



ENCAPSULAMENTO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM POLÍMEROS
ACRÍLICOS E AVALIAÇÃO DE HIPERTERMIA PARA POTENCIAL
TRATAMENTO DE CÂNCER

Marcel Guimarães Martins

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto
Priscilla Vanessa Finotelli

Rio de Janeiro
Março de 2017

ENCAPSULAMENTO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM POLÍMEROS
ACRÍLICOS E AVALIAÇÃO DE HIPERTERMIA PARA POTENCIAL
TRATAMENTO DE CÂNCER

Marcel Guimarães Martins

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.

Prof^a. Priscilla Vanessa Finotelli, D.Sc.

Prof^a. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Prof. Fernando Gomes de Souza Junior, D.Sc.

Prof. Flávio Garcia, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2017

Martins, Marcel Guimarães

Encapsulamento de nanopartículas magnéticas em polímeros acrílicos e avaliação de hipertermia para potencial tratamento de câncer / Marcel Guimarães Martins. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2017.

XXV, 135 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Priscilla Vanessa Finotelli

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 125-135.

1. Polimerização por miniemulsão. 2. Nanopartículas superparamagnéticas. 3. Hipertermia magnética. I. Pinto, José Carlos Costa da Silva *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Ao Nick (*in memoriam*) por sempre encorajar e incentivar minha formação acadêmica e por motivar de alguma forma o sentido deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Rosemary e Frederico, meu incondicional agradecimento. Obrigado pelo apoio irrestrito e esforços concedidos em todos os momentos.

A minha irmã Bruna e meu cunhado Fernando, pela grande torcida e confiança na minha capacidade para concretizar este trabalho.

A meus familiares e amigos, por apoiar as minhas escolhas e pelo carinho, paciência e incentivo, mesmo quando não compreendiam a proposta deste trabalho como um todo.

Aos orientadores José Carlos Pinto e Priscilla Finotelli, pela oportunidade atribuída e atenção conferida. Obrigado por incentivarem cada tomada de decisão, mesmo quando ultrapassava os domínios acadêmicos para a fronteira do empreender. Vocês são grandes exemplos de profissionais a serem seguidos.

À professora Méri Vieira por despertar em mim a paixão pela pesquisa científica e contribuir na formação de uma base sólida para este caminho. Além dos ensinamentos e trocas de aprendizados, obrigado por sua amizade.

Às amigas que iniciaram na graduação e serão mantidas e cultivadas para sempre. Fernanda, Lizandra, Luna e Marina, não importa os rumos que nossas vidas tomem, sempre arrumaremos um jeito de estarmos juntos e conectados.

Aos eternos integrantes do lab 5A/5B da Química-UFF, por acolherem um engenheiro em um laboratório dominado por químicos. Obrigado por sempre estarem presentes, mesmo que não sendo fisicamente.

Aos integrantes do Magmol-UFF, com os quais pude compartilhar bons momentos mesmo que por curto período de tempo. Obrigado pela amizade de todos e incentivo para que eu buscasse os meus ideais.

Aos demais amigos da Química e Engenharia Química da UFF, pela amizade e inesquecíveis momentos vividos.

Aos que compartilharam da transição UFF-UFRJ e sempre proporcionaram boas risadas estando juntos. Daniels, Guilherme “peixe/café”, Fran e menino Maurício, obrigado pela amizade sincera.

Àqueles com os quais convivi diariamente no último ano do mestrado, pelos momentos vividos juntos. Betin, Eyleen, Morgs e Nachito, obrigado pelas trocas de experiências e por me tornarem uma pessoa melhor a cada dia.

A todos os vitoriosos que iniciaram essa jornada no PEQ juntos, muito obrigado por tornarem esta caminhada mais leve. A Ariane, pela grande amizade construída nestes dois anos de PEQ; obrigado por toda a vivência compartilhada, incluindo alegrias, tristezas, vitórias, desespero, curtições e conquistas, sem esquecer das nossas longas conversas quase como terapias de vida. A Camilinha, por momentos intensos e muitas vezes “dramáticos”; obrigado por ampliar minha capacidade de entendimento e interpretação e por estar sempre presente. Ao grande Fabinho, pela pessoa humana, verdadeira e amiga que é; obrigado por estar junto em importantes ocasiões e contribuir na concretização de tantos projetos na representação discente do programa, além de participar de muitas vivências pessoais tanto de aflições quanto de realizações; conte sempre comigo. A meu irmão Nayher, pela parceria, companheirismo e conversas filosóficas; obrigado pela habilidade de convergir o caos a pontos sensíveis e introspectivos.

À equipe organizadora do XVI Colóquio Anual de Engenharia Química do PEQ, pelo espírito de equipe e amizade. Débora, Fábio, Guilherme e Tahyná, obrigado por me proporcionarem esta vivência tão gratificante, junto a pessoas dispostas a fazer acontecer.

A Adriana Teixeira e Luciana Carvalheira, pela grande amizade iniciada no primeiro período de PEQ e fortalecidas pelo ideal empreendedor que ainda nos garantirá grandes realizações juntos. Obrigado pelo apoio de sempre e pela confiança em meus ideais.

A todos do Laboratório I-140, EngePol e Ladeq, pelo convívio e aprendizado. Em especial, obrigado Jorge, Alessandro, Larissa, Natasha, Nathalie e Ricardo, por estarem sempre dispostos a ajudar e facilitarem a dinâmica dos laboratórios. A Iza, por compartilhar seus conhecimentos sempre com tanta dedicação e atenção. A Lu, por apoiar

e incentivar mudanças e inovações em prol do coletivo. A Thamiris, pela ajuda irrestrita e pela grande pessoa que é, sempre disposta a ajudar a todos mesmo em sacrifício próprio; obrigado pelas nossas confusas porém produtivas discussões experimentais, pelas ajudas em análises e procedimentos, pela troca de experiências e pelas conversas a qualquer hora que tornaram a vivência no laboratório muito mais divertida.

Aos alunos de iniciação científica, por me proporcionarem a experiência de orientação científica, que refletiu em grande crescimento pessoal. Obrigado Daniel e Nathany, por me permitirem ensinar, por aprender com vocês e por toda ajuda e empenho.

Às Roses da limpeza, pelas conversas de meio de expediente, animando o dia a dia no laboratório e nas dependências do PEQ.

Aos laboratórios que contribuíram na realização de medidas e caracterizações apresentados neste trabalho. Em especial, obrigado ao André Rossi (CBPF), ao Flávio Garcia (CBPF), à Helen Ferraz (GRIFIT) e à Maria Elizabeth Garcia (PAM) pela paciência e compartilhamento de conhecimentos que contribuíram significativamente para a análise de dados e discussão de resultados.

À secretaria do PEQ da COPPE/UFRJ, pelo suporte. Em especial, à Egna, ao Luan, à Luciana, à Mary e à Vera, por serem sempre tão prestativos.

Aos professores do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ, pelo desenvolvimento acadêmico e aprendizado. Extensivo a todos os professores que contribuíram de alguma maneira com a minha formação ao longo de toda trajetória.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

ENCAPSULAMENTO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM POLÍMEROS
ACRÍLICOS E AVALIAÇÃO DE HIPERTERMIA PARA POTENCIAL
TRATAMENTO DE CÂNCER

Marcel Guimarães Martins

Março/2017

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Priscilla Vanessa Finotelli

Programa: Engenharia Química

O presente trabalho descreve a síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro encapsuladas em polímeros acrílicos. Magnetita (Fe_3O_4) foi obtida por coprecipitação e encapsulada via polimerização por miniemulsão inversa, em poli(ácido acrílico), e direta, em poli(metacrilato de metila). Também foi avaliada a bioconjugação de ácido fólico à superfície das partículas poliméricas obtidas por miniemulsão inversa. A baixa coercividade e remanência das nanopartículas magnéticas, assim como o comportamento superparamagnético à temperatura ambiente, encoraja aplicações médicas almejadas neste trabalho. Medidas realizadas quando as nanopartículas são submetidas a aplicação de campo magnético alternado externo corroboram o potencial de aplicação destes materiais para hipertermia. Assim, foram obtidas com sucesso partículas híbridas magnético-poliméricas com dimensão submicrométrica estáveis em meio aquoso. Estas partículas são promissoras para o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados e sítio dirigidos, para o emprego de hipertermia em terapias oncológicas, proporcionando tratamentos menos invasivos e mais eficientes, com menores efeitos colaterais e maior especificidade.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

ENCAPSULATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES IN ACRYLIC POLYMERS
AND EVALUATION OF HYPERTHERMIA FOR POTENTIAL CANCER
THERAPY

Marcel Guimarães Martins

March/2017

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto

Priscilla Vanessa Finotelli

Department: Chemical Engineering

This work describes the synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles encapsulated in acrylic polymers. Magnetite (Fe_3O_4) was obtained through coprecipitation and encapsulated by inverse and direct miniemulsion polymerization, in poly(acrylic acid) and poly(methyl methacrylate), respectively. Besides, the folic acid bioconjugation with the surface of polymeric particles obtained by inverse miniemulsion was performed and evaluated. The low coercivity and remanence of magnetic nanoparticles, as well as the superparamagnetic behavior at room temperature, favor medical applications aimed at the conceiving of this work. Measures performed with the nanoparticles under external alternating magnetic field corroborate the potential application of these materials for hyperthermia. Therefore, hybrid magnetic-polymeric particles with submicrometer size and stable in aqueous medium were successfully obtained. These particles are promising for the development of complex nanostructured systems for use in hyperthermia in cancer therapies, providing less invasive and more efficient treatments, with lower side effects and greater specificity.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO I Introdução..... | 1 |
| 1.1. Estado da Arte..... | 1 |
| 1.2. Objetivos | 3 |
| 1.2.1. Objetivo Geral..... | 3 |
| 1.2.2. Objetivos Específicos | 3 |
| 1.3. Estrutura da dissertação | 4 |
| CAPÍTULO II Revisão Bibliográfica | 6 |
| 2.1. Partículas magnéticas | 6 |
| 2.1.1. Conceitos fundamentais do magnetismo ao nanomagnetismo | 6 |
| 2.1.2. Partículas superparamagnéticas de óxido de ferro | 9 |
| 2.1.3. Estabilidade coloidal..... | 12 |
| 2.1.4. Hipertermia Magnética | 14 |
| 2.2. Partículas poliméricas | 17 |
| 2.2.1. Conceitos fundamentais de polimerização | 17 |
| 2.2.2. Métodos de polimerização..... | 19 |
| 2.2.3. Polimerização por miniemulsão | 20 |
| 2.2.4. Polímeros acrílicos | 23 |
| 2.2.5. Poli(ácido acrílico) | 24 |
| 2.2.6. Encapsulamento de partículas magnéticas em polímeros..... | 25 |
| 2.3. Bioconjugação | 27 |
| 2.3.1. Liberação controlada e entrega sítio-dirigida..... | 27 |
| 2.3.2. Mecanismo de bioconjugação | 29 |
| 2.3.3. Folato..... | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4. Considerações Gerais | 33 |
| Capítulo III Materiais e Métodos | 35 |
| 3.1. Síntese da magnetita | 35 |
| 3.1.1. Materiais | 35 |
| 3.1.2. Metodologia | 37 |
| 3.1.3. Planejamento experimental | 39 |
| 3.2. Miniemulsão inversa do PAA | 40 |
| 3.2.1. Materiais | 40 |
| 3.2.2. Metodologia | 42 |
| 3.2.3. Planejamento experimental | 44 |
| 3.3. Miniemulsão direta do PMMA | 46 |
| 3.3.1. Materiais | 46 |
| 3.3.2. Metodologia | 48 |
| 3.4. Bioconjugação com ácido fólico | 49 |
| 3.4.1. Materiais | 50 |
| 3.4.2. Metodologia | 50 |
| 3.5. Caracterizações e especificações de equipamentos | 51 |
| 3.5.1. Análise termogravimétrica (TGA) | 51 |
| 3.5.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) | 52 |
| 3.5.3. Cromatografia de permeação em gel (GPC) | 52 |
| 3.5.4. Difração de raios X (DRX) | 52 |
| 3.5.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) | 53 |
| 3.5.6. Espectroscopia na região de ultravioleta e visível (UV-vis) | 53 |
| 3.5.7. Hipertermia magnética | 53 |
| 3.5.8. Medida de magnetização | 53 |

| | | |
|---|---|------------|
| 3.5.9. | Microscopia eletrônica de transmissão (MET) | 54 |
| 3.5.10. | Microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 54 |
| 3.5.11. | Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico | 54 |
| 3.5.12. | Reologia | 55 |
| 3.5.13. | Rendimento da reação | 55 |
| 3.6. | Análise Estatística | 56 |
| Capítulo IV Resultados e Discussões | | 58 |
| 4.1. | Nanopartículas magnéticas (NPM) | 59 |
| 4.1.1. | Estrutura, morfologia e tamanho de partículas | 59 |
| 4.1.2. | Estabilidade em solução | 63 |
| 4.1.3. | Medidas de magnetização | 65 |
| 4.1.4. | Hipertermia magnética | 69 |
| 4.1.5. | Análise estatística [NPM] | 72 |
| 4.2. | Nanopartículas poliméricas (NPP) | 77 |
| 4.2.1. | Partículas de PAA | 77 |
| 4.2.1.1. | Análise estatística [NPP] | 77 |
| 4.2.1.2. | Caracterização das partículas de PAA | 87 |
| 4.2.2. | Partículas de PMMA | 91 |
| 4.2.2.1. | Caracterização das partículas de PMMA | 91 |
| 4.3. | Encapsulamento | 93 |
| 4.3.1. | Morfologia e tamanho | 94 |
| 4.3.2. | Estabilidade em solução | 98 |
| 4.3.3. | Medidas de magnetização | 98 |
| 4.3.4. | Hipertermia magnética | 100 |
| 4.4. | Bioconjugação | 102 |
| Capítulo V Conclusões e Perspectivas | | 106 |

| | |
|--|------------|
| 5.1. Conclusões | 106 |
| 5.2. Sugestões para trabalhos futuros | 108 |
| APÊNDICE A | 110 |
| APÊNDICE B..... | 114 |
| APÊNDICE C | 119 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 125 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - ESQUEMA DO COMPORTAMENTO DOS MOMENTOS MAGNÉTICOS PARA DIFERENTES TIPOS DE MATERIAL, NA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DE UM CAMPO MAGNÉTICO EXTERNO. ADAPTADO DE (JEONG ET AL., 2007)..... | 7 |
| FIGURA 2 – CURVA DE MAGNETIZAÇÃO CARACTERÍSTICA DE MATERIAIS FERROMAGNÉTICOS E FERRIMAGNÉTICOS. ADAPTADO DE (JEONG ET AL., 2007). | 8 |
| FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO COMPORTAMENTO DE NANOPARTÍCULAS NA CORRENTE SANGUÍNEA E O EFEITO DO AUMENTO DE PERMEABILIDADE E RETENÇÃO (<i>EPR</i>) EM REGIÕES DE TECIDOS TUMORAIS. ADAPTADO DE (ESTELRICH ET AL., 2015)..... | 11 |
| FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DE SURFACTANTES COMUMENTE EMPREGADOS PARA ESTABILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS: (A) ÁCIDO OLEICO E (B) ÁCIDO CÍTRICO. | 13 |
| FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TRATAMENTO DE CÂNCER POR HIPERTERMIA MAGNÉTICA, EMPREGANDO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS: (A) INTRODUÇÃO DO FLUIDO MAGNÉTICO NO TECIDO TUMORAL E (B) APLICAÇÃO DE CAMPO MAGNÉTICO ALTERNADO PARA INDUZIR O AQUECIMENTO LOCALIZADO. ADAPTADO DE (NANOMED, 2013). | 14 |
| FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DOIS COMPONENTES DA RELAXAÇÃO MAGNÉTICA, APÓS APLICAÇÃO DE UM CAMPO MAGNÉTICO B , EM UM FLUIDO MAGNÉTICO. ADAPTADO DE (LAURENT ET AL., 2011). | 15 |
| FIGURA 7 - ESQUEMA DO PRIMEIRO PROTÓTIPO PARA TESTES CLÍNICOS DE HIPERTERMIA MAGNÉTICA (MFH HYPERTHERMIESYSTEME GMBH,BERLIN,GERMANY). ADAPTADO DE (JORDAN ET AL., 2001). | 17 |
| FIGURA 8 - PROCESSO DE POLIMERIZAÇÃO POR MINIEMULSÃO. ADAPTADO DE (LANDFESTER; MUSYANOVYCH; MAILANDER, 2010). | 21 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE MINIEMULSÃO DIRETA (ESQUERDA) E INVERSA (DIREITA). ADAPTADO DE (CAPEK, 2010)..... | 22 |
| FIGURA 10 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLÍMEROS ACRÍLICOS (A) POLI(METACRILATO DE METILA) E (B) POLI(ÁCIDO ACRÍLICO). | 23 |
| FIGURA 11 - FORMAÇÃO DE LIGAÇÃO AMIDA POR REAÇÃO ENTRE UM GRUPAMENTO CARBOXILA E UM GRUPAMENTO AMINO PRIMÁRIO, INTERMEDIADO POR EDC. | 30 |
| FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO FÓLICO. | 32 |
| FIGURA 13 - UNIDADE EXPERIMENTAL UTILIZADA PARA A SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA. | 36 |
| FIGURA 14 - UNIDADE EXPERIMENTAL UTILIZADA PARA A SÍNTESE DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PAA. | 41 |
| FIGURA 15 - MINI-REATOR METTLER TOLEDO, MODELO EASYMAX 102, UTILIZADO NAS SÍNTESES DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PMMA. ADAPTADO DE (METTLER, 2016)..... | 47 |
| FIGURA 16 - DIFRATOGRAMAS DE AMOSTRAS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO OBTIDAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH. | 60 |
| FIGURA 17 - DRX DE AMOSTRA DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS SINTETIZADA POR COPRECIPITAÇÃO EM pH 11, COM IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS CORRESPONDENTES À MAGNETITA. | 62 |
| FIGURA 18 - MET DE AMOSTRA DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS SINTETIZADAS POR COPRECIPITAÇÃO EM pH 11 (A) E CORRESPONDENTE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS (B)..... | 63 |
| FIGURA 19 - SUSPENSÕES DE NPM EM SOLUÇÃO DE LAURIL SULFATO DE SÓDIO A 3,0 % P/P (ESQUERDA) E CITRATO DE SÓDIO A 0,3 % P/P (DIREITA). AMOSTRAS FORAM FILTRADAS EM MEMBRANA DE 0,25 μ M, APÓS 2 H DE AGITAÇÃO MECÂNICA. | 64 |
| FIGURA 20 - MAGNETIZAÇÃO COMO FUNÇÃO DO CAMPO MAGNÉTICO APLICADO A DIFERENTES TEMPERATURAS, PARA AMOSTRA DE NPMs OBTIDA EM pH 11..... | 66 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 21 - AMPLIAÇÃO DAS CURVAS DE HISTERESE, REFERENTES ÀS MEDIDAS DE MAGNETIZAÇÃO COMO FUNÇÃO DO CAMPO MAGNÉTICO APLICADO EM DIFERENTES TEMPERATURAS, PARA AMOSTRA DE NPMs OBTIDAS EM PH 11..... | 67 |
| FIGURA 22 - MAGNETIZAÇÃO COMO FUNÇÃO DA TEMPERATURA SOB CAMPO MAGNÉTICO DE 100 Oe, NOS MODOS FC E ZFC, PARA AMOSTRA DE NPMs OBTIDAS EM PH 11. . | 68 |
| FIGURA 23 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DE CALOR DE NPM EM SOLUÇÃO AQUOSA DE LSS 3,0% P/P, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, SOB APLICAÇÃO DE CAMPO MAGNÉTICO A 16 KA.M ⁻¹ E 307 KHZ. | 69 |
| FIGURA 24 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DE CALOR DE NPM, SECA EM DIFERENTES CONDIÇÕES, SOB APLICAÇÃO DE CAMPO MAGNÉTICO A 16 KA.M ⁻¹ E 307 KHZ ([NPM] = 5,0 MG.ML ⁻¹). | 70 |
| FIGURA 25 - PERFIL DE TEMPERATURA E CAMPO MAGNÉTICO ([NPM] = 9,33 MG.ML ⁻¹ ; [LSS] = 0,5 MOL.L ⁻¹ ; H = 15,5 KA.M ⁻¹ E F = 307 KHZ). | 72 |
| FIGURA 26 - [PLANEJAMENTO NPM] DIAGRAMA COM VALORES DE SLP PREDITOS PELO MODELO E OBSERVADOS EXPERIMENTALMENTE..... | 76 |
| FIGURA 27 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO RENDIMENTO DA REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO DO PAA..... | 78 |
| FIGURA 28 - INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DO INICIADOR NO RENDIMENTO DA REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO DO PAA. REAÇÕES REALIZADAS À TEMPERATURA CONSTANTE DE 70 °C. | 80 |
| FIGURA 29 - EFEITO DE INCHAMENTO E SOLUBILIDADE DE PAA RETICULADO POR EGDMA VIA POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO..... | 81 |
| FIGURA 30 - [PLANEJAMENTO NPP] DIAGRAMA DOS VALORES DE CONVERSÃO PREDITOS PELO MODELO E OBSERVADOS EXPERIMENTALMENTE. | 86 |
| FIGURA 31 - MEV DE PARTÍCULAS DE PAA OBTIDAS EM POLIMERIZAÇÃO POR MINIEMULSÃO INVERSA. | 88 |
| FIGURA 32 - FTIR DE PARTÍCULAS DE PAA OBTIDAS EM POLIMERIZAÇÃO POR MINIEMULSÃO INVERSA. | 89 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 33 - TGA DE PARTÍCULAS DE PAA OBTIDAS EM POLIMERIZAÇÃO POR MINIEMULSÃO INVERSA..... | 90 |
| FIGURA 34 - DSC DE PARTÍCULAS DE PAA OBTIDAS EM POLIMERIZAÇÃO POR MINIEMULSÃO INVERSA..... | 90 |
| FIGURA 35 - MET DE PARTÍCULAS DE PMMA OBTIDAS POR POLIMERIZAÇÃO POR MINIEMULSÃO DIRETA..... | 92 |
| FIGURA 36 - FTIR DE PARTÍCULAS DE PMMA OBTIDAS EM POLIMERIZAÇÃO POR MINIEMULSÃO DIRETA..... | 93 |
| FIGURA 37 - TGA DE PARTÍCULAS DE PMMA OBTIDAS EM POLIMERIZAÇÃO POR MINIEMULSÃO DIRETA..... | 93 |
| FIGURA 38 – ANÁLISE DE MET DE FILME POLIMÉRICO OBTIDO APÓS SECAGEM DE AMOSTRA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ESTABILIZADAS EM LAURIL SULFATO DE SÓDIO E ENCAPSULADAS EM PAA..... | 95 |
| FIGURA 39 – ANÁLISE DE MET DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ENCAPSULADAS EM PAA PÓS ESTABILIZAÇÃO EM CITRATO DE SÓDIO..... | 95 |
| FIGURA 40 - DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULAS DE PMMA PURO E CONTENDO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ENCAPSULADAS, MEDIDA POR ESPALHAMENTO DE LUZ..... | 97 |
| FIGURA 41 – ANÁLISE DE MET DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ENCAPSULADAS EM PMMA (A) E ANÁLISES DE MET DE AGLOMERADOS DESTAS PARTÍCULAS (B) COM CORRESPONDENTE MAPEAMENTO POR NANODIFRAÇÃO (C)..... | 97 |
| FIGURA 42 - MAGNETIZAÇÃO EM FUNÇÃO DO CAMPO MAGNÉTICO APLICADO A 300 K, PARA AMOSTRAS DE NPM ENCAPSULADAS EM POLÍMEROS ACRÍLICOS..... | 99 |
| FIGURA 43 – MEDIDA DE HIPERTERMIA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO ENCAPSULADAS EM PAA ($H = 15,5 \text{ KA.M}^{-1}$, $F = 307 \text{ KHZ}$, $[\text{NPM@PAA}] =$ $200,0 \text{ MG.ML}^{-1}$)..... | 101 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 44 - FTIR DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PAA PURAS (NPP), ÁCIDO FÓLICO (AF) E NPP BIOCONJUGADAS COM AF (NPP_AF) ANTES E APÓS LAVAGEM. | 103 |
| FIGURA 45 – ESPECTRO DE UV-VIS DO FILTRADO DE LAVAGENS SUCESSIVAS DE PARTÍCULAS DE PAA BIOCONJUGADAS A AF. | 104 |
| FIGURA 46 – ESPECTRO DE FTIR DE AMOSTRAS DE NPP BIOCONJUGADAS COM AF COMPARATIVO A AMOSTRAS REALIZADAS EM ENSAIOS EM BRANCO, APÓS SUCESSIVAS LAVAGENS EM CONDIÇÕES ALCALINAS..... | 105 |
| FIGURA 47 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO EM AUSÊNCIA DE EGDMA. | 114 |
| FIGURA 48 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO COM 3 % P/P DE EGDMA. | 114 |
| FIGURA 49 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO COM 7 % P/P DE EGDMA. | 115 |
| FIGURA 50 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO COM 10 % P/P DE EGDMA. | 115 |
| FIGURA 51 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO COM 15 % P/P DE EGDMA. | 116 |
| FIGURA 52 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO COM 30 % P/P DE EGDMA. | 116 |
| FIGURA 53 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO COM 40 % P/P DE EGDMA. | 117 |
| FIGURA 54 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO COM 42 % P/P DE EGDMA. | 117 |
| FIGURA 55 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO COM 45 % P/P DE EGDMA. | 118 |
| FIGURA 56 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA PARA A REAÇÃO (1,1,1) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL. | 119 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 57 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA PARA A REAÇÃO (1,1,-1) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL..... | 119 |
| FIGURA 58 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA PARA A REAÇÃO (1,-1,1) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL..... | 120 |
| FIGURA 59 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA PARA A REAÇÃO (1,-1,-1) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL. | 120 |
| FIGURA 60 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA PARA A REAÇÃO (-1,1,1) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL..... | 121 |
| FIGURA 61 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA PARA A REAÇÃO (-1,1,-1) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL. | 121 |
| FIGURA 62 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA PARA A REAÇÃO (-1,-1,1) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL. | 122 |
| FIGURA 63 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA PARA A REAÇÃO (-1,-1,-1) DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL. | 122 |
| FIGURA 64 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA PARA O 1º PONTO CENTRAL DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL..... | 123 |
| FIGURA 65 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA PARA O 2º PONTO CENTRAL DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL..... | 123 |
| FIGURA 66 - TGA DE PAA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA PARA O 3º PONTO CENTRAL DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL..... | 124 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - [PLANEJAMENTO NPM] DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS DE ENTRADA COM SEUS RESPECTIVOS LIMITES..... | 39 |
| TABELA 2 - PROPORÇÕES MÁSSICAS DE REAGENTES EMPREGADOS NA POLIMERIZAÇÃO DE AA POR MINIEMULSÃO INVERSA. | 42 |
| TABELA 3 - [PLANEJAMENTO NPP] DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS DE ENTRADA COM SEUS RESPECTIVOS LIMITES..... | 45 |
| TABELA 4 - PROPORÇÕES MÁSSICAS DE REAGENTES EMPREGADOS NA POLIMERIZAÇÃO DE MMA POR MINIEMULSÃO DIRETA. | 48 |
| TABELA 5 - DIÂMETRO MÉDIO DE CRISTALITOS ESTIMADOS PELA EQUAÇÃO DE SCHERRER, APRESENTADOS COM OS RESPECTIVOS PARÂMETROS DE CÁLCULO..... | 61 |
| TABELA 6 - POTENCIAL ZETA DE NPM DISPERSAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES. | 64 |
| TABELA 7 – GRANDEZAS ASSOCIADAS ÀS CURVAS DE HISTERESE, REFERENTES ÀS MEDIDAS DE MAGNETIZAÇÃO COMO FUNÇÃO DO CAMPO MAGNÉTICO APLICADO EM DIFERENTES TEMPERATURAS, PARA AMOSTRA DE NPMs OBTIDAS EM pH 11..... | 67 |
| TABELA 8 - SLP DE NPMs, SECAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES, SOB APLICAÇÃO DE CAMPO MAGNÉTICO A 16 KA.M^{-1} E 307 KHZ. | 71 |
| TABELA 9 - [PLANEJAMENTO NPM] CONDIÇÕES DAS VARIÁVEIS DE ENTRADA E RESPECTIVAS TAXAS DE LIBERAÇÃO DE CALOR ASSOCIADAS À VARIÁVEL DE SAÍDA SLP..... | 73 |
| TABELA 10 - [PLANEJAMENTO NPM] ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PONTOS CENTRAIS..... | 74 |
| TABELA 11 - [PLANEJAMENTO NPM] MATRIZ DE CORRELAÇÃO ENTRE VARIÁVEIS. | 75 |
| TABELA 12 - COMPOSIÇÃO MÁSSICA DAS REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO EM SOLUÇÃO DE AA EM PRESENÇA DE EGDMA. | 82 |

| | |
|---|----|
| TABELA 13- [PLANEJAMENTO NPP] CONDIÇÕES DAS VARIÁVEIS DE ENTRADA, ASSOCIADAS ÀS RESPECTIVAS VARIÁVEIS DE SAÍDA NOS ENSAIOS DE POLIMERIZAÇÃO. | 83 |
| TABELA 14 - [PLANEJAMENTO NPP] ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PONTOS CENTRAIS. | 84 |
| TABELA 15 - [PLANEJAMENTO NPP] MATRIZ DE CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS. ... | 84 |
| TABELA 16 - PRINCIPAIS BANDAS DE ABSORÇÃO E RESPECTIVAS ATRIBUIÇÕES DO ESPECTRO DE FTIR DE PARTÍCULAS DE PAA OBTIDAS EM POLIMERIZAÇÃO POR MINIEMULSÃO INVERSA. | 89 |
| TABELA 17 - POTENCIAL ZETA DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS E NPM ENCAPSULADAS EM POLÍMEROS. | 98 |

NOMENCLATURA

| | |
|----------|--|
| AA | ácido acrílico |
| AF | ácido fólico |
| AIBN | azobisisobutironitrila |
| AO | ácido oléico |
| CBPF | Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas |
| CS | citrato de sódio |
| DNA | ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| DRX | difração de raios X |
| DSC | calorimetria exploratória diferencial (<i>differential scanning calorimetry analysis</i>) |
| Engenpol | Laboratório de Engenharia de Polímeros da UFRJ |
| EPR | aumento de permeabilidade e retenção (<i>enhanced permeability and retention</i>) |
| f | Frequência |
| FC | modo <i>field-cooled</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FTIR | espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>) |
| GPC | cromatografia de permeação em gel (<i>gel permeation chromatography</i>) |
| h | hora |
| H | campo magnético |
| Hc | campo coercivo |
| hkl | índices de Miller |
| ILP | perda intrínseca de potência (<i>intrinsic loss power</i>) |
| k | constante de proporcionalidade |

| | |
|-------------|--|
| LABNANO | Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia do CBPF |
| L_c | Comprimento de correlação Diâmetro médio do cristalito calculado em referência ao pico de maior intensidade |
| LdrX-UFF | Laboratório Multiusuário de Difração de Raios X da UFF |
| LSS | lauril sulfato de sódio |
| m | massa |
| M | magnetização |
| M_s | magnetização de saturação |
| M_r | magnetização remanente |
| MAG-MATMULT | Laboratório de Magnetometria da Infraestrutura de Pesquisa Multiusuária para Materiais Avançados do CBPF |
| MET | microscopia eletrônica de transmissão |
| MEV | microscopia eletrônica de varredura |
| MMA | metacrilato de metila |
| NPM | nanopartícula magnética |
| NPP | nanopartícula polimérica |
| PAA | poli(ácido acrílico) |
| PEG | poli(etilenoglicol) |
| PMMA | poli(metacrilato de metila) |
| p/p | peso por peso |
| PVA | poli(álcool vinílico) |
| RMN-H | espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio |
| rpm | rotações por minuto |
| SAR | taxa de absorção específica (<i>specific absorption rate</i>) |
| SLP | perda específica de potência (<i>specific loss power</i>) |
| SPION | nanopartícula superparamagnética de óxido de ferro (<i>superparamagnetic iron oxide nanoparticle</i>) |
| t | tempo |

| | |
|----------------|--|
| T | temperatura |
| T _B | temperatura de bloqueio (<i>blocking temperature</i>) |
| T _g | temperatura de transição vítrea (<i>glass transition temperature</i>) |
| TGA | análise termogravimétrica (<i>thermogravimetric analysis</i>) |
| UFF | Universidade Federal Fluminense |
| UFRJ | Universidade Federal do Rio de Janeiro |
| UV-vis | espectroscopia na região de ultravioleta e visível |
| W | potência |
| ZFC | modo <i>zero field-cooled</i> |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----------|---|
| ϕ_H | diâmetro hidrodinâmico |
| σ | magnetização de saturação |
| ξ | potencial zeta |
| τ | tempo de relaxação característico |
| τ_N | tempo de relaxação de Néel |
| τ_B | tempo de relaxação de Brown |
| λ | comprimento de onda |
| θ | ângulo de difração |
| β | largura à meia altura de pico de difração |

CAPÍTULO I

Introdução

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Oliver Wendell Holmes

1.1. Estado da Arte

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo e, segundo a Organização Mundial da Saúde, o surgimento de novos casos tem crescido de forma alarmante. Segundo recente informe mundial sobre câncer (STEWART; WILD, 2014), em 2012 foram contabilizados 14 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo e 8,2 milhões de casos de morte por esta enfermidade. As causas mais comuns foram câncer de pulmão, fígado, estômago, colorretal, mama e esôfago. A expectativa é de que o número de novos casos cresça por volta de 70 % em duas décadas. Assim, aumenta a necessidade por tratamentos de câncer, preferencialmente menos invasivos e que mitiguem os efeitos colaterais.

Frente a este cenário, a técnica de hipertermia magnética constitui uma medida terapêutica emergente e promissora para o combate ao câncer. O fenômeno consiste na dissipação de calor por materiais magnéticos quando expostos a um campo magnético alternado (CARRIÃO; BAKUZIS, 2016). O tratamento é baseado no aquecimento localizado do tecido tumoral em uma faixa de temperatura na qual o dano é reversível em células saudáveis, mas não em células tumorais (BROLLO et al., 2016). Em 1957 foi proposta a utilização de nanopartículas magnéticas para induzir a elevação da temperatura de forma seletiva e destruir tumores metastáticos (GILCHRIST et al., 1957). Apesar de tal tecnologia ainda não ter tido sucesso em casos de metástase, atualmente já se reporta caso de tratamento de tumores cerebrais por hipertermia magnética, com base em

nanopartículas de magnetita injetadas na região intratumoral (MAIER-HAUFF et al., 2011).

Recentemente muitos trabalhos têm demonstrado o potencial de partículas magnéticas em tratamentos de câncer por hipertermia. Além de ser empregada como terapia térmica, a técnica de hipertermia pode ser utilizada para a entrega controlada de fármacos. A geração de aquecimento localizado promove a liberação de fármaco adsorvido na nanopartícula magnética ou encapsulado junto a mesma em matriz polimérica (KUMAR; MOHAMMAD, 2011). Desta forma, tratamentos quimioterápicos tradicionais podem ser otimizados para aplicações específicas e seletivas, reduzindo efeitos colaterais e apresentando maior eficiência terapêutica, quando em sinergia com a hipertermia magnética.

A associação de nanopartículas magnéticas com polímeros agrega uma série de vantagens a aplicações médicas destes materiais. Além de aumentar a estabilidade das partículas em solução, o polímero incrementa a estabilidade oxidativa do material magnético (KUMAR; MOHAMMAD, 2011; WU et al., 2015). A adição do polímero na superfície das nanopartículas magnéticas favorece a dispersão individual das partículas em fluidos biológicos e aumenta o tempo de circulação das nanopartículas no organismo. Além disso, o recobrimento polimérico permite agregar funcionalidades, por intermédio do encapsulamento ou conjugação à superfície, de agentes terapêuticos, agentes de direcionamento e intensificadores de permeação celular (BOYER et al., 2010).

Uma metodologia versátil para a obtenção de partículas magnéticas internalizadas em uma matriz polimérica é a técnica de miniemulsão. O processo de polimerização em miniemulsão permite o encapsulamento de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, bem como de partículas sólidas, usando polímeros de diferentes naturezas, resultando em partículas estáveis e com tamanhos bem controlados pelas condições do processo. Combinado com técnicas de funcionalização específica da superfície da partícula e a possibilidade de liberação de substâncias encapsuladas em condições particulares, complexos sistemas de nanopartículas podem ser idealizados para aplicações biomédicas (LANDFESTER; MUSYANOVYCH; MAILANDER, 2010).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de nanopartículas magnéticas encapsuladas em polímeros acrílicos, visando potencial aplicação para o tratamento de câncer por hipertermia magnética.

1.2.2. Objetivos Específicos

O objetivo geral pode ser consolidado por meio de realização dos seguintes objetivos específicos:

- obtenção de nanopartículas magnéticas (NPM) de óxido de ferro, de forma simples, barata, reprodutível e escalável;
- encapsulamento das NPMs em nanopartículas poliméricas (NPPs), com estreita distribuição de tamanhos e dimensão compatível para as aplicações médicas desejadas;
- desenvolvimento de metodologia para obtenção de nanopartículas de poli(ácido acrílico) (PAA) por miniemulsão inversa;
- encapsulamento de NPM em poli(metacrilato de metila) (PMMA), empregando metodologia consolidada de miniemulsão direta, para análise comparativa de desempenho com material obtido por encapsulamento em matriz de PAA;
- avaliação do efeito de hipertermia magnética das partículas magnéticas puras e encapsuladas em polímero acrílico;
- bioconjugação do PAA com ácido fólico, para garantir maior especificidade à partícula híbrida, permitindo aplicação sítio-dirigida a tecidos tumorais.

1.3. Estrutura da dissertação

A presente dissertação está organizada em cinco capítulos, incluindo este capítulo introdutório, além de apêndices e referências bibliográficas. A seguir é feita uma breve descrição de cada capítulo que compõe o trabalho.

No Capítulo I é exposto de forma sumária o estado da arte, como motivação para o desenvolvimento deste trabalho, fazendo-se uma introdução e apresentando-se os objetivos.

O Capítulo II apresenta uma revisão bibliográfica, incluindo fundamentações teóricas, integrando conceitos de nanopartículas magnéticas, com encapsulamento em polímeros, sempre que possível vinculado a uma abordagem voltada a aplicações médicas, em especial a hipertermia magnética. São destacadas as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro como mais adequadas para aplicações biológicas, sendo apresentadas as propriedades magnéticas intrínsecas e as metodologias para obtenção da nanopartícula inorgânica, evidenciando as variáveis que afetam a morfologia, estabilidade coloidal e propriedades magnéticas do material. Admitindo o recobrimento polimérico como um agente que confere estabilidade oxidativa e de superfície às partículas magnéticas, além de permitir o incremento de funcionalidades ao material, são apresentados conceitos de polimerização e de obtenção de nanopartículas poliméricas por polimerização em miniemulsão. É introduzido o conceito de polimerização por miniemulsão (direta e inversa), destacando as principais variáveis de processo e como elas afetam a estabilidade do sistema e o controle de tamanho de partículas. São apresentados os principais estudos disponíveis na literatura referentes à síntese de nanopartículas poliméricas, puras e híbridas, com destaque para a metodologia de polimerização por miniemulsão empregando polímeros acrílicos. É dada maior atenção aos polímeros hidrogéis, em especial ao poli(ácido acrílico), em virtude da maior afinidade destes materiais com sistemas biológicos, além da possibilidade facilitada de agregação de biomoléculas à superfície da partícula, dada a exposição de grupos funcionais reativos do PAA. Também são destacadas propriedades do PAA que permitem o desenvolvimento de complexos sistemas de liberação controladas de ativos de forma seletiva, que podem ser associados a partículas magnéticas, permitindo ampla exploração na área médica, principalmente para o aprimoramento de terapias oncológicas envolvendo hipertermia magnética.

No Capítulo III é detalhada a metodologia experimental empregada no presente trabalho, dividida em quatro subseções: (i) síntese das nanopartículas de magnetita; (ii) síntese das partículas poliméricas por miniemulsão (direta, no caso do PMMA, e inversa, no caso do PAA); (iii) encapsulamento das partículas magnéticas na etapa de polimerização e (iv) bioconjugação de ácido fólico à partícula de PAA. Planejamentos experimentais realizados nas etapas de síntese de partículas magnéticas e poliméricas também são detalhados neste capítulo. Complementarmente, são apresentadas as técnicas de caracterização empregadas, bem como a especificação dos equipamentos utilizados.

O Capítulo IV apresenta os resultados obtidos, bem como as caracterizações realizadas. Os resultados são discutidos comparativamente a dados apresentados na literatura e as metodologias empregadas são avaliadas criticamente. Neste capítulo são comparados os resultados obtidos com o encapsulamento de nanopartículas de magnetita em PMMA e PAA, sendo expostas as vantagens e desvantagens intrínsecas a cada sistema. Por fim, é destacando o potencial de aplicação das partículas híbridas em procedimentos de hipertermia magnética, bem como as limitações e possibilidades de melhorias observadas.

No Capítulo V são apresentadas as principais conclusões obtidas a partir das discussões expostas no capítulo anterior. Além das conclusões, são abordadas sugestões e recomendações para trabalhos futuros.

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Nanotecnologia Biofuncional da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e no Laboratório de Engenharia de Polímeros (EngePol) do Programa de Engenharia Química (PEQ) do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE) da UFRJ. Análises de caracterização foram conduzidas em laboratórios, além da UFRJ, da Universidade Federal Fluminense (UFF) e do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

CAPÍTULO II

Revisão Bibliográfica

“Cada dia sabemos mais e entendemos menos.”

Albert Einstein

O presente capítulo tem por finalidade elucidar conceitos referentes a partículas magnéticas e poliméricas, sempre que possível relacionando-os com a abordagem de aplicações médicas. Uma vez expostos os conceitos teóricos fundamentais, é destacada a importância dos materiais híbridos magnético-poliméricos, principalmente quando apresentados como partículas com dimensões submicrométricas. São evidenciadas em particular as propriedades destes materiais no que concerne à técnica de hipertermia magnética e sua aplicação como medida para tratamento de câncer. Também é abordada a técnica de bioconjugação como ferramenta capaz de aumentar a especificidade do material em relação à aplicação de interesse.

2.1. Partículas magnéticas

2.1.1. Conceitos fundamentais do magnetismo ao nanomagnetismo

O estado magnético de um material é determinado pelo ordenamento e comportamento coletivo dos seus momentos magnéticos (DIAS, 2014). O momento magnético é resultante do momento magnético orbital e do momento magnético de *spin*. Estas contribuições fundamentais estão associadas, respectivamente, ao movimento orbital dos elétrons ao redor do núcleo atômico e ao movimento do *spin* do elétron sobre seu próprio eixo, adotando uma visão pictórica do problema em que se simplifica os

conceitos em óptica de mecânica clássica (FILHO, 2014). A Figura 1 apresenta o arranjo dos momentos magnéticos para diferentes tipos de material.

Materiais diamagnéticos não apresentam momentos magnéticos na ausência de campo. No entanto, sob ação de um campo magnético, os momentos magnéticos se alinham no sentido oposto à aplicação do campo, resultando em uma força de repulsão. Em materiais paramagnéticos, os momentos magnéticos tendem a se alinhar na direção e no sentido do campo aplicado. Todavia, na ausência do campo, a energia térmica disponível no sistema impede que os momentos magnéticos interajam fortemente entre si, resultando em uma orientação aleatória. Materiais ferromagnéticos apresentam momentos magnéticos permanentes, mesmo na ausência de campo aplicado. Quando o campo aplicado é removido, o material conserva grande parte da magnetização. Materiais ferrimagnéticos e antiferromagnéticos apresentam comportamento similar aos ferromagnéticos. Nestes casos, na ausência de campo magnético, os momentos magnéticos se acoplam de maneira antiparalela, resultando em uma magnetização global parcialmente reduzida ou nula. Isto se deve ao fato dos materiais apresentarem, respectivamente, momentos magnéticos desiguais ou idênticos (KOLHATKAR et al., 2013).

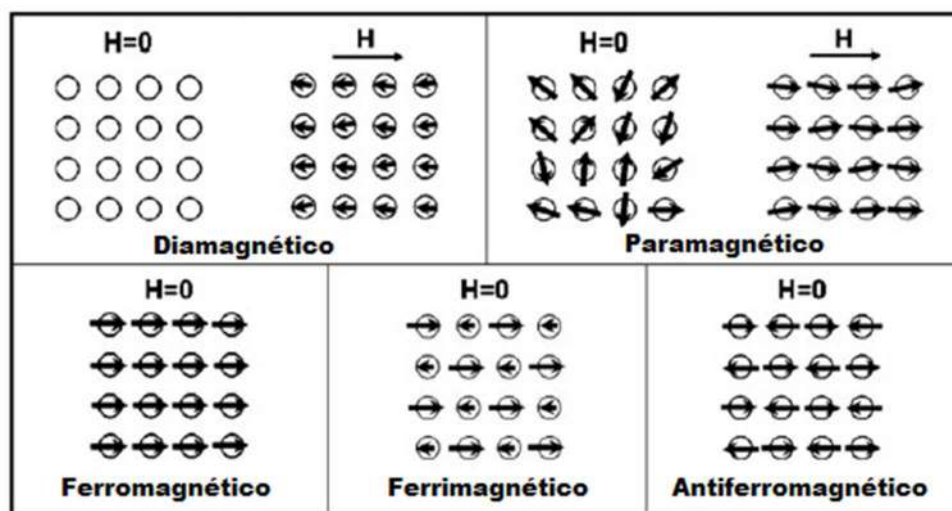


Figura 1 - Esquema do comportamento dos momentos magnéticos para diferentes tipos de material, na ausência ou presença de um campo magnético externo. Adaptado de (JEONG et al., 2007)

Considerando o momento magnético, e sua interação dipolar, como a quantidade magnética elementar, a magnetização pode ser interpretada como a manifestação macroscópica da média volumétrica de um conjunto de momentos magnéticos. Partindo destes princípios, o conceito de domínio magnético descreve a existência de regiões dentro do material em que os momentos magnéticos se alinham e formam uma magnetização espontânea (DIAS, 2014).

