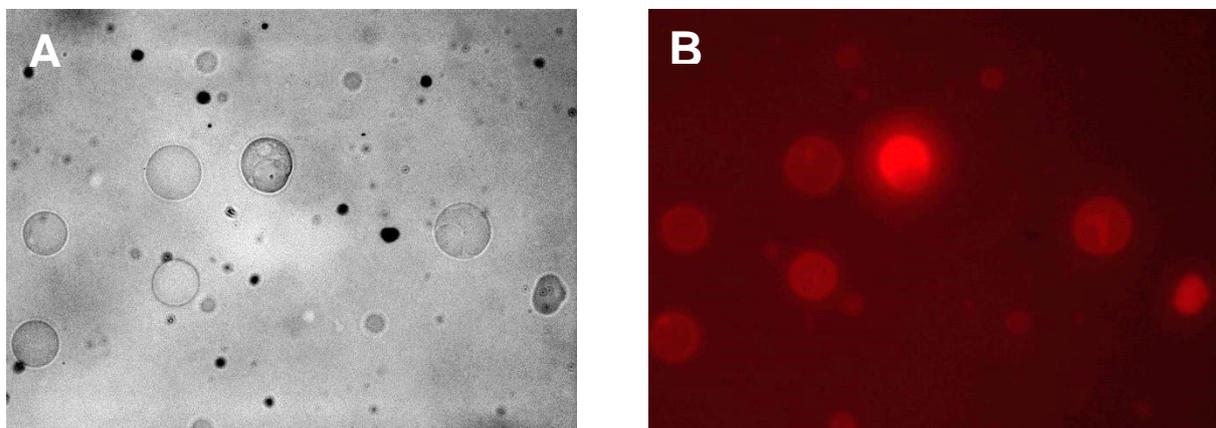


Figura 34. Grupo controle incubado com Fe₃O₄ polidispersa. A) Contraste de fase e B) Fluorescência da MC 540.

Na imagem 33A, nota-se vesículas menores internalizadas em vesículas maiores, nas quais é perceptível, até mesmo, a diferença de coloração para as GUVs que, aparentemente, não possuem vesículas internalizadas (mais claras, remetendo às populações de GUVs controle). Esse processo de invaginação das vesículas lipídicas pode estar relacionado à presença de partículas de magnetita no meio.

Quando a mesma visualização é trocada para o modo de fluorescência, comparativamente ao meio quando não possuía partículas de magnetita (Figura 32), é evidente um aumento da fluorescência de algumas GUVs e/ou parte, com um leve aumento da intensidade na superfície da membrana das GUVs. Este efeito demonstra que a presença de magnetita proporcionou uma alteração da estrutura de algumas GUVs, principalmente nas que apresentaram internalização de uma ou mais vesículas.

Como as GUVs originalmente não continham um marcador fluorescente intercalado na sua membrana, a presença da fluorescência na membrana é uma prova de que as LUVs fundiram junto com a GUV.

Logo em seguida, sem trocar a amostra do microscópio (aumento de 40x), aplicou-se um campo magnético externo uniforme de 400 mT (LIGADO) com o auxílio de um ímã permanente de NdFeB (dimensões de 48 mm de diâmetro e 10 mm de espessura e 46,0 / 49,0 MGOe de energia máxima) encostado na lâmina.

O intuito deste experimento é avaliar o potencial de aplicação das partículas de magnetita sem revestimento em sistemas biológicos.

O campo magnético aplicado arrasta as partículas de magnetita, cuja movimentação ao longo da lâmina é visível a olho nu (Figura 34), tanto partículas menores quanto as maiores. É imperceptível o deslocamento, no entanto, das vesículas lipídicas gigantes.

Deve-se atentar que nenhuma GUV muda a sua posição ao longo do tempo observado. Há um momento que até ocorre deformação em uma GUV devido à passagem com certa velocidade de uma partícula de magnetita com tamanho aproximado de 5 μm , no tempo de 4 segundos (Figura 34), contudo, depois que a partícula atravessa pela GUV, esta volta a sua conformação original.

A aplicação do campo é retirada aos 5s e observa-se que somente algumas partículas menores, com dimensão por volta de 1 μm , possuem uma tendência de movimento até entrarem em estado estacionário novamente. Algumas partículas maiores param de se mover logo após retirar o campo magnético (DESLIGADO), como a partícula de magnetita destacada em $t = 6\text{s}$ (Figura 34), mantendo-se na mesma posição a partir de $t = 6\text{s}$ ($t = 6\text{s}$, 7s , 8s e 9s ; indicada pela seta vermelha).

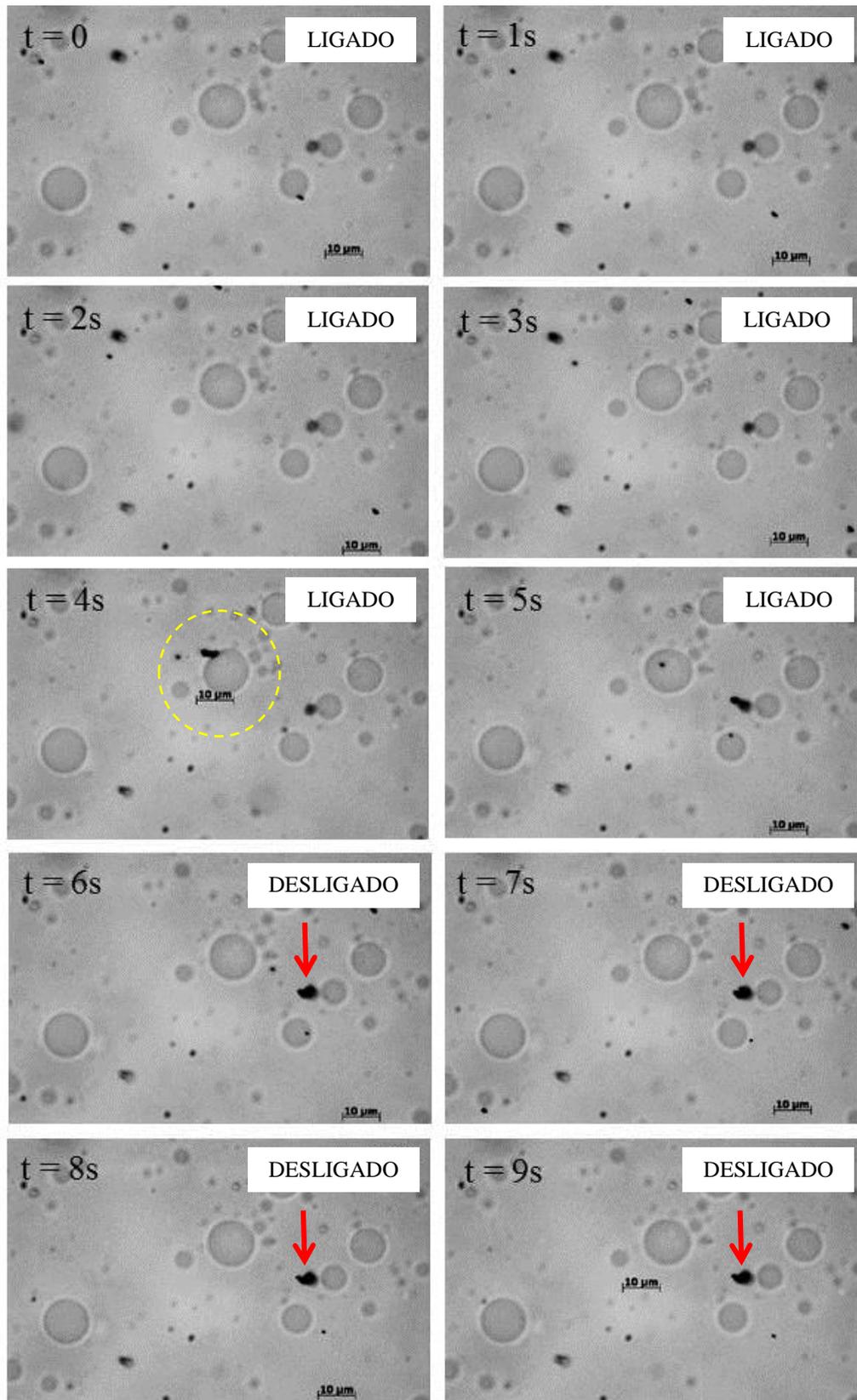


Figura 35. Efeito do campo magnético externo uniforme (400 mT) no grupo controle incubado com Fe_3O_4 polidispersa.

A formulação de Fe_3O_4 sem revestimento, não promove alterações na membrana lipídica da GUV, a ponto de fazê-la movimentar-se ao longo do campo ou alongar-se, como

acontece quando a GUV é sintetizada na presença da suspensão de magnetita (GUVs magnéticas)²⁰³

Na figura 34, a aplicação do campo magnético uniforme ocorreu por um período de 10 segundos, cujas imagens foram obtidas em tempo real, com um intervalo de 1 segundo (tempo mínimo do software da câmera do microscópio para gerar uma imagem, salvar e capturar outra novamente).

Um estudo, desenvolvido em paralelo, foi realizado com amostras de GUVs (20 μ L) e partículas de magnetita (10 μ L). Somente nesta etapa, a proporção de GUV para magnetita foi alterada de 5:1 (análises anteriores) para 2:1, com o objetivo de aprimorar a visualização das partículas de magnetita no meio.

A amostra foi submetida ao campo magnético externo de 400 mT durante 30 minutos, na qual foram coletadas imagens antes (Figura 35A e 35C) e após (Figura 35B e 35D) desse período.

