

ANNA CAROLINA TELATIN TOGNOLO

**FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS COM
POLÍMERO TERMOSENSÍVEL PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
FÁRMACO E HIPERTERMIA MAGNÉTICA.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

T645f Tognolo, Anna Carolina Telatin
Funcionalização de nanopartículas superparamagnéticas com polímero termossensível para liberação controlada de fármaco e hipertermia magnética / Anna Carolina Telatin Tognolo. – Araraquara : [s.n.], 2017
73 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques

1. Nanopartículas. 2. Copolímeros. 3. Preparação de liberação controlada. 4. Metotrexato. 5. Termoterapia.
I. Título.

ANNA CAROLINA TELATIN TOGNOLO

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

Araraquara, 07 de agosto de 2017.

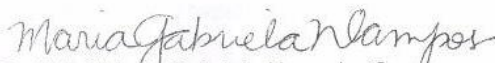
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof.ª Dr.ª Sandra Helena Pulcinelli
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof.ª Dr.ª Maria Gabriela Nogueira Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia / UNIFAL / Alfenas - MG

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO:

Nome: Anna Carolina Telatin Tognolo

Nome em citações bibliográficas: Tognolo, A. C. T.

ENDEREÇO PROFISSIONAL:

Rua Prof. Francisco Degni, 55, Quitandinha, 1480-060, Araraquara - SP.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2015 Mestrado em Química.

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

Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2010 - 2015 Graduação em Química Tecnológica.

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

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS:

Apresentação de Poster no **Fifth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials 2017**. (Congresso). Surface modification of magnetic nanoparticles with thermoresponsive P(NIPAAm-co-DMAAm) copolymers for drug delivery and hyperthermia.

Workshop on Entrepreneurship for Scientists and Engineers from Developing Countries, 2016. (Oficina). Workshop project presentation.

Apresentação de Poster no **XV Brazilian MRS Meeting**, 2016. Magnetic nanoparticles surface modified with thermosensitive P(NIPAAm-co-DMAAm) copolymers for methotrexate delivery.

Apresentação de Poster no **Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials (Hybrid Materials 2015)**, 2015. (Congresso). Magnetic

Nanoparticles: Surface modified with folic acid.

Apresentação de Poster **Workshop Austrália Unesp 2015**, 2015. (Congresso).

Magnetic Nanoparticles: Surface functionalization and modification with folic acid.

Apresentação de Poster **XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, 2015.

(Congresso). Funcionalização da superfície de nanopartículas magnéticas com alcoxissilano e modificação com ácido fólico.

Multifunctional Colloidal Systems: Design and Applications in Materials Science and Biomedicine, 2014. (Congresso)

Workshop Nanobiocatalysts, 2014. (Simpósio)

Apresentação de Poster no **XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp**,

2014. (Congresso). Nanopartículas magnéticas: Funcionalização de superfície para modificação com ácido fólico.

Participação da Organização da **XLIII Semana da Química**, 2013. Curso: Química Medicinal.

Apresentação de Poster no **XXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp**,

2013. (Congresso). Síntese de nanopartículas magnéticas obtidas por coprecipitação homogênea sonoquimicamente assistida.

Apresentação de Poster no **XXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp**,

2012. (Congresso). Síntese e caracterização de zeólitas contendo cobre para a desidrogenação catalítica do etanol em fase gás.

Participação na **XLI Semana da Química**, 2011. Curso: Cosméticos.

Participação na **XL Semana da Química**, 2010. Curso: Perfuração de poços de petróleo e conhecimento de polímeros.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Antonio e Silvanete por toda confiança, apoio, amor e dedicação, sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Thiago e Gustavo e as minhas sobrinhas Manoela e Maria e à toda minha família pelo incentivo e apoio.

Aos meus amigos, Jéssica, Juliana, Luisa, Cris, Ariane, Thiago, Bruno, Lucas e Tiago pelos momentos de diversão em Araraquara e por toda ajuda e incentivo.

Aos meus colegas do laboratório de Materiais Magnéticos e Colóides, agradeço por todo o conhecimento compartilhado e por toda ajuda oferecida, especialmente ao Jaime, Juliana, Rodolfo e Bruno que ajudaram muito na realização desse trabalho.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Rodrigo Marques, vulgo Jataí, pela orientação, paciência e pelos conselhos e ensinamentos compartilhados durante esses anos de iniciação científica e mestrado, e por acreditar que tudo isso seria possível.

Ao Prof. Dr. Miguel Jafelicci, por toda contribuição com o trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À todos os professores e funcionários do Instituto de Química.

*"Aprendi a aceitar desafios que nunca pensei fazer antes. Sucesso e conforto
não podem coexistir." Ginni Rometty*

RESUMO

O câncer é uma das doenças mais desafiadoras e não solucionadas até hoje na medicina moderna. Apesar das terapias padrões como radioterapia, quimioterapia, cirurgia ou combinações desses tratamentos serem efetivos, esses procedimentos apresentam diversos efeitos colaterais. Portanto, há uma vasta investigação por tratamentos alternativos a fim de diminuir os efeitos colaterais dessas terapias. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NP) modificadas com polímeros termossensíveis, vêm sendo desenvolvidas como um sistema de liberação controlada de fármaco e hipertermia magnética. Na presença de um campo magnético alternado externo (AC), esses sistemas são aquecidos induzindo a transição do polímero e, conseqüentemente, liberando o fármaco. Sendo assim, a proposta deste trabalho foi o desenvolvimento de um nanossistema terapêutico multifuncional. Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro foram sintetizadas, funcionalizadas com o alcóxido silano 3-mercaptopropil – trimetoxissilano (MPTS) e modificadas com o copolímero termossensível Poli(N-isopropilacrilamida-co-dimetilacrilamida), P(NIPAAm-co-DMAAm), para encapsulamento e liberação controlada do fármaco quimioterápico metotrexato e no tratamento por hipertermia magnética. A funcionalização com o MPTS foi confirmada por espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) e pela análise termogravimétrica (TGA). A copolimerização na superfície das nanopartículas foi confirmada pelas técnicas de FT-IR, medidas de potencial zeta, TGA e pela medida do diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura. Determinou-se a baixa temperatura crítica de solução (LCST) do copolímero sintetizado, através da espectroscopia no UV-vis em função da temperatura. O valor de LCST determinado foi de 40,5 °C e está dentro do esperado para aplicações biomédicas. Pela microscopia eletrônica de transmissão (MET), observou-se que as nanopartículas magnéticas apresentaram forma esférica e estreita distribuição de tamanho mesmo após serem modificadas com o copolímero. Os resultados obtidos na hipertermia, mostraram que as amostras aquecem quando são submetidas a um campo magnético externo, atingindo temperaturas esperadas para a hipertermia. E por fim, o encapsulamento e a liberação do metotrexato foram realizados com êxito, sendo que a liberação do fármaco acima da LCST do copolímero, apresentou melhor resultado quando comparado com a liberação abaixo dessa temperatura.