Os domínios magnéticos podem se encontrar distribuídos de forma aleatória, de maneira que a resultante do campo magnético em qualquer direção é igual a zero e o material não apresenta magnetização. Quando o material sofre ação de um campo magnético externo, os domínios magnéticos tendem a se organizar, orientando na direção do campo aplicado, até atingir a saturação máxima. A remoção do campo externo reduz o grau de alinhamento dos domínios, não necessariamente retomando a condição inicial de desordem, reflexo da possível existência de histerese magnética no material (FILHO, 2014).

A variação da magnetização (M) como função do campo aplicado (H) constitui uma importante ferramenta para o estudo de materiais magnéticos. A relação entre estas grandezas costuma ser apresentada como um ciclo de histerese, como o esboçado na Figura 2, onde são identificadas importantes grandezas relacionadas ao conceito de domínios magnéticos apresentado anteriormente. A magnetização de saturação (M_s) é a magnetização da amostra quando todos os domínios estão alinhados; a magnetização remanente (M_r) é a magnetização do material a campo zero; e o campo coercivo (H_c) é o campo necessário para anular a magnetização remanente (DIAS, 2014).

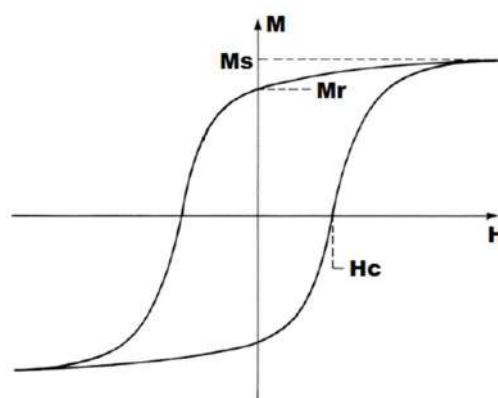


Figura 2 – Curva de magnetização característica de materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos. Adaptado de (JEONG et al., 2007).

Vale ressaltar que a presença de histerese na curva de magnetização é característica de materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos, uma vez que estes conservam parte da magnetização, mesmo após a remoção do campo magnético aplicado.

Quando o material (ferrimagnético ou ferromagnético) apresenta dimensão diminuta, a região do domínio magnético também é reduzida até um valor crítico em que um monodomínio é formado. Neste caso, a partícula permanece espontaneamente magnetizada em uma só direção e apresenta estado de superparamagnetismo, salvo influências da temperatura (ESTELRICH et al., 2015).

Em estado superparamagnético, negligenciando o efeito de anisotropia de forma, a curva de magnetização em função do campo magnético apresenta campo coercivo e magnetização remanente nulos; ou seja, não apresenta histerese magnética. Esta característica apresenta grande vantagem em aplicações biomédicas, uma vez que as partículas perdem a magnetização quando o campo magnético é removido. Assim, é eliminada a principal força motriz responsável pelo efeito de agregação, indesejável para este tipo de aplicação. Além disso, nanopartículas superparamagnéticas são desejáveis para aplicações biomédicas em virtude do efetivo controle de suas propriedades magnéticas, uma vez que apresentam forte resposta à aplicação de campo magnético externo (KOLHATKAR et al., 2013).

2.1.2. Partículas superparamagnéticas de óxido de ferro

Devido suas propriedades (elétrica, óptica e magnética) únicas, nanopartículas magnéticas têm sido profundamente investigadas para aplicações biomédicas, com destaque para diagnóstico e terapia por ressonância magnética e hipertermia magnética (LAURENT et al., 2011; LEE; HYEON, 2012; LIU; FAN, 2014). Em particular, nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (conhecidas pelo termo SPIONs, do inglês *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*) têm recebido considerável atenção devido ao baixo custo de produção, alta estabilidade físico-química, boa biocompatibilidade, além da natureza não tóxica e biodegradável (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007).

Óxidos de ferro podem se apresentar em oito arranjos cristalográficos distintos. Dentre estes, a hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ganham

destaque por conta do polimorfismo que envolve transições de fase por indução de temperatura. A magnetita difere dos demais óxidos de ferro por conter em sua estrutura o ferro em dois estados de oxidação (divalente e trivalente). O Fe_3O_4 apresenta estrutura cúbica de espinélio invertido, que consiste em um empacotamento cúbico em que os íons Fe^{2+} ocupam a metade dos campos octaédricos e os íons de Fe^{3+} são divididos uniformemente entre os campos octaédricos e tetraédricos remanescentes (WU et al., 2015).

Óxidos de ferro apresentam propriedades magnéticas dependentes do tamanho e forma das partículas. Geralmente, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ apresenta ferromagnetismo fraco em temperatura ambiente, enquanto Fe_3O_4 e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ exibem comportamento ferrimagnético em temperatura ambiente (WU et al., 2015). Quando o tamanho da partícula é inferior a aproximadamente 20 nm, a magnetização das nanopartículas de magnetita é aleatorizada por energias térmicas que define o comportamento superparamagnético do material. A transição do regime superparamagnético para o estado de bloqueio é denominada temperatura de bloqueio (T_B) e está diretamente relacionada com o volume da partícula (LING; LEE; HYEON, 2015).

O tamanho da partícula também afeta a absorção celular, a distribuição no organismo e a farmacocinética associada. Portanto o tamanho de partícula deve ser otimizado, para evitar a rápida eliminação por ação do sistema imune do organismo. Nanopartículas com tamanho reduzido (diâmetro hidrodinâmico inferior a 6 nm) tendem a ser excretadas pelo sistema renal, enquanto partículas grandes (diâmetro hidrodinâmico superior a 100 nm) são facilmente fagocitadas e, portanto, tendem a acumular rapidamente no fígado e baço. Nanopartículas na faixa de tamanho compreendida entre 20 e 100 nm tendem a acumular em tumores por efeito do aumento de permeabilidade e retenção - *EPR* (Figura 3), uma vez que tecidos tumorais geralmente apresentam fenestrações de vasos sanguíneos com dimensões de centenas de nanômetros (LING; LEE; HYEON, 2015).

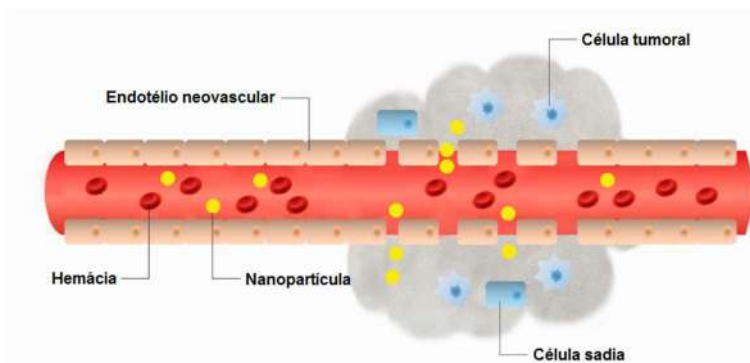


Figura 3 - Representação esquemática do comportamento de nanopartículas na corrente sanguínea e o efeito do aumento de permeabilidade e retenção (*EPR*) em regiões de tecidos tumorais. Adaptado de (ESTELRICH et al., 2015).

Avanços sobre os métodos de síntese de nanopartículas de óxido de ferro possibilitam a síntese de partículas não apenas com boa cristalinidade e propriedades magnéticas diferenciadas, mas também com bom controle de tamanhos e formas bem definidas e uniformes. Uma variedade de métodos de síntese tem sido aplicada para a obtenção de SPIONs, como coprecipitação, decomposição térmica, sínteses hidrotérmicas ou solvotérmicas, sol-gel e miniemulsão (LING; LEE; HYEON, 2015; WU; HE; JIANG, 2008).

O método mais convencional para a obtenção de nanopartículas de magnetita é a coprecipitação. Este método consiste na mistura de íons di e trivalentes em razão molar de 1:2 em soluções altamente alcalinas, geralmente sob aquecimento e atmosfera inerte. A cinética de crescimento das partículas é limitada e controlada por vários parâmetros experimentais, como tipo de sal de ferro empregado, razão molar de íons $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, valor de pH e força iônica do meio, taxa de agitação, velocidade de adição do agente alcalino, bem como a presença de surfactante (WU et al., 2015; WU; HE; JIANG, 2008). Uma desvantagem deste método de síntese é o elevado valor de pH do meio reacional, que deve ser ajustado na etapa de purificação do produto, dificultando a obtenção de partículas monodispersas. Além disso, é gerado rejeito aquoso que deve ser tratado para não refletir em um passivo ambiental (WU; HE; JIANG, 2008). Em contrapartida, uma grande vantagem do método é a facilidade de produção em grande escala de nanopartículas superparamagnéticas com elevados valores de magnetização de saturação (WU et al., 2015).

Além do tamanho, a forma é um fator determinante nas propriedades magnéticas das partículas de óxido de ferro. Normalmente, estas partículas são obtidas com morfologia esférica, mas métodos de síntese alternativos garantem partículas com as mais diversas formas e, conseqüentemente, propriedades magnéticas únicas. Dentre as morfologias não tradicionais, destacam-se os nanooctópodes (ZHAO et al., 2013), os nanocubos (KIM et al., 2009) e os nanoanéis (JIA et al., 2008). A anisotropia de forma afeta significativamente o comportamento magnético destes materiais. Os nanooctópodes, assim como as esferas, apresentam estado superparamagnético quando em dimensões reduzidas (ZHAO et al., 2013). Já os nanocubos apresentam comportamento ferrimagnético, enquanto os nanoanéis apresentam um estado particular denominado vórtice magnético* (JIA et al., 2008; KIM et al., 2009).

São encontrados na literatura inúmeros trabalhos que empregam nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro em aplicações biomédicas, com destaque para aplicações como contraste de imagens, entrega controlada de fármacos e hipertermia magnética (PANKHURST; CONNOLLY; JONES, 2003). Vale ressaltar que essa classe de partículas magnéticas é a única aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (LAURENT et al., 2011) e comercializada (QIAO; YANG; GAO, 2009).

2.1.3. Estabilidade coloidal

Um problema inevitável intrínseco a nanopartículas magnéticas é a instabilidade, em suspensão, por longos períodos de tempo. Partículas com tamanho reduzido tendem a agregar, para reduzir a energia superficial do sistema, resultando em conseqüente sedimentação. Além disso, a elevada reatividade química faz com que a superfície das nanopartículas seja facilmente oxidada na presença de oxigênio, resultando em considerável perda de propriedades magnéticas (WU et al., 2015). Portanto, é fundamental desenvolver estratégias apropriadas de estabilização e proteção da superfície das nanopartículas magnéticas, seja durante ou após a síntese. Vale ressaltar que para aplicações biológicas é necessário obter nanopartículas dispersas em água, uma vez que

* Vórtice magnético é uma configuração de *spins* encontrada em partículas que apresentam seção circular ou elíptica, como nanodiscos ou nanoanéis (DIAS, 2014).

o meio biológico é constituído em grande parte por soluções aquosas próximas da condição de neutralidade.

A metodologia mais comum para evitar a agregação é a utilização de surfactantes. Dependendo da natureza destas moléculas, as nanopartículas podem apresentar comportamento hidrofílico, hidrofóbico ou anfifílico, após a estabilização. Um exemplo clássico de molécula orgânica lipossolúvel empregada para reduzir a aglomeração de nanopartículas magnéticas e aumentar a estabilidade é o ácido oleico (Figura 4-a). A efetiva estabilização proporcionada por esta molécula é conferida à longa cadeia carbônica, aliada à presença de uma dupla ligação do tipo cis, que gera uma torção no meio da estrutura (WU; HE; JIANG, 2008). Partículas magnéticas também podem ser estabilizadas em dispersão aquosa por adsorção de ácido cítrico (Figura 4-b). Este ácido, ou derivados, se coordena à partícula magnética por um ou dois grupamentos carboxila, dependendo da curvatura da superfície ou impedimento estérico. A exposição de ao menos um grupamento carboxílico livre é responsável por tornar a superfície negativamente carregada e hidrofílica (LAURENT et al., 2008).

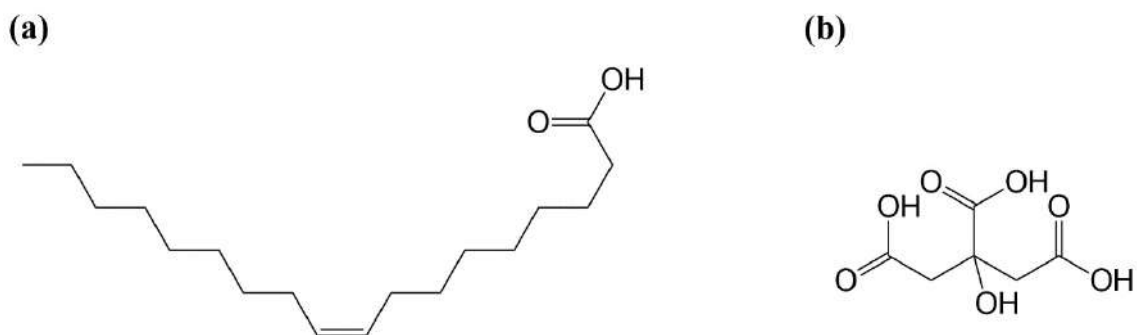


Figura 4 - Estrutura química de surfactantes comumente empregados para estabilização de nanopartículas magnéticas: (a) ácido oleico e (b) ácido cítrico.

O emprego de surfactantes afeta a estabilidade das partículas magnéticas, mas nem sempre resolve o problema de oxidação da superfície. Entretanto, a proteção destas partículas pode ser obtida por encapsulamento em materiais inorgânicos (como sílica, carbono, metais e óxidos) ou polímeros. Estes materiais, além de aumentarem a estabilidade (física e química) das partículas em solução, agregam funcionalidades vinculadas à natureza e às propriedades do recobrimento (WU et al., 2015).

2.1.4. Hipertermia Magnética

Nanopartículas magnéticas, como a magnetita (Fe_3O_4), são materiais muito interessantes para aplicações biomédicas, devido suas propriedades magnéticas peculiares. O regime superparamagnético destas partículas impõe uma dinâmica magnética bastante lenta, que permite a recuperação da remanência do material de forma bem controlada, quando aplicado um campo magnético alternado de alta frequência. Nesta situação, as nanopartículas magnéticas liberam energia, promovendo um aumento de temperatura localizado. Este efeito é promissor para o tratamento de câncer e é conhecido como hipertermia magnética (esquematizado na Figura 5). O tratamento é baseado no aquecimento localizado do tecido tumoral na faixa de 41 a 45 °C, estimulado por um campo magnético alternado externo. Nessa faixa de temperatura, o dano é reversível em células saudáveis, mas não em células tumorais (BROLLO et al., 2016).

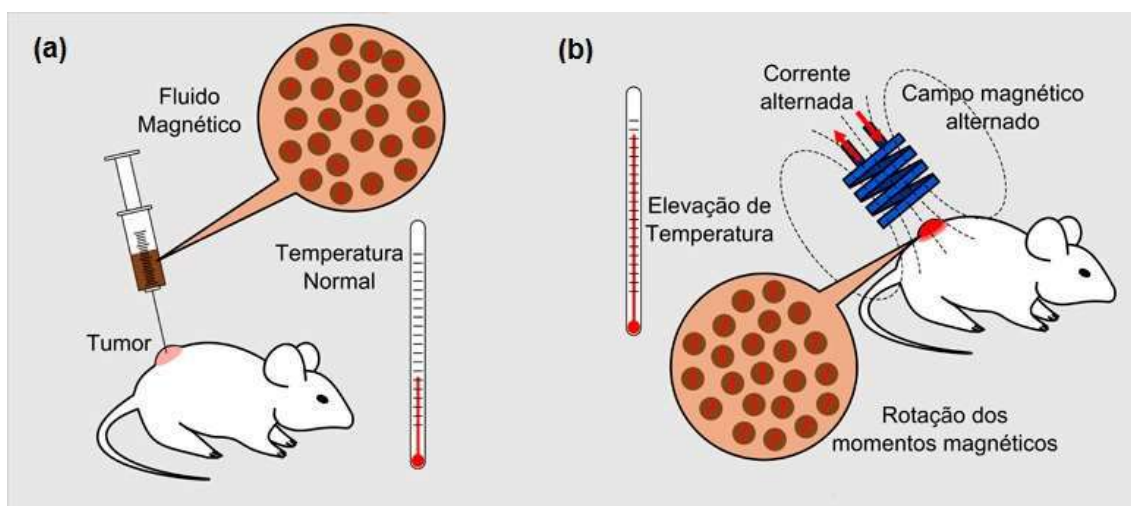


Figura 5 - Representação esquemática do tratamento de câncer por hipertermia magnética, empregando nanopartículas magnéticas: (a) introdução do fluido magnético no tecido tumoral e (b) aplicação de campo magnético alternado para induzir o aquecimento localizado. Adaptado de (NANOMED, 2013).

A dinâmica de resposta da partícula durante a transformação da energia magnética em calor, empregando um campo magnético alternado, é governada sobretudo por

flutuações térmicas que ocorrem na partícula. O mecanismo de geração de calor por partículas magnéticas pode ser atribuído a perdas por histerese ou relaxação (de Néel ou Brown). No caso de partículas superparamagnéticas, que não apresentam histerese na curva de magnetização, o mecanismo ocorre por relaxação. A liberação de calor por relaxação de Néel está relacionada à rápida mudança de direção dos momentos magnéticos referente à estrutura cristalina do material, enquanto a liberação de calor por relaxação de Brown está relacionada ao atrito gerado pela rotação física das partículas no meio em que se encontram. Ou seja, um mecanismo se refere à dinâmica interna da partícula, enquanto o outro mecanismo se refere à dinâmica externa (KUMAR; MOHAMMAD, 2011). Em termos de tempo de relaxação característico (τ), como ilustrado pela Figura 6, o tempo de relaxação de Néel (τ_N) é caracterizado pela restituição do equilíbrio de magnetização após uma perturbação, definindo uma flutuação resultante da alternância do momento magnético entre duas direções de fácil magnetização; e o tempo de relaxação de Brown (τ_B) está associado à rotação da partícula por inteiro, compondo uma contribuição viscosa ao sistema (LAURENT et al., 2011).

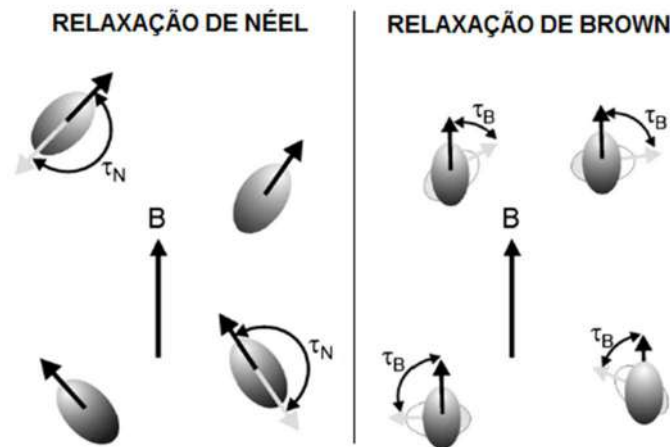


Figura 6 - Representação esquemática dos dois componentes da relaxação magnética, após aplicação de um campo magnético B , em um fluido magnético. Adaptado de (LAURENT et al., 2011).

A eficiência do material para gerar calor por indução de campo magnético alternado é medida em termos de perda específica de potência (SLP - *Specific loss power*), também conhecido pela notação de taxa de absorção específica (SAR - *specific*

absorption rate). A Equação 1 define essa grandeza como a potência (W) gerada pela nanopartícula, normalizada pela massa (m) de nanopartícula. Em outras palavras, é a medida direta da taxa de aquecimento que a nanopartícula é capaz de fornecer (DIAS, 2014).

$$SLP = SAR = \frac{W}{m} = c \frac{m'}{m} \left(\frac{dT}{dt} \right) \quad \text{Equação 1}$$

onde c é a capacidade calorífica do conjunto (nanopartícula + solvente), m' é a massa do conjunto e $\frac{dT}{dt}$ é a taxa de variação da temperatura (T) em função do tempo (t).

Para fins clínicos, são desejadas nanopartículas que resultem em elevados valores de SLP, possibilitando a administração de menores quantidades de material para uma mesma condição terapêutica, minimizando possíveis efeitos colaterais relacionados ao excesso de nanopartículas no organismo do paciente. Geralmente, o valor de SLP é dependente de parâmetros como estrutura da partícula (tamanho, forma e arranjo cristalino), propriedades magnéticas da partícula (anisotropia magnética e temperatura de magnetização) e condições do campo magnético alternado (amplitude e frequência) (KUMAR; MOHAMMAD, 2011). Muitos destes parâmetros podem ser controlados, seja na síntese da partícula magnética ou no momento de aplicação do campo magnético. Aliando o anseio por elevadas taxas de aquecimento com a necessidade de evitar prejuízos à saúde do paciente, a escolha dos parâmetros de campo magnético alternado para hipertermia pode ser otimizada se o produto entre a amplitude e frequência não exceder $5 \cdot 10^9 \text{ A m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (HERGT; DUTZ, 2007).

Esforços recentes têm sido empregados para comprovar que a hipertermia magnética intracelular constitui um método terapêutico viável, controlável e não invasivo e, portanto, pode ser consolidado como tratamento para condições patológicas humanas (BLANCO-ANDUJAR et al., 2016). Os SPIONs já são aprovados para testes em humanos e existe um protótipo (Figura 7) dedicado a testes clínicos de tratamento de câncer por hipertermia magnética, localizado em Berlin (JORDAN et al., 2001). A *MagForce Nanotechnologies AG* é a única companhia que utiliza nanopartículas de óxido de ferro recobertas com aminosilano para tratamento de tumores por hipertermia, apresentando ensaios clínicos em estágio avançado. O primeiro teste clínico foi apresentado por Johannsen et al. (2005), abordando o tratamento de câncer de próstata de maneira promissora.



Figura 7 - Esquema do primeiro protótipo para testes clínicos de hipertermia magnética (MFH Hyperthermie systeme GmbH, Berlin, Germany). Adaptado de (JORDAN et al., 2001).

2.2. Partículas poliméricas

2.2.1. Conceitos fundamentais de polimerização

A produção de polímeros ocorre por meio da ligação química entre moléculas de baixa massa molar, denominadas monômeros, que apresentam funcionalidades. Por funcionalidade entende-se a existência de pontos reativos na molécula, que podem ser oriundos da presença de grupos funcionais reativos ou de insaturações. Assim, para que ocorra uma polimerização, as moléculas de monômero devem apresentar a capacidade de se combinar com ao menos outras duas moléculas de monômero, para resultar na formação de uma cadeia polimérica de elevada massa molar. Neste caso, os centros reativos das moléculas não podem apresentar impedimento estérico. Portanto, polímeros são produzidos a partir de monômeros com funcionalidade maior ou igual a dois. Vale ressaltar que moléculas bifuncionais geram cadeias poliméricas bidimensionais, enquanto moléculas polifuncionais produzem redes poliméricas tridimensionais.

Complementarmente, se durante a polimerização de moléculas bifuncionais for adicionada uma molécula polifuncional, promove-se a formação de ligações cruzadas (CANEVAROLO JR., 2006).

A primeira classificação de polímeros foi proposta por Carothers (1929), que introduziu o conceito de polímero de condensação. Carothers classificou os polímeros em dois grupos: polímeros de adição e polímeros de condensação. Quando só ocorrem reações de adição, a partir de insaturações reativas entre os monômeros, não há perda de matéria nem formação de subprodutos; ou seja, a massa molar do polímero corresponde à soma das massas molares dos monômeros. Mas se ocorrem reações de condensação, há perda de matéria e formação de subprodutos, uma vez que a formação de ligações covalentes, provenientes da reação entre grupos funcionais reativos dos monômeros, resulta quase sempre na eliminação de moléculas de baixa massa molar.

Com base nos mecanismos das reações, Flory (1953) classificou as polimerizações em dois grupos: polimerização em etapas e polimerização em cadeias. A polimerização em etapas se caracteriza por condensações sucessivas entre quaisquer moléculas que apresentem grupos funcionais reativos. De acordo com este mecanismo, cada reação entre grupos funcionais é uma reação completa e independente de qualquer outra. Como os grupos funcionais são reativos entre si, destacam-se como particularidades deste mecanismo o aumento da massa molar com o tempo da reação e a não necessidade de adição de iniciadores para promover a reação. Já a polimerização em cadeias consiste na formação da cadeia polimérica a partir da desestabilização da instauração dos monômeros e a sucessiva reação entre estes. Este mecanismo requer um iniciador para formar um centro ativo, que inicia e propaga a polimerização rapidamente. A adição de cada molécula de monômero à cadeia polimérica leva ao desaparecimento de um centro ativo, dando origem a um novo centro ativo, de forma que cada cadeia polimérica cresce muito rapidamente até atingir a massa molar em que a reação é terminada.

Nota-se que as definições de Carothers e Flory são complementares. O primeiro analisa a estrutura do material, enquanto o segundo avalia o mecanismo reacional de obtenção do polímero. A partir destas premissas e definições, é possível estender estes conceitos fundamentais para questões relacionadas a processos industriais e a aplicações tecnológicas.

2.2.2. Métodos de polimerização

Os polímeros podem ser obtidos por diversos métodos de polimerização, a depender da aplicação desejada para o produto final. Em linhas gerais, esses processos podem ser classificados como homogêneos, quando ocorrem em apenas uma fase, ou heterogêneos, quando o produto é insolúvel no meio reacional ou a reação ocorre em mais de uma fase. Como processos de polimerização homogêneos, destacam-se as polimerizações em massa e em solução; e como processos de polimerização heterogêneos, destacam-se as polimerizações em suspensão e em emulsão (CANEVAROLO JR., 2006; ODIAN, 2004).

I. Polimerização em massa

Na polimerização em massa o iniciador é adicionado diretamente ao monômero e a reação é iniciada por meio de ativação do iniciador, comumente por aquecimento. A vantagem deste processo é a qualidade do produto final, em virtude de elevada pureza obtida. Em contrapartida, há grande dificuldade para controlar a temperatura do sistema, já que a reação de polimerização é muito exotérmica, o que pode levar à instabilidade do processo. Além disso, as altas viscosidades atingidas podem comprometer a operação e a purificação do produto final (CANEVAROLO JR., 2006).

II. Polimerização em solução

A polimerização em solução é similar à polimerização em massa, mas ocorre na presença de um solvente. A adição do solvente no meio reacional garante melhor controle sobre as condições térmicas do sistema, permitindo melhor homogeneização da temperatura reacional por meio de uma transferência de calor mais efetiva. A reação é iniciada com total miscibilidade entre os componentes (monômero, iniciador e solvente). A introdução do solvente resulta na perda de produtividade do processo e em maiores custos para purificação e recirculação do solvente (CANEVAROLO JR., 2006).

III. Polimerização em suspensão

Na polimerização em suspensão, o iniciador é solúvel no monômero, que é disperso em uma fase contínua. Em sistemas de suspensão clássicos, emprega-se a água como fase contínua, na qual também é adicionado um agente de suspensão. A agitação

do sistema promove a formação de pequenas gotas de monômero, que são estabilizadas pelo agente de suspensão, evitando a coalescência entre as gotas formadas no volume reacional. O aumento da temperatura do meio garante a polimerização em cada gota e o controle de temperatura do sistema é facilitado pela presença da fase contínua, que dispersa o calor liberado pela polimerização. São obtidas, como produto final, partículas com granulometria característica na faixa entre 10 μm e 1 mm (CANEVAROLO JR., 2006).

IV. Polimerização em emulsão

Na polimerização em emulsão, assim como na polimerização em suspensão, o monômero é disperso em uma fase contínua. Em contrapartida, neste caso o iniciador está usualmente presente na fase contínua, ao invés de solubilizado no monômero. Na polimerização em emulsão clássica, a água compõe a fase contínua, que contém um agente emulsificante que promove a formação de micelas. A agitação do sistema leva à formação de gotas de monômero, mas a polimerização nas gotas é evitada, uma vez que o iniciador está presente na fase contínua. A polimerização ocorre no interior das micelas (parte hidrofóbica), inchada com o monômero que migra das gotas. O produto final da reação é constituído por partículas com diâmetros característicos na faixa entre 50 nm e 1 μm (CANEVAROLO JR., 2006).

Os métodos de polimerização descritos na presente seção são frequentemente empregados em processos industriais. No entanto, para aplicações médicas intravenosas, que consiste na proposta deste trabalho, a polimerização por miniemulsão é mais indicada, principalmente por garantir a obtenção controlada de partículas com dimensões na ordem de nanômetros. Por isso, tal método de polimerização será melhor detalhado na próxima seção.

2.2.3. Polimerização por miniemulsão

Metodologias para o *design* de partículas são necessárias para sintetizar nanopartículas ou nanocápsulas poliméricas com tamanho, composição, morfologia e superfície funcional bem definidos. Um método versátil para tal finalidade é a polimerização por miniemulsão. O processo de miniemulsão, esquematizado na Figura 8, consiste na criação de pequenas gotas estabilizadas em uma fase contínua, quando duas

fases imiscíveis são submetidas à aplicação de alta tensão de cisalhamento. Idealmente, não se observam mudanças de tamanho entre a gota de monômero inicialmente estabilizada e a partícula de polímero obtida ao final da reação (LANDFESTER, 2009; LANDFESTER; MUSYANOVYCH; MAILANDER, 2010).

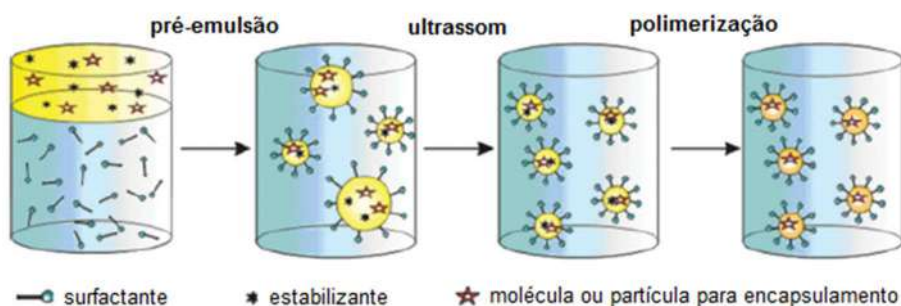


Figura 8 - Processo de polimerização por miniemulsão. Adaptado de (LANDFESTER; MUSYANOVYCH; MAILANDER, 2010).

No processo de miniemulsão, cada gota pode ser vista como um nano-reator, porque cada uma apresenta comportamento independente, não sendo perturbada pelos outros eventos. Na etapa de pré-emulsão, são formadas pequenas gotas por ação de um sistema de agitação, que promove a dispersão de uma fase dispersa em uma fase contínua não miscível. Sob alta tensão de cisalhamento (ação de ultrassom, ultraturrax ou homogeneizador de alta pressão), forma-se uma emulsão que apresenta gotas com estreita distribuição de tamanhos, com dimensão entre 50 e 500 nm. O tamanho das gotas depende, além do sistema de agitação mecânica, da quantidade e tipo de emulsificante utilizado e da presença de um agente estabilizante de pressão osmótica. O estabilizante deve apresentar boa solubilidade na fase dispersa e baixa solubilidade na fase contínua. Na etapa final, ocorre a reação de polimerização na fase dispersa, resultando na formação de nanopartículas poliméricas estabilizadas na fase contínua. O produto final da polimerização por miniemulsão é denominado látex (LANDFESTER; MUSYANOVYCH; MAILANDER, 2010).

A miniemulsão pode ser classificada como direta ou inversa (Figura 9), dependendo da natureza das fases contínua e dispersa do sistema. Na miniemulsão direta o monômero apresenta caráter lipofílico (como metacrilato de metila) e compõe uma fase

apolar que é dispersa em uma fase contínua polar, geralmente água. Já na miniemulsão inversa, a fase dispersa, que contém o monômero (como ácido acrílico), é de natureza hidrofílica e a fase contínua apresenta caráter apolar. Em ambos os sistemas se aplicam os mesmos princípios de estabilidade (LANDFESTER, 2006; OLIVEIRA; NELE; PINTO, 2013).

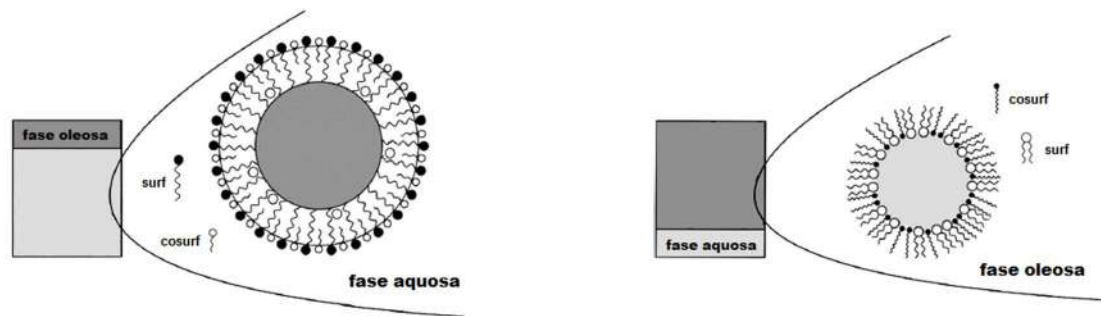


Figura 9 - Representação esquemática de miniemulsão direta (esquerda) e inversa (direita). Adaptado de (CAPEK, 2010).

Algumas particularidades importantes do sistema de miniemulsão são destacadas a seguir:

- i) Na etapa de emulsificação, o tamanho final das gotas é definido por um processo de quebra e coalescência que tende a atingir um estado de equilíbrio dinâmico, que corresponde a distribuição final de tamanhos da partícula (CAPEK, 2010);
- ii) A polimerização só ocorre por intermédio da etapa de nucleação das gotas, uma vez que a concentração de surfactante encontra-se abaixo da concentração micelar crítica, evitando-se o mecanismo de nucleação micelar (OLIVEIRA; NELE; PINTO, 2013);
- iii) O agente de pressão osmótica, também conhecido como estabilizante ou co-surfactante, previne o efeito de degradação difusional (*Ostwald ripening*) e permite controlar a dimensão e estabilidade das gotas formadas (CAPEK, 2010);
- iv) Na polimerização em miniemulsão o iniciador pode estar contido na fase dispersa ou na fase contínua, dada a efetiva transferência de massa proporcionada pela grande área específica das gotas (OLIVEIRA; NELE; PINTO, 2013);

v) Polimerizações por miniemulsão, quando comparadas às reações em solução ou em massa, geralmente são mais rápidas e resultam em polímeros com maiores massas molares (CAPEK, 2010).

2.2.4. Polímeros acrílicos

Os polímeros acrílicos compreendem a classe dos polímeros derivados de ácidos e ésteres acrílico e metacrílico. Levando em consideração as propriedades desses materiais, polímeros acrílicos diferem consideravelmente dos metacrílicos. Polimetacrilatos apresentam elevada resistência mecânica e estabilidade dimensional, devido à rigidez de suas cadeias poliméricas, resultando em elevados valores de temperatura de transição vítrea (Tg). Em contrapartida, poliacrilatos são muito menos rígidos, devido à ausência de grupos metila inseridos de forma alternada na cadeia polimérica (ODIAN, 2004).

Exemplos clássicos de polímeros acrílicos são o poli(metacrilato de metila) (PMMA) e o poli(ácido acrílico) (PAA), apresentados na Figura 10. Estes polímeros são reportados na literatura como biocompatíveis, sendo utilizados, dentre outras aplicações médicas, como agentes embolizantes (CUI et al., 2012; JAYAKRISHNAN et al., 1994).

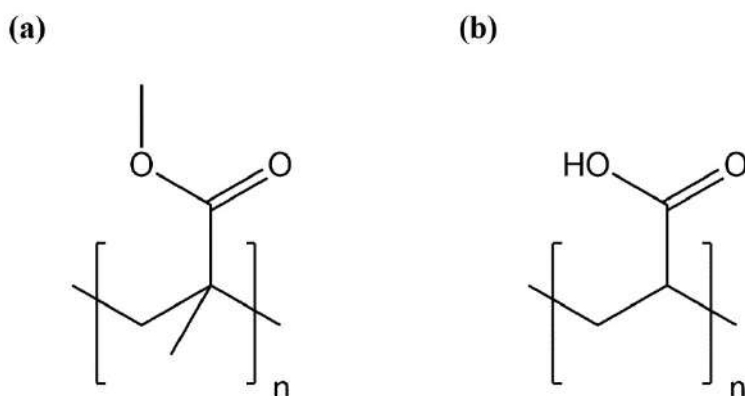


Figura 10 - Estrutura química dos polímeros acrílicos (a) poli(metacrilato de metila) e (b) poli(ácido acrílico).

No presente trabalho são preparadas nanopartículas dos polímeros acrílicos PMMA e PAA, empregando a técnica de miniemulsão direta e inversa, respectivamente. No entanto, o foco principal é dado à obtenção de partículas poliméricas de PAA que, quando comparado ao PMMA, é pouco discutido na literatura e apresenta grandes potencialidades para aplicações biológicas, em virtude da hidrofiliçidade do material e a disponibilidade de grupos funcionais para bioconjugações. Portanto, a próxima seção versará em torno do poli(ácido acrílico) e particularidades sobre a obtenção de partículas submicrométricas por miniemulsão inversa.

2.2.5. Poli(ácido acrílico)

Polímeros hidrofílicos, especialmente nas formas reticuladas conhecidas por hidrogéis, compõem uma classe de biomateriais com grande potencial para aplicações médicas, em virtude da elevada biocompatibilidade. A reticulação do material evita sua solubilização em meio aquoso, por conta da formação de ligações cruzadas, de natureza física ou química, na cadeia polimérica (PEPPAS et al., 2006). Dentre os hidrogéis sintéticos, destacam para aplicações médicas o polietilenoglicol (PEG), o poli(álcool vinílico) (PVA) e o poli(ácido acrílico) (PAA) (DRURY; MOONEY, 2003).

Partículas de PAA com dimensões micro e submicrométricas foram preparadas na literatura por diferentes abordagens sintéticas. Kriwet, Walter e Kissel (1998) descreveram a síntese de partículas bioadesivas de PAA, empregando o método de polimerização por emulsão inversa. A polimerização foi iniciada por radicais livres de diferentes naturezas, resultando em distintas distribuições de tamanhos. O emprego de iniciadores hidrossolúveis resultou em partículas micrométricas, enquanto os iniciadores lipossolúveis resultaram em partículas com dimensões nanométricas. Molnar et al. (2009) reportaram o preparo de nanopartículas de PAA, reticulando o polímero comercial com diamina, por intermédio de carbodiimida. As partículas obtidas foram purificadas por diálise e apresentaram tamanhos dependentes do pH e da massa molar do polímero empregado. Pinto et al. (2012) apresentaram um processo para obtenção de partículas de PAA composto por duas etapas. Inicialmente, o polímero reticulado com glicerol foi obtido por polimerização em solução. Posteriormente, a solução polimérica foi dispersa em óleo vegetal e a emulsão polímero/óleo foi submetida a aquecimento, resultando em

partículas com dimensões micrométricas, após evaporação do excesso de água da etapa anterior.

Pouco se discute na literatura referente a obtenção de partículas poliméricas de PAA por meio de metodologia de polimerização por miniemulsão inversa. Landfester, Willert e Antonietti (2000) destacaram importantes princípios da polimerização por miniemulsão e preparam partículas de PAA na ausência e presença de reticulante. Foi empregado o diacrilato de dietilenoglicol como agente reticulante, com teor de 4,0 % (p/p) com relação ao monômero, com o intuito de obter um polietetrólito homogêneo e estável, quando ressuspensionado em água. O ácido acrílico foi disperso em ciclohexano, apresentando solubilidade não negligenciável, o que afeta a cinética do sistema. A solubilidade do monômero na fase contínua pode ser reduzida significativamente com a adição de água. Tal decréscimo é ainda mais favorecido pela adição de um estabilizante fortemente hidrofílico, como NaCl ou NaOH. Diferentes surfactantes comerciais foram avaliados, sendo determinada uma concentração crítica (garantida a ausência de formação de micelas e o recobrimento incompleto das partículas) necessária para a obtenção de um látex estável, com partículas por volta de 100 nm. A utilização do surfactante comercial KLE3729 foi considerada mais adequada, uma vez que o surfactante comercial Span 80 interage fortemente com o monômero, formando complexos. A polimerização foi realizada a 65 °C, adicionando azobisisobutironitrila (AIBN) como iniciador na fase contínua, após emulsificação por ultrassom. A reação apresentou elevada conversão em poucos minutos, mas foi realizada por 2 h para favorecer completa conversão do monômero. As partículas obtidas apresentaram boa homogeneidade de tamanhos. Quando ressuspensionadas em água, as partículas apresentaram o dobro do diâmetro inicial, decorrente do inchamento do hidrogel. Capek (2010) discutiu trabalhos semelhantes, em que foram obtidas partículas de PAA puras ou na forma de compósitos.

2.2.6. Encapsulamento de partículas magnéticas em polímeros

Compósitos poliméricos são utilizados em diversas aplicações tecnológicas e médicas, principalmente na forma nanoparticulada. Neste contexto, o encapsulamento de partículas magnéticas em partículas poliméricas tem sido vastamente investigado. Para tal, várias técnicas têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas, baseadas em princípios químicos ou puramente físicos. Um dos melhores métodos para preparar estas partículas

inorgânicas-orgânicas é a técnica de polimerização por miniemulsão, devido ao efetivo controle das propriedades do sistema, que permite a interação adequada entre os materiais de diferentes naturezas (CAPEK, 2010).

O encapsulamento de partículas magnéticas em partículas poliméricas apresenta uma série de vantagens. O polímero protege a superfície da partícula magnética, garantindo maior estabilidade oxidativa ao material. A superfície polimérica também pode ser utilizada para biofuncionalização. Sendo o polímero biocompatível, o potencial de toxicidade das partículas magnéticas é ainda mais reduzido. Finalmente, múltiplas funções, como modalidades de detecção e tratamento de doenças, podem ser incorporadas à partícula, dada a combinação de diferentes propriedades advindas da composição diversificada do material (KUMAR; MOHAMMAD, 2011).

São encontrados na literatura diversos trabalhos que envolvem o encapsulamento de partículas magnéticas em partículas de polímeros que apresentam dimensões submicrométricas. Lin, Chiu e Don (2006) empregaram a polimerização por miniemulsão inversa para encapsular partículas de magnetita em copolímeros de natureza hidrofílica e obter compósitos termossensíveis. Foram obtidas partículas com distribuição homogênea de material magnético, com diâmetro aproximado de 200 nm, desde que respeitada a condição de concentração de surfactante abaixo da concentração micelar crítica. Luo, Dai e Chiu (2007) encapsularam nanopartículas de magnetita em poliestireno via polimerização por miniemulsão direta. O resultado foi um látex com duas populações de partículas nanométricas; com dimensões reduzidas, quando constituída puramente de poliestireno, e maiores, quando apresentaram o material inorgânico incorporado. Romio et al. (2013) empregaram a polimerização por miniemulsão inversa para encapsular partículas magnéticas de Ni em poliacrilamida. Os tamanhos de partículas obtidas se apresentaram em uma ampla faixa de tamanhos (300 a 500 nm), sendo dependente do tipo de estabilizante hidrofílico utilizado. Perecin et al. (2014) revestiram nanopartículas de magnetita com PMMA por meio de técnica de secagem, empregando *Nano Spray Dryer**. A metodologia se demonstrou viável para grandes escalas, mas apresentou elevado diâmetro médio de partícula (825 nm).

* *Nano Spray Dryer* é um método de produção de partículas em dimensão nanométrica por intermédio de pulverização e secagem física (PERECIN, 2014).

Trabalhos recentes empregaram a metodologia de miniemulsão para o encapsulamento de partículas superparamagnéticas de magnetita em polímeros acrílicos. Feuser et al. (2015) encapsularam nanopartículas de magnetita em PMMA, apresentando uma metodologia viável para a obtenção, em uma única etapa, de partículas híbridas com estreita distribuição de tamanhos. O encapsulamento resultou em um látex estável em meio aquoso, apresentando partículas com composição e dimensão compatível a aplicações biomédicas (em torno de 100 nm). Zhang et al. (2015) apresentaram um método para a obtenção, em ampla escala, de nanogel magnético de PAA. Neste caso, nanopartículas de poliacrilonitrila (PAN) reticuladas com divinilbenzeno foram sintetizadas via polimerização por miniemulsão direta. A formação do PAA ocorreu por hidrólise alcalina das partículas de PAN. A superfície das nanopartículas de Fe_3O_4 foi previamente modificada, promovendo o incremento de hidrofobicidade do material e facilitando a incorporação na primeira etapa do procedimento. Após a conversão dos grupamentos hidrofóbicos (-CN) em hidrofílicos (-COOH), foi observado um incremento significativo na dimensão das partículas em meio aquoso (de 100 nm para até 500 nm), em razão do inchamento do PAA.

Vale destacar que, apesar de serem encontradas muitas metodologias para a obtenção de nanopartículas magnéticas encapsuladas em polímeros, poucas resultam em distribuição de tamanho de partícula compatível a aplicações médicas intravenosas. Além disso, para tais aplicações é importante observar a presença de grupamentos funcionais pendentes no polímero e que possibilitem a incorporação de biomoléculas.