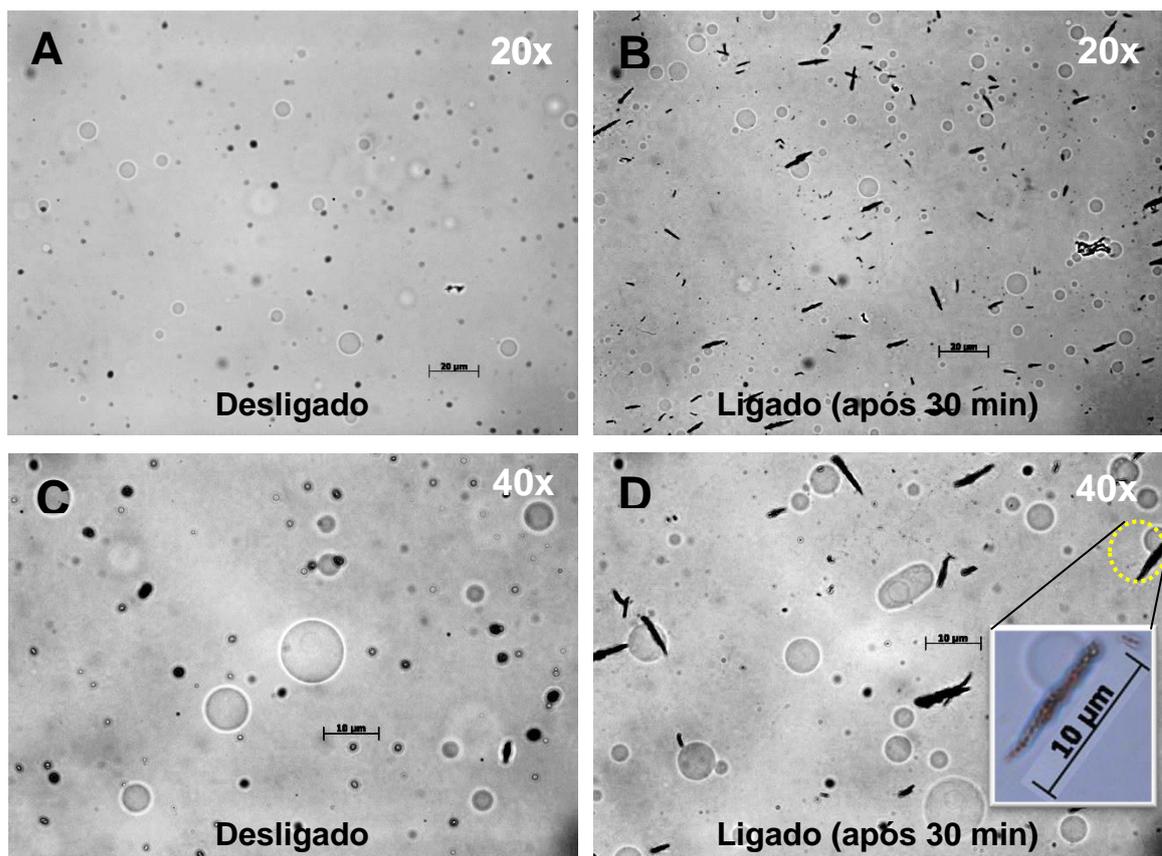


Figura 36. Efeito de alinhamento das partículas de magnetita com aplicação do campo magnético externo uniforme.

A figura 35A (campo desligado) representa a suspensão de magnetita incubada em GUVs, muito semelhante à figura 32B, com pontinhos escuros por toda a lâmina, porém, sem lipossomos e o marcador fluorescente, uma vez que neste experimento não se faz necessária a

inclusão destes dois elementos, pois há o interesse de visualizar apenas o alinhamento promovido pela aplicação do campo magnético externo, destacado pelo aumento na figura 35D. Com esta ampliação do agregado de partículas de magnetita, é claro que o filete, de comprimentos variados, se faz do alinhamento linear de partículas de magnetita, com diâmetro de aproximadamente 2 μm . Após desligar o campo, essas partículas vão se soltando uma das outras, procurando voltar à conformação inicial. Este fenômeno de desalinhamento é mais visível quando o campo fica aplicado durante apenas 30 segundos (dados não mostrados).

A preservação da estrutura das GUVs e ausência de movimento, durante a aplicação do campo magnético externo, é algo que se mantém também neste estudo.

4.5.3 GUVs incubadas com magnetolipossomos

Em pesquisa publicada em 1995 por Menager e Cabuil²²² com lipossomos gigantes fabricados na presença da suspensão magnética (diâmetro de até 40 μm), aplicou-se um campo magnético de baixa intensidade (10 mT), cujo efeito provocou um alongamento das vesículas em direção ao campo, o que proporcionou um estudo do efeito de deformação da mesma.

Nesta investigação, a vesícula lipídica gigante foi sintetizada na ausência de partículas magnéticas, o que confere um modelo celular contendo apenas uma solução de sacarose no seu interior envolto em um meio de glicose, ambas na mesma concentração. O que possibilita a visualização das GUVs na microscopia óptica é a diferença entre os índices de refração dos componentes interno e externo, como já mencionado.

Este modelo de membrana celular pode ser testado com diversas variáveis como vem sido descrito em inúmeros artigos ao longo dos anos^{170, 223}. Outra etapa primordial deste trabalho destaca a síntese de partículas magnéticas sem qualquer agente estabilizante que, na fase seguinte, são encapsuladas por uma bicamada lipídica, gerando assim os magnetolipossomos (LUVs, em sua maioria), os quais são vastamente explorados na literatura para diversas aplicações, inclusive, em testes de biocompatibilidade e biodistribuição na presença ou na ausência de um fármaco (detalhado no tópico 1.5).

Até o presente momento, há inúmeros artigos relatando a síntese e caracterização dos dois sistemas em separado, contudo, o atual estudo possui alguns aspectos intrínsecos e ainda não explorados na literatura.

Os magnetolipossomos são incubados na solução de GUVs, previamente confeccionadas na ausência de partículas magnéticas. Os estudos com aplicação do campo

magnético uniforme são feitos no conjunto: magnetolipossomos e GUVs. Além disso, foi estudado qualitativamente o deslocamento do sistema, enquanto a maioria dos experimentos apresentam efeitos de deformação (elongação) ou alinhamento dentro de vesículas contendo partículas magnéticas internalizadas de modo artificial ou biológico (endossomos)²²⁴, ambos com a aplicação de um campo magnético.

A composição lipídica empregada para a formação dos magnetolipossomo e GUVs permanece a mesma dos ensaios anteriores (PC 65%, PE 20% e CL 15%), para ambos.

Para este ensaio, uma nova lâmina foi confeccionada, colocando-se 25 μM de MC 540 em 25 μL de magnetolipossomos (nanopartículas de magnetita polidispersa recobertas por LUVs) incubados em 50 μL de GUVs.

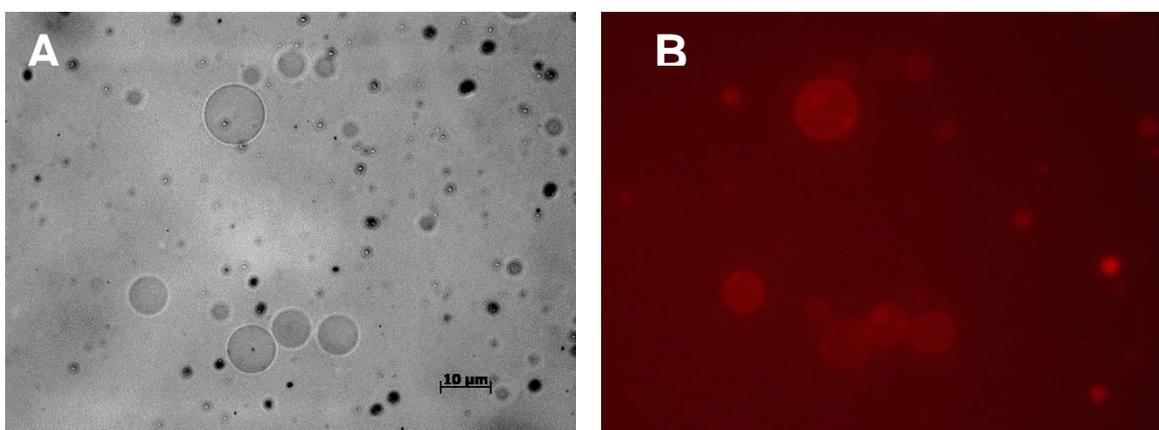


Figura 37. Magnetolipossomos–MC 540 incubados em GUVs. A) Contraste de fase; B) Microscopia de fluorescência. 40x.

As LUVs contendo magnetita apresentam o mesmo fenômeno de fluorescência observado para as LUVs sozinhas (Figura 32B), portanto, a entrega do marcador fluorescente para as LUVs com e sem magnetita, indica que essas LUVs são eficientes como carreadores de moléculas exógenas e a magnetita não interfere na fusão da LUV com a GUV.

Dessa forma, espera-se que a magnetita não interferirá na fusão da LUV com a célula, sendo um potencial modelo de carregamento de fármaco para uma célula.

4.5.4 Esquema ilustrativo para as imagens de fluorescência

Há uma limitação com o que se consegue mostrar com a imagem de fluorescência real, por isso, esse esquema se faz útil para fazer um rascunho do que está acontecendo em cada um dos sistemas propostos. Portanto, um esquema das imagens de contraste de fase e de fluorescência para 1) GUV, 2) GUV + LUVs–MC 540, 3) GUV + LUVs–MC 540–Magnetita

e 4) GUV + LUVs–MC 540–Magnetolipossomo foi elaborado para melhor compreender o sistema apresentado.