Palavras-chaves: Nanopartículas magnéticas. Polímero termossensível. Liberação controlada de fármaco. Hipertermia magnética.

ABSTRACT

Nowadays, cancer is one of the biggest challenges in medicine. Besides the standard treatments such as chemotherapy, radiotherapy and surgery, these procedures have several side effects. In order to reduce the side effects, there is extensive research for alternative treatments. Iron oxide magnetic nanoparticles (NP) modified with thermosensitive polymers, has been developed as a simultaneous system, for drug delivery and for magnetic hyperthermia. In the presence of an alternating magnetic field (AC), this system will be heated, inducing a phase transition of the thermoresponsive polymer and then, consequently releasing the drug inside the tumor cells. Therefore, the proposed work is the development of a therapeutic multifunctional nanosystem. Iron oxide magnetic nanoparticles were synthesized, functionalized with the alkoxy silane 3-mercaptopropyl trimethoxysilane (MPTS) and modified with the thermoresponsive copolymer P(NIPAAm-co-DMAAm), for the encapsulation and controlled release of the methotrexate (MTX) and for the magnetic hyperthermia. The surface modification of nanoparticles was monitored by Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR). TEM images showed nanoparticles with average size of 10 nm. The hydrodynamic diameter of the nanosystem as a function of the temperature was measured by dynamic light scattering and the hydrodynamic diameter for the P(NIPAAm-co-DMAAm) surface modified nanoparticles, changes near 40 °C. Under an alternative AC, the nanosystem showed a high performance for hyperthermia treatment. Drug loading and release rate of methotrexate at different temperatures showed ideal behaviour for its application as drug delivery system.

Keywords: Magnetic nanoparticles. Thermoresponsive polymers. Drug delivery. Magnetic hyperthermia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NP/SPION - Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro

MPTS - 3-mercaptopropil-trimetoxisilano

PNIPAAm - Poli(N-isopropilacrilamida)

DMAAm - Dimetilacrilamida

P(NIPAAm-co-DMAAm) - Poli(N-isopropilacrilamida-co-dimetilacrilamida)

MTX - Metotrexato

LCST - Baixa temperatura crítica de solução

DRX - Difractometria de raios X

IR-FT - Espectroscopia na região do infravermelho

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

TG - Análise termogravimétrica

DLS - Espalhamento dinâmico de luz

¹H RMN - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

GPC - Cromatografia de permeação em gel

SAR - Taxa de energia absorvida específica ou energia absorvida específica

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Representação esquemática do mecanismo de liberação controlada de fármaco utilizando NP como guia magnético. | 17 |
| Figura 2 - Representação esquemática da hipertermia magnética utilizando NP como mediadores de calor. | 17 |
| Figura 3 - Representação esquemática da proposta do presente trabalho. | 18 |
| Figura 4 - Mecanismos responsáveis pelo efeito sinérgico da combinação das terapias..... | 21 |
| Figura 5 - Ilustração da curva de histerese magnética de um material ferrimagnético..... | 22 |
| Figura 6 - Relação entre o diâmetro das SPION e a estrutura dos domínios magnéticos, D_s é o diâmetro “superparamagnético” e D_c é o diâmetro crítico..... | 23 |
| Figura 7 - Curva de histerese de um material superparamagnético. | 23 |
| Figura 8 - Estrutura molecular do MPTS. | 25 |
| Figura 9 - Reação do alcoxissilano MPTS na superfície das nanopartículas magnéticas. | 26 |
| Figura 10 - Representação esquemática de polímero termosensível..... | 27 |
| Figura 11 - Proposta de mecanismo de reação entre as nanopartículas magnéticas funcionalizadas com MPTS e o copolímero termossensível. | 28 |
| Figura 12 - Estruturas moleculares do ácido fólico e do metotrexato. | 29 |
| Figura 13 - A) Representação esquemática do metabolismo celular do ácido fólico. B) Mecanismo de ação do fármaco MTX. | 29 |
| Figura 14 - Representação esquemática do encapsulamento do MTX. | 33 |
| Figura 15 - Representação esquemática do ensaio de liberação de MTX. | 34 |
| Figura 16 - Difratoograma de raios X das NP obtido e do padrão de difração de raios – X da fase magnetita. | 39 |
| Figura 17 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras A) NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3, B) NP@MPTS e C) SPION. | 41 |
| Figura 18 - Curvas de titulação potenciométrica das amostras NP, NP@MPTS e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3..... | 43 |
| Figura 19 - Micrografias eletrônicas de transmissão obtidas, A) e B) NP@MPTS e C) e D) NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3. | 45 |