2.3. Bioconjugação

2.3.1. Liberação controlada e entrega sítio-dirigida

Partículas poliméricas têm sido amplamente empregadas para a formulação de sistemas de liberação controlada de fármacos. Associados à bioconjugação de marcadores específicos, estes sistemas representam uma alternativa a técnicas tradicionais de combate ao câncer, como a quimioterapia. Tratamentos quimioterápicos inevitavelmente resultam em efeitos colaterais devido a não seletividade aos tecidos tumorais e à elevada toxicidade dos fármacos empregados. Superando as limitações impostas pelos agentes

quimioterápicos livres, nanocarreadores podem oferecer uma série de vantagens, como prevenir a degradação prematura do fármaco no organismo, evitar interações indesejadas no sistema biológico, aumentar a absorção do fármaco em um tecido específico, controlar a cinética e perfil de distribuição do fármaco, além de favorecer a penetração intracelular do ativo (WANG; REMPEL, 2015). No entanto, vale ressaltar que o emprego de partículas poliméricas em sistemas de entrega de fármacos sítio dirigida deve atender ao critério de tamanho, que é determinante para a biodistribuição. O tamanho ótimo das nanopartículas, para aplicações biomédicas intravenosas, é considerado na faixa entre 25 e 100 nm (STUART et al., 2010).

Avanços no campo da biotecnologia têm criado a necessidade de desenvolvimento de carreadores poliméricos para moléculas bioativas hidrofílicas (WEST; HUBBELL, 1995). Polímeros hidrogéis, como o PAA, apresentam grande potencial para aplicações biotecnológicas, em especial relacionadas ao desenvolvimento dos chamados polímeros inteligentes (PEPPAS et al., 2006). Polímeros inteligentes são aqueles que apresentam uma resposta ativa a pequenos sinais e alterações do ambiente (como pH, temperatura, luz e campo magnético), sofrendo alterações drásticas e reversíveis em sua microestrutura. Assim, quando vinculados a fármacos, podem formar complexos sistemas de liberação controlada de fármacos, em resposta à necessidade de uma doença específica (YOU et al., 2010).

Nanopartículas magnéticas podem ser associadas aos carreadores poliméricos de fármacos, promovendo uma liberação controlada mais efetiva, por intermédio de aplicação de campo magnético. Este cenário demonstra a potencialidade de combinar a técnica de hipertermia como medida terapêutica, em sinergia com a liberação controlada de fármacos, atendendo aplicações médicas personalizadas. A entrega de fármacos controlada por hipertermia pode ocorrer por meio de quebra de ligações ou aumento da permeabilidade. No primeiro caso, biomoléculas ativas são aderidas à superfície de nanopartículas por ligações lábeis, que podem ser desfeitas por aquecimento. O segundo caso envolve o encapsulamento conjunto do ativo e das nanopartículas magnéticas na nanopartícula polimérica. Assim, a geração de calor pela partícula magnética pode promover a vibração das cadeias poliméricas, garantindo a migração facilitada do ativo para o exterior da partícula polimérica. Este mecanismo pode ser reversível sob condições específicas e depende da intensidade e frequência de oscilação do campo magnético

empregado. A eficiência da liberação controlada por este mecanismo é intensificada pelo emprego de polímeros hidrogéis termossensíveis (KUMAR; MOHAMMAD, 2011).

2.3.2. Mecanismo de bioconjugação

O interesse em combinar proteínas e demais biomoléculas com sistemas poliméricos tem crescido rapidamente, dada a ampla gama de aplicações de biomateriais injetáveis. Nestes, o segmento peptídico confere a biocompatibilidade e a atividade seletiva, enquanto a matriz polimérica permite a flexibilidade estrutural (CHIMONIDES et al., 2013). Com a proposta de reproduzir reações peptídicas que ocorrem em organismos vivos, diferentes metodologias de bioconjugação já foram descritas na literatura (DEFOREST; POLIZZOTTI; ANSETH, 2009; NAKAJIMA; IKADA, 1995).

Bioconjugação consiste no processo de ligar quimicamente, por ligação covalente, duas ou mais moléculas que possuem grupos funcionais terminais específicos (como amina primária, carboxila e sulfidrila). Na maioria dos casos, ao menos umas dessas moléculas é de origem biológica ou um fragmento ou derivado de uma biomolécula. Em algumas situações, a conjugação é formada entre moléculas restritamente sintéticas, mas seu uso é direcionado para aplicações biológicas (HERMANSON, 2013a). Esta área da química inclui aplicações em imobilização, modificação de superfícies e marcação biológica. A propriedade mais importante de uma molécula na bioconjugação é a reatividade do grupo funcional. O grupo reativo estabelece o método e o mecanismo empregado para a modificação química a ser aplicada. Geralmente, moléculas utilizadas para bioconjugação contêm ao menos dois grupos terminais reativos, como encontrados em proteínas e ácidos nucleicos (HERMANSON, 2013a; THERMO SCIENTIFIC, 2012).

A Figura 11 apresenta o esquema de reação entre uma molécula que apresenta um grupamento amino primário como grupo terminal e outra que apresenta um grupamento carboxila, intermediada por uma carbodiimida. Essa abordagem particular foi adotada como estratégia de bioconjugação no presente trabalho.

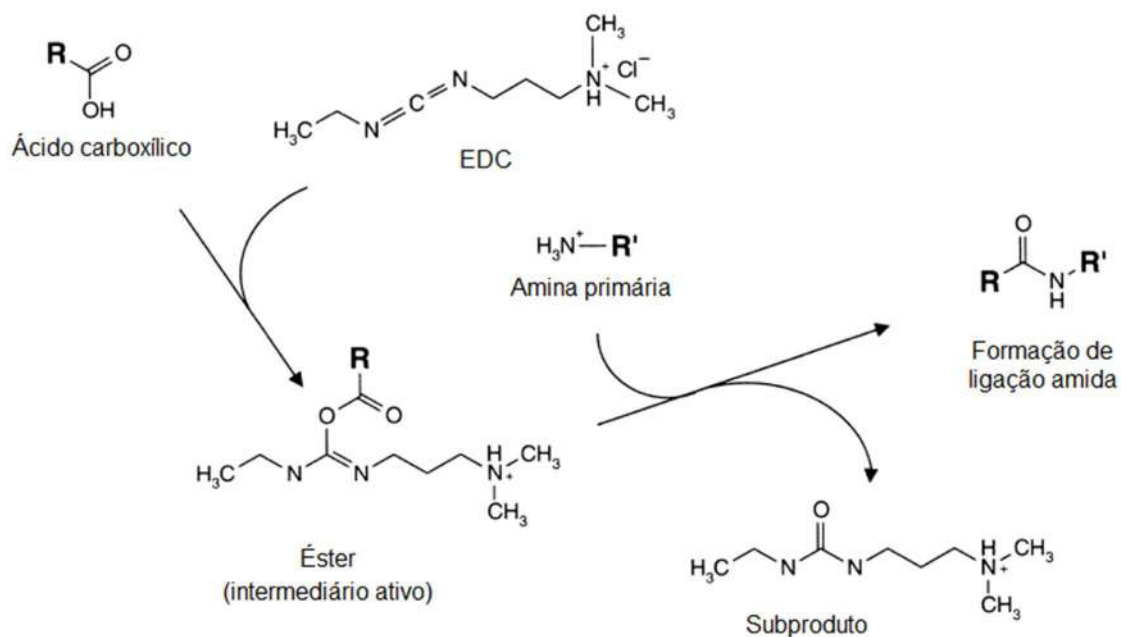


Figura 11 - Formação de ligação amida por reação entre um grupamento carboxila e um grupamento amino primário, intermediado por EDC.

Aminas primárias ($-\text{NH}_2$) existem normalmente como terminação de cadeias polipeptídicas, denominadas de alfa-aminas. Devido à carga positiva de sistemas fisiológicos, as aminas primárias estão normalmente voltadas para fora nas estruturas proteicas, tornando estes grupamentos mais acessíveis para bioconjugações, evitando a desnaturação da estrutura. Grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) compõem carbonos terminais de cadeias peptídicas e, assim como as aminas primárias, normalmente se encontram na superfície das estruturas proteicas. Ácidos carboxílicos são reativos com relação às carbodiimidas, que promovem a ligação direta de carboxilas com aminas primárias, sem fazer parte da ligação amida final. A carbodiimida ativa grupamentos carboxila, formando ésteres intermediários que são mais reativos e facilmente deslocados por ataque nucleofílico. O EDC (cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) é a carbodiimida mais popular utilizada para a conjugação biológica de substâncias que contêm grupos carboxila e amina. A etapa de ativação do grupo carboxílico por EDC é favorecida por ambientes ácidos (pH 3,5-4,5). Estes intermediários formam ligações lábeis com aminas primárias, em meio levemente alcalino (pH 7-9), resultando em ligações amida estáveis e dando origem a um derivado de ureia como subproduto. No entanto, a hidrólise destes ésteres compete com a reação com a amina primária, sendo a

reação fortemente dependente do pH do meio (HERMANSON, 2013b; THERMO SCIENTIFIC, 2012).

2.3.3. Folato

A seletividade e eficiência da abordagem sítio-dirigida a células tumorais pode melhorar significativamente a medida terapêutica adotada no combate ao câncer, uma vez que o tratamento se torna muito mais específico e localizado. A bioconjugação de folatos em nanopartículas representa uma interessante estratégia para tratamento de câncer sítio-dirigido e tem sido amplamente explorada em pesquisas oncológicas. Células cancerígenas expressam receptores de folato em razão da multiplicação celular. Células normais expressam um nível significativamente menor de receptores de folato, quando comparadas a células tumorais, o que sugere que folatos podem ser utilizados como potentes marcadores em diferentes abordagens terapêuticas baseadas em nanocarreadores (BAHRAMI et al., 2015). O emprego de ácido fólico para a bioconjugação de nanopartículas garante o reconhecimento destas partículas por receptores expressos em diversos tipos de células carcinogênicas, incluindo pulmão, mama, cólo de útero, próstata e linfomas (MAHAJAN et al., 2013).

Nanopartículas magnéticas têm sido vinculadas ao ácido fólico (Figura 12), muitas vezes intermediado por polímeros. Os polímeros conferem grupos funcionais disponíveis, propícios à formação de ligações covalentes com a biomolécula. Além disso, o polímero também é muitas vezes empregado como espaçador, para aumentar a flexibilidade do ácido fólico e garantir uma configuração ótima entre o ácido fólico e os receptores de folato (LIU et al., 2016). Partículas magnéticas encapsuladas em polímeros foram funcionalizadas com ácido fólico para o aprimoramento de ressonância magnética nuclear e hipertermia magnética, direcionados especificamente para o diagnóstico e tratamento de câncer. Nestes casos, diferentes abordagens foram adotadas para o acoplamento da molécula, dependendo da natureza do polímero. Em linhas gerais, o acoplamento foi intermediado por carbodiimida, resultando em esterificação ou formação de ligação amida, quando a cadeia polimérica apresenta grupamentos hidroxila ou carboxila pendentos (MAHAJAN et al., 2013; SADHASIVAM et al., 2015).

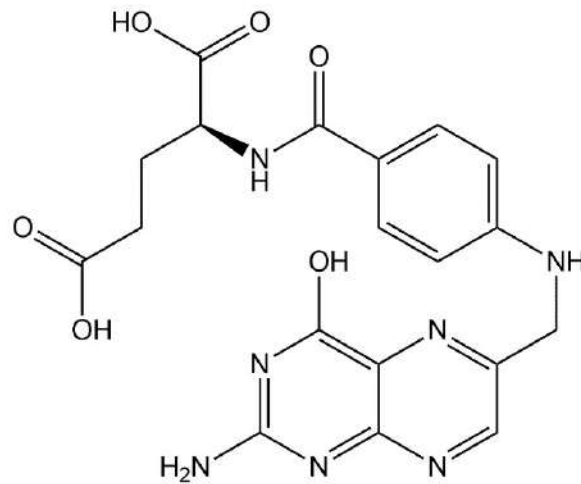


Figura 12 - Estrutura química do ácido fólico.

O ácido fólico, também conhecido como vitamina B9, é um nutriente essencial a todas as células para a biossíntese de nucleotídeos, além de atuar em várias rotas metabólicas (BAHRAMI et al., 2015). O ácido fólico exerce um importante papel na oncologia, especificamente por atuar na metilação do DNA e na síntese de purinas e pirimidinas. O ácido fólico é a forma de folato mais estável, mas não é encontrada naturalmente em tecidos vivos, sendo necessária a redução no organismo. Células neoplásicas* possuem receptores específicos de alta afinidade com folatos e, por serem células de rápida replicação, são extremamente dependentes de um abundante suprimento de folato reduzido. A utilização do ácido fólico, ou de seus derivados, pode ser direcionada tanto para prevenção como para tratamento de câncer. Foi demonstrado que o crescimento de tumores é inibido quando há deficiência de folato, o que sustenta terapias antitumorais que utilizam agentes antifolato (BALUZ; DO CARMO; ROSAS, 2002). Em contrapartida, a seletividade dos folatos por células neoplásicas propiciam terapias baseadas em carreadores altamente específicos, que podem aliar tratamentos quimioterápicos à técnica de hipertermia magnética (BAHRAMI et al., 2015; THU HUONG et al., 2016).

* Células neoplásicas - sinônimo para células tumorais, neste contexto.

2.4. Considerações Gerais

Partículas poliméricas com dimensão submicrométrica têm sido extensivamente utilizadas em aplicações biomédicas. Nanopartículas usadas para o transporte específico de fármacos, contrastes ou agentes promotores de imagens, têm sido desenvolvidas, visando em particular a permeabilidade em diferentes tipos de tecidos. O encapsulamento de fármacos e marcadores em nanopartículas poliméricas pode constituir uma técnica eficiente para a atuação direcionada. O desenvolvimento destes complexos sistemas particulados pode ser alcançado, de maneira relativamente simples, por intermédio da polimerização por miniemulsão (LANDFESTER; MUSYANOVYCH; MAILANDER, 2010).

Polímeros hidrogéis inteligentes que respondem à aplicação de um campo magnético alternado tem atraído interesse crescente nos últimos anos. Isto se atribui à amplitude de potenciais aplicações como carreadores controláveis, agentes de contraste para imageamento por ressonância magnética e terapia por aquecimento magnético. Comparado a estímulos tradicionais, como pH e temperatura, o estímulo magnético é mais conveniente, uma vez que pode ser controlado remotamente e apresenta resposta rápida e relativamente sensível. Hidrogéis sensíveis à aplicação de campo magnético podem ser preparados pela introdução de nanopartículas magnéticas em uma matriz polimérica hidrofílica por interações químicas ou puramente físicas. Combinando a capacidade de liberação de calor das nanopartículas magnéticas com a sensibilidade estrutural do polímero, sob aplicação de campo magnético alternado, podem ser desenvolvidos interessantes sistemas terapêuticos nanoparticulados que aliam efeitos de hipertermia magnética a efeitos quimioterápicos tradicionais, de forma altamente eficiente para o combate ao câncer (ZHANG; HUANG; DU, 2016).

Diante do exposto, a presente dissertação busca o desenvolvimento de nanopartículas magnéticas, encapsuladas em polímeros acrílicos, para aplicações médicas. Nanopartículas magnéticas de magnetita foram obtidas por coprecipitação, em razão de ser uma metodologia de fácil reprodução em grandes escalas, além de apresentar viabilidade técnica e econômica. O encapsulamento em polímeros acrílicos foi promovido por intermédio da polimerização em miniemulsão, para garantir a obtenção

de partículas com estreita distribuição de tamanhos e dimensão compatível a aplicações médicas. Foi possível estudar a polimerização por miniemulsão direta, de forma comparativa com a miniemulsão inversa, dada a natureza lipofílica e hidrofílica dos monômeros empregados (respectivamente, metacrilato de metila e ácido acrílico). Foi dada maior atenção à obtenção de partículas poliméricas de poli(ácido acrílico) por miniemulsão inversa, uma vez que poucos estudos têm sido desenvolvidos nessa área, principalmente com a preocupação para aplicações médicas. Vale destacar que polímeros hidrogéis como o PAA apresentam excelente afinidade com sistemas biológicos, em razão da hidrofílicidade intrínseca. Complementarmente, aproveitando os grupos funcionais expostos do PAA, o ácido fólico foi bioconjugado às partículas, vislumbrando a disposição localizada destas partículas em tecidos tumorais. Por fim, foi avaliado o efeito de hipertermia magnética das partículas magnéticas puras e encapsuladas, considerando o uso potencial das partículas em terapias oncológicas.

Capítulo III

Materiais e Métodos

"Cada sonho que você deixa para trás é um pedaço do seu futuro que deixa de existir."

Steve Jobs

Neste capítulo é apresentada a metodologia empregada para a síntese das partículas magnéticas e poliméricas, bem como o procedimento de bioconjugação. Também são delineados os planejamentos experimentais realizados com o intuito de agregar informações complementares. Além disso, são especificadas as unidades experimentais utilizadas nas sínteses e os equipamentos empregados nas caracterizações dos materiais obtidos.

As sínteses das nanopartículas de magnetita foram realizadas no laboratório de Nanotecnologia Biofuncional da Faculdade de Farmácia da UFRJ, enquanto as sínteses das partículas poliméricas foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Polímeros (EngePol) do Programa de Engenharia Química (PEQ) do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE) da UFRJ.

3.1. Síntese da magnetita

As nanopartículas de magnetita foram sintetizadas de acordo com o procedimento apresentado por Bedê (2010), empregando o método de coprecipitação.

3.1.1. Materiais

A unidade experimental utilizada para a síntese das partículas magnéticas está ilustrada na Figura 13, sendo a estrutura da unidade detalhada a seguir:

1. Banho termostático para garantir a temperatura constante ao longo da reação.
2. Balão de vidro borossilicato de fundo redondo com duas bocas, sendo uma utilizada para inserir o agitador mecânico e a outra para inserir os reagentes.
3. Suporte universal com garra, para sustentar e alinhar o sistema balão-agitador.
4. Agitador mecânico com haste de aço inox e impelidor dobrável com pá unificada disposta verticalmente.

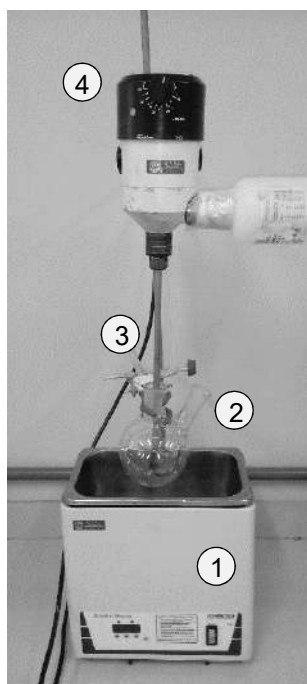


Figura 13 - Unidade experimental utilizada para a síntese de nanopartículas de magnetita.

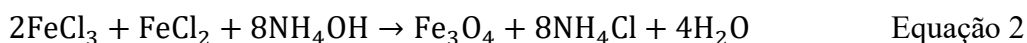
Os reagentes utilizados nesta etapa foram empregados como recebidos, salvo especificações em contrário. A seguir, estão especificados os reagentes usados:

1. Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil). Este reagente foi purificado por recristalização, uma vez que oxida facilmente quando exposto à atmosfera.
2. Ácido sulfúrico (H_2SO_4) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com teor máximo de água de 5 % p/p.

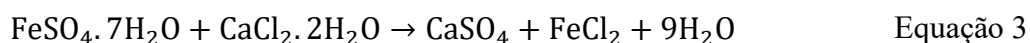
3. Ferro metálico pulverizado (Fe^0) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil).
3. Cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA.
4. Cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA.
5. Solução de amônia (NH_4OH) fornecido pela Merck (Brasil) com grau Emsure ACS e teor de 28-30 % p/v em água.
6. Água ultrapura obtida por sistema de purificação de água Milli-Q[®].

3.1.2. Metodologia

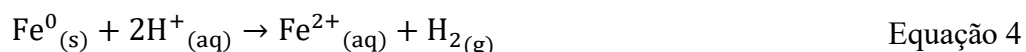
A Equação 2 apresenta a equação global envolvida na obtenção da magnetita (Fe_3O_4) pelo método de coprecipitação.



Os precursores desta reação podem ser obtidos comercialmente, sem a necessidade de procedimentos intermediários. No entanto, para garantir elevada pureza da fonte de Fe^{2+} , o FeCl_2 foi obtido de acordo com a Equação 3, utilizando o FeSO_4 previamente purificado por recristalização.



Para purificar o sulfato de ferro II (FeSO_4), este foi solubilizado em solução de ácido sulfúrico 25 % (p/v), resultando em uma solução saturada a 60 °C. A solução foi mantida sob aquecimento e submetida a agitação com bastão de vidro, à medida que foram sendo adicionadas pequenas porções de ferro metálico (Fe^0). O ferro metálico atua como metal de sacrifício, evitando a oxidação dos íons Fe^{2+} presentes no sólido e fornecendo ainda mais destes íons ao meio reacional ao se oxidar. O deslocamento do equilíbrio da Equação 4 para a direita favorece que o sulfato de ferro se apresente no estado de oxidação mais reduzido. O Fe^0 foi adicionado até ter sido cessada a evolução de gases (H_2), observada como efervescência do meio.



A mistura reacional foi submetida a filtração à vácuo, a quente, em funil sinterizado, para remover os particulados residuais do ferro metálico que foi oxidado. O filtrado apresentou coloração azul esverdeada, característica do FeSO_4 . Então, a solução foi resfriada em banho de gelo e posteriormente em *freezer*, garantindo a formação dos cristais purificados. Os cristais foram submetidos a filtração à vácuo e lavados com pequenas porções de água gelada, para remover o excesso do meio ácido em que se encontrava.

O FeSO_4 purificado foi reagido com o CaCl_2 , misturando as soluções aquosas destes sais, previamente preparadas, nas proporções estequiométricas da Equação 3, de forma a ser obtida uma solução de FeCl_2 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Como subproduto precipitou CaSO_4 , que foi removido por centrifugação a 6000 rpm por 10 min (Thermo Scientific, rotor Fiberlite F15-6x100y).

Foi preparada uma solução aquosa de FeCl_3 , também a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, que foi misturada à solução de FeCl_2 em proporção equimolar (não estequiométrica, como apresentado na Equação 2) e vertida no balão de fundo redondo, submerso em banho de água a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. A mistura foi submetida a agitação mecânica a 800 rpm, sendo homogeneizada até atingir o equilíbrio térmico. Posteriormente, foi gotejada uma solução de amônia (NH_4OH 28-30% p/v) sobre a mistura reacional, induzindo a formação de um precipitado preto (magnetita) por alcalinização do meio. A adição da base foi controlada pelo valor do pH do meio, mantido ao final da reação em 5, 8 ou 11, dependendo da síntese realizada. Ao término da adição da base, a agitação e o aquecimento foram mantidos por 30 min.

A suspensão final de magnetita foi resfriada até a temperatura ambiente e submetida a centrifugação (800 rpm, 5 min), para remover o excesso de base, subprodutos e possíveis precursores não reagidos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com água, sob centrifugação, até que o sobrenadante apresentasse pH neutro. A magnetita, já purificada, foi em parte mantida em água e em parte liofilizada, sendo ambas armazenadas em frascos fechados.

3.1.3. Planejamento experimental

Com a proposta de avaliar a viabilidade do emprego das nanopartículas de magnetita em possíveis terapias térmicas, foi desenhado um plano experimental, estruturado como um planejamento experimental fatorial completo a dois níveis (2^4) com réplicas no ponto central. A coleta de dados para a avaliação estatística do sistema consiste em um conjunto de medições de hipertermia magnética de amostras de nanopartículas de magnetita dispersas em soluções aquosas do surfactante lauril sulfato de sódio (LSS). A magnetita utilizada foi previamente sintetizada pelo método de coprecipitação, tendo sido o pH final do meio reacional ajustado para 11. Foi utilizada para isso a amostra de magnetita liofilizada, para garantir maior precisão de concentração das nanopartículas magnéticas (NPM) quando ressuspendidas na solução de surfactante.

As variáveis selecionadas para avaliação quanto à influência na liberação de calor das NPM, por aplicação de campo magnético alternado, foram: frequência do campo magnético (f), intensidade do campo magnético (H), concentração de surfactante ($[LSS]$) e concentração de nanopartículas ($[NPM]$). Os intervalos de variação destas variáveis estão apresentados na Tabela 1, em que são apresentados o limite inferior (-1), o limite superior (+1) e o ponto central (0).

Tabela 1 - [Planejamento NPM] Definição das variáveis de entrada com seus respectivos limites.

| Variável | Descrição | -1 | 0 | +1 |
|----------|--------------------------|------|------|------|
| I | Frequência (kHz) | 102 | - | 307 |
| II | Campo ($kA.m^{-1}$) | 10,5 | 13,0 | 15,5 |
| III | $[LSS]$ ($mol.L^{-1}$) | 0,1 | 0,3 | 0,5 |
| IV | $[NPM]$ ($mg.mL^{-1}$) | 4,00 | 6,67 | 9,33 |

O planejamento experimental realizado contou com um montante de 22 experimentos, sendo 16 medidas principais (planejamento 2^4), com adicional de 6 medidas referentes às réplicas no ponto central (3 réplicas para cada possibilidade de frequência permitida no equipamento). Por experimento, entende-se a quantificação da taxa de liberação de calor das amostras por intermédio do equipamento de hipertermia

nanoScale Biomagnetic DMI00 Series, especificado na Seção 3.5.8. Os dados resultantes foram convertidos na variável de saída SLP (definido na Seção 2.4.4).

3.2. Miniemulsão inversa do PAA

Na literatura não são encontradas metodologias consolidadas para a obtenção de nanopartículas de poli(ácido acrílico). Metodologias mais próximas da desejada são polimerizações por suspensão ou emulsão, que resultam em partículas que apresentam tamanhos que variam na faixa de nanômetros até micrômetros (CUI et al., 2012; KRIWET; WALTER; KISSEL, 1998; MOLNAR et al., 2009). Portanto, para obter partículas de PAA com ordem de grandeza nanométrica, foi desenvolvida uma metodologia de polimerização por miniemulsão inversa, com base no trabalho de Pinto et al. (2012).

3.2.1. Materiais

A unidade experimental utilizada para a síntese das partículas poliméricas de poli(ácido acrílico), bem como das partículas magnéticas encapsuladas em PAA, está ilustrada na Figura 14. A estrutura da unidade é detalhada a seguir:

1. Banho termostático (aquecimento e resfriamento) para controle da temperatura ao longo da reação.
2. Reator de vidro borossilicato encamisado, com capacidade de 500 ml. A tampa do reator apresenta quatro bocas, sendo a boca central utilizada para inserir o agitador mecânico e uma boca lateral utilizada para inserir os reagentes.
3. Suporte universal com garra, para sustentar e alinhar o sistema reator-agitador.
4. Agitador mecânico com haste e impelidor revestidos com teflon, sendo o impelidor composto por uma pá unificada disposta verticalmente.

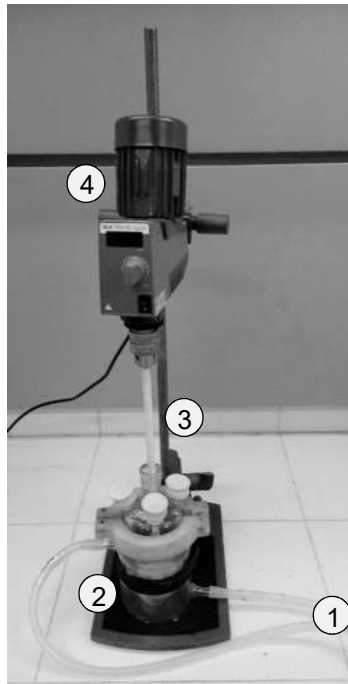


Figura 14 - Unidade experimental utilizada para a síntese de partículas poliméricas de PAA.

Os reagentes utilizados nesta etapa do trabalho foram empregados sem qualquer processo de purificação e estão especificados a seguir:

1. Ácido acrílico (AA) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA e pureza mínima de 99 %.
2. Persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA.
3. Dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) fornecido pela Sigma-Aldrich (Brasil) com pureza mínima de 98 %.
4. Óleo vegetal de soja da marca Liza[®] (Brasil) com pureza comercial em grau alimentício.
5. Monooleato de sorbitan (Span 80[®]) fornecido pela Sigma-Aldrich (Brasil) com grau PA.
6. Lauril sulfato de sódio fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA e teor máximo de água de 10% p/p.

7. Citrato de sódio fornecido pela Schering AG (Alemanha) com grau PA.
8. Água ultrapura obtida por sistema de purificação de água Milli-Q®.

3.2.2. Metodologia

a) Obtenção de partículas de PAA

As proporções mássicas dos reagentes utilizados na polimerização por miniemulsão inversa, para obtenção de partículas de PAA, estão dispostas na Tabela 4, assim como a especificação da função de cada componente no sistema reacional.

Tabela 2 - Proporções mássicas de reagentes empregados na polimerização de AA por miniemulsão inversa.

| Fase | Componente | Função | Teor (% p/p) |
|---------------------------------|--|------------------------|---------------------|
| Reacional (20,0 %) | AA | Monômero | 30,0 |
| | EGDMA | Reticulante | 15,0 |
| | K ₂ S ₂ O ₈ | Iniciador | 1,0 |
| | Água | Solvente/Estabilizante | 54,0 |
| Dispersante (80,0 %) | Óleo vegetal | Meio contínuo | 97,0 |
| | Span 80 | Surfactante | 3,0 |

As fases foram preparadas separadamente e depois misturadas. A fase reacional compunha 20,0 % da massa total do sistema reacional e foi preparada pela mistura do monômero (AA) e reticulante (EGDMA) em água, resultando em uma mistura turva, dado o caráter oleoso do reticulante e a solubilidade parcial do monômero em água. Uma pequena porção de água foi reservada para preparo, em separado, de uma solução saturada do iniciador. A fase dispersante compunha 80,0 % da massa total do sistema reacional e seu preparo consistiu da mistura do surfactante Span 80 com o óleo vegetal. A fase reacional, já contendo o iniciador, foi vertida sobre a fase dispersante e a mistura foi homogeneizada com bastão de vidro, resultando em um sistema emulsionado. Posteriormente, este sistema foi submetido a fortes tenções de cisalhamento, por ação de

sonda de ultrassom (Branson Digital Sonifier[®], modelo 450) operando por 10 min em 30 % de potência (correspondente a 120 W de potência em frequência constante de 20 KHz). A miniemulsão obtida foi vertida em reator encamisado (apresentado na Figura 14) com temperatura da camisa controlada em 70 °C e rotação do impelidor de 800 rpm. Após ser atingido o equilíbrio térmico, da camisa com o interior do reator, a reação foi realizada por 4 h. A reação ocorreu em sistema parcialmente aberto, de maneira que a água pudesse ser parcialmente removida do sistema ao longo da reação, favorecendo a precipitação das partículas de hidrogel.

Para entender melhor o sistema e avaliar algumas de suas condições termodinâmicas e cinéticas, reações foram realizadas com pequenas alterações, a saber: (i) adição do iniciador na primeira etapa do procedimento; (ii) diferentes temperaturas reacionais (60 a 80 °C) e (iii) emprego de diferentes teores de agente reticulante.

Completado o tempo de reação especificado, a temperatura da camisa foi reduzida para 30 °C, enquanto o sistema reacional foi mantido sob agitação, para evitar aglomeração das partículas até que fosse atingido o equilíbrio térmico. Ao final do procedimento, foram obtidas nanopartículas suspensas no meio oleoso. Por conta do interesse na aplicação destas partículas em sistema biológico, faz-se necessária uma etapa adicional de purificação para estabilizar as partículas em meio aquoso. Portanto, foi adicionada água ao meio, na proporção de 1:2, e a mistura bifásica foi mantida em repouso por aproximadamente uma semana, para garantir que as partículas poliméricas migrassem para a fase aquosa por decantação e afinidade química, uma vez que o PAA é hidrofílico. A fase oleosa foi então descartada e a fase aquosa, contendo as partículas poliméricas (caracterizadas por turvação esbranquiçada), foi transferida para funil de separação para remoção de óleo residual. A suspensão das partículas poliméricas em água não apresentou boa estabilidade, uma vez que as partículas de PAA são dotadas de propriedade adesiva que favorece a formação de aglomerados ou decantação na forma de filmes poliméricos, dependendo do grau de reticulação. Por isso, o sistema deve ser estabilizado com o emprego de surfactantes, como o lauril sulfato de sódio.

b) Encapsulamento de nanopartículas de magnetita em PAA

As nanopartículas de magnetita utilizadas foram sintetizadas por coprecipitação, como descrito na Seção 3.1.2, tendo sido o pH final do meio reacional ajustado para 11 e o material armazenado em solução aquosa em pH neutro. As amostras de NPM foram centrifugadas, para remover o excesso de solventes, sendo ressuspensas em solução de lauril sulfato de sódio (3,0 % p/p) ou citrato de sódio (0,3 % p/p), com teor mássico de 1,0 % de material magnético em solução. A suspensão preparada em LSS foi dispersa com o auxílio de ultrassom (Branson Digital Sonifier®, modelo 450), operando por 10 min em 30 % de potência, enquanto a suspensão preparada em solução de citrato foi homogeneizada por agitação vigorosa, em tubo Falcon de 15,0 mL, seguida de agitação constante a 45 rpm por 4 h. Ambas as suspensões foram previamente filtradas em membrana de 0,25 µm, para garantir a retenção de grandes aglomerados. As nanopartículas de magnetita, dispersas nas respectivas soluções de surfactantes, foram utilizadas no sistema de polimerização, substituindo o teor de água.

Toda metodologia empregada para a obtenção de partículas poliméricas de PAA (descritas na Seção 3.2.2-a) foi repetida, apenas com a diferença de que as nanopartículas de magnetita estabilizadas em soluções de surfactantes também passaram a compor a fase reacional, ou seja, a água adicionada ao sistema reacional foi substituída pela suspensão de nanopartículas magnéticas em solução aquosa de surfactante.

3.2.3. Planejamento experimental

Como a metodologia de polimerização do ácido acrílico reticulado por EGDMA foi desenvolvida no presente trabalho, faz-se necessário um estudo mais aprofundado sobre como algumas variáveis do processo afetam a obtenção das partículas poliméricas. Por isso, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo a dois níveis (2^3) com réplicas no ponto central, considerando as seguintes variáveis de entrada: temperatura da reação (T), carga de monômero (% AA) e carga de reticulante (% EGDMA).

Visando propor um plano experimental que proporcionasse resultados com maior conteúdo de informações relevantes, foi realizado um estudo exploratório prévio. Neste estudo, foi avaliada a influência da adição do iniciador na etapa de pré emulsão ou pós

equilíbrio térmico, bem como o efeito da temperatura de reação, sobre o rendimento da polimerização por miniemulsão inversa. Tais procedimentos foram realizados em concordância com a metodologia descrita na Seção 3.2.2-a. Também foi avaliado o efeito de inchamento do polímero, associado ao teor de reticulante empregado. Neste caso, foram realizadas reações de polimerização em solução, por razões de simplificação, uma vez que a reação ocorre em uma única fase, sem necessidade de etapa adicional de purificação. As reações de polimerização em solução foram realizadas em bécheres, submetidos a banho de aquecimento a 70 °C, em sistema parcialmente fechado por intermédio de vidro de relógio. Foi fixado o teor de monômero (AA) em 30,0 % p/p e de iniciador (K₂S₂O₈) em 1 % p/p, enquanto o teor de reticulante (EGDMA) foi variado, sendo compensado pela quantidade de água utilizada. As reações ocorreram em um período de 2h, resultando em blocos de polímero macios, que foram triturados em pedaços menores, secos em estufa a 90 °C e posteriormente macerados em gral com o auxílio de nitrogênio líquido (torna o polímero quebradiço, pois resfria o material em temperatura muito inferiores à Tg), para garantir uma distribuição granulométrica mais uniforme entre as amostras. Por fim, foram realizados ensaios de inchamento em água dos polímeros obtidos com diferentes teores de reticulante, permitindo determinar o teor de água absorvido pelo polímero hidrogel e avaliar a possibilidade de solubilização do material pouco reticulado.

A partir dos estudos exploratórios, foram determinados os intervalos de variação das variáveis de entrada, apresentados na Tabela 3, como limite inferior (-1), limite superior (+1) e ponto central (0).

Tabela 3 - [Planejamento NPP] Definição das variáveis de entrada com seus respectivos limites.

| Variável | Descrição | Unidade | -1 | 0 | 1 |
|-----------------|------------------|----------------|-----------|----------|----------|
| I | Temperatura | °C | 65 | 70 | 75 |
| II | Carga de AA | % p/p | 30 | 40 | 50 |
| III | Carga de EGDMA | % p/p | 2 | 5 | 8 |

O planejamento experimental realizado contou com um montante de 11 reações de polimerização por miniemulsão inversa, adaptando a metodologia descrita na Seção 3.2.2 - a às especificações das variáveis impostas pelo desenho de experimentos e fixando

o tempo de reação em 2 h. O total de reações contempla 8 reações principais (planejamento 2³) com adicional de 3 réplicas no ponto central. As variáveis de saída foram obtidas por intermédio de caracterizações dos materiais poliméricos quanto ao rendimento da reação, análise termogravimétrica e comportamento reológico, conforme protocolo e especificações descritos na Seção 3.5. O ensaio de reologia, além de dados de viscosidade, gerou em paralelo dados de inchamento e solubilidade das partículas poliméricas em água.

3.3. Miniemulsão direta do PMMA

O grupo de pesquisa apresenta ampla experiência na obtenção de partículas poliméricas de PMMA por miniemulsão, muitas vezes associado ao encapsulamento de ativos (FONSECA et al., 2013; LORCA et al., 2012; PAIVA, 2015). Por isso, a metodologia abordada nesta seção está baseada no trabalho de Peixoto (2013), para a obtenção das partículas poliméricas. O encapsulamento de nanopartículas magnéticas atende a procedimento semelhante, salvo adaptações baseadas no trabalho de Feuser et al. (2015), que serão detalhadas ao longo da seção.

3.3.1. Materiais

As sínteses das partículas poliméricas de poli(metacrilato de metila), bem como das partículas magnéticas encapsuladas em PMMA, foram realizadas em mini-reator de vidro borossilicato Mettler Toledo, modelo EasyMax 102, com capacidade volumétrica de 100 mL, encamisado, com controle automático de temperatura, equipado com termopar, agitador e condensador. A Figura 15 ilustra a referida unidade experimental empregada.



Figura 15 - Mini-reator Mettler Toledo, modelo EasyMax 102, utilizado nas sínteses de partículas poliméricas de PMMA. Adaptado de (METTLER, 2016).

Os reagentes utilizados nesta etapa do trabalho, foram empregados sem qualquer processo de purificação, como especificado a seguir:

1. Metacrilato de metila (MMA) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA e pureza mínima de 99 %.
2. Hexadecano (Cetano) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA e pureza mínima de 99 %.
3. Persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA.
4. Lauril sulfato de sódio (LSS) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA e teor máximo de 10% p/p de água.
5. Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA.
6. Ácido oleico (AO) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA.
7. Água ultrapura obtida por sistema de purificação de água Milli-Q[®].

3.3.2. Metodologia

a) Obtenção de partículas de PMMA

As proporções mássicas dos reagentes utilizados na polimerização por miniemulsão direta, para obtenção de partículas de PMMA, estão dispostas na Tabela 4, assim como a especificação da função de cada componente no sistema reacional.

Tabela 4 - Proporções mássicas de reagentes empregados na polimerização de MMA por miniemulsão direta.

| Fase | Componente | Função | Teor (% p/p) |
|---------------------------------|--|------------------------|--------------|
| Reacional (17,5 %) | MMA | Monômero | 99,5 |
| | Cetano | Coestabilizante | 0,5 |
| Dispersante (82,5 %) | LSS | Surfactante | 1,2 |
| | NaHCO ₃ | Agente tamponante | 0,1 |
| | K ₂ S ₂ O ₈ | Iniciador | 0,1 |
| | Água | Meio contínuo/Solvente | 98,6 |

As fases foram preparadas separadamente e depois misturadas. A fase reacional compunha 17,5 % da massa total do sistema reacional e foi preparada pela mistura do monômero MMA com o coestabilizante hexadecano. A fase dispersante compunha 82,5 % da massa total do sistema reacional e seu preparo consistiu da solubilização prévia do surfactante e do agente tamponante em água, sob discreto aquecimento para favorecer a solubilização dos sais. Uma pequena porção de água foi reservada para preparo, em separado, de uma solução saturada do iniciador. A fase reacional foi vertida sobre a fase dispersante e a mistura foi homogeneizada com bastão de vidro, resultando em um sistema emulsionado. Posteriormente, este sistema foi submetido a fortes tensões de cisalhamento, por ação de sonda de ultrassom (Branson Digital Sonifier[®], modelo 450) operando por 5 min em 30 % de potência (correspondente a 120 W de potência em frequência constante de 20 KHz). A miniemulsão obtida foi vertida em minirreator (Figura 15) com temperatura da camisa controlada em 80 °C e rotação do impelidor de 500 rpm. Após ser atingido o equilíbrio térmico, da camisa com o interior do reator, a

solução de iniciador foi adicionada e a reação foi realizada por 2 h. A reação ocorreu em sistema fechado, tendo um condensador acoplado ao reator e resfriado a 10 °C, para evitar as perdas de monômero ao longo da reação. Vale destacar que o iniciador foi adicionado apenas na última etapa, para evitar que a reação se iniciasse na etapa anterior. Finalizada a reação, foi obtido um látex estável que foi armazenado em frasco fechado sem qualquer purificação adicional, tendo em vista que tal reação resulta na conversão de cerca de 100 % do monômero já nos primeiros 30 min de reação.

b) Encapsulamento de nanopartículas de magnetita em PMMA

As nanopartículas de magnetita utilizadas foram sintetizadas por coprecipitação, como descrito na Seção 3.1.2, tendo sido o pH final do meio reacional ajustado para 11 e o material armazenado em solução aquosa em pH neutro. Foi pesada uma alíquota desta amostra correspondente a 1 % p/p da quantidade de monômero utilizado na etapa de polimerização. Esta alíquota foi centrifugada para remover o excesso de água, sendo posteriormente ressuspendidas em ácido oleico. A suspensão foi homogeneizada por agitação vigorosa em tubo Falcon de 15,0 mL, seguida de agitação constante a 45 rpm por 4 h. Após este período, a amostra foi centrifugada e o excesso de ácido oleico foi removido. As nanopartículas de magnetita, então recobertas em ácido oleico, foram ressuspendidas em metacrilato de metila, para adição no sistema de polimerização.

Toda a metodologia empregada para obtenção de partículas poliméricas de PMMA (descritas na Seção 3.3.2-a) foi repetida, apenas com a diferença de que as nanopartículas de magnetita recobertas em ácido oleico passaram a compor a fase reacional.

3.4. Bioconjugação com ácido fólico

Partículas poliméricas de PAA foram funcionalizadas com moléculas de ácido fólico por processo de bioconjugação intermediada por carbodiimida, baseado no protocolo apresentado por Hermanson (2013b).

3.4.1. Materiais

A metodologia empregada é relativamente simples e não demanda a utilização de uma unidade experimental elaborada, como as empregadas nos procedimentos de síntese descritos anteriormente. Os reagentes utilizados nesta etapa do trabalho foram empregados sem qualquer processo de purificação, como especificado a seguir:

1. Fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA e teor mínimo de 99 %.
2. Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA e teor mínimo de 99 %.
3. Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) fornecido pela Sigma-Aldrich (Brasil) com pureza superior a 99 %.
4. Ácido fólico (AF) fornecido pela Sigma-Aldrich (Brasil) com pureza superior a 97 %.
5. Hidróxido de sódio (NaOH) fornecido pela Vetec Química Fina (Brasil) com grau PA.

3.4.2. Metodologia

O procedimento de bioconjugação foi aplicado a partículas de PAA previamente secas ao ar e posteriormente maceradas, resultando em um material em pó finamente dividido. Vale ressaltar que não se faz necessária a secagem do material. Este procedimento foi realizado apenas para facilitar a determinação da massa de partículas poliméricas com maior precisão.

Inicialmente foi preparada solução tampão fosfato (0,05 M e pH 6,8) para utilização em diferentes etapas do procedimento. Paralelamente, foi preparada solução da carbodiimida (EDC) em tampão fosfato, na concentração de $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Em um tubo Falcon de 15,0 mL foram pesados 100 mg de partículas poliméricas, que foram ressuspensas em 5,0 mL de tampão fosfato. Após homogeneização, por agitação, foram adicionadas ao tubo 5,0 mL da solução de EDC ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). O tubo foi então submetido à agitação mecânica (20 rpm) por 1 h, para garantir a ativação dos grupos carboxílicos expostos na superfície da partícula de PAA. Decorrido o referido período, a

suspensão foi filtrada em membrana Amicon (100 KDa), sob centrifugação (Thermo Scientific, rotor Fiberlite F15-6x100y), a 6000 rpm, por 10 min, para remover o excesso de EDC e interromper a etapa de ativação. O sólido foi ressuscitado em 5,0 mL de tampão fosfato e transferido para um tubo Falcon de 15,0 mL, onde foram previamente pesados 50 mg de ácido fólico. O tubo foi homogeneizado sob agitação vigorosa e submetido à agitação mecânica (20 rpm) por 2 h, para promover a reação entre a amina primária do ácido fólico e a carboxila, ativada por carbodiimida, da matriz polimérica. Após o tempo de reação, a suspensão foi novamente filtrada em membrana Amicon (100 kDa), sob centrifugação, a 6000 rpm, por 10 min. Para garantir a ausência de moléculas de ácido fólico aderidas à superfície polimérica por interações puramente físicas, a amostra foi lavada diversas vezes com 5,0 mL de tampão fosfato e três vezes com 5,0 mL de solução de NaOH (em pH 10), repetindo o procedimento de ressuspensão e centrifugação em membrana Amicon. No decorrer das lavagens foram feitas amostragens do sólido para caracterizações por FTIR e alíquotas do filtrado foram reservadas para avaliação da presença de ácido fólico residual no lixiviado. O sólido final foi ressuscitado em 3,0 mL de água.

Também foram realizados ensaios em branco, sem a etapa de ativação com a carbodiimida. Estes ensaios consistiram apenas da etapa reacional de mistura do ácido fólico com as partículas poliméricas de PAA, em tampão fosfato ou em água. Os procedimentos de lavagem foram realizados tal como na amostra principal.

