

Bruno Estevam Amantéa

Comportamento termossensível de nanopartículas magnéticas revestidas com PNIPAm-co-PAA e PNVCL-co-PAA para liberação de fármacos

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

Co-Orientador: Prof. Dr. Denis Ricardo Martins de Godoi

Araraquara
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

A484c Amantéa, Bruno Estevam
Comportamento termossensível de nanopartículas magnéticas revestidas com PNIPAm-co-PAA e PNVCL-co-PAA para liberação de fármacos / Bruno Estevam Amantéa. – Araraquara : [s.n.], 2019
87 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques
Coorientador: Denis Ricardo Martins de Godoi

1. Nanopartículas. 2. Tecnologia de liberação controlada. 3. Copolímeros. 4. Magnetita. 5. Revestimentos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Comportamento termossensível de nanopartículas magnéticas revestidas com PNIPAM-co-PAA e PNVCL-co-PAA para liberação de fármacos"

AUTOR: BRUNO ESTEVAM AMANTÉA**ORIENTADOR: RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES****COORIENTADOR: DENIS RICARDO MARTINS DE GODOI**

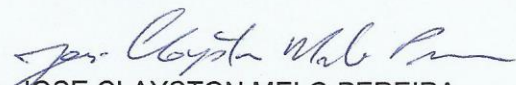
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. CECILIO SADAO FUGIVARA
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. JOSE CLAYSTON MELO PEREIRA
Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof.ª Dr.ª ANA PAULA RAMOS
Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto



Prof. Dr. EVERTON BONTURIM
Departamento de Engenharia / Universidade Presbiteriana Mackenzie - MACKENZIE - São Paulo

Araraquara, 12 de julho de 2019

SÚMULA CURRÍCULAR

Dados Pessoais

Nome: Bruno Estevam Amantéa

Filiação: José Carlos Amantéa e Maria Aparecida Estevam Amantéa

Nascimento: 29/09/1989 – Araraquara/SP – Brasil

Carteira de Identidade: 35.624.324-2 – SSP – SP – 31/10/2007

CPF: 391.294.248-01

Endereço Profissional

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Instituto de Química de Araraquara

Jardim Quitandinha – Araraquara, SP – Brasil

CEP 14800-060

Endereço Eletrônico: bruno.amantea@yahoo.com.br

Formação Acadêmica

2015-2019: Doutorado em Química. Bolsista CAPES (Processo: 1492733)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Comportamento termossensível de nanopartículas magnéticas revestidas com PNIPAm-co-PAA e PNVCL-co-PAA para liberação de fármacos

Ano de obtenção: 2019

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

2017: Licenciatura em Química

Universidade de Franca, São Paulo, Brasil

2013 – 2015: Mestrado em Química. Bolsista CNPq

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Desenvolvimento de catalisadores sem platina: estudos comparativos da oxidação de metanol em PdRu/C e PtRu/C em meio alcalino

Ano de obtenção: 2015

Orientadora: Prof.^a Dra. Hebe de las Mercedes Villullas

2009 – 2012: Graduação em Bacharelado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Estudo comparativo da eletroxidação de metanol em nanocatalisadores a base de Pt contendo Ru e Ir

Orientadora: Prof.^a Dra. Hebe de las Mercedes Villullas

Áreas de Atuação

1. Química
2. Físico-Química
3. Química de materiais e interfaces
4. Coloides e Polímeros

Prêmios

2012: Menção Honrosa – Melhores trabalhos, Congresso de Iniciação Científica da UNESP

Título: Efeito na atividade para oxidação de metanol da adição de Iridio a catalisadores de PtRu.

Artigos e Trabalhos

1 Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados

Publicação: München, S.; Adaime, M. B.; Perazolli, L. A.; Amantéa, B. E.; Zaghete, M. A. Jeans: a relação entre aspectos científicos, tecnológicos e sociais para o ensino de química. **Química Nova na Escola**, v. 37, n. 3, p. 172-179, 2015.

Publicação: Santos, C. S.; Viali, W. R.; Nunes, E. S.; Assis, D. R.; Amantéa, B. E.; Jafelicci Júnior, M. Aqueous Nanofluids Based on Copper MPA: Synthesis and Characterization. **Materials Research**, v. 20, p. 104-110, 2017.

Publicação: Brandt, J.; Piazza, R. D.; Santos, C. S.; Vega-Chacón, J. R.; Amantéa, B. E.; Pinto, G. C.; Jafelicci Júnior, M.; Marques, R. F. C. Synthesis and Colloidal Characterization of Folic Acid-modified PEG-b-PCL Micelles for Methotrexate Delivery. **Journal of Colloids and Interfaces B: Biointerfaces**, v. 177, p. 228-234, 2019.

Publicação: Amantéa, B. E.; Piazza, R. D.; Chacon, J. R. V., Santos, C. C.; Costa, T. P.; Godoi, D. R. M.; Jafelicci Júnior, M.; Marques, R. F. C. Esterification influence in thermosensitive behavior of copolymers PNIPAM-co-PAA and PVCL-co-PAA in magnetic nanoparticles surface. **Journal of Colloids and Interfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 575, p. 18-26, 2019.

2 Participação em eventos científicos

Amantéa, B. E.; Piazza, R. D.; Chacon, J. R. V., Santos, C. C.; Costa, T. P.; Godoi D. R. M.; Jafelicci Júnior, M.; Marques, R. F. C. Esterification influence in thermosensitive behavior of coated magnetic nanoparticles with PNIPAM-co-PAA and PNVCL-co-PAA. **Brazil MRS Meeting (SBPMat)**, 2018.

Amantéa, B. E.; Piazza, R. D.; Chacon, J. R. V., Santos, C. C.; Costa, T. P.; Godoi D. R. M.; Jafelicci Júnior, M.; Marques, R. F. C. Esterification influence in thermosensitive behavior of copolymers PNIPAM-co-PAA and PVCL-co-PAA in magnetic nanoparticles surface. **The 7th Latin American Conference on Metastable and Nanostructured Materials (Nanomat)**, 2017.

Costa, T. P.; Assis, D. R.; Jafelicci Júnior, M.; Marques, R. F. C.; Porous hydroxyapatite, scaffold nanostructures for potential application in drug delivery system. **The 7th Latin American Conference on Metastable and Nanostructured Materials (Nanomat)**, 2017.

Amantéa, B. E.; Souza, R. F. F.; Villullas, H. M. Interações metal-suporte em eletro catálise: estudo comparativo de catalisadores PtFe/C e PtFe/TiO₂-C. **10º Encontro Regional de Catálise (XERCat)**, 2012.

Souza, R. F. F.; Amantéa, B. E.; Villullas, H. M. Efeitos das interações metal suporte nas reações de oxidação de metanol e ácido fórmico em catalisadores suportados em TiO_2 -C. **XX Congresso da Sociedade Ibero-americana de Eletroquímica (Sibae)**, 2012.

Amantéa, B. E.; Villullas, H. M. Efeito na atividade para oxidação de metanol da adição de Irídio a catalisadores de PtRu. **XXIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC)**, 2012.

Amantéa, B. E.; Perazolli, L. A. A Química e a História da Calça Jeans. **1º Congresso Paulista de Extensão Universitária (COPEX)**, 2010.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus queridos pais, José Carlos Amantéa e Maria Aparecida Estevam Amantéa, por todo o empenho, paciência e amor.

Aos meus queridos irmãos, Fabiana Estevam Amantéa, Carla Estevam Amantéa e Juliano Estevam Amantéa, pelo apoio e carinho.

Ao meu orientador, Rodrigo Fernando Costa Marques, pelo apoio, ensino, paciência e compreensão.

Aos professores Miguel Jafelicci Júnior e Denis Ricardo Martins de Godoi, pelo conhecimento e ajuda.

Ao meu querido amigo Thiago Holanda de Abreu, pela amizade sincera e longas noites de estudos.

Aos meus brilhantes companheiros de laboratório, que me ajudaram nos trabalhos e artigos científicos: Caio, Rodolfo, Taciane, Jaime, Chico, João, Caroline, Gabriel e Guilherme.

Ao meu amigo Jovan, pela ajuda no trabalho.

Ao Instituto de Química de Araraquara, pela formação de qualidade.

Às agências de fomento CNPq, FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro na pesquisa.

RESUMO

A capacidade de alguns polímeros de mudar suas propriedades devido ao aumento da temperatura tornou-se uma possibilidade de aplicação para entrega de medicamentos. Polímeros compostos de n-isopropilacrilamida ou n-vinilcaprolactama são conhecidos pelo comportamento termoresponsivo devido a mudanças de estrutura com aumento de temperatura. Esses polímeros têm menor temperatura de solução crítica (LCST), acima da qual ocorrem mudanças nas interações intramoleculares e intermoleculares. Em temperaturas abaixo da LCST, os polímeros apresentam solubilidade em água e, acima da LCST, a estrutura colapsada resultará em uma fase insolúvel. Essa propriedade de transição estrutural permite que esses polímeros sejam aplicados no fornecimento de drogas, uma vez que, tornando-se insolúvel, o polímero irá expulsar moléculas de água em posições intercadeias e, conseqüentemente, um fármaco que esteja junto com essa água. Este trabalho combinou a característica de polímeros termosensíveis com nanopartículas magnéticas. O sistema estudado consiste em nanopartículas magnéticas revestidas com polímero, esterificados ou não, impregnados com solução medicamentosa (metotrexato ou diclofenaco de potássio). O revestimento polimérico nas nanopartículas magnéticas foi detectado por FTIR, curvas termogravimétricas e análise do potencial zeta. A propriedade termosensível foi detectada em ambos os revestimentos utilizando poli (N-isopropilacrilamida ou poli (N-vinilcaprolactama) com ácido acrílico. Através de DLS, foi possível identificar que a LCST do copolímero diminuiu após a esterificação com 1-pentanol. As nanopartículas revestidas foram submetidas à hipertermia magnética e a capacidade de geração de calor dessas partículas foi identificada mesmo após o processo de esterificação. A capacidade de carregar e liberar metotrexato e diclofenaco de potássio foi estudada por espectroscopia UV mostrando diferenças devido à esterificação, ou seja, após a esterificação e com uma LCST menor, foi possível identificar uma liberação maior em função do tempo para ambos os medicamentos.

Palavras chave: Nanopartículas magnéticas; Polímeros termosensíveis; *Drug delivery*.

ABSTRACT

The ability of some polymers to change their properties due to the increase in temperature has become a possibility of application in drug delivery. Polymers composed of n-isopropylacrylamide or n-vinylcaprolactam are known as thermoresponsive due major structure changes with temperature increase. These polymers present a lower critical solution temperature (LCST) caused by a change in intramolecular interactions. At temperatures below the LCST the polymers present solubility in water and above the collapsed structure will results in an insoluble phase. This property of structural transition is closely observed by studies focused on drug delivery, since by becoming insoluble, the polymer expel water from structure and, consequently, any drug in solution. This work had the objective of combining the characteristic of thermosensitive polymers with magnetic nanoparticles. Magnetic nanoparticles were coated with these polymers, acting as substrates, and were able to provide heat through magnetic hyperthermia. The studied system consists in magnetic nanoparticles coated with polymer, esterified or not, impregnated with drug solution (methotrexate or potassium diclofenac). This work showed the general properties of the polymer coating by using Fourier transformed IR spectroscopy, zeta potential, dynamic light scattering. As results, the coating was made successfully, there is a decrease in the hydrodynamic diameter as the temperature has increased. The coated nanoparticles were subjected to magnetic hyperthermia and the heat generating capacity of these particles was identified. The ability to charge and release methotrexate, studied by UV spectroscopy, shows differences due esterification, considering structural factors, and demonstrates a major role of temperature control the release of methotrexate and potassium diclofenac.

Keywords: Magnetic nanoparticles; Thermoresponsive polymers; Drug delivery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura cristalina da Magnetita vista na direção [111] (Diagonal através do cubo). Octaedros amarelados contém Fe^{3+} e os Tetraedros verdes contém uma mistura de Fe^{2+} e Fe^{3+} . O Oxigênio é mostrado como esferas vermelhas 19

Figura 2 – Representação dos dipolos magnéticos para os diferentes materiais considerando uma representação esquemática dos domínios e um gráfico representativo da magnetização em função do campo magnético externo aplicado. (a) Material diamagnético: baixa ou pouca resposta em relação ao campo magnético. (b) Material paramagnético: os elétrons desemparelhados respondem ao campo magnético externo se alinhando e produzindo um fraco campo magnético no material. (c) Material ferromagnético: Momento angular total resultante do alinhamento da estrutura do material, ou seja, grande resposta em função da aplicação do campo magnético externo. (d) Material antiferromagnético: Momento magnético total resultante igual a zero, mas existe uma resposta similar aos materiais paramagnéticos com a aplicação do campo externo. (e) Materiais ferrimagnéticos: A estrutura em sub redes provoca diminuição do momento magnético total, pois os momentos encontram-se antiparalelo. Respondem fortemente ao campo magnético externo, porém em menor intensidade se comparado aos matérias ferromagnéticos 24

Figura 3 – Representação de magnetita diamagnética (acima de 15 nm) devido à presença de multidomínios magnéticos e de magnetita superparamagnética (abaixo de 15 nm) devido à presença de apenas um domínio magnético. Os traços brancos que separam os domínios para materiais acima de 15 nm são denominados paredes de domínios. A fronteira entre os domínios não é brusca, pois caso contrário haveria uma energia de interação entre as diferentes orientações muito grande. Por isso na fronteira existe a formação de uma camada onde a orientação dos domínios magnéticos varia gradualmente, minimizando a energia de interação necessária para manter tal configuração. Essa fronteira é chamada de parede do domínio ou parede de Bloch 26

Figura 4 – Esquema da relaxação de Néel para partículas abaixo de 15 nm e consideradas superparamagnéticas (momento magnético sendo alterado em função do tempo). De a) para d) é representado a mudança da direção do domínio magnético em relação a alteração dos polos do campo magnético alternado. A relaxação de Néel

envolve pequenas modificações na estrutura cristalina, que armazenam energia ao serem estimuladas pelo campo magnético. Ao cessar ou alterar a direção do campo magnético, a energia (energia interna) é liberada na forma de calor, da mesma forma como elucidado pela Primeira Lei da Termodinâmica.....	30
Figura 5 – Esquema da relaxação de Brown para partículas abaixo de 15 nm e consideradas superparamagnéticas (momento magnético sendo alterado em função do tempo). De a) para d) é representado a mudança da direção do domínio magnético em relação a alteração dos polos do campo magnético alternado considerando que a partícula realiza movimento de rotação. A relaxação de Brown envolve o processo de rotação da partícula e, conseqüentemente, cria atrito com o meio que a contém, gerando calor.	31
Figura 6 – Esquema de resposta de polímero “inteligente” em relação ao aumento da temperatura.	33
Figura 7 – Representação da estrutura A) N-isopropilacrilamida e B) poli(N-isopropilacrilamida).....	35
Figura 8 – A) Estrutura do ácido fólico e B) Estrutura do metotrexato.....	34
Figura 9 – Fórmula estrutural do diclofenaco de potássio	35
Figura 10 – Representação esquemática do material desejado. a) Nanopartícula revestida com polímero termossensível; b) Entumescimento da cadeia do polímero com solução contendo o medicamento; c) Estrutura do copolímero colapsada após hipertermia magnética e liberação do medicamento.....	38
Figura 11 – Fluxograma que representa o esquema da síntese de nanopartículas magnéticas pela síntese de coprecipitação.....	41
Figura 12 – Fluxograma que representa o esquema da modificação da superfície de nanopartículas magnéticas pela síntese de polimerização	42
Figura 13 – Fluxograma que representa o esquema da esterificação dos polímeros presentes na superfície das nanopartículas de óxido de ferro.	43
Figura 14 – Espectro UV-vis do medicamento metotrexato (a) e curva de calibração preparada para cálculo da concentração liberada (b)	46
Figura 15 – a)Espectro UV-vis do medicamento diclofenaco de potássio e b) curva de calibração preparada para calcula da concentração liberada	47
Figura 16 – Curva de calibração para os padrões de poli(estireno) com diferentes massas moleculares em DMF	48

Figura 17 – Representação esquemática da ligação do ácido acrílico com a superfície da nanopartícula magnética	50
Figura 18 – Esquema da reação de polimerização na superfície da magnetita revestida com ácido acrílico. As duas rotas de síntese estão expressas, sendo uma com ácido acrílico e N-isopropilacrilamida e outra com ácido acrílico e N-vinilcaprolactama.....	51
Figura 19 – Reação de esterificação das magnetitas funcionalizadas com copolímero PNIPAAm-co-PAA.....	51
Figura 20 –Espectros vibracionais na região do infravermelho dos precursores da síntese: a) N-isopropilacrilamida, b) Ácido acrílico c) N-vinilcaprolactona e d) Espectro ampliado do monômero N-vinilcaprolactona para identificação das bandas	54
Figura 21 – Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras de magnetita antes e depois da funcionalização com os copolímeros a) PNIPAAm-co-PAA e b) PNVCL-co-PAA.....	56
Figura 22 – Curvas termogravimétricas dos materiais antes e após funcionalização e esterificação a) magnetita, b) magnetita revestida com copolímero PNIPAAm-co-PAA, c) magnetita revestida com copolímero PNVCL-co-PAA, d) magnetita revestida com copolímero PNIPAAm-co-PAA após esterificação e e) magnetita revestida com copolímero PNVCL-co-PAA após esterificação.....	58
Figura 23 – Micrografia das nanopartículas de magnetita e histograma da distribuição de tamanho.....	588
Figura 24 – Micrografia e histograma da distribuição de tamanho das nanopartículas de magnetita revestidas com copolímero PNIPAAm-co-PAA.....	58
Figura 25 – Micrografia transmissão e histograma da distribuição de tamanho das nanopartículas de magnetita revestidas com copolímero PNIPAAm-co-PAAmod.....	58
Figura 26 – Micrografia e histograma da distribuição de tamanho das nanopartículas de magnetita revestidas com copolímero PNVCL-co-PAA.....	59
Figura 27 – Micrografia e histograma da distribuição de tamanho das nanopartículas de magnetita revestidas com copolímero PNVCL-co-PAAmod.....	60
Figura 28 – Hipertermia magnética das amostras de magnetita revestidas. A curva preta representa a magnetita pura, sem revestimento; a curva vermelha representa a	

magnetita revestida com PNIPAm-co-PAA; a curva rosa representa a magnetita revestida com PNIPAm-co-PAA após esterificação; a curva azul representa a magnetita revestida com PNVCL-co-PAA e a curva verde representa a magnetita revestida com PNVCL-co-PAA após esterificação. Experimento realizado com campo magnético alternado ($H = 14 \text{ kAm}^{-1}$) numa frequência fixa ($f = 420 \text{ kHz}$)	60
Figura 29 – Ajuste da equação Box-Lucas modificada para o cálculo das constantes A e B no material magnetita pura.....	62
Figura 30 – Ajuste da equação Box-Lucas modificada para o cálculo das constantes A e B no material magnetita revestida com copolímero PNIPAm-co-PAA	63
Figura 31 – Ajuste da equação Box-Lucas modificada para o cálculo das constantes A e B no material magnetita revestida com copolímero PNVCL-co-PAA	63
Figura 32 – Ajuste da equação Box-Lucas modificada para o cálculo das constantes A e B no material magnetita revestida com copolímero PNIPAm-co-PAA após esterificação	64
Figura 33 – Ajuste da equação Box-Lucas modificada para o cálculo das constantes A e B no material magnetita revestida com copolímero PNVCL-co-PAA após esterificação	64
Figura 34 – Tendência do diâmetro hidrodinâmico dos materiais: a) magnetita revestida com copolímero PNIPAm-co-PAA; b) magnetita revestida com copolímero PNIPAm-co-PAA após esterificação; c) magnetita revestida com copolímero PNVCL-co-PAA; e d) magnetita revestida com copolímero PNVCL-co-PAA após esterificação. Solvente: água ultrapura, $\text{pH} = 7,0$	66
Figura 35 – Curvas de potencial zeta das amostras. Titulantes $\text{HCl } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{NaOH } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$. A curva preta representa a magnetita sem revestimento. A curva vermelha representa a magnetita revestida com o polímero PNIPAm-co-PAA. A curva azul representa a magnetita revestida com o polímero PNVCL-co-PAA. A curva rosa representa a magnetita revestida com PNIPAm-co-PAA após esterificação. A curva verde representa a magnetita revestida com PNVCL-co-PAA após esterificação	68
Figura 36 – Esquema da disposição de cargas na superfície de magnetita em diferentes pH , baseado nas análises de potencial zeta do trabalho.....	68
Figura 37 – Esquema da disposição de cargas na superfície de magnetita revestida com PNIPAm-co-PAA em diferentes pH , baseado nas análises de potencial zeta do trabalho	69

Figura 38 – Esquema da disposição de cargas na superfície de magnetita revestida com PNVCL-co-PAA em diferentes pH, baseado nas análises de potencial zeta do trabalho	69
Figura 39 – Liberação de metotrexato (MTX) para as nanopartículas modificadas em função do tempo em a) 37°C e b) 43 °C.....	72
Figura 40 – Liberação de diclofenaco de potássio (DFC) para as nanopartículas modificadas em função do tempo em a) 37°C e b) 43 °C.....	75
Figura 41 – Cromatogramas dos copolímeros sintetizados PNIPAm-co-PAAmod e PNVCL-co-PAAmod. Solvente DMF e tempo de corrida 20 minutos	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos materiais sintetizados	43
Tabela 2 – Padrões de PE utilizados no preparo da curva de calibração do método de cromatografia de permeação em gel (GPC).....	48
Tabela 3 – Tempo necessário para variação da temperatura de 25 °C para 40 °C de cada amostra de magnetita	61
Tabela 4 – Taxa de absorção específica (SAR) dos materiais sintetizados, calculadas a partir do ajuste das curvas temperatura x tempo com campo magnético $H = 14 \text{ kAm}^{-1}$ e frequência $f = 420 \text{ kHz}$	65
Tabela 5 – Grau de incorporação de metotrexato nas magnetitas revestidas para 10 mg de magnetita.....	71
Tabela 6 – Comparação da concentração liberada no frasco contendo 15 mL após 4 horas de liberação de metotrexato em 37 °C e 43 °C.....	74
Tabela 7 – Grau de incorporação de diclofenaco de potássio em 10 mg de magnetitas revestidas	74
Tabela 8 – Determinação da massa molar de cada um dos picos de a até j da Figura 20. O software utilizado para análise dos picos foi <i>Omini SEC</i> v. 5.1	77
Tabela 9 – Análise elementar dos copolímeros sintetizados	78

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – ácido acrílico

DFC – Diclofenaco de potássio

DLS – *Dynamic light scattering* – Espalhamento de luz dinâmico

DMSO – Dimetilsulfóxido

LCST – *Lower critical solution temperature* – Temperatura crítica mínima de solução

MTX – Metotrexato

NIPAm – N-isopropilacrilamida

NVCL – N-vinilcaprolactama

PAA – poli (ácido acrílico)

PNIPAm – poli (N-isopropilacrilamida)

PNIPAm-co-PAA – copolímero composto de N-isopropilacrilamida e ácido acrílico

PNVCL – poli (N-vinilcaprolactama)

PNVCL-co-PAA – copolímero composto de N-vinilcaprolactama e ácido acrílico

SAR – *Specific absorption rate* – Taxa de absorção específica

TEM – *Transmission electron microscopy* – Microscopia eletrônica de transmissão.

TG – Termogravimetria

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Magnetita: visão geral	19
1.2 Origem do magnetismo	21
1.3 Nanopartículas magnéticas e superparamagnetismo	25
1.4 Hipertermia magnética	27
1.5 Mecanismo de aquecimento	29
1.6 Revestimentos das nanopartículas magnéticas	31
1.7 Polímeros termossensíveis e <i>drug delivery</i>	33
2 OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3 PARTE EXPERIMENTAL	40
3.1 Síntese de nanopartículas	41
3.2 Polimerização e funcionalização da superfície	41
3.3 Esterificação	42
3.4 Caracterizações	44
3.4.1 Hipertermia magnética	44
3.4.2 Espalhamento de luz dinâmico (DSL)	44
3.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FT- IR)	44
3.4.4 Potencial zeta	45
3.4.5 Liberação controlada	45
3.4.5.1 <i>Incorporação e liberação de Metotrexato e diclofenaco de potássio</i>	45
3.4.5.2 <i>Liberação controlada de metotrexato e diclofenaco de potássio</i>	46
3.4.6 Cromatografia de permeação em gel (GPC)	47
3.4.7 Microscopia eletrônica de transmissão	49
3.4.8 Análises termogravimétricas (TG)	49
3.4.9 Análise elementar	49

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5 CONCLUSÃO	80
6 REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Magnetita: visão geral

A magnetita é um mineral de óxido de ferro que ocorre naturalmente na Terra (por exemplo, cinzas de carvão mineral) ou pode ser liberada para o meio ambiente por meio de atividades humanas (por exemplo, pós de toner preto) (GMINSKI et al., 2011).

A magnetita pertence ao grupo espinélio e cristaliza no sistema cristalino cúbico (**Figura 1**), podendo ser descrita pela fórmula geral Fe_3O_4 . A estrutura cristalina da magnetita (Fe_3O_4) é o espinélio inverso e o grupo espacial é Fd-3m. A fórmula geral de espinélio invertido é $(Y)[XY]O_4$, onde em Fe_3O_4 , $X = Fe^{2+}$ e $Y = Fe^{3+}$. Os colchetes indicam sítios atômicos tetraédricos e os parênteses indicam sítios atômicos octaédricos. Fe^{2+} e Fe^{3+} estão distribuídos nos sítios tetraédricos (ALIRAMAJI; ZAMANIAN; SOHRABIJAM, 2015; DE MONTFERRAND et al., 2013).