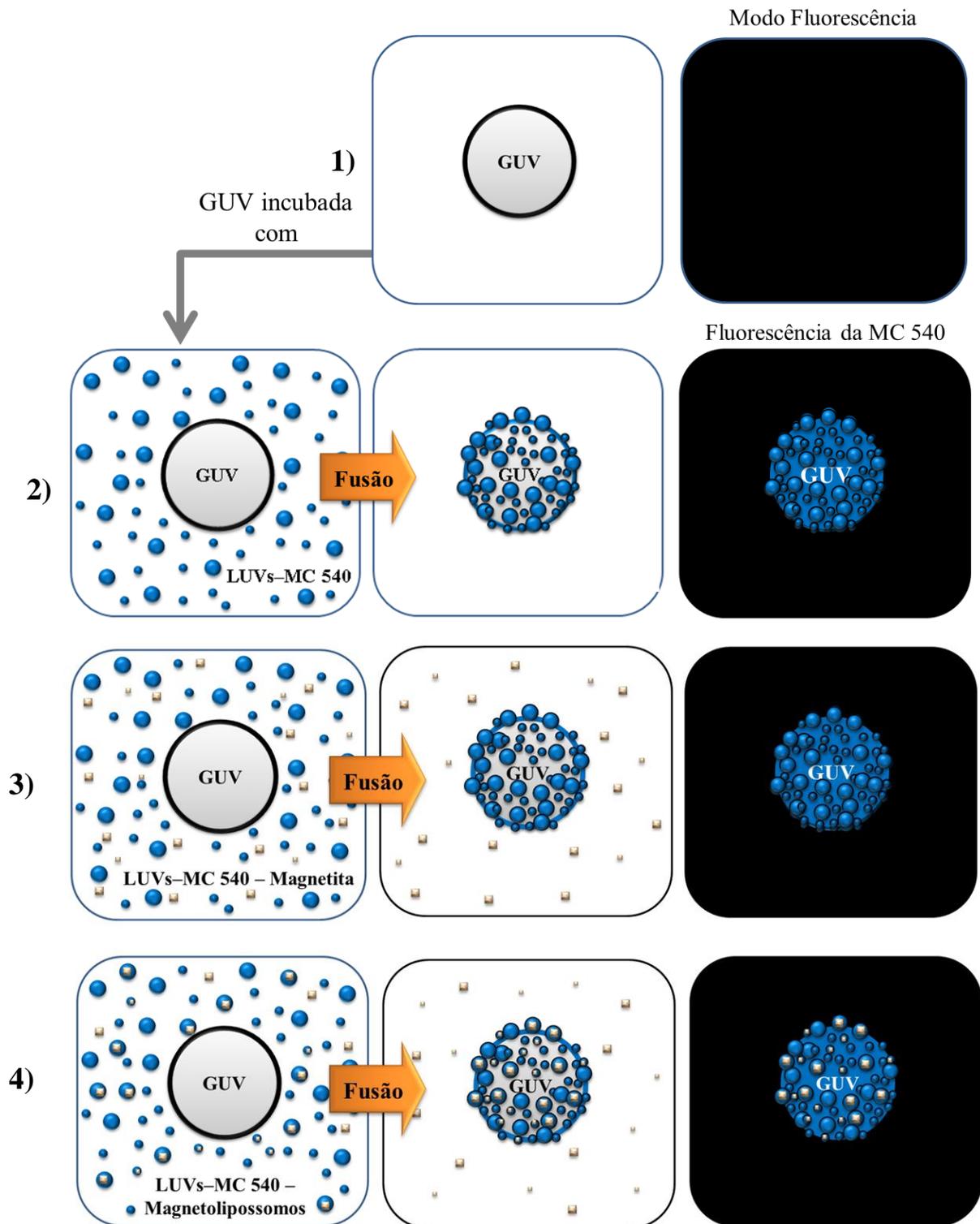


Figura 38. Esquema de fluorescência para 1) GUV, 2) GUV + LUVs–MC 540, 3) GUV + LUVs–MC 540–Magnetita e 4) GUV + LUVs–MC 540–Magnetolipossomo.

A proporção da escala não está sendo respeitada por causa do espaço disponível e para possibilitar a visualização das LUVs, cujo diâmetro não ultrapassa 1 μm . Além disso, desconsiderou-se as vesículas que apresentavam outras no seu interior.

Um resumo extraído de parte do tópico 3.3 de caracterizações, simplifica os 4 passos mostrados na figura 37:

- 1) Inicialmente as GUVs são visualizadas no contraste de fase, porém, na fluorescência nada aparece, pois não há marcador fluorescente intercalado nas suas membranas;
- 2) O lipossomo (LUVs) contendo MC 540 \rightarrow visualiza (grupo controle);
- 3) Incuba (2) com Magnetita \rightarrow visualiza na Ausência e Presença de campo magnético;
- 4) Incuba uma nova lâmina de GUV com magnetolipossomos-MC 540 \rightarrow visualiza na Ausência e Presença de campo magnético.

Como as GUVs originalmente não tinham um marcador fluorescente intercalado na sua membrana, a presença da fluorescência na membrana da GUV é uma confirmação de que as LUVs fundiram com a GUV e na presença ou ausência de magnetita, o mesmo fenômeno foi observado, assim como foi discutido no subitem anterior.

Os resultados finais que serão apresentados no próximo assunto dizem respeito ao procedimento número 4, quando o campo magnético uniforme externo é aplicado no sistema.

4.5.5 Estudo da magnetoforese em magnetolipossomos

A amostra de magnetolipossomos previamente incubados com MC 540 foi inserida em um meio contendo GUVs (Figura 36), etapa realizada em 4.5.3.

Dessa forma, com a lâmina no microscópio aproximou-se o ímã e, simultaneamente, as imagens foram coletadas, com intervalo entre elas de apenas 1 segundo.

Entre as imagens registradas, foi selecionada uma sequência de 40 imagens (aumento de 40x) para representar o sistema na presença de um campo magnético uniforme externo de 400 mT.

Com base nestas imagens, a figura 38 ilustra no tempo $t = 0$, no começo da seta amarela, praticamente metade de uma vesícula lipídica gigante com um agregado de magnetita próximo a sua superfície. Com a aplicação do campo, pode-se observar a movimentação desta GUV, tomada como referência. No tempo $t = 6$ s, nota-se que a GUV aparece inteira no campo de visão, devido ao deslocamento promovido pela atuação do campo magnético. Ao final de 40 s de exposição ao ímã, a GUV aparece ocupando o centro do campo (Figura 38).

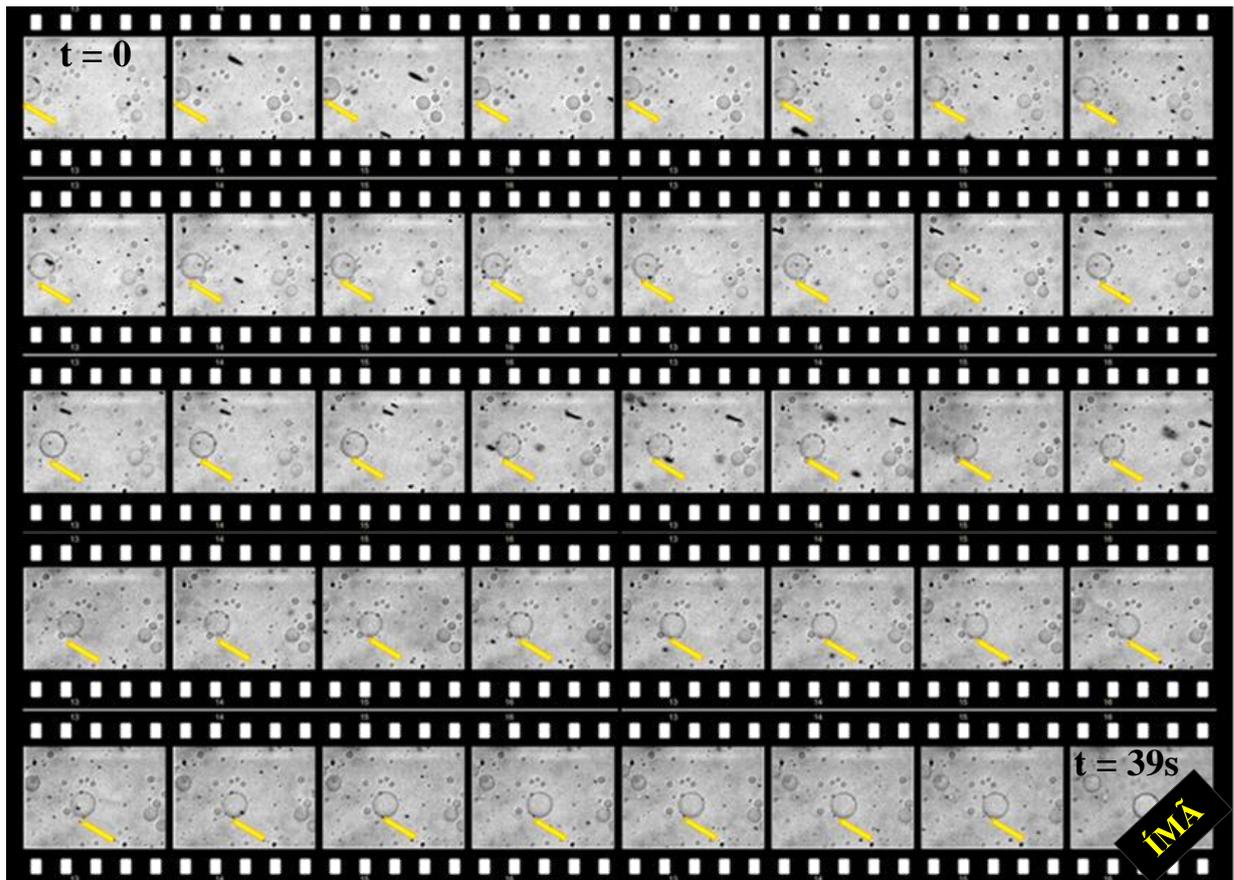


Figura 39. Microscopia óptica de GUVs incubadas com 25 μ L de magnetolipossomos na presença de um campo externo magnético uniforme (400 mT).