3.5. Caracterizações e especificações de equipamentos

3.5.1. Análise termogravimétrica (TGA)

Análises de perdas de massa sob aquecimento foram realizadas em equipamento Perkin Elmer, modelo STA 6000, do Laboratório de Engenharia de Polímeros da UFRJ (EngePol). As análises foram conduzidas em atmosfera inerte, com fluxo constante de nitrogênio a 20 mL.min⁻¹ e taxa de aquecimento constante a 10 °C.min⁻¹.

3.5.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A determinação de temperaturas características das transições térmicas das partículas poliméricas foram feitas em equipamento Perkin Elmer, modelo DSC 8500, do Laboratório de Engenharia de Polímeros da UFRJ (EngePol). Os termogramas foram obtidos no segundo ciclo de aquecimento/resfriamento, empregando taxa de aquecimento/resfriamento constante de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ sob atmosfera de nitrogênio. O primeiro ciclo teve como objetivo a padronização da história térmica das amostras.

3.5.3. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Distribuições de massas molares de partículas poliméricas foram obtidas em cromatógrafo Viscotek, modelo GPC Max VE2001, do Laboratório de Engenharia de Polímeros da UFRJ (EngePol), com coluna linear KF-804L e KF-805L, fornecidas pela Shodex, com tamanho máximo de poro de $1,5\cdot 10^3\text{ \AA}$ e $5\cdot 10^3\text{ \AA}$ e detector refratométrico Viscotek, modelo VE3580, operando a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. A fase móvel utilizada foi o solvente tetrahidrofurano (THF). Apenas as partículas poliméricas de PMMA foram caracterizadas por esta técnica, uma vez que é necessário que o polímero seja solúvel na fase móvel. As partículas de PAA produzidas não solubilizam no solvente, uma vez que apresentam certo grau de reticulação. Por este motivo, as partículas de PAA não foram caracterizadas quanto à distribuição de massas molares.

3.5.4. Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X foram obtidos em difratômetro de pó Bruker D8 Advanced, do Laboratório Multiusuário de Difração de Raios X da UFF (LdrX-UFF). Foi utilizada fonte de radiação $\text{Cu K}\alpha$, fenda de 0,6 mm e filtro PSD-Ni, para realizar medidas com passo de $0,05^{\circ}$ e tempo de leitura por ponto de 0,2s. Vale destacar que as amostras de magnetita fluorescem sob ação de raios X. O efeito da fluorescência pode ser amenizado por condições do equipamento e de operação, bem como ajustes de linha de base pós medida.

3.5.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos no modo de transmissão em espectrômetro Thermo Electron Corporation, modelo Nicolet 6700, do Laboratório de Engenharia de Polímeros da UFRJ (EngePol). Os espectros foram registrados no intervalo de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e 64 varreduras por análise, utilizando geometria ATR.

3.5.6. Espectroscopia na região de ultravioleta e visível (UV-vis)

Os espectros de UV-vis foram obtidos em espectrômetro Thermo Scientific, modelo Multiskan GO, do Laboratório de Engenharia de Polímeros da UFRJ (EngePol). Os espectros foram registrados no intervalo de 200-600 nm, com passo de 1 nm. As amostras, previamente filtradas em membranas de 0,45 μm , foram dispostas em microplaca de poliestireno com poços de fundo chato.

3.5.7. Hipertermia magnética

Medidas de hipertermia magnética foram realizadas em equipamento nanoScale Biomagnetic, modelo DM100 Series, do Laboratório de Magnetometria da Infraestrutura de Pesquisa Multiusuária para Materiais Avançados do CBPF (MAG-MATMULT). O equipamento opera em sistema fechado, sob vácuo, com sistema de refrigeração acoplado a bobina e controle de temperatura monitorado por termopar. O equipamento pode operar em duas frequências fixas (102 ou 307 KHz) e em intensidade de campo magnético variável, na faixa de 0 a 16 KA/m. As amostras foram analisadas em meio aquoso em concentrações especificadas nas medidas.

3.5.8. Medida de magnetização

Medidas de magnetização de saturação (σ) foram realizadas em magnetômetro MPMS (*Magnetic Property Measurement System*) da Quantum Design, do Laboratório de Magnetometria da Infraestrutura de pesquisa multiusuária para Materiais Avançados do CBPF (MAG-MATMULT). As medidas foram realizadas sob campo variável de 50000 a -50000 Oe, em temperaturas fixas entre 5 k e 300 K.

3.5.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As imagens por transmissão foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução JEOL 2100F 200kV, do Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia do CBPF (LABNANO). Este equipamento possui fonte de elétrons de emissão por campo (FEG), câmara CCD (11 Mpixel GATAN Orius Camera), sistema de espectroscopia de perda de energia de elétrons (EELS-GIF Tridium GATAN), sistema de espectroscopia por dispersão de energia de raios-X (EDS) Noran Seven, sistema de mapeamento de nanodifração com precessão NANOMEGAS Digistar e possibilidade de operação em modo de microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM). As amostras foram diluídas em água ultrapura e dispersas em grades de cobre recobertas com carbono e resina polimérica.

3.5.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens por varredura foram obtidas nos microscópios eletrônicos de varredura JSM 6460LV-JEOL e VEGA 3LMU-TESCAN, do Núcleo Multiusuário de Microscopia da COPPE/UFRJ. As amostras secas, previamente maceradas, foram dispersas em porta amostras e metalizadas com ouro.

3.5.11. Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico

O potencial zeta (ξ) e o diâmetro hidrodinâmico (ϕ_H) de partículas foi determinado em Zeta Sizer da Malvern Instruments, Nano series, modelo Nano-ZS, do Grupo de Fluidos e Materiais Poliméricos Multifásicos localizado no Polo de Xistoquímica da UFRJ. Para realizar as análises, as amostras foram centrifugadas, para remoção do sobrenadante, e ressuspensas em água ultrapura.

3.5.12. Reologia

Medidas de viscosidade foram realizadas em reômetro da TA Instruments, modelo DHR, do Laboratório de Engenharia de Colóides da UFRJ (EngeCol). Foi utilizada a geometria de cilindros concêntricos de duplo *gap* e as medições foram realizadas a 25 °C, por 300 s, empregando taxa de cisalhamento de 10 s⁻¹ e 40 pontos por deca. Medidas de viscosidade foram realizadas apenas nos sistemas de partículas de PAA ressuspensas em água, referentes ao planejamento experimental descrito na Seção 3.2.3. Para realizar as medidas de maneira comparativa, as amostras de polímero foram secas até peso constante. Em tubos Falcon de 50,0 mL foram dispostas 0,4 g de cada amostra junto a 15,0 g de água. Os tubos foram submetidos a 60 rpm de agitação por 5 dias, favorecendo o inchamento e possível solubilidade das partículas hidrogéis. Foram realizadas medidas de viscosidade da solução sobrenadante, após remoção das partículas por centrifugação a 800 rpm, em três ciclos de 10 min.

3.5.13. Rendimento da reação

Foram realizadas análises de rendimento das reações de polimerização, especificamente para as reações de obtenção de partículas de PAA. Para tal, foram coletadas alíquotas ao longo da reação. Estas alíquotas, de aproximadamente 3 mL, foram dispostas em recipientes de vidro contendo 10 gotas de solução aquosa de hidroquinona com teor de 1 % p/p. Vale destacar que não é necessária a precisão volumétrica das medidas, uma vez que o sistema foi pesado em cada etapa.

As amostras foram colocadas em estufa sob vácuo com aquecimento inicial de 70 °C, que foi elevado gradativamente a 90 °C, para garantir a remoção dos voláteis sem que houvesse perdas de massa por projeção da amostra para fora dos recipientes. As amostras foram mantidas em estufa até apresentarem massas constantes. Ciente da proporção mássica dos reagentes ao início da reação, sabendo que a fase oleosa não volatiliza na temperatura final e admitindo que as espécies voláteis são completamente removidas quando o sistema apresenta massa constante, foi realizado um balanço de massa para determinar o teor de monômeros (incluindo o reticulante) que foi convertido a polímero.

3.6. Análise Estatística

As análises estatísticas e desenvolvimento de modelos empíricos correspondentes aos planejamentos experimentais descritos nas Seções 3.1.3 e 3.2.3 foram realizadas com auxílio do software Statistica, versão 7.0, desenvolvido pela Stat Soft Inc.

A análise estatística dos dados foi efetuada admitindo-se uma distribuição normal de probabilidades com um intervalo de confiança de 95%. Como os planejamentos experimentais contam com repetições de experimentos apenas nos pontos centrais, os erros foram avaliados nestes pontos e considerados constantes na região experimental.

A função objetivo para estimação de parâmetros (Equação 5) foi definida com base no método de mínimos quadrados, admitindo as hipóteses de modelo perfeito e experimento bem feito. Portanto, foi admitindo que os erros do sistema seguem a distribuição normal, que medidas experimentais não estão correlacionadas, que as variáveis independentes são isentas de erros e ainda que todos os erros das variáveis dependentes são iguais e independentes (SCHWAAB; PINTO, 2007, 2011).

$$F_{\text{obj}} = \sum_{i=1}^{\text{NE}} (y_i^e - y_i^c)^2 \quad \text{Equação 5}$$

sendo y^e o valor experimental disponível e y^c o valor calculado pelo modelo quantitativo.

O procedimento de estimação de parâmetros foi realizado adotando-se o método de Hooke-Jeeves e Quasi-Newton para minimização da função objetivo, perturbação relativa de 10^{-13} para cálculo de derivadas, número máximo de 100 iterações e 10^{-7} como critério de convergência.

A definição do modelo empírico (linear nos parâmetros) se deu a partir de tentativas, levando em conta os efeitos principais e efeitos de sinergia entre as variáveis, partindo-se da expressão genérica apresentada pela Equação 6, em que a_i são os parâmetros do modelo referentes aos efeitos principais, b_{ij} são os parâmetros do modelo

referentes aos efeitos secundários, z_i e z_j são as variáveis independentes do modelo e y é a variável resposta dependente do modelo.

$$y^c = a_0 + \sum_{i=1}^{NX} a_i \cdot z_i + \sum_{i=1}^{NX-1} \cdot \sum_{j=i+1}^{NX} b_{ij} \cdot z_i \cdot z_j$$

Equação 6

Os modelos finais obtidos levam em consideração apenas os parâmetros significativos (significância mínima de 0,95) e coeficientes de correlação próximos à unidade, sendo capazes de descrever o sistema de forma satisfatória com o menor número possível de parâmetros e permitindo a condução de análises estatísticas significativas.

Capítulo IV

Resultados e Discussões

“Se você não está sendo chamado de louco,
provavelmente não está pensando grande o
suficiente.”

Linda Rottenberg

O presente capítulo reúne caracterizações dos materiais obtidos por meio das metodologias detalhadas no capítulo anterior. Com o intuito de tornar o entendimento mais claro e permitir discussões específicas, o capítulo foi dividido em quatro seções chave. A primeira seção aborda discussões referentes às nanopartículas magnéticas de magnetita obtidas por coprecipitação, sendo analisadas condições reacionais, estabilidade das partículas em meio aquoso sob influência de surfactantes, além de avaliadas propriedades magnéticas do material, com destaque para a hipertermia. A segunda seção apresenta as partículas poliméricas com dimensões submicrométricas obtidas por miniemulsão inversa, no caso das partículas de PAA, e direta, no caso das partículas de PMMA. Nesta seção, é discutida a influência de variáveis sobre o processo de obtenção das partículas poliméricas, principalmente de PAA, e são comparadas a morfologia e estabilidade entre as partículas obtidas por ambos os processos de polimerização. O encapsulamento das nanopartículas superparamagnéticas nas partículas poliméricas acrílicas (NPM@NPP*) é discutido na terceira seção, em que são confrontadas morfologia, tamanho, estabilidade em solução aquosa e efeitos de hipertermia das partículas híbridas obtidas pelos procedimentos de encapsulamento por miniemulsão

* Será utilizado o grafo @ para referenciar o encapsulamento de nanopartícula magnética em nanopartícula polimérica, na forma NPM@NPP e suas variações.

inversa e direta. Na quarta seção é estudada a bioconjugação do ácido fólico ao PAA à luz do incremento de potencialidade à partícula polimérica para aplicações biológicas sítio dirigidas. A inter-relação entre as seções anteriores evidencia o potencial de desenvolvimento de sistemas particulados híbridos em escala nanométrica para aplicações médicas.

4.1. Nanopartículas magnéticas (NPM)

4.1.1. Estrutura, morfologia e tamanho de partículas

Nanopartículas de magnetita foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, adotando três diferentes valores de pH para o ajuste final das condições de síntese (a saber: 5, 8 e 11). Medidas de difração de raios X destas amostras foram realizadas com o intuito de avaliar o efeito do pH final sobre o processo de obtenção da partícula magnética. Os difratogramas das respectivas amostras estão confrontados na Figura 16, normalizados pelo pico de maior intensidade, sendo possível perceber o aumento da cristalinidade do material com o aumento de pH da condição reacional. Por maior cristalinidade entende-se picos mais intensos e bem definidos, além de redução de ruído nas medidas.

O material obtido em meio menos alcalino (pH 5), além de ser constituído por partículas com menor definição cristalina, apresentou indícios de resíduos de sal de amônio (identificado no referido difratograma). A presença do subproduto reacional se justifica pela ineficiência na purificação desta amostra, uma vez que as lavagens foram realizadas com controle do pH do sobrenadante até neutralidade, correspondente à água ultrapura, que é muito próximo do pH em destaque.

A cinética de formação de magnetita por coprecipitação, bem como as propriedades magnéticas do material obtido, é dependente de uma série de aspectos, como valor de pH do meio reacional, concentração dos precursores reacionais, natureza do agente precipitante e temperatura da síntese. Segundo Gribanov et al. (1990), a faixa de pH ideal para precipitação de magnetita está entre 8,5 e 10, região relacionada à formação

de tampão de amônia com os sais de ferro hidrolisados. Tal observação justifica os resultados mais satisfatórios obtidos com o emprego de condições mais alcalinas.

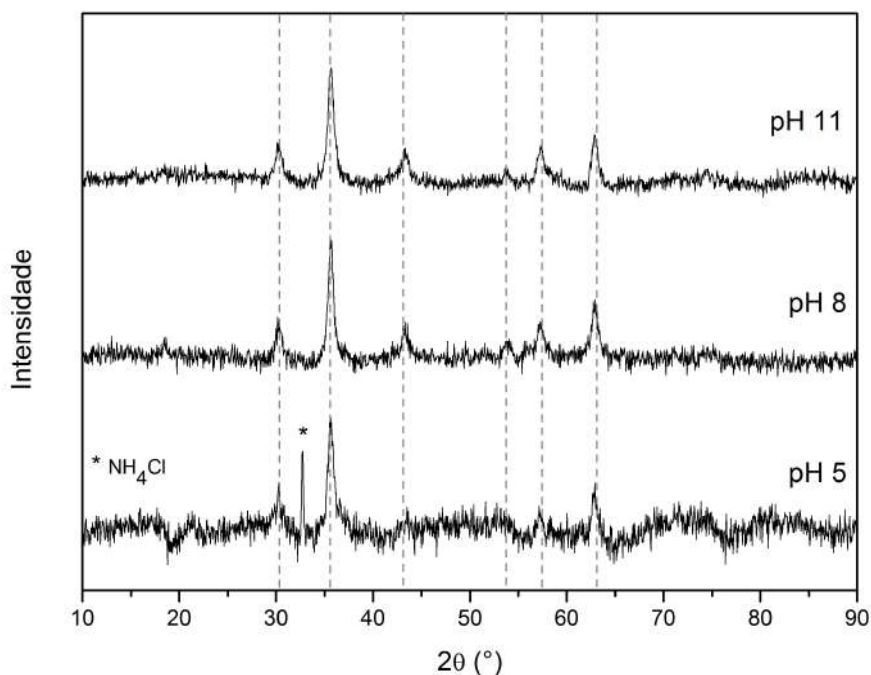


Figura 16 - Difratoogramas de amostras de nanopartículas de óxido de ferro obtidas em diferentes condições de pH.

Os diâmetros médios dos cristalitos foram estimados pela equação de Scherrer (Equação 7), em que L_c é o diâmetro médio do cristalito calculado em referência ao pico de maior intensidade identificado pelos correspondentes índices de Miller, k é uma constante de proporcionalidade (foi admitida a ocorrência de partículas esféricas e simetria cúbica, adotando assim $k = 0,94$), λ é o comprimento de onda da radiação (0,1542 nm para Cu $K\alpha$), θ é o ângulo de difração e β é a largura à meia altura do pico analisado (calculado por aproximação do pico por uma Gaussiana). A dimensão estimada para os cristalitos (Tabela 5) sugere uma boa aproximação para o diâmetro médio das partículas obtidas.

$$L_c = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos(\theta)} \quad \text{Equação 7}$$

Tabela 5 - Diâmetro médio de cristalitos estimados pela equação de Scherrer, apresentados com os respectivos parâmetros de cálculo.

| pH | 2θ (°) | β (°) | D₃₁₁ (nm) |
|-----------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 5 | 35,54 | 0,82 | 11 |
| 8 | 35,59 | 0,69 | 13 |
| 11 | 35,69 | 0,72 | 12 |

Não foi observada correlação do pH do meio reacional com o tamanho do cristalito, até porque muitos fatores influenciam fortemente no tamanho da partícula e nem todos foram controlados com a devida precisão para ser feita uma afirmação desta natureza. Todavia, foi confirmado que condições mais alcalinas contribuem com a cristalinidade do material.

Frente aos resultados apresentados, as nanopartículas magnéticas obtidas em pH 11 foram adotadas nos subseqüentes ensaios de encapsulamento em matrizes poliméricas. Portanto, tais partículas foram caracterizadas com maior detalhamento, como discutido no decorrer desta seção.

A Figura 17 apresenta o padrão de difração do material magnético obtido em pH 11. O difratograma apresenta os picos característicos da magnetita, que foram identificados pelos correspondentes índices de Miller. No entanto, vale ressaltar que a magnetita e a maghemita possuem estruturas cristalográficas muito semelhantes e, portanto, podem apresentar picos sobrepostos em seus padrões de difração. No Apêndice A é feita uma análise mais detalhada do difratograma em questão, com auxílio de parâmetros obtidos em base de dados cristalográficos. Nesta análise, o padrão de difração da amostra é confrontado com padrões de difração calculados com base no arranjo cristalino da magnetita e maghemita. Foi observado que os picos principais do difratograma analisado podem apresentar contribuições de ambos óxidos de ferro. Portanto, a caracterização do material por difração de raios X não garante de forma inequívoca a pureza do material. Entretanto, é notório que a fase de magnetita contribui majoritariamente com a composição do material, tendo em vista a coloração negra do material. A exposição do material ao ar tende a enriquecer o teor de maghemita, o que é percebido pelo fato da amostra adquirir coloração ocre, característica da espécie oxidada.

Sendo assim, as amostras empregadas nas metodologias de encapsulamento foram armazenadas em soluções aquosas, amenizando o polimorfismo induzido por condições oxidativas.

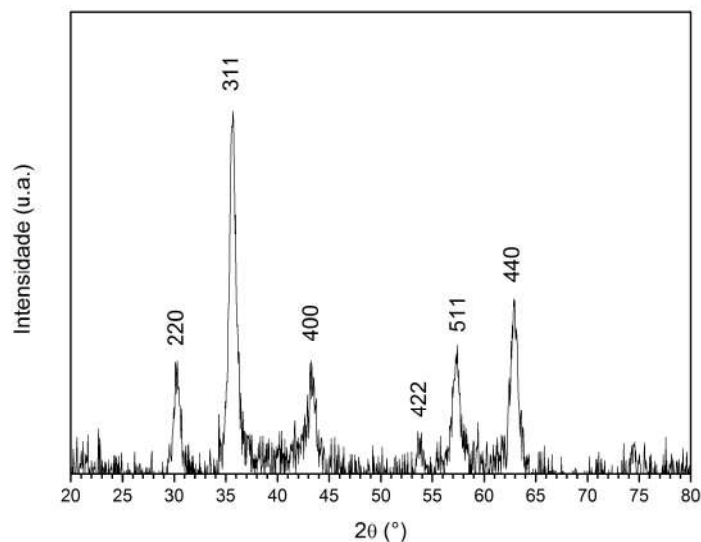


Figura 17 - DRX de amostra de partículas magnéticas sintetizada por coprecipitação em pH 11, com identificação dos picos correspondentes à magnetita.

A morfologia das partículas magnéticas pôde ser melhor avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 18). A micrografia de transmissão (Figura 18 - MET de amostra de partículas magnéticas sintetizadas por coprecipitação em pH 11 (a) e correspondente distribuição de tamanho de partículas (b).- a) confirma a forma esférica das partículas e apresenta distribuição de tamanho de partículas (Figura 18 - MET de amostra de partículas magnéticas sintetizadas por coprecipitação em pH 11 (a) e correspondente distribuição de tamanho de partículas (b).- b) com diâmetro médio de 11 nm e desvio padrão de 3,5 nm. Considerando que a média aritmética é subestimada para a distribuição apresentada, foi calculada a média ponderada (12 nm) para caracterizar as partículas com maior confiabilidade. Portanto, o diâmetro da partícula calculado a partir da distribuição de tamanho de partículas por MET apresenta ordem de grandeza compatível com as estimativas previstas por difração de raios X. As partículas magnéticas organizam-se em pequenos aglomerados, arranjo favorecido pela minimização da energia superficial do sistema e potencializado pela secagem da amostra imposta pela condição da caracterização.

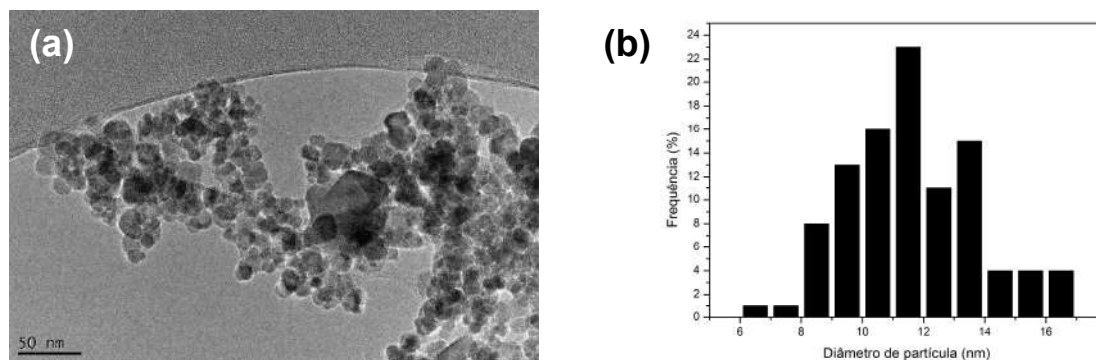


Figura 18 - MET de amostra de partículas magnéticas sintetizadas por coprecipitação em pH 11 (a) e correspondente distribuição de tamanho de partículas (b).

4.1.2. Estabilidade em solução

As nanopartículas magnéticas empregadas na metodologia de encapsulamento em PAA foram avaliadas quanto à estabilidade em solução aquosa em presença de surfactantes. As partículas foram estabilizadas em solução saturada de lauril sulfato de sódio (LSS) e em solução 0,3 % p/p de citrato de sódio (CS), com teor mássico de 1,0 % de material magnético em solução, sendo posteriormente filtradas em membrana com diâmetro de poro de 0,25 μm . Na Figura 19 pode ser observada a estabilidade destas suspensões. Vale destacar que a amostra preparada em LSS não atingiu satisfatória dispersão individual das partículas e que grande parte do material em suspensão foi retido pela membrana, resultando em sobrenadante com baixo teor de sólido (turvação discreta). Foi observado previamente que o LSS é menos efetivo que o CS para manter as partículas em suspensão, vencendo tendência à aglomeração e decantação da amostra. Por essa razão, foi adotada a solução de LSS em condição de saturação. Já a concentração da solução de CS foi determinada com base em estudo realizado por Alves (2012) que corrobora os resultados aqui apresentados.



Figura 19 - Suspensões de NPM em solução de lauril sulfato de sódio a 3,0 % p/p (esquerda) e citrato de sódio a 0,3 % p/p (direita). Amostras foram filtradas em membrana de 0,25 μm , após 2 h de agitação mecânica.

Validando a avaliação qualitativa exposta anteriormente, a estabilidade das partículas em água foi quantificada por análise de potencial zeta (Tabela 6), seguindo protocolo de medida estabelecido na Seção 3.5.11. As nanopartículas magnéticas sem estabilização prévia com surfactante (NPM pura) apresentou potencial de -16,03 mV. A exposição de átomos de ferro na superfície de nanopartículas de óxido de ferro favorece a coordenação de moléculas de água na superfície da partícula, quando em meio aquoso. Assim, a superfície da nanopartícula fica repleta de grupos hidroxilos anfóteros, dependentes da dissociação das referidas moléculas de água. Portanto, a carga superficial da partícula é dependente do pH do meio e, por conseguinte, do ponto isoelétrico, que ocorre por volta de pH 6,8 (LING; HYEON, 2013).

Tabela 6 - Potencial zeta de NPM dispersas em diferentes condições.

| Amostra | ξ (mV) |
|---|-------------------|
| NPM pura | -16,03 \pm 1,75 |
| NPM dispersa em lauril sulfato de sódio 3,0 % p/p | -0,08 \pm 0,15 |
| NPM dispersa em citrato de sódio 0,3 % p/p | -24,77 \pm 1,27 |

O potencial eletrocinético das partículas se manteve negativo quando estabilizadas pelos surfactantes. No entanto, ocorreram significativas alterações nas magnitudes das medidas. A estabilidade das partículas em solução é caracterizada por altos valores de potencial zeta (ξ), acima de 30 mV (em módulo), região de potencial em que as partículas tendem a repelir umas às outras, reduzindo a tendência de aglomeração e favorecendo a dispersão (FERREIRA, 2009). Adotando este critério de estabilidade, os valores de

potencial zeta obtidos em presença dos surfactantes está de acordo com o previsto. Como observado previamente, o LSS não estabiliza as NPM de forma efetiva, o que é confirmado pelo baixo valor de ξ . Em contrapartida, o potencial referente as NPM estabilizadas em CS apresenta ordem de grandeza condizente à região de estabilidade de sistemas particulados em suspensão.

4.1.3. Medidas de magnetização

Quando o volume de uma partícula magnética se encontra abaixo de um volume crítico, a divisão em domínios magnéticos é substituída pela configuração de monodomínio, que passa a ser energeticamente mais favorável. Nesta configuração, acima da T_B , o momento magnético da partícula é altamente influenciado por flutuações térmicas e a energia térmica é suficiente para mudar rapidamente a direção do momento magnético de cada partícula, em estado superparamagnético. A competição entre as energias térmica e magnética determina se a partícula está em estado superparamagnético ou bloqueado (CULLITY; GRAHAM, 2011). A investigação das propriedades magnéticas foi realizada por meio de medidas de magnetização como função do campo magnético aplicado ($M \times H$) e da temperatura ($M \times T$).

As amostras magnéticas sintetizadas em diferentes condições de alcalinidade apresentaram comportamento semelhantes quanto às propriedades magnéticas. Todas as amostras apresentaram valores de magnetização de saturação a 300K na faixa entre 75 e 85 emu.g^{-1} , condizente a valores reportados na literatura (WU; HE; JIANG, 2008) para nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e, como esperado, inferior ao valor massivo de 100 emu.g^{-1} . Medidas de isotermas de magnetização realizadas em função do campo magnético aplicado, em distintas temperaturas e em campo fixo em 100 Oe são apresentadas respectivamente nas Figuras Figura 20 e Figura 22, para a amostra obtida em pH 11.

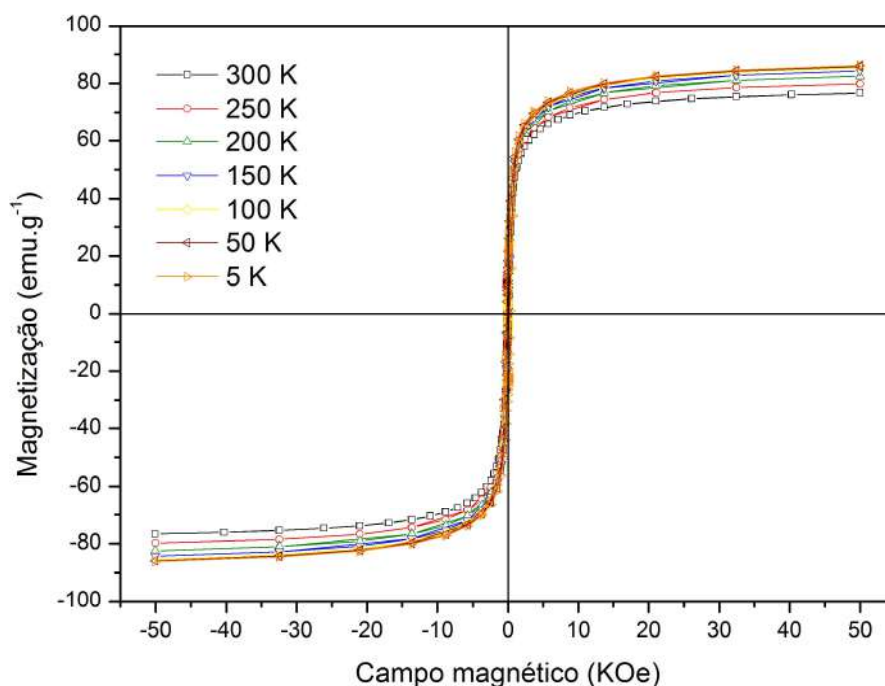


Figura 20 - Magnetização como função do campo magnético aplicado a diferentes temperaturas, para amostra de NPMs obtida em pH 11.

A coercividade e a remanência da amostra magnética diminuem com o aumento da temperatura (Figura 20), sendo a magnetização de saturação elevada de 76 emu.g⁻¹ (a 300 k) para 85 emu.g⁻¹, quando a medida é realizada a 5 K. Uma histerese discreta é observada nas curvas de magnetização (destacada na Figura 21 e detalhada na Tabela 7). Apesar da referida histerese, a presença de comportamento superparamagnético pode ser atribuído quando a razão entre magnetização residual e de saturação se encontra abaixo de 0,1. Tal valor de quadratura corresponde à perda de mais que 90 % da magnetização após remoção do campo magnético (KHANNA; VERMA, 2013). Portanto, há indícios de que o material magnético obtido apresenta comportamento superparamagnético na temperatura ambiente.

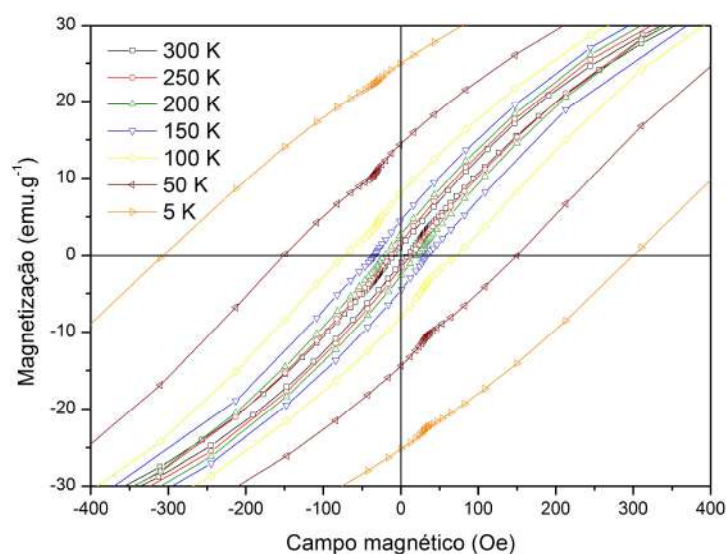


Figura 21 - Ampliação das curvas de histerese, referentes às medidas de magnetização como função do campo magnético aplicado em diferentes temperaturas, para amostra de NPMs obtidas em pH 11.

Tabela 7 – Grandezas associadas às curvas de histerese, referentes às medidas de magnetização como função do campo magnético aplicado em diferentes temperaturas, para amostra de NPMs obtidas em pH 11.

| T (K) | Hc (Oe) | Mr (emu.g ⁻¹) | Ms (emu.g ⁻¹) | Mr/Ms |
|-------|---------|---------------------------|---------------------------|-------|
| 300 | 8,7 | 1,2 | 76,0 | 0,016 |
| 250 | 13,2 | 1,8 | 78,7 | 0,023 |
| 200 | 20,7 | 2,7 | 80,1 | 0,034 |
| 150 | 33,9 | 4,6 | 82,0 | 0,056 |
| 100 | 71,4 | 7,9 | 84,0 | 0,094 |
| 50 | 150,7 | 14,5 | 84,8 | 0,171 |
| 5 | 303,2 | 25,1 | 84,8 | 0,296 |

As medidas de magnetização como função da temperatura foram realizadas nos modos *zero field-cooled* (ZFC)* e *field-cooled* (FC)** , sob aplicação de campo magnético externo constante de 100 Oe (Figura 22). O comportamento observado não está de acordo com o esperado para sistemas superparamagnéticos (MERCANTE, 2013). Em modo

* *Zero field-cooled* (ZFC) - A amostra é inicialmente arrefecida sem qualquer campo magnético aplicado à temperatura desejada. Os dados são coletados enquanto se aquece a amostra com a aplicação de campo magnético.

** *Field-cooled* (FC) - A amostra é arrefecida com campo magnético aplicado à temperatura desejada.

ZFC, a temperatura de bloqueio (T_B) não figura como uma inflexão máxima e, em modo FC, a magnetização decresce monotonicamente com o incremento de temperatura, sugerindo comportamento ferrimagnético massivo (RODRIGUES et al., 2016). O comportamento magnético tendendo ao esperado para o material massivo pode estar relacionado à aglomeração das nanopartículas promovida no processo de secagem do material (por liofilização) antes da medida. O empacotamento do material pode influenciar as interações magnéticas interpartículas. Kostopoulou et al. (2014) investigam *nanoclusters* de nanopartículas de óxido de ferro e observaram que o aumento do tamanho do *cluster* resulta no aumento da T_B , apresentando curvas compatíveis com a obtida neste trabalho.

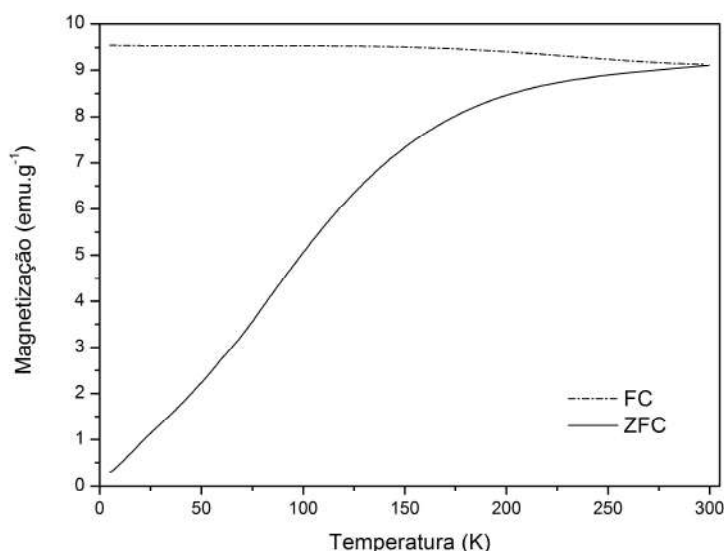


Figura 22 - Magnetização como função da temperatura sob campo magnético de 100 Oe, nos modos FC e ZFC, para amostra de NPMs obtidas em pH 11.

Em medidas de magnetização de nanopartículas magnéticas como função da temperatura, com o aumento da temperatura (modo ZFC) os momentos magnéticos adquirem energia suficiente para vencer a barreira de energia criada pela anisotropia, resultando em um aumento da magnetização, que atinge valor máximo quando a maior parte das partículas se encontra desbloqueada. Em temperaturas superiores à associada ao bloqueio da maior parte das nanopartículas, a energia térmica se sobrepõe e a magnetização decresce com a temperatura na região de regime superparamagnético. À medida que a temperatura é novamente reduzida (modo FC), os momentos magnéticos

retomam a condição de bloqueio, agora na direção do campo aplicado, e o valor da magnetização deixa de aumentar (MERCANTE, 2013).

4.1.4. Hipertermia magnética

As nanopartículas magnéticas também foram caracterizadas quanto ao efeito de hipertermia, para avaliar o potencial de liberação de calor do material quando submetido à aplicação de campo magnético alternado externo. A Figura 23 reúne os perfis de liberação de calor das NPM em meio aquoso, sob diferentes concentrações. A temperatura do meio aumenta com a evolução do tempo de medida e com a concentração do material magnético, como um típico perfil de hipertermia (SAKELLARI et al., 2016). As partículas magnéticas obtidas neste trabalho podem ser consideradas como efetivos mediadores de hipertermia, quando empregadas em concentrações superiores a $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (admitindo a tolerância de 15 min para atingir a faixa de temperatura de 41 a $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

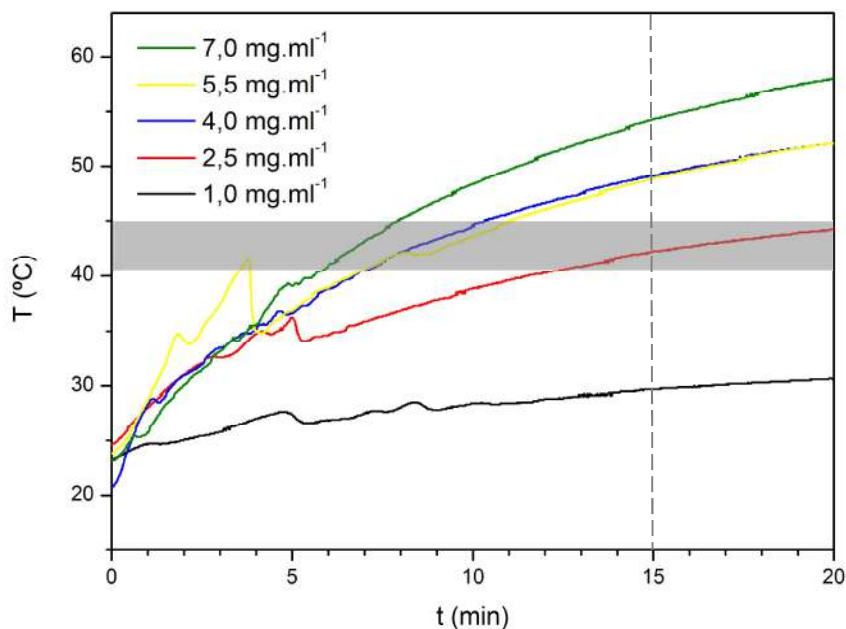


Figura 23 - Perfil de liberação de calor de NPM em solução aquosa de LSS 3,0% p/p, com diferentes concentrações, sob aplicação de campo magnético a 16 KA.m^{-1} e 307 KHz .

Inflexões irregulares foram observadas no início da curva de aquecimento, sendo atribuídas à decantação das partículas por ação de aplicação do campo. Comportamento semelhante foi descrito por Dias (2014), para sistemas compostos por nanoanéis ferrimagnéticos.

Medidas de hipertermia foram realizadas para uma mesma amostra sob diferentes condições de secagem (Figura 24). A eficiência de liberação de calor em água apresentou uma ligeira redução (menor inclinação da curva) com o aumento da temperatura de secagem da amostra. Tal constatação pode ser atribuída à possível oxidação parcial da superfície da partícula magnética, favorecida pela temperatura. Esta diferença é relevante para a avaliação da hipertermia das amostras encapsuladas em matriz polimérica, uma vez que os materiais foram caracterizados após secagem padronizada em 60 °C.

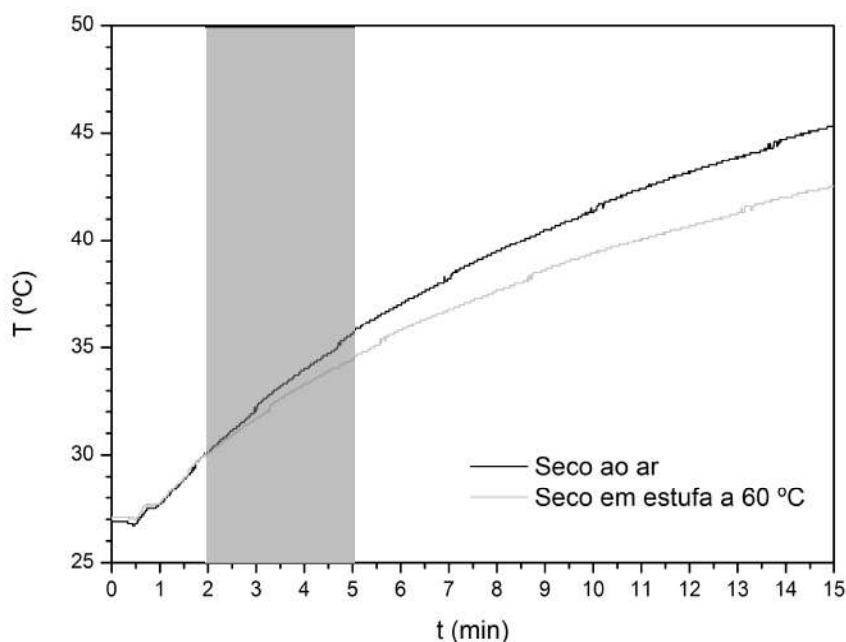


Figura 24 - Perfil de liberação de calor de NPM, seca em diferentes condições, sob aplicação de campo magnético a 16 KA.m^{-1} e 307 KHz ($[\text{NPM}] = 5,0 \text{ mg.ml}^{-1}$).

A inclinação da curva de aquecimento no estágio inicial de aquecimento corresponde à taxa de aquecimento que caracteriza a eficiência de hipertermia. Esta pode ser convertida em SLP, por intermédio da Equação 1. Considerando o meio de suspensão das partículas magnéticas como água pura e ponderando o calor específico total do sistema (partícula mais água) pela massa, a Equação 1 pode ser reescrita na forma da Equação 8, em termos do calor específico da partícula (c_p), do calor específico da água

(c_{H_2O}), da massa específica da água (ρ_{H_2O}) e da concentração mássica das partículas (ρ_p).

$$SLP = \left[c_p + \frac{\rho_{H_2O} \cdot c_{H_2O}}{\rho_p} \right] \cdot \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad \text{Equação 8}$$

As curvas da Figura 24 foram linearizadas no intervalo inicial das medidas (2 a 5 min, região em destaque na figura) resultando em retas com coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,99. Os coeficientes angulares das retas, correspondentes às respectivas taxas de aquecimento dos sistemas, foram utilizados para cálculos de SLP (Tabela 8) por intermédio da Equação 8, considerados valores de calor específico da magnetita ($c_p = 0,16 \text{ cal.g}^{-1}.\text{°C}^{-1}$), calor específico da água ($c_{H_2O} = 1,00 \text{ cal.g}^{-1}.\text{°C}^{-1}$), massa específica da água ($\rho_{H_2O} = 1000,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) e concentração mássica das partículas ($\rho_p = 5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$). É notória a redução do valor do SLP em resposta ao aquecimento da amostra.

Tabela 8 - SLP de NPMs, secas em diferentes condições, sob aplicação de campo magnético a 16 KA.m^{-1} e 307 KHz .

| Condição de secagem do material | SLP (W.g ⁻¹) | ILP (nH.m ² .kg ⁻¹) |
|---------------------------------|--------------------------|--|
| Seco ao ar | 25,66 | 0,33 |
| Seco a 60 °C | 20,78 | 0,26 |

Apesar do SLP ser a grandeza mais empregada para expressar a magnitude de hipertermia de um material, é complicado comparar estes valores apresentados por diferentes autores, em razão da dependência deste parâmetro com o campo e a frequência. Com o intuito de eliminar esta dependência Kallumadil et al. (2009) introduziram o conceito de perda específica de potência (ILP - *Intrinsic loss power*), definida como a razão entre o SLP e o produto $H^2 \cdot f$ (Equação 9).

$$ILP = \frac{SLP}{H^2 \cdot f} \quad \text{Equação 9}$$

Os maiores valores de SLP já reportados para nanopartículas de óxido de ferro são 600 W.g^{-1} (410 KHz ; $11,2 \text{ KA.m}^{-1}$), para NP quimicamente sintetizada (HERGT et al., 2004), e 960 W.g^{-1} (410 KHz ; $10,0 \text{ KA.m}^{-1}$), para NP produzida por bactéria (HERGT et al., 2005), com valores correspondentes a ILP de 11,7 e 23,4 $\text{nH.m}^2.\text{Kg}^{-1}$, respectivamente. Nanopartículas comerciais de óxido de ferro com diâmetros entre 10 e

12 nm foram reportados com ILP na faixa de 2,00 a 3,25 nH.m².Kg⁻¹ (KALLUMADIL et al., 2009). Os valores de ILP apresentados na Tabela 8 possuem uma ordem de grandeza a menos que a reportada para os referidos óxidos de ferro comerciais. Em contrapartida, estes valores são compatíveis com dados reportados por Fortin et al. (2007) para nanopartículas de óxidos de ferro. Vale ressaltar que todas as referências apresentadas destacam o incremento do ILP com o aumento do tamanho da partícula. Portanto deve ser observado que o comportamento magnético do material também varia com o tamanho e morfologia da partícula, o que influi nas diferenças de ILP.

4.1.5. Análise estatística [NPM]

Todas as medidas de hipertermia magnética das amostras do planejamento, descrito na Seção 3.1.3, apresentaram comportamento semelhante ao exemplificado na Figura 25. Observa-se claramente a evolução da liberação de calor das nanopartículas magnéticas para o meio aquoso em relação ao tempo de medida, realizada em frequência e intensidade de campo magnético alternado de amplitude constante.