| | |
|--|----|
| Figura 20 - Análise termogravimétrica das amostras: NP@MPTS, NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm5 e NP@MPTS@NIPAAm-co- DMAAm3..... | 47 |
| Figura 21 - TG-DTG das amostras A)NP@MPTS, B)NP@MPTS@NIPAAm-co- DMAAm5 e C)NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3..... | 47 |
| Figura 22 - Medidas de diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura das amostras NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 e da amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm5..... | 50 |
| Figura 23 - Temperatura crítica de solução (LCST) dos copolímeros P(NIPAAm-co- DMAAm3) e P(NIPAAm-co-DMAAm5). Transmitância em 500 nm, determinada em solução tampão fosfato PBS (pH 7,4). | 52 |
| Figura 24 - ¹ H RMN espectros obtidos das amostras P(NIPAAm-co-DMAAm3) e P(NIPAAm-co-DMAAm5). | 54 |
| Figura 25 - Temperatura das amostras em função do tempo, sob aplicação de um campo magnético (420 kHz, 14kA/m). | 59 |
| Figura 26 - A) Espectro de absorção de metotrexato. B) Curva analítica para o MTX no comprimento de onda 303 nm..... | 61 |
| Figura 27 - Liberação de MTX da amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 à 45 °C e a 37 °C..... | 62 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Principais atribuições encontradas nos espectros de absorção na região do infravermelho..... | 42 |
| Tabela 2 - Medidas de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão das amostras à 25 °C..... | 48 |
| Tabela 3 - Caracterizações dos copolímeros sintetizados..... | 56 |
| Tabela 4 - Taxas de aquecimento e SAR obtidas das amostras com concentração de 15 mg ml ⁻¹ | 59 |
| Tabela 5 - Coeficientes de correlação e parâmetros das liberações, obtidos pelas equações dos modelos matemáticos. | 64 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 19 |
| 2.1 Nanopartículas magnéticas | 19 |
| 2.2 Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas | 20 |
| 2.3 Características magnéticas das nanopartículas | 22 |
| 2.4 Funcionalização da superfície das nanopartículas magnéticas | 24 |
| 2.5 Modificação da superfície das nanopartículas magnéticas com polímero termossensível | 26 |
| 2.6 Metotrexato | 28 |
| 3. OBJETIVOS | 31 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 32 |
| 4.1 Síntese das NP | 32 |
| 4.2 Funcionalização das np com o 3-mercaptopropil-trimetoxissilano (mpts) | 32 |
| 4.3 Copolimerização do P(NIPAAM-co-DMAAM) da superfície das NP@MPTS . 32 | |
| 4.4 Encapsulamento e liberação do metotrexato | 33 |
| 5. CARACTERIZAÇÕES | 35 |
| 5.1 Difração de raios X (DRX) | 35 |
| 5.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) | 35 |
| 5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) | 35 |
| 5.4 Diâmetro hidrodinâmico | 36 |
| 5.5 Diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura | 36 |
| 5.6 Potencial zeta | 36 |
| 5.7 Espectroscopia na região do UV-Vis | 36 |
| 5.8 Espectroscopia na região do UV-Vis em função da temperatura | 37 |
| 5.9 Análise termogravimétrica TGA | 37 |
| 5.10 Hipertermia magnética | 37 |
| 5.11 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) | 37 |
| 5.12 Cromatografia de permeação em gel (GPC) | 38 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 39 |

| | |
|--|----|
| 6.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas sintetizadas e funcionalizadas | 39 |
| 6.1.1 <u>Difração de raios X</u> | 39 |
| 6.1.2 <u>Espectroscopia na região do infravermelho</u> | 40 |
| 6.1.3 <u>Potencial zeta</u> | 42 |
| 6.1.4 <u>Microscopia eletrônica de transmissão</u> | 44 |
| 6.1.5 <u>Análise termogravimétrica</u> | 46 |
| 6.1.6 <u>Diâmetro hidrodinâmico</u> | 48 |
| 6.2 <u>Determinação da temperatura crítica de solução dos copolímeros sintetizados</u> .. | 49 |
| 6.2.1 <u>Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas em função da temperatura</u> | 49 |
| 6.2.2 <u>Espectroscopia na região do UV-Vis em função da temperatura</u> | 51 |
| 6.2.3 <u>¹H RMN</u> | 53 |
| 6.2.4 <u>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</u> | 54 |
| 6.3 Hipertermia magnética | 57 |
| 6.4 Encapsulamento e liberação do metotrexato | 60 |
| 6.5 Análise cinética da liberação | 63 |
| 7 CONCLUSÕES | 66 |
| PERSPECTIVAS | 67 |
| REFERÊNCIAS | 68 |

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 12,7 milhões de novos casos de câncer são diagnosticados a cada ano no mundo.¹ Estima-se que até 2030 haverá 13 milhões de mortes devido ao câncer, sendo 1 milhão dessas mortes na região da América Latina e do Caribe.¹

Atualmente, o câncer é um dos grandes desafios da medicina. É considerada uma doença difícil de ser tratada, devido a limitação de tratamentos disponíveis.² Os tratamentos usuais tais como, a quimioterapia, cirurgia e radioterapia são considerados efetivos quando a detecção do câncer é precoce², porém devido a não especificidade do fármaco ao tecido tumoral, esses tratamentos causam diversos efeitos colaterais ao paciente como, perda de cabelo, anemia, hemorragias, úlceras e etc.¹ Portanto, há um grande esforço sendo aplicado para o desenvolvimento de tratamentos alternativos, que possam diminuir os efeitos colaterais locais e sistêmicos nos pacientes.