Considerando a posição inicial e final calculada sempre no centro da GUV, utilizando os recursos de escala da própria imagem, a GUV percorreu um percurso de aproximadamente 15 μ m, enquanto a magnetita deslocou-se cerca de 110 μ m, no espaço de tempo de 18 s (Figura 39).

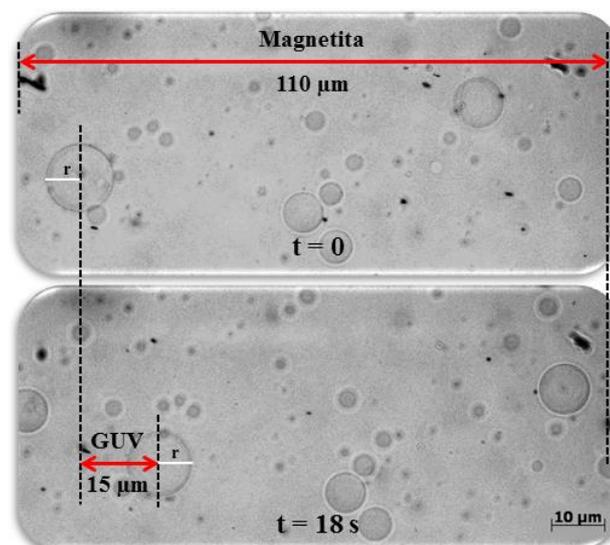


Figura 40. Deslocamento da magnetita e da GUV na presença de um campo magnético uniforme.

De acordo com os resultados da figura 39, o deslocamento da magnetita foi aproximadamente 86% maior em relação ao da GUV, no mesmo período de tempo. A magnetoforese das GUVs incubadas com magnetolipossomos foi um marco representativo nesta dissertação, pois os resultados com Fe_3O_4 não geraram movimentação das vesículas lipídicas, o que confirma a interação das nanopartículas de magnetita polidispersa com os lipídios na formação das LUVs (magnetolipossomos), as quais foram marcadas com um marcador fluorescente e mostraram fluorescência na membrana da GUV neste caso. Assim, a aplicação do campo pode dirigir a LUV para a GUV e promover o deslocamento significativo desta.

5 CONCLUSÕES

Analisou-se por difração de raios-X, por espalhamento de luz dinâmico e por imagens de microscopia eletrônica de varredura, que pelo segundo método padronizado de síntese permitiu-se obter magnetita polidispersa com tamanhos nanométricos. Conforme observado pela mudança do potencial de carga de superfície e por FTIR, ficou comprovado que houve um recobrimento parcial da magnetita pelo lipídio. Este recobrimento melhorou a estabilização e permitiu que as nanopartículas de magnetita polidispersa pudessem ser entregues por modelos de células (GUV e GMV). Duas populações foram encontradas para o potencial zeta dos magnetolipossomo, contudo, não houve separação magnética de propósito para ver se recobriu tudo e ficou claro que o lipídio recobriu parcialmente a magnetita. A entrega do marcador fluorescente das LUVs com e sem magnetita para as GUVs indica que estas LUVs são eficientes como carreadores de moléculas exógenas e a magnetita não interfere nesse processo. Estes resultados também sugerem que as propriedades de superfície das nanopartículas polidispersas modificadas são um importante parâmetro da formulação para promover a interação destas com membranas lipídicas.

Portanto, em termos gerais, este sistema, por conter a magnetita, pode representar um candidato a ser direcionado para um alvo específico no organismo mediante a aplicação de um campo magnético externo. A fusão da LUV com a membrana da célula pode promover uma entrega seletiva de um fármaco para uma célula-alvo. Trata-se, no entanto, de um estudo modelo e fundamental, que não está adaptado e deve ser testado em condições *in vivo*, o qual poderá ser realizado em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

1. Shinkai, M., Functional magnetic particles for medical application. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2002, 94, 606-613.
2. Ito, A.; Shinkai, M.; Honda, H.; Kobayashi, T., Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2005, 100, 1-11.
3. Safarik, I.; Safarikova, M.; Forsythe, S. J., The application of magnetic separations in applied microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 1995, 78, 575-585.
4. Chen, M.; Yamamuro, S.; Farrell, D.; Majetich, S. A., Gold-coated iron nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Applied Physics* 2003, 93, 7551-7553.
5. Tran, N.; Webster, T. J., Magnetic nanoparticles: biomedical applications and challenges. *Journal of Materials Chemistry* 2010, 20, 8760-8767.
6. Alexiou, C.; Schmid, R. J.; Jurgons, R.; Kremer, M.; Wanner, G.; Bergemann, C.; Huenges, E.; Nawroth, T.; Arnold, W.; Parak, F. G., Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 2006, 35, 446-450.
7. Franzreb, M.; Siemann-Herzberg, M.; Hobbey, T. J.; Thomas, O. R. T., Protein purification using magnetic adsorbent particles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, 70, 505-516.
8. Kato, K.; Radbruch, A., Isolation and characterization of cd34+ hematopoietic stem-cells from human peripheral-blood by high-gradient magnetic cell sorting. *Cytometry* 1993, 14, 384-392.
9. Chan, D. Y. C.; Henderson, D.; Barojas, J.; Homola, A. M., The stability of a colloidal suspension of coated magnetic particles in an aqueous-solution. *Ibm Journal of Research and Development* 1985, 29, 11-17.
10. Ding, G. W.; Adriane, K.; Chen, X. Z.; Chen, J.; Liu, Y. F., PVP magnetic nanospheres: Biocompatibility, in vitro and in vivo bleomycin release. *International Journal of Pharmaceutics* 2007, 328, 78-85.
11. Weissleder, R.; Stark, D. D.; Engelstad, B. L.; Bacon, B. R.; Compton, C. C.; White, D. L.; Jacobs, P.; Lewis, J., Superparamagnetic iron-oxide - pharmacokinetics and toxicity. *American Journal of Roentgenology* 1989, 152, 167-173.
12. Oberdorster, G., Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine* 2010, 267.
13. Pouliquen, D.; Lejeune, J. J.; Perdrisot, R.; Ermias, A.; Jallet, P., Iron-oxide nanoparticles for use as an mri contrast agent - pharmacokinetics and metabolism. *Magnetic Resonance Imaging* 1991, 9, 275-283.
14. Jain, T. K.; Reddy, M. K.; Morales, M. A.; Leslie-Pelecky, D. L.; Labhasetwar, V., Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Molecular Pharmaceutics* 2008, 5.
15. Dave, S. R.; Gao, X., Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2009, 1.

16. Oh, W. K.; Yoon, H.; Jang, J., Size control of magnetic carbon nanoparticles for drug delivery. *Biomaterials* 2010, 31, 1342-1348.
17. Veiseh, O.; Gunn, J. W.; Zhang, M., Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010, 62, 284-304.
18. Chertok, B.; Moffat, B. A.; David, A. E.; Yu, F. Q.; Bergemann, C.; Ross, B. D.; Yang, V. C., Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials* 2008, 29, 487-496.
19. Babincova, M.; Babinec, P., Possibility of magnetic targeting of drugs using magnetoliposomes. *Pharmazie* 1995, 50.
20. Soenen, S. J. H.; Hodenius, M.; De Cuyper, M., Magnetoliposomes: versatile innovative nanocolloids for use in biotechnology and biomedicine. *Nanomedicine* 2009, 4.
21. Sahoo, S. K.; Labhasetwar, V., Nanotech approaches to delivery and imaging drug. *Drug Discovery Today* 2003, 8.
22. Roco, M. C., Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology* 2003, 14.
23. Neuberger, T.; Schopf, B.; Hofmann, H.; Hofmann, M.; von Rechenberg, B., Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2005, 293, 483-496.
24. Okuhata, Y., Delivery of diagnostic agents for magnetic resonance imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999, 37, 121-137.
25. Choi, H. S.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J. P.; Ipe, B. I.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V., Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnology* 2007, 25, 1165-1170.
26. Banerjee, T.; Mitra, S.; Singh, A. K.; Sharma, R. K.; Maitra, A., Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2002, 243, 93-105.
27. Gupta, A. K.; Gupta, M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 2005, 26, 3995-4021.
28. Moghimi, S. M., Exploiting bone-marrow microvascular structure for drug-delivery and future therapies. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995, 17, 61-73.
29. Moghimi, S. M., Mechanisms of splenic clearance of blood-cells and particles - towards development of new splenotropic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995, 17, 103-115.
30. Gupta, A. K.; Curtis, A. S. G., Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Interaction studies with human fibroblasts in culture. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 2004, 15, 493-496.
31. Wu, W.; He, Q. G.; Jiang, C. Z., Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters* 2008, 3, 397-415.
32. Lin, M. M.; Kim, D. K.; El Haj, A. J.; Dobson, J., Development of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONS) for Translation to Clinical Applications. *Ieee Transactions on Nanobioscience* 2008, 7, 298-305.