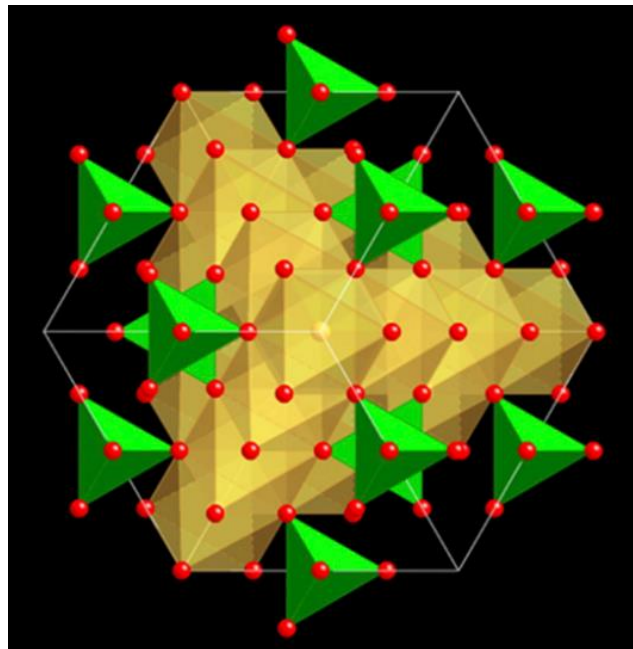


Figura 1 – Estrutura cristalina da Magnetita vista na direção [111] (Diagonal através do cubo). Octaedros amarelados contém Fe^{3+} e os Tetraedros verdes contém uma mistura de Fe^{2+} e Fe^{3+} . O Oxigênio é mostrado como esferas vermelhas

Fonte: GIERÉ, R., 2016.

A magnetita é uma fase natural comum, ocorrendo em vários ambientes geológicos, variando entre rochas ígneas (por exemplo, basaltos), rochas

sedimentares (por exemplo, areias de praia) e rochas metamórficas (por exemplo, xistos). Devido à sua tendência a reagir com o oxigênio para formar hematita (Fe_2O_3) e vários oxihidróxidos de ferro (por exemplo, a goethita), a magnetita pode ser usada como uma ferramenta poderosa para explorar as concentrações de oxigênio nas rochas durante processos geológicos, através de mudanças no conteúdo de oxigênio.

Cristais de magnetita biogênicos e quimicamente puros ocorrem nos corpos de uma ampla gama de organismos dentro dos reinos da Monera, Protista e Animalia (por exemplo, micróbios magnetotáticos, insetos, moluscos, peixes, pássaros, mamíferos) (KIRSCHVINK; WALKER; DIEBEL, 2001). Nesses organismos, a magnetita forma a base para um tipo de mecanismo biofísico de detecção de campo magnético, que facilita a orientação e a navegação (KIRSCHVINK; WINKLHOFER; WALKER, 2010; MOURITSEN; RITZ, 2005). No cérebro humano, também já foi estudado que a magnetita se precipita biologicamente como parte do metabolismo do ferro. Segundo Maher et al. (2016), a magnetita, na forma de partículas magnéticas, são presentes no cérebro humano devido à poluição do ar, sugerindo que elas podem se originar de uma fonte externa (KIRSCHVINK; KOBAYASHI-KIRSCHVINK; WOODFORD, 1992; MAHER et al., 2016). Ocorreu também a proposta de que a magnetita endógena pode desempenhar um papel fundamental na percepção, transdução e armazenamento em longo prazo da informação no cérebro humano e em outros organismos (MARTÍNEZ BANACLOCHA; BÓKKON; BANACLOCHA, 2010).

Uma das questões que surge a partir da descoberta da magnetita presente no corpo humano, derivada externamente no tecido cerebral, é a de que a magnetita adicional pode afetar negativamente a saúde humana, caso em grandes concentrações ou sem direcionamento adequado no corpo. Por isso, técnicas avançadas em medicina, química e física são usadas para amenizar os riscos e efeitos colaterais. As nanopartículas de magnetita podem ser consideravelmente menos tóxicas quando modificadas na superfície e são de especial interesse nas ciências biomédicas, porque podem ser usadas como portadoras para o fornecimento direcionado de drogas (DUGUET et al., 2006; MESÁROŠOVÁ et al., 2014). Além disso, nanopartículas de magnetita podem ser exploradas para terapia de câncer baseada em hipertermia, em que o calor induzido pela aplicação de um campo magnético alternado causa necrose de células cancerígenas, mas não danifica o tecido normal circundante (HERVAULT; THANH, 2014).

1.2 Origem do magnetismo

A propriedade magnética dos materiais é determinada pelos dipolos magnéticos e pela natureza da interação entre eles. Os dipolos magnéticos têm origem no momento angular orbital e no spin dos elétrons presentes nos íons ou átomos que formam a matéria, ou seja, são dependentes da estrutura eletrônica dos átomos. (BLUNDELL, 2001).

A grandeza macroscópica que representa o estado magnético de um material e o vetor magnetização, representado pela letra M e é definido como a resposta do material frente a um campo magnético externo (\vec{H}). Quando se submete um material qualquer à um campo magnético externo, a estrutura deste material responde ao campo submetido mediante a produção de um campo magnético próprio (\vec{B}_M), cuja intensidade e orientação dependem não apenas do campo externo como também das propriedades do material que compõe o material em questão. No estado em que o material submetido ao campo magnético externo apresenta um campo magnético próprio pode-se afirmar que ele se encontra magnetizado. Como a magnetização total do material é o resultado da maior ou menor cooperação de todos os dipolos magnéticos encontrados no material, a medida da magnetização associa-se à densidade volumétrica de momento de dipolo magnético (**equação 1**) (BLUNDELL, 2001).

$$\vec{M} = \frac{\mu}{V} \quad (1)$$

Uma vez compreendido que a magnetização implica um campo magnético diretamente associado ao campo externo, deve-se considerar além do campo devido à magnetização (\vec{B}_M) o campo externo responsável por induzir magnetização no material (\vec{B}_0). É notório que o campo magnético total medido em um dado ponto do sistema é resultante da somatória dos dois campos (**equação 2**):

$$\vec{B} = \vec{B}_M + \vec{B}_0 \quad (2)$$

Os fenômenos magnéticos podem ser expressos por duas grandezas: o vetor de indução magnética (\vec{B}) e o vetor intensidade de campo magnético \vec{H} . Enquanto \vec{H} é relacionado com a corrente que cria o campo (corrente de condução), \vec{B} , depende tanto da corrente de condução, quanto da magnetização do meio, ou seja, da corrente de Ampère. Assim, \vec{B} é a resposta do campo externo (\vec{H}) aplicado em um material

magnético (BLUNDELL, 2001). A relação entre eles encontra-se descrita na **equação 3**:

$$\vec{B} = \mu_0 \vec{H} \quad (3)$$

Onde μ_0 é a permeabilidade magnética. Substituindo-se a **equação 3** em **equação 2** tem-se a **equação 4**:

$$\vec{B} = \mu_0 \vec{M} + \overline{\mu_0 \vec{H}} \text{ ou } \vec{B} = \mu_0 (\vec{M} + \vec{H}) \quad (4)$$

Em meios de resposta lineares a magnetização é diretamente proporcional ao campo externo. A constante de proporcionalidade é conhecida por susceptibilidade magnética e geralmente representada por χ_m . A susceptibilidade magnética é a capacidade que um material tem de se magnetizar sob a ação de um campo magnético externo aplicado, podendo ser definida pela **equação 5** (BLUNDELL, 2001).

$$\chi_m = \frac{\vec{M}}{\vec{H}} \quad (5)$$

De acordo com os valores de susceptibilidade os materiais podem ser divididos em fases magnéticas e os principais tipos de fases magnéticas são:

Diamagnetismo: esta é a propriedade que todos os materiais que tem cargas em movimento apresentam quando sujeitas a um campo magnético externo ou a sua variação. Nestes materiais os átomos têm momento angular total nulo (\vec{j}), ou seja, não possuem dipolo magnético intrínseco. É caracterizada por uma pequena susceptibilidade magnética negativa e independente da temperatura. (LANDEE; TURNBULL, 2014).

Paramagnetismo: é o fenômeno que ocorre em materiais que possuem um momento de dipolo magnético intrínseco não interagentes entre si. Na ausência de campo magnético a magnetização desses materiais é nula. A aplicação de um campo magnético externo fará com que os dipolos magnéticos eletrônicos se alinhem na direção deste campo. É caracterizada por uma susceptibilidade magnética positiva e pequena, e dependendo de sua origem tem uma forte dependência com a temperatura. A tendência ao alinhamento encontra oposição na agitação térmica. A dependência com a temperatura é resultado da competição entre a tendência de alinhamento dos dipolos e a tendência da agitação térmica em romper esse alinhamento. (LANDEE; TURNBULL, 2014).

Ferromagnetismo: alguns elementos de transição, como o ferro, níquel e cobalto puros ou em ligas com outros elementos, apresentam uma alta magnetização espontânea. Essa alta magnetização nos materiais ferromagnéticos está relacionada ao fato destes possuírem momento angular orbital total (\vec{L}) e momento angular spin total (\vec{S}) altamente interagentes que se alinham paralelamente entre si originando um momento angular magnético total (\vec{J}), ou seja, conferindo a propriedade de ímã permanente. O ferromagnetismo é exibido pelos materiais contendo elétrons desemparelhados em orbitais d ou f que se acoplam com elétrons desemparelhados em orbitais semelhantes em átomos vizinhos. O módulo da magnetização em materiais ferromagnéticos é várias ordens de grandeza maior do que em materiais paramagnéticos e diamagnéticos. (BLUNDELL, 2001; SAINI et al., 1988).

Antiferromagnetismo: é originado pela interação entre os spins, mas essa interação tende a alinhar os momentos magnéticos em direções opostas. Os momentos magnéticos vizinhos se cancelam mutuamente. O comportamento da magnetização em função do campo é semelhante à de um material que apresenta paramagnetismo, mas as origens deste comportamento são diferentes, pois no caso de materiais antiferromagnéticos o ordenamento é de longo alcance, ou seja, depende da estrutura e, conseqüentemente do momento magnético angular total. O momento magnético angular total (\vec{J}) é a somatória das interações do momento angular orbital total (\vec{L}) e o momento angular spin total (\vec{S}). (BLUNDELL, 2001; SAINI et al., 1988).

Ferrimagnetismo: os materiais ferrimagnéticos também se ordenam em sub redes provenientes de interstícios na estrutura (por exemplo a magnetita apresenta interstícios tetraédricos e octaédricos) que apresentam cada uma um momento angular total em direções opostas, porém a intensidade desses momentos são distintas e considerando a estrutura total do material após a somatória dos momentos angulares das sub redes ainda existe um momento magnético residual conferindo magnetização permanente. A magnetita que é o material de estudo desse trabalho encontra-se caracterizada no ferrimagnetismo (LANDEE; TURNBULL, 2014).

A **Figura 2** mostra a representação esquemática dos dipolos magnéticos para as diferentes fases magnéticas e o comportamento da susceptibilidade magnética de acordo com o campo magnético externo aplicado.

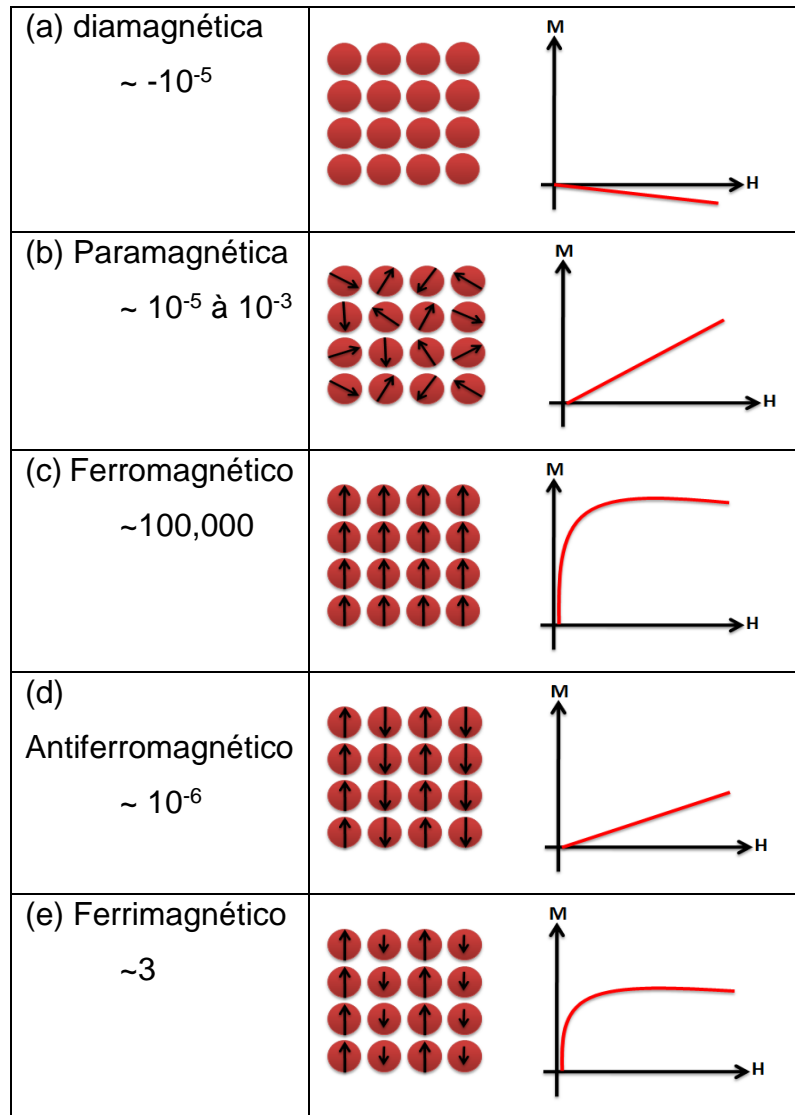


Figura 2: Representação dos dipolos magnéticos para os diferentes materiais considerando uma representação esquemática dos domínios e um gráfico representativo da magnetização em função do campo magnético externo aplicado. (a) Material diamagnético: baixa ou pouca resposta em relação ao campo magnético. (b) Material paramagnético: os elétrons desemparelhados respondem ao campo magnético externo se alinhando e produzindo um fraco campo magnético no material. (c) Material ferromagnético: Momento angular total resultante do alinhamento da estrutura do material, ou seja, grande resposta em função da aplicação do campo magnético externo. (d) Material antiferromagnético: Momento magnético total resultante igual a zero, mas existe uma resposta similar aos materiais paramagnéticos com a aplicação do campo externo. (e) Materiais ferrimagnéticos: A estrutura em sub redes provoca diminuição do momento magnético total, pois os momentos encontram-se antiparalelo. Respondem fortemente ao campo magnético externo, porém em menor intensidade se comparado aos matérias ferromagnéticos. (ALIRAMAJI; ZAMANIAN; SOHRABIJAM, 2015).

1.3 Nanopartículas magnéticas e superparamagnetismo

Durante a última década, a aplicação da nanotecnologia à medicina para diagnóstico e terapia emergiu como novo campo, denominado teranóstica. Uma ampla seleção de estruturas nanométricas foram desenvolvidas para aplicações em administração de medicamentos, imagem e engenharia de tecidos (KEMPE; KEMPE, 2010). As nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas são, certamente, os materiais mais promissores para aplicações médicas, como marcação celular, bioensaio, geração de imagens e hipertermia magnética. Primeiro, seus tamanhos de núcleo ajustáveis, variando entre 1 nm e 100 nm, permitem o controle das propriedades de acordo com a aplicação pretendida. Por exemplo, nanopartículas de óxido de ferro extremamente pequenas (diâmetro menor que 4 nm) podem ser usadas como agentes de contraste em ressonância magnética, enquanto nanopartículas de óxido de ferro com tamanho médio próximo a 10 nm são excelentes na geração de calor para tratamentos utilizando hipertermia magnética (HERVAULT; THANH, 2014).

As nanopartículas de magnetita podem ser sintetizadas usando vários métodos diferentes, como a decomposição térmica, microemulsão e co-precipitação. Entre todos esses métodos, a co-precipitação é considerada a mais apropriada para a produção em massa usando soluções de Fe^{2+} , Fe^{3+} e uma base. A reação de co-precipitação será exemplificada adiante no trabalho.

Por modificações da superfície, podem ser produzidos revestimentos ou cascas para materiais magnéticos pioneiros. Isso permite um maior controle de propriedades químicas e bioquímicas, pois moléculas bioativas, polímeros e revestimentos inorgânicos (sílica, ouro etc.) acoplados à superfície podem favorecer compatibilidade celular e modificar propriedades físico-químicas, como quantidade de carga, e adicionar sensibilidade ao pH e/ou temperatura (FILIPPOUSI et al., 2013; PANSERI et al., 2012).

A magnetita recebeu mais atenção devido à facilidade de modificação da superfície por substâncias orgânicas e inorgânicas. Para alta performance em aplicações, as nanopartículas devem ser preferencialmente esféricas, biocompatíveis, superparamagnéticas e ter estreita distribuição de tamanho, alta cristalinidade, grande área de superfície (para maior capacidade de revestimento ou ligação enzimática) e boa dispersão em meio líquido. Guo et al. (2009) ressalta que nanopartículas esféricas

apresentam grande área superficial, permitindo maior facilidade de revestimento com materiais orgânicos ou inorgânicos. Segundo Guo, Hervault e Thanh (2014), para aplicações biomédicas existe a preferência por nanopartículas superparamagnéticas, uma vez que essas não retêm qualquer magnetização após a remoção do campo magnéticos, evitando coágulos. A diferença das nanopartículas superparamagnéticas está no tamanho, pois partículas maiores tendem a possuir vários domínios magnéticos. Normalmente, as partículas superparamagnéticas estão compreendidas na faixa de tamanho entre 3 nm e 15 nm (HERVAULT; THANH, 2014). A **Figura 3** ilustra a diferença entre os tamanhos de partícula e seus domínios magnéticos.

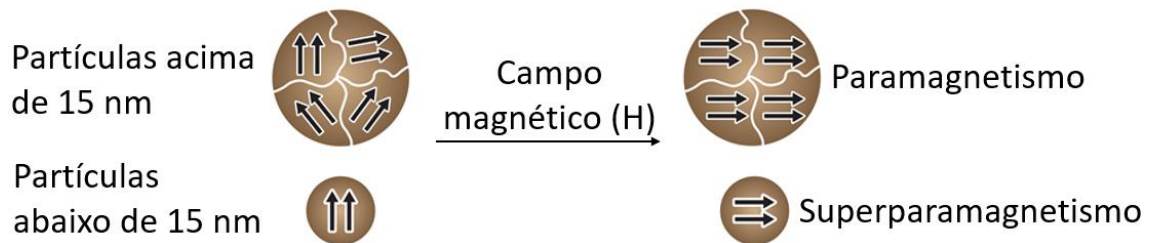


Figura 3 – Representação de magnetita diamagnética (acima de 15 nm) devido à presença de multidomínios magnéticos e de magnetita superparamagnética (abaixo de 15 nm) devido à presença de apenas um domínio magnético. Os traços brancos que separam os domínios para materiais acima de 15 nm são denominados paredes de domínios. A fronteira entre os domínios não é brusca, pois caso contrário haveria uma energia de interação entre as diferentes orientações muito grande. Por isso na fronteira existe a formação de uma camada onde a orientação dos domínios magnéticos varia gradualmente, minimizando a energia de interação necessária para manter tal configuração. Essa fronteira é chamada de parede do domínio ou parede de Bloch. (BLUNDELL, 2001; SAINI et al., 1988).

Fonte: Elaborado pelo autor.

As partículas no intervalo de 3 nm até 15m (Figura 5) apresentam um único domínio magnético e não possuem magnetização residual após cessar o campo magnético. Essa propriedade é muito interessante, pois as nanopartículas magnéticas não sofrerão atração magnética, evitando aglomeração e melhorando a estabilidade do material em suspensão (HERVAULT; THANH, 2014; LU; SALABAS; SCHUTH, 2007).

Os matérias multidomínios, quando submetidos a um campo magnético externo, alinham os domínios magnéticos em relação ao campo magnético aplicado; porém, ao ser retirado o campo magnético, nem todos os domínios retornam à sua orientação original, ou seja, existe uma magnetização residual que pode ocasionar atração magnética entre as nanopartículas e os efeitos são a formação de agregados. Esse fenômeno da agregação causada pela remanência magnética em partículas

multidomínios pode resultar na embolia capilar (quando aplicado em corrente sanguínea de seres vivos), reduzindo as chances de sucesso nas aplicações em biomedicina. Assim, existe a preferência por nanopartículas superparamagnéticas que são estudadas para aplicações *in vivo*.(BAÑOBRE-LÓPEZ; TEIJEIRO; RIVAS, 2013; FILIPPOUSI et al., 2013; HERVAULT; THANH, 2014).

1.4 Hipertermia magnética

A hipertermia é um procedimento terapêutico em que os tecidos são aquecidos acima dos intervalos fisiológicos normais. É mais frequentemente considerada como uma terapia alternativa para o tratamento do câncer devido a não apresentar efeitos colaterais, o que a torna um substituto atraente para a quimioterapia e a radioterapia. A terapêutica com hipertermia é geralmente considerada em duas faixas distintas de temperatura, nas quais o aumento da temperatura resulta em vários graus de perturbação celular. Aumentos moderados de temperatura (41 – 46°C) podem alterar a funcionalidade das proteínas intercelulares, levando à degradação celular e, finalmente, induzindo a apoptose (CHRISTOPHI et al., 1998; HARMON et al., 1991).

Entretanto, na hipertermia moderada, geralmente são necessários tratamentos mais longos para um resultado eficaz, muitas vezes em combinação com modalidades adicionais de tratamento, como radiação ou quimioterapia (termoquimioterapia). Por outro lado, o tratamento com hipertermia a temperaturas acima de 46°C pode resultar diretamente na morte celular, mesmo em tratamentos agudos com duração de apenas alguns minutos. A hipertermia nessas temperaturas é geralmente referida como termoablação e é caracterizada por necrose tecidual, coagulação ou carbonização (KUMAR; MOHAMMAD, 2011).

Muitos modos distintos de hipertermia estão disponíveis, mas a maioria sofre de limitações significativas no direcionamento de tumores ou na localização precisa da energia térmica. Na hipertermia de corpo inteiro, todo o corpo é aquecido acima das temperaturas fisiológicas normais. Técnicas que empregam a aplicação remota de radiação eletromagnética, como hipertermia por capacitância de radiofrequência ou hipertermia por micro-ondas, são mais bem direcionadas que a hipertermia em todo o corpo, mas ainda são não específicas para tecidos. Além disso, sua precisão é limitada pelo seu comprimento de onda, levando a aquecimento significativo dos

tecidos circundantes ou aquecimento insuficiente dos tumores-alvo. Tratamentos percutâneos com sondas de radiofrequência, microondas e técnicas de fotocoagulação mediadas por laser possibilitam uma localização espacial mais precisa, mas requerem acesso físico ao tumor e localização a priori do tumor. Outras modalidades, como o ultrassom, sofrem de limitações semelhantes (KUMAR; MOHAMMAD, 2011; SURIYANTO; NG; KUMAR, 2017).

O mecanismo de entrega ideal para hipertermia seria não invasivo, com alta especificidade celular e capaz de um aquecimento de alta intensidade precisamente localizado em tecidos profundos. Gilchrist et al. (1957) propuseram pela primeira vez materiais magnéticos para hipertermia no ano de 1950 e, nos anos posteriores, nanopartículas magnéticas mostraram ser capazes de atender a cada um desses requisitos (GILCHRIST et al., 1957; KUMAR; MOHAMMAD, 2011).

Nanopartículas magnéticas em suspensões coloidais estáveis podem ser administradas de forma não invasiva através de uma variedade de *drug delivery*. Após a inserção no corpo, normalmente por via sanguínea (intravenosa), podem ser dirigidos até o local adequado e aquecidos por um sistema de campo magnético remotamente controlado, ou seja, existe um direcionamento das nanopartículas para os locais necessários, tornando possível combater as doenças sem afetar diretamente os tecidos saudáveis. Isso permite um aquecimento eficiente em tecidos profundos com quase nenhum comprometimento de células e tecidos no caminho. As nanopartículas magnéticas podem ser direcionadas até certo ponto com campos magnéticos externos, permitindo uma localização específica do tecido mais superficial. A localização específica do tecido também pode ser obtida com uma funcionalização química apropriada e, além disso, as nanopartículas magnéticas têm mostrado a tendência de se acumular dentro de certo tipo de células tumorais por acumulação passiva (acúmulo de nanopartículas dentro da células causado pela dificuldade de excretar substâncias e pela alta vascularização nas proximidades de tumores) (BAÑOBRE-LÓPEZ; TEIJEIRO; RIVAS, 2013; GUIBERT et al., 2015; HERVAULT; THANH, 2014).

Finalmente, nanopartículas magnéticas têm sido usadas como veículo para a liberação controlada de drogas, bem como para hipertermia e, portanto, aumentam as possibilidades de uso de agentes terapêuticos multimodais. Partículas magnéticas que foram estudadas para uso em hipertermia consistem quase que inteiramente de

magnetita (Fe_3O_4) e espinélios relacionados com cobalto, níquel ou outras substituições (KUMAR; MOHAMMAD, 2011).

Nos últimos anos, grande parte do foco dos estudos e pesquisa tem sido em partículas superparamagnéticas, uma vez que nanopartículas de domínio único mostraram absorver mais potência em campos magnéticos e frequências fisiologicamente relevantes do que partículas de múltiplos domínios (JEYADEVAN, 2010). Dada à importância clínica, existe uma forte necessidade de nanopartículas otimizadas para a hipertermia magnética. No entanto, a otimização ainda não é bem compreendida e os resultados experimentais dos sistemas de nanopartículas variam amplamente (DEATSCH; EVANS, 2014).