As nanopartículas magnéticas (NP), devido às suas propriedades diferenciadas adquiridas em escala nanométrica, habilidade de funcionalização com biomoléculas de interesse, suscetibilidade ao campo magnético, biocompatibilidade, estabilidade e facilidade de serem sintetizadas², são materiais capazes de potencializar as aplicações biomédicas.³

Dentre os tratamentos alternativos utilizando nanopartículas magnéticas, destacam-se a liberação controlada do fármaco e a hipertermia magnética. Devido ao seu pequeno tamanho e à possibilidade de funcionalização da superfície, as nanopartículas são capazes de penetrar a parede celular, comportando-se como guia magnético na liberação controlada de fármaco e, na hipertermia magnética, atuam como melhores mediadores de calor.⁴

Na Figura 1 observa-se uma representação esquemática da liberação controlada de fármaco. As nanopartículas magnéticas são utilizadas como guia magnético, levando o fármaco no local onde se encontram as células cancerígenas. Ao serem internalizadas, os mecanismos de estímulos são ativados e o fármaco é liberado. Assim, a dose necessária do fármaco a ser utilizada pelo paciente é reduzida e, conseqüentemente, a concentração de fármaco entregue em células saudáveis diminui, minimizando os efeitos colaterais.⁵

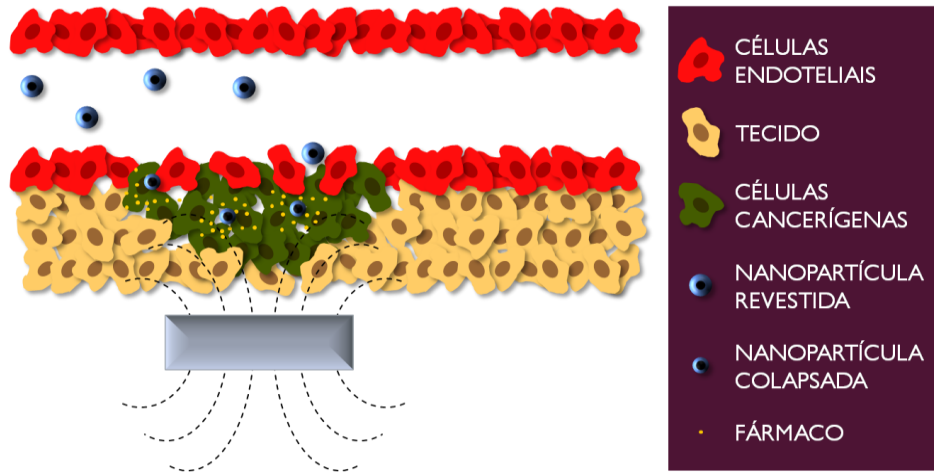


Figura 1 - Representação esquemática do mecanismo de liberação controlada de fármaco utilizando NP como guia magnético.

Fonte: autor

Na hipertermia magnética, as nanopartículas magnéticas são dispersas próximo ao tecido-alvo (Figura 2 A). Posteriormente, é aplicado um campo magnético estático externo, que induz a magnetização das nanopartículas e através da imagem por ressonância magnética localiza-se o local do tumor (Figura 2 B). Em seguida, é aplicado um campo magnético alternado com frequência elevada, que converte a energia magnética das nanopartículas em energia térmica (Figura 2 C). Esse aquecimento promove a apoptose de células tumorais.⁶

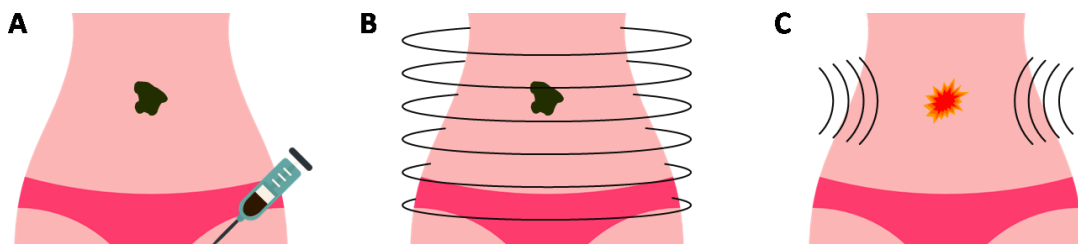


Figura 2 - Representação esquemática da hipertermia magnética utilizando NP como mediadores de calor.

Fonte: autor.

Porém, para que as nanopartículas magnéticas possam ser utilizadas em biomedicina, é necessário modificar sua superfície com moléculas específicas, as quais possibilitam tais aplicações e conferem maior biocompatibilidade às partículas.⁶

Tendo o exposto, a proposta desse trabalho foi desenvolver um nanossistema terapêutico multifuncional visando a aplicação simultânea de liberação controlada de fármaco e hipertermia magnética. Para isso, nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foram sintetizadas, funcionalizadas com o alcóxido 3-mercaptopropil-trimetoxissilano e copolimerizadas com o copolímero termossensível P(NIPAAm-co-DMAAm), para posterior encapsulamento do fármaco anticancerígeno metotrexato (MTX) (Figura 3).

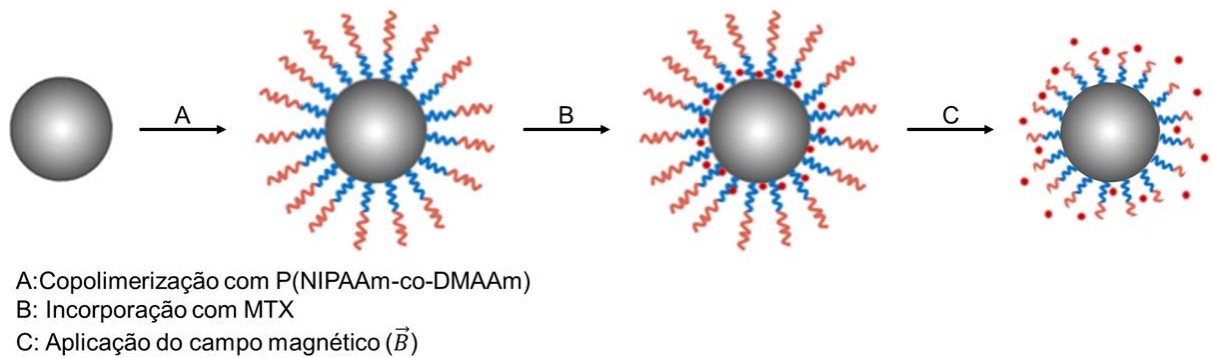


Figura 3 - Representação esquemática da proposta do presente trabalho.
Fonte: Adaptado de Louguet et al.⁷