33. Bertorelle, F.; Wilhelm, C.; Roger, J.; Gazeau, F.; Menager, C.; Cabuil, V., Fluorescence-modified superparamagnetic nanoparticles: Intracellular uptake and use in cellular imaging. *Langmuir* 2006, 22, 5385-5391.
34. Wilhelm, C.; Lavialle, F.; Pechoux, C.; Tatischeff, I.; Gazeau, F., Intracellular trafficking of magnetic nanoparticles to design multifunctional biovesicles. *Small* 2008, 4, 577-582.
35. Luciani, N.; Wilhelm, C.; Gazeau, F., The role of cell-released microvesicles in the intercellular transfer of magnetic nanoparticles in the monocyte/macrophage system. *Biomaterials* 2010, 31, 7061-7069.
36. Hafelli, U. O.; Riffle, J. S.; Harris-Shekhawat, L.; Carmichael-Baranauskas, A.; Mark, F.; Dailey, J. P.; Bardenstein, D., Cell Uptake and in Vitro Toxicity of Magnetic Nanoparticles Suitable for Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics* 2009, 6, 1417-1428.
37. Xiao, L.; Li, J.; Brougham, D. F.; Fox, E. K.; Feliu, N.; Bushmelev, A.; Schmidt, A.; Mertens, N.; Kiessling, F.; Valldor, M.; Fadeel, B.; Mathur, S., Water-Soluble Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles with Biocompatible Coating for Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Acs Nano* 2011, 5.
38. Lattuada, M.; Hatton, T. A., Functionalization of monodisperse magnetic nanoparticles. *Langmuir* 2007, 23, 2158-2168.
39. Benyettou, F.; Chebbi, I.; Motte, L.; Seksek, O., Magnetoliposome for alendronate delivery. *Journal of Materials Chemistry* 2011, 21.
40. Li, Z.; Tan, B.; Allix, M.; Cooper, A. I.; Rosseinsky, M. J., Direct coprecipitation route to monodisperse dual-functionalized magnetic iron oxide nanocrystals without size selection. *Small* 2008, 4, 231-239.
41. Yokoi, H.; Kantoh, T., Thermal-decomposition of the iron(iii) hydroxide and magnetite composites of poly(vinyl alcohol) - preparation of magnetite and metallic iron particles. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 1993, 66.
42. Maity, D.; Choo, S.-G.; Yi, J.; Ding, J.; Xue, J. M., Synthesis of magnetite nanoparticles via a solvent-free thermal decomposition route. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2009, 321.
43. Vijayakumar, R.; Koltypin, Y.; Felner, I.; Gedanken, A., Sonochemical synthesis and characterization of pure nanometer-sized Fe₃O₄ particles. *Materials Science and Engineering a-Structural Materials Properties Microstructure and Processing* 2000, 286.
44. Lalatonne, Y.; Richardi, J.; Pileni, M. P., Van der Waals versus dipolar forces controlling mesoscopic organizations of magnetic nanocrystals. *Nature Materials* 2004, 3, 121-125.
45. Zhao, H.-Q.; Shi, R.; Wang, Y.-T., Nanoscale Tail Aggregation in Ionic Liquids: Roles of Electrostatic and van der Waals Interactions. *Communications in Theoretical Physics* 2011, 56.
46. Zhang, L.; He, R.; Gu, H.-C., Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science* 2006, 253.
47. Zhu, L. Z.; Ma, J. W.; Jia, N. Q.; Zhao, Y.; Shen, H. B., Chitosan-coated magnetic nanoparticles as carriers of 5-Fluorouracil: Preparation, characterization and cytotoxicity studies. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2009, 68, 1-6.

48. Barrera, C.; Herrera, A. P.; Rinaldi, C., Colloidal dispersions of monodisperse magnetite nanoparticles modified with poly(ethylene glycol). *Journal of Colloid and Interface Science* 2009, 329, 107-113.
49. Fajarah, F.; Setyawan, H.; Widiyastuti, W.; Winardi, S., Synthesis of magnetite nanoparticles by surfactant-free electrochemical method in an aqueous system. *Advanced Powder Technology* 2012, 23, 328-333.
50. Kang, Y. S.; Risbud, S.; Rabolt, J. F.; Stroeve, P., Synthesis and characterization of nanometer-size Fe₃O₄ and gamma-Fe₂O₃ particles (vol 8, pg 2210, 1996). *Chemistry of Materials* 1998, 10, 1733-1733.
51. De Cuyper, M.; Muller, P.; Lueken, H.; Hodenius, M., Synthesis of magnetic Fe₃O₄ particles covered with a modifiable phospholipid coat. *Journal of Physics-Condensed Matter* 2003, 15, S1425-S1436.
52. Gonzales, M.; Krishnan, K. M., Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystal cores for hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2005, 293.
53. Giri, J.; Thakurta, S. G.; Bellare, J.; Nigam, A. K.; Bahadur, D., Preparation and characterization of phospholipid stabilized uniform sized magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2005, 293, 62-68.
54. Ravikumar, C.; Bandyopadhyaya, R., Mechanistic Study on Magnetite Nanoparticle Formation by Thermal Decomposition and Coprecipitation Routes. *Journal of Physical Chemistry C* 2011, 115, 1380-1387.
55. Schwertmann, U.; Cornell, R. M., *Iron Oxides in the Laboratory - Preparation and Characterization*. VCH: New York, 1991.
56. Si, S.; Kotal, A.; Mandal, T. K.; Giri, S.; Nakamura, H.; Kohara, T., Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles in the presence of polyelectrolytes. *Chemistry of Materials* 2004, 16, 3489-3496.
57. Zhang, Y.; Zhang, J., Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells. *Journal of Colloid and Interface Science* 2005, 283.
58. Namdeo, M.; Saxena, S.; Tankhiwale, R.; Bajpai, M.; Mohan, Y. M.; Bajpai, S. K., Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery Applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2008, 8, 3247-3271.
59. Banerjee, R., Liposomes: Applications in medicine. *Journal of Biomaterials Applications* 2001, 16.
60. Lesieur, S.; Gazeau, F.; Luciani, N.; Menager, C.; Wilhelm, C., Multifunctional nanovectors based on magnetic nanoparticles coupled with biological vesicles or synthetic liposomes. *Journal of Materials Chemistry* 2011, 21, 14387-14393.
61. Plassat, V.; Martina, M. S.; Barratt, G.; Menager, C.; Lesieur, S., Sterically stabilized superparamagnetic liposomes for MR imaging and cancer therapy: Pharmacokinetics and biodistribution. *International Journal of Pharmaceutics* 2007, 344, 118-127.
62. Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C., Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 1965, 13.

63. Lasic, D. D., Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology* 1998, 16.
64. Sharma, A.; Sharma, U. S., Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* 1997, 154.
65. Chatterjee, S. N.; Agarwal, S., Liposomes as membrane model for study of lipid-peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 1988, 4.
66. Colley, C. M.; Ryman, B. E., Liposome - from membrane model to therapeutic agent. *Trends in Biochemical Sciences* 1976, 1.
67. Choi, Y. W.; Rogers, J. A., The liposome as a model membrane in correlations of partitioning with alpha-adrenoceptor agonist activities. *Pharmaceutical Research* 1990, 7.
68. Degier, J.; Mandersl.Jg; Vandeeene.Ll, Lipid composition and permeability of liposomes. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1968, 150.
69. Torchilin, V. P., Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005, 4.
70. Lasic, D. D., Colloid chemistry - Liposomes within liposomes. *Nature* 1997, 387, 26-27.
71. He, P.; Zhu, X. Y., Phospholipid-assisted synthesis of size-controlled gold nanoparticles. *Materials Research Bulletin* 2007, 42, 1310-1315.
72. Ayyagari, A. L.; Zhang, X. D.; Ghaghada, K. B.; Annapragada, A.; Hu, X. P.; Bellamkonda, R. V., Long-circulating liposomal contrast agents for magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Medicine* 2006, 55, 1023-1029.
73. Weissman.G; Sessa, G.; Standish, M.; Bangham, A. D., A direct effect of steroids on permeability of lipid membranes (liposomes). *Journal of Clinical Investigation* 1965, 44.
74. Gabizon, A. A., LIPOSOME Circulation time and tumor targeting - implications for cancer-chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995, 16.
75. Fujisawa, T.; Miyai, H.; Hironaka, K.; Tsukamoto, T.; Tahara, K.; Tozuka, Y.; Ito, M.; Takeuchi, H., Liposomal diclofenac eye drop formulations targeting the retina: Formulation stability improvement using surface modification of liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 2012, 436, 564-567.
76. Medina, O. P.; Zhu, Y.; Kairemo, K., Targeted liposomal drug delivery in cancer. *Current Pharmaceutical Design* 2004, 10.
77. Toyota, T.; Ohguri, N.; Maruyama, K.; Fujinami, M.; Saga, T.; Aoki, I., Giant Vesicles Containing Superparamagnetic Iron Oxide as Biodegradable Cell-Tracking MRI Probes. *Analytical Chemistry* 2012, 84, 3952-3957.
78. Jesorka, A.; Orwar, O., Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annual Review of Analytical Chemistry* 2008, 1.
79. Woodle, M. C.; Lasic, D. D., Sterically stabilized liposomes. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1992, 1113.
80. Huang, C.; Thompson, T. E., Properties of lipid bilayer membranes separating 2 aqueous phases - water permeability. *Journal of Molecular Biology* 1966, 15.