1.5 Mecanismo de aquecimento

Na presença de um campo magnético externo, existe um alinhamento natural dos domínios magnéticos das nanopartículas. Se existir uma alternância do campo (campo magnético alternado), no qual os polos norte e sul são invertidos a taxas muito altas, os domínios magnéticos das nanopartículas também irão se reorientar nessas taxas e dois tipos diferentes de movimentos surgirão, originando a geração de calor. Uma das propriedades das nanopartículas superparamagnéticas está na geração de calor através das relaxações que ocorrem entre as reorientações dos domínios magnéticos das partículas em campo magnético alternado ou após cessar a aplicação do mesmo (DEATSCH; EVANS, 2014; ROSENSWEIG, 2002; SURIYANTO; NG; KUMAR, 2017).

A relaxação de Néel (**Figura 4**) envolve a reorientação do momento magnético da partícula na mesma direção do campo magnético com cada oscilação. A relaxação de Néel é vista como um movimento interno do material, no qual existe uma reorientação de cada domínio magnético na direção do campo magnético externo aplicado. O tempo de relaxação é dado pela **equação 6**,

$$\tau_N = \tau_o \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right) \quad (6)$$

sendo $t_0 = 10^{-9}$ s para partículas esféricas, K a constante anisotrópica e depende do material da partícula, V o volume da partícula, k_b a constante de Boltzmann, H_b o campo magnético aplicado e T a temperatura. A relaxação de Néel é fortemente

dependente do tamanho da partícula, uma vez que, basicamente, uma estrutura maior resultaria numa maior capacidade de alterações internas e, portanto, maior capacidade de reorientação dos domínios individuais (HERVAULT; THANH, 2014). Logicamente, existe um limite, pois, a partir de certo tamanho, o material não iria se enquadrar mais como nanopartícula.

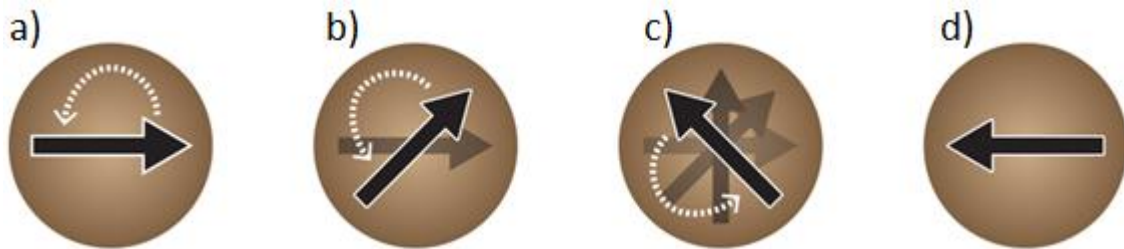


Figura 4 – Esquema da relaxação de Néel para partículas abaixo de 15 nm e consideradas superparamagnéticas (momento magnético sendo alterado em função do tempo). De a) para d) é representado a mudança da direção do domínio magnético em relação a alteração dos polos do campo magnético alternado. A relaxação de Néel envolve pequenas modificações na estrutura cristalina, que armazenam energia ao serem estimuladas pelo campo magnético. Ao cessar ou alterar a direção do campo magnético, a energia (energia interna) é liberada na forma de calor, da mesma forma como elucidado pela Primeira Lei da Termodinâmica **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Um outro modo de produção de calor pela aplicação de campo magnético alternado é a relaxação Browniana (**Figura 5**) que seria a produção de calor em função do atrito mecânico causado pela rotação da partícula no meio que a contém. O tempo de relaxamento Browniano é calculado pela seguinte **equação 7**,

$$\tau_B = \left(\frac{3\eta V_H}{k_B T} \right) \quad (7)$$

onde η é a viscosidade do líquido de transporte, V_H é o volume hidrodinâmico da partícula, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura. O mecanismo de relaxamento Browniano também é extremamente dependente do tamanho da partícula e da viscosidade. Uma maior viscosidade do meio líquido irá diminuir a capacidade de rotação das partículas e, conseqüentemente, diminuiria a capacidade de gerar calor por atrito (HERVAULT; THANH, 2014).

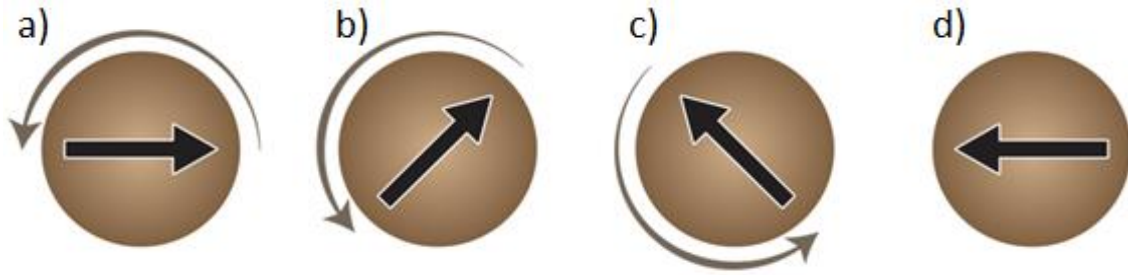


Figura 5 – Esquema da relaxação de Brown para partículas abaixo de 15 nm e consideradas superparamagnéticas (momento magnético sendo alterado em função do tempo). De a) para d) é representado a mudança da direção do domínio magnético em relação a alteração dos polos do campo magnético alternado considerando que a partícula realiza movimento de rotação. A relaxação de Brown envolve o processo de rotação da partícula e, conseqüentemente, cria atrito com o meio que a contém, gerando calor.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Devido à ampla distribuição de tamanhos que se encontram em diversas nanopartículas produzidas industrialmente ou em estudos científicos é muito comum utilizar a taxa de absorção específica (da sigla inglesa SAR) para comparar a capacidade de gerar calor das nanopartículas magnéticas (HERVAULT; THANH, 2014). O valor da SAR pode ser obtido pela **equação 8**:

$$SAR = \frac{\Delta T}{\Delta t} \frac{C}{m Fe_3O_4} \quad (8)$$

Sendo T a temperatura, t o tempo, C a capacidade calorífica da amostra e mFe_3O_4 a massa de ferro por unidade de massa de fluído (KALLUMADIL et al., 2009).

Conforme avançam os estudos de diferentes materiais, inclusive partículas de óxido de ferro funcionalizadas com espécies químicas que propiciam distintos valores de SAR, que passa a ser extremamente útil para a comparação das nanopartículas magnéticas e sua capacidade de gerar mais ou menos calor após a modificação da superfície com diferentes materiais, sejam com revestimentos inorgânicos, como revestimentos sílica e metais, ou orgânicos, como revestimento com biomoléculas ou polímeros (ABDOLLAH; FERESHTEH; NAZANIN, 2017; KALLUMADIL et al., 2009).

1.6 Revestimentos das nanopartículas magnéticas

As superfícies de nanopartículas magnéticas podem ser modificadas através da criação de revestimentos orgânicos, como polímeros, ou de revestimentos inorgânicos, como ouro e sílica. Essas alterações superficiais tornam possível uma posterior funcionalização pela ligação de várias moléculas bioativas (BERRY;

CURTIS, 2003). Com o revestimento da superfície, essas nanopartículas magnéticas podem ser dispersas em solventes adequados, formando suspensões homogêneas, chamadas ferrofluidos (BABINCOVÁ; PETER, 2001; WANG; HUSSAIN; KRESTIN, 2001).

Tal suspensão pode apresentar excelente estabilidade coloidal, com baixa capacidade de aglomeração, o que facilita a aplicação em seres vivos. As partículas revestidas podem interagir com um campo magnético externo e serem posicionadas em uma área específica do corpo humano, facilitando a ressonância magnética para o diagnóstico médico e a terapia do câncer assistida por campo magnético AC (BONNEMAIN, 1998). À medida que as partículas magnéticas se acumulam, por exemplo, no tecido do tumor, elas podem desempenhar um papel importante na detecção através de imagem de ressonância magnética ou como veículo de droga para certos medicamentos anticancerígenos. As nanopartículas magnéticas com característica de superfície adequadas apresentam um elevado potencial para uso em aplicações *in vitro* e *in vivo* (ABDOLLAH; FERESHTEH; NAZANIN, 2017; MAMANI; GAMARRA; BRITO, 2014).

O Laboratório de Materias Magnéticos e Coloides (LaMMC) estuda e estudou vários tipos diferentes de revestimento de magnetita para aplicação biológica. Estratégias como as de Vega-Chacón et al. (2017) e Bini et al. (2012) utilizam alcoxissilanos na superfície das nanopartículas magnéticas, criando uma casca que protege a magnetita de oxidação e degradação biológica. Esses revestimentos aumentam a estabilidade coloidal e, como relatado por Vega-Chacón et al. (2017), permite a inserção de grupos funcionais que servem como macroiniciadores de reações de polimerização.

Viali et al. (2013) e Nunes et al. (2014) estudaram a funcionalização de magnetita e poli(etilenoglicol) (PEG). O revestimento de superfície com PEG (denominado *PEGylation* em inglês) aumenta o diâmetro hidrodinâmico das partículas, promovendo uma maior separação entre as partículas e aumentando a estabilidade coloidal através de estabilização estérica, pois o espaço ocupado pelo polímero na superfície dificulta o processo de aglomeração. A estratégia principal para a inclusão de PEG na superfície da nanopartícula foi através do uso de ácido cítrico para formação de ligação covalente do grupo carboxílico com os grupos hidróxidos da superfície da magnetita. A ligação de grupos carboxílicos com a superfície de óxido de ferro já foi reportada na literatura e é caracterizada como uma reação espontânea

do tipo ácido base, na qual se libera água como produto (ABDOLLAH; FERESHTEH; NAZANIN, 2017; CHEN et al., 2011; LIU; FRAYLICH; SAUNDERS, 2009). A ligação monodentada não é a única possibilidade com a superfície do óxido de ferro, pois existem três diferentes modos de ligação: monodentada, ponte e bidentada. Para facilitar a compreensão, este trabalho irá utilizar apenas a representação monodentada da ligação de grupos ácidos carboxílicos com a superfície da magnetita para esquemas de síntese e reações químicas.

1.7 Polímeros termossensíveis e *drug delivery*

Ao longo dos anos, um desafio a ser vencido pelo campo farmacêutico é a diminuição dos efeitos provenientes da interação entre um fármaco e outros sítios bioquímicos que não são de interesse (KOO; RUBINSTEIN; ONYUKSEL, 2005). Como alternativa para esse tipo de problema, iniciaram-se os estudos de sistemas de liberação controlada de fármacos (*drug delivery*), sendo que os objetivos principais desse tipo de sistema são: diminuir os efeitos colaterais e o número de dosagens requeridas; manter a biodisponibilidade do fármaco; obter biocompatibilidade entre o carreador com o corpo humano (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

Em linhas gerais, os sistemas de *drug delivery* consistem no acoplamento de um fármaco a um carreador. Esse pode ser de diversas naturezas, seja ela aminoácidos, polímeros, micela, vesículas, nanopartículas etc. (KOO; RUBINSTEIN; ONYUKSEL, 2005; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Alguns tipos de polímeros merecem destaque por apresentarem grande sensibilidade frente à presença de estímulos externos. Logo, pequenas mudanças no ambiente químico (pH, concentração, força iônica...) ou físico (temperatura, potencial elétrico, pressão...) acarretam mudanças estruturais ou de propriedades (BAG; RAO, 2006; JEONG; GUTOWSKA, 2002). Geralmente solúveis em água, esses polímeros são diversas vezes chamados de “inteligentes” por apresentarem propriedades facilmente controladas através de determinados estímulos (ABDOLLAH; FERESHTEH; NAZANIN, 2017; JAGUR-GRODZINSKI, 2009).

A classificação desses polímeros corresponde ao tipo de estímulo ao qual esses respondem. Como, por exemplo, polímeros termossensíveis ou pH-sensíveis (SCHMALJOHANN, 2006). Na área de *drug delivery*, alguns estudos visam a

otimização dos polímeros: na sua morfologia, na sua capacidade de resposta frente a estímulos e em suas propriedades físico-químicas (RUSU et al., 2016). Para tal, pode-se citar a copolimerização de monômeros hidrofílicos com os hidrofóbicos, com objetivo de melhorar as interações células/polímeros ou permitir a incorporação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos simultaneamente (PRIYA JAMES et al., 2014; WU; CHU, 2008).

A origem do comportamento “inteligente” dos polímeros termossensíveis se deve à transição de fase dependente de uma temperatura crítica (**Figura 6**), a qual produz mudanças rápidas na solubilidade. A temperatura na qual ocorre a mudança na solubilidade é denominada temperatura crítica mínima de solução (*lower critical solution temperature* ou LCST) (ALARCON; PENNADAM; ALEXANDER, 2005).

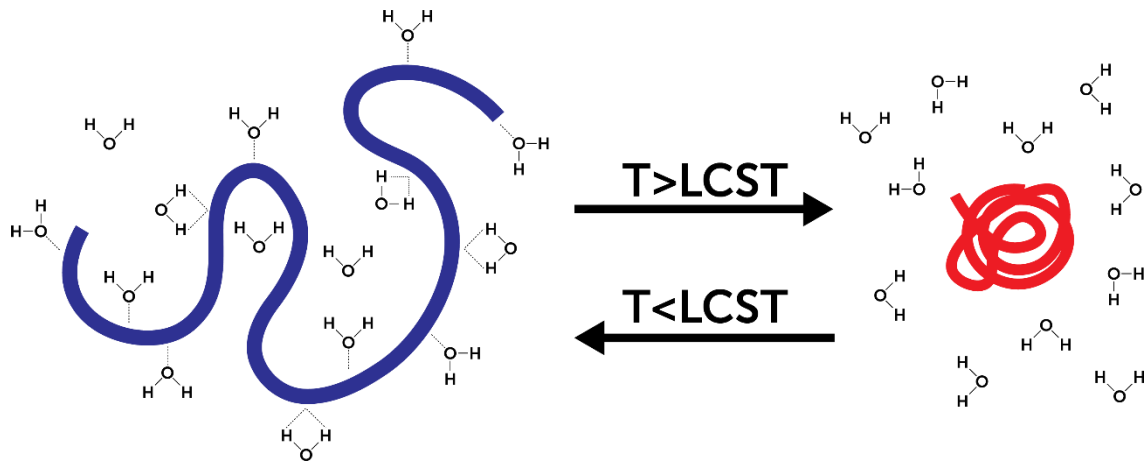


Figura 6 – Esquema de resposta de polímero “inteligente” em relação ao aumento da temperatura
Fonte: Elaborado pelo autor.

Esse comportamento pode ser explicado termodinamicamente por ser um processo energeticamente favorável. E usando a equação da energia de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$): a separação de fases é o processo mais favorável quando a temperatura sofre um aumento, devido, principalmente, à entropia do sistema mais vizinhança, em que as interações que existem entre as moléculas de água e a cadeia do polímero não são suficientemente fortes e o polímero passa a interagir entre si, excluindo as moléculas de água da sua estrutura, formando glóbulos suspensos em água (WARD; GEORGIU, 2011).

O polímero termossensível mais estudado é o poli(N-isopropilacrilamida) ou PNIPAm (**Figura 7**). Cadeias de PNIPAm apresentam unidades de repetição baseadas em grupos hidrofóbicos (isopropil) e hidrofílicos (amida) e a sua temperatura crítica mínima de solução é próxima da temperatura do corpo humano,

aproximadamente 32°C. Abaixo dessa temperatura, o polímero é solúvel em água e forma uma mistura homogênea, ou seja, uma solução. Com o aquecimento, o polímero torna-se hidrofóbico e imiscível, por apresentar interações entre as cadeias fortes, ocasionando a separação de fases. Como poucas cadeias se unem para a formação do precipitado, a solução torna-se uma suspensão, na qual pequenas partículas dos polímeros são detectáveis por técnicas que envolvem espalhamento de luz. Se a solução original for muito concentrada, é possível ver o efeito de turvamento da suspensão, uma vez que as cadeias de polímeros se tornam insolúveis (ALARCON; PENNADAM; ALEXANDER, 2005; HOCINE; LI, 2013; WARD; GEORGIU, 2011).

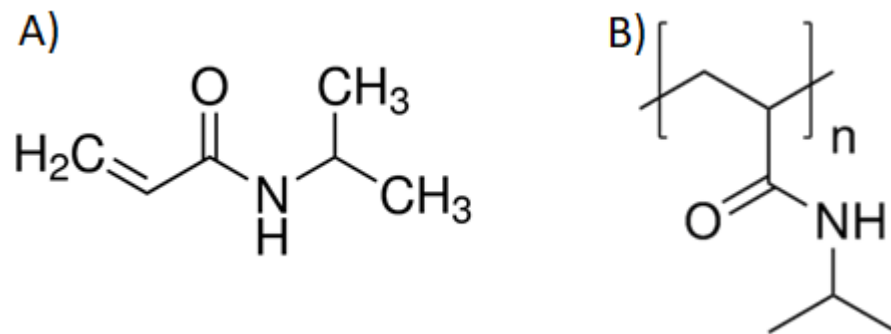


Figura 7 – Representação da estrutura A) N-isopropilacrilamida e B) poli(N-isopropilacrilamida
Fonte: Elaborado pelo autor.

Utilizando uma interpretação molecular para a compreensão da transição de fase, retoma-se a importância das forças intermoleculares que governam o fenômeno. Átomos altamente eletronegativos (isto é, N, O, F e Cl) associados à átomos de hidrogênio – como por exemplo, em pequenas moléculas orgânicas – possuem tendência a realizar ligações de hidrogênio com a água. Quando um polímero é dissolvido em água, existem três tipos de interações que podem ocorrer: apenas entre moléculas de polímero, entre moléculas de água e polímeros e apenas entre moléculas de água. A competição entre as ligações possíveis origina o fenômeno de colapso da cadeia polimérica, pois, uma vez que determinada temperatura é atingida, a energia contida nas moléculas de solvente (água) é muito alta para a manutenção das pontes de hidrogênio entre as moléculas de água e o polímero. Assim, as ligações entre as cadeias de polímeros (moléculas de polímero interagindo em sua maioria entre si) são favorecidas, originando interações apolares fortes, causando a expulsão

do solvente, redução do volume e colapso da estrutura (LANZALACO; ARMELIN, 2017).

Devido a seu caráter termossensível, o PNIPAm é muito estudado nas áreas de química e física, como hidrogéis funcionais, membranas filtrantes e revestimentos de nanopartículas (ALARCON; PENNADAM; ALEXANDER, 2005; HOCINE; LI, 2013; WARD; GEORGIU, 2011). E, dessa forma, é possível aproveitar suas propriedades utilizando nanopartículas magnéticas como substrato. As nanopartículas magnéticas passam a exercer o papel de substrato fornecedor de calor, pois, ao serem expostas a um campo magnético oscilante, podem produzir calor através de relaxação de Brown ou Néel e provocar modificação na estrutura, devido à propriedade termossensível do polímero de forma controlada (HERVAULT; THANH, 2014).

A estratégia, em liberação controlada, é fazer com que esse sistema de nanopartículas magnéticas revestidas com polímeros inteligentes sejam impregnadas com um fármaco. Dentro da gama de fármacos a respeito dos quais existe um interesse em aplicações de liberação controlada encontram-se o metotrexato (MTX) e o diclofenaco de potássio. Metotrexato é um medicamento que possui uma estrutura similar ao ácido fólico, como pode ser visto pela **Figura 8**.

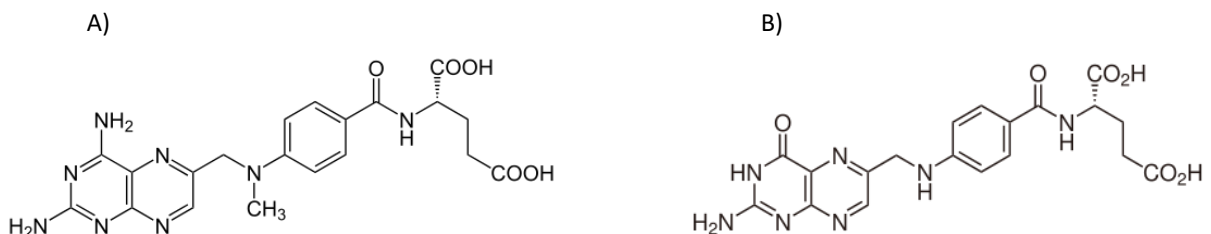


Figura 8 – A) Estrutura do ácido fólico e B) Estrutura do metotrexato
Fonte: Elaborado pelo autor.

O metotrexato tem uma ação direta nos mecanismos que envolvem replicação do DNA na presença de ácido fólico, funcionando como um inibidor na síntese de DNA. Esse tipo de tratamento é muito utilizado no combate ao câncer e doenças autoimunes (WOOD; WO, 2015). Porém, o medicamento, por interferir diretamente na síntese do DNA, passa a ser problemático em doses maiores e, em tratamentos envolvendo quimioterapia, apresentam efeitos colaterais clássicos, como: náuseas, vômitos, cirrose, queda de cabelo, pneumonia etc. Portanto, controlar a dose desse tipo de fármaco passa a ser essencial para melhorar o tratamento dos pacientes, diminuindo os efeitos colaterais (HESS; KHASAWNEH, 2015; WOOD; WO, 2015).

O diclofenaco de potássio (**Figura 9**) é o anti-inflamatório não esteróide (AINE) mais amplamente prescrito em todo o mundo (MCGETTIGAN; HENRY, 2013). Mais de 10 milhões de prescrições de medicamentos com diclofenaco foram dispensadas nos EUA em 2012. Desde sua introdução em 1973, vários novos medicamentos contendo diclofenaco foram aprovados para uso e comercializados nos EUA. O crescimento das prescrições de AINEs nos EUA foi impulsionado, em parte, pela introdução de novos medicamentos para diclofenaco (ALTMAN et al., 2015). Esses novos produtos têm propriedades farmacocinéticas variadas e regimes de dosagem e são indicados para o tratamento de uma variedade de condições de dor aguda e/ou crônica (SULTAN et al., 2009; TODD; SORKIN, 1988). O desenvolvimento de medicamentos diclofenaco demonstra como a tecnologia farmacêutica pode ser usada para impulsionar a inovação, criando medicamentos com maior eficácia, segurança e maior utilidade clínica.

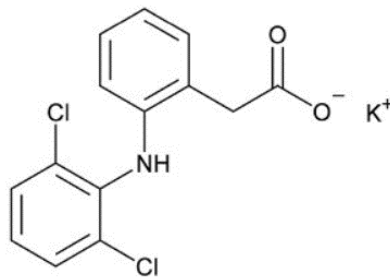


Figura 9 – Fórmula estrutural do diclofenaco de potássio
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os AINEs, incluindo o diclofenaco de potássio, resumem os avanços no desenvolvimento de medicamentos diclofenaco, com ênfase primária nas modificações das propriedades farmacocinéticas do diclofenaco implementadas para melhorar sua eficácia e segurança considerando novas tecnologias em *drug delivery* (ALTMAN et al., 2015). Esses trabalhos consideram a criação de medicamentos mais compatíveis com carreadores de fármaco e permitem o uso de uma quantidade menor, sem comprometer a concentração necessária para eficácia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar nanopartículas magnéticas revestidas com copolímeros termossensíveis capazes de carregar/liberar metotrexato e diclofenaco de potássio. Essas partículas devem responder ao estímulo temperatura para liberar maior e menor concentração de fármaco encapsulado. A aplicação futura do material será voltada ao auxílio no tratamento do câncer pelo método de termo quimioterapia. A **Figura 10** é a representação ilustrada do objetivo geral.

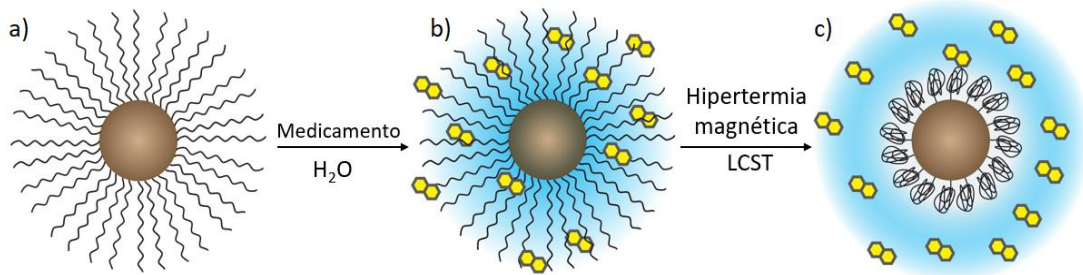


Figura 10 – Representação esquemática do material desejado. a) Nanopartícula revestida com polímero termossensível; b) Entumescimento da cadeia do polímero com solução contendo o medicamento; c) Estrutura do copolímero colapsada após hipertermia magnética e liberação do medicamento

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas magnéticas de óxido de ferro capazes de gerar calor com a aplicação de campo magnético alternado e avaliar a capacidade de gerar calor pelas curvas de hipertermia magnética;

- Utilizar ácido acrílico como revestimento das nanopartículas de óxido de ferro através do grupo funcional ácido carboxílico e utilizar a ligação dupla como início da polimerização de copolímeros na superfície do material;

- Inserir na superfície das nanopartículas de magnetita os copolímeros poli(N-isopropilacrilamida)-co-poli(ácido acrílico) PNIPAAm-co-PAA e poli(n-isopropilacrilamida)-co-poli(N-vinilcaprolactama) PNVCL-co-PAA através de reação de polimerização em suspensão de nanopartículas;

- Modificar os polímeros pela inserção do grupo hidrofóbico (pentano) nas cadeias dos polímeros através de reação de esterificação de 1-pentanol com o grupo ácido carboxílico do ácido acrílico;

- Comprovar a presença de polímero na superfície das nanopartículas de óxido de ferro através das técnicas de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, potencial zeta e análise termogravimétrica;

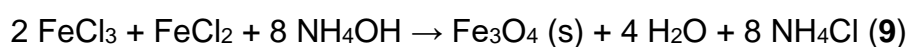
- Verificar os efeitos do revestimento das nanopartículas antes e após a esterificação em relação à temperatura mínima crítica de solução (LCST) através da mudança do diâmetro hidrodinâmico pela técnica de espalhamento de luz dinâmico;

- Verificar taxa de liberação das drogas metotrexato e diclofenaco de potássio do sistema nanopartícula-copolímero em solução com pH, força iônica e temperatura similares ao sangue humano.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Síntese de nanopartículas

A síntese utilizada para a preparação de nanopartículas de magnetita foi o método da coprecipitação (**equação 9**), utilizando cloreto de ferro II e cloreto de ferro III em solução de hidróxido de amônio (DA SILVA NUNES et al., 2014; VEGA-CHACÓN et al., 2017; VIALI et al., 2013).