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas (NP) são vastamente investigadas visando as aplicações biomédicas, particularmente o diagnóstico e o tratamento de câncer, tais como liberação controlada de fármaco, hipertermia magnética e imagem de ressonância magnética.^{2,8} O crescente desenvolvimento de nanopartículas é devido as suas propriedades ópticas, elétricas, magnéticas, de transporte e catalíticas, as quais são fortemente dependentes do tamanho das partículas que constituem o material, e que em escala nanométrica tornam-se diferenciadas e ajustáveis.⁹

Dentre os diversos tipos de nanopartículas magnéticas, as que mais se destacam em aplicações biomédicas são as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, mais especificamente a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), por serem relativamente fáceis de serem sintetizadas, biocompatíveis e estáveis quimicamente.^{6,8} Além disso, as nanopartículas magnéticas apresentam principais propriedades tais como, formação de monodomínios magnéticos, existência de grande área de superfície em relação ao seu volume e a possibilidade de recobri-las com ligantes específicos.^{6,10}

Dentre os diversos métodos que podem ser utilizados na fabricação de nanopartículas, como por exemplo, microemulsão água em óleo¹¹, moagem e mecânica¹², sonoquímico¹³, sol-gel¹⁴ e etc., destaca-se o método de coprecipitação¹⁵ devido as suas inúmeras vantagens: homogeneidade química, baixas temperaturas de síntese e reação, partículas de tamanhos reduzidos e uniformes, com pouca aglomeração, produção de baixo custo, economia de tempo e fácil produção em grande escala.^{15,16}

Devido as propriedades citadas anteriormente, as nanopartículas magnéticas são materiais capazes de potenciar a liberação controlada de fármaco, a hipertermia magnética e imagem por ressonância magnética.²

2.2 Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas podem ser funcionalizadas com biomoléculas, como proteínas e anticorpos, a fim de aumentar a seletividade ao tipo de câncer e aumentar a internalização das NP dentro das células cancerígenas. O potencial das NP no tratamento do câncer é evidente, entretanto, pode ser melhorado se desenvolvido um sistema com funções terapêuticas multifuncionais, como por exemplo a combinação da hipertermia magnética e dispositivos de liberação controlada de fármaco.^{4,6}

Os sistemas de liberação controlada apresentam diversas vantagens quando comparados com a quimioterapia padrão, a qual não consegue diferenciar as células cancerígenas das células saudáveis causando fortes danos nestas células durante o tratamento. Utilizando nanopartículas magnéticas carregadas com o fármaco de interesse e com o auxílio de um campo magnético externo, é possível liberar o fármaco no local específico onde se encontram as células cancerígenas, reduzindo a dose necessária do fármaco a ser utilizado pelo paciente e conseqüentemente, diminuindo a concentração de fármaco entregue em células saudáveis. Logo, os efeitos colaterais nos pacientes são minimizados.^{5,6}

A hipertermia é um fenômeno conhecido pelo aumento da temperatura do corpo acima da temperatura normal.⁶ Pode ser utilizada como tratamento médico, sendo nomeado como terapia de hipertermia ou termoterapia, na qual o tecido do corpo é exposto a altas temperaturas com a finalidade de danificar e/ou destruir as células cancerígenas¹⁷, além de tornar essas células mais sensíveis aos efeitos radioativos e/ou certos tipos de fármacos.^{18,19}

A técnica de hipertermia local utilizando nanopartículas magnéticas como mediadores de calor, consiste na injeção de uma suspensão coloidal contendo as NP próximo ao tumor, seguida da aplicação de um campo magnético externo alternado (AMF), o qual leva ao aquecimento das NP provocando a apoptose de células cancerígenas.^{6,17}

A apoptose celular, também conhecida como morte celular programada, é um processo no qual as células em tecidos normais desencadeiam sua auto destruição em resposta a um sinal.²⁰ A apoptose também ocorre espontaneamente em células cancerígenas, retardando o crescimento do tumor, porém ela pode ser

potencializada quando estimulada por calor, irradiação e fármacos anticancerígenos.⁶

Sabe-se que as células cancerígenas apresentam grande sensibilidade à hipertermia quando comparadas às células saudáveis.⁶ Tecidos saudáveis são capazes de resistir a temperaturas até 42-45 °C, ao contrário das células cancerígenas, que provocam a apoptose celular nessas mesmas temperaturas.^{6,21} Esse efeito seletivo da hipertermia é devido à diferença fisiológica entre as células cancerígenas e as células dos tecidos normais.²¹

Vários estudos vêm sendo realizados para demonstrar a eficiência da combinação da liberação controlada de fármaco com a hipertermia magnética. Ensaio clínicos realizados já mostraram que o efeito sinérgico da combinação dessas terapias é efetivo.¹⁹ Diversos mecanismos estão envolvidos nessa combinação, tais como o aumento da captação de fármacos anticancerígenos dentro das células cancerígenas e o aumento da citotoxicidade do fármaco, os quais fazem com que a sensibilidade dessas células aos fármacos utilizados aumente.²²

Durante a hipertermia magnética, o fluxo sanguíneo e o tamanho do poro do vaso sanguíneo do tumor aumentam, resultando no aumento da concentração do fármaco na região do câncer. Este fenômeno permite que o fármaco seja internalizado na célula tumoral, causando maiores danos durante a replicação do DNA⁶. Figura 4.