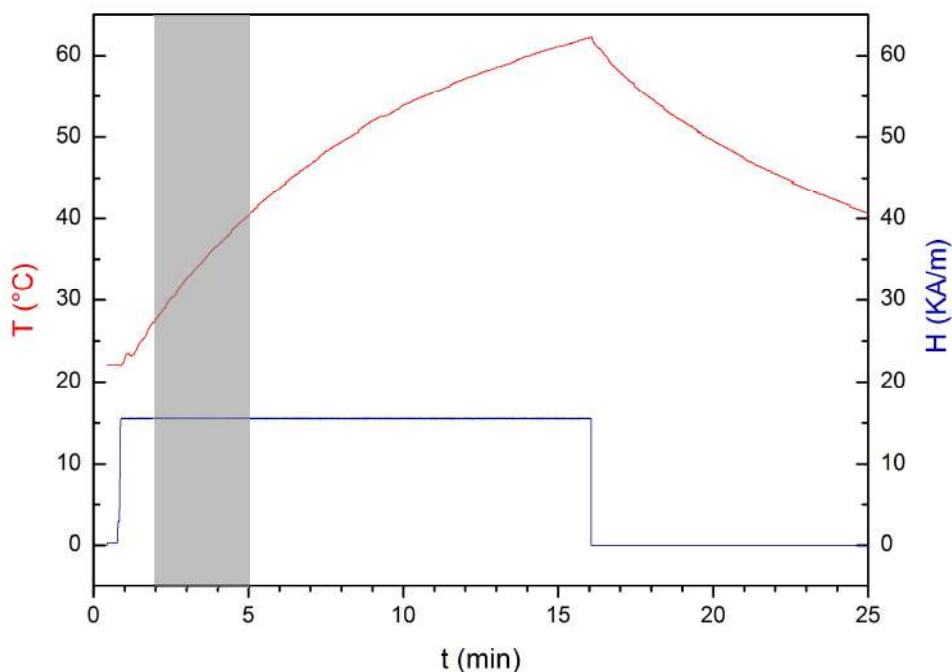


Figura 25 - Perfil de temperatura e campo magnético ([NPM] = 9,33 mg.mL⁻¹; [LSS] = 0,5 mol.L⁻¹; H = 15,5 KA.m⁻¹ e f = 307 KHz).

As medidas de hipertermia geraram dados de taxa de liberação de calor que foram convertidos em valores de SLP, por intermédio da Equação 8. Para o cálculo do SLP foram considerados os valores de calor específico da magnetita, calor específico da água e massa específica da água, respectivamente: 0,16 cal.g⁻¹.°C⁻¹; 1,00 cal.g⁻¹.°C⁻¹ e 1000,0 mg.mL⁻¹. Os valores de taxa de liberação de calor foram calculados a partir da linearização dos dados de temperatura do meio em análise, na faixa compreendida entre 2 e 5 min a partir do início de aplicação do campo. Tal delimitação foi aplicada com o intuito de eliminar interferências de comportamentos irregulares nos instantes iniciais das medidas, porém mantendo a precisão das medidas.

Tabela 9 - [Planejamento NPM] Condições das variáveis de entrada normalizadas e respectivas taxas de liberação de calor associadas à variável de saída SLP.

| z1 | z2 | z3 | z4 | $\Delta T/\Delta t$ (°C/min) | SLP (W/g) |
|----|----|----|----|---------------------------------|--------------|
| -1 | -1 | -1 | -1 | 0,11 | 1,88 |
| -1 | -1 | -1 | 1 | 0,43 | 3,23 |
| -1 | -1 | 1 | -1 | 0,14 | 2,51 |
| -1 | -1 | 1 | 1 | 0,50 | 3,77 |
| -1 | 1 | -1 | -1 | 0,51 | 8,89 |
| -1 | 1 | -1 | 1 | 1,19 | 8,88 |
| -1 | 1 | 1 | -1 | 0,55 | 9,62 |
| -1 | 1 | 1 | 1 | 1,14 | 8,53 |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 0,65 | 11,29 |
| 1 | -1 | -1 | 1 | 1,57 | 11,71 |
| 1 | -1 | 1 | -1 | 0,65 | 11,40 |
| 1 | -1 | 1 | 1 | 1,60 | 11,98 |
| 1 | 1 | -1 | -1 | 1,75 | 30,43 |
| 1 | 1 | -1 | 1 | 3,99 | 29,84 |
| 1 | 1 | 1 | -1 | 1,91 | 33,25 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 3,93 | 29,39 |
| -1 | 0 | 0 | 0 | 0,71 | 7,48 |
| -1 | 0 | 0 | 0 | 0,56 | 5,84 |
| -1 | 0 | 0 | 0 | 0,61 | 6,35 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 2,18 | 22,87 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 2,18 | 22,81 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 1,99 | 20,86 |

*(z1 - f, z2 - H, z3 - [LSS], z4 - [NPM])

A Tabela 9 apresenta o conjunto completo dos experimentos que compuseram o planejamento fatorial realizado e reúne os respectivos valores calculados de taxa de liberação de calor, vinculados à variável de saída SLP. Apesar de dados brutos tenderem a apresentar maior precisão em análises estatísticas, optou-se pelo cálculo da taxa de absorção específica (SLP), com o intuito de validar os resultados obtidos, além de estabelecer uma padronização em concordância com a forma que tais dados se apresentam na literatura.

Tendo em vista que o SLP consiste na potência gerada pela nanopartícula magnética normalizada por sua massa, valores iguais desta variável de saída para experimentos realizados com massas diferentes de nanopartículas, desde que mantidas iguais as demais condições do experimento, validam o planejamento. Portanto, tomando em pares os 16 primeiros experimentos, apresentados na Tabela 9, para diferentes condições apenas na Var. IV (concentração de NPM), observa-se que os valores de SLP são estatisticamente iguais, admitindo o erro experimental como o dobro dos desvios padrões (uma vez que foram consideradas distribuições normais com 95 % de confiança). Os referidos desvios padrões estão apresentados na Tabela 10, em que é apresentada a análise dos pontos centrais do planejamento. Os erros podem ser considerados satisfatórios, dado o baixo conteúdo de dispersão das medidas.

Tabela 10 - [Planejamento NPM] Análise estatística dos pontos centrais.

| | (-1, 0, 0, 0) | (+1, 0, 0, 0) |
|----------------------|----------------------|----------------------|
| Média | 6,56 | 22,18 |
| Variância | 0,70 | 1,31 |
| Desvio Padrão | 0,84 | 1,14 |

A análise de correlações entre as variáveis de entrada e saída, apresentada na Tabela 11, mostra que a frequência e intensidade do campo magnético aplicado estão fortemente correlacionados à liberação de calor pelas nanopartículas, de maneira estatisticamente significativa* e diretamente proporcional. Como mencionado por Kumar e Mohammad (2011), a liberação de calor por partículas superparamagnéticas é mais afetado pelo mecanismo de relaxação de Néel e, em geral, os valores de SLP aumentam

* Os valores estatisticamente significativos estão representados em vermelho nas matrizes de correlação apresentadas neste trabalho.

com a frequência e proporcionalmente ao quadrado da intensidade de campo magnético aplicado. Tal consideração está em concordância com o resultado apresentado na referida matriz de correlações.

Tabela 11 - [Planejamento NPM] Matriz de correlação entre variáveis.

| | z1 | z2 | z3 | z4 | SLP |
|------------|-------------|-------------|-----------|-----------|-------------|
| z1 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,78 |
| z2 | 0,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,55 |
| z3 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 0,00 | 0,02 |
| z4 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | -0,01 |
| SLP | 0,78 | 0,55 | 0,02 | -0,01 | 1,00 |

A matriz identidade destacada na Tabela 11 confirma a ortogonalidade intrínseca ao planejamento fatorial. Neste, as variáveis independentes se encontram completamente descorrelacionadas umas com as outras.

Os valores normalizados das variáveis de entrada, junto aos correspondentes valores de SLP, presentes na Tabela 9, foram alimentados ao software Statistica para a predição de modelo estatístico empírico, no formato apresentado pela Equação 6. O modelo final obtido (Equação 10), apresenta todos os parâmetros significativos, expressos com seus respectivos erros paramétricos. A avaliação estatística culminou em valor de 19,19 para a função objetivo e coeficiente de correlação de 0,995, indicando bom ajuste dos parâmetros ao modelo. Este ajuste satisfatório pode ser observado na Figura 26 que apresenta o diagrama que inter-relaciona os valores observados experimentalmente com os valores preditos pelo modelo.

$$\begin{aligned}
 \text{SLP}(\text{W.g}^{-1}) = & 13,764 \pm 0,220 + 7,675 \pm 0,220 \cdot f(\text{KHz}) + 6,31 \pm 0,258 \cdot H(\text{KA.m}^{-1}) \\
 & + 3,250 \pm 0,258 \cdot f(\text{KHz}) \cdot H(\text{KA.m}^{-1})
 \end{aligned}$$

Equação 10

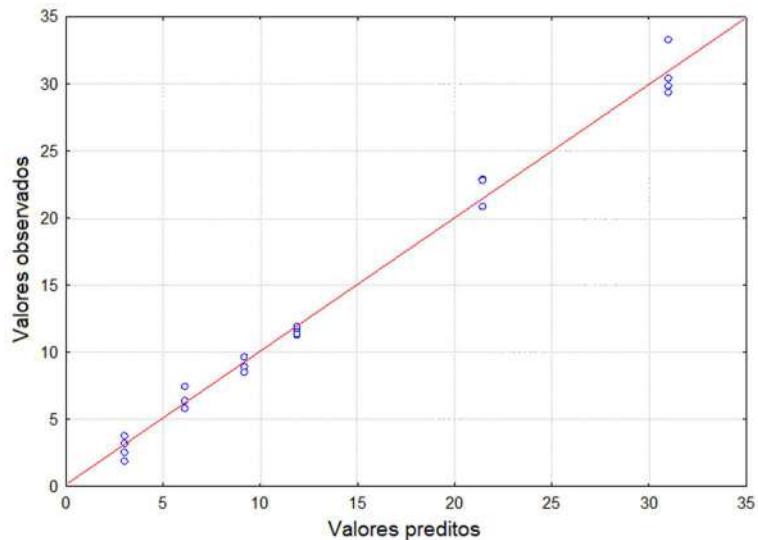


Figura 26 - [Planejamento NPM] Diagrama com valores de SLP preditos pelo modelo e observados experimentalmente.

O modelo empírico desenvolvido confirma que as variáveis frequência e intensidade de campo magnético exercem efeitos significativos sobre o desempenho térmico do sistema analisado. Ambas as variáveis apresentam comportamento construtivo com relação ao SLP (parâmetros positivos), contribuindo com componentes principais e compondo o termo de sinergia. A concentração de surfactante e de partículas magnéticas não figuram no modelo como variáveis significativas, o que está de acordo com a baixa correlação destas com a variável de saída (como pode ser visto na Tabela 11).

As componentes de indução de campo magnético influenciam o SLP em diferentes proporções. Como pode ser observado nos parâmetros do modelo e na correlação destas com a variável de saída, a frequência influencia o SLP mais que a intensidade de campo magnético aplicado, o que pode ser justificado pelo fato do planejamento de segunda ordem ter a sensibilidade apenas para influências lineares das variáveis. A influência quadrática referente à intensidade de campo magnético só pode ser confirmada por planejamento de terceira ordem. Entretanto, o teor mais sutil do parâmetro vinculado a tal variável pode ser um indicativo desta não linearidade.

O surfactante tende a influenciar os esforços viscosos do sistema que, em termos de liberação de calor pelas partículas magnéticas no meio, integra o mecanismo de relaxação de Brown. Como mencionado anteriormente, este mecanismo de relaxação contribui pouco no processo de liberação de calor; portanto, justifica-se a baixa influência

do surfactante sobre o SLP. Complementarmente, o efeito nulo da concentração de nanopartículas magnéticas no modelo de predição do SLP já era esperado, em razão desta ser uma variável normalizada em termos da massa de material magnético, uma vez que o volume de solvente utilizado em todas as alíquotas foi o mesmo.

Shah et al. (2015) investigaram o impacto das variáveis frequência e intensidade de campo magnético aplicado, concentração e tamanho de nanopartículas magnéticas, bem como viscosidade do meio, sobre a eficiência de liberação de calor de óxidos de ferro como magnetita e maghemita. O grupo analisou efeitos principais de cada variável sobre o SLP, por intermédio de variações individuais de cada variável. Os resultados apresentados no referido estudo corroboram a análise multivariável proposta nesta seção.

4.2. Nanopartículas poliméricas (NPP)

4.2.1. Partículas de PAA

Como já mencionado, foi dada maior atenção no presente trabalho para a obtenção de nanopartículas poliméricas de PAA. Em acordo com o desenvolvimento cronológico dos experimentos e de forma a fundamentar uma metodologia mais bem estruturada, a avaliação do planejamento experimental precede a caracterização das partículas poliméricas de PAA obtidas por miniemulsão inversa.

4.2.1.1. Análise estatística [NPP]

A presente análise estatística, referente ao estudo da polimerização por miniemulsão inversa do PAA, será discutida em dois blocos. Inicialmente serão abordados os estudos exploratórios responsáveis pela definição das variáveis de saída, e respectivos intervalos de variação, do planejamento. O segundo bloco faz a discussão propriamente dita do planejamento experimental, com a proposição de um modelo empírico para a variável de saída mais relevante.

a) Estudos exploratórios

Polimerizações via miniemulsão inversa foram realizadas em diferentes temperaturas (Figura 27) com o intuito de avaliar o comportamento cinético da reação. Foi empregada a metodologia descrita na Seção 3.2.2, salvo a diferença do iniciador ter sido adicionado apenas após equilíbrio térmico da emulsão no reator. O comportamento das isotermas em relação à variação de temperatura é semelhante ao observado em polimerizações do ácido acrílico em solução (CHEVREL et al., 2014). Apesar de inclinações mais pronunciadas em maiores temperaturas, as taxas de reação foram inferiores às esperadas para polimerizações em miniemulsão. Este método de polimerização tende a resultar em reações mais rápidas, em comparação à polimerização em solução (CAPEK, 2010). A cinética relativamente lenta observada pode ser atribuída à possível limitação difusional do iniciador para as gotas que contêm o monômero. Tal resistência à transferência de massa pode estar relacionada com a elevada viscosidade da fase contínua empregada. Vale observar que a conversão inicial é alta (cerca de 25 %), o que pode ser atribuído à possível iniciação da polimerização nas etapas anteriores ao aquecimento no reator.

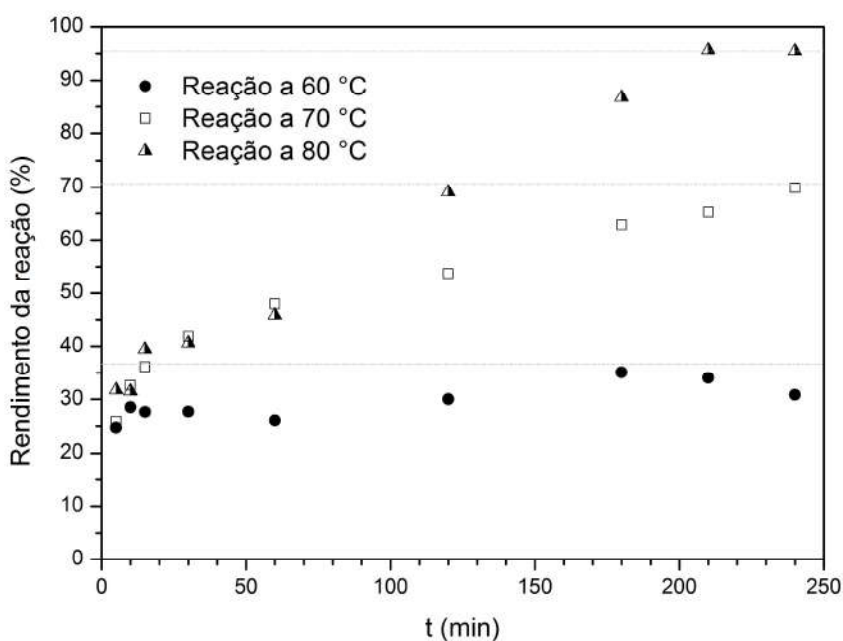


Figura 27 - Influência da temperatura no rendimento da reação de polimerização do PAA.

Em termos práticos, a reação conduzida a 80 °C apresentou pequenos aglomerados poliméricos no fim do processo. Portanto, temperaturas superiores a 80 °C inviabilizam a

obtenção de nanopartículas poliméricas monodispersas, o que pode estar relacionado a interferências da temperatura na estabilidade da emulsão na etapa antecedente à polimerização. Diante desta limitação, a temperatura máxima no planejamento foi definida como igual a 75 °C. O ponto central foi fixado em 70 °C, considerando ser essa a condição mais comumente empregada em polimerizações de ácido acrílico iniciadas por persulfato.

A influência do momento de adição do iniciador no sistema reacional foi avaliada por intermédio de reações conduzidas a 70 °C. O rendimento da reação foi confrontado, na Figura 28, para a adição do iniciador depois do equilíbrio térmico e para a adição do iniciador pré etapa de emulsão. O rendimento apresentou comportamento estatisticamente similar no início da reação, não sendo influenciado pela condição de adição do iniciador. Modificações significativas na taxa de reação (inclinação da curva obtida pelos pontos experimentais) foram observadas após 2 h de reação. A obtenção do PAA por miniemulsão inversa apresentou melhores rendimentos quando o iniciador foi adicionado logo no início do processo. Neste caso, o iniciador encontra-se mais homoganeamente distribuído na fase reacional, sem a necessidade de vencer limitações difusionais impostas pelo meio de suspensão. Assim, a concentração de iniciador tende a ser maior no interior das gotículas onde ocorre a polimerização e a atividade dos radicais ativos é mantida por mais tempo, estendendo o prazo de terminação da reação. Embasado por este raciocínio, o comportamento semelhante ao início da reação sugere que a cinética da reação seja controlada pela iniciação térmica nas primeiras horas. Com base nestes resultados, a metodologia de polimerização do ácido acrílico foi estabelecida com a adição do iniciador no início do processo, antecedendo a etapa de emulsão.

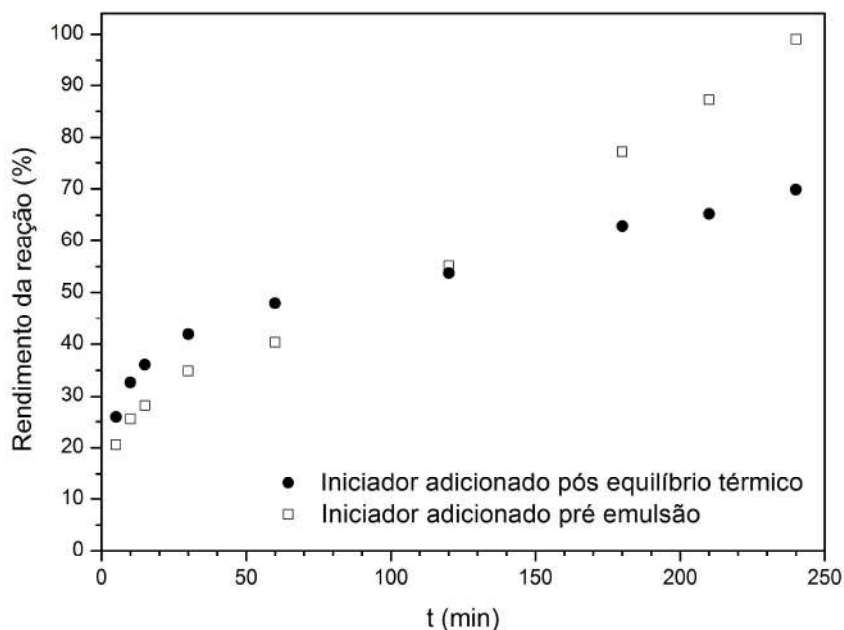


Figura 28 - Influência da adição do iniciador no rendimento da reação de polimerização do PAA. Reações realizadas à temperatura constante de 70 °C.

De forma complementar às considerações cinéticas apresentadas, os estudos exploratórios contemplaram a avaliação do nível de reticulação do polímero por meio de ensaios de inchamento em água. Para avaliar tal comportamento, foram realizadas polimerização de ácido acrílico em solução aquosa e em presença de EGDMA como reticulante, conforme metodologia apresentada na Seção 3.2.3. Teores de inchamento e solubilidade (Figura 29), calculados a partir de dados coletados nos referidos ensaios, sugerem o aumento do nível de reticulação com o aumento do teor de reticulante inserido no sistema, como esperado, já que o percentual de inchamento e solubilidade decrescem com o incremento da carga de EGDMA.

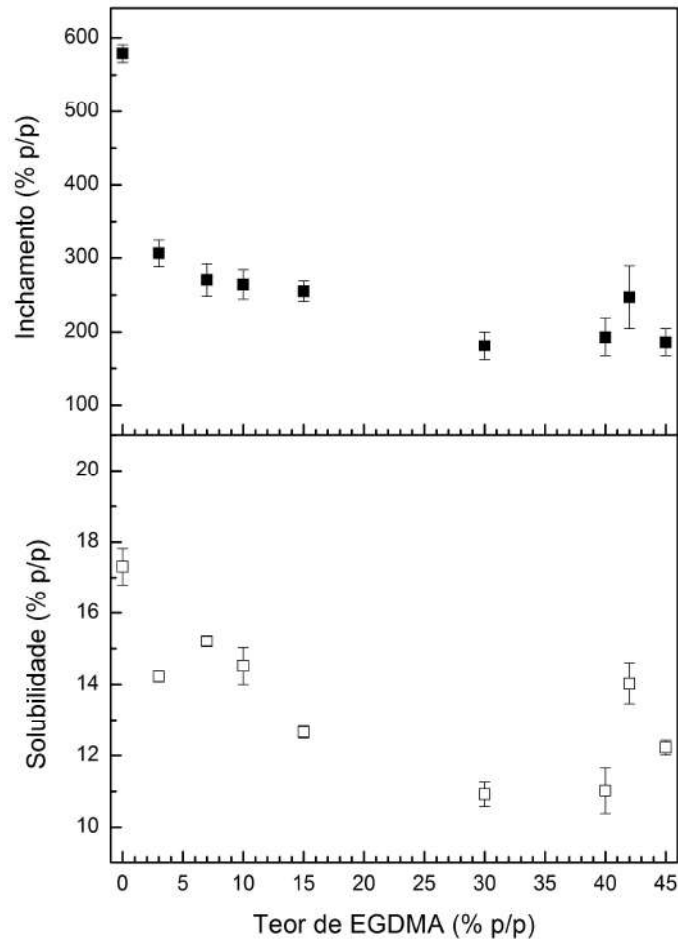


Figura 29 - Efeito de inchamento e solubilidade de PAA reticulado por EGDMA via polimerização em solução.

O hidrogel de PAA/EGDMA resultou em expressivos teores de inchamento em água (200-300 %). Tal comportamento está em acordo com o perfil de inchamento apresentado para o PEGDMA, descrito por Killion et al. (2011), que apontaram o favorecimento do inchamento como consequência do aumento do teor de água no meio reacional. Como o aumento do teor de reticulante empregado nas polimerizações em solução resulta em menores teores de água no sistema, como exposto na Tabela 12, a referida correlação do inchamento com o teor de água também pode ser observada no presente trabalho.

A quantificação do teor de polímero em solução mostra que a solubilidade do polímero hidrogel apresenta perfil em concordância com o inchamento do material. Portanto, quando submetido ao meio aquoso, o PAA reticulado com EGDMA apresenta uma tendência sutil à solubilização parcial. No entanto, o teor de solubilização do material

não é muito significativo (13% em média). Vale ressaltar que a quantificação da solubilidade do material acumula erros experimentais de pesagem, mais significativos do que na determinação do teor de inchamento.

Tabela 12 - Composição mássica das reações de polimerização em solução de AA em presença de EGDMA.

| EGDMA | K₂S₂O₈ | AA | H₂O |
|--------------|--|-----------|-----------------------|
| 0 | 1 | 30 | 69 |
| 3 | 1 | 30 | 66 |
| 7 | 1 | 30 | 62 |
| 10 | 1 | 30 | 59 |
| 15 | 1 | 30 | 54 |
| 30 | 1 | 30 | 39 |
| 40 | 1 | 30 | 29 |
| 42 | 1 | 30 | 27 |
| 45 | 1 | 30 | 24 |

Com base no perfil de inchamento obtido para o PAA reticulado com EGDMA, optou-se por restringir o teor de reticulante no planejamento em níveis inferiores a 10 %. Assim, a sensibilidade da avaliação estatística é favorecida para a previsão do comportamento desta variável.

As amostras obtidas por polimerização em solução, com diferentes teores de reticulante, também foram caracterizadas quanto à degradação térmica. As respectivas curvas de TGA dos polímeros estão reunidas no Apêndice B. Em geral, as curvas apresentam duas temperaturas principais de degradação do material. Analisando o perfil de degradação com relação à carga de reticulante utilizada na reação, é observado que o incremento do teor de reticulante está correlacionado com o aumento da estabilidade térmica do material (degradação ocorre em maior proporção na maior temperatura). O aumento da estabilidade térmica do polímero é um indício da efetiva reticulação do material, uma vez que o inter cruzamento das cadeias poliméricas exige maior energia térmica para rompimento das ligações.

A região abordada no planejamento para o teor de monômero foi definida com base em referência adotada para o desenvolvimento da metodologia de miniemulsão inversa do PAA (PINTO et al., 2012).

b) Planejamento experimental

As condições definidas para cada experimento que compõem o planejamento estão apresentadas na Tabela 13, vinculadas com as correspondentes variáveis de saída. Foram definidas como variáveis de saída o rendimento ao final de 2 h de reação (R), a variação de massa referente à última degradação térmica do material (M), a viscosidade do sobrenadante resultante do ensaio de inchamento das partículas poliméricas em água (V), bem como a solubilidade (S) e inchamento (I) referentes ao mesmo ensaio. No Apêndice C são reunidas as curvas de TGA analisadas para este planejamento.

Tabela 13- [Planejamento NPP] Condições das variáveis de entrada normalizadas, associadas às respectivas variáveis de saída nos ensaios de polimerização.

| z1 | z2 | z3 | Rendimento (% p/p) | Δm (% p/p) | Viscosidade (cP) | Solubilidade (% p/p) | Inchamento (% p/p) |
|----|----|----|-----------------------|-----------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------|
| 1 | 1 | 1 | 69,39 | 41,98 | 7,50 | 35,58 | 11,58 |
| 1 | 1 | -1 | 61,74 | 40,38 | 10,80 | 55,93 | 17,27 |
| 1 | -1 | 1 | 94,37 | 45,18 | 6,50 | 25,65 | 14,64 |
| 1 | -1 | -1 | 87,92 | 42,4 | 11,70 | 45,48 | 26,84 |
| -1 | 1 | 1 | 34,20 | 43,36 | 5,30 | 23,05 | 6,37 |
| -1 | 1 | -1 | 43,83 | 40,42 | 20,10 | 55,62 | 24,41 |
| -1 | -1 | 1 | 60,71 | 39,61 | 5,40 | 15,95 | 5,31 |
| -1 | -1 | -1 | 69,20 | 41,73 | 10,10 | 42,63 | 21,36 |
| 0 | 0 | 0 | 59,40 | 39,58 | 5,00 | 18,43 | 6,00 |
| 0 | 0 | 0 | 70,59 | 39,65 | 5,40 | 19,08 | 5,42 |
| 0 | 0 | 0 | 66,89 | 40,64 | 6,70 | 23,32 | 15,51 |

*(z1 - T, z2 - % AA, z3 - % EGDMA)

Primeiramente os dados das variáveis de saída referentes aos experimentos de réplica no ponto central foram tratados de acordo com a Tabela 14, expondo o conteúdo de erro destes experimentos, que foi admitido como constante para todo o planejamento. Observa-se que as réplicas de rendimento da reação (R) e inchamento das partículas (I) apresentaram elevado teor de dispersão e que os maiores conteúdos de erro estão

relacionados às variáveis vinculadas ao ensaio de inchamento (V, S e I). Entretanto, os erros experimentais calculados não refletem em resultados estatisticamente iguais ao longo do planejamento, o que permite a análise quantitativa dos dados. Assim, foi realizada uma análise multivariada das correlações entre as variáveis (entrada e saída) do planejamento fatorial, resumida pela correspondente matriz de correlação (Tabela 15).

Tabela 14 - [Planejamento NPP] Análise estatística dos pontos centrais.

| Variável de saída | R (% p/p) | M (% p/p) | V (cP) | S (% p/p) | I (% p/p) |
|----------------------|-----------|-----------|--------|-----------|-----------|
| Média | 65,63 | 39,96 | 5,70 | 20,28 | 8,98 |
| Variância | 32,50 | 0,35 | 0,79 | 7,05 | 32,06 |
| Desvio Padrão | 5,70 | 0,59 | 0,89 | 2,66 | 5,66 |

Tabela 15 - [Planejamento NPP] Matriz de correlações entre as variáveis.

| | z1 | z2 | z3 | R | M | V | S | I |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| z1 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,69 | 0,30 | -0,11 | 0,19 | 0,18 |
| z2 | 0,00 | 1,00 | 0,00 | -0,67 | -0,17 | 0,25 | 0,30 | -0,12 |
| z3 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | -0,03 | 0,33 | -0,70 | -0,74 | -0,74 |
| R | 0,69 | -0,67 | -0,03 | 1,00 | 0,36 | -0,16 | -0,03 | 0,28 |
| M | 0,30 | -0,17 | 0,33 | 0,36 | 1,00 | -0,07 | 0,05 | 0,23 |
| V | -0,11 | 0,25 | -0,70 | -0,16 | -0,07 | 1,00 | 0,86 | 0,81 |
| S | 0,19 | 0,30 | -0,74 | -0,03 | 0,05 | 0,86 | 1,00 | 0,83 |
| I | 0,18 | -0,12 | -0,74 | 0,28 | 0,23 | 0,81 | 0,83 | 1,00 |

A análise de correlações entre as variáveis mostra interações estatisticamente significativas entre os pares (entrada/saída) T/R, % AA/R, % EGDMA/V, % EGDMA/S e % EGDMA/I. Analisando as variáveis de saída individualmente, o rendimento da reação de polimerização (R) evolui com o incremento de temperatura do sistema e em oposição ao teor de monômero, porém na mesma ordem de grandeza. A variação da taxa de reação com a temperatura está de acordo com o observado nos estudos exploratórios e como esperado para a reação do AA. Em contrapartida, o rendimento da reação apresentou relação de dependência inversa com a carga de monômero empregada. Tal comportamento se justifica pelo mecanismo de reação de polimerização radicalar (MELO et al., 2014). Nas reações de polimerização via radicais livres, diversas cadeias são iniciadas, propagam e morrem de forma continuada, até o esgotamento da fonte geradora de radicais livres (OLIVEIRA; NELE; PINTO, 2013), não havendo acoplamento entre

conversão e massa molar. A carga de monômero pode influenciar a massa molar do polímero obtido; no entanto, a reação é limitada pelo tempo de vida do radical formado. Portanto a correlação inversa da concentração de monômero com o rendimento da reação pode estar vinculada à utilização de carga fixa de iniciador em todo o planejamento, resultando em redução de carga relativa de iniciador com o aumento de carga de monômero.

A estabilidade térmica do material (M) não apresentou interação significativa com qualquer variável de processo avaliada. No entanto, foi percebida uma correlação mais efetiva desta variável de saída com a temperatura da reação e o teor de reticulante. Tal comportamento é um indício de que o incremento de temperatura favorece o enriquecimento da fase polimérica com o reticulante, aumentando a estabilidade térmica do material.

O grau de reticulação do polímero hidrogel é influenciado pelo teor de reticulante, dada a interação significativa e destrutiva com as variáveis referentes ao ensaio de inchamento. O aumento do teor de reticulação do polímero resulta na redução do inchamento (I) e da solubilidade (S) do material, condizente com a contribuição negativa destas grandezas na matriz de correlação. Em contrapartida, a solubilização do polímero aumenta a viscosidade da solução aquosa (considerando viscosidade de 1,0 cP para a água; 1,3 cP para AA e 3,2 cP para EGDMA), o que é confirmado por todas as medidas de viscosidade dos sobrenadantes analisados no planejamento terem sido superiores à viscosidade da água (Tabela 13). Portanto é coerente a redução da viscosidade (V) com o aumento do teor de reticulação, dado menor quantidade de polímero se dissolver na fase aquosa.

Na matriz de correlações (Tabela 15), a matriz identidade, no canto superior esquerdo, confirma a ortogonalidade intrínseca do planejamento fatorial proposto. Também está destacada, no canto inferior direito, a matriz de correlações entre as variáveis referentes ao ensaio de inchamento das partículas poliméricas em água. Nesta última matriz, todas as variáveis estão fortemente correlacionadas, uma vez que todas refletem de alguma forma o teor de reticulação do polímero. Além disso, a relação entre estas variáveis é significativa, visto que são complementares.

Os valores apresentados na Tabela 13 foram alimentados ao software Statistica para a predição de modelos estatísticos empíricos, no formato apresentado pela

Equação 6. Nem todas as variáveis de saída resultaram em modelos com ajuste satisfatório aos dados experimentais. No entanto, uma vez que a matriz de correlações apresentada permitiu que fossem extraídas as informações mais relevantes dos modelos, optou-se por apresentar apenas o modelo referente à variável rendimento da reação (R).

O modelo final obtido (Equação 11), apresenta todos os parâmetros significativos, expressos com seus respectivos erros paramétricos. A avaliação estatística culminou em valor de 68,23 para a função objetivo e coeficiente de correlação de 0,988, indicando bom ajuste dos dados experimentais ao modelo proposto (Figura 30), salvo dispersão dos pontos centrais (Figura 30).

$$\text{Conversão (\%)} = 65,29 \pm 0,94 + 13,19 \pm 1,10 \cdot T(^{\circ}\text{C}) - 12,88 \pm 1,10 \cdot \text{AA}(\% \text{ p/p}) + 4,03 \pm 1,10 \cdot \text{T. EGDMA}(\% \text{ p/p})$$

Equação 11

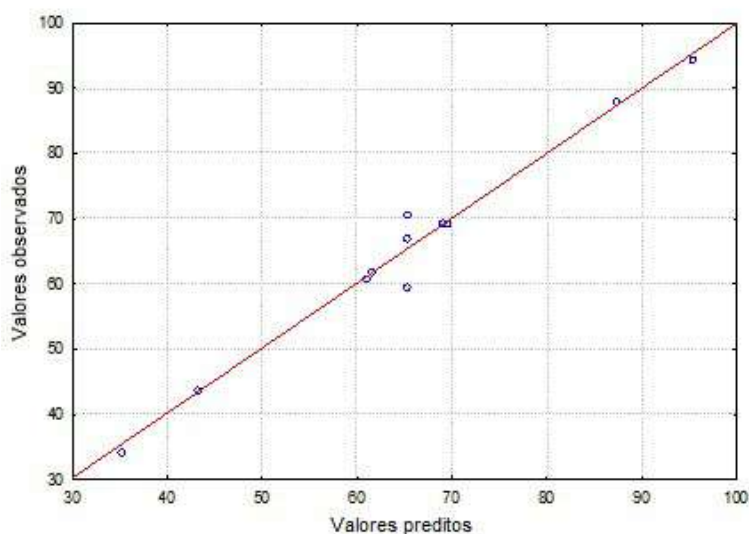


Figura 30 - [Planejamento NPP] Diagrama dos valores de conversão preditos pelo modelo e observados experimentalmente.

Os termos principais do modelo empírico, apresentado para o rendimento da reação de polimerização por miniemulsão inversa, são compostos pelas variáveis temperatura e teor de monômero, em acordo com a correlação significativa apresentada entre estas variáveis na matriz de correlação (Tabela 15). Além disso, o modelo apresenta

uma relação de sinergia entre a temperatura e o teor de reticulante. Tal interação significativa sugere a incorporação do reticulante EGDMA na matriz polimérica de PAA.

4.2.1.2. Caracterização das partículas de PAA

As partículas de PAA descritas nesta seção são referentes às condições e proporções mássicas descritas na Seção 3.2.2. A definição da metodologia considerou os resultados obtidos no planejamento experimental, discutido na seção anterior, e informações relevantes da literatura. Vale ressaltar que em geral são empregados teores ínfimos de agente reticulante para promover a formação de ligações cruzadas ao longo da cadeia polimérica. No entanto, em virtude de se objetivar a produção de partículas poliméricas com tamanhos bem definidos e com grau mínimo de inchamento em meio aquoso, foi adotado como 15 % o teor de EGDMA. O teor de água também foi fixado em um valor expressivo (acima de 50 %), com a premissa de que a partícula polimérica fosse concebida em condição de excesso de solvente, podendo assumir dimensão inferior ao tamanho da gota formada no início da reação, dada a perda de água proporcionada pela reação em sistema parcialmente aberto e sob aquecimento constante. É importante atentar para a função dual da água neste sistema, pois além de atuar como solvente, ela também tem a função de estabilizante da fase dispersa.

As partículas poliméricas de PAA, obtidas pela metodologia de miniemulsão inversa desenvolvida, apresentaram boa dispersão em água e dimensão em escala nanométrica. A caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (Figura 31) confirma a dimensão submicrométrica das partículas. No entanto, por limitações da resolução do equipamento, não foi possível definir com precisão o tamanho das partículas, apesar de se ter uma boa ideia de que possuem diâmetro inferior a 300 nm. Tentou-se realizar medições de distribuição de tamanho de partículas em meio aquoso, pela técnica de espalhamento de luz, no entanto os resultados não foram relevantes. A dificuldade na determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas de PAA pode estar relacionada com a solubilidade parcial do polímero em meio aquoso e também pela rápida agregação das partículas hidrogéis. Vale destacar que o controle de tamanho de partículas pode ser conseguido por modificação de parâmetros experimentais, como intensidade da força cisalhante promotora da miniemulsão e também pela adição de uma agente de pressão osmótica com elevada hidrofiliçidade (CAPEK, 2010).

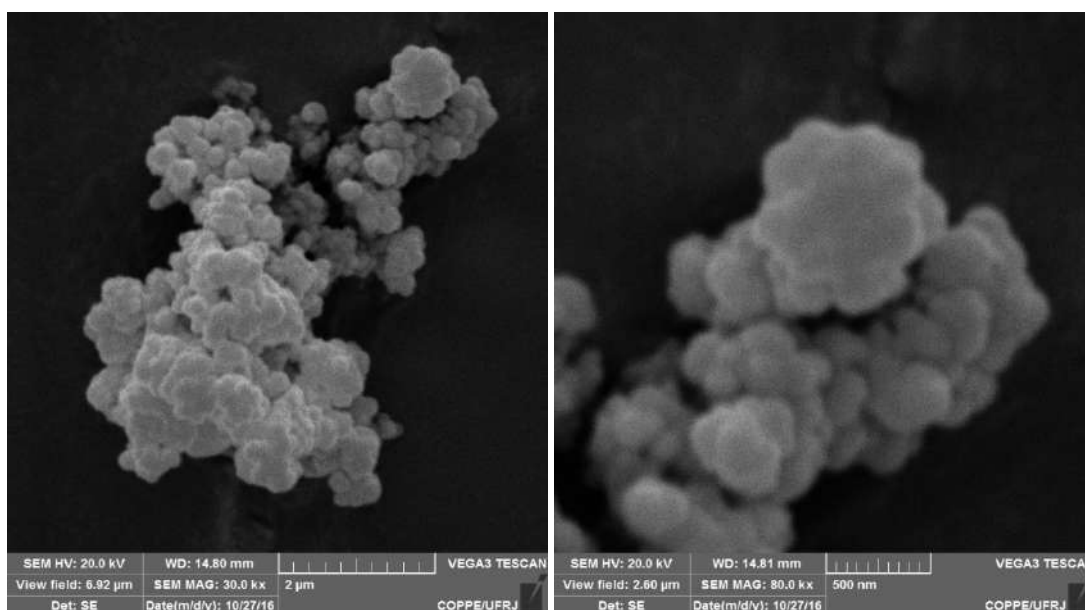


Figura 31 - MEV de partículas de PAA obtidas em polimerização por miniemulsão inversa.

O material foi caracterizado por FTIR (Figura 32), sendo possível identificar as bandas características do polímero, em concordância com a literatura (CHEN et al., 2015; ZHENG et al., 2011). Na Tabela 16 são identificadas as bandas características com as respectivas atribuições. A presença da carboxila, contribuição intrínseca ao ácido acrílico, é evidenciada pelas bandas referentes às ligações C-O, C=O e O-H (1158 , 1712 e 2926 cm^{-1} , respectivamente).

Tanto o monômero (AA) quanto o reticulante (EGDMA) apresentam ambientes químicos muito semelhantes (AA caracterizado pelo grupo funcional carboxila e EGDMA caracterizado pelo grupo funcional éster). Portanto, não é possível distinguir com precisão a contribuição de cada espécie no espectro. Em contrapartida, a inexistência da banda de deformação axial associada a ligação C=C (por volta de 1650 cm^{-1}) confirma a ausência de resíduos dos precursores na partícula polimérica, após etapa de purificação do material. Além disso, representa um indício de que todo EGDMA incorporado na cadeia polimérica reagiu pelos dois extremos da molécula, sendo acoplado ao ácido acrílico por reações de adição (MIN; SILBERSTEIN; ALURU, 2014). A incorporação do EGDMA na matriz polimérica é notória, dada a semelhança do perfil do espectro apresentado na Figura 32 com o espectro característico do PEGDMA (KILLION et al.,

2011). Este fato confirma a hipótese de reticulação do polímero preparado em miniemulsão.

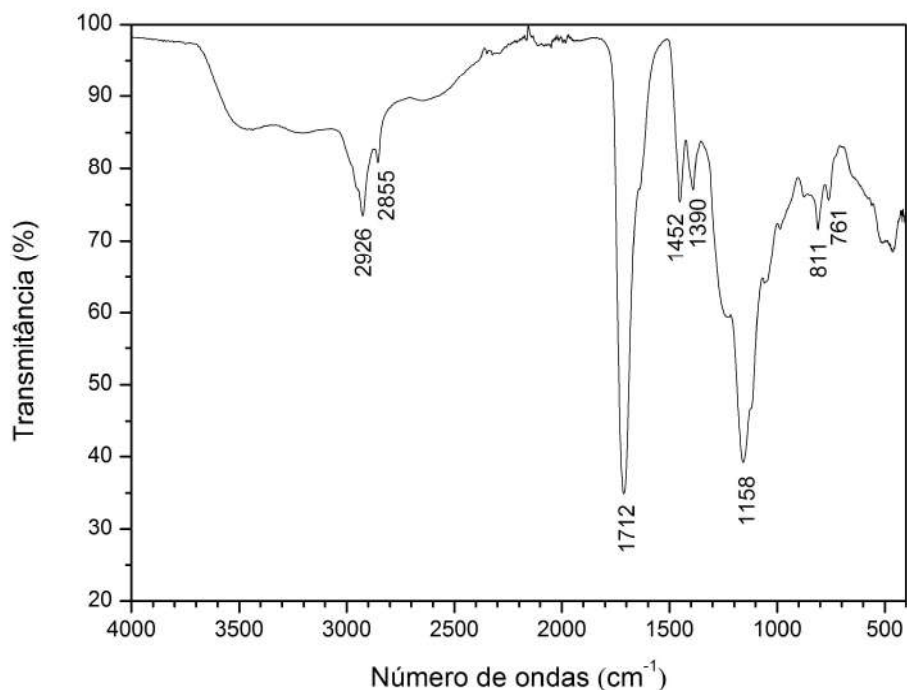


Figura 32 - FTIR de partículas de PAA obtidas em polimerização por miniemulsão inversa.

Tabela 16 - Principais bandas de absorção e respectivas atribuições do espectro de FTIR de partículas de PAA obtidas em polimerização por miniemulsão inversa.

| Banda (cm ⁻¹) | Tipo de absorção |
|---------------------------|--|
| 761 e 811 | Deformações das ligações C-H fora do plano |
| 1158 | Deformação axial da ligação C-O (-COOH ou -COOR) |
| 1712 | Deformação axial da ligação C=O (-COOH) |
| 2926 | Deformação axial da ligação O-H (-COOH) |

As propriedades térmicas do material foram caracterizadas por análises térmicas. As correspondentes curvas de TGA e DSC estão apresentadas nas Figuras Figura 33 e Figura 34, respectivamente.

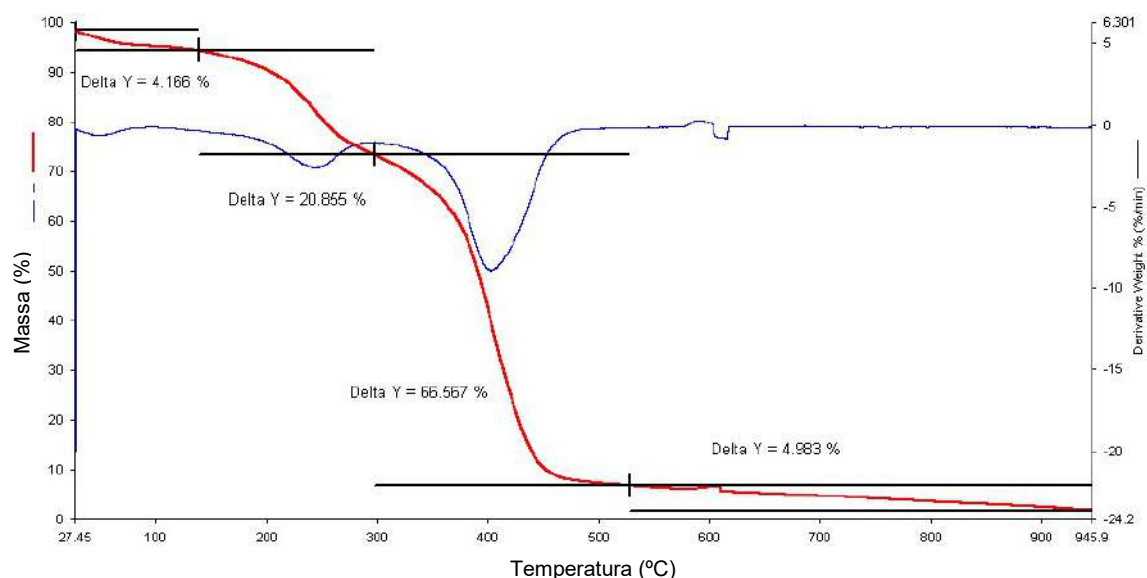


Figura 33 - TGA de partículas de PAA obtidas em polimerização por miniemulsão inversa.