Para a síntese, uma solução de cloreto de ferro II e cloreto de ferro III (100 ml) na proporção 1:2 foi adicionada num balão de fundo redondo de 250 ml contendo uma solução de hidróxido de amônio 10 mol L^{-1} (100 ml). O procedimento foi realizado em agitação constante e atmosfera de argônio, com o mesmo sendo borbulhado durante todo o processo. Após toda a solução de ferro ser adicionada, o sistema ficou em agitação por mais 8 horas com uma temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Esse procedimento foi feito com o objetivo de fornecer um material mais cristalino e com melhores propriedades para gerar calor por hipertermia magnética. Por fim, lavou-se as nanopartículas com água ultrapura através de separação magnética até próximo de pH 7,0 e congelou-se as amostras para posterior análise ou reações.

A **Figura 11** representa o fluxograma com os passos do preparo das nanopartículas magnéticas.

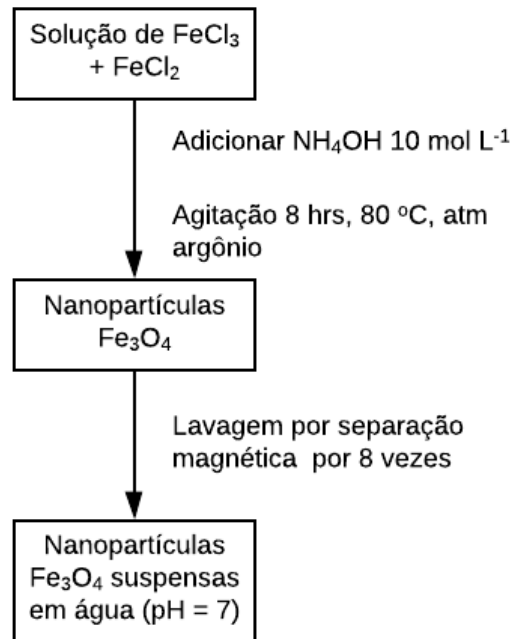
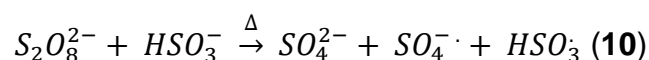


Figura 11: Fluxograma que representa o esquema da síntese de nanopartículas magnéticas pela síntese de coprecipitação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Polimerização e funcionalização da superfície

Para a polimerização, 30 ml da suspensão de nanopartículas funcionalizadas (aproximadamente 15 mg ml⁻¹) foram adicionadas em balão de 2 bocas. Foram adicionados os monômeros de N-isopropilacrilamida (NIPAm), na proporção molar NIPAm/AA = 0,5, ou N-vinilcaprolactona (NVLC) e ácido acrílico, na proporção molar NVCL/AA = 0,5. Esperou-se 20 minutos em agitação constante para que ocorresse a funcionalização da superfície pelos grupos carboxílicos do ácido acrílico. Persulfato de potássio e bisulfito de sódio foram adicionados como iniciador e catalisador da polimerização, respectivamente (EBDON; HUCKERBY; THOMAS, 1994). Ambos são responsáveis pela geração de radicais livres segundo a **equação 10**:



Os radicais produzidos irão iniciar a reação de polimerização através da ligação dupla do NIPAm, AA ou NVCL.

O balão foi lacrado e seu interior foi submetido a vácuo e preenchido com argônio. A temperatura do sistema foi elevada a 80 °C e permaneceu sob agitação

constante durante 4 horas. Por fim, as nanopartículas foram lavadas com água ultrapura através de separação magnética até pH próximo a 7,0 e submetidas a diálise. Conforme foram feitas as modificações a lavagem por separação magnética se tornou mais lenta. A **Figura 12** representa o fluxograma com os passos da modificação da superfície das nanopartículas de óxido de ferro.

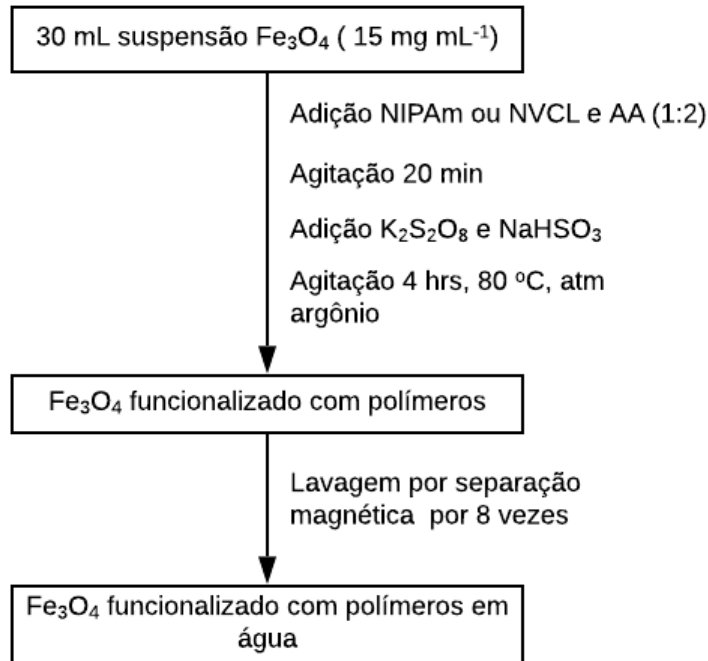


Figura 12: Fluxograma que representa o esquema da modificação da superfície de nanopartículas magnéticas pela síntese de polimerização.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Esterificação

Para esterificação, aproximadamente 100 mg de magnetita revestida com polímeros foram utilizadas. Realizou-se a troca do solvente água para 1-pentanol, utilizando-se acetona como intermediário. As partículas suspensas em 15 ml de 1-pentanol e 10 mg de cloreto de ferro III hexahidratado (catalisador) foram adicionadas em frasco de reação de 50 ml. O sistema da reação permaneceu em 130 °C por 24 horas sob atmosfera de argônio. As amostras então foram lavadas e o solvente foi trocado novamente para água. As amostras com a sigla **mod** em seus respectivos

nomes significam que os copolímeros foram esterificados com 1-pentanol. A **Tabela 1** representa a nomenclatura utilizada para as amostras.

Tabela 1 – Descrição dos materiais sintetizados

Nome	Descrição
Mag	Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro
Mag@PNIPAm-co-PAA	Nanopartículas magnéticas revestidas com copolímero PNIPAm-co-PAA
Mag@PNVCL-co-PAA	Nanopartículas magnéticas revestidas com copolímero PNVCL-co-PAA
Mag@PNIPAm-co-PAAmod	Nanopartículas magnéticas revestidas com copolímero PNIPAm-co-PAA após esterificação
Mag@PNVCL-co-PAAmod	Nanopartículas magnéticas revestidas com copolímero PNVCL-co-PAA após esterificação

Fonte: Elaborado pelo autor.

A **Figura 13** representa o fluxograma com os passos da esterificação dos polímeros presentes na superfície das nanopartículas de óxido de ferro.

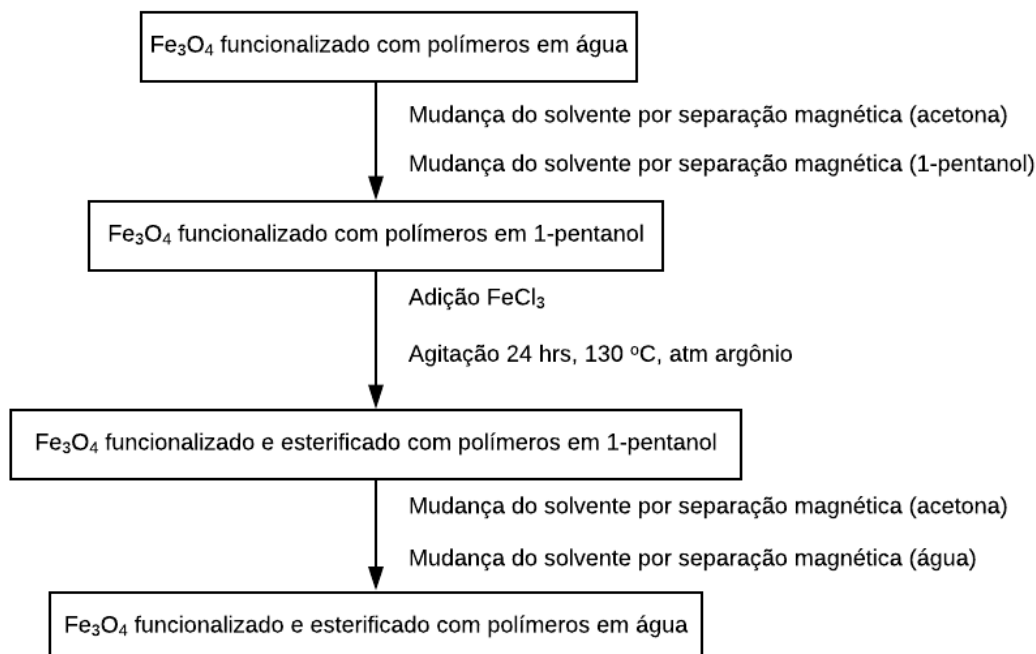


Figura 13: Fluxograma que representa o esquema da esterificação dos polímeros presentes na superfície das nanopartículas de óxido de ferro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Caracterizações

3.4.1 Hipertermia magnética

Um frasco contendo 1 ml de suspensão de magnetita com concentração próxima a 15 mg ml^{-1} foi submetido a aplicação de um campo magnético $H = 14 \text{ kAm}^{-1}$ e com frequência $f = 420 \text{ kHz}$ durante 6 minutos. A temperatura foi medida em um recipiente hermeticamente fechado, sem a interferência do ambiente externo. O aparelho utilizado foi *DM100 Series* da marca *Nanoscale Biomagnetics* presente no Laboratório de Materiais Cerâmicos do Instituto de Química de Araraquara (UNESP). As curvas temperatura x tempo obtidas foram analisadas para obtenção da taxa de absorção específica (da sigla inglesa SAR) através do método de interpolação do polinômio da equação de Box-Lucas (KALLUMADIL et al., 2009).

3.4.2 Espalhamento de luz dinâmico (DSL)

Para as caracterizações, 20 ml das suspensões de magnetitas revestidas com aproximadamente $0,01 \text{ g ml}^{-1}$ foram analisadas em pH próximo de 7,4. Utilizou-se o equipamento *Zetasizer* da *Malvern Instruments* presente no Laboratório de Materiais Magnéticos e Coloides do Instituto de Química de Araraquara (UNESP). O diâmetro hidrodinâmico foi calculado pela equação de Stokes-Einstein (**equação 11**):

$$D_h = k_b T / 3\pi\eta D \quad (11)$$

Sendo k_b a constante de Boltzmann, T a temperatura, η a viscosidade do meio e D o coeficiente de difusão translacional.

O raio hidrodinâmico das amostras foi medido a cada $3 \text{ }^\circ\text{C}$, com cinco análises por ponto para o cálculo do desvio padrão. Outras informações sobre o modo de funcionamento do aparelho é a utilização do laser vermelho no comprimento de onda 650 nm e o laser foi posicionado num ângulo de 173° em relação a amostra.

3.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Para as caracterizações, todas as amostras foram secas e prensadas em pastilhas de brometo de potássio. A composição das pastilhas foi aproximadamente 1 mg de amostras para 100 mg de brometo de potássio. Utilizou-se o *FT-IR Spectrometer Frontier* da *Perkin Elmer*, presente no Laboratório de Materiais Magnéticos e Coloides do Instituto de Química de Araraquara (UNESP), no modo transmissão com resolução de 4 cm^{-1} , realizando 24 varreduras no intervalo de 4000 cm^{-1} até 500 cm^{-1} .

3.4.4 Potencial zeta

Para as caracterizações, 15 ml das suspensões de magnetitas analisadas foram ajustadas para pH 7,0 utilizando ácido clorídrico $0,01\text{ mol L}^{-1}$ e adicionado cloreto de sódio até a concentração de $0,01\text{ mol L}^{-1}$. A suspensão ficou em agitação por 1 dia antes dos experimentos, para garantir a completa homogeneidade. Utilizou-se o equipamento *Zetasizer* da *Malvern Instruments* presente no Laboratório de Materiais Magnéticos e Coloides do Instituto de Química de Araraquara (UNESP). As amostras tiveram o pH variado de 3 até 10 utilizando-se um titulador automático acoplado ao analisador. As soluções utilizadas para controle do pH foram HCl $0,01\text{ mol L}^{-1}$ e NaOH $0,01\text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

3.4.5 Liberação controlada

3.4.5.1 Incorporação e liberação de Metotrexato e diclofenaco de potássio

Primeiramente, realizou-se a incorporação de metotrexato ou diclofenaco de potássio, na qual 10 mg de magnetita revestida foram colocadas em banho de gelo numa solução de $1,5\text{ mg ml}^{-1}$ de metotrexato ou $0,97\text{ mg ml}^{-1}$ de diclofenaco de potássio e tampão fosfato pH 7,4 por 24 horas. A concentração foi inicialmente escolhida por se tratar do máximo valor de metotrexato que foi possível de solubilizar em água. Os valores de massa entre metotrexato e diclofenaco de potássio são diferentes para manter a mesma concentração molar para ambos os experimentos, uma vez que metotrexato e diclofenaco de potássio têm massas molares distintas. As nanopartículas revestidas impregnadas com metotrexato foram lavadas em água

ultrapura gelada por centrifugação e, então, 2 mg das nanopartículas foram armazenadas em saco de diálise para o teste de liberação.

3.4.5.2 Liberação controlada de metotrexato e diclofenaco de potássio

A membrana de diálise contendo 2 mg de magnetita impregnada com fármaco foi inserida num tubo de ensaio com exatamente 15 ml de tampão fosfato pH 7,4 e mantido em temperatura constante. Alíquotas de 1 ml foram recolhidas em tempos distintos e cada alíquota foi analisada por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta. A cada 1 ml de solução retirado foi inserido novamente 1 ml de tampão fosfato para manter o volume de solução constante.

A curva analítica foi preparada com metotrexato da marca *Sigma-Aldrich* (lote: PHR1396) e utilizou-se o valor máximo da banda próxima 303 nm como base para o cálculo da absorbância, pois apresenta uma boa separação entre as bandas e sinal dentro do limite de detecção como observado na **Figura 14**. A **Figura 14** representa o espectro de absorção UV-vis do medicamento metotrexato e a curva analítica preparada para o cálculo da concentração de medicamento liberado. A curva analítica foi preparada utilizando-se o valor de absorbância para diferentes padrões de concentrações determinadas e utilizou-se o valor da absorbância em 303 nm como correlação entre absorbância e concentração em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

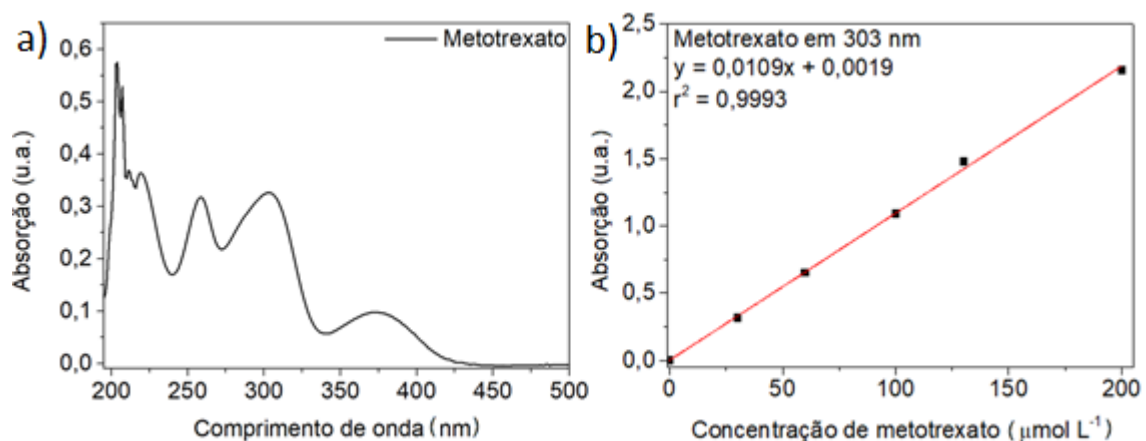


Figura 2 – Espectro UV-vis do medicamento metotrexato (a) e curva de calibração preparada para cálculo da concentração liberada (b)

Fonte: Elaborado pelo autor.

A curva analítica foi preparada com diclofenaco de potássio e utilizou-se o pico em 276 nm como base para o cálculo da absorbância. A **Figura 15** representa o espectro de absorção UV-vis do medicamento diclofenaco de potássio e a curva analítica preparada para o cálculo da concentração de medicamento liberado.

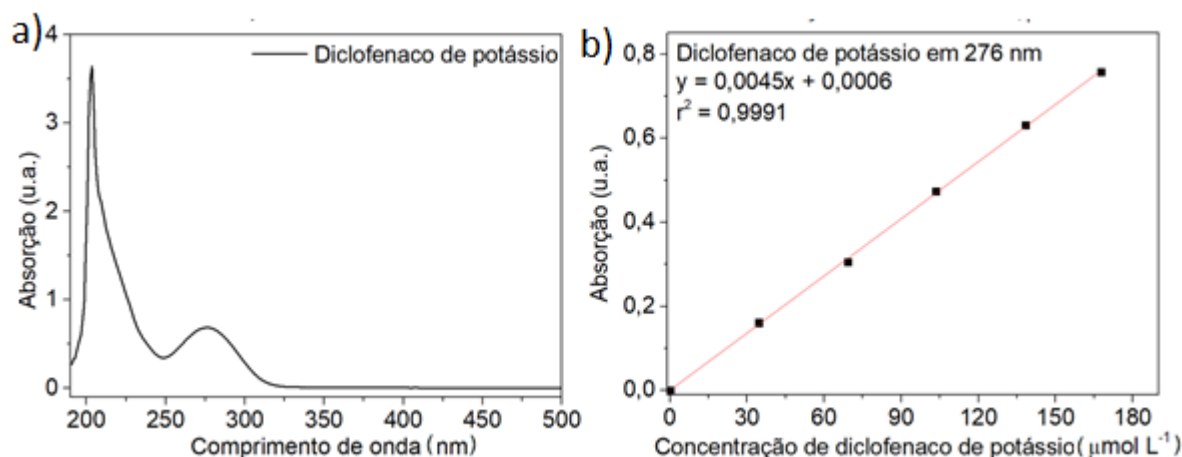


Figura 15 – a)Espectro UV-vis do medicamento diclofenaco de potássio e b) curva de calibração preparada para calcula da concentração liberada

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.6 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Para determinação da massa molar dos copolímeros PNIPAm-co-PAA, PNVCL-co-PA, PNIPAm-co-PAAmod e PNVCL-co-PAAmod, as sínteses de polimerização e esterificação foram feitas na ausência de magnetita. As soluções poliméricas foram liofilizadas durante 1 dia e os polímeros secos foram novamente solubilizados em 1 ml de N,N – Dimetilformamida (DMF) e a solução foi filtrada por membrada de 0,43 μm para análise em cromatografia de permeação em gel. O equipamento utilizado é um cromatógrafo de permeação em gel da marca *Malvern Instruments*, com detector de índice de refração. As duas colunas (KD-801 e KD-803) utilizadas em série da marca *Shodex* apresentam compatibilidade com o solvente DMF.

A curva analítica foi preparada com padrão de poli(estireno) (PE) da marca *Malvern Instruments*, com diferentes massas moleculares. O equipamento encontra-se no Laboratório de Materiais Magnéticos e Coloides do Instituto de Química de Araraquara (UNESP), O ajuste da curva analítica (**Figura 16**) foi feito através de polinômio de terceira ordem utilizando o programa *Omini Sec* da empresa *Malvern*

Instruments. A **Tabela 2** representa os padrões do polímero poliestireno utilizado para a calibração da curva de massa molar.

Tabela 2 – Padrões de PE utilizados no preparo da curva de calibração do método de cromatografia de permeação em gel (GPC)

Padrões	Mp	Mw	Mn
PS4500K	4200000	4480000	3930000
PS2000K	1900000	1970000	1790000
PS940K	940000	950000	925000
PS400K	400000	410000	395000
PS170K	170000	171000	164000
PS105K	103500	104401	101009
PS78K	77000	78200	76000
PS30K	29600	30100	29100
PS13K	13400	13700	13100
PS6000	6040	6220	5870
PS2500	2560	2630	2500
PS1200	1200	1241	1160

Fonte: Elaborado pelo autor.

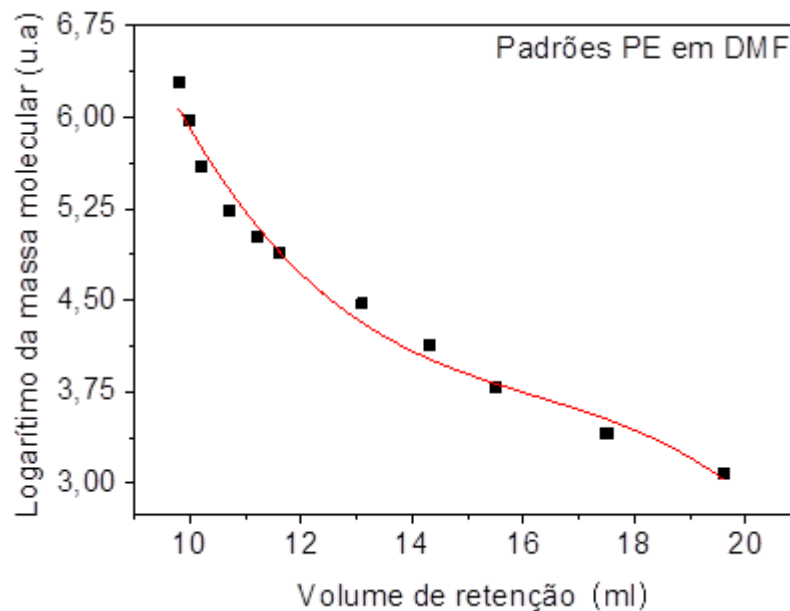


Figura 3 – Curva de calibração para os padrões de poli(estireno) com diferentes massas moleculares em DMF

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.7 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Para o preparo das amostras, as nanopartículas secas (aproximadamente 5 mg) foram suspensas em isopropanol. Utilizou-se *grids* de cobre revestidos com polímero *formvar* para imobilização das partículas suspensas em isopropanol. Os *grids* foram mantidos em dessecador a vácuo por 2 dias e encaminhados para análise. Um equipamento JEOL JEM2100 LaB6 - 200 kV foi utilizado para o estudo de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). O microscópio encontra-se no laboratório multiusuários do departamento de físico-química da USP São Carlos. Histogramas de distribuição de tamanho de partícula foram construídos baseando-se na contagem de aproximadamente 150 partículas num total de 4 micrografias por amostra. Para a contagem das partículas utilizou-se o *software ImageJ*.

3.4.8 Análises termogravimétricas (TG)

As curvas termogravimétricas foram registradas no *TA Instruments SDT 2960* (TG-DTA simultâneo) presente no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química de Araraquara (UNESP), utilizando atmosfera de ar sintético com vazão de 100 ml min^{-1} , com taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$; a massa de amostra pesada foi de $3,00 \pm 0,5 \text{ mg}$. O equipamento foi calibrado com as mesmas condições de análise e utilizando o índio como padrão. As curvas foram registradas a partir da temperatura ambiente até $700 \text{ }^\circ\text{C}$ (CHADHA; BHANDARI, 2014).

3.4.8 Análise elementar

O analisador elementar CHNS/O 2400 série II da *Perkin Elmer* localizado no Laboratório multiusuários do Instituto de Química de Araraquara foi utilizado para o cálculo dos teores de carbono, nitrogênio e hidrogênio nas amostras sólidas. As análises de carbono, hidrogênio e nitrogênio são realizadas simultaneamente com amostras de 5 mg de material, cujo desvio padrão é de 3% em massa. As amostras devem ser maceradas, secas e guardadas no dessecador antes da análise. O procedimento para análise de C, N, H é feito através da queima em atmosfera de oxigênio do material e a detecção da proporção dos gases produzidos é analisada por um detector elétrico capaz de identificar a proporção dos gases produzidos CO_2 , NO_2 e H_2O .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como considerações iniciais do trabalho, a análise dos resultados das sínteses será feita para melhor compreensão do material. Primeiramente, as nanopartículas magnéticas foram mantidas em agitação constante na presença de solução de ácido acrílico para que fosse possível a incorporação do mesmo na superfície do óxido de ferro através de ligação química. A **Figura 17** mostra a representação esquemática da formação da ligação da superfície com uma molécula de ácido acrílico.

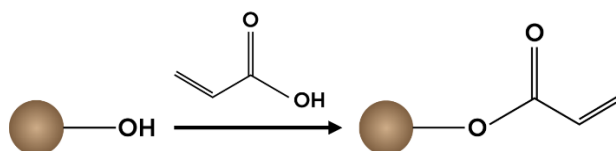


Figura 17 – Representação esquemática da ligação do ácido acrílico com a superfície da nanopartícula magnética

Fonte: Elaborado pelo autor.