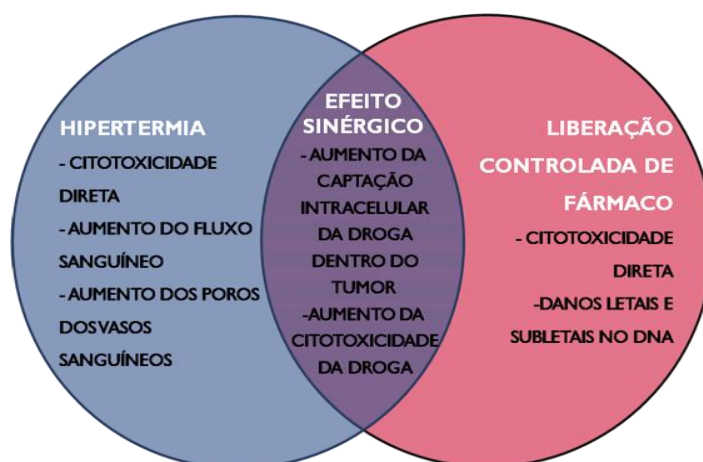


Figura 4 - Mecanismos responsáveis pelo efeito sinérgico da combinação das terapias.
Fonte: Adaptado de Hervault et al.²²

Sabendo-se das vantagens do efeito sinérgico na combinação do tratamento termo-quimioterápico, as nanopartículas magnéticas contendo fármacos anticancerígenos são, tanto para a hipertermia quanto para a liberação controlada de fármaco, candidatas promissoras para o tratamento do câncer.⁶

2.3 Características magnéticas das nanopartículas

Os materiais sintetizados no presente trabalho são óxidos de ferro que, inicialmente, são classificados como materiais ferrimagnéticos. Quando esses materiais são expostos a um campo magnético externo, seus domínios magnéticos tendem a se orientar na mesma direção que o campo magnético aplicado.⁶ A saturação magnética é alcançada assim que cada momento de cada domínio é alinhado para essa direção. Quando o campo é removido, a magnetização não volta a ser zero, resultando em uma magnetização remanente (M_r). Para que a magnetização volte a ser nula, é necessário aplicar um campo magnético preciso, que é conhecido como campo coercivo (H_c). A curva de magnetização de um material ferrimagnético é representado pelo ciclo de histerese (Figura 5).⁶

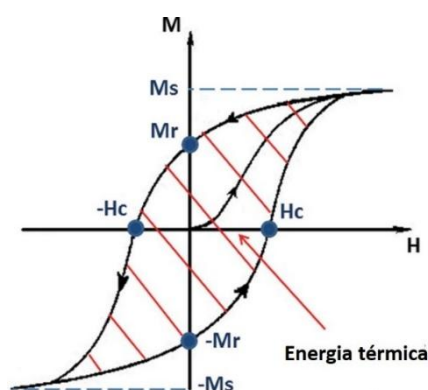


Figura 5 - Ilustração da curva de histerese magnética de um material ferrimagnético.
Fonte: Adaptado de Hervault et al.⁶

Quando a nanopartícula é reduzida a um diâmetro crítico de aproximadamente 20 nm, o comportamento dessa partícula passa de ferrimagnético para superparamagnético. Assim, o domínio magnético é reduzido modificando a estrutura e a largura das paredes que delimitam os domínios e como consequência

dessas modificações, a energia para a formação de multidomínios aumenta tornando-se favorável a formação de um único monodomínio nas nanopartículas, como ilustrado na Figura 6.^{5,23}

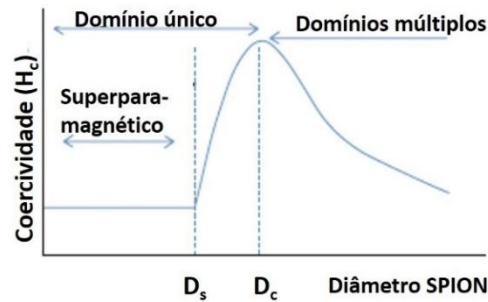


Figura 6 - Relação entre o diâmetro das SPION e a estrutura dos domínios magnéticos, D_s é o diâmetro “superparamagnético” e D_c é o diâmetro crítico.
Fonte: Adaptado de Dave et al.²³

Assim, após a aplicação de um campo magnético externo, as nanopartículas superparamagnéticas (SPION) não apresentam uma curva de histerese, os momentos magnéticos atômicos alinham-se paralelamente numa só direção e a magnetização residual (M_r) e o campo coercivo (H_c) são nulos, como ilustrado na Figura 7.⁶

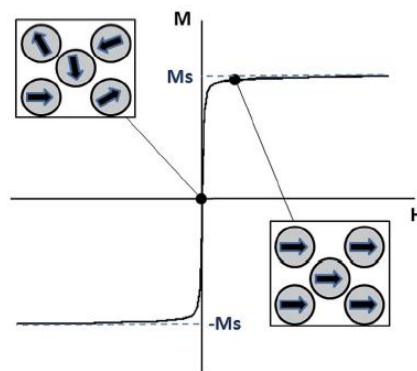


Figura 7 - Curva de histerese de um material superparamagnético.
Fonte: Hervault et al.⁶

Em relação a hipertermia magnética, a dissipação de calor das nanopartículas superparamagnéticas ocorre por dois tipos de relaxamento: o de Néel e o

Browniano.⁴ Os mecanismos de relaxamento são dependentes do tamanho das nanopartículas e também do material que as constituem. O relaxamento de Néel ocorre devido a reorientação do momento magnético das nanopartículas, na mesma direção do campo magnético externo aplicado.

A equação que calcula o tempo de relaxamento de Néel é apresentada abaixo:

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

No qual $\tau_o = 10^{-9}$ s, K é a constante anisotrópica, V é o volume da partícula magnética, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura. O relaxamento de Néel, como pode ser observado na equação, é extremamente dependente do tamanho da partícula.⁶

O relaxamento Browniano, é causado pelo atrito resultante da rotação da própria partícula no líquido de transporte. O tempo de relaxamento Browniano é calculado pela seguinte equação:

$$\tau_B = \left(\frac{3\eta V_H}{K_B T}\right)$$

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 rotação das partículas.⁶

Nanopartículas superparamagnéticas, apresentam interessantes vantagens que as tornam mais adequadas para diagnósticos e terapias, pois essas partículas não apresentam magnetização remanente quando o campo magnético é removido, prevenindo assim a formação de agregados que poderiam causar emboliação dos vasos capilares.^{6,24}