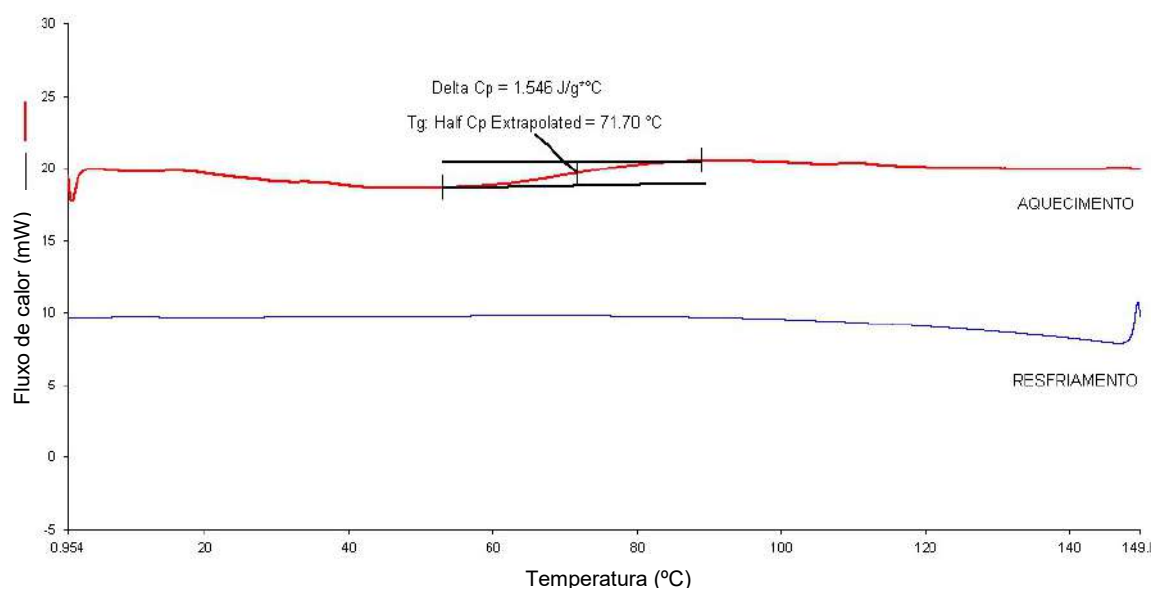


Figura 34 - DSC de partículas de PAA obtidas em polimerização por miniemulsão inversa.

A curva de TGA apresentada para as partículas poliméricas de PAA (Figura 33) mostra uma pequena perda de massa em temperaturas inferiores a 150 °C, provavelmente referente à presença de água residual no emaranhado polimérico. O material apresenta duas regiões características de degradação térmica, com taxas de perda de massa mais pronunciadas em torno de 250 e 420 °C. A perda de massa mais significativa ocorre na

maior temperatura de degradação, demonstrando a boa estabilidade térmica do polímero. Como discutido na Seção 4.2.1.1, a estabilidade térmica do material é favorecida pelo enriquecimento da matriz polimérica em termos do reticulante (EGDMA).

Uma transição de fase de segunda ordem é observada na curva de DSC (Figura 34). O material apresenta temperatura de transição vítrea (T_g) em 71,70 °C, de acordo com o valor de T_g reportado para PAA puro (PINTO et al., 2012). Usualmente, polímeros reticulados não apresentam T_g , em razão do elevado grau de intercrossamento das cadeias poliméricas. Em contrapartida, temperaturas de transições vítreas iguais às apresentadas pelo polímero puro são esperadas para blendas poliméricas imiscíveis. Portanto, a existência da referida T_g para o polímero reticulado pode indicar a formação de copolímeros em bloco. A formação de copolímero entre AA e EGDMA é pertinente, uma vez que ambas as moléculas apresentam insaturações terminais. No caso do EGDMA ter atuado como agente reticulante e monômero, também é esperada uma transição de fases correspondente ao PEGDMA. No entanto, a curva de DSC não apresentou uma mudança de linha de base adicional, em virtude do PEGDMA exprimir T_g em torno de -50 °C (KILLION et al., 2011) e a medida não ter sido realizada em temperaturas negativas.

4.2.2. Partículas de PMMA

A presente seção tem a finalidade de apresentar caracterizações fundamentais das partículas poliméricas de PMMA obtidas por polimerização via miniemulsão direta, apenas para estabelecer um padrão comparativo.

4.2.2.1. Caracterização das partículas de PMMA

As partículas poliméricas de PMMA foram obtidas como um látex estável, sem a necessidade de purificação adicional. Estas apresentaram estabilidade em suspensão aquosa muito superior à observada para as partículas de PAA. Contudo, vale considerar que a fase contínua do meio de polimerização direta contém surfactante, que auxilia a manutenção da suspensão das partículas poliméricas ao final da reação.

Tamanhos de partículas foram observados, por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 35), na faixa de 50 nm. Distribuição de tamanho das partículas

empregando técnica de espalhamento dinâmico de luz, apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de 51 nm, com coeficiente de variação 2, corroborando os dados da literatura (LORCA et al., 2012). Os diâmetros obtidos por ambas as técnicas apresentam dimensões compatíveis, uma vez que o PMMA é um polímero organofílico e não incha na presença de água. Portanto, em termos de dimensão das partículas, o PMMA pode ser mais adequado que o PAA para aplicações biológicas, uma vez que se elimina o efeito de inchamento do material quando submetido ao meio aquoso.

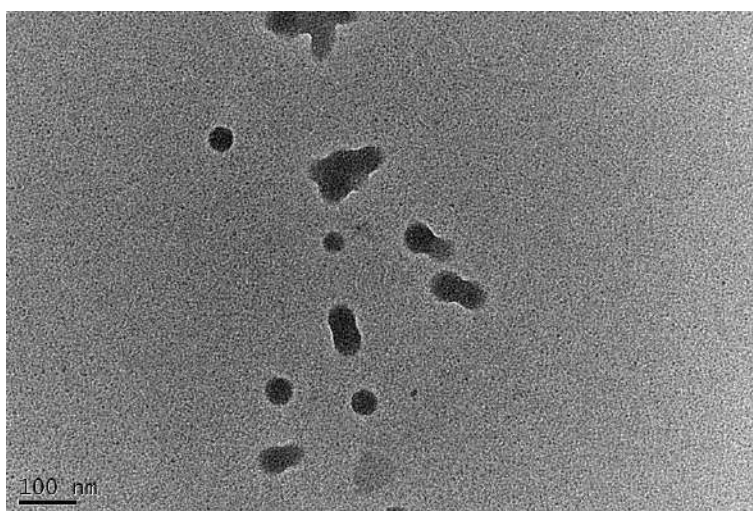


Figura 35 - MET de partículas de PMMA obtidas por polimerização por miniemulsão direta.

As partículas de PMMA também foram caracterizadas quanto à composição estrutural, estabilidade térmica e distribuição de massa molar. O espectro de FTIR (Figura 36) e a curva de TGA (Figura 37) corroboram dados encontrados na literatura (KIM; NOH; PARK, 2013). O PMMA apresenta bandas características similares às destacadas na Tabela 16 para o PAA, dada a similaridade química dos materiais (estruturas químicas confrontadas na Figura 10). O PMMA sintetizado mostrou elevada estabilidade térmica, com degradação principal em 380 °C. As partículas de PMMA apresentaram massa molar ponderal média de $1,79 \cdot 10^6$ Da, com índice de polidispersão de 1,99, condizente com distribuições de massas molares para PMMA obtidos por miniemulsão (PAIVA; MELO; PINTO, 2016).

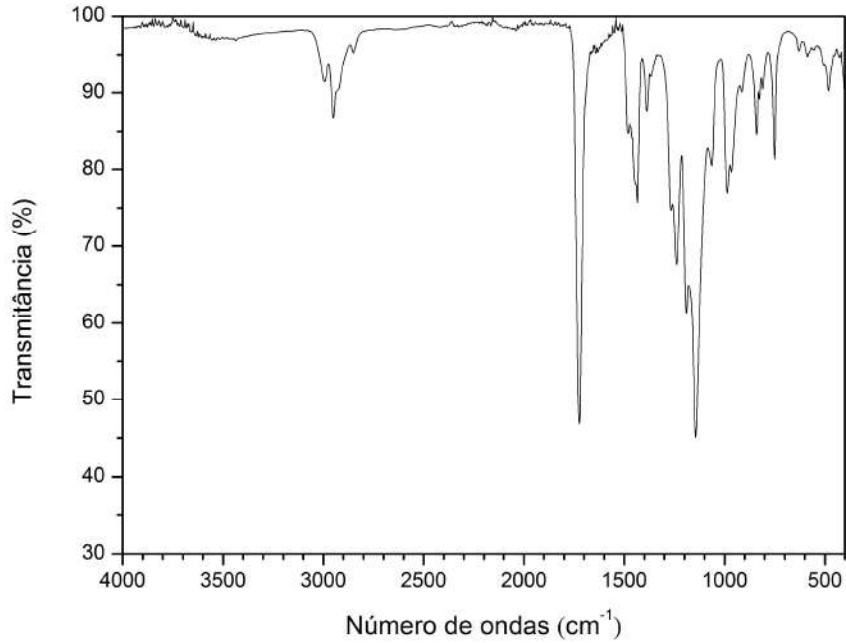


Figura 36 - FTIR de partículas de PMMA obtidas em polimerização por miniemulsão direta.

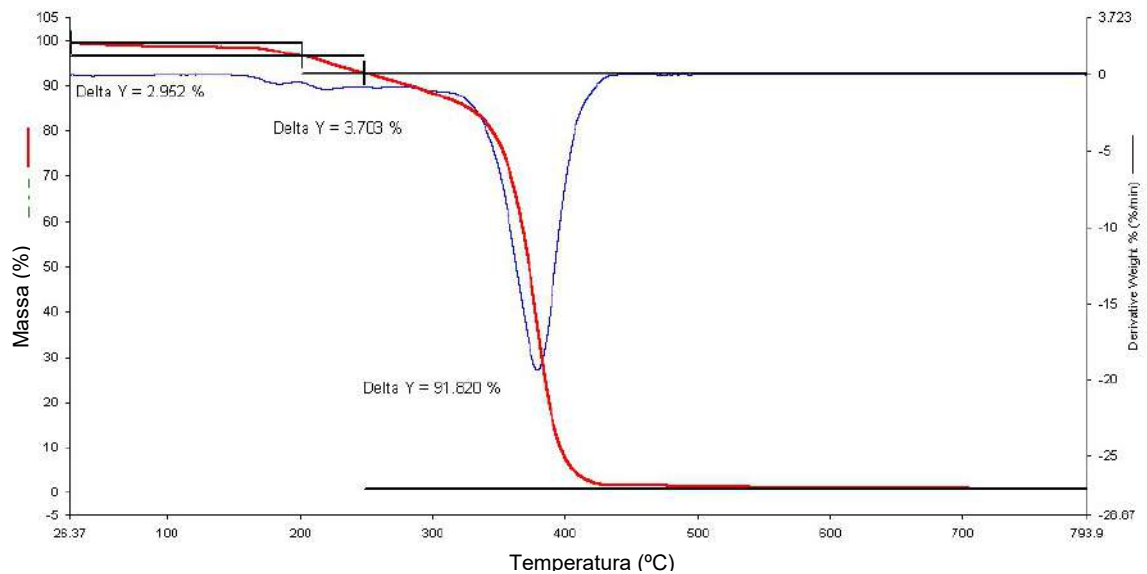


Figura 37 - TGA de partículas de PMMA obtidas em polimerização por miniemulsão direta.

4.3. Encapsulamento

A presente seção apresenta um estudo comparativo entre as nanopartículas magnéticas encapsuladas em PAA (NPM@PAA), por miniemulsão inversa, e em PMMA (NPM@PMMA), por miniemulsão direta. As referidas partículas foram caracterizadas

quanto à morfologia e tamanho, estabilidade em solução, magnetização e hipertermia magnética.

4.3.1. Morfologia e tamanho

A estabilidade da partícula magnética em solução afeta significativamente o processo de encapsulamento do material em matriz polimérica. A formação de uma suspensão estável favorece a estabilidade da emulsão promovida na etapa de polimerização por miniemulsão (direta ou inversa).

O efeito do surfactante empregado para estabilizar as NPMs foi fortemente percebido quando encapsuladas em PAA. Quando empregado lauril sulfato de sódio (LSS), foi obtido um material polimérico com baixa concentração de NPM e grande tendência à formação de filme. O baixo teor de material magnético se deve à retenção dos aglomerados por filtração prévia em membrana, para garantir o emprego do material preferencialmente monodisperso. Análises de microscopia eletrônica de transmissão do material (Figura 38) mostraram a formação de um filme polimérico, favorecido pela condição de vácuo a que a amostra foi submetida no equipamento, com ocorrência de partículas magnéticas monodispersas, favorecida pelas forças cisalhantes promovidas pela sonda de ultrassom durante o preparo da suspensão das NPMs.

Com o propósito de aumentar o teor de NPM na fase polimérica, as NPMs foram dispersas em solução de citrato de sódio (CS), apresentando estabilidade substancialmente superior, como discutido na Seção 4.1.2. Neste caso, foram obtidas partículas poliméricas mais bem definidas, com cerca de 300 nm de diâmetro, contendo as nanopartículas magnéticas em seu interior organizadas como aglomerados (Figura 39). Em termos práticos, foi observada a formação de partículas poliméricas com diferentes teores de reticulante. Tal afirmação se sustenta na observação da formação de uma interface água/óleo rica em partículas poliméricas contendo as NPM, além da presença de partículas poliméricas na fase aquosa pobres em material magnético e com tendência à formação de filme. As partículas magnéticas encapsuladas em PAA aqui caracterizadas são referentes às concentradas na interface água/óleo, posteriormente purificadas e ressuspendidas em água. Estas não apresentaram tendência a formação de filme e, quando

secas, apresentam-se como pó finamente dividido. Tal comportamento sugere o enriquecimento do PAA em EGDMA, que apresenta maior afinidade pela fase oleosa.

O possível enriquecimento da matriz polimérica em EGDMA, favorecido pelas nanopartículas magnéticas recobertas com citrato de sódio, sugerem uma interação mais efetiva da NPM com o CS, em comparação ao LSS. Moléculas de CS fortemente aderidas à superfície da NPM tendem a conferir um caráter organofílico às partículas, proporcionando interações mais efetivas com o EGDMA, que tem maior afinidade pela fase orgânica do que pela fase aquosa.

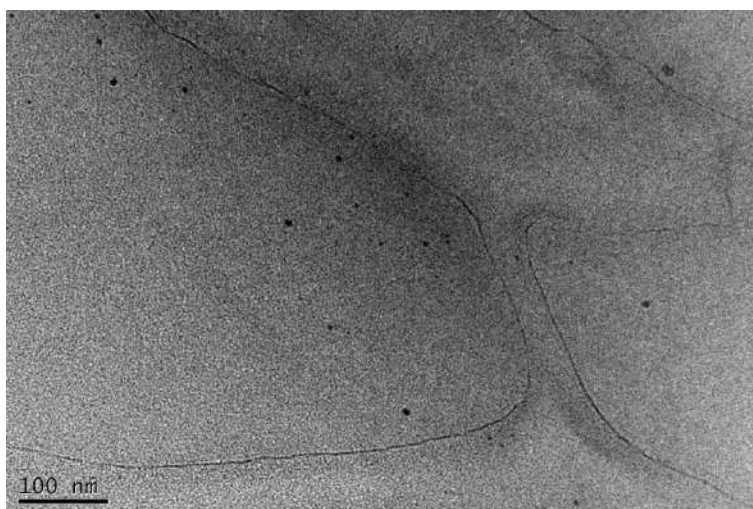


Figura 38 – Análise de MET de filme polimérico obtido após secagem de amostra de nanopartículas magnéticas estabilizadas em lauril sulfato de sódio e encapsuladas em PAA.

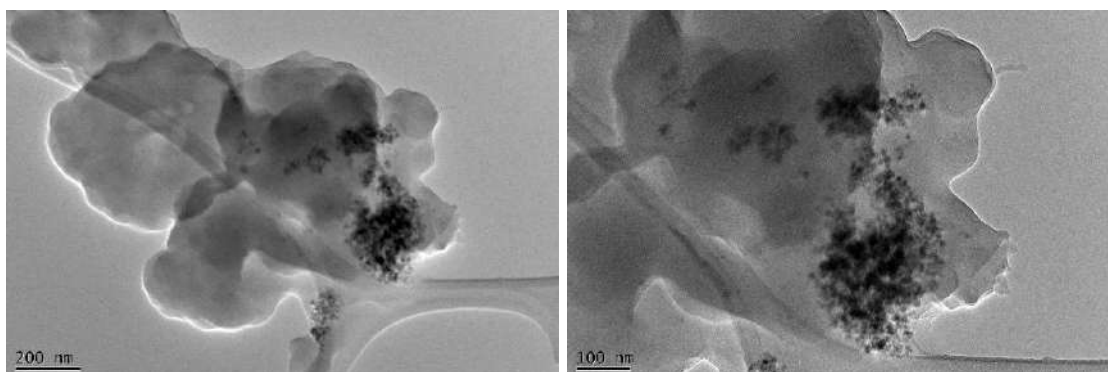


Figura 39 – Análise de MET de nanopartículas magnéticas encapsuladas em PAA pós estabilização em citrato de sódio.

A morfologia disforme (não perfeitamente esférica) das partículas obtidas (Figura 39), pode ser atribuída à adição de água como estabilizante na fase dispersa (LANDFESTER; WILLERT; ANTONIETTI, 2000). Tal condição pode ser eventualmente contornada pela adição de um agente de pressão osmótica com forte caráter lipofílico (CAPEK, 2010).

Amostras de NPM encapsulada em PMMA, obtidas por miniemulsão direta, também foram caracterizadas quanto à morfologia e tamanho. As partículas de PMMA contendo NPM apresentaram um incremento no diâmetro médio de 51 nm, quando obtidas puras, para 142 nm (Figura 40), confirmado por imagens de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 41-a).

A obtenção de partículas poliméricas maiores, quando se encapsularam partículas inorgânicas (observadas para ambos os casos – NPM@PAA e NPM@PMMA), pode ser atribuída ao aumento de resistência, criado no meio, à formação de emulsão quando aplicadas forças cisalhantes. O incremento de tamanho de partícula após introdução de um ativo no sistema polimérico foi reportado por outros autores, sendo correlacionado a perturbações no fenômeno de quebra e coalescência das gotas (OLIVEIRA et al., 2012). No entanto, o enquadramento desta variável nas especificações desejadas pode ser conseguido facilmente por ajuste de parâmetros do processo reacional, como já mencionado anteriormente.

A concentração de partículas magnéticas na amostra NPM@PMMA foi baixa, uma vez que foi adotado o teor de 1 % em massa. Mapeamento por nanodifração (Figura 41-c) das partículas encapsuladas (Figura 41-b) confirmam o conteúdo de material magnético. Para avaliar o efeito de hipertermia, é desejada uma concentração mais elevada de nanopartículas de óxido de ferro. No entanto, tal preocupação não integra o escopo do presente trabalho, uma vez que o potencial de aplicação para hipertermia de NPM encapsuladas em PMMA (via polimerização por miniemulsão) já foi confirmado por Feuser et al. (2015).

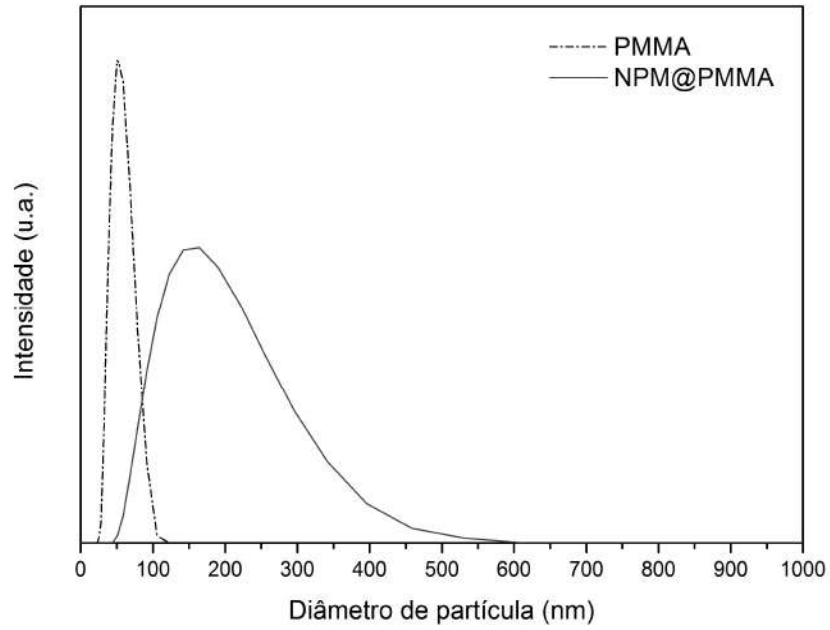


Figura 40 - Distribuição de tamanho de partículas de PMMA puro e contendo nanopartículas magnéticas encapsuladas, medida por espalhamento de luz.

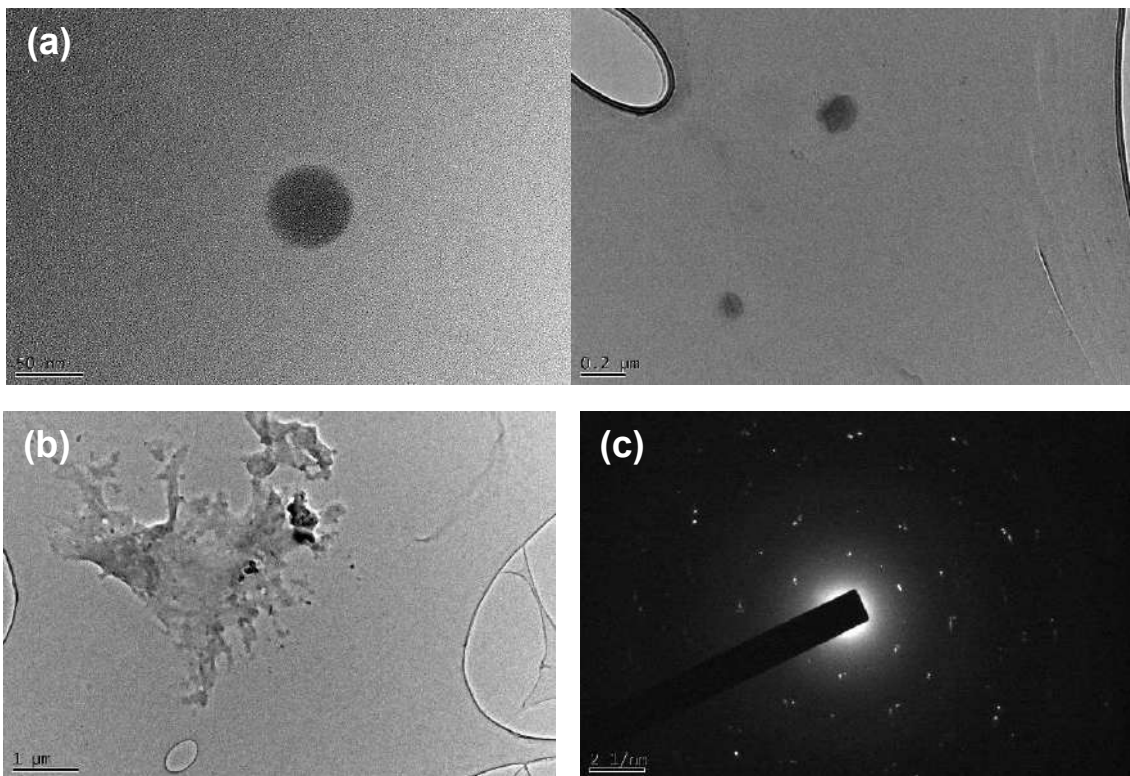


Figura 41 – Análise de MET de nanopartículas magnéticas encapsuladas em PMMA (a) e análises de MET de aglomerados destas partículas (b) com correspondente mapeamento por nanodifração (c).

4.3.2. Estabilidade em solução

A estabilidade das partículas poliméricas em solução aquosa foi avaliada para amostras de polímeros puros e com nanopartículas magnéticas encapsuladas (Tabela 17). O encapsulamento em polímero promove incremento de estabilidade das nanopartículas magnéticas em solução aquosa, comparado ao efeito de recobrimento por surfactantes (Tabela 6).

Considerando o critério de estabilidade adotado na Seção 4.1.2 (suspensão de partículas estável para $|\xi| > 30$ mV), o PMMA garante maior estabilidade às partículas que o PAA. Em linhas gerais, todas as partículas expostas na Tabela 17 apresentam estabilidade aceitável para aplicações biológicas. Adicionalmente, valores similares observados para os pares polímero puro e NPM encapsulada no correspondente polímero, corroboram o efetivo encapsulamento, dado que as superfícies das partículas apresentam contribuições primordiais da matriz polimérica original.

Tabela 17 - Potencial zeta de partículas poliméricas e NPM encapsuladas em polímeros.

| Amostra | ξ (mV) |
|-------------------------------------|-------------------|
| PAA obtido por miniemulsão inversa | $-21,27 \pm 4,77$ |
| NPM encapsuladas em PAA (NPM@PAA) | $-22,53 \pm 0,93$ |
| PMMA obtido por miniemulsão direta | $-38,53 \pm 1,83$ |
| NPM encapsuladas em PMMA (NPM@PMMA) | $-34,83 \pm 1,33$ |

4.3.3. Medidas de magnetização

O encapsulamento das partículas magnéticas nos polímeros acrílicos resultou em um material híbrido com magnetização inferior à do precursor magnético. As nanopartículas magnéticas encapsuladas em PAA e PMMA apresentaram magnetização máxima de $0,32 \text{ emu.g}^{-1}$ e $0,06 \text{ emu.g}^{-1}$, respectivamente (Figura 42). A redução de duas a três ordens de grandeza na magnitude da magnetização do material, em comparação à Ms da NPM pura (Tabela 7), se deve à presença do polímero, que contribui como material não magnético na medida. Tal comportamento é reportado na literatura quando nanopartículas de óxidos de ferro são recobertas com materiais de diversas naturezas (KHOSROSHAHI et al., 2015; KRALJ; DROFENIK; MAKOVEC, 2011; PERECIN et

al., 2014). Vale destacar, que além da influência principal da matriz não magnética, a magnetização da amostra também pode ser reduzida por oxidações parciais da superfície das partículas de magnetita, resultantes da metodologia de encapsulamento empregada.

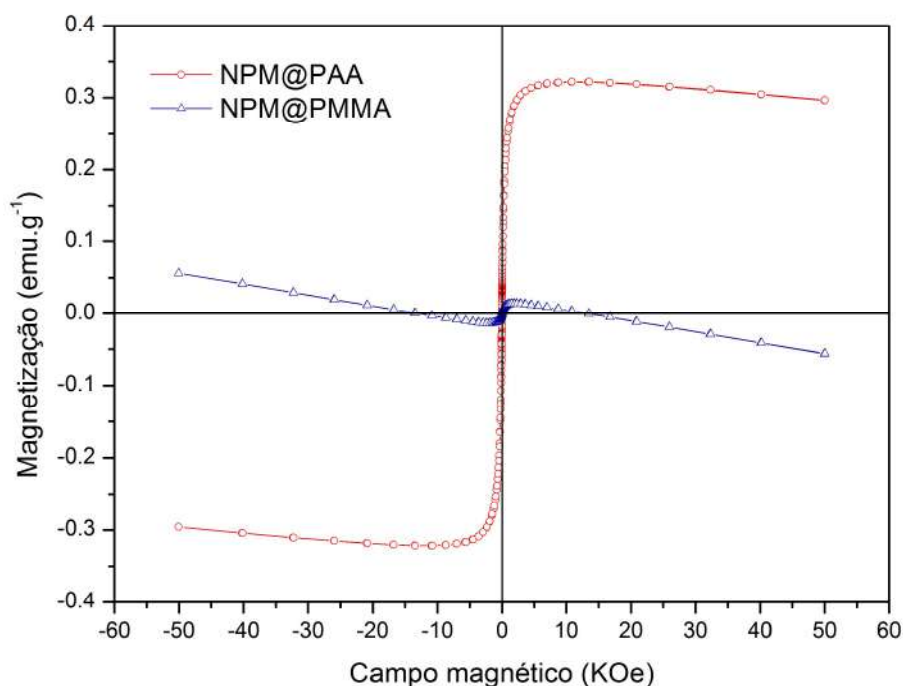


Figura 42 - Magnetização em função do campo magnético aplicado a 300 K, para amostras de NPM encapsuladas em polímeros acrílicos.

É importante observar que as medidas de magnetização após encapsulamentos apresentam uma componente diamagnética significativa. O comportamento diamagnético é caracterizado pela inclinação da curva de magnetização após a saturação. O diamagnetismo é uma propriedade inerente a todos os materiais e só não é detectável na presença de efeitos magnéticos mais intensos. Portanto, a contribuição pronunciada da componente diamagnética é devido ao elevado teor de material polimérico na matriz híbrida. A redução do teor de material magnético evidencia o efeito diamagnético, o que justifica tal efeito ver-se mais pronunciado na amostra NPM@PMMA, uma vez que o material magnético está mais concentrado quando encapsulado em PAA (NPM@PAA). Efeitos semelhantes são apresentados na literatura (DIMRI et al., 2012; LI et al., 2010), quando materiais não magnéticos são dopados com materiais magnéticos.

4.3.4. Hipertermia magnética

A amostra de nanopartículas magnéticas encapsuladas em PAA por miniemulsão inversa (NPM@PAA) foi avaliada em termos de hipertermia magnética (Figura 43). Tal amostra corresponde à fase polimérica concentrada na interface água/óleo previamente à purificação. Como grande parte do monômero empregado na síntese foi recolhido como partículas de PAA puras concentradas na fase aquosa, o teor de partículas magnéticas contido na fase encapsulada foi maior que o fixado inicialmente. Portanto, diferente das NPM@PMMA, as NPM@PAA puderam ser avaliadas quanto ao potencial de liberação de calor sob aplicação de campo magnético alternado externo.

O perfil de liberação de calor apresentado pelas NPM@PAA demonstra potencial de aplicação destas partículas em sistemas de hipertermia magnética. Vale ressaltar que foi quantificada uma alíquota substancialmente maior do material encapsulado, uma vez que a geração de calor é exclusiva ao teor de material magnético presente na amostra. O polímero, além de não ser uma fonte geradora de calor sob aplicação do campo, atua como uma barreira que aumenta a resistência à transferência de calor para a solução aquosa. Tal influência pode ser associada ao aspecto ruidoso do perfil de liberação de calor da amostra, diferentemente dos perfis mais regulares obtidos para as nanopartículas magnéticas puras (apresentados e discutidos nas Seções 4.1.4 e 4.1.5). É importante lembrar que a relevância da medida está na taxa de liberação de calor intrínseca ao material (relacionada ao seu valor de SLP) e não simplesmente pela temperatura atingida pela solução aquosa em que as partículas foram ressuspensas. Isto porque a temperatura do organismo apresenta equilíbrio térmico naturalmente por volta de 37 °C, superior à temperatura inicial da medida, por volta de 25 °C.

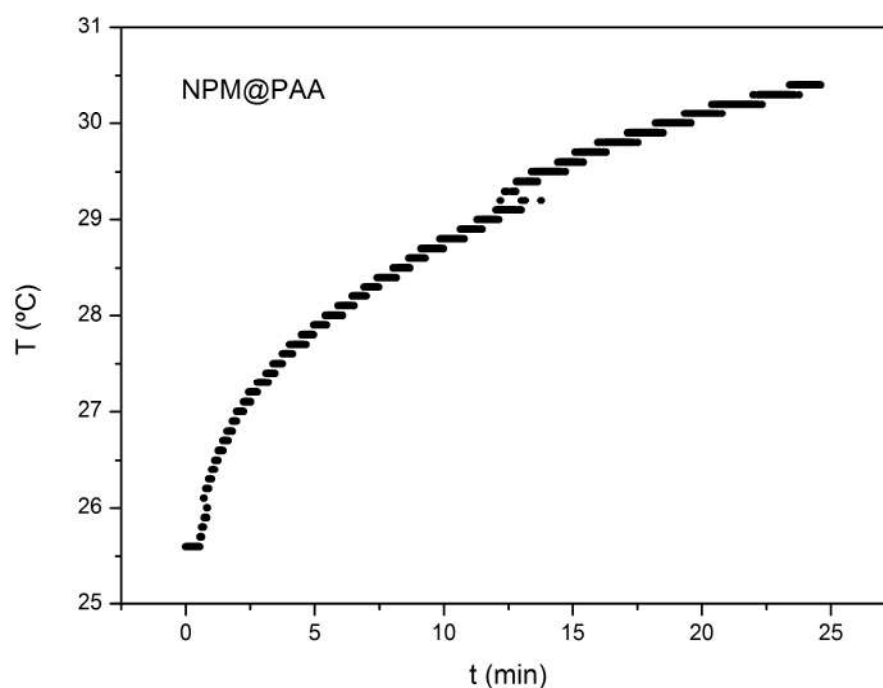


Figura 43 – Medida de hipertermia de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro encapsuladas em PAA ($H = 15,5 \text{ KA.m}^{-1}$, $f = 307 \text{ KHz}$, $[\text{NPM@PAA}] = 200,0 \text{ mg.ml}^{-1}$)

Trabalhos envolvendo encapsulamento de nanopartículas magnéticas em partículas poliméricas de diferentes naturezas confirmam o processo de encapsulamento e redução da magnetização correspondente à massa de polímero adicionada no sistema ou à parcial oxidação da superfície das partículas magnéticas; no entanto, não abordam o efeito de hipertermia do material (LIN; CHIU; DON, 2006; PERECIN et al., 2014; ROMIO et al., 2013). Zhang et al. (2015) também encapsularam nanopartículas de magnetita em PAA. No referido trabalho foram avaliadas a estrutura e a morfologia das partículas híbridas, mas não foi avaliado o efeito de hipertermia, sendo abordada a influência do encapsulamento nas propriedades magnéticas do material. Feuser et al. (2015) não realizaram medições diretas do efeito de hipertermia, mas avaliaram indiretamente este efeito, comprovando a redução da viabilidade celular sob aplicação de campo magnético alternado.

4.4. Bioconjugação

A bioconjugação intermediada por carbodiimida vem sendo vastamente empregada para ancorar biomoléculas ativas em superfícies de partículas magnéticas, muitas vezes recobertas por polímeros, com a finalidade de aplicação em sistemas biológicos (AKAL; ALPSOY; BAYKAL, 2016; LIU et al., 2016; MAHAJAN et al., 2013; SINGH et al., 2015; TANG et al., 2014; THU HUONG et al., 2016). Apesar da metodologia ser bem estabelecida, nem sempre é trivial comprovar a formação da ligação covalente.

Ácido fólico foi bioconjugado a nanopartículas poliméricas de PAA (NPP_AF) e a reação foi confirmada por caracterização do material por FTIR após lavagem. A Figura 44 confronta os espectros do polímero bioconjugado ao ácido fólico com os espectros de seus precursores. Vale destacar que os grupos funcionais característicos da partícula polimérica hidrogel também estão presentes na estrutura química do ácido fólico. Assim, as diferenças entre os espectros de FTIR se devem aos anéis aromáticos e grupos funcionais nitrogenados intrínsecos ao ácido fólico.

A amostra bioconjugada, caracterizada previamente à lavagem, apresentou espectro com grande contribuição do ácido fólico. Após procedimento de lavagem, realizado para remover o AF residual, o aspecto ruidoso do espectro foi eliminado e a diferença, com relação ao espectro da NPP pura, se concentrou na banda em 1560 cm^{-1} . Tal banda é característica de grupos aromáticos e se sobrepõe à banda fraca de deformação angular N-H, característica de amins e amidas secundárias. Portanto, a presença desta banda confirma que o ácido fólico não foi completamente removido com o procedimento de lavagem e é um indício de que ocorreu a formação de ligação amida entre a carboxila do ácido acrílico e a amina do ácido fólico. Uma vez que a confirmação da reação se deve à identificação de grupamento amida, também presente no interior da molécula de AF, não é possível afirmar de maneira inequívoca que ocorreu uma adsorção química e não apenas física da biomolécula.

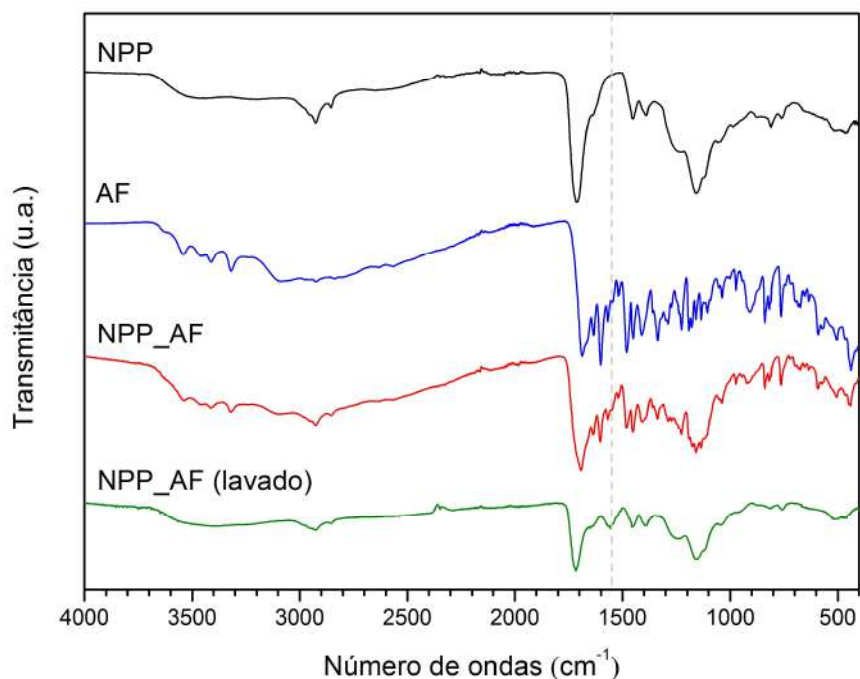


Figura 44 - FTIR de nanopartículas poliméricas de PAA puras (NPP), ácido fólico (AF) e NPP bioconjugadas com AF (NPP_AF) antes e após lavagem.

Com o intuito de eliminar a incerteza quanto à efetiva formação de ligação química, as águas de lavagem das partículas, pós protocolo de bioconjugação, foram analisadas quanto à presença de ácido fólico. Assim, foi possível garantir com maior precisão a completa remoção de AF não reagido. Esta avaliação semiquantitativa foi realizada por intermédio de espectroscopia na região de ultravioleta e visível (Figura 45) e confirmou que após a quinta lavagem o AF foi detectado em concentração traço, até atingir concentração inferior ao limite de detecção do equipamento, favorecida por lavagens mais alcalinas. A medida espectroscópica foi realizada no modo de varredura, concentrando na faixa de comprimento de onda próxima à região de absorção do ultravioleta (200 – 400 nm), uma vez que o AF expressa absorções específicas em 280 e 360 nm (ALABURDA et al., 2008; PUBLISHERS, 1992).

Vale ressaltar que o ácido fólico é muito pouco solúvel em água e sua solubilidade é dependente do pH, sendo favorecida por condições fracamente ácidas ou alcalinas (WU et al., 2010). Estudo conduzido por Younis et al. (2009) mostrou expressivo incremento na solubilidade do ácido fólico em condições básicas (pH 10). Portanto, as lavagens foram procedidas em melhores condições de solubilidade da espécie química, favorecendo a eliminação da porção não reagida de ácido fólico.

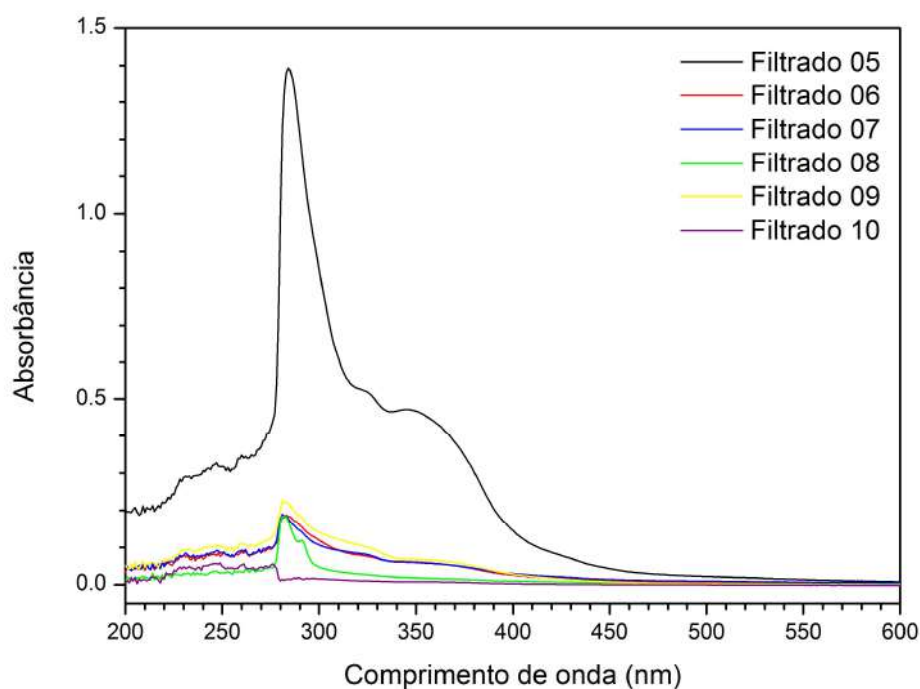


Figura 45 – Espectro de UV-vis do filtrado de lavagens sucessivas de partículas de PAA bioconjugadas a AF.

Garantida a eliminação do AF residual, foi repetida a caracterização por FTIR (Figura 46). A persistência da banda em 1560 cm^{-1} reforça a hipótese de formação efetiva da ligação amida. Considerando a hipótese de adsorção física, a energia de interação entre o AF e o PAA é elevada o bastante para que a adsorção não seja revertida, mesmo em condições severas e sucessivas de lavagens. Tal comportamento também foi observado para as amostras correspondentes aos ensaios em branco realizados. No ensaio em branco, foi eliminada a etapa de ativação por ação da carbodiimida. Foi realizado um ensaio em branco mantendo as condições do meio especificadas no protocolo descrito na Seção 3.4.2 e outro substituindo o tampão fosfato por água ultrapura. O perfil similar dos espectros (Figura 46) nas diferentes condições de procedimento sugere que não há a necessidade do emprego do EDC para que a bioconjugação ocorra. A eliminação do emprego da espécie ativadora resulta em vantagens financeiras significativas e simplifica o processo.

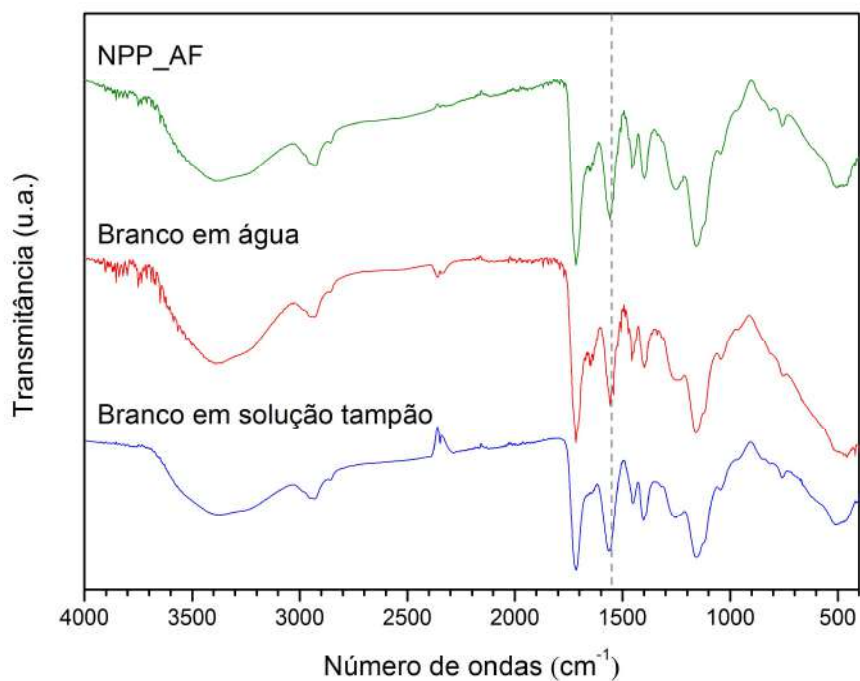


Figura 46 – Espectro de FTIR de amostras de NPP bioconjugadas com AF comparativo a amostras realizadas em ensaios em branco, após sucessivas lavagens em condições alcalinas.

Uma caracterização mais adequada, para comprovar a formação da ligação covalente de maneira inequívoca, seria o emprego da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H). No entanto, não foi possível realizar tal caracterização, uma vez que a amostra deve ser completamente solubilizada em solvente deuterado, o que é inviabilizado pela reticulação do polímero.

Capítulo V

Conclusões e Perspectivas

“O tempo é o melhor autor, sempre encontra um final perfeito.”

Charles Chaplin

5.1. Conclusões

- Empregando o método de coprecipitação, foram sintetizadas nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Fe_3O_4) de forma simples, barata, reprodutível e escalável. As partículas foram caracterizadas quanto à composição, morfologia, tamanho, estabilidade em solução, além de serem investigadas suas propriedades magnéticas e de hipertermia sob aplicação de campo magnético alternado externo. As nanopartículas de óxido de ferro apresentaram baixa coercividade e remanência, indicando comportamento superparamagnético à temperatura ambiente, adequado a aplicações médicas.
- A proposta central deste trabalho foi encapsular partículas magnéticas em partículas poliméricas, empregando a metodologia de polimerização por miniemulsão, uma vez que esta garante a obtenção de partículas poliméricas bem definidas e com adequado controle de tamanho de partículas em dimensões submicrométricas. Para tal, foram eleitos polímeros acrílicos, considerando a bioafinidade do material e aplicações em áreas médicas já consolidadas com PAA e PMMA. No entanto, a afinidade química dos correspondentes monômeros impõe substancial variação na metodologia de polimerização. Partículas de PAA foram obtidas por miniemulsão inversa, dado o caráter hidrofílico do ácido acrílico, enquanto partículas de PMMA foram obtidas pela metodologia tradicional de miniemulsão direta, bem estabelecida na literatura.