A ligação de grupos carboxílicos com a superfície de óxido de ferro já foi reportada na literatura e é caracterizada como uma reação espontânea do tipo ácido base, na qual se libera água como produto (ABDOLLAH; FERESHTEH; NAZANIN, 2017; CHEN et al., 2011; LIU; FRAYLICH; SAUNDERS, 2009). A ligação monodentada não é a única possibilidade de ligação com a superfície do óxido de ferro, pois existem diferentes tipos de ligação, como mencionando anteriormente. Porém, aqui, será utilizada apenas a ligação monodentada para facilitar a compreensão dos esquemas de síntese.

Após a funcionalização com ácido acrílico, iniciou-se a síntese com adição do iniciador de reação de polimerização persulfato de potássio, o catalisador da reação bisulfito de sódio e os monômeros da reação de polimerização (ácido acrílico, N-isopropilacrilamida e N-vinilcaprolactama) e, assim, a reação de polimerização radicalar foi possível pela união das moléculas através de ligação dupla dos monômeros. A **Figura 18** representa o esquema da polimerização na superfície da nanopartícula.

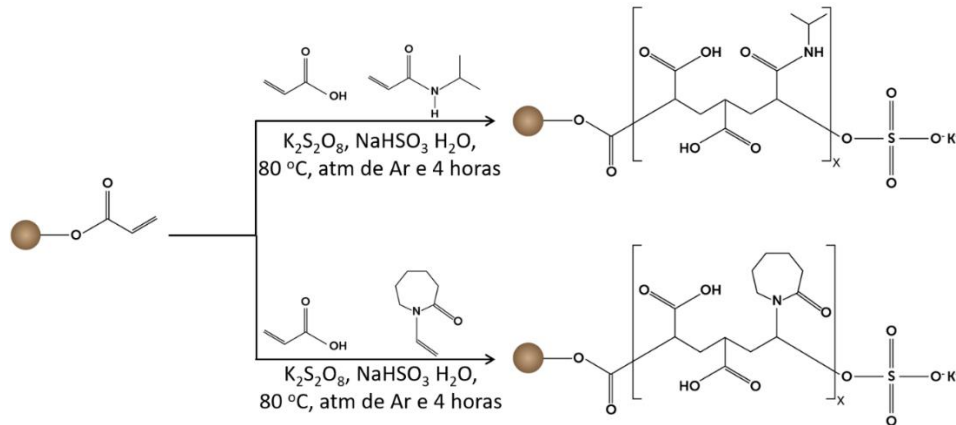


Figura 4 – Esquema da reação de polimerização na superfície da magnetita revestida com ácido acrílico. As duas rotas de síntese estão expressas, sendo uma com ácido acrílico e N-isopropilacrilamida e outra com ácido acrílico e N-vinilcaprolactama

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma vez prontas as nanopartículas com revestimento polimérico, essas foram submetidas a um processo de esterificação adaptado de Komura et al. (2008), utilizando cloreto de ferro III como catalisador e 1-pentanol como solvente. O esquema da **Figura 19** representa o esperado após a esterificação.

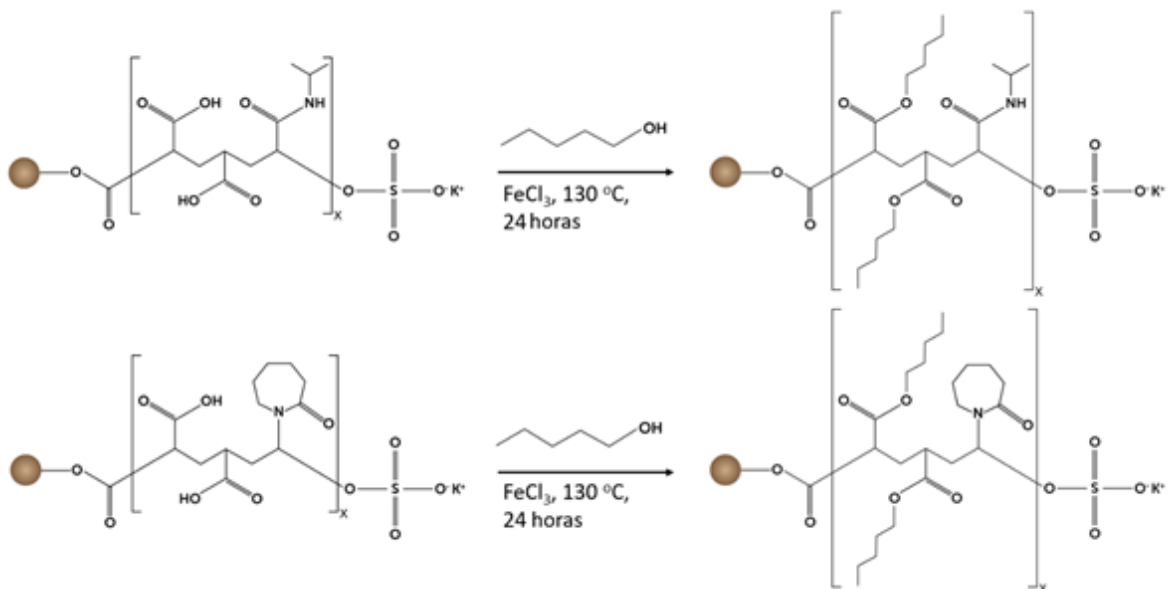


Figura 5 – Reação de esterificação das magnetitas funcionalizadas com copolímero PNIPAAm-co-PAA

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma vez com os materiais sintetizados, as caracterizações futuras darão os pontos de apoio para confirmação da estrutura, das propriedades físico-químicas e do comportamento na liberação de fármaco pelos materiais. Basicamente, serão

confirmados os seguintes tópicos ao longo deste trabalho: se o processo de polimerização ocorreu e se o polímero ficou depositado na superfície da magnetita; a relação entre a massa de polímero e a massa de magnetita; o tamanho das partículas de óxido de ferro; a capacidade de gerar calor através da aplicação de campo magnético alternado; a variação do tamanho do revestimento de polímero em função do aumento da temperatura; como os materiais se comportam em solução aquosa em relação às cargas na superfície; a capacidade de incorporação e liberação de fármacos; a massa molecular e composição dos polímeros.

Para a identificação dos grupos funcionais dos polímeros na superfície das nanopartículas magnéticas as amostras funcionalizadas foram submetidas a espectroscopia vibracional na região do infravermelho para verificar se PNIPAAm-co-PAA e PNVCL-co-PAA estavam presentes na superfície.

Primeiramente, foram coletados os espectros dos monômeros utilizados para as sínteses dos copolímeros: N-isopropilacrilamida, N-vinilcaprolactona e ácido acrílico. Os espectros dessas moléculas e suas principais bandas são relatadas em trabalhos científicos e estão mostradas na **Figura 20** (DENG et al., 2014; JIANG et al., 2014; MARQUES et al., 2016).

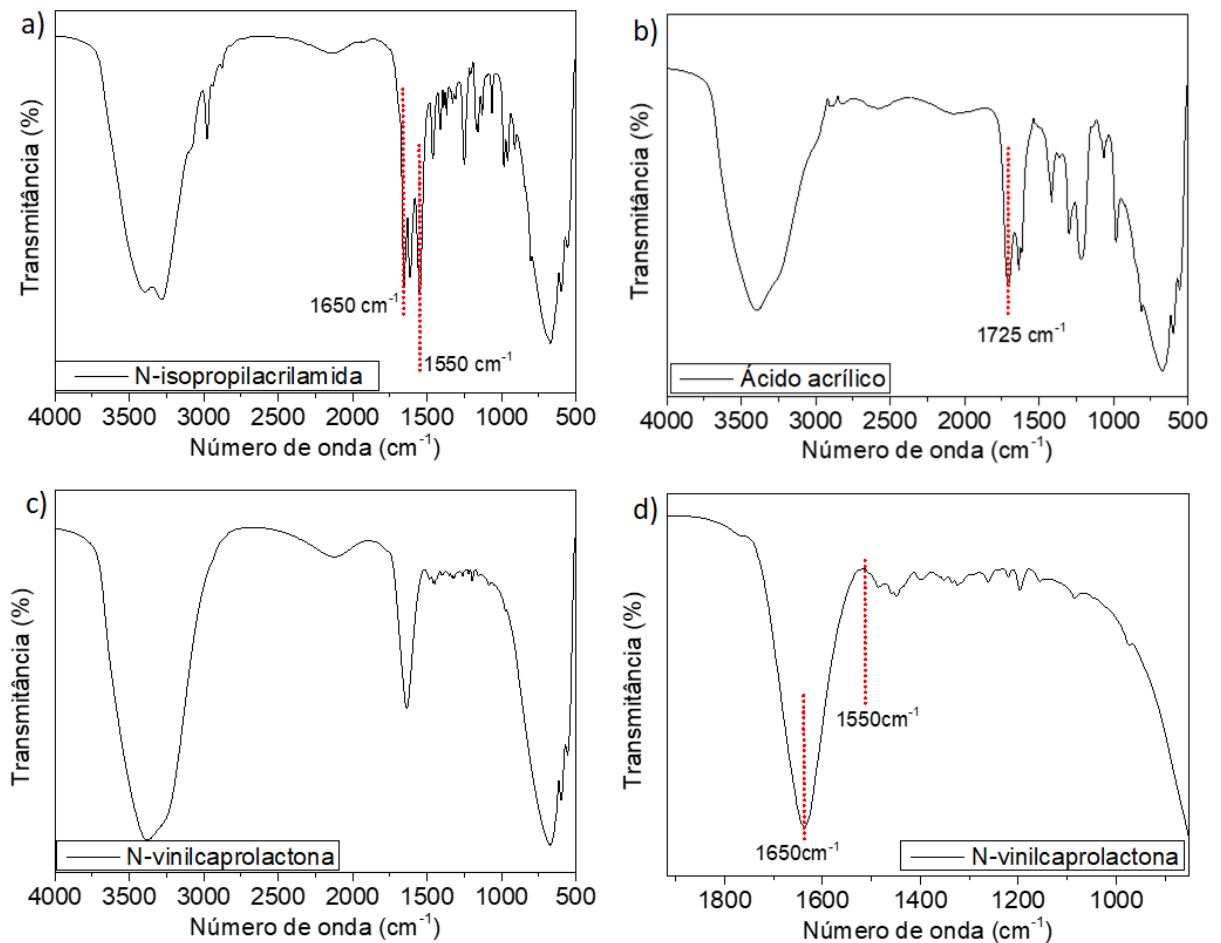


Figura 20 – Espectros vibracionais na região do infravermelho dos precursores da síntese: a) N-isopropilacrilamida, b) Ácido acrílico c) N-vinilcaprolactona e d) Espectro ampliado do monômero N-vinilcaprolactona para identificação das bandas. (DENG et al., 2014; MARQUES et al., 2016)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre as principais vibrações encontradas na **Figura 20 a)** temos o estiramento C=O de amida (1650 cm^{-1}) e a vibração C-N de amidas (1550 cm^{-1}) característicos da N-isopropilacrilamida. Na **Figura 20 b)** temos o estiramento C=O (1750 cm^{-1}) característico de ácidos carboxílicos para o ácido acrílico. Na **Figura 20 c)** temos o espectro da N-vinilcaprolactona, porém foi feita sua ampliação na **Figura 20 d)** para melhor identificação das bandas podendo observar claramente o estiramento C=O de amida (1650 cm^{-1}), mas não foi possível identificar a banda em 1550 cm^{-1} . As bandas presentes entre 1500 cm^{-1} e 800 cm^{-1} serão analisadas posteriormente, pois são bandas respectivas as vibrações de grupos carbônicos e não oferecem informações sobre os grupos funcionais dos monômeros.

As bandas clássicas para detectar ácido acrílico (1725 cm^{-1}), N-isopropilacrilamida (1650 cm^{-1} e 1550 cm^{-1}) e N-vinilcaprolactona (1650 cm^{-1}) são

descritas em trabalhos que usam esses monômeros para síntese de copolímeros e podem ser utilizadas para identificação da presença dos polímeros na superfície de nanopartículas. (DENG et al., 2014; MARQUES et al., 2016; MAMANI; GAMARRA; BRITO, 2014; PETCHAROEN; SIRIVAT, 2012).

A **Figura 21** ilustra os espectros vibracionais na região do infravermelho para a magnetita revestida com polímeros.

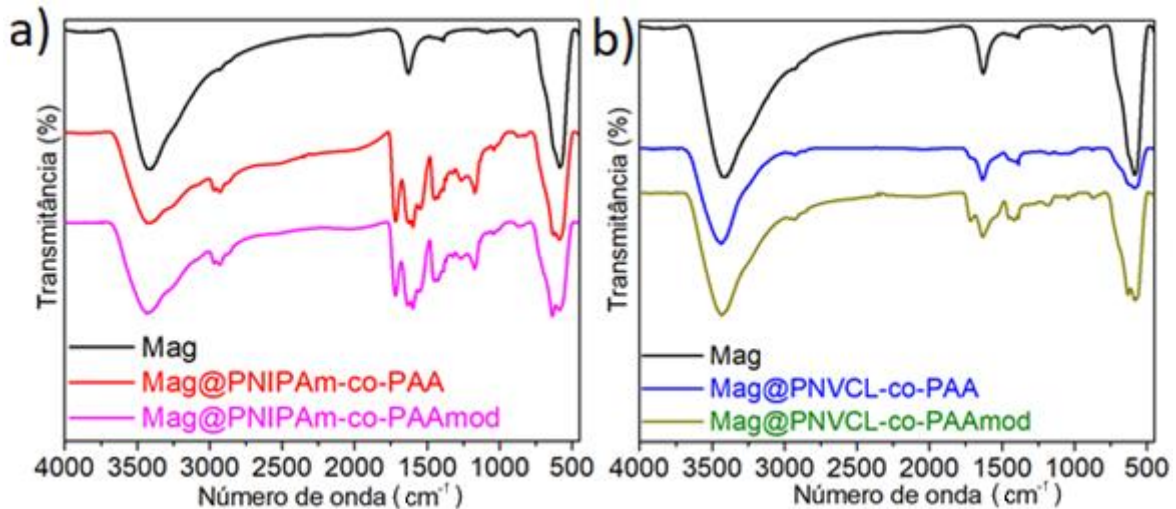


Figura 21 – Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras de magnetita antes e depois da funcionalização com os copolímeros a) PNIPAAm-co-PAA e b) PNVCL-co-PAA.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nos espectros antes (curva preta) e após (curvas vermelha/verde/azul/rosa) a funcionalização da **Figura 21**, tem-se as bandas comuns em 3500 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} correspondentes ao estiramento O-H na superfície do óxido de ferro, 2930 cm^{-1} correspondente ao estiramento assimétrico de grupos CH_2 , 1110 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} vibrações de grupos carbônicos ligados à superfície e 630 cm^{-1} e 580 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento da ligação Fe-O da magnetita (MAMANI; GAMARRA; BRITO, 2014; PETCHAROEN; SIRIVAT, 2012).

Para os espectros das amostras funcionalizadas com polímeros da **Figura 21** pode-se observar a presença de um conjunto de bandas entre 1800 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} . As bandas observadas comprovam a presença do polímero na superfície da magnetita. Entre as bandas encontram-se estiramentos do grupos C=O de ácido carboxílicos em 1725 cm^{-1} , correspondendo à presença de poli(ácido acrílico), e estiramentos C=O de amida em 1650 cm^{-1} e 1550 cm^{-1} , correspondendo à presença dos grupos amida de poli(N-isopropilacrilamida) e poli(N-vinilcaprolactama). Também

é possível observar bandas próximas a 1455 cm^{-1} correspondentes ao estiramento C-N de amins primarias (DENG et al., 2014; MARQUES et al., 2016).

Semelhante aos trabalhos publicados por Deng et al. (2014), Marques et al. (2016) e Jiang et al. (2016), as mesmas bandas nos espectros relacionados ao copolímero PNIPAM-co-PAA foram identificadas. Devido à similaridade do espectro aos espectros apresentados em outros trabalhos que estudam o copolímero PNIPAm-co-PAA, pode-se afirmar que a copolimerização foi adequada para inserção do polímero na superfície do óxido de ferro. Os resultados de absorção de infravermelho das amostras permitem concluir a existência de polímero na superfície, atestando o sucesso da síntese escolhida para funcionalização da magnetita com o copolímero PNIPAAm-co-PAA ou PVCL-co-PAA.

Outra análise utilizada para comprovar a funcionalização dos polímeros na superfície e medir a proporção entre polímero e magnetita dos materiais foram as medidas de termogravimetria. A **Figura 22** mostra os termogramas das amostras funcionalizadas com os quatro diferentes copolímeros na superfície da magnetita.

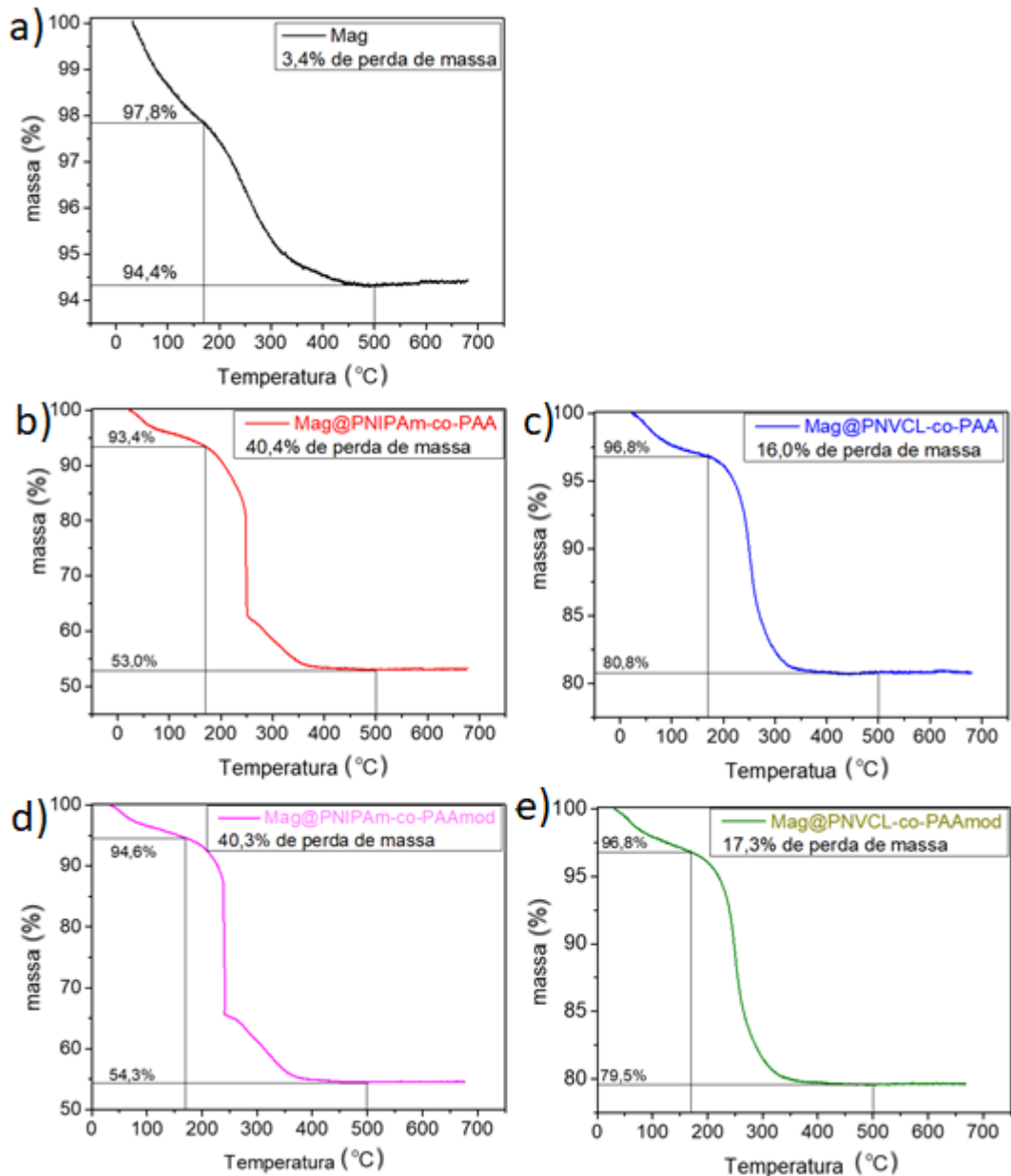


Figura 22 – Curvas termogravimétricas dos materiais antes e após funcionalização e esterificação a) magnetita, b) magnetita revestida com copolímero PNIPAm-co-PAA, c) magnetita revestida com copolímero PNVCL-co-PAA, d) magnetita revestida com copolímero PNIPAm-co-PAA após esterificação e e) magnetita revestida com copolímero PNVCL-co-PAA após esterificação

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação à perda de massa pelas nanopartículas magnéticas sem revestimentos, existem trabalhos que relatam que a perda de massa inicial até aproximadamente 120 °C está associada, primeiramente, à presença de água na superfície das partículas. Posteriormente, em temperaturas mais altas, existe a completa eliminação de produtos orgânicos na superfície, o que, conseqüentemente, está relacionado à quantidade de polímeros presentes na superfície; portanto,

escolheu-se para análise o intervalo entre 170 °C e 500 °C (CHADHA; BHANDARI, 2014; VIALI et al., 2013).

Pelas curvas da **Figura 22** pode-se perceber que para todos os materiais funcionalizados existe uma perda de massa significativa em relação ao aumento da temperatura. A partir de 170 °C começam a ocorrer os processos de decomposição dos copolímeros na superfície. A diferença de massa resultante dessa decomposição foi utilizada para o cálculo da proporção magnetita/copolímero em cada um dos materiais. Como pode ser observado pelos termogramas da **Figura 22**, para PNIPAM-co-PAA, 40% do material é composto por polímeros, enquanto que para PNVCL-co-PAA, a composição fica próxima de 16%. Esses resultados sugerem que a funcionalização com PNIPAM-co-PAA é bem mais eficiente se comparada a PNVCL-co-PAA. Outra informação importante é que após a esterificação com PNIPAM-co-PAA não ocorreu mudança significativa na perda de massa; mas com PNVCL-co-PAA, após a esterificação, observa-se um pequeno aumento na perda de massa. Uma hipótese possível para explicar a baixa variação de massa após a esterificação do copolímero seria a perda de polímero da superfície em função do processo de síntese que envolve aplicação de 130 °C durante 24 horas com solvente orgânico compatível com os polímeros presentes na superfície.

O tamanho das nanopartículas foi determinado por microscopia eletrônica de transmissão. A intenção de tal análise foi caracterizar as nanopartículas funcionalizadas verificando a distribuição de tamanhos pela contagem de partículas e aplicando os dados a uma curva Gaussiana para obtenção do tamanho médio de partículas. Essa informação torna-se necessária, uma vez que existe a busca por materiais superparamagnéticos e esses estão no intervalo de 7 até 15 nanômetros. As **Figuras 23, 24, 25, 26 e 27** contêm as micrografias das amostras e o histograma da distribuição de tamanho.

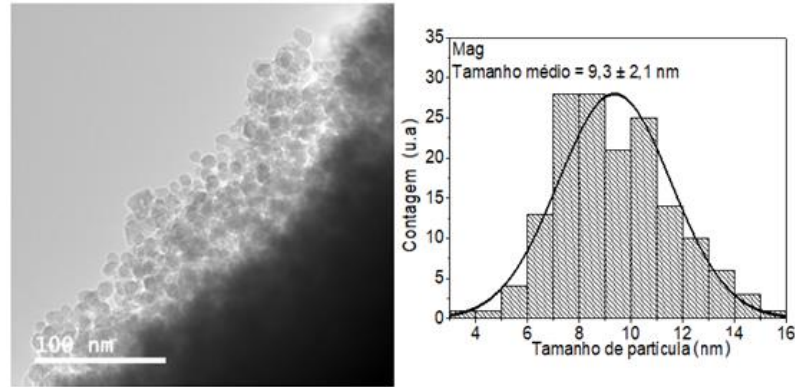


Figura 6 – Micrografia das nanopartículas de magnetita e histograma da distribuição de tamanho
Fonte: Elaborado pelo autor.

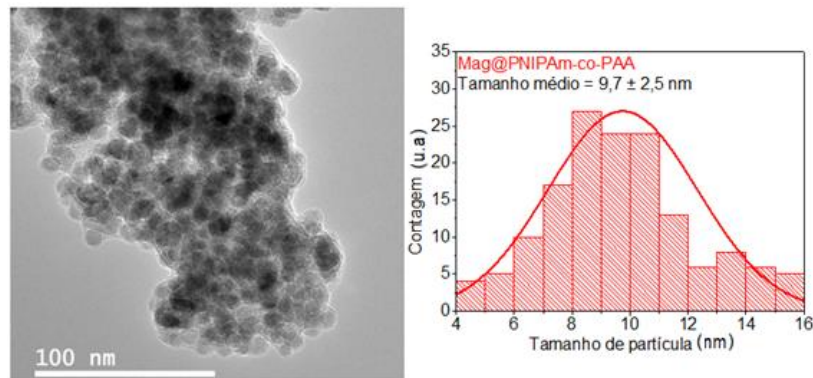


Figura 24 – Micrografia e histograma da distribuição de tamanho das nanopartículas de magnetita revestidas com copolímero PNIPAm-co-PAA
Fonte: Elaborado pelo autor.