2.4 Funcionalização da superfície das nanopartículas magnéticas

Para utilizar as NP em aplicações biomédicas, as propriedades do material tais como, magnetização, tamanho, estabilidade coloidal e funcionalização da

superfície são parâmetros que devem ser mantidos sob controle.⁴ Modificações químicas na superfície das nanopartículas, com moléculas e íons específicos, peptídeos, vitaminas, antibióticos e etc., são necessárias para que as NP sejam utilizadas em aplicações biomédicas, pois as tornam mais seletivas para a terapia de interesse.^{4,25} Geralmente, as biomoléculas não reagem com as superfícies das NP, tornando-se necessária uma alteração na superfície das NP para a conjugação com as biomoléculas.²⁶

Os alcoxisilanos são conhecidos como agentes de acoplamento, pois permitem melhorias de união de compostos inorgânicos com orgânicos, devido a sua biofuncionalidade.²⁷ Os alcoxisilanos ligam-se a óxidos de ferro por meio de reações de hidrólise e condensação de seus grupos alcóxidos.²⁸ Seu grupo terminal não hidrolisável possibilita a ancoragem de fármacos ou a formação de ligações cruzadas (cross-link) entre substratos e polímeros orgânicos.^{28,29}

O alcoxisilano escolhido para realizar a funcionalização das NP neste trabalho foi o 3-mercaptopropil-trimetoxisilano (MPTS), um organosilano comumente utilizado na introdução de funções orgânicas à superfície das nanopartículas.³⁰ A estrutura do MPTS apresenta um grupo tiol (-SH), um grupo propil como espaçador, além de três partes hidrolisáveis $\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$, como pode ser observado na Figura 8.

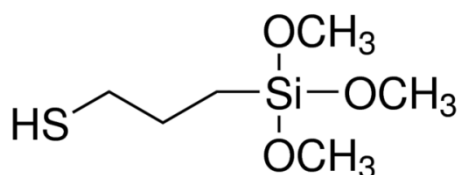


Figura 8 - Estrutura molecular do MPTS.

Fonte: Williams et al.³¹

Na superfície das NP ocorrem ligações Si-O-Fe de modo que estas apresentam grupos tiol em sua superfície, como pode ser observado na Figura 9. Tais grupos, apresentam caráter eletrofílico, ou seja, apresentam maior afinidade por elétrons.³² Portanto, partículas funcionalizadas com MPTS tendem a apresentar cargas negativas na sua superfície.^{32,33}

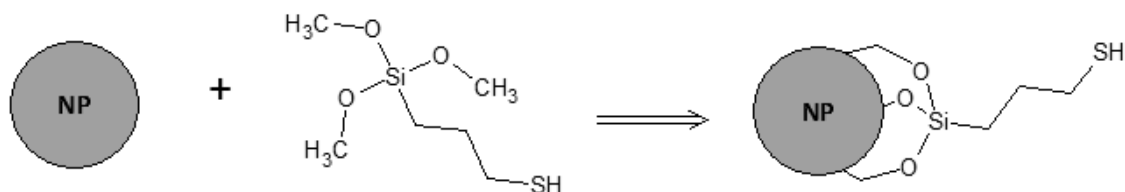


Figura 9 - Reação do alcóxissilano MPTS na superfície das nanopartículas magnéticas.

Fonte: autor.

2.5 Modificação da superfície das nanopartículas magnéticas com polímeros termossensíveis

A biofuncionalização da superfície das nanopartículas, pode ser explorada para ajustar recursos tais como, a proteção das nanopartículas, aumento da sua estabilidade e tempo de permanência na corrente sanguínea e a especificidade das nanopartículas para células tumorais.^{34,35}

Polímeros inteligentes são polímeros capazes de modificar sua estrutura, mediante variações externas do ambiente em que se encontram, como temperatura, pH, força iônica, campo magnético.³⁶ Essas modificações permitem seu uso em diversas aplicações biomédicas tais como na liberação controlada de fármacos, na terapia genética e na engenharia de tecidos.³⁵⁻³⁷

Dentre os polímeros inteligentes, os polímeros termossensíveis que apresentam baixa temperatura crítica de solução (LCST), são os mais estudados para a liberação controlada de fármaco, uma vez que são capazes de liberar o fármaco com uma taxa controlada e em uma região específica, mediante o aumento da temperatura.³⁸ Os polímeros termossensíveis apresentam como principal característica a presença de grupos hidrofóbicos tais como, metil, etil e propil.³⁸

O polímero N-isopropilacrilamida (PNIPAAm) destaca-se entre os polímeros termossensíveis, pois é potencialmente viável para aplicações na área de biomateriais devido a sua insolubilidade em água quando aquecido, podendo assim ser utilizado no carreamento de fármacos.^{36,39} O PNIPAAm é solúvel em água abaixo da sua LCST entre 30-35 °C (próximo a temperatura do corpo humano 37 °C), com predominância de interações hidrofílicas provenientes das ligações de hidrogênio do polímero com as águas nas vizinhanças.³⁹ Em temperaturas abaixo da LCST, as ligações de hidrogênio dos grupos hidrofílicos da cadeia do polímero com as

moléculas de água são dominantes, resultando assim, em uma solubilidade maior em água. Com o aumento da temperatura, as interações hidrofóbicas tornam-se mais evidentes, enquanto que as ligações de hidrogênio entre o polímero e o solvente tornam-se mais fracas.³⁸⁻⁴⁰ Como resultado, as cadeias do polímero colapsam abruptamente para um glóbulo hidrofóbico, expulsando moléculas de água da sua estrutura.^{6,36,40} Esse comportamento está esquematizado na Figura 10.