81. Saenger, W., Structure and dynamics of water surrounding biomolecules. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 1987, 16.
82. Dunitz, J. D., The entropic cost of bound water in crystals and biomolecules. *Science* 1994, 264.
83. Pavinatto, F. J.; Pavinatto, A.; Caseli, L.; dos Santos, D. S.; Nobre, T. M.; Zaniquelli, M. E. D.; Oliveira, O. N., Interaction of chitosan with cell membrane models at the air-water interface. *Biomacromolecules* 2007, 8, 1633-1640.
84. Hvidt, A., Interactions of water with non-polar solutes. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 1983, 12.
85. Ketterer, B.; Neumcke, B.; Lauger, P., Transport mechanism of hydrophobic ions through lipid bilayer membranes. *Journal of Membrane Biology* 1971, 5.
86. Bruner, L. J., Interaction of hydrophobic ions with lipid bilayer membranes. *Journal of Membrane Biology* 1975, 22.
87. Lemmon, M. A., Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008, 9.
88. Divecha, N.; Irvine, R. F., Phospholipid signaling. *Cell* 1995, 80.
89. Szoka, F.; Papahadjopoulos, D., Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1978, 75.
90. Weissman, G.; Sessa, G.; Standish, M.; Bangham, A. D., A direct effect of steroids on permeability of lipid membranes (liposomes). *Journal of Clinical Investigation* 1965, 44, 1109-&.
91. Sessa, G.; Weissman, G., Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research* 1968, 9.
92. Johnson, S. M.; Bangham, A. D.; Hill, M. W.; Korn, E. D., Single bilayer liposomes. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1971, 233, 820-&.
93. Schaferkorting, M.; Korting, H. C.; Braunfalco, O., Liposome preparations - a step forward in topical drug-therapy for skin-disease - a review. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1989, 21.
94. Farmer, M. C.; Gaber, B. P., Liposome-encapsulated hemoglobin as an artificial oxygen-carrying system. *Methods in Enzymology* 1987, 149.
95. Klibanov, A. L.; Maruyama, K.; Torchilin, V. P.; Huang, L., Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *Febs Letters* 1990, 268.
96. Nastruzzi, C.; Cortesi, R.; Esposito, E.; Gambari, R.; Borgatti, M.; Bianchi, N.; Feriotto, G.; Mischiati, C., Liposomes as carriers for DNA-PNA hybrids. *Journal of Controlled Release* 2000, 68.
97. Watson, D. S.; Endsley, A. N.; Huang, L., Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens (vol 30, pg 2256, 2012). *Vaccine* 2012, 30.
98. Lipids, A. P. Lipid Products. <http://avantilipids.com/>.

99. NELSON, D. L.; COX, M., *Lehninger - Principles of Biochemistry*. 4 ed.; W. H. Freeman: New York, 2004.
100. Lewis, R. N. A. H.; McElhaney, R. N., The physicochemical properties of cardiolipin bilayers and cardiolipin-containing lipid membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 2009, 1788, 2069-2079.
101. White, S. H., Lipid bilayer as a solvent for small hydrophobic molecules. *Nature* 1976, 262.
102. Thompson, T. E.; Huang, C., Water permeability of lipid bilayer membranes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1966, 137.
103. Antonietti, M.; Forster, S., Vesicles and liposomes: A self-assembly principle beyond lipids. *Advanced Materials* 2003, 15.
104. Nagle, J. F.; Tristram-Nagle, S., Structure of lipid bilayers. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes* 2000, 1469, 159-195.
105. Sudbrack, T. P.; Archilha, N. L.; Itri, R.; Riske, K. A., Observing the Solubilization of Lipid Bilayers by Detergents with Optical Microscopy of GUVs. *Journal of Physical Chemistry B* 2011, 115, 269-277.
106. Nagayasu, A.; Uchiyama, K.; Kiwada, H., The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999, 40.
107. Allen, T. M.; Austin, G. A.; Chonn, A.; Lin, L.; Lee, K. C., Uptake of liposomes by cultured mouse bone-marrow macrophages - influence of liposome composition and size. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1991, 1061.
108. Dvorianchikova, G.; Barakat, D. J.; Hernandez, E.; Shestopalov, V. I.; Ivanov, D., Liposome-delivered ATP effectively protects the retina against ischemia-reperfusion injury. *Molecular Vision* 2010, 16.
109. Felnerova, D.; Viret, J. F.; Gluck, R.; Moser, C., Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Current Opinion in Biotechnology* 2004, 15.
110. Abe, H.; Azuma, H.; Yamaguchi, M.; Fujihara, M.; Ikeda, H.; Sakai, H.; Takeoka, S.; Tsuchida, E., Effects of hemoglobin vesicles, a liposomal artificial oxygen carrier, on hematological responses, complement and anaphylactic reactions in rats. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology* 2007, 35.
111. Huwyler, J.; Wu, D. F.; Pardridge, W. M., Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, 93.
112. Park, J. W.; Hong, K. L.; Kirpotin, D. B.; Colbern, G.; Shalaby, R.; Baselga, J.; Shao, Y.; Nielsen, U. B.; Marks, J. D.; Moore, D.; Papahadjopoulos, D.; Benz, C. C., Anti-HER2 immunoliposomes: Enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clinical Cancer Research* 2002, 8.
113. Derycke, A. S. L.; de Witte, P. A. M., Liposomes for photodynamic therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004, 56.

114. Jain, S.; Jain, P.; Umamaheshwari, R. B.; Jain, N. K., Transfersomes - A novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery: Development, characterization, and performance evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2003, 29.
115. Nappini, S.; Bombelli, F. B.; Bonini, M.; Norden, B.; Baglioni, P., Magnetoliposomes for controlled drug release in the presence of low-frequency magnetic field. *Soft Matter* 2010, 6, 154-162.
116. Bhosale, S.; Sisson, A. L.; Talukdar, P.; Fuerstenberg, A.; Banerji, N.; Vauthey, E.; Bollot, G.; Mareda, J.; Roger, C.; Wuerthner, F.; Sakai, N.; Matile, S., Photoproduction of proton gradients with pi-stacked fluorophore scaffolds in lipid bilayers. *Science* 2006, 313.
117. Williams, B. W.; Stubbs, C. D., Properties influencing fluorophore lifetime distributions in lipid bilayers. *Biochemistry* 1988, 27.
118. El-Aneed, A., An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release* 2004, 94.
119. Yarosh, D.; Klein, J., The role of liposomal delivery in cutaneous DNA repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996, 18.
120. Schreier, H.; Sawyer, S. M., Liposomal DNA vectors for cystic fibrosis gene therapy. Current applications, limitations, and future directions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996, 19.
121. Lonez, C.; Vandenbranden, M.; Ruyschaert, J.-M., Cationic liposomal lipids: From gene carriers to cell signaling. *Progress in Lipid Research* 2008, 47.
122. Storm, G.; Koppenhagen, F.; Heeremans, A.; Vingerhoeds, M.; Woodle, M. C.; Crommelin, D. J. A., Novel developments in liposomal delivery of peptides and proteins. *Journal of Controlled Release* 1995, 36.
123. Serikawa, T.; Kikuchi, A.; Sugaya, S.; Suzuki, N.; Kikuchi, H.; Tanaka, K., In vitro and in vivo evaluation of novel cationic liposomes utilized for cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release* 2006, 113.
124. Altin, J. G.; Parish, C. R., Liposomal vaccines - targeting the delivery of antigen. *Methods* 2006, 40.
125. Ambrosch, F.; Wiedermann, G.; Jonas, S.; Althaus, B.; Finkel, B.; Gluck, R.; Herzog, C., Immunogenicity and protectivity of a new liposomal hepatitis A vaccine. *Vaccine* 1997, 15.
126. Fries, L. F.; Gordon, D. M.; Richards, R. L.; Egan, J. E.; Hollingdale, M. R.; Gross, M.; Silverman, C.; Alving, C. R., Liposomal malaria vaccine in humans - a safe and potent adjuvant strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89.
127. Vahedi, F., Augmentation of immune responses induced by DNA vaccines in BALB/c mice: liposomal adjuvants, delivery routes, protein boost. *Clinical Biochemistry* 2011, 44.
128. Heath, T. D.; Lopez, N. G.; Stern, W. H.; Papahadjopoulos, D., 5-Fluoroorotate - a new liposome-dependent cyto-toxic agent. *Febs Letters* 1985, 187.
129. Debs, R. J.; Fuchs, H. J.; Philip, R.; Brunette, E. N.; Duzgunes, N.; Shellito, J. E.; Liggitt, D.; Patton, J. R., Immunomodulatory and toxic effects of free and liposome-encapsulated tumor necrosis factor-alpha in rats. *Cancer Research* 1990, 50.