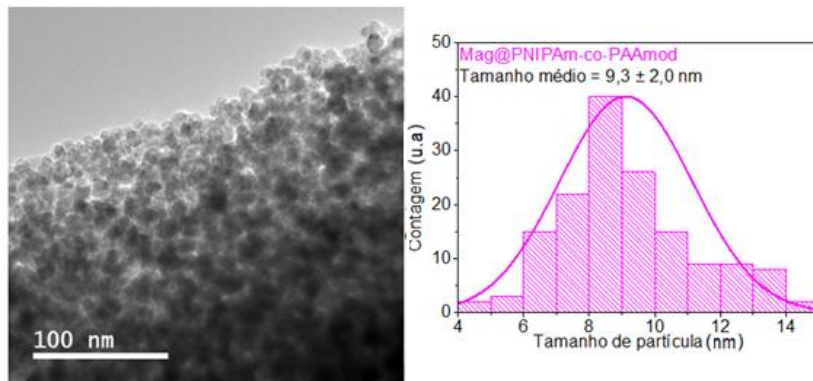


Figura 7 – Micrografia transmissão e histograma da distribuição de tamanho das nanopartículas de magnetita revestidas com copolímero PNIPAm-co-PAAmod
Fonte: Elaborado pelo autor.

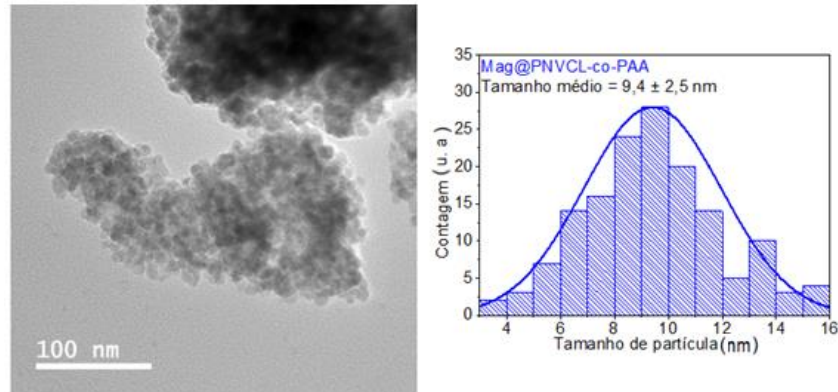


Figura 8 – Micrografia e histograma da distribuição de tamanho das nanopartículas de magnetita revestidas com copolímero PNVCL-co-PAA

Fonte: Elaborado pelo autor.

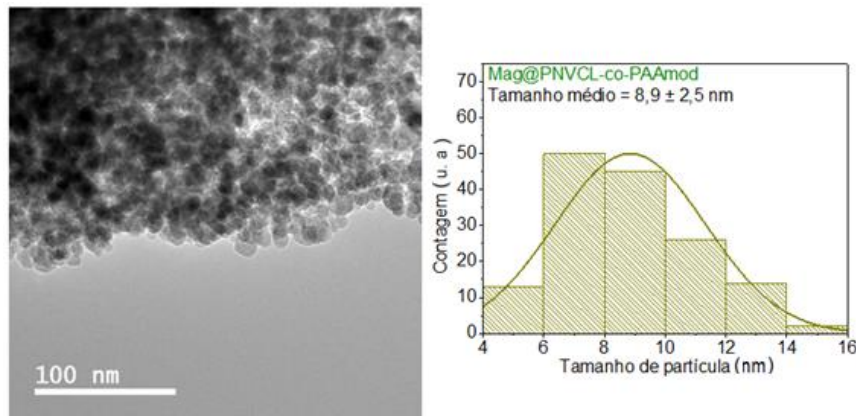


Figura 9– Micrografia e histograma da distribuição de tamanho das nanopartículas de magnetita revestidas com copolímero PNVCL-co-PAAmod

Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme verificado nas **Figuras 23, 24, 25, 26 e 27** pode-se observar que o tamanho médio de todas as amostras é muito próximo, considerando os desvios encontrados. Era esperado que todas as partículas apresentassem distribuição de tamanhos similares, pois todas partem das mesmas nanopartículas magnéticas ilustradas na **Figura 23**. Foi possível verificar que nenhuma modificação posterior, polimerização ou esterificação, alterou o tamanho médio das partículas de óxido de ferro. Os polímeros por serem compostos por carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio não possuem densidade de carga suficiente para produzir contraste nas micrografias. Com tamanho médio próximo a 9 nm pode-se enquadrar as nanopartículas magnéticas como superparamagnéticas, de acordo com esperado para a aplicação biomédica pretendida (HERVAULT; THANH, 2014; KALLUMADIL et al., 2009).

A segunda propriedade de interesse em relação às nanopartículas magnéticas é a capacidade de geração de calor com aplicação de campo magnético alternado. As suspensões de nanopartículas foram mantidas em banho ultrassônico por 15 minutos e, então, esperou-se o equilíbrio térmico em 25 °C para a aplicação do campo magnético alternado. Todas as amostras foram medidas em suspensão de magnetita: aproximadamente 15 mg de magnetita em 1 ml de água deionizada. A **Figura 28** ilustra o gráfico da medida de hipertermia magnética das amostras com ênfase nos tempos necessários para que aqueçam da temperatura ambiente até 40 °C.

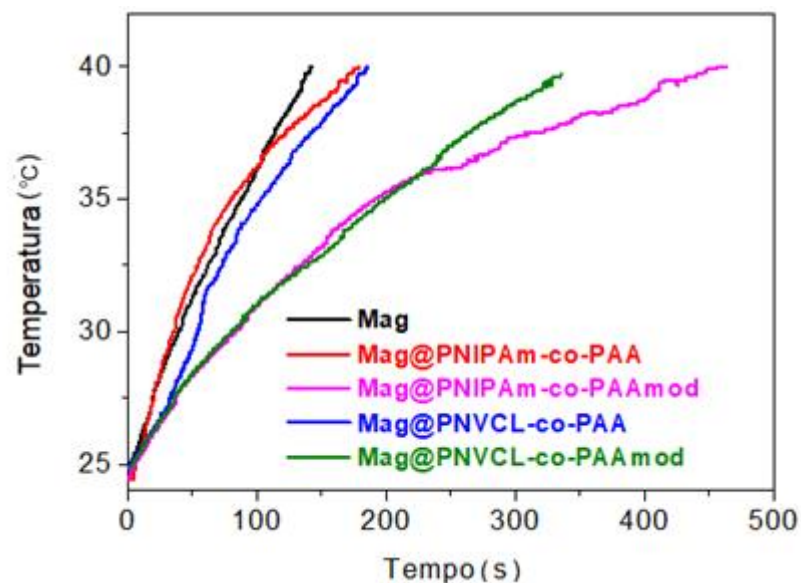


Figura 28 – Hipertermia magnética das amostras de magnetita revestidas. A curva preta representa a magnetita pura, sem revestimento; a curva vermelha representa a magnetita revestida com PNIPAm-co-PAA; a curva rosa representa a magnetita revestida com PNIPAm-co-PAA após esterificação; a curva azul representa a magnetita revestida com PNVCL-co-PAA e a curva verde representa a magnetita revestida com PNVCL-co-PAA após esterificação. Experimento realizado com campo magnético alternado ($H = 14 \text{ kAm}^{-1}$) numa frequência fixa ($f = 420 \text{ kHz}$)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Utilizando a **Figura 28** foi possível construir a **Tabela 3**, que seria uma relação da quantidade de tempo necessária para aquecer as amostras até temperatura de 40 °C. A temperatura de 40 °C foi escolhida como padrão por se tratar de amostras com baixa concentração de magnetita, aproximadamente 15 mg de magnetita em 1 ml de água ultrapura. Outro ponto considerado para a escolha da temperatura seria o fato de os materiais estudados pertencerem ao tipo de tratamento de termoquimioterapia, que envolve aquecimento máximo de 43 °C e utiliza uma droga em conjunto com a geração de calor.

Tabela 3 – Tempo necessário para variação da temperatura de 25 °C para 40 °C de cada amostra de magnetita

Amostras	Δt (s)
Mag	143
Mag@PNIPAm-co-PAA	178
Mag@PNIPAm-co-PAAmod	462
Mag@PNVCL-co-PAA	186
Mag@PNVCL-co-PAAmod	337

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados da **Tabela 3** corroboram a premissa de que o método de síntese de nanopartículas com hidróxido de amônio está de acordo com a produção de nanopartículas magnéticas capazes de gerar calor. As amostras com revestimento de polímero PNIPAm-co-PAA e PNVCL-co-PAA apresentaram um tempo maior para aquecimento até 40°C em relação a magnetita sem revestimento. Existem duas hipóteses mais prováveis, sendo a primeira uma influência do revestimento polimérico que provoca efeitos na relaxação de Brown, uma vez que a estrutura do polímero deve dificultar a livre movimentação da partícula em solução aquosa. A segunda considera que a camada de polímero funciona como uma barreira que impede a livre dissipação do calor, ou seja, o calor produzido pela nanopartícula possui dificuldade de se propagar para o solvente (água) devido ao revestimento polimérico que se utiliza do calor para mudanças estruturais. Embora ocorra uma diminuição na capacidade de gerar calor, uma vez que o tempo necessário para que se atinja 40 °C é maior, deve-se considerar que as amostras estão revestidas e, portanto, a massa de magnetita diminui, ou seja, existe uma diluição da massa de magnetita. O revestimento polimérico aumenta a massa de amostra de magnetita e utilizar 15mg de amostra revestida apresenta a soma de massa de polímero e óxido de ferro, como pode ser observado pelas análises termogravimétricas da Figura 21. A diminuição da massa de magnetita em função do revestimento foi levada em consideração para o cálculo da taxa de absorção específica.

Um outro modo de analisar a produção de calor de forma quantitativa é utilizando a taxa de absorção específica (SAR). O modelo de análise consiste no ajuste na variação de calor inicial das curvas de hipertermia magnética através da **equação de Box-Lucas (12)**:

$$T(t) = A(1 - e^{-Bt}) \quad (12)$$

Onde T é a temperatura, t o tempo, A é a saturação da temperatura e B é o parâmetro relacionado à curvatura de aquecimento. Porém, as análises da Figura 21 iniciam-se numa temperatura acima de 0 °C, ou seja, o ajuste da curva Box-Lucas não é possível, uma vez que o valor de tempo igual a zero não representa o valor de temperatura igual a zero. Portanto, utiliza-se um método alternativo no qual inclui-se uma constante t_c na variável tempo para que seja possível a temperatura inicial ser 25 °C. A nova função é representada pela **equação 13**.

$$T(t) = A(1 - e^{-B(t-t_c)}) \quad (13)$$

Onde T é a temperatura, t o tempo, A é a saturação da temperatura, B é o parâmetro relacionado à curvatura de aquecimento e t_c é uma constante que permite o ajuste da variável tempo para que seja possível a equação iniciar em 25 °C e não em 0 °C. Essa **equação 13** foi utilizada para o ajuste de uma curva Box-Lucas nas análises de hipertermia realizadas. As **Figura 29, 30, 31, 32 e 33** mostram os ajustes da equação Box-Lucas nas amostras. O ajuste da curva é representado pela linha vermelha e a marcação em rosa representa o intervalo da derivada para obtenção das constantes A e B.

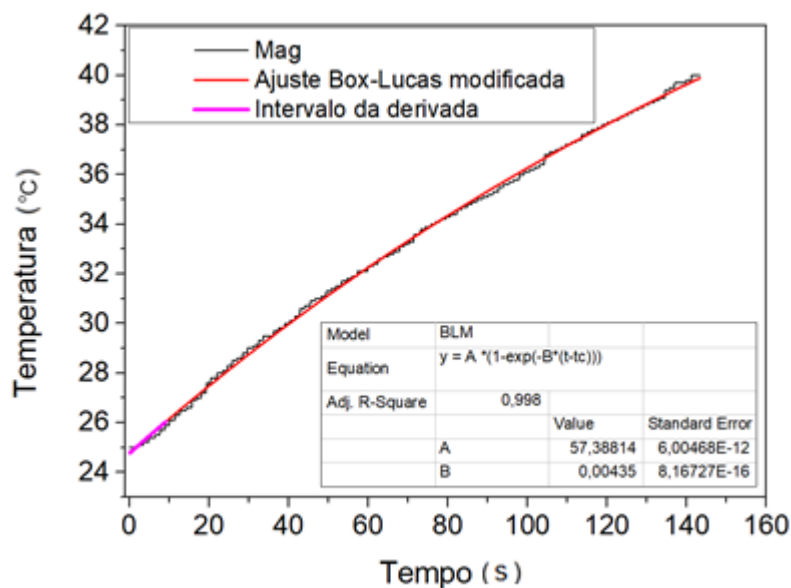


Figura 29 – Ajuste da equação Box-Lucas modificada para o cálculo das constantes A e B no material magnetita pura

Fonte: Elaborado pelo autor.

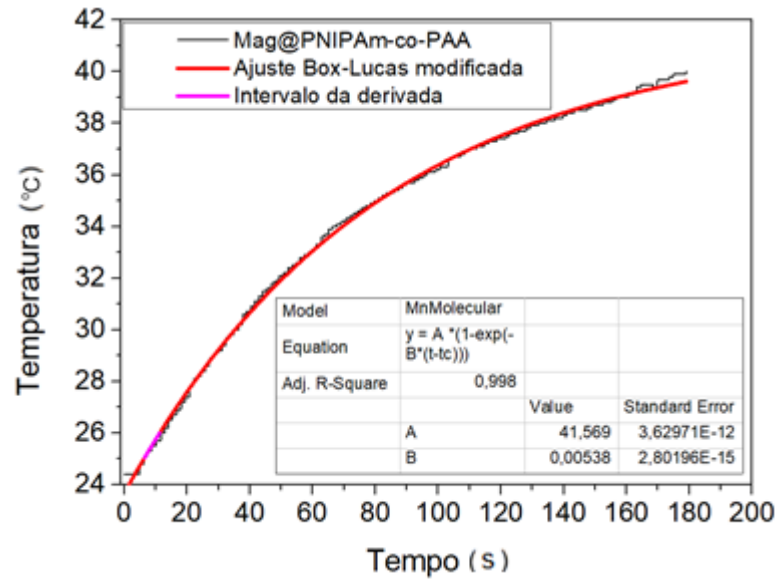


Figura 30 – Ajuste da equação Box-Lucas modificada para o cálculo das constantes A e B no material magnetita revestida com copolímero PNIPAm-co-PAA
Fonte: Elaborado pelo autor.

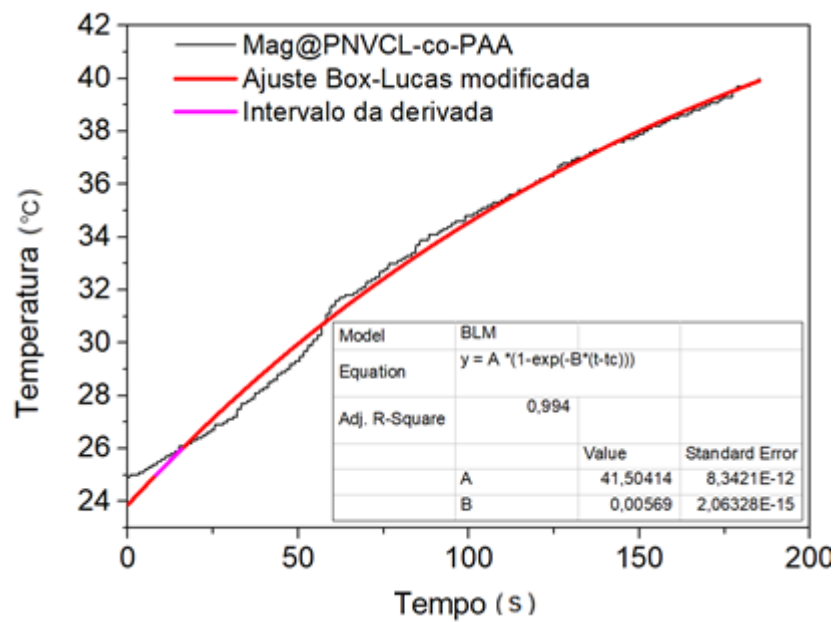


Figura 31 – Ajuste da equação Box-Lucas modificada para o cálculo das constantes A e B no material magnetita revestida com copolímero PNVCL-co-PAA
Fonte: Elaborado pelo autor.

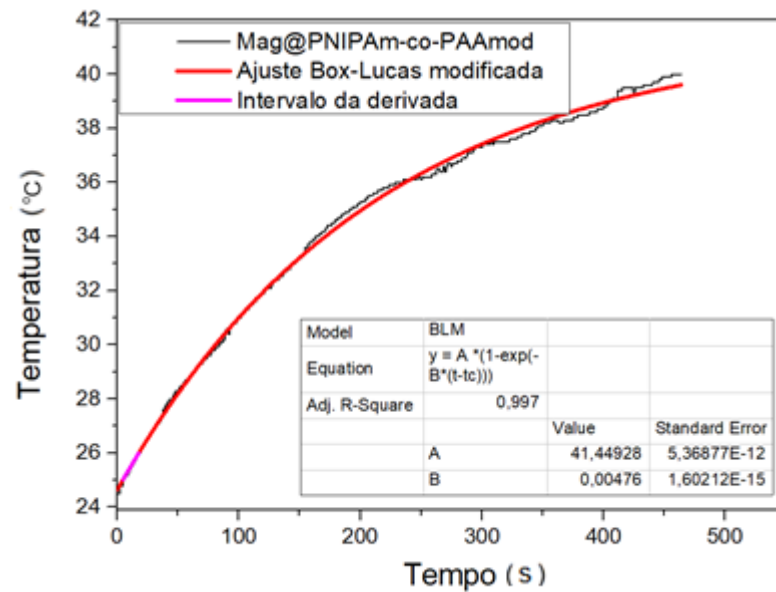


Figura 10 – Ajuste da equação Box-Lucas modificada para o cálculo das constantes A e B no material magnetita revestida com copolímero PNIPAm-co-PAA após esterificação
Fonte: Elaborado pelo autor.

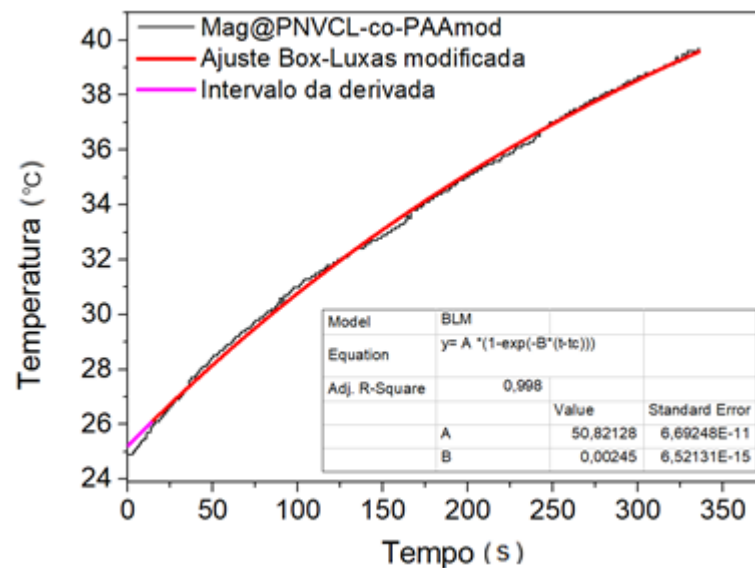


Figura 33 – Ajuste da equação Box-Lucas modificada para o cálculo das constantes A e B no material magnetita revestida com copolímero PNVCL-co-PAA após esterificação
Fonte: Elaborado pelo autor.

O produto $A \times B$ no tempo $t = 0$, ou próximo dos valores iniciais de tempo, é conhecido como a taxa de calor inicial e é numericamente equivalente à relação $\Delta T / \Delta t$ na equação da SAR. Basicamente, para obtenção desse valor ($\Delta T / \Delta t$) através da equação Box-Lucas modificada basta derivar a **equação 13** nos valores iniciais para obtenção dos parâmetros A e B.

Uma vez conhecidos os valores de A e B, estima-se que a capacidade calorífica C do sistema é muito próxima à capacidade calorífica da água ($C_{\text{água}} = 4.18 \text{ Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$) e, utilizando essa consideração, é possível calcular o valor de SAR para cada uma das amostras utilizando a **equação 8**. A **Tabela 4** expressa os valores de SAR dos materiais e a tendência é semelhante à **Tabela 3**, na qual os materiais que apresentam maior tempo para atingir 40 °C são os que apresentam menores valores de SAR.

Tabela 4 – Taxa de absorção específica (SAR) dos materiais sintetizados, calculadas a partir do ajuste das curvas temperatura x tempo com campo magnético $H = 14 \text{ kAm}^{-1}$ e frequência $f = 420 \text{ kHz}$

Material	SAR / Wg^{-1}
Mag	68,6
Mag@PNIPAm-co-PAA	62,3
Mag@PNVCL-co-PAA	65,9
Mag@PNIPAm-co-PAAmod	54,9
Mag@PNVCL-co-PAAmod	34,6

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados da **Tabela 4** sugerem que a presença de outro material na superfície das nanopartículas magnéticas atua como uma barreira que limita a difusão do calor gerado pelas nanopartículas. Segundo Liu et al. (2012), quanto maior a espessura da barreira de polímero na superfície de nanopartículas magnéticas, maior a diminuição no valor SAR (LIU; FRAYLICH; SAUNDERS, 2009; LIU et al., 2012). Pelos dados da **Tabela 4**, pode-se perceber que a diminuição dos valores de SAR para Mag@NIPAm-co-PAA e Mag@PNVCL-co-PAA são ligeiramente menores que magnetita sem revestimento, mas não existem mudanças drásticas dos valores, ou seja, um indício de que a camada de polímero é pequena. Essa análise está de acordo com as medidas de termogravimetria, pois a maior massa em ambos os casos, Mag@PNVCL-co-PAA e Mag@PNIPAm-co-PAA, é para magnetita e não para os polímeros.

Os materiais esterificados, PINIPAm-co-PAAmod e PNVCL-co-PAAmod, foram submetidos a um processo de síntese de 24 horas à temperatura de 130 °C. Essa síntese provavelmente causou a oxidação da magnetita para a forma maghemita, que possui uma menor capacidade de gerar calor se comparada à magnetita (BABIČ et al., 2017; SALAS; VEINTEMILLAS-VERDAGUER; MORALES, 2013). Embora ocorra uma diminuição na capacidade de geração de calor devido ao processo de modificação de superfície, ainda é possível detectar que as nanopartículas têm a

capacidade de gerar calor aplicando-se um campo magnético alternado e isso está de acordo com a proposta do trabalho.

A capacidade de resposta com a variação de temperatura para as nanopartículas magnéticas funcionalizadas foi analisada por medidas de espalhamento de luz dinâmico em função da temperatura (TREND de temperatura).

O diâmetro hidrodinâmico foi medido em função da temperatura para que fosse possível identificar a LCST do revestimento de polímeros e avaliar quais as mudanças na mesma em relação aos polímeros esterificados. A **Figura 34** mostra a variação do diâmetro hidrodinâmico das partículas em função da temperatura.

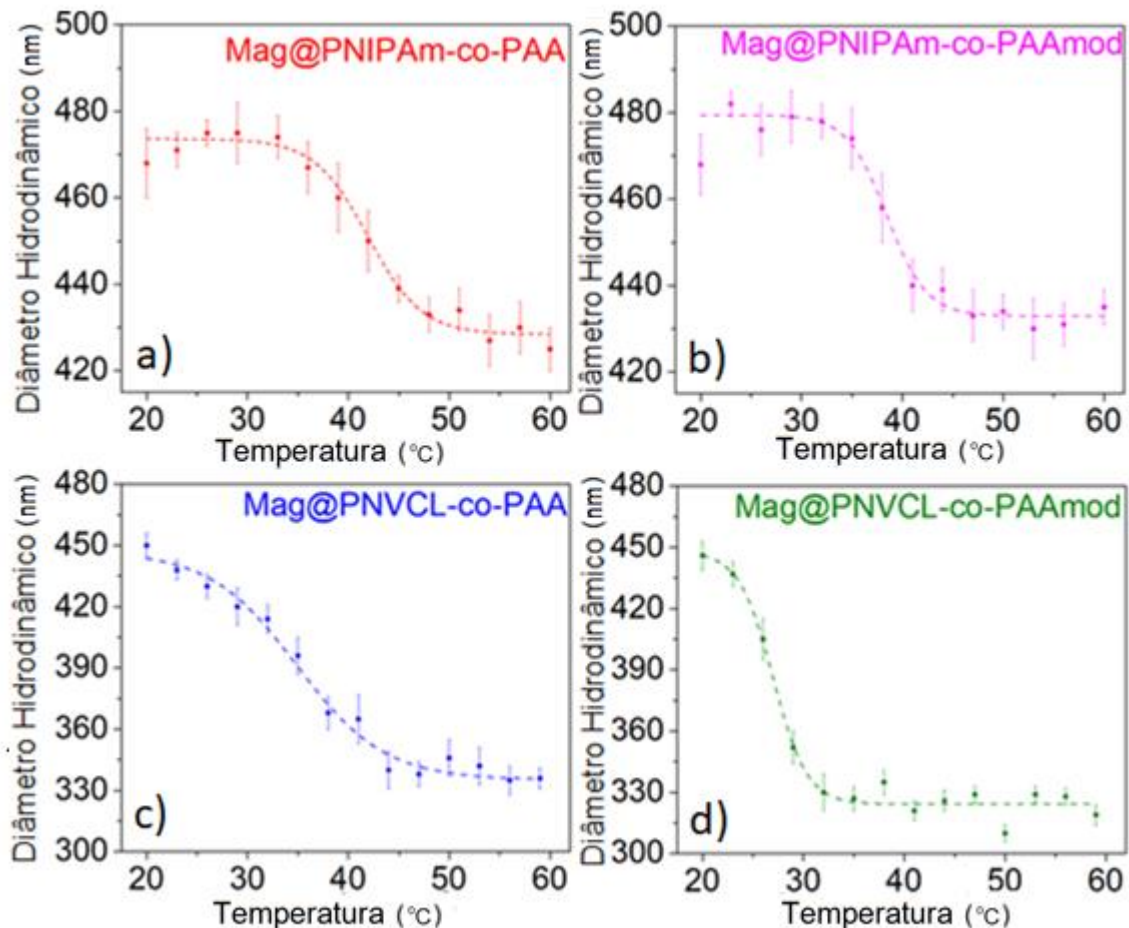


Figura 34 – Tendência do diâmetro hidrodinâmico dos materiais: a) magnetita revestida com copolímero PNIPAm-co-PAA; b) magnetita revestida com copolímero PNIPAm-co-PAA após esterificação; c) magnetita revestida com copolímero PNVCL-co-PAA; e d) magnetita revestida com copolímero PNVCL-co-PAA após esterificação. Solvente: água ultrapura, pH = 7,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

As temperaturas médias das amostras foram calculadas pelo ponto de inflexão da linha de tendência ajustada. Observa-se que a amostra de magnetita revestida com

PNIPAAm-co-PAA (**Figura 34a**) apresenta uma transição em seu diâmetro hidrodinâmico que se inicia em 35 °C e termina 50 °C. O valor da média desse intervalo, 42,5 °C, representa a temperatura crítica mínima de solução e está de acordo com a proposta desse trabalho. A modificação por esterificação com 1-pentanol desse copolímero diminuiu a temperatura de transição para 38,7 °C. Esse resultado era esperado, pois grupos hidrofóbicos (pentano) foram adicionados à cadeia do polímero, diminuindo o caráter hidrofílico, diminuindo interações com o solvente (água). Embora LCST do copolímero tenha diminuído, ela ainda se encontra superior à temperatura do corpo humano e continua válida para aplicações futuras.