- A síntese de partículas de PAA em dimensões submicrométrica não é bem definida na literatura. Portanto, foi desenvolvida uma metodologia de polimerização por miniemulsão inversa empregando óleo vegetal como fase contínua. Na fase dispersa foi adotado elevado teor de água, que atuou como solvente e estabilizante. Variáveis reacionais foram avaliadas quanto a potencial influência na formação das partículas poliméricas de hidrogel. Foi constatado que a reação é sensível a variação de temperatura, sendo preferencial que ocorra por volta de 70 °C (empregando persulfato como iniciador radicalar), uma vez que se observam aglomerações das partículas a partir de 80 °C. Além da temperatura, foi observada contribuição significativa da carga de monômero na velocidade da reação. Já o teor de reticulante afetou fortemente as propriedades físico-químicas do polímero, influenciando de forma substancial a propriedade de inchamento do hidrogel. Adicionalmente, foram constatados indícios de que o enriquecimento da matriz polimérica de PAA com o reticulante EGDMA reduz a propriedade adesiva do polímero e a tendência à formação de filmes.
- O encapsulamento de nanopartículas magnéticas em PAA apresentou resultados satisfatórios quando as partículas magnéticas foram previamente estabilizadas por citrato de sódio. Apesar do elevado teor de reticulante empregado na síntese, o polímero apresenta tendência a inchamento em meio aquoso, propriedade intrínseca de polímeros hidrogéis. Tal comportamento resulta em diâmetros hidrodinâmicos que podem dificultar as aplicações médicas. No entanto, a distribuição de tamanho das partículas pode ser controlada por meio de ajustes em variáveis do processo de polimerização. Em contrapartida, considerando a finalidade de aplicações médicas, o emprego do PAA agrega a vantagem de possibilitar o encapsulamento de fármacos hidrossolúveis na matriz polimérica, além de apresentar grupos funcionais carboxila pendentos, que facilitam a bioconjugação de marcadores específicos. Por outro lado, o emprego de PMMA resultou em partículas com morfologia mais bem definida, sendo ao final da reação obtido um látex polimérico estável em meio aquoso (fase contínua do sistema de polimerização), sem que houvesse a necessidade de purificação adicional. Em ambos os casos, o encapsulamento das nanopartículas magnéticas resultou em partículas mais estáveis em meio aquoso, ao custo de reduzir a magnetização do material, ponderada pela massa de polímero associada.

- A avaliação de hipertermia das partículas híbridas mostrou o potencial de aplicação em tratamento de câncer. Contudo é desejada maior concentração de nanopartículas magnéticas no interior das partículas poliméricas.
- A bioconjugação de ácido fólico em partículas de PAA confirmou a efetividade do acoplamento de grupamentos carboxila com aminas, intermediado por carbodiimida. O emprego de condições mais amenas também se mostrou amigável à ancoragem da biomolécula na matriz polimérica. A associação do ácido fólico às partículas magnéticas híbridas permite o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados e sítio dirigidos para emprego de hipertermia em terapias oncológicas, que podem ser acoplados a sistemas de entrega de fármacos, proporcionando tratamentos menos invasivos e mais eficientes.

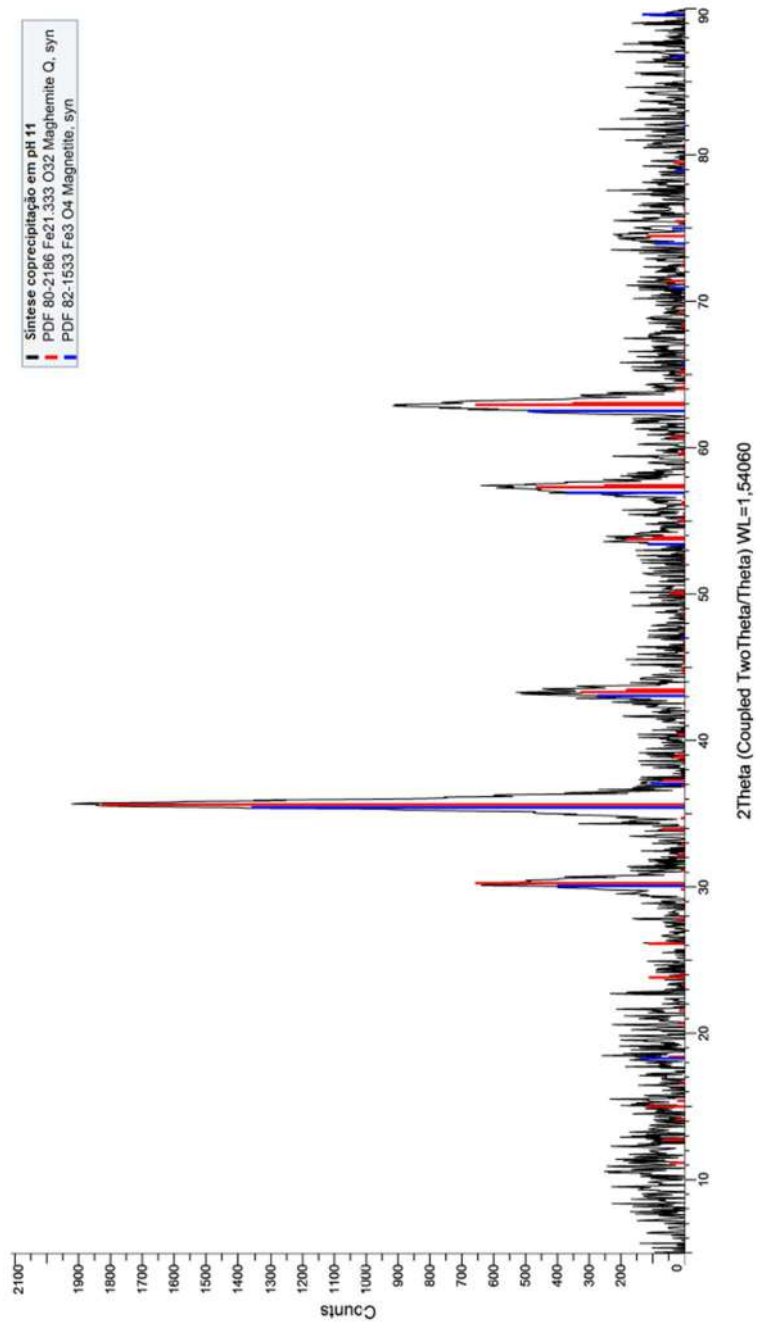
5.2. Sugestões para trabalhos futuros

- Estudo cinético da polimerização do PAA em presença do reticulante EGDMA, para avaliar o efeito do iniciador em cenários de variações multivariada de temperatura e cargas de monômero e reticulante. Também é importante determinar a concentração micelar crítica do Span 80 no óleo vegetal, para garantir que a reação de miniemulsão ocorra abaixo da condição de saturação do surfactante e não haja competição com mecanismos reacionais formadores de micela.
- Considerando as vantagens intrínsecas de cada sistema polimérico, recomenda-se para trabalhos futuros o encapsulamento de nanopartículas magnéticas, estabilizadas por citrato, em copolímeros de MMA com AA. Assim, pode ser favorecida a obtenção de partículas com distribuição de tamanho bem definidas e controladas, sem tendências a inchamento em meio aquoso, mas com a exposição de grupos funcionais favoráveis à conjugação de biomoléculas.
- Estudo do incremento de carga inorgânica nas partículas poliméricas é de fundamental importância para viabilizar aplicações práticas do sistema. Neste contexto, é enriquecedor um estudo mais aprofundado da estabilização das nanopartículas magnéticas com citrato de sódio. Havendo comprovação de aumento

do caráter organofílico das partículas magnéticas estabilizadas por citrato em meio aquoso, o ácido oleico poderia ser substituído na metodologia de encapsulamento por miniemulsão direta, com o potencial de proporcionar significativo incremento na carga de partículas magnéticas encapsuladas em PMMA. Outra alternativa seria a incorporação do material magnético *in situ* à polimerização do PAA. Neste caso, os sais de ferro precursores dos óxidos magnéticos seriam adicionados à fase aquosa junto com o monômero, sendo precipitado por adição de base ao longo da reação. Tanto os sais quanto a base têm caráter fortemente lipofílico, contribuindo como estabilizantes na formação das partículas poliméricas por miniemulsão inversa.

- O encapsulamento de quimioterápicos, com as nanopartículas magnéticas em polímeros bioconjugados a marcadores altamente específicos e seletivos pode permitir o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados complexos. Uma vez no organismo, após se concentrarem seletivamente na região tumoral de interesse, a aplicação de um campo magnético alternado externo pode ativar as nanopartículas magnéticas de forma que, nos momentos iniciais de aplicação do campo, as vibrações das nanopartículas facilitariam a liberação do fármaco, atuando no enfraquecimento das células carcinogênicas. Em um segundo momento, com a manutenção da aplicação continuada do campo magnético, as partículas magnéticas podem gerar calor suficiente para matar as células tumorais por hipertermia.

APÊNDICE A



| Formula Fe ₃ O ₄ Name Iron Oxide Name (mineral) Magnetite, syn Name (common) | | <table border="1"> <thead> <tr> <th>d</th> <th>2θ</th> <th>l</th> <th>h</th> <th>k</th> <th>l</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>4,84801</td><td>18,285</td><td>99</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>2,96879</td><td>30,077</td><td>294</td><td>2</td><td>2</td><td>0</td></tr> <tr><td>2,53179</td><td>35,426</td><td>999</td><td>3</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>2,42401</td><td>37,057</td><td>77</td><td>2</td><td>2</td><td>2</td></tr> <tr><td>2,09925</td><td>43,054</td><td>201</td><td>4</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>1,92640</td><td>47,139</td><td>6</td><td>3</td><td>3</td><td>1</td></tr> <tr><td>1,71403</td><td>53,412</td><td>85</td><td>4</td><td>2</td><td>2</td></tr> <tr><td>1,61600</td><td>56,936</td><td>274</td><td>3</td><td>3</td><td>3</td></tr> <tr><td>1,48439</td><td>62,522</td><td>361</td><td>4</td><td>4</td><td>0</td></tr> <tr><td>1,41935</td><td>65,737</td><td>8</td><td>5</td><td>3</td><td>1</td></tr> <tr><td>1,39950</td><td>66,790</td><td>-1</td><td>4</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>1,32768</td><td>70,927</td><td>28</td><td>6</td><td>2</td><td>0</td></tr> <tr><td>1,28053</td><td>73,962</td><td>68</td><td>5</td><td>3</td><td>3</td></tr> <tr><td>1,26590</td><td>74,962</td><td>28</td><td>6</td><td>2</td><td>2</td></tr> <tr><td>1,21200</td><td>78,923</td><td>21</td><td>4</td><td>4</td><td>4</td></tr> <tr><td>1,17582</td><td>81,857</td><td>4</td><td>7</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>1,12210</td><td>86,704</td><td>27</td><td>6</td><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>1,09320</td><td>89,599</td><td>97</td><td>7</td><td>3</td><td>1</td></tr> </tbody> </table> | | | | | | d | 2θ | l | h | k | l | 4,84801 | 18,285 | 99 | 1 | 1 | 1 | 2,96879 | 30,077 | 294 | 2 | 2 | 0 | 2,53179 | 35,426 | 999 | 3 | 1 | 1 | 2,42401 | 37,057 | 77 | 2 | 2 | 2 | 2,09925 | 43,054 | 201 | 4 | 0 | 0 | 1,92640 | 47,139 | 6 | 3 | 3 | 1 | 1,71403 | 53,412 | 85 | 4 | 2 | 2 | 1,61600 | 56,936 | 274 | 3 | 3 | 3 | 1,48439 | 62,522 | 361 | 4 | 4 | 0 | 1,41935 | 65,737 | 8 | 5 | 3 | 1 | 1,39950 | 66,790 | -1 | 4 | 4 | 2 | 1,32768 | 70,927 | 28 | 6 | 2 | 0 | 1,28053 | 73,962 | 68 | 5 | 3 | 3 | 1,26590 | 74,962 | 28 | 6 | 2 | 2 | 1,21200 | 78,923 | 21 | 4 | 4 | 4 | 1,17582 | 81,857 | 4 | 7 | 1 | 1 | 1,12210 | 86,704 | 27 | 6 | 4 | 2 | 1,09320 | 89,599 | 97 | 7 | 3 | 1 |
|--|---|---|---|---|---|--|--|---|----|---|---|---|---|---------|--------|----|---|---|---|---------|--------|-----|---|---|---|---------|--------|-----|---|---|---|---------|--------|----|---|---|---|---------|--------|-----|---|---|---|---------|--------|---|---|---|---|---------|--------|----|---|---|---|---------|--------|-----|---|---|---|---------|--------|-----|---|---|---|---------|--------|---|---|---|---|---------|--------|----|---|---|---|---------|--------|----|---|---|---|---------|--------|----|---|---|---|---------|--------|----|---|---|---|---------|--------|----|---|---|---|---------|--------|---|---|---|---|---------|--------|----|---|---|---|---------|--------|----|---|---|---|
| d | 2θ | l | h | k | l | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4,84801 | 18,285 | 99 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2,96879 | 30,077 | 294 | 2 | 2 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2,53179 | 35,426 | 999 | 3 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2,42401 | 37,057 | 77 | 2 | 2 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2,09925 | 43,054 | 201 | 4 | 0 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,92640 | 47,139 | 6 | 3 | 3 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,71403 | 53,412 | 85 | 4 | 2 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,61600 | 56,936 | 274 | 3 | 3 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,48439 | 62,522 | 361 | 4 | 4 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,41935 | 65,737 | 8 | 5 | 3 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,39950 | 66,790 | -1 | 4 | 4 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,32768 | 70,927 | 28 | 6 | 2 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,28053 | 73,962 | 68 | 5 | 3 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,26590 | 74,962 | 28 | 6 | 2 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,21200 | 78,923 | 21 | 4 | 4 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,17582 | 81,857 | 4 | 7 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,12210 | 86,704 | 27 | 6 | 4 | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1,09320 | 89,599 | 97 | 7 | 3 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lattice: Cubic S.G.: Fd-3m (227) | Mol. weight = 231,54 Volume [CD] = 592,07 Dx = Dm = 5,18 l/cor = 5,110 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| a = 8,39700 b = c = a/b = 1,00000 c/b = 1,00000 | alpha = beta = gamma = Z = 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ICSD Collection Code: 075627 Remark From ICSD/CSD: REM RVP Test From ICSD: Calc. density unusual but tolerable Temperature Factor: ITF Remark From ICSD/CSD: REM TEM Mentioned Sample Preparation: Annealed at 1173 K for 28 hours Additional Pattern: See PDF 19-629, PDF 72-2303, PDF 74-0748, PDF 75-0033, PDF 75-0449, PDF 75-1372, PDF 75-1610, P76-1849, PDF 77-1545, PDF 79-0417, PDF 79-0418, PDF 79-0419, PDF 85-1436, PDF 87-2334, PDF 88-0315, PDF 88-0866, PDF 89-2355, PDF 89-2388, PDF 89-3854, PDF 89-4319 and PDF 89-688 Remark From ICSD/CSD: xyz(O) from different measurements varies from .2549 to .2559, given data from table 9 Article Title: Crystal structures and cation distributions in simple spinels from powder XRD structural refinements: Mg Cr ₂ O ₄ , Zn Cr ₂ O ₄ , Fe ₃ O ₄ and the temperature dependence of the cation distribution in Zn Al ₂ O ₄ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Structure Publication: Phys. Chem. Miner. Detail: volume 20, page 541 (1994) Authors: O'Neill, H.St.C., Dollase, W.A. Primary Reference Publication: Calculated from ICSD using POWD-12++ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Radiation: CuKα1 Wavelength: 1,54060 SS/FOM: 999,9 (0,0002:18) | Filter: Not specified d-spacing: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| Formula | | Fe ₂₁ .333 O ₃₂ | | d | 2θ | l | h | k | l | d | 2θ | l | h | k | l |
|----------------|--|---------------------------------------|--|---------|--------|-----|---|---|----|---------|--------|-----|---|---|----|
| Name | | Iron Oxide | | 7.91904 | 11.164 | 25 | 1 | 0 | 1 | 2.30532 | 39.041 | 11 | 3 | 2 | 1 |
| Name (mineral) | | Maghemite Q, syn | | 6.94546 | 12.735 | 36 | 1 | 0 | 2 | 2.23094 | 40.398 | 11 | 2 | 1 | 9 |
| Name (common) | | | | 6.26055 | 14.135 | 14 | 0 | 0 | 4 | 2.23094 | 40.398 | 11 | 3 | 2 | 3 |
| | | | | 5.90250 | 14.997 | 66 | 1 | 0 | 3 | 2.19635 | 41.063 | 1 | 1 | 0 | 11 |
| | | | | 5.90250 | 14.997 | 66 | 1 | 1 | 0 | 2.19635 | 41.063 | 1 | 3 | 0 | 7 |
| | | | | 5.74507 | 15.411 | 12 | 1 | 1 | 1 | 2.17143 | 41.555 | 3 | 3 | 2 | 4 |
| | | | | 5.33902 | 16.591 | 9 | 1 | 1 | 2 | 2.12405 | 42.527 | 2 | 1 | 1 | 11 |
| | | | | 4.81937 | 18.395 | 27 | 1 | 1 | 3 | 2.12405 | 42.527 | 2 | 3 | 1 | 7 |
| Lattice: | | Tetragonal | | 4.29470 | 20.665 | 10 | 1 | 0 | 5 | 2.08685 | 43.323 | 179 | 0 | 0 | 12 |
| S.G.: | | P41212 (92) | | 4.29470 | 20.665 | 10 | 1 | 1 | 4 | 2.08685 | 43.323 | 179 | 4 | 0 | 0 |
| | | Mol. weight = | | 4.11091 | 21.568 | 9 | 2 | 0 | 1 | 2.07964 | 43.481 | 100 | 2 | 1 | 10 |
| | | Volume [CD] = | | 3.81890 | 23.274 | 4 | 1 | 1 | 5 | 2.07964 | 43.481 | 100 | 3 | 0 | 8 |
| | | Dx = | | 3.73307 | 23.816 | 01 | 1 | 0 | 6 | 2.02454 | 44.727 | 4 | 1 | 0 | 12 |
| | | Dm = | | 3.73307 | 23.816 | 01 | 2 | 0 | 3 | 2.02454 | 44.727 | 4 | 4 | 0 | 3 |
| | | I/cor = | | 3.69227 | 24.084 | 8 | 2 | 1 | 1 | 2.01796 | 44.881 | 4 | 3 | 1 | 8 |
| a = | | alpha = | | 3.40781 | 25.128 | 01 | 1 | 1 | 6 | 2.01796 | 44.881 | 4 | 4 | 1 | 1 |
| b = | | beta = | | 3.40781 | 25.128 | 01 | 2 | 1 | 3 | 1.99859 | 45.340 | 3 | 2 | 0 | 11 |
| c = | | gamma = | | 3.28820 | 27.096 | 2 | 1 | 0 | 7 | 1.99859 | 45.340 | 3 | 4 | 1 | 2 |
| a/b = | | Z = | | 3.20632 | 27.802 | 13 | 2 | 0 | 5 | 1.97976 | 45.795 | 2 | 4 | 0 | 4 |
| c/b = | | | | 3.20632 | 27.802 | 13 | 2 | 1 | 4 | 1.96750 | 46.097 | 3 | 3 | 0 | 9 |
| | | | | 3.13027 | 28.491 | 2 | 0 | 0 | 8 | 1.96750 | 46.097 | 3 | 3 | 3 | 0 |
| | | | | 3.05939 | 29.160 | 2 | 1 | 1 | 7 | 1.96146 | 46.247 | 2 | 3 | 3 | 1 |
| | | | | 2.99311 | 29.827 | 6 | 2 | 1 | 5 | 1.94365 | 46.696 | 2 | 2 | 1 | 11 |
| | | | | 2.95125 | 30.260 | 359 | 2 | 0 | 6 | 1.94365 | 46.696 | 2 | 3 | 2 | 7 |
| | | | | 2.95125 | 30.260 | 359 | 2 | 2 | 0 | 1.91502 | 47.437 | 1 | 3 | 1 | 9 |
| | | | | 2.87254 | 31.110 | 7 | 2 | 2 | 2 | 1.91502 | 47.437 | 1 | 3 | 3 | 3 |
| | | | | 2.78247 | 32.143 | 13 | 2 | 1 | 6 | 1.90945 | 47.584 | 2 | 2 | 2 | 10 |
| | | | | 2.78247 | 32.143 | 13 | 2 | 2 | 3 | 1.87699 | 48.459 | 2 | 1 | 0 | 13 |
| | | | | 2.70545 | 32.347 | 3 | 1 | 1 | 8 | 1.87699 | 48.459 | 2 | 4 | 1 | 5 |
| | | | | 2.70545 | 32.347 | 3 | 3 | 0 | 1 | 1.86137 | 48.892 | 4 | 3 | 0 | 10 |
| | | | | 2.71621 | 32.950 | 5 | 2 | 0 | 7 | 1.86137 | 48.892 | 4 | 3 | 2 | 8 |
| | | | | 2.71621 | 32.950 | 5 | 3 | 0 | 2 | 1.83127 | 49.750 | 1 | 1 | 1 | 13 |
| | | | | 2.63968 | 33.933 | 38 | 3 | 1 | 0 | 1.83127 | 49.750 | 1 | 3 | 3 | 5 |
| | | | | 2.63968 | 33.933 | 38 | 3 | 0 | 3 | 1.82155 | 50.033 | 26 | 2 | 1 | 12 |
| | | | | 2.58291 | 34.703 | 6 | 2 | 1 | 7 | 1.82155 | 50.033 | 26 | 4 | 2 | 3 |
| | | | | 2.58291 | 34.703 | 6 | 3 | 1 | 2 | 1.81675 | 50.175 | 15 | 3 | 1 | 10 |
| | | | | 2.51684 | 35.644 | 999 | 1 | 1 | 9 | 1.77967 | 51.295 | 1 | 3 | 2 | 9 |
| | | | | 2.51684 | 35.644 | 999 | 3 | 1 | 3 | 1.77967 | 51.295 | 1 | 3 | 3 | 6 |
| | | | | 2.43231 | 36.926 | 4 | 3 | 0 | 5 | 1.76196 | 51.849 | 1 | 3 | 0 | 11 |
| | | | | 2.43231 | 36.926 | 4 | 3 | 1 | 4 | 1.76196 | 51.849 | 1 | 4 | 1 | 7 |
| | | | | 2.40969 | 37.286 | 37 | 2 | 2 | 6 | 1.74902 | 52.261 | 2 | 1 | 0 | 14 |
| | | | | 2.33520 | 38.521 | 2 | 3 | 1 | 5 | 1.74902 | 52.261 | 2 | 4 | 2 | 5 |
| | | | | 2.31515 | 38.868 | 19 | 2 | 0 | 9 | 1.73636 | 52.671 | 1 | 4 | 0 | 8 |
| | | | | 2.31515 | 38.868 | 19 | 3 | 0 | 6 | 1.72398 | 53.079 | 1 | 3 | 1 | 11 |
| | | | | 2.30532 | 39.041 | 11 | 1 | 1 | 10 | 1.72398 | 53.079 | 1 | 3 | 3 | 7 |
| | | | | 2.30532 | 39.041 | 11 | 3 | 2 | 1 | 1.70391 | 53.754 | 100 | 2 | 2 | 12 |
| Radiation: | | CuKα1 | | | | | | | | | | | | | |
| Wavelength: | | 1,54060 | | | | | | | | | | | | | |
| SS/FOM: | | 999,9 (0,41) | | | | | | | | | | | | | |
| Filter: | | Not specified | | | | | | | | | | | | | |
| d-spacing: | | | | | | | | | | | | | | | |

| d | 2θ | l | h | k | l | d | 2θ | l | h | k | l | d | 2θ | l | h | k | l |
|---------|--------|-----|---|---|----|---------|--------|----|---|---|----|---------|--------|----|---|---|----|
| 1,70391 | 53,754 | 100 | 2 | 2 | 12 | 1,44341 | 64,507 | 2 | 4 | 2 | 11 | 1,27297 | 74,475 | 65 | 5 | 3 | 9 |
| 1,70391 | 53,754 | 100 | 4 | 2 | 6 | 1,43627 | 64,867 | 1 | 4 | 4 | 4 | 1,25842 | 75,485 | 16 | 2 | 2 | 18 |
| 1,69997 | 53,889 | 55 | 3 | 2 | 10 | 1,43157 | 65,106 | 11 | 3 | 3 | 12 | 1,25842 | 75,485 | 16 | 6 | 2 | 6 |
| 1,69997 | 53,889 | 55 | 4 | 1 | 8 | 1,43157 | 65,106 | 11 | 4 | 3 | 9 | 1,25211 | 75,933 | 1 | 0 | 0 | 20 |
| 1,66948 | 54,955 | 11 | 3 | 0 | 12 | 1,42923 | 65,226 | 6 | 1 | 1 | 17 | 1,25211 | 75,933 | 1 | 4 | 0 | 16 |
| 1,66948 | 54,955 | 11 | 4 | 3 | 0 | 1,42923 | 65,226 | 6 | 5 | 3 | 1 | 1,24744 | 76,268 | 1 | 5 | 1 | 13 |
| 1,66578 | 55,088 | 7 | 3 | 3 | 8 | 1,42230 | 65,584 | 1 | 5 | 2 | 7 | 1,24436 | 76,491 | 3 | 4 | 2 | 15 |
| 1,66578 | 55,088 | 7 | 4 | 3 | 1 | 1,42230 | 65,584 | 1 | 5 | 3 | 2 | 1,24436 | 76,491 | 3 | 5 | 2 | 12 |
| 1,65484 | 55,483 | 3 | 4 | 2 | 7 | 1,41097 | 66,177 | 3 | 3 | 1 | 15 | 1,23076 | 77,493 | 1 | 3 | 1 | 18 |
| 1,65484 | 55,483 | 3 | 4 | 3 | 2 | 1,41097 | 66,177 | 3 | 5 | 1 | 9 | 1,23076 | 77,493 | 1 | 6 | 1 | 9 |
| 1,64410 | 55,877 | 1 | 2 | 0 | 14 | 1,39555 | 67,004 | 1 | 4 | 1 | 13 | 1,22485 | 77,937 | 1 | 1 | 1 | 20 |
| 1,63706 | 56,139 | 7 | 1 | 0 | 15 | 1,39555 | 67,004 | 1 | 5 | 3 | 4 | 1,22485 | 77,937 | 1 | 5 | 4 | 7 |
| 1,63706 | 56,139 | 7 | 3 | 1 | 12 | 1,39123 | 67,240 | 1 | 4 | 2 | 12 | 1,22048 | 78,269 | 1 | 5 | 0 | 14 |
| 1,63357 | 56,269 | 5 | 5 | 1 | 1 | 1,39123 | 67,240 | 1 | 4 | 4 | 6 | 1,22048 | 78,269 | 1 | 6 | 3 | 4 |
| 1,62324 | 56,659 | 2 | 3 | 2 | 11 | 1,38909 | 67,357 | 2 | 2 | 0 | 17 | 1,21188 | 78,933 | 1 | 5 | 3 | 11 |
| 1,62324 | 56,659 | 2 | 5 | 1 | 2 | 1,38909 | 67,357 | 2 | 5 | 2 | 8 | 1,20484 | 79,485 | 18 | 4 | 4 | 12 |
| 1,60646 | 57,306 | 255 | 1 | 1 | 15 | 1,37644 | 68,061 | 1 | 3 | 3 | 13 | 1,19249 | 80,475 | 3 | 3 | 2 | 18 |
| 1,60646 | 57,306 | 255 | 5 | 1 | 3 | 1,37644 | 68,061 | 1 | 5 | 3 | 5 | 1,19249 | 80,475 | 3 | 6 | 2 | 9 |
| 1,60316 | 57,435 | 138 | 4 | 0 | 10 | 1,37230 | 68,294 | 6 | 1 | 0 | 18 | | | | | | |
| 1,60316 | 57,435 | 138 | 4 | 2 | 8 | 1,37230 | 68,294 | 6 | 6 | 0 | 3 | | | | | | |
| 1,58381 | 58,203 | 2 | 3 | 0 | 13 | 1,37025 | 68,411 | 3 | 2 | 1 | 17 | | | | | | |
| 1,58381 | 58,203 | 2 | 4 | 3 | 5 | 1,37025 | 68,411 | 3 | 6 | 1 | 1 | | | | | | |
| 1,57439 | 58,585 | 1 | 4 | 1 | 10 | 1,35413 | 69,340 | 10 | 3 | 2 | 15 | | | | | | |
| 1,56514 | 58,965 | 1 | 0 | 0 | 16 | 1,35413 | 69,340 | 10 | 5 | 2 | 9 | | | | | | |
| 1,55605 | 59,344 | 1 | 3 | 1 | 13 | 1,34628 | 69,803 | 1 | 3 | 1 | 16 | | | | | | |
| 1,55605 | 59,344 | 1 | 5 | 1 | 5 | 1,34628 | 69,803 | 1 | 4 | 3 | 11 | | | | | | |
| 1,55007 | 59,596 | 11 | 2 | 0 | 15 | 1,34048 | 70,150 | 1 | 4 | 2 | 13 | | | | | | |
| 1,55007 | 59,596 | 11 | 3 | 2 | 12 | 1,34048 | 70,150 | 1 | 4 | 1 | 14 | | | | | | |
| 1,54711 | 59,722 | 6 | 3 | 3 | 10 | 1,33475 | 70,495 | 1 | 4 | 4 | 8 | | | | | | |
| 1,54711 | 59,722 | 6 | 5 | 2 | 1 | 1,32910 | 70,840 | 1 | 5 | 1 | 11 | | | | | | |
| 1,52970 | 60,472 | 1 | 2 | 2 | 14 | 1,32910 | 70,840 | 1 | 5 | 3 | 7 | | | | | | |
| 1,52402 | 60,721 | 23 | 2 | 1 | 15 | 1,31984 | 71,413 | 32 | 2 | 0 | 16 | | | | | | |
| 1,52402 | 60,721 | 23 | 5 | 1 | 6 | 1,31984 | 71,413 | 32 | 6 | 2 | 0 | | | | | | |
| 1,51285 | 61,217 | 1 | 1 | 1 | 16 | 1,31257 | 71,870 | 1 | 6 | 2 | 2 | | | | | | |
| 1,51285 | 61,217 | 1 | 4 | 3 | 7 | 1,30364 | 72,440 | 7 | 2 | 1 | 18 | | | | | | |
| 1,50464 | 61,588 | 1 | 3 | 0 | 14 | 1,30364 | 72,440 | 7 | 4 | 0 | 15 | | | | | | |
| 1,50464 | 61,588 | 1 | 5 | 2 | 4 | 1,29664 | 72,883 | 1 | 3 | 2 | 16 | | | | | | |
| 1,47563 | 62,935 | 359 | 4 | 0 | 12 | 1,29664 | 72,883 | 1 | 5 | 4 | 2 | | | | | | |
| 1,47563 | 62,935 | 359 | 4 | 4 | 0 | 1,28803 | 73,460 | 1 | 4 | 1 | 15 | | | | | | |
| 1,47307 | 63,057 | 192 | 5 | 0 | 8 | 1,28803 | 73,460 | 1 | 5 | 1 | 12 | | | | | | |
| 1,45310 | 64,026 | 12 | 4 | 1 | 12 | 1,28633 | 73,573 | 1 | 1 | 1 | 19 | | | | | | |
| 1,45310 | 64,026 | 12 | 4 | 4 | 3 | 1,28633 | 73,573 | 1 | 3 | 1 | 17 | | | | | | |
| 1,45066 | 64,146 | 7 | 1 | 0 | 17 | 1,28127 | 73,912 | 1 | 5 | 2 | 11 | | | | | | |
| 1,45066 | 64,146 | 7 | 5 | 1 | 8 | 1,28127 | 73,912 | 1 | 6 | 1 | 7 | | | | | | |
| 1,44341 | 64,507 | 2 | 2 | 1 | 16 | 1,27297 | 74,475 | 65 | 3 | 3 | 15 | | | | | | |
| 1,44341 | 64,507 | 2 | 4 | 2 | 11 | 1,27297 | 74,475 | 65 | 5 | 3 | 9 | | | | | | |

APÊNDICE B

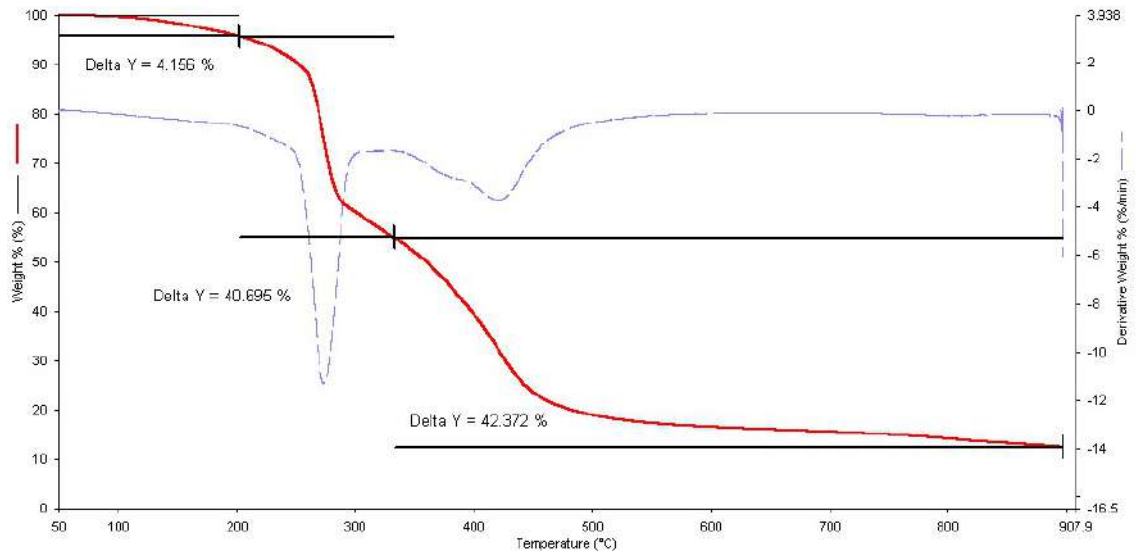


Figura 47 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução em ausência de EGDMA.

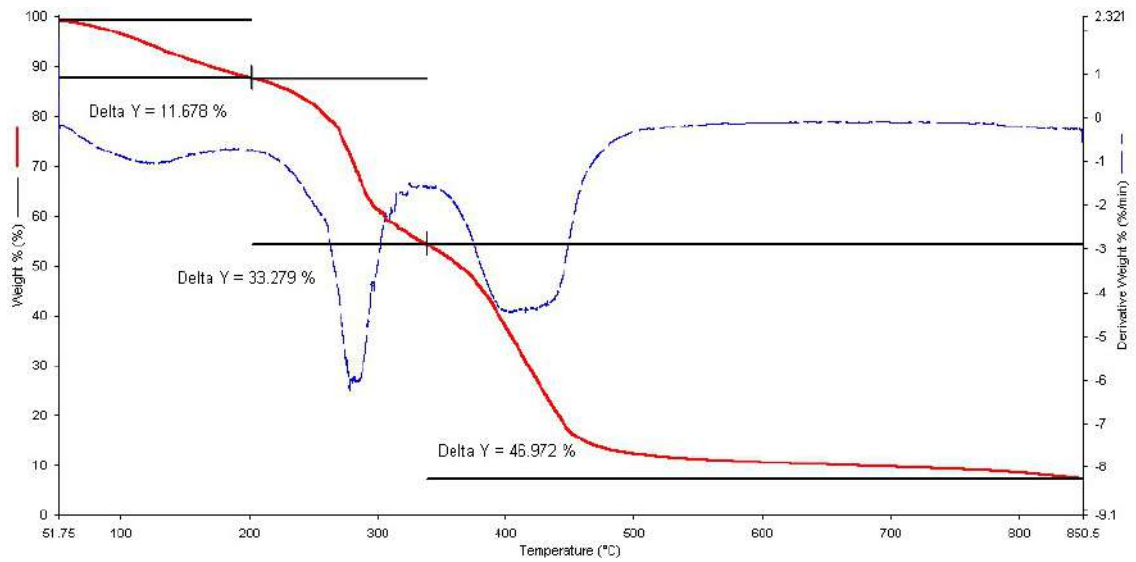


Figura 48 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 3 % p/p de EGDMA.

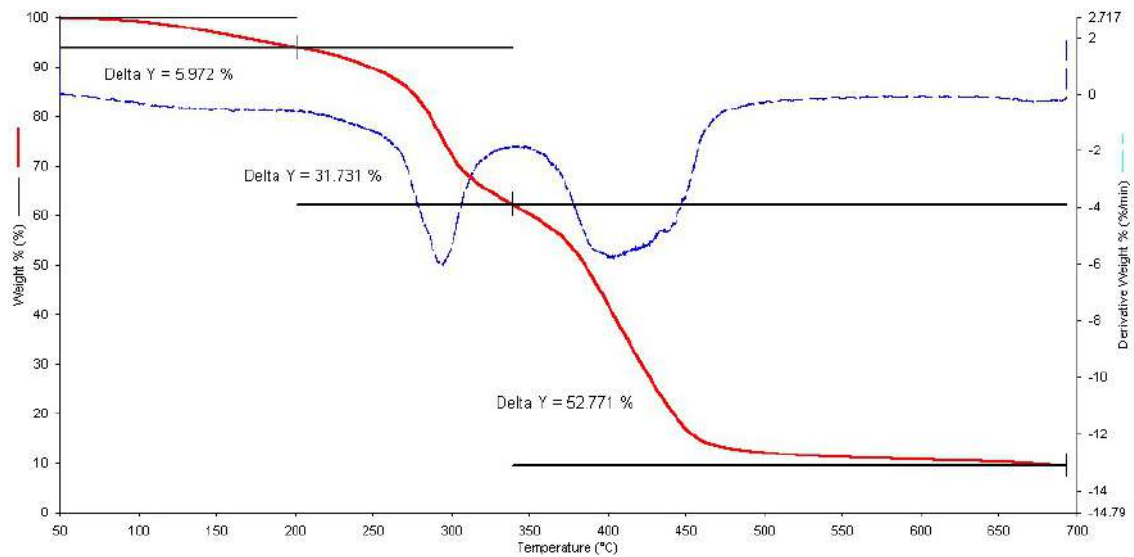


Figura 49 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 7 % p/p de EGDMA.

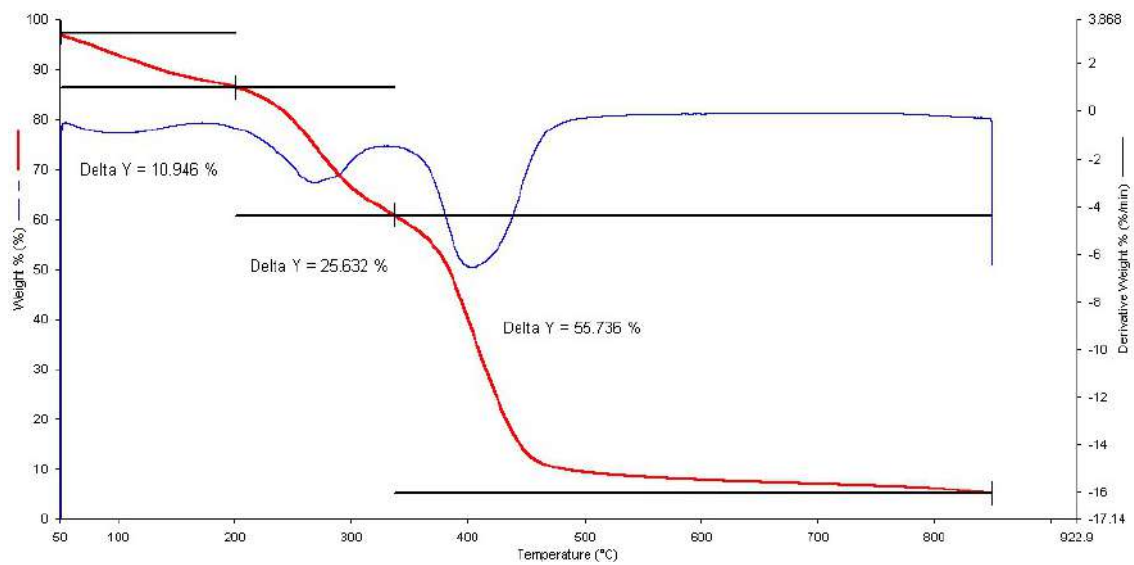


Figura 50 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 10 % p/p de EGDMA.

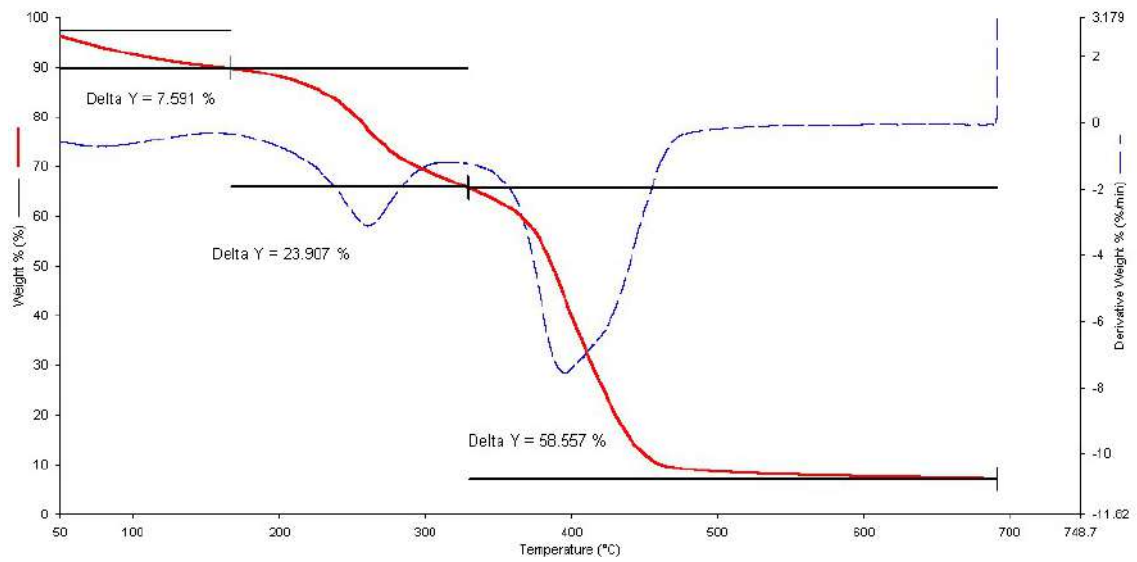


Figura 51 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 15 % p/p de EGDMA.

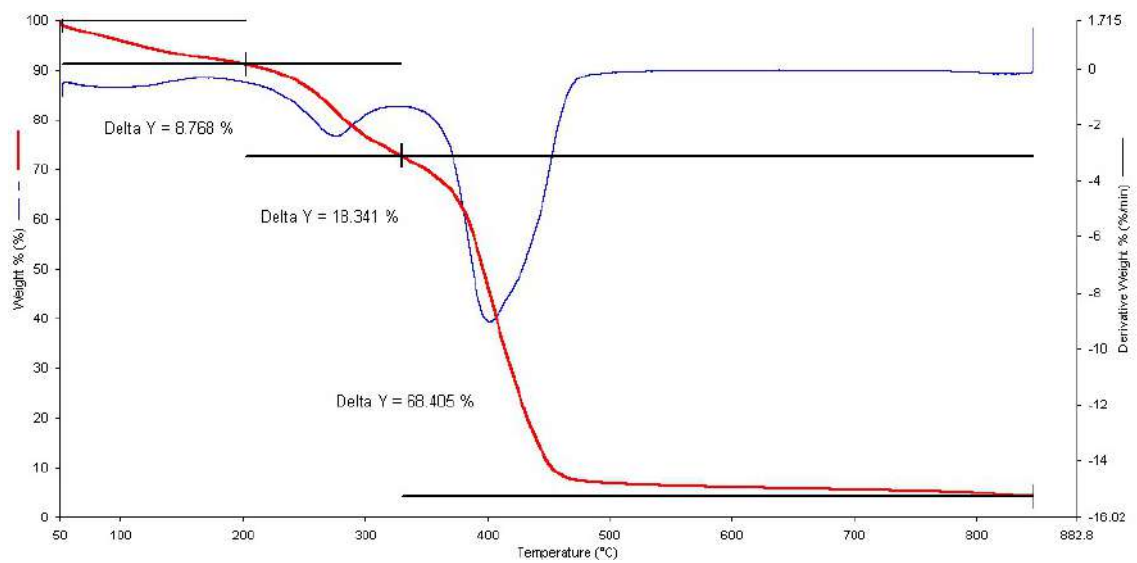


Figura 52 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 30 % p/p de EGDMA.