130. Alving, C. R., Delivery of liposome-encapsulated drugs to macrophages. *Pharmacology & Therapeutics* 1983, 22.
131. Schroit, A. J.; Fidler, I. J., Effects of liposome structure and lipid-composition on the activation of the tumoricidal properties of macrophages by liposomes containing muramyl dipeptide. *Cancer Research* 1982, 42.
132. Oku, N.; Koike, C.; Tokudome, Y.; Okada, S.; Nishikawa, N.; Tsukada, H.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Fujii, H.; Murata, J.; Saiki, I., Application of liposomes for cancer metastasis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997, 24.
133. Allen, T. M.; Hansen, C. B.; Demenezes, D. E. L., Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995, 16.
134. Gabizon, A. A.; Barenholz, Y.; Bialer, M., Prolongation of the circulation time of doxorubicin encapsulated in liposomes containing a polyethylene glycol-derivatized phospholipid - pharmacokinetic studies in rodents and dogs. *Pharmaceutical Research* 1993, 10.
135. Gabizon, A.; Shiota, R.; Papahadjopoulos, D., Pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin encapsulated in stable liposomes with long circulation times. *Journal of the National Cancer Institute* 1989, 81.
136. Allen, T. M.; Hansen, C.; Rutledge, J., Liposomes with prolonged circulation times - factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1989, 981.
137. Gabizon, A.; Catane, R.; Uziely, B.; Kaufman, B.; Safra, T.; Cohen, R.; Martin, F.; Huang, A.; Barenholz, Y., Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Research* 1994, 54.
138. Kim, J.-Y.; Kim, J.-K.; Park, J.-S.; Byun, Y.; Kim, C.-K., The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator. *Biomaterials* 2009, 30.
139. Vanfurth, R.; Spector, W. G.; Cohn, Z. A.; Hirsch, J. G.; Langevoog, H.; Humphrey, J. H., Mononuclear phagocyte system - new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization* 1972, 46.
140. Vanfurth, R., Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology* 1982, 161.
141. Hume, D. A.; Ross, I. L.; Himes, S. R.; Sasmono, R. T.; Wells, C. A.; Ravasi, T., The mononuclear phagocyte system revisited. *Journal of Leukocyte Biology* 2002, 72.
142. Fairbairn, L.; Kapetanovic, R.; Sester, D. P.; Hume, D. A., The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *Journal of Leukocyte Biology* 2011, 89.
143. Chow, A.; Brown, B. D.; Merad, M., Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nature Reviews Immunology* 2011, 11.
144. Chonn, A.; Semple, S. C.; Cullis, P. R., Separation of large unilamellar liposomes from blood components by a spin column procedure - towards identifying plasma-proteins which mediate liposome clearance in vivo. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1991, 1070.
145. Patel, H. M., Serum opsonins and liposomes - their interaction and opsonophagocytosis. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 1992, 9.

146. Allen, T. M.; Hansen, C. B.; Guo, L. S. S., Subcutaneous administration of liposomes - a comparison with the intravenous and intraperitoneal routes of injection. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1993, 1150.
147. Senior, J. H.; Trimble, K. R.; Maskiewicz, R., Interaction of positively-charged liposomes with blood - implications for their application invivo. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1991, 1070.
148. Allen, T. M.; Hansen, C., Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes - effect of dose. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1991, 1068.
149. Maurer, N.; Fenske, D. B.; Cullis, P. R., Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2001, 1, 923-947.
150. Kim, D.-H.; An, E. J.; Kim, J.; Han, S.-H.; Kim, J.-W.; Oh, S.-G.; Suh, K.-D.; Cho, E. C., Fabrication and characterization of pseudo-ceramide-based liposomal membranes. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2009, 73.
151. Egbaria, K.; Weiner, N., Liposomes as a topical drug delivery system. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 1990, 200.
152. Korting, H. C.; Blecher, P.; Schaferkorting, M.; Wendel, A., Topical liposome drugs to come - what the patent literature tells us - a review. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1991, 25.
153. Kirjavainen, M.; Urtti, A.; Jaaskelainen, I.; Suhonen, T. M.; Paronen, P.; ValjakkaKoskela, R.; Kiesvaara, J.; Monkkonen, J., Interaction of liposomes with human skin in vitro - The influence of lipid composition and structure. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism* 1996, 1304.
154. Westerhof, W., Possibilities of liposomes as dynamic dosage form in dermatology. *Medical Hypotheses* 1985, 16.
155. Joseph, A.; Louria-Hayon, I.; Plis-Finarov, A.; Zeira, E.; Zakay-Rones, Z.; Raz, E.; Hayashi, T.; Takabayashi, K.; Barenholz, Y.; Kedar, E., Liposomal immunostimulatory DNA sequence (ISS-ODN): an efficient parenteral and mucosal adjuvant for influenza and hepatitis B vaccines. *Vaccine* 2002, 20.
156. Zhang, J. Q.; Zhang, Z. R.; Yang, H.; Tan, Q. Y.; Qin, S. R.; Qiu, X. L., Lyophilized paclitaxel magnetoliposomes as a potential drug delivery system for breast carcinoma via parenteral administration: In vitro and in vivo studies. *Pharmaceutical Research* 2005, 22.
157. Lasic, D. D., The mechanism of vesicle formation. *Biochemical Journal* 1988, 256.
158. Brunner, J.; Skrabal, P.; Hauser, H., Single bilayer vesicles prepared without sonication physicochemical properties. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1976, 455.
159. Batzri, S.; Korn, E. D., Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1973, 298, 1015-1019.
160. Manosroi, A.; Manosroi, J., Microencapsulation of human insulin DEAE-dextran complex and the complex in liposomes by the emulsion non-solvent addition method. *Journal of Microencapsulation* 1997, 14.
161. Winterhalter, M.; Lasic, D. D., Liposome stability and formation - experimental parameters and theories on the size distribution. *Chemistry and Physics of Lipids* 1993, 64, 35-43.

162. Lasic, D. D.; Needham, D., The "Stealth" liposome: A prototypical biomaterial. *Chemical Reviews* 1995, 95.
163. Lasic, D. D.; Martin, F. J., On the mechanism of vesicle formation. *Journal of Membrane Science* 1990, 50.
164. Jaafar-Maalej, C.; Diab, R.; Andrieu, V.; Elaissari, A.; Fessi, H., Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *Journal of Liposome Research* 2010, 20.
165. Sackmann, E., Supported membranes: Scientific and practical applications. *Science* 1996, 271.
166. Menger, F. M.; Keiper, J. S., Chemistry and physics of plant vesicles as biomembrane models. *Current Opinion in Chemical Biology* 1998, 2.
167. Fischer, A.; Oberholzer, T.; Luisi, P. L., Giant vesicles as models to study the interactions between membranes and proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 2000, 1467.
168. Veatch, S. L.; Keller, S. L., Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophysical Journal* 2003, 85, 3074-3083.
169. Zhao, J.; Wu, J.; Heberle, F. A.; Mills, T. T.; Klawitter, P.; Huang, G.; Costanza, G.; Feigenson, G. W., Phase studies of model biomembranes: Complex behavior of DSPC/DOPC/cholesterol. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 2007, 1768, 2764-2776.
170. Kahya, N., Protein-protein and protein-lipid interactions in domain-assembly: Lessons from giant unilamellar vesicles. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 2010, 1798, 1392-1398.
171. Honerkamp-Smith, A. R.; Cicuta, P.; Collins, M. D.; Veatch, S. L.; den Nijs, M.; Schick, M.; Keller, S. L., Line tensions, correlation lengths, and critical exponents in lipid membranes near critical points. *Biophysical Journal* 2008, 95, 236-246.
172. Nappini, S.; Bonini, M.; Bombelli, F. B.; Pineider, F.; Sangregorio, C.; Baglioni, P.; Norden, B., Controlled drug release under a low frequency magnetic field: effect of the citrate coating on magnetoliposomes stability. *Soft Matter* 2011, 7, 1025-1037.
173. Halbreich, A.; Roger, J.; Pons, J. N.; Geldwerth, D.; Da Silva, M. F.; Roudier, M.; Bacri, J. C., Biomedical applications of maghemite ferrofluid. *Biochimie* 1998, 80, 379-390.
174. Berger, P.; Adelman, N. B.; Beckman, K. J.; Campbell, D. J.; Ellis, A. B.; Lisensky, G. C., Preparation and properties of an aqueous ferrofluid. *Journal of Chemical Education* 1999, 76.
175. Morais, P. C.; Santos, J. G.; Neto, K. S.; Pelegrini, F.; De Cuyper, M., Magnetic resonance of magnetic fluid and magnetoliposome preparations. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2005, 293.
176. Chen, Y.; Bose, A.; Bothun, G. D., Controlled Release from Bilayer-Decorated Magnetoliposomes via Electromagnetic Heating. *Acs Nano* 2010, 4, 3215-3221.
177. Margolis, L. B.; Namiot, V. A.; Kljucin, L. M., Magnetoliposomes - another principle of cell sorting. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1983, 735, 193-195.
178. Decuyper, M.; Joniau, M., Magnetoliposomes - formation and structural characterization. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 1988, 15, 311-319.