O copolímero PNVCL-co-PAA apresentou uma temperatura de transição próxima de 35 °C. O copolímero composto de PNVCL em sua estrutura apresenta LCST mais baixa que copolímeros compostos de PNIPAm, uma vez que PNVCL contém um grupo de caráter mais hidrofóbico. Pela propriedade hidrofóbica da N-vinilcaprolactama é possível entender que inserir outro grupo hidrofóbico na cadeia de polímero é suficiente para a desestabilização do mesmo no solvente aquoso, tornando-o mais insolúvel em água e, conseqüentemente, diminuindo a LCST. Após a esterificação do copolímero PNVCL-co-PAA, o copolímero PNVCL-co-PAAmod apresentou uma temperatura de transição abaixo de 30 °C.

Para avaliar a carga da superfície das magnetitas funcionalizadas foram realizados os experimentos de potencial zeta. A **Figura 35** ilustra os gráficos contendo a análise de todos os materiais.

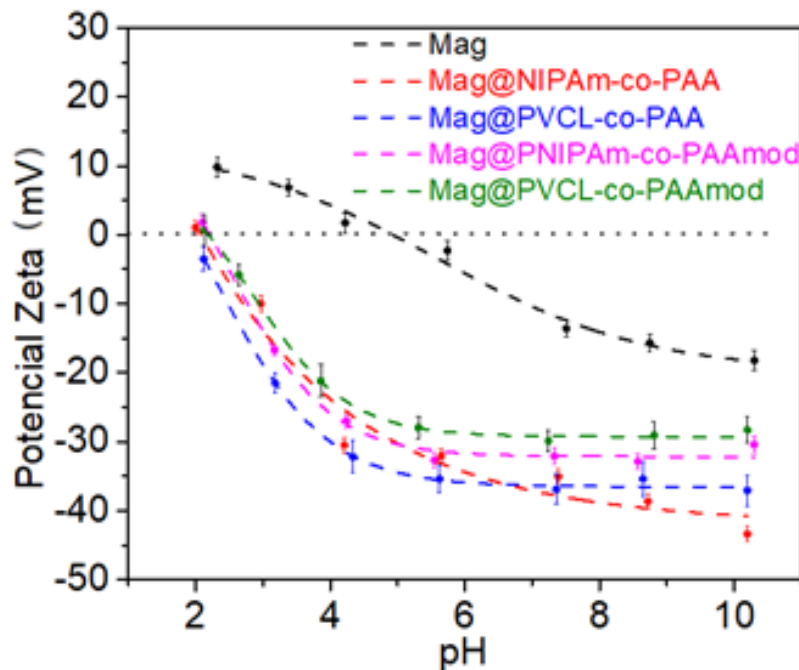


Figura 35 – Curvas de potencial zeta das amostras. Titulantes HCl 0,01 mol L⁻¹ e NaOH 0,01 mol L⁻¹. A curva preta representa a magnetita sem revestimento. A curva vermelha representa a magnetita revestida com o polímero PNIPAm-co-PAA. A curva azul representa a magnetita revestida com o polímero PNVCL-co-PAA. A Curva rosa representa a magnetita revestida com PNIPAm-co-PAA após esterificação. A curva verde representa a magnetita revestida com PNVCL-co-PAA após esterificação. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Pela **Figura 35**, nota-se que a nanopartícula de magnetita apresentou um ponto isoelétrico próximo a pH 5. Esse valor está de acordo com valores já citados em trabalhos publicados sobre esse tipo de material (VIALI et al. 2013; NUNES et al. 2014). A **Figura 36** representa um esquema do comportamento da carga da superfície da magnetita em diferentes pH.

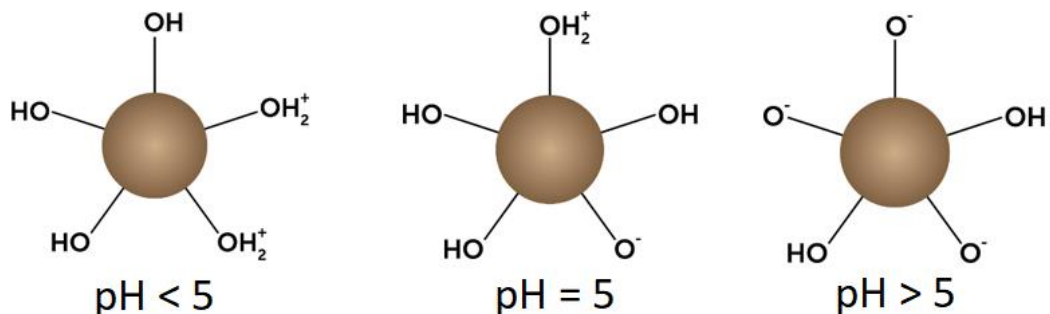


Figura 36 – Esquema da disposição de cargas na superfície de magnetita em diferentes pH, baseado nas análises de potencial zeta do trabalho **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Para as amostras funcionalizadas com copolímeros modificados percebe-se uma queda nos valores do ponto isoelétrico para valores menores que o da magnetita

sem revestimento. Essa queda ocorre exclusivamente devido à presença dos grupos carboxílicos do ácido acrílico contido na estrutura dos polímeros na superfície da magnetita. As **Figuras 37** e **38** representam o esquema das cargas dos materiais revestidos com PNIPAM-co-PAA e PNVCL-co-PAA, respectivamente.

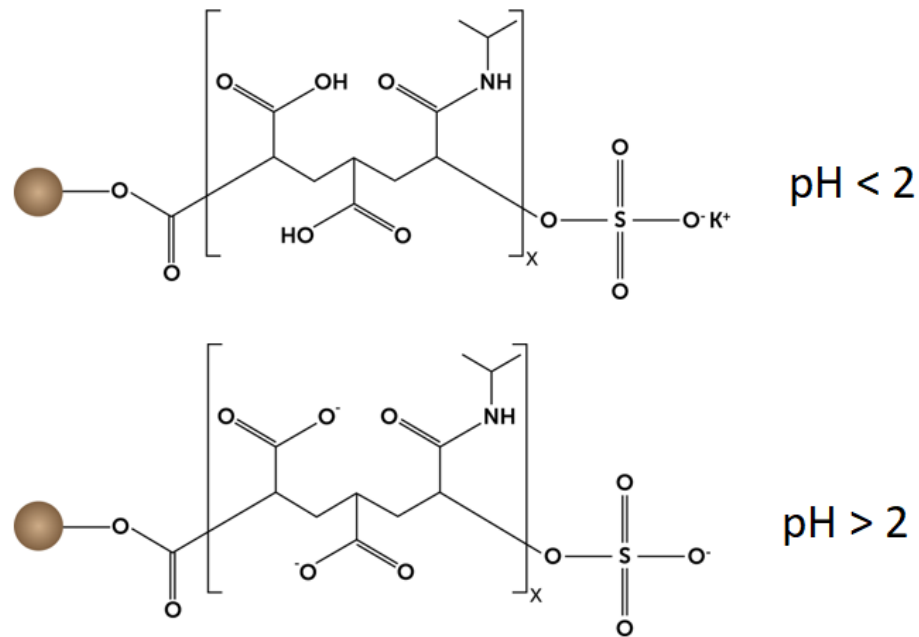


Figura 37 – Esquema da disposição de cargas na superfície de magnetita revestida com PNIPAM-co-PAA em diferentes pH, baseado nas análises de potencial zeta do trabalho
Fonte: Elaborado pelo autor.

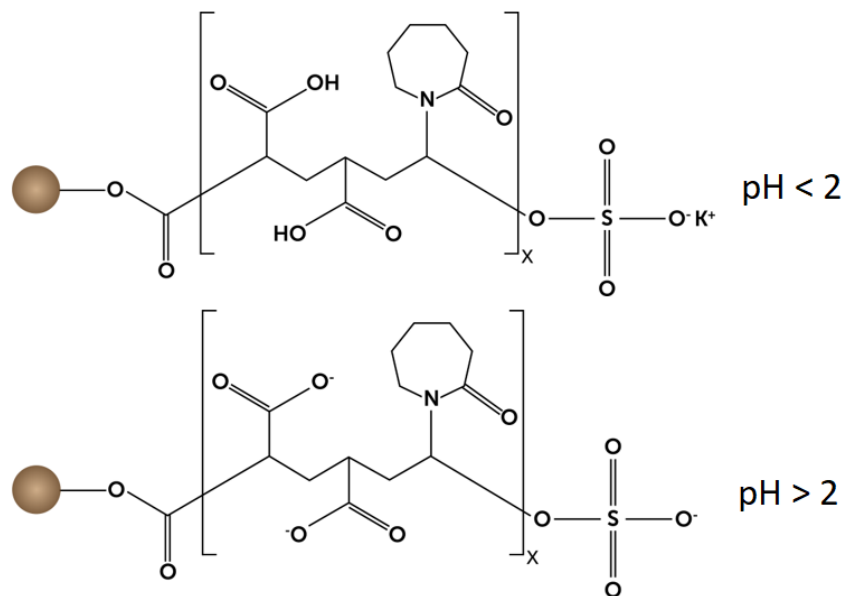


Figura 38 – Esquema da disposição de cargas na superfície de magnetita revestida com PNVCL-co-PAA em diferentes pH, baseado nas análises de potencial zeta do trabalho
Fonte: Elaborado pelo autor.

O ácido carboxílico desprotonado confere uma carga negativa para a estrutura do polímero e, conseqüentemente, para a superfície das nanopartículas modificadas (SCHMIDT; HELLWEG; VON KLITZING, 2008; WU et al., 2006). As amostras contendo copolímeros esterificados apresentaram pontos isoelétricos próximos a pH 2, ou seja, a modificação por esterificação não originou efeitos que modifiquem os valores de pH.

Observando-se o potencial zeta das amostras da **Figura 35**, é possível visualizar que em pH 10, que é considerado o maior valor de pH analisado e no qual proporciona-se a maior desprotonação das cadeias de polímeros que contém ácido acrílico, existe uma diferenciação na carga da superfície. O material PNIPAM-co-PAA apresenta uma carga de -40 mV e o material PNVCL-co-PAA apresenta uma carga de -36 mV. Após a esterificação, ambos os materiais tiveram suas cargas de superfície diminuída em relação ao material original, PNIPAm-co-PAAmod -31 mV e PNVCL-co-PAAmod -29 mV. Essa diminuição na carga da superfície do material está associada à substituição dos grupos ácido carboxílico do ácido acrílico pelo grupo pentano (após a esterificação com 1-pentanol). Essa diminuição serve como indício de que a esterificação na superfície ocorreu. Um fato interessante a ser ressaltado é que o revestimento PNIPAm-co-PAA e PNVCL-co-PAA após pH 7 apresentam carga próxima a -40 mV, evidenciando possível estabilidade eletrostática no sistema de nanopartículas revestidas, ou seja, facilitando ainda mais uma possível aplicação biológica em pH próximos desse valor (CHEN et al., 2011).

Para avaliar a capacidade de liberação dos fármacos, as nanopartículas modificadas foram submetidas a um procedimento de incorporação, que envolvia separar 10 mg de amostra de magnetita modificada com copolímeros e mantê-las em banho de gelo por 24 horas numa solução de metotrexato $1,5 \text{ mg ml}^{-1}$ (9 mg de MTX em 6 ml de solução de tampão fosfato). Utilizando-se centrifugação para precipitação das nanopartículas e a suspensão em tampão fosfato, 2 mg foram tomados (2 ml dos 10 ml dos quais foram suspensos 10 mg de magnetita). A porcentagem de fármaco incorporado baseada na diferença da concentração de metotrexato na solução original e após 24 horas de incubação está representada na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Grau de incorporação de metotrexato nas magnetitas revestidas para 10 mg de magnetita

Materiais	Massa de MTX incorporada / mg	Eficiência de encapsulação (m incorporada/m total) *100	Coefficiente de incorporação (m incorporada / m magnetita) *100
Mag@PNIPAm-co-PAA	3,72	41,3	37,2
Mag@PNVCL-co-PAA	3,32	36,9	33,2
Mag@PNIPAm-co-PAAmod	2,83	31,5	28,3
Mag@PNVCL-co-PAAmod	2,18	24,3	21,8

Fonte: Elaborado pelo autor.

Pela **Tabela 5**, percebe-se que as amostras apresentam comportamento similares após a esterificação, uma vez que amostras funcionalizadas com PNIPAAm-co-PAAmod e PNVCL-co-PAAmod apresentam uma capacidade menor de incorporar metotrexato que seus respectivos copolímeros originais. Duas hipóteses podem explicar tal comportamento, pois estruturas hidrofóbicas formadas após a esterificação em PNIPAAm-co-PAAmod e PNVCL-co-PAAmod apresentam uma menor quantidade de grupos carboxílicos, o que dificulta a difusão da solução de metotrexato entre as cadeias dos polímeros, ocasionando uma menor quantidade do medicamento retido na estrutura. Ou, após a esterificação, ocorreu uma organização similar à formação de micelas, na qual os grupos hidrofílicos ficam expostos ao meio aquoso, enquanto os grupos hidrofóbicos ficam próximos à superfície do óxido de ferro, impedindo o contato entre os grupos hidrofóbicos e o metotrexato. Essa ideia é contrária ao pensamento original de que cadeias de polímeros mais hidrofóbicas seriam capazes de reter maior quantidade de fármaco na estrutura por compatibilidade de interações intermoleculares, pois os dados que mediram a quantidade de fármaco armazenado diminuem após a esterificação e os dados de potencial zeta indicam que a compatibilidade entre as interações intermoleculares, fármaco/polímero, não são as principais responsáveis pela retenção de moléculas de metotrexato nas cadeias de polímeros PNIPAM-co-PAA e PNVCL-co-PAA em solução aquosa, pois os polímeros mais apolares (após a esterificação com menor valor de potencial zeta em pH 7,4) não foram os que retiveram maior quantidade de metotrexato.

Para o PNVCL-co-PAA e PNVCL-co-PAAmod, que são as estruturas mais hidrofóbicas comparadas a PNIPAm-co-PAA e PNIPAm-co-PAAmod, é possível identificar uma menor capacidade de retenção de metotrexato na estrutura. A

estrutura da N-vinilcaprolactama está, provavelmente, formando barreiras hidrofóbicas (similares à formação de micelas), que dificultam a entrada de solvente e metotrexato. Quando PNVCL-co-PAA é esterificado, a incorporação diminui ainda mais, ou seja, diminuindo a difusão do solvente devido à formação de uma estrutura majoritariamente apolar. Mesmo existindo uma afinidade entre as interações apolares, conforme aumenta-se a hidrofobicidade, a quantidade de metotrexato retida diminui.

A concentração ideal de metotrexato para uma eficiência no combate a células tumorais está entre $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em humanos. Normalmente os tratamentos que envolvem quimioterapia consiste em capsulas ingeridas via oral que contém 15 mg de MTX. Esse trabalho utilizou o valor de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de MTX para verificar a quantidade máxima que seria possível de internalizar nas nanopartículas considerando a dose normalmente ingerida de 15 mg.

A fim de identificar a capacidade de liberação de metotrexato, as amostras foram submetidas a teste de liberação de fármaco em função do tempo. A **Figura 39** representa a porcentagem de liberação de metotrexato em função do tempo para duas temperaturas distintas em solução de tampão fosfato pH 7,4. As temperaturas escolhidas 37 °C e 43 °C representam respectivamente a temperatura corporal sem estímulo que seria considerado o branco da análise para liberação e a temperatura de 43 °C é a temperatura considerando o estímulo magnético que irá produzir calor, considerando a metodologia do tratamento por termoquimioterapia (calor fornecido pelas nanopartículas e medicamento simultaneamente).

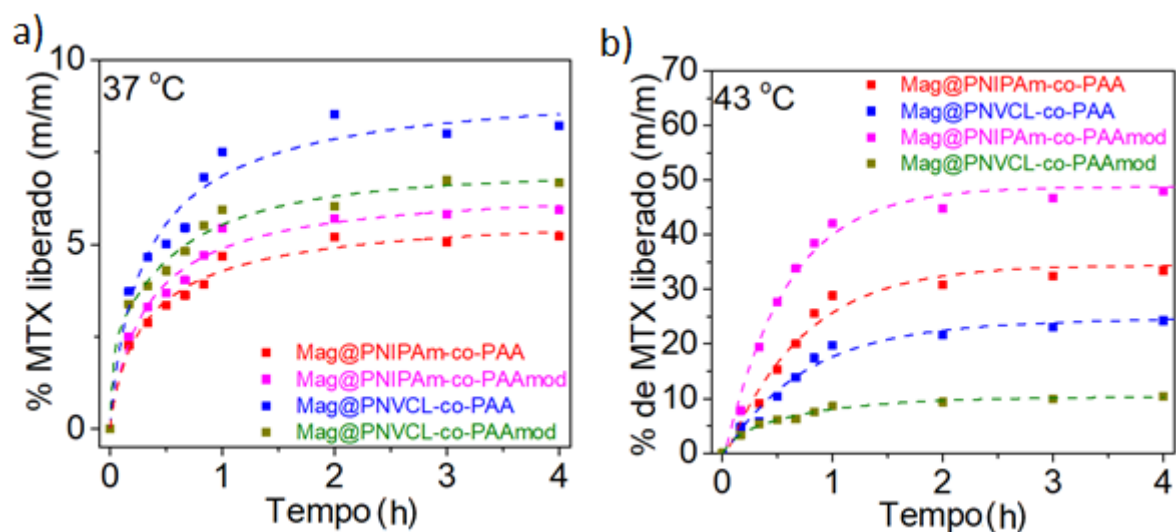


Figura 11 – Liberação de metotrexato (MTX) para as nanopartículas modificadas em função do tempo em a) 37°C e b) 43 °C

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como pode ser observado pela **Figura 39**, as amostras possuem uma capacidade de liberação muito superior em 43 °C se comparado com 37 °C, o que está totalmente de acordo com a proposta do trabalho, que seria promover taxas de liberação maiores em temperaturas superiores à do corpo humano. O efeito de retração da estrutura é o principal responsável pela alta capacidade de liberação em temperaturas maiores que 43 °C, uma vez que a estrutura totalmente colapsada dos polímeros expulsa grande parte do solvente (água) e, simultaneamente, o fármaco (metotrexato). Observa-se que o aumento na liberação de metotrexato para o material Mag@PNVCL-co-PAAmod em relação ao material Mag@PNVCL-co-PAA é de apenas 5%, pois a estrutura já se encontra colapsada em 37 °C. Outro ponto importante a ser detalhado é que os materiais Mag@PNIPAm-co-PAA e Mag@PNIPAm-co-PAAmod apresentaram maior taxa de liberação. E, em ambos os casos, para PNIPAm ou PNVCL, a liberação de metotrexato em 43 °C é superior que em 37 °C após a esterificação, ou seja, entende-se que a estrutura de polímero modifica o mecanismo de liberação. Em relação a dose liberada pelos materiais foi elaborada a **Tabela 6** que mostra os cálculos feitos da concentração cumulativa da quantidade de material liberada após 4 horas.

Tabela 6: Comparação da concentração liberada no frasco contendo 15 mL após 4 horas de liberação de metotrexato em 37 °C e 43 °C.

Amostra	Concentração 4 horas 37 °C / mol L ⁻¹	Concentração 4 horas 43 °C / mol L ⁻¹
Mag@ PNIPAM-co-PAA	2,84E-02	2,00E-01
Mag@ PNVCL-co-PAA	3,99E-02	1,16E-01
Mag@ PNIPAM-co-PAAmod	2,49E-02	2,01E-01
Mag@ PNVCL-co-PAAmod	2,11E-02	3,23E-02

Fonte: Elaborado pelo autor.

Pela **Tabela 6** é possível verificar que a concentração de MTX está muito acima da recomendada pelo combate a células tumorais ($1,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹). Ou seja, é possível extrapolar os valores para diminuir muito a concentração diluindo-se a quantidade de MTX a ser incorporada até se estabelecer o valor aceitável. Caso fosse feita uma diluição de 4 vezes seria possível atingir os valores de concentração adequados do medicamento. Outro fator relevante é a diferença da ordem de grandeza entre a concentração em 37 °C e em 43 °C. Como em 43 °C a ordem de grandeza da concentração molar está 1 unidade maior comparado a concentração em 37 °C é possível estabelecer uma relação de ação medicamento fazendo com que a

concentração em 37 °C não tenha efeito no combate a células tumorais, mas em 43 °C seja possível iniciar o tratamento.

A liberação de metotrexato ser intensificada pelo aumento da temperatura abriu uma nova dúvida, ou seja, se a liberação estaria envolvida com um processo de interações intermoleculares devido à polaridade das cadeias e do fármaco, ou se o colapso da estrutura é o principal responsável pelo aumento da liberação. Por isso, foram feitas as curvas de liberação do medicamento diclofenaco de potássio (um fármaco polar e solúvel em água) para diferenciar os tipos de interações químicas no processo de liberação. A **Tabela 6** representa a incorporação de diclofenaco de potássio nos materiais sintetizados.

Tabela 7 – Grau de incorporação de diclofenaco de potássio em 10 mg de magnetitas revestidas

Materiais	Massa de DFC incorporada / mg	Eficiência de encapsulação (m incorporada/m total) *100	Coeficiente de incorporação (m incorporada / m magnetita) *100
Mag@PNIPAm-co-PAA	3,15	32,4	31,5
Mag@PNVCL-co-PAA	2,81	28,9	28,1
Mag@PNIPAm-co-PAAmod	2,83	27,1	28,3
Mag@PNVCL-co-PAAmod	2,43	25,1	24,3

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos dados apresentados na **Tabela 7**, pode-se perceber que existe o mesmo padrão da capacidade de retenção de fármaco se comparado com a **Tabela 5**, que mostra os materiais esterificados com uma menor capacidade de incorporação. O diclofenaco de potássio é um fármaco polar, solúvel em água e com interações intermoleculares diferentes do metotrexato, por isso surge um novo indício de que as interações intermoleculares exercem um papel menos significativo quando comparado com a difusão do solvente pelas cadeias. As estruturas mais hidrofóbicas, ou seja, os copolímeros esterificados (PNIPAm-co-PAAmod e PNVCL-co-PAAmod), provavelmente formam estruturas que protegem as cadeias apolares do solvente (solução de tampão fosfato), implicando na diminuição da incorporação do fármaco na estrutura; mesmo utilizando uma temperatura baixa como 10 °C, não foi suficiente para que existisse uma incorporação similar aos polímeros não esterificados.

Para avaliar se existe um comportamento similar ao metotrexato foram feitas as curvas de liberação de diclofenaco de potássio em 37 °C e 43 °C. A **Figura 40** representa a liberação de diclofenaco de potássio em duas temperaturas distintas.

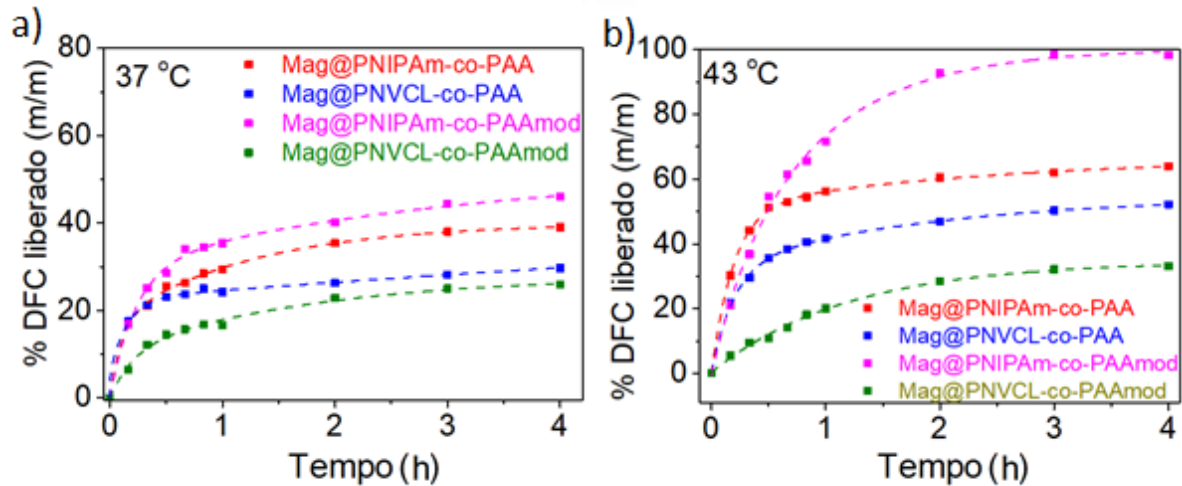


Figura 12 – Liberação de diclofenaco de potássio (DFC) para as nanopartículas modificadas em função do tempo em a) 37°C e b) 43 °C

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na **Figura 40** observa-se o mesmo efeito de liberação que ocorreu para o medicamento metotrexato. As taxas de liberação de diclofenaco de potássio em 43 °C é muito superior se comparadas a 37 °C. Mais uma vez, o material Mag@PNIPAm-co-PAAmod apresentou o melhor desempenho de liberação em 43 °C. O que vale ressaltar é que o efeito principal a ser destacado para liberação é o colapso da estrutura causado pela LCST, pois o material Mag@PNVCL-co-PAAmod não apresentou variação significativa na liberação de diclofenaco, uma vez que seu valor de LCST é atingido antes de 30 °C, ou seja, para ambas as temperaturas da liberação, a estrutura já se encontra totalmente colapsada.