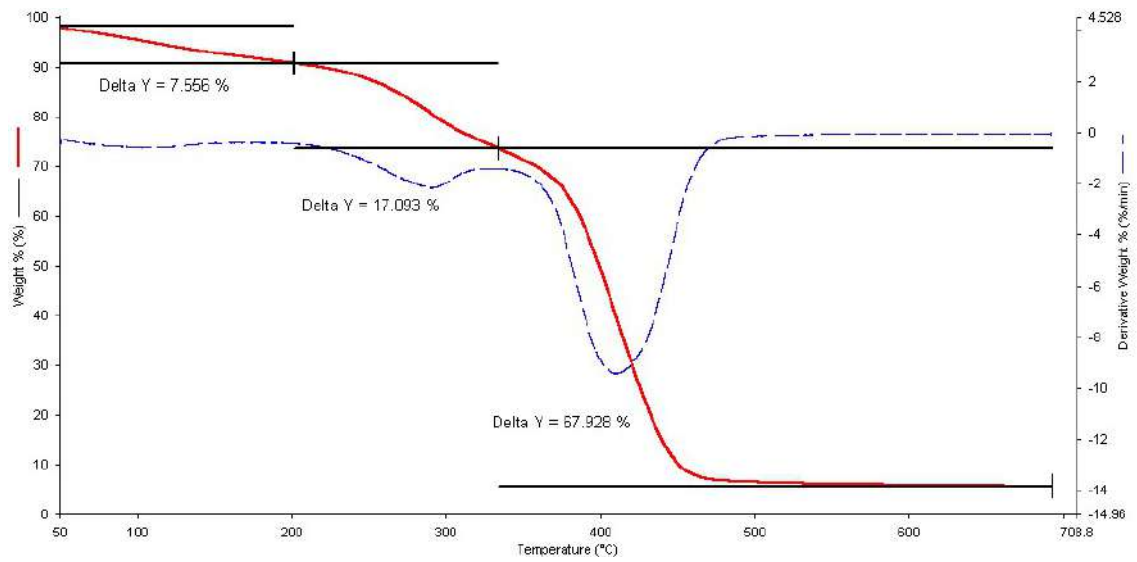


Figura 53 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 40 % p/p de EGDMA.

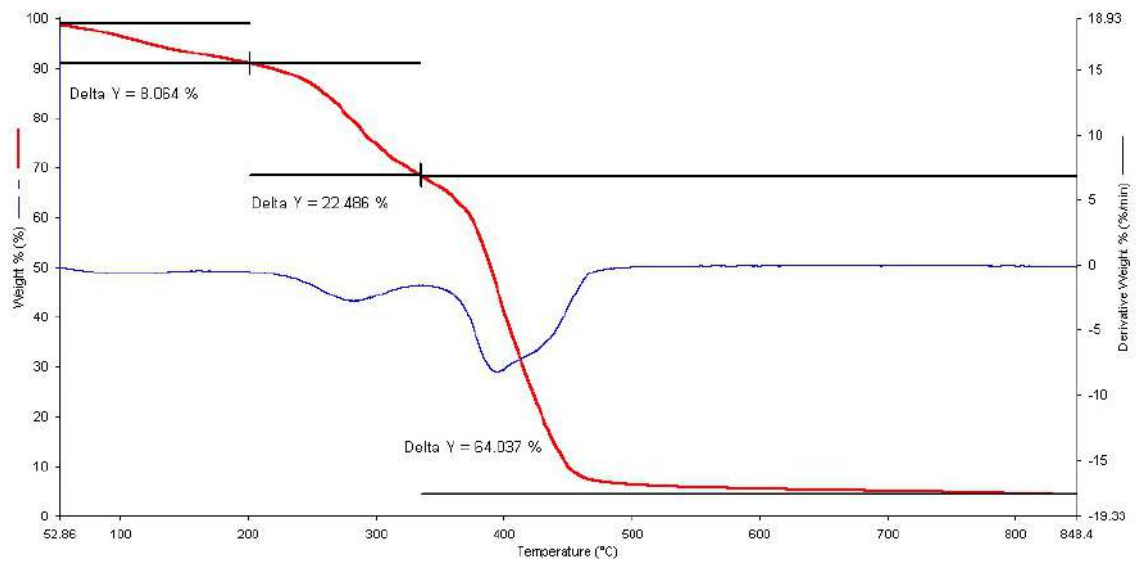


Figura 54 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 42 % p/p de EGDMA.

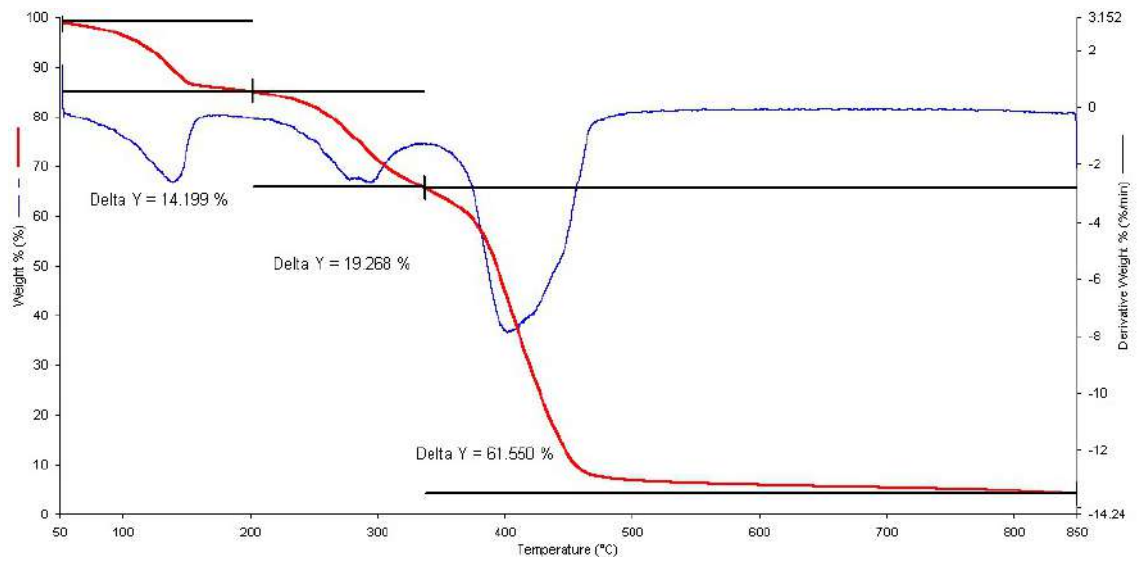


Figura 55 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 45 % p/p de EGDMA.

APÊNDICE C

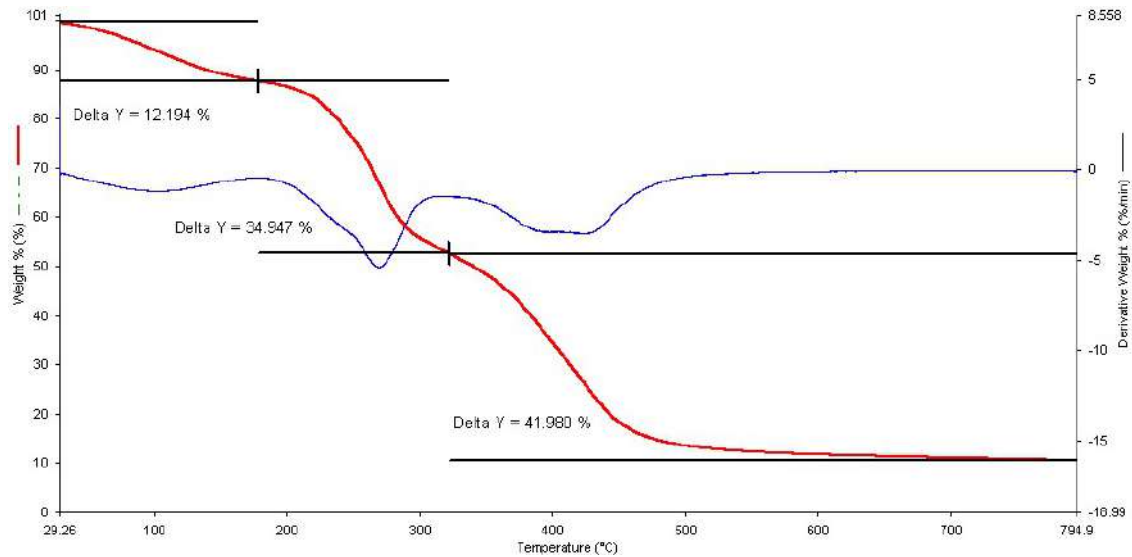


Figura 56 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (1,1,1) do planejamento experimental.

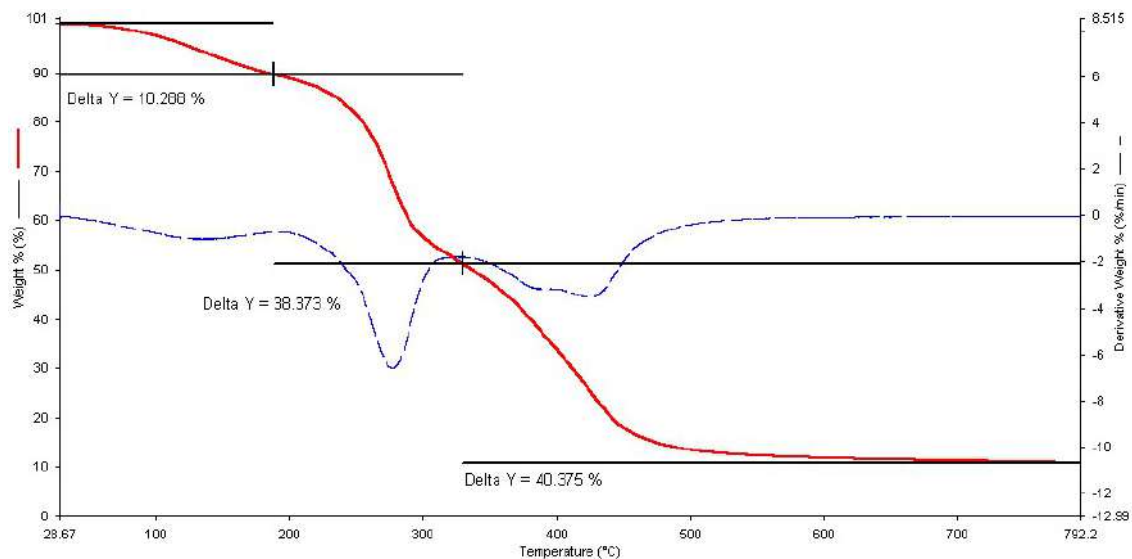


Figura 57 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (1,1,-1) do planejamento experimental.

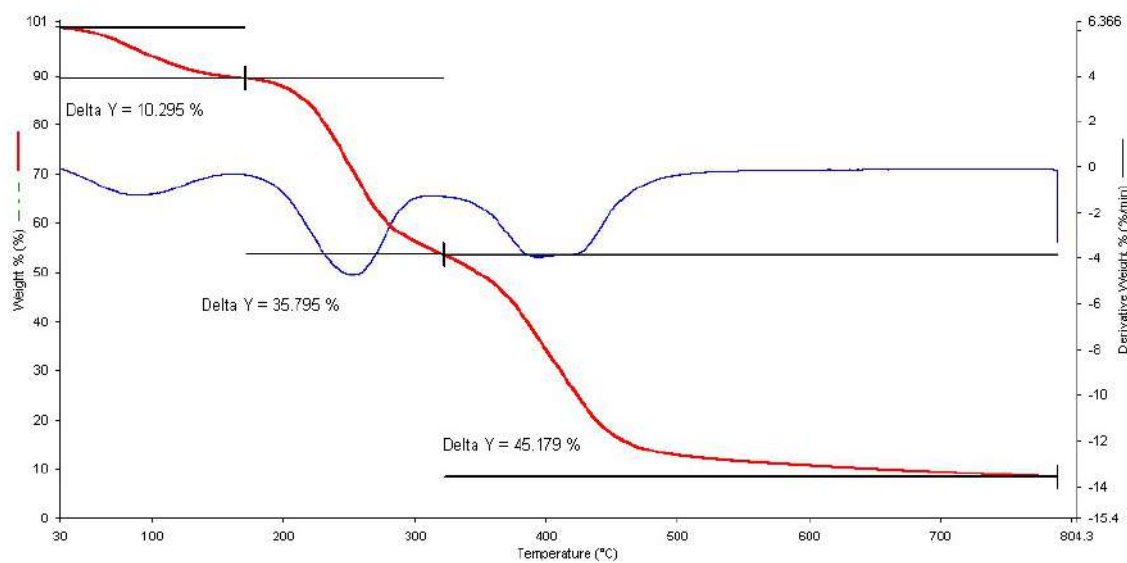


Figura 58 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (1,-1,1) do planejamento experimental.

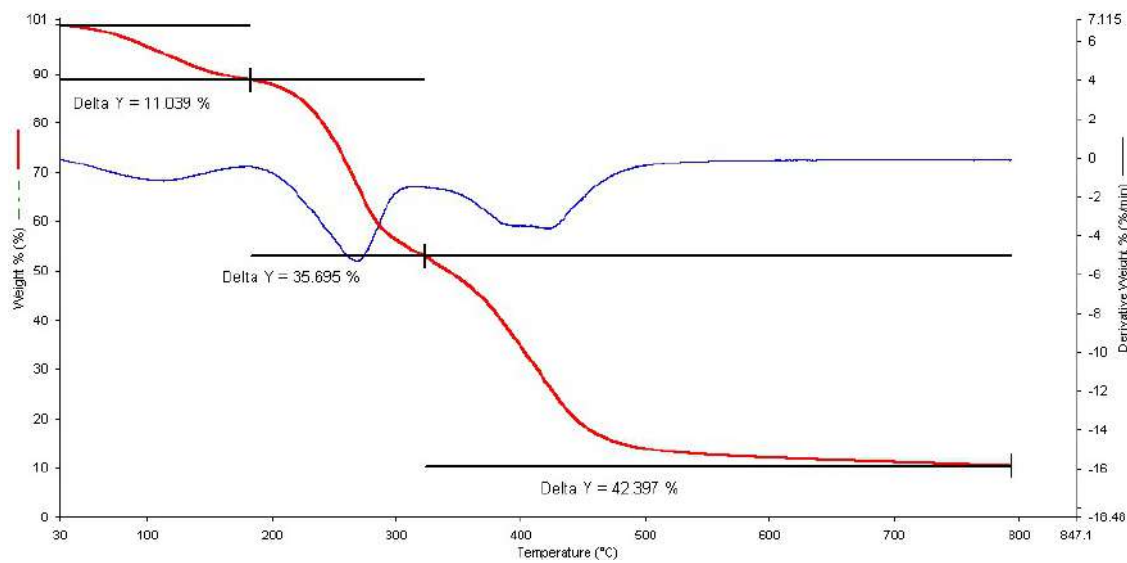


Figura 59 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (1,-1,-1) do planejamento experimental.

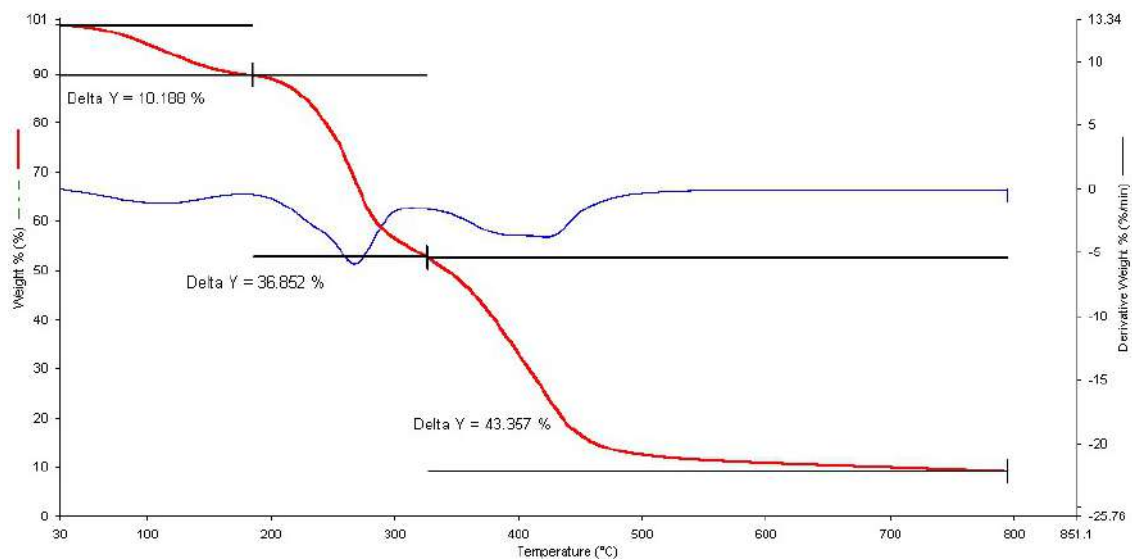


Figura 60 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (-1,1,1) do planejamento experimental.

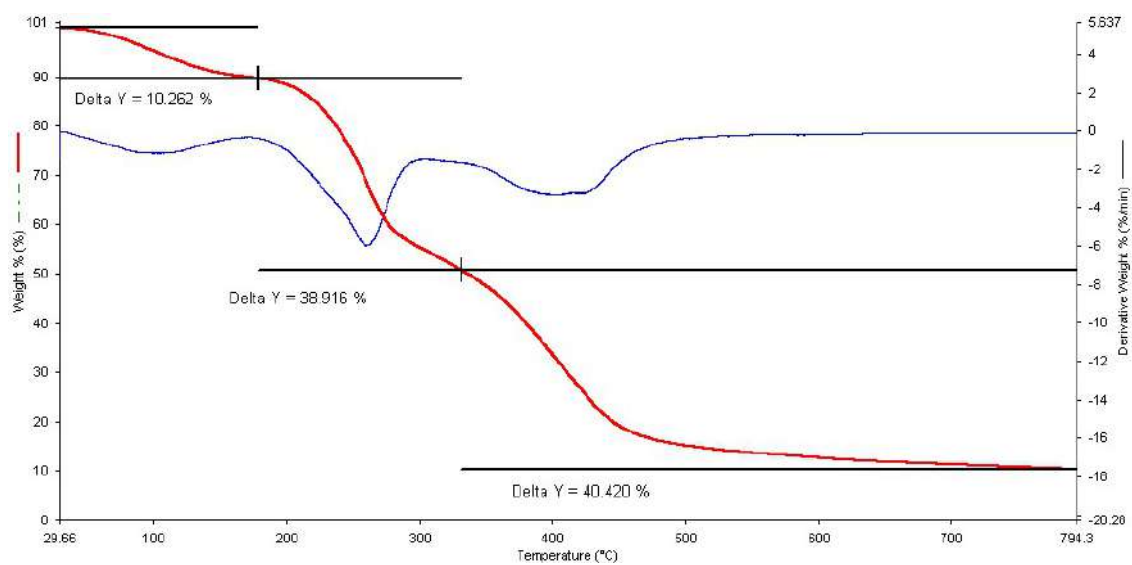


Figura 61 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (-1,1,-1) do planejamento experimental.

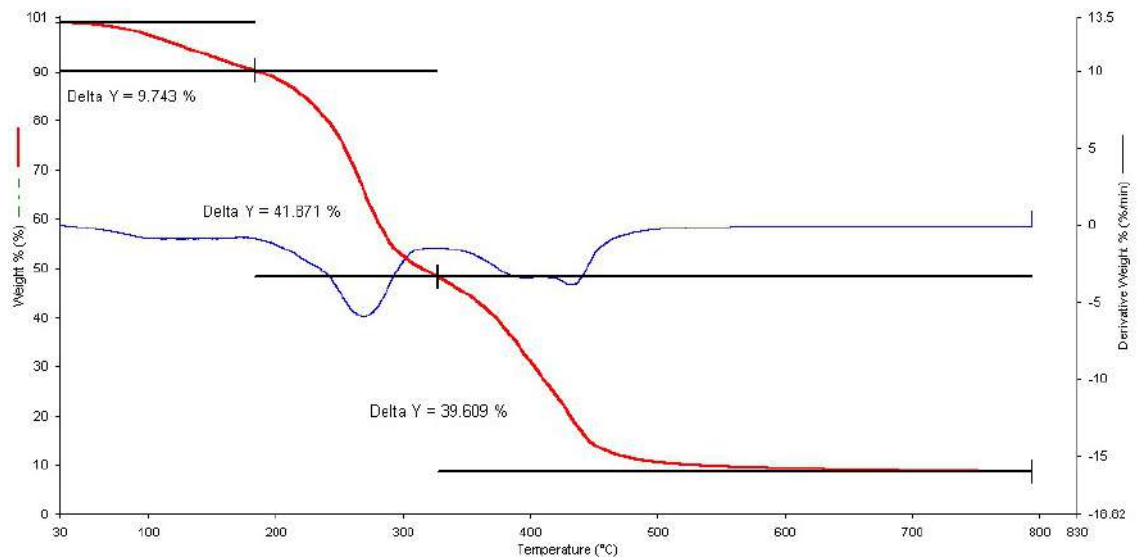


Figura 62 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (-1,-1,1) do planejamento experimental.

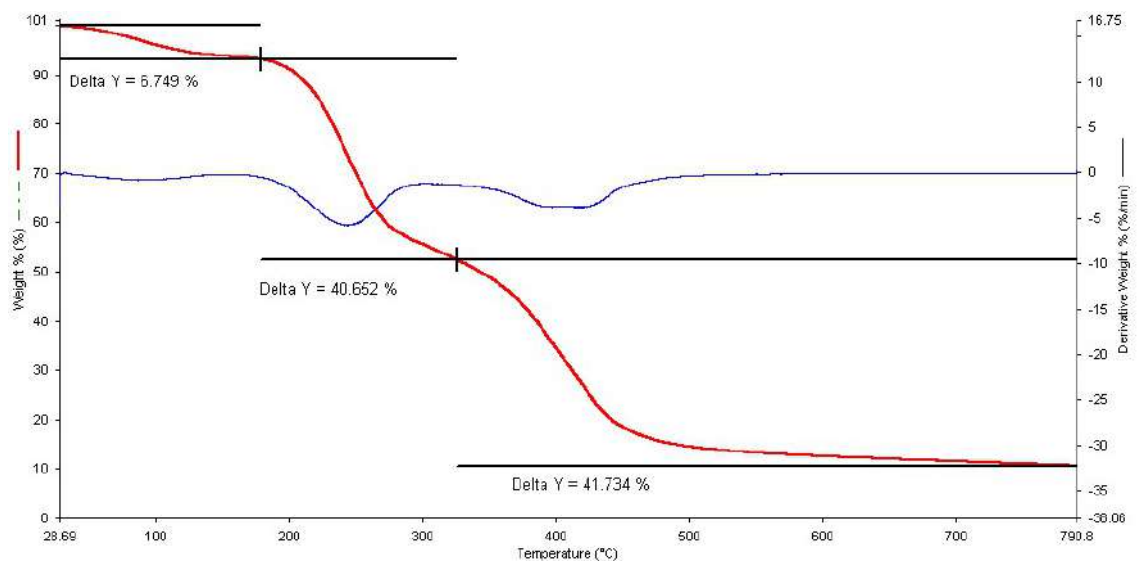


Figura 63 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (-1,-1,-1) do planejamento experimental.

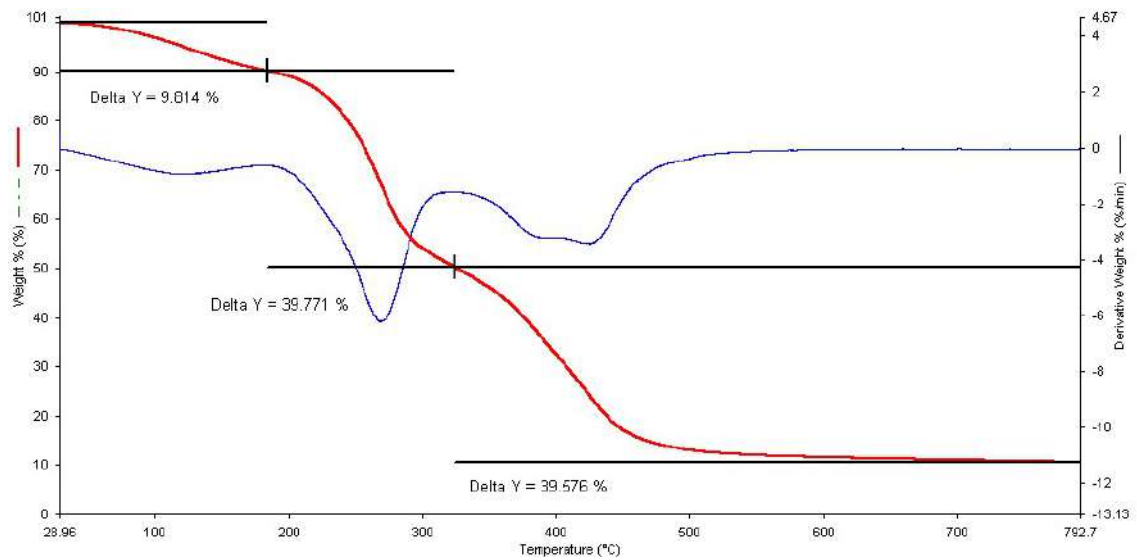


Figura 64 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para o 1º ponto central do planejamento experimental.

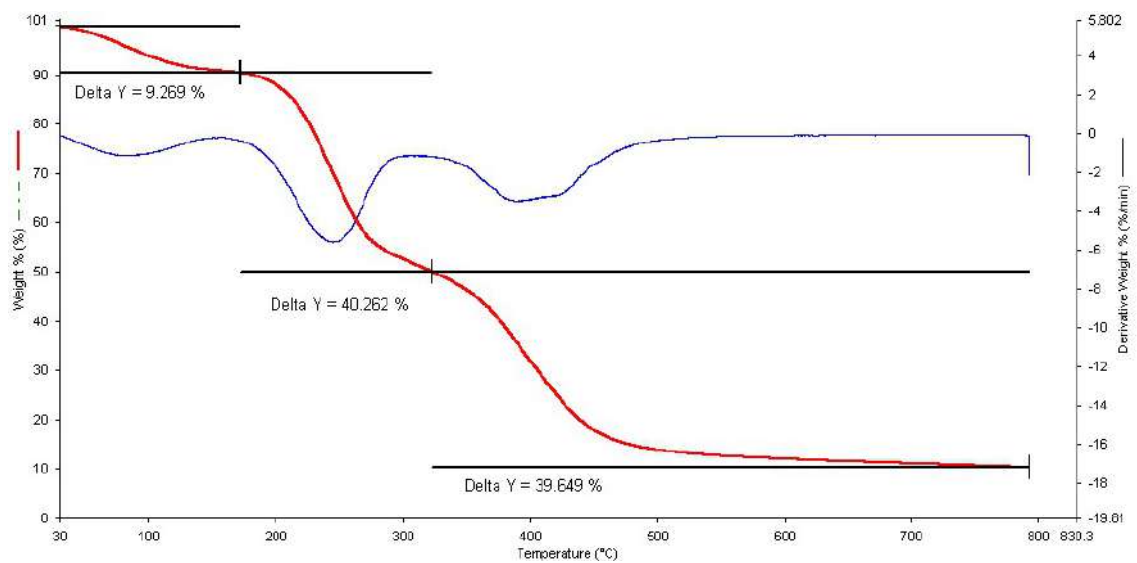


Figura 65 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para o 2º ponto central do planejamento experimental.

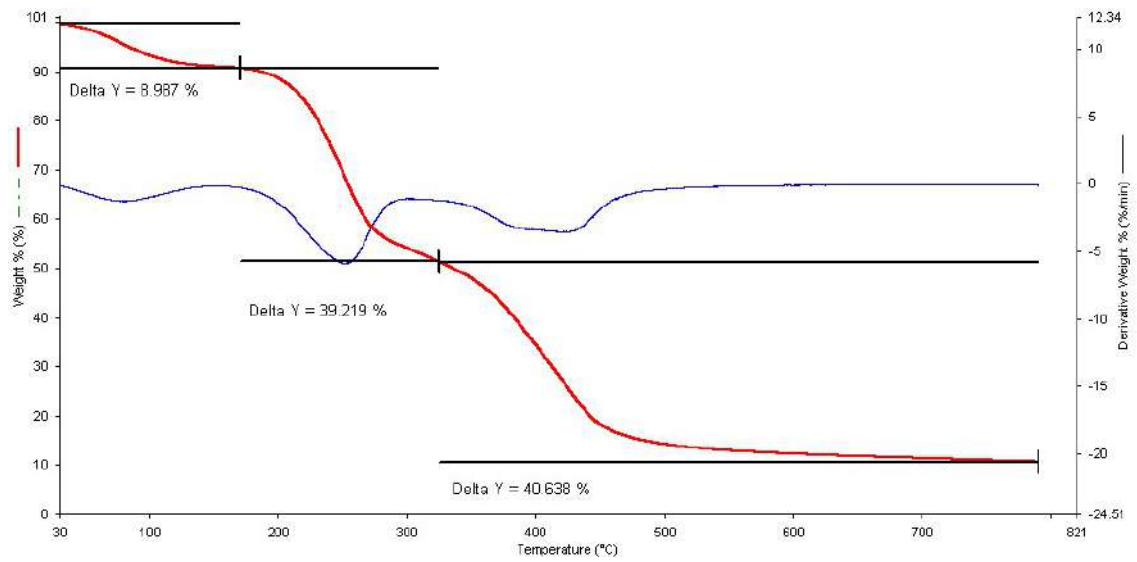


Figura 66 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para o 3º ponto central do planejamento experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAL, Z. U.; ALPSOY, L.; BAYKAL, A. Superparamagnetic iron oxide conjugated with folic acid and carboxylated quercetin for chemotherapy applications. **Ceramics International**, v. 42, n. 7, p. 9065–9072, 2016.

ALABURDA, J. et al. Determination of folic acid in fortified wheat flours. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 336–342, 2008.

ALVES, A. M. R. **Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas para tratamento de cancro: estudo da síntese e estabilização das soluções coloidais de Fe₃O₄**. [s.l.] Universidade Nova de Lisboa, 2012.

BAHRAMI, B. et al. Folate-conjugated nanoparticles as a potent therapeutic approach in targeted cancer therapy. **Tumor Biology**, v. 36, n. 8, p. 5727–5742, 2015.

BALUZ, K.; DO CARMO, M. DAS G. T.; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica : revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 4, p. 597–607, 2002.

BEDÊ, P. M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para aplicações médicas**. [s.l.] Instituto Militar de Engenharia, 2010.

BLANCO-ANDUJAR, C. et al. Real-time tracking of delayed-onset cellular apoptosis induced by intracellular magnetic hyperthermia. **Nanomedicine**, v. 11, n. DECEMBER, p. 121–136, 2016.

BOYER, C. et al. The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. **NPG Asia Materials**, v. 2, n. 1, p. 23–30, 2010.

BROLLO, M. E. F. et al. Magnetic hyperthermia in brick-like Ag@Fe₃O₄ core-shell nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 397, p. 20–27, 2016.

CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos**

e engenheiros. 2^a ed. [s.l.: s.n.].

CAPEK, I. On inverse miniemulsion polymerization of conventional water-soluble monomers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 156, n. 1–2, p. 35–61, 2010.

CAROTHERS, W. H. An Introduction to the General Theory of Condensation Polymers. **Am. Chem. Soc.**, v. 51, n. 1833, p. 2548–2559, 1929.

CARRIÃO, M. S.; BAKUZIS, A. F. Mean-field and linear regime approach to magnetic hyperthermia of core-shell nanoparticles : can tiny nanostructures fight cancer? p. 8363–8377, 2016.

CHEN, B. et al. Anticorrosive properties of oligoaniline containing photo-cured coatings. v. 10, p. 9154–9166, 2015.

CHEVREL, M. C. et al. In situ monitoring of acrylic acid polymerization in aqueous solution using rheo-Raman technique. Experimental investigation and theoretical modelling. **Chemical Engineering Science**, v. 106, p. 242–252, 2014.

CHIMONIDES, G. F. et al. Facile synthesis of polymer-peptide conjugates via direct amino acid coupling chemistry. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 4853–4859, 2013.

CUI, D. C. et al. Poly(acrylic acid) microspheres loaded with lidocaine: Preparation and characterization for arterial embolization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 527–535, 2012.

CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to Magnetic Materials**. 2. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2011.

DEFOREST, C. A; POLIZZOTTI, B. D.; ANSETH, K. S. Sequential click reactions for synthesizing and patterning three-dimensional cell microenvironments. **Nature materials**, v. 8, n. 8, p. 659–664, 2009.

DIAS, C. S. B. **Estudo de vórtice magnético em nanopartículas para aplicações em hipertermia magnética**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2014.

DIMRI, M. C. et al. Room-temperature ferromagnetism in Ca and Mg stabilized cubic

zirconia bulk samples and thin films prepared by pulsed laser deposition. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 45, n. 47, p. 475003, 2012.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337–4351, 2003.

ESTELRICH, J. et al. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 8070–8101, 2015.

FERREIRA, R. V. **Síntese e Caracterização de Nanopartículas Magnéticas Funcionalizadas com Núcleo Magnético de Magnetita**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

FEUSER, P. E. et al. Encapsulation of magnetic nanoparticles in poly(methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of hyperthermia in U87MG cells. **European Polymer Journal**, v. 68, p. 355–365, 2015.

FILHO, A. C. G. **Estudo da estrutura e propriedades magnéticas e elétricas de ferritas de Ni²⁺/Zn²⁺ dopadas com Nd³⁺**. [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2014.

FLORY, P. J. **Principles of Polymer Chemistry**. Ithaca, N.Y.: Cornell University Press, 1953.

FONSECA, L. B. et al. Production of PMMA Nanoparticles Loaded with Praziquantel Through “In Situ” Miniemulsion Polymerization. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 7, n. 1, p. 54–63, 2013.

FORTIN, J. P. et al. Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 9, p. 2628–2635, 2007.

GILCHRIST, R. K. et al. Selective Inductive Heating of Lymph Nodes *. **Annals of surgery**, v. 146, n. 4, p. 596–606, 1957.

GRIBANOV, N. M. et al. Physico-chemical regularities of obtaining highly dispersed magnetite by the method of chemical condensation. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 85, p. 7–10, 1990.

HERGT, R. et al. Maghemite nanoparticles with very high AC-losses for application in RF-magnetic hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 270, n. 3, p. 345–357, 2004.

HERGT, R. et al. Magnetic properties of bacterial magnetosomes as potential diagnostic and therapeutic tools. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 80–86, 2005.

HERGT, R.; DUTZ, S. Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a visionary tumour therapy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, n. 1 SPEC. ISS., p. 187–192, 2007.

HERMANSON, G. T. Introduction to Bioconjugation. In: **Bioconjugate Techniques**. 3^a ed. [s.l: s.n.]. p. 1–125.

HERMANSON, G. T. Zero-Length Crosslinkers. In: **Bioconjugate Techniques**. 3^a ed. [s.l: s.n.]. p. 259–273.

JAYAKRISHNAN, A. et al. Endovascular embolization using hydrogel microspheres. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 5, n. 9–10, p. 723–727, 1994.

JEONG, U. et al. Superparamagnetic colloids: Controlled synthesis and niche applications. **Advanced Materials**, v. 19, n. 1, p. 33–60, 2007.

JIA, C. J. et al. Large-scale synthesis of single-crystalline iron oxide magnetic nanorings. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 50, p. 16968–16977, 2008.

JOHANNSEN, M. et al. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. **International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group**, v. 21, n. March 2016, p. 637–647, 2005.

JORDAN, A. et al. Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 225, n. 1–2, p. 118–126, 2001.

KALLUMADIL, M. et al. Suitability of commercial colloids for magnetic

hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 10, p. 1509–1513, 2009.

KHANNA, L.; VERMA, N. K. Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity study of calcium ferrite nanoparticles. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 16, n. 6, p. 1842–1848, 2013.

KHOSROSHAHI, M. E. et al. Nanoshell-mediated targeted photothermal therapy of HER2 human breast cancer cells using pulsed and continuous wave lasers: an in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 7, p. 1913–1922, 2015.

KILLION, J. A. et al. Mechanical properties and thermal behaviour of PEGDMA hydrogels for potential bone regeneration application. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 7, p. 1219–1227, 2011.

KIM, D. et al. Synthesis of Uniform Ferrimagnetic Magnetite Nanocubes - Journal of the American Chemical Society (ACS Publications). **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 2, p. 454–5, 2009.

KIM, H. C.; NOH, S. M.; PARK, S. K. Synthesis and characterization of nanosilica ball-PMMA hybrid composites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 3, p. 1653–1658, 2013.

KOLHATKAR, A. G. et al. **Tuning the magnetic properties of nanoparticles**. [s.l.: s.n.]. v. 14

KOSTOPOULOU, A et al. Assembly-mediated interplay of dipolar interactions and surface spin disorder in colloidal maghemite nanoclusters. **Nanoscale**, v. 6, n. 7, p. 3764–76, 2014.

KRALJ, S.; DROFENIK, M.; MAKOVEC, D. Controlled surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles with terminal amino and carboxyl groups. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 7, p. 2829–2841, 2011.

KRIWET, B.; WALTER, E.; KISSEL, T. Synthesis of bioadhesive poly(acrylic acid) nano- and microparticles using an inverse emulsion polymerization method for the entrapment of hydrophilic drug candidates. **Journal of Controlled Release**, v. 56, n. 1–3, p. 149–158, 1998.

KUMAR, C. S. S. R.; MOHAMMAD, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 9, p. 789–808, 2011.

LANDFESTER, K. Synthesis of Colloidal Particles in Miniemulsions. **Annu. Rev. Mater. Res.**, v. 36, p. 231–79, 2006.

LANDFESTER, K. Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, n. 25, p. 4488–4508, 2009.

LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A.; MAILANDER, V. From polymeric particles to multifunctional nanocapsules for biomedical applications using the miniemulsion process. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 493–515, 1 fev. 2010.

LANDFESTER, K.; WILLERT, M.; ANTONIETTI, M. Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions. **Macromolecules**, v. 33, n. 7, p. 2370–2376, 2000.

LAURENT, S. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physical characterizations, and biological applications. **Chem Rev**, v. 108, p. 2064–2110, 2008.

LAURENT, S. et al. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 166, n. 1–2, p. 8–23, 2011.

LEE, N.; HYEON, T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2575–2589, 2012.

LI, L. et al. Insights into the roles of organic coating in tuning the defect chemistry of monodisperse TiO(2) nanocrystals for tailored properties. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 12, p. 10857–10864, 2010.

LIN, C.; CHIU, W.; DON, T. Superparamagnetic Thermoresponsive Composite Latex via W / O Miniemulsion Polymerization. n. September, 2006.

- LING, D.; HYEON, T. Chemical design of biocompatible iron oxide nanoparticles for medical applications. **Small Journal**, v. 9, n. 9–10, p. 1450–1466, 2013.
- LING, D.; LEE, N.; HYEON, T. Chemical synthesis and assembly of uniformly sized iron oxide nanoparticles for medical applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 5, p. 1276–1285, 2015.
- LIU, W. et al. Folic acid conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for nondestructive separation and detection of ovarian cancer cells from whole blood. **Biomater. Sci.**, v. 4, n. 1, p. 159–166, 2016.
- LIU, X. L.; FAN, H. M. Innovative magnetic nanoparticle platform for magnetic resonance imaging and magnetic fluid hyperthermia applications. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 4, p. 38–46, 2014.
- LORCA, B. S. S. et al. Preparation of PMMA nanoparticles loaded with benzophenone-3 through miniemulsion polymerization. **Macromolecular Symposia**, v. 319, n. 1, p. 246–250, 2012.
- LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222–1244, 2007.
- LUO, Y.; DAI, C.; CHIU, W. Polystyrene / Fe₃O₄ Composite Latex via Miniemulsion Polymerization-Nucleation Mechanism and Morphology. p. 1014–1024, 2007.
- MAHAJAN, S. et al. Preparation and in vitro evaluation of folate-receptor-targeted SPION–polymer micelle hybrids for MRI contrast enhancement in cancer imaging. **Nanotechnology**, v. 24, n. 1, p. 15603, 2013.
- MAIER-HAUFF, K. et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 103, n. 2, p. 317–324, 2011.
- MELO, C. K. et al. In Situ Incorporation of Recycled Polystyrene in Styrene Suspension Polymerizations. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 8, n. 1, p. 46–60, 2014.

MERCANTE, L. A. **Síntese e funcionalização de nanopartículas magnéticas para aplicações biomédicas.** [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2013.

METTLER. Disponível em: <<http://www.mt.com>>. Acesso em: 5 out. 2016.

MIN, K.; SILBERSTEIN, M.; ALURU, N. R. Crosslinking PMMA: Molecular dynamics investigation of the shear response. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 52, n. 6, p. 444–449, 2014.

MOLNAR, R. M. et al. Preparation and characterization of poly(acrylic acid)-based nanoparticles. **Colloid and Polymer Science**, v. 287, n. 6, p. 739–744, 2009.

NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. **Bioconjugate chemistry**, v. 6, n. 1, p. 123–130, 1995.

NANOMED. **Braço online da revista Nature publica artigo da Rede Pró Centro-Oeste.** Disponível em: <<http://fundect.ledes.net/news/3157/brao-o-online-da-revista-nature-publica-artigo-da-rede-para-centro-oeste>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

ODIAN, G. **Principles of Polymerization.** 4^a ed. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 2004.

OLIVEIRA, M. A. M. et al. In situ incorporation of doxorubicin in copolymer particles during suspension polymerization. **Macromolecular Symposia**, v. 319, n. 1, p. 23–33, 2012.

OLIVEIRA, M. A. M.; NELE, M.; PINTO, J. C. Polimerização RAFT em Miniemulsão. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 23, n. 6, p. 784–797, 2013.

PAIVA, T. F. **Análise de Processos de Nanoencapsulamento de Filtros Solares.** [s.l: s.n.].

PAIVA, T.; MELO, P.; PINTO, J. C. Comparative Analysis of Sunscreen Nanoencapsulation Processes. **Macromolecular Symposia**, v. 368, n. 1, p. 60–69, 2016.

PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 167, 2003.

PEIXOTO, A. C. B. **Funcionalização de nanopartículas poliméricas para liberação de medicamentos sítio-dirigida**. [s.l.] COPPE/UFRJ, 2013.

PEPPAS, N. A. et al. Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. **Advanced Materials**, v. 18, n. 11, p. 1345–1360, 2006.

PERECIN, C. J. et al. Nanopartículas superparamagnéticas encapsuladas com polímeros para aplicação no tratamento de câncer por hipertermia. **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, p. 2703–2706, 2014.

PINTO, M. C. C. et al. Production of poly(acrylic acid) particles dispersed in organic media. **Macromolecular Symposia**, v. 319, n. 1, p. 15–22, 2012.

PUBLISHERS, E. S. Short Communication Determination of folic acid in an elemental diet by high- performance liquid chromatography with UV detection. **Science**, v. 609, p. 277–280, 1992.

QIAO, R. R.; YANG, C. H.; GAO, M. Y. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 35, p. 6274–6293, 2009.

RODRIGUES, A. R. O. et al. Magnetoliposomes based on manganese ferrite nanoparticles as nanocarriers for antitumor drugs. **RSC Adv.**, v. 6, n. 21, p. 17302–17313, 2016.

ROMIO, A. P. et al. Encapsulation of magnetic nickel nanoparticles via inverse miniemulsion polymerization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, n. 3, p. 1426–1433, 2013.

SADHASIVAM, S. et al. Carbon encapsulated iron oxide nanoparticles surface engineered with polyethylene glycol-folic acid to induce selective hyperthermia in folate over expressed cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 480, n. 1–2, p. 8–14, 2015.

SAKELLARI, D. et al. Ferrimagnetic nanocrystal assemblies as versatile magnetic particle hyperthermia mediators. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 187–193, 2016.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. **Análise de Dados Experimentais I: Fundamentos de**

Estatística e Estimação de Parâmetros. Rio de Janeiro: [s.n.].

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. **Análise de Dados Experimentais II: Planejamento de Experimentos.** Rio de Janeiro: [s.n.].

SHAH, R. R. et al. Impact of magnetic field parameters and iron oxide nanoparticle properties on heat generation for use in magnetic hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 387, p. 96–106, 2015.

SINGH, G. et al. Cancer cell targeting using folic acid/anti-HER2 antibody conjugated fluorescent CdSe/CdS/ZnS-MPA and CdTe-MSA quantum dots. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 12, p. 9382–9395, 2015.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (EDS.). **World Cancer Report 2014.** [s.l: s.n.].

STUART, M. A C. et al. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. **Nature materials**, v. 9, n. 2, p. 101–113, 2010.

TANG, Z. et al. Quantitative control of active targeting of nanocarriers to tumor cells through optimization of folate ligand density. **Biomaterials**, v. 35, n. 27, p. 8015–8027, 2014.

THERMO SCIENTIFIC. **Crosslinking Reagents Technical Handbook.** Disponível em: <www.thermofisher.com>. Acesso em: 17 ago. 2015.

THU HUONG, L. T. et al. Folate attached, curcumin loaded Fe₃O₄ nanoparticles: A novel multifunctional drug delivery system for cancer treatment. **Materials Chemistry and Physics**, v. 172, p. 98–104, 2016.

WANG, H.; REMPEL, G. L. Introduction of Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications. n. 1, p. 4–9, 2015.

WEST, J. L.; HUBBELL, J. A. Photopolymerized Hydrogel Materials for Drug-Delivery Applications. **Reactive Polymers**, v. 25, n. 2–3, p. 139–147, 1995.

WU, W. et al. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 16, n. 2, p. 23501, 2015.

WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface

functionalization strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 11, p. 397–415, 2008.

WU, Z. et al. Solubility of folic acid in water at pH values between 0 and 7 at temperatures (298.15, 303.15, and 313.15) K. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 9, p. 3958–3961, 2010.

YOU, J.-O. et al. Bioresponsive matrices in drug delivery. **Journal of biological engineering**, v. 4, n. 1, p. 15, 2010.

YOUNIS, I. R. et al. Influence of pH on the dissolution of folic acid supplements. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, n. 1–2, p. 97–102, 2009.

ZHANG, J. et al. Large-scale synthesis and characterization of magnetic poly(acrylic acid) nanogels via miniemulsion polymerization. **RSC Adv.**, v. 5, n. 72, p. 58889–58894, 2015.

ZHANG, J.; HUANG, Q.; DU, J. Recent advances in magnetic hydrogels. **Polymer International**, v. 65, n. 12, p. 1365–1372, 2016.

ZHAO, Z. et al. Octapod iron oxide nanoparticles as high-performance T₂ contrast agents for magnetic resonance imaging. **Nature communications**, v. 4, p. 2266, 2013.

ZHENG, Y. et al. Synthesis and Properties of a High-Molecular-Weight Poly (amic acid) and Polyimide Based on 2,2-Bis (3-amino-4-hydroxyphenyl) hexafluoropropane. v. 121, p. 702–706, 2011.