179. Babincova, M., Microwave-controlled drug-release from magnetoliposomes. *Pharmazie* 1995, 50.
180. Masuko, Y.; Tazawa, K.; Viroonchatapan, E.; Takemori, S.; Shimizu, T.; Fujimaki, M.; Nagae, H.; Sato, H.; Horikoshi, I., Possibility of thermosensitive magnetoliposomes as a new agent for electromagnetic induced hyperthermia. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1995, 18.
181. Shinkai, M.; Suzuki, M.; Iijima, S.; Kobayashi, T., Antibody-conjugated magnetoliposomes for targeting cancer-cells and their application in hyperthermia. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1995, 21.
182. Viroonchatapan, E.; Sato, H.; Ueno, M.; Adachi, I.; Tazawa, K.; Horikoshi, I., Magnetic targeting of thermosensitive magnetoliposomes to mouse livers in an in situ on-line perfusion system. *Life Sciences* 1996, 58.
183. Viroonchatapan, E.; Sato, H.; Ueno, M.; Adachi, I.; Tazawa, K.; Horikoshi, I., Release of 5-fluorouracil from thermosensitive magnetoliposomes induced by an electromagnetic field. *Journal of Controlled Release* 1997, 46.
184. Babincova, M.; Sourivong, P.; Chorvat, D.; Babinec, P., Laser triggered drug release from magnetoliposomes. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 1999, 194.
185. Sangregorio, C.; Wiemann, J. K.; O'Connor, C. J.; Rosenzweig, Z., A new method for the synthesis of magnetoliposomes. *Journal of Applied Physics* 1999, 85.
186. Sabate, R.; Barnadas-Rodriguez, R.; Callejas-Fernandez, J.; Hidalgo-Alvarez, R.; Estelrich, J., Preparation and characterization of extruded magnetoliposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 2008, 347.
187. Wright, J. C.; Burgess, D. J.; Xu, X.; Burgess, D., Liposomes as Carriers for Controlled Drug Delivery. In *Long Acting Injections and Implants*, Springer US: 2012; pp 195-220.
188. Martina, M. S.; Fortin, J. P.; Menager, C.; Clement, O.; Barratt, G.; Grabielle-Madelmont, C.; Gazeau, F.; Cabuil, V.; Lesieur, S., Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging. *Journal of the American Chemical Society* 2005, 127, 10676-10685.
189. Martina, M.-S.; Wilhelm, C.; Lesieur, S., The effect of magnetic targeting on the uptake of magnetic-fluid-loaded liposomes by human prostatic adenocarcinoma cells. *Biomaterials* 2008, 29, 4137-4145.
190. Martina, M.-S.; Nicolas, V.; Wilhelm, C.; Menager, C.; Barratt, G.; Lesieur, S., The in vitro kinetics of the interactions between PEG-ylated magnetic-fluid-loaded liposomes and macrophages. *Biomaterials* 2007, 28, 4143-4153.
191. Fortin-Ripoche, J. P.; Martina, M. S.; Gazeau, F.; Menager, C.; Wilhelm, C.; Bacri, J. C.; Lesieur, S.; Clement, O., Magnetic targeting of magnetoliposomes to solid tumors with MR imaging monitoring in mice: Feasibility. *Radiology* 2006, 239.
192. Martina, M.-S.; Fortin, J.-P.; Fournier, L.; Menager, C.; Gazeau, F.; Clement, O.; Lesieur, S., Magnetic targeting of rhodamine-labeled superparamagnetic liposomes to solid tumors: In vivo tracking by fibered confocal fluorescence microscopy. *Molecular Imaging* 2007, 6, 140-146.

193. Riviere, C.; Martina, M.-S.; Tomita, Y.; Wilhelm, C.; Dinh, A. T.; Menager, C.; Pinard, E.; Lesieur, S.; Gazeau, F.; Seylaz, J., Magnetic targeting of nanometric magnetic fluid loaded liposomes to specific brain intravascular areas: A dynamic imaging study in mice. *Radiology* 2007, 244, 439-448.
194. Bucher, P.; Fischer, A.; Luisi, P. L.; Oberholzer, T.; Walde, P., Giant vesicles as biochemical compartments: The use of microinjection techniques. *Langmuir* 1998, 14, 2712-2721.
195. Inaoka, Y.; Yamazaki, M., Vesicle fission of giant unilamellar vesicles of liquid-ordered-phase membranes induced by amphiphiles with a single long hydrocarbon chain. *Langmuir* 2007, 23, 720-728.
196. Menager, C.; Guemghar, D.; Perzynski, R.; Lesieur, S.; Cabuil, V., Lipid bilayer elasticity measurements in giant liposomes in contact with a solubilizing surfactant. *Langmuir* 2008, 24, 4968-4974.
197. Lesieur, S.; Grabielle-Madellmont, C.; Menager, C.; Cabuil, V.; Dadhi, D.; Pierrot, P.; Edwards, K., Evidence of surfactant-induced formation of transient pores in lipid bilayers by using magnetic-fluid-loaded liposomes. *Journal of the American Chemical Society* 2003, 125, 5266-5267.
198. Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Elst, L. V.; Muller, R. N., Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews* 2008, 108, 2064-2110.
199. Sandre, O.; Menager, C.; Prost, J.; Cabuil, V.; Bacri, J. C.; Cebers, A., Shape transitions of giant liposomes induced by an anisotropic spontaneous curvature. *Physical Review E* 2000, 62, 3865-3870.
200. Tamba, Y.; Yamazaki, M., Single giant unilamellar vesicle method reveals effect of antimicrobial peptide magainin 2 on membrane permeability. *Biochemistry* 2005, 44, 15823-15833.
201. Langner, M.; Hui, S. W., Merocyanine interaction with phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1993, 1149, 175-179.
202. Nappini, S.; Al Kayal, T.; Berti, D.; Norden, B.; Baglioni, P., Magnetically Triggered Release From Giant Unilamellar Vesicles: Visualization By Means Of Confocal Microscopy. *Journal of Physical Chemistry Letters* 2011, 2, 713-718.
203. Beaune, G.; Menager, C.; Cabuil, V., Location of magnetic and fluorescent nanoparticles encapsulated inside giant liposomes. *Journal of Physical Chemistry B* 2008, 112, 7424-7429.
204. Laurencin, M.; Georgelin, T.; Malezieux, B.; Siaugue, J. M.; Menager, C., Interactions Between Giant Unilamellar Vesicles and Charged Core-Shell Magnetic Nanoparticles. *Langmuir* 2010, 26, 16025-16030.
205. Beaune, G.; Menager, C., In situ precipitation of magnetic fluid encapsulated in giant liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science* 2010, 343, 396-399.
206. Angelova, M. I.; Dimitrov, D. S., Liposome electroformation. *Faraday Discussions* 1986, 81.
207. Estes, D. J.; Mayer, M., Electroformation of giant liposomes from spin-coated films of lipids. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 2005, 42.
208. Verkman, A. S.; Frosch, M. P., Temperature-jump studies of merocyanine-540 relaxation kinetics in lipid bilayer-membranes. *Biochemistry* 1985, 24.
209. Waggoner, A. S., Dye indicators of membrane-potential. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 1979, 8, 47-68.

210. Tomita, T.; Sugawara, T.; Wakamoto, Y., Multitude of Morphological Dynamics of Giant Multilamellar Vesicles in Regulated Nonequilibrium Environments. *Langmuir* 2011, 27, 10106-10112.
211. Stott, B. M.; Vu, M. P.; McLemore, C. O.; Lund, M. S.; Gibbons, E.; Brueseke, T. J.; Wilson-Ashworth, H. A.; Bell, J. D., Use of fluorescence to determine the effects of cholesterol on lipid behavior in sphingomyelin liposomes and erythrocyte membranes. *Journal of Lipid Research* 2008, 49, 1202-1215.
212. Tandon, V.; Bhagavatula, S. K.; Nelson, W. C.; Kirby, B. J., zeta potential and electroosmotic mobility in microfluidic devices fabricated from hydrophobic polymers: 1. The origins of charge. *Electrophoresis* 2008, 29, 1092-1101.
213. Tandon, V.; Kirby, B. J., zeta potential and electroosmotic mobility in microfluidic devices fabricated from hydrophobic polymers: 2. Slip and interfacial water structure. *Electrophoresis* 2008, 29, 1102-1114.
214. Beaune, G.; Dubertret, B.; Clement, O.; Vayssettes, C.; Cabuil, V.; Menager, C., Giant vesicles containing magnetic nanoparticles and quantum dots: Feasibility and tracking by fiber confocal fluorescence microscopy. *Angewandte Chemie-International Edition* 2007, 46.
215. Mitchell, B. S., An introduction to materials engineering and science: for chemical and materials engineers. Wiley Online Library: 2004.
216. Sun, S. H.; Zeng, H., Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 2002, 124, 8204-8205.
217. Lim, S.-F.; Zheng, Y.-M.; Zou, S.-W.; Chen, J. P., Characterization of copper adsorption onto an alginate encapsulated magnetic sorbent by a combined FT-IR, XPS and mathematical modeling study. *Environmental Science & Technology* 2008, 42, 2551-2556.
218. Zhang, S.; Niu, H.; Zhang, Y.; Liu, J.; Shi, Y.; Zhang, X.; Cai, Y., Biocompatible phosphatidylcholine bilayer coated on magnetic nanoparticles and their application in the extraction of several polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water and milk samples. *Journal of Chromatography A* 2012, 1238, 38-45.
219. Jiang, C. H.; Gamarnik, A.; Tripp, C. P., Identification of lipid aggregate structures on TiO₂ surface using headgroup IR bands. *Journal of Physical Chemistry B* 2005, 109, 4539-4544.
220. Orendorff, C. J.; Alam, T. M.; Sasaki, D. Y.; Bunker, B. C.; Voigt, J. A., Phospholipid-Gold Nanorod Composites. *Acs Nano* 2009, 3, 971-983.
221. Li, G.-y.; Jiang, Y.-r.; Huang, K.-l.; Ding, P.; Chen, J., Preparation and properties of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds* 2008, 466, 451-456.
222. Menager, C.; Cabuil, V., Synthesis of magnetic liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science* 1995, 169, 251-253.
223. Koonen, D. P. Y.; Coumans, W. A.; Arumugam, Y.; Bonen, A.; Glatz, J. F. C.; Luiken, J., Giant membrane vesicles as a model to study cellular substrate uptake dissected from metabolism. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2002, 239.
224. Wilhelm, C.; Cebers, A.; Bacri, J. C.; Gazeau, F., Deformation of intracellular endosomes under a magnetic field. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 2003, 32, 655-660.