As últimas análises são a cromatografia de permeação em gel e análise elementar para determinar a massa molar, o fator de polidispersão e composição dos polímeros. Sabendo-se que as amostras são resultados de polimerização radicalar não controlada, espera-se que sejam polidispersas, com índice D (índice de polidispersão polimérico) acima de 1,1 (JIANG et al., 2014). A **Figura 41** mostra os cromatogramas do conjunto de polímeros para determinação da massa molar e do índice de polidispersão.

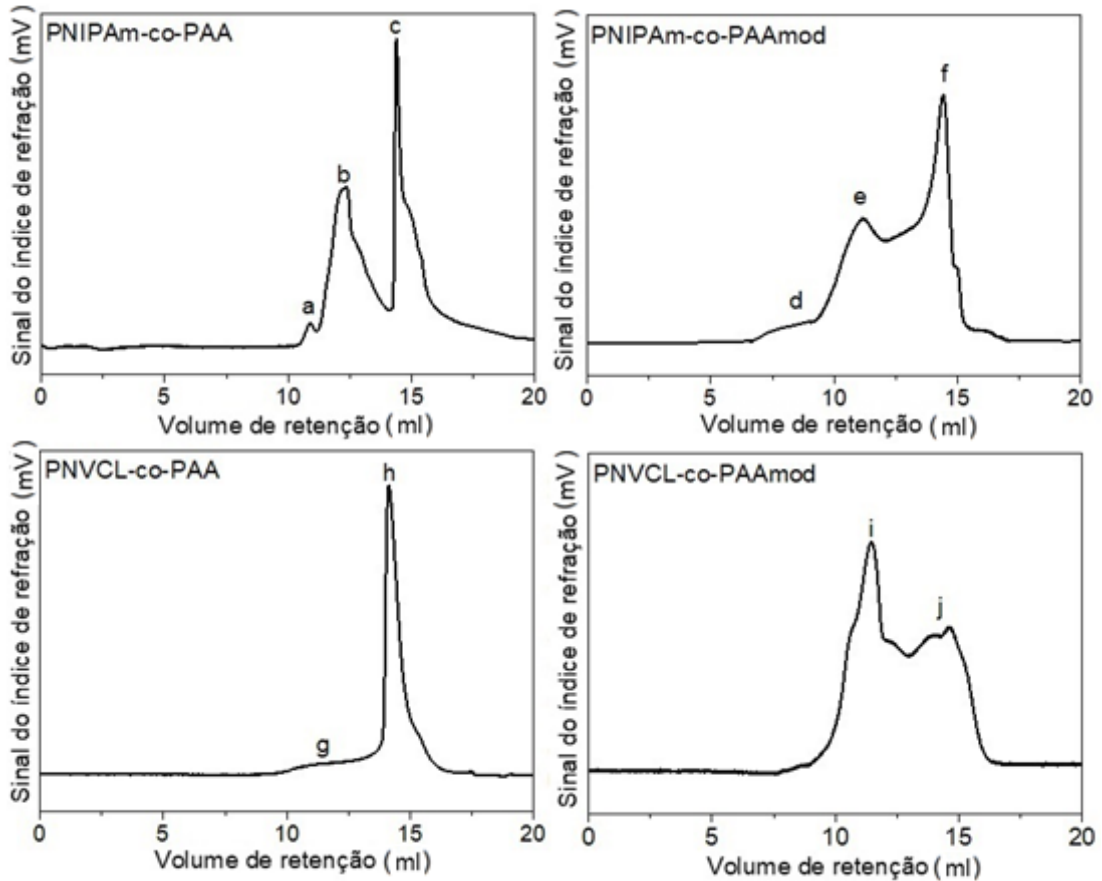


Figura 41 – Cromatogramas dos copolímeros sintetizados PNIPAm-co-PAAmod e PNVCL-co-PAAmod. Solvente DMF e tempo de corrida 20 minutos
Fonte: Elaborado pelo autor.

Pelo ajuste do software *Omni SEC* dos cromatogramas da **Figura 41** foi possível identificar a massa molar e a polidispersão de todos os picos presentes nos cromatogramas. Os picos estão indicados por letras minúsculas de a até j e estão analisados na **Tabela 8**.

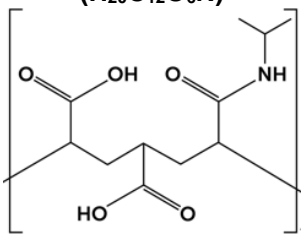
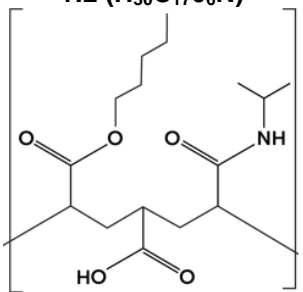
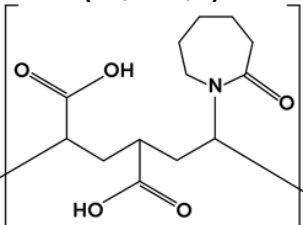
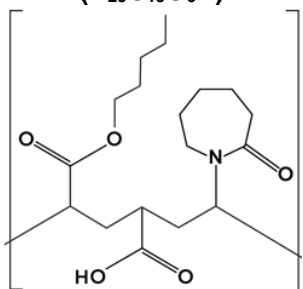
Tabela 8 – Determinação da massa molar de cada um dos picos de a até j da Figura 20. O software utilizado para análise dos picos foi *Omini SEC* v. 5.1

Copolímero	Pico	Mn / Da	Mw / Da	D
PNIPAm-co-PAA	a	218700	240000	1,10
	b	30400	41060	1,35
	c	7800	8230	1,06
PNIPAm-co-PAAmod	d	-	-	-
	e	93230	207900	2,23
	f	14350	16040	1,12
PNVCL-co-PAA	g	145680	434450	2,98
	h	13250	14950	1,13
PNVCL-co-PAAmod	i	30480	41050	1,35
	j	13900	26360	1,90

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como pode ser visto na **Tabela 8**, o copolímero PNIPAm-co-PAA possui 3 grupos de picos identificando 3 tamanhos distintos de peso molecular (a - 240000 Da, b - 41060 Da e c - 8230 Da). Após a esterificação, o copolímero modificado por PNIPAm-co-PAA mostrou aumento da massa molecular em todos os picos (d-fora da faixa da curva de calibração, e - 207900 Da e f -16040) indicando que a inserção de 1-pentanol foi de fato possível. Um fator interessante a ser observado é que a inserção de 1-pentanol nas cadeias de PNIPAm-co-PAA resultou no aumento da polidispersividade das cadeias poliméricas. Para o copolímero de PNVCL-co-PAA, os picos originais (g - 434450 Da e h - 149500) apresentaram aumento após a esterificação, mas, comparando-se os picos g e i, observa-se uma diminuição da polidispersão. Essa redução provavelmente ocorreu em função da esterificação ter igualado a distribuição da massa molar, ou pela total sobreposição do pico i nas proximidades do pico g. De qualquer maneira, o efeito do aumento das massas molares atribuídos aos picos é um efeito similar visto para ambos os copolímeros, PNVCL-co-PAA e PNIPAm-co-PAA, após a modificação.

Tabela 9 – Análise elementar dos copolímeros sintetizados

	Elemento químico	MM / g mol^{-1}	Composição teórica / %	Análise Elementar CHN / %
 <p>PNIPAm-co-PAA 1:2 ($\text{H}_{20}\text{C}_{12}\text{O}_6\text{N}$)</p>	C	144,13	52,57	50,02 \pm 1,5
	N	14,01	5,11	6,56 \pm 0,20
	H	20,02	7,30	6,63 \pm 0,20
	O	95,99	35,02	-
	Massa molar da unidade de repetição = 274,14 g. mol^{-1}			
 <p>PNIPAm-co-PAAmoD 1:2 ($\text{H}_{30}\text{C}_{17}\text{O}_6\text{N}$)</p>	C	204,18	59,32	57,15 \pm 1,7
	N	14,01	4,07	5,26 \pm 0,16
	H	30,02	8,72	7,89 \pm 0,24
	O	95,99	27,89	-
	Massa molar da unidade de repetição = 344,21 g. mol^{-1}			
 <p>PNVCL-co-PAA 1:2 ($\text{H}_{19}\text{C}_{14}\text{O}_6\text{N}$)</p>	C	168,15	56,58	53,98 \pm 1,6
	N	14,01	4,71	5,74 \pm 0,17
	H	19,02	6,40	6,01 \pm 0,18
	O	95,99	32,30	-
	Massa molar da unidade de repetição = 297,17 g. mol^{-1}			
 <p>PNVCL-co-PAAmoD 1:2 ($\text{H}_{29}\text{C}_{19}\text{O}_6\text{N}$)</p>	C	228,20	62,14	59,22 \pm 1,8
	N	14,01	3,81	4,44 \pm 0,13
	H	29,02	7,90	7,12 \pm 0,21
	O	95,99	26,14	-
	Massa molar da unidade de repetição = 367,23 g. mol^{-1}			

Fonte: Elaborado pelo autor.

A **Tabela 9** representa a análise elementar feita dos copolímeros e expressa uma comparação entre a proporção teórica calculada, considerando que a unidade de repetição do polímero apresenta uma unidade de monômero termossensível e duas unidades de ácido acrílico, ou seja, os polímeros preparados na proporção molar de dois mols de ácido acrílico para 1 mol de N-isopropilacrilamida ou N-vinilcaprolactama. Outro fator importante a ser notado é que a segunda consideração feita é a existência

de apenas uma inserção de uma molécula de 1-pentanol na unidade de repetição. Compreendendo-se as duas considerações, buscou-se comparar diretamente os valores das proporções obtidas pela análise elementar e os valores teóricos calculados a partir das unidades de repetição, que estão representadas pelas fórmulas moleculares e estruturais na **Tabela 9**.

Todos os polímeros da **Tabela 9** mostraram que a composição teórica da unidade de repetição está muito próxima da composição obtida na análise elementar de CHN. Essa evidência é extremamente importante para confirmar que o copolímero está na razão molar estabelecida no procedimento experimental. Outro fato encontrado foi que a esterificação do 1-pentanol foi responsável por apenas 50% da modificação dos grupos carboxílicos. O rendimento da esterificação foi de aproximadamente 50% e, basicamente, ainda existem grupos de ácido carboxílico disponíveis. Esta medida concorda com a análise do Potencial Zeta, sugerindo que cargas negativas de grupos carboxílicos desprotonados ainda estão presentes na cadeia polimérica após a esterificação.

5 CONCLUSÃO

Foi sintetizado um sistema de nanopartículas magnéticas revestidas com polímeros. Essas nanopartículas de óxido de ferro são capazes de gerar calor na presença de um campo magnético alternado. O processo de esterificação pode estar ocasionando a diminuição de geração de calor em função de uma possível oxidação de magnetita para maghemita. As técnicas de espectroscopia de infravermelho e termogravimetria confirmam a presença de polímero na superfície, ou seja, a funcionalização foi efetiva e nenhum processo de síntese causa a remoção dos polímeros da superfície. Os materiais apresentam propriedade de transição hidrofílico-hidrofóbico com aumento da temperatura, sendo a magnetita revestida PNIPAm-co-PAA e PNIPAm-co-PAAmod os materiais com maior temperatura de transição (42,5°C e 38,7 °C, respectivamente). A liberação de metotrexato e diclofenaco de potássio é favorecida com o aumento da temperatura e a propriedade da estrutura (hidrofílica ou hidrofóbica) apresenta efeitos determinantes tanto na incorporação quanto na liberação. A quantidade de metotrexato nas nanopartículas pode ser ajustada para oferecer ação contra células tumorais e uma menor quantidade de MTX será necessária para a aplicação *in vivo*, pois as partículas conseguem produzir uma concentração em tampão fosfato quatro vezes superior a necessária para o tratamento.

SUGESTAO PARA TRABALHOS FUTUROS

Por fim, este estudo abre a possibilidade de implementar outras moléculas no processo de esterificação, ou seja, confirmar que é possível inserir o 1-pentanol nas cadeias de PNIPAm-co-PAA e PNVCL-co-PAA permite que novos ácidos carboxílicos sejam testados. As sugestões mais recorrentes seriam proteínas ou biomoléculas que contenham a função ácido carboxílico e que possuam função biológica, como o ácido fólico, que possui função importante no processo de replicação do DNA, e utilizá-lo como direcionador considerando que células tumorais são ávidas pelo seu consumo, seria uma excelente sugestão.

6 REFERÊNCIAS

ABDOLLAH, S. M.; FERESHTEH, F.; NAZANIN, F. Synthesis and modification of iron oxide nanoparticles (magnetite) for biomedical applications. **Research Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 9, p. 87–95, 2017.

ACKLAND, S. P.; SCHILSKY, R. L. High-dose methotrexate: A critical reappraisal. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. 2017–2031, 1987.

ALARCON, C. DE LAS H.; PENNADAM, S.; ALEXANDER, C. Stimuli responsive polymers for biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 34, n. 3, p. 276–285, 2005.

ALIRAMAJI, S.; ZAMANIAN, A.; SOHRABIJAM, Z. Characterization and Synthesis of Magnetite Nanoparticles by Innovative Sonochemical Method. **Procedia Materials Science**, v. 11, p. 265–269, 2015.

ALTMAN, R. et al. Advances in NSAID Development : Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology. **Drugs**, v. 75, n. 8, p. 859–877, 2015.

BABIČ, M. et al. Heat generation of surface-modified magnetic γ -Fe₂O₃ nanoparticles in applied alternating magnetic field. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 50, n. 34, p. 345002, 31 ago. 2017.

BABINCOVÁ, M.; PETER, B. V. High-Gradient magnetic capture of ferrofluids: Implications for drug targeting and Tumor Embolization. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 56, n. 9-10, p. 909–911, 2001.

BAG, D. S.; RAO, K. U. B. Smart polymers and their applications. **Journal of Polymer Materials**, v. 23, n. 3, p. 225–248, 2006.

BAÑOBRE-LÓPEZ, M.; TEIJEIRO, A.; RIVAS, J. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, v. 18, n. 6, p. 397–400, 2013.

BERRY, C. C.; CURTIS, A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, n. 13, p. R198, 2003.

BINI, R. A. et al. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxy silanes. **Journal of Magnetism and Magnetic**

Materials, v. 324, n. 4, p. 534–539, 2012.

BLUNDELL, S. **Magnetism in Condensed Matter**. United Kingdom: Oxford University Press, 2001.

BONNEMAIN, B. Superparamagnetic Agents in Magnetic Resonance Imaging: Physicochemical Characteristics and Clinical Applications A Review - **Journal of Drug Targeting** | Taylor & Francis Online, v. 6, n. 3, p. 167–174, 1998.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Drug – excipient compatibility screening — Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 82–97, 2014.

CHEN, Y. et al. Hollow Poly (N -isopropylacrylamide) - co -poly (acrylic acid) Microgels with High Loading Capacity for Drugs. 2011. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 124, n. 6, p. 4678-4685, 2012.

CHRISTOPHI, C. et al. The treatment of malignancy by hyperthermia. **Surgical Oncology**, v. 7, n. 1–2, p. 83–90, 1998.

DA SILVA NUNES, E. et al. Characterization of tetraethylene glycol passivated iron nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 315, n. 1, p. 337–345, 2014.

DE MONTFERRAND, C. et al. Iron oxide nanoparticles with sizes, shapes and compositions resulting in different magnetization signatures as potential labels for multiparametric detection. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 4, p. 6150–6157, 2013.

DEATSCH, A. E.; EVANS, B. A. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 354, p. 163–172, 2014.

DENG, H. et al. PEG-b-PCL copolymer micelles with the ability of pH-controlled negative-to-positive charge reversal for intracellular delivery of doxorubicin. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 11, p. 4281–4292, 2014.

DUGUET, E. et al. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. **Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 157–168, ago. 2006.

EBDON, J. R.; HUCKERBY, T. N.; THOMAS, C. H. Free-radical aqueous slurry

polymerizations of acrylonitrile : 2 . End-groups and other minor structures in polyacrylonitriles initiated by potassium persulfate / sodium bisulfite. **Polymer**, v. 35, n. 2, p. 250–256, 1994.

FILIPPOUSI, M. et al. Novel core-shell magnetic nanoparticles for Taxol encapsulation in biodegradable and biocompatible block copolymers: Preparation, characterization and release properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, n. 1, p. 221–230, 2013.

GILCHRIST, R. K. et al. Selective inductive heating of lymph nodes. **Annals of surgery**, v. 146, n. 4, p. 596–606, out. 1957.

GMINSKI, R. et al. Genotoxic effects of three selected black toner powders and their dimethyl sulfoxide extracts in cultured human epithelial A549 lung cells in vitro. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 52, n. 4, p. 296–309, maio 2011.

GUIBERT, C. et al. Hyperthermia of Magnetic Nanoparticles: Experimental Study of the Role of Aggregation. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 50, p. 28148–28154, 2015.

GUO, S. et al. Monodisperse mesoporous superparamagnetic single-crystal magnetite nanoparticles for drug delivery. **Biomaterials**, v. 30, n. 10, p. 1881–1889, 2009.

HARMON, B. V. et al. The role of apoptosis in the response of cells and tumours to mild hyperthermia. **International Journal of Radiation Biology**, v. 59, n. 2, p. 489–501, 1991.

HERVAULT, A.; THANH, N. T. K. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. **Nanoscale**, v. 6, n. 20, p. 11553–11573, 2014.

HESS, J. A.; KHASAWNEH, M. K. Cancer metabolism and oxidative stress: Insights into carcinogenesis and chemotherapy via the non-dihydrofolate reductase effects of methotrexate. **BBA Clinical**, v. 3, p. 152–161, jun. 2015.

HOCINE, S.; LI, M. H. Thermoresponsive self-assembled polymer colloids in water. **Soft Matter**, v. 9, n. 25, p. 5839–5861, 2013.

JAGUR-GRODZINSKI, J. Polymeric gels and hydrogels for biomedical and

pharmaceutical applications. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 21, n. 1, p. 27–47, 1 jan. 2009.

JEONG, B.; GUTOWSKA, A. Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 7, p. 305–311, 18 jul. 2002.

JEYADEVAN, B. Present status and prospects of magnetite nanoparticles-based hyperthermia. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 118, n. 6, p. 391–401, 2010.

JIANG, X. et al. Synthesis of PAA-g-PNIPAM well-defined graft polymer by sequential RAFT and SET-LRP and its application in preparing size-controlled superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as a stabilizer. **Polymer (United Kingdom)**, v. 55, n. 16, p. 3703–3712, 2014.

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.
KEMPE, H.; KEMPE, M. The use of magnetite nanoparticles for implant-assisted magnetic drug targeting in thrombolytic therapy. **Biomaterials**, v. 31, n. 36, p. 9499–9510, 2010.

KIRSCHVINK, J. L.; KOBAYASHI-KIRSCHVINK, A.; WOODFORD, B. J. Magnetite biomineralization in the human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 16, p. 7683–7687, 15 ago. 1992.

KIRSCHVINK, J. L.; WALKER, M. M.; DIEBEL, C. E. Magnetite-based magnetoreception. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 4, p. 462–467, 2001.

KIRSCHVINK, J. L.; WINKLHOFER, M.; WALKER, M. M. Biophysics of magnetic orientation: Strengthening the interface between theory and experimental design. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. SUPPL. 2, p. 179–191, 2010.

KOMURA, K. et al. FeCl₃·6H₂O as a versatile catalyst for the esterification of steroid alcohols with fatty acids. **Synthesis**, n. 21, p. 3407–3410, 2008.

KOO, O. M.; RUBINSTEIN, I.; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, n. 3, p. 193–212, 18 jul. 2005.

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, ago. 2011.

LANDEE, C. P.; TURNBULL, M. M. Review: A gentle introduction to magnetism: Units, fields, theory, and experiment. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 67, n. 3, p. 375–439, 2014.

LANZALACO, S.; ARMELIN, E. Poly(N-isopropylacrylamide) and Copolymers: A Review on Recent Progresses in Biomedical Applications. **Gels**, v. 3, n. 4, p. 36, 2017.

LIU, R.; FRAYLICH, M.; SAUNDERS, B. R. Thermoresponsive copolymers : from fundamental studies to applications. **Colloid and Polymer Scienc**, v. 287, n. 6, p. 627–643, 2009.

LIU, X. L. et al. Optimization of surface coating on Fe₃O₄ nanoparticles for high performance magnetic hyperthermia agents. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 17, p. 8235–8244, 2012.

LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHUTH, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222–1244, 2007.

MAHER, B. A. et al. Magnetite pollution nanoparticles in the human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 39, p. 10797 LP – 10801, 27 set. 2016.

MAMANI, J. B.; GAMARRA, L. F.; BRITO, G. E. DE S. Synthesis and characterization of Fe₃O₄ nanoparticles with perspectives in biomedical applications. **Materials Research**, v. 17, n. 3, p. 542–549, 2014.

MARQUES, N. N. et al. PNIPAM-based graft copolymers prepared using potassium persulfate as free-radical initiator: synthesis reproducibility. **Colloid and Polymer Science**, v. 294, n. 6, p. 981–991, 2016.

MARTÍNEZ BANACLOCHA, M. A.; BÓKKON, I.; BANACLOCHA, H. M. Long-term memory in brain magnetite. **Medical Hypotheses**, v. 74, n. 2, p. 254–257, 2010.

MCGETTIGAN, P.; HENRY, D. Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and High-Income Countries. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 2, 2013.

- MESÁROŠOVÁ, M. et al. The role of reactive oxygen species in the genotoxicity of surface-modified magnetite nanoparticles. **Toxicology Letters**, v. 226, n. 3, p. 303–313, 2014.
- MOURITSEN, H.; RITZ, T. Magnetoreception and its use in bird navigation. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 15, n. 4, p. 406–414, 2005.
- PANSERI, S. et al. Innovative magnetic scaffolds for orthopedic tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 100 A, n. 9, p. 2278–2286, 2012.
- PETCHAROEN, K.; SIRIVAT, A. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. **Materials Science & Engineering B**, v. 177, n. 5, p. 421–427, 2012.
- PRIYA JAMES, H. et al. Smart polymers for the controlled delivery of drugs – a concise overview. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 2, p. 120–127, abr. 2014.
- ROSENSWEIG, R. E. E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, n. 0, p. 370–374, 2002.
- RUSU, A. G. et al. Tailoring the properties of chitosan-poly(acrylic acid) based hydrogels by hydrophobic monomer incorporation. **Materials Letters**, v. 164, p. 320–324, fev. 2016.
- SAINI, S. et al. Magnetism: a primer and review. **American Journal of Roentgenology**, v. 150, n. 4, p. 735–743, 1 abr. 1988.
- SALAS, G.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; MORALES, M. DEL P. Relationship between physico-chemical properties of magnetic fluids and their heating capacity. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p. 768–776, 1 dez. 2013.
- SCHMALJOHANN, D. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 15, p. 1655–1670, 30 dez. 2006.
- SCHMIDT, S.; HELLWEG, T.; VON KLITZING, R. Packing density control in P(NIPAM-Co-AAc) microgel monolayers: Effect of surface charge, pH, and preparation technique. **Langmuir**, v. 24, n. 21, p. 12595–12602, 2008.
- SULTAN, A. et al. Single dose oral flurbiprofen for acute postoperative pain in adults.

Cochrane Database of Systematic Reviews, v. 61, n. 4, 2009.

SURIYANTO; NG, E. Y. K.; KUMAR, S. D. Physical mechanism and modeling of heat generation and transfer in magnetic fluid hyperthermia through Néelian and Brownian relaxation: a review. **Biomedical engineering online**, v. 16, n. 1, p. 36, 2017.

TODD, P. A.; SORKIN, E. M. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy [published erratum appears in *Drugs* 1988 Jul;36(1):preceding 1]. **Drugs**, v. 35, n. 3, p. 244–285, 1988.

VEGA-CHACÓN, J. et al. pH-responsive poly(aspartic acid) hydrogel-coated magnetite nanoparticles for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 366–373, 2017.

VIALI, W. R. et al. PEGylation of SPIONs by polycondensation reactions: A new strategy to improve colloidal stability in biological media. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 8, p. 18–24, 2013.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010.

WANG, Y. X. J.; HUSSAIN, S. M.; KRESTIN, G. P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: Physicochemical characteristics and applications in MR imaging. **European Radiology**, v. 11, n. 11, p. 2319–2331, 2001.

WARD, M. A.; GEORGIU, T. K. Thermoresponsive polymers for biomedical applications. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1215–1242, 2011.

WOOD, G. S.; WU, J. Methotrexate and Pralatrexate. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 4, p. 747–755, out. 2015.

WU, D.-Q.; CHU, C.-C. Biodegradable hydrophobic–hydrophilic hybrid hydrogels: swelling behavior and controlled drug release. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 19, n. 4, p. 411–429, 1 jan. 2008.

WU, Y. et al. Preparation and characterization of chitosan – poly (acrylic acid) polymer magnetic microspheres. **Polymer**, v. 47, n. 15, p. 5287–5294, 2006.