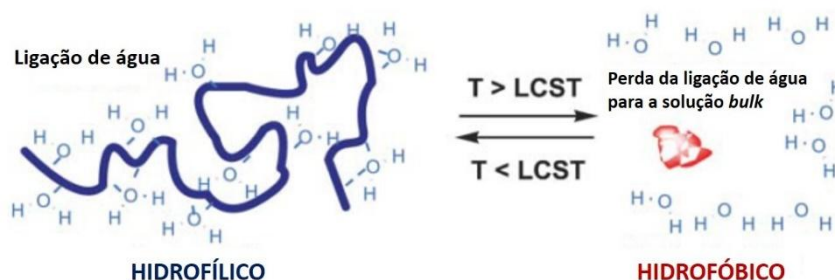


Figura 10 - Representação esquemática de polímero termossensível.
Fonte: Adaptado de Las Heras Alarcon et al.³⁶

Através da copolimerização do PNIPAAm com o monômero hidrofílico N-N dimetilacrilamida (DMAAm), a LCST pode ser ajustada para uma temperatura superior à temperatura do corpo (37 °C) afim de torná-lo atrativo para a liberação controlada de fármacos.³⁷ O aumento da LCST é desejado, pois é necessário que o fármaco não seja liberado na temperatura fisiológica durante seu transporte até a célula-alvo, sendo sua liberação realizada mediante aquecimento externo do polímero.⁴¹

A representação do mecanismo proposto de copolimerização na superfície das nanopartículas está representado na Figura 11.

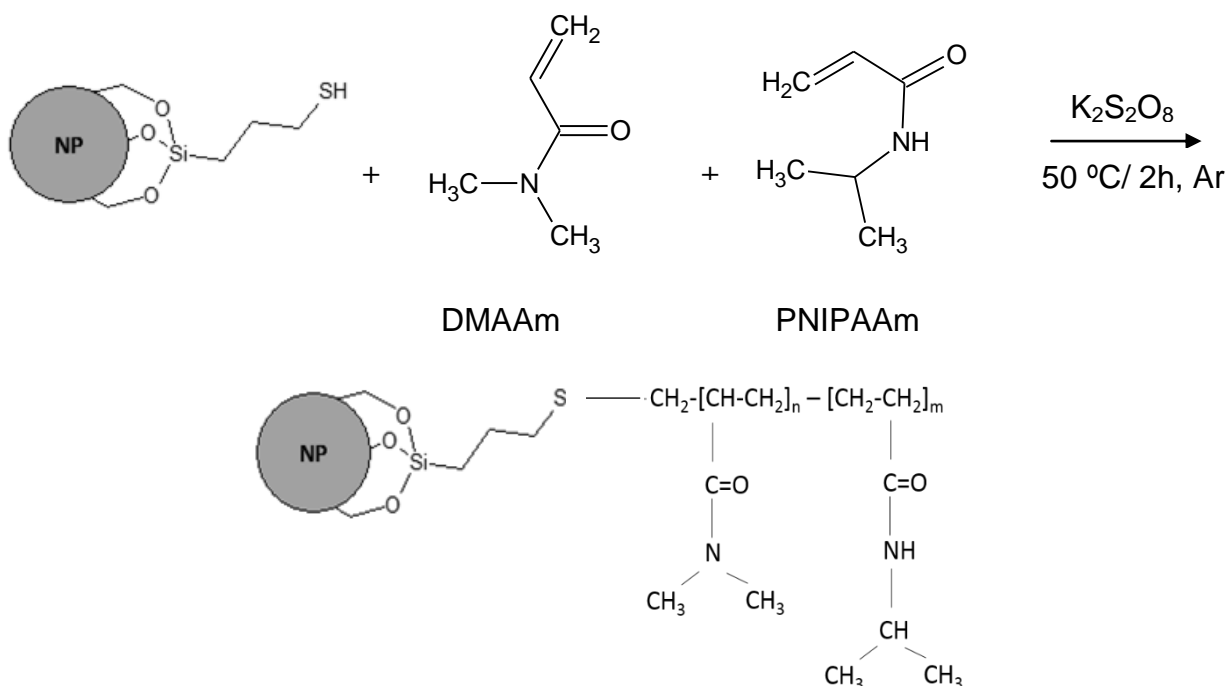


Figura 11 - Proposta de mecanismo de reação entre as nanopartículas magnéticas funcionalizadas com MPTS e o copolímero termossensível.

Fonte: autor.

2.6 Metotrexato

O metotrexato (MTX), é um fármaco muito utilizado no tratamento de tumores sólidos, leucemia e, recentemente, como agente imunossupressor em transplantes de órgãos e no tratamento de doenças auto-imunes como reumatismo.⁴²

Devido a sua alta polaridade, o MTX atravessa a membrana celular com dificuldade. Em pH neutro do sistema fisiológico encontra-se principalmente como espécie aniônica e, por isso é transportado para dentro das células através de um sistema de transporte específico.⁴²

Sabe-se que os receptores folatos são extremamente expressos na membrana de células cancerígenas.^{43,44} O metotrexato, é um fármaco quimioterápico semelhante ao ácido fólico, suas características de marcação são similares, com efeito terapêutico em muitas células cancerígenas.⁴⁴ Figura 12.

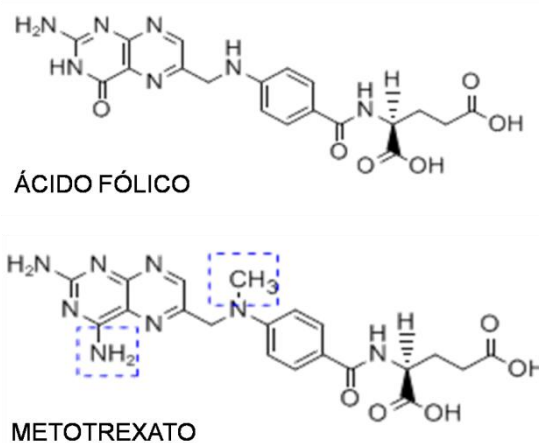


Figura 12 - Estruturas moleculares do ácido fólico e do metotrexato.
Fonte: Adaptado de Rubino et al.⁴²

Sendo assim, os receptores folatos carregam o MTX para dentro do citoplasma celular e o MTX por sua vez interrompe o metabolismo celular do ácido fólico pela inibição da sua enzima, a diidrofolato redutase (DHFR), como observado na Figura 13.^{43,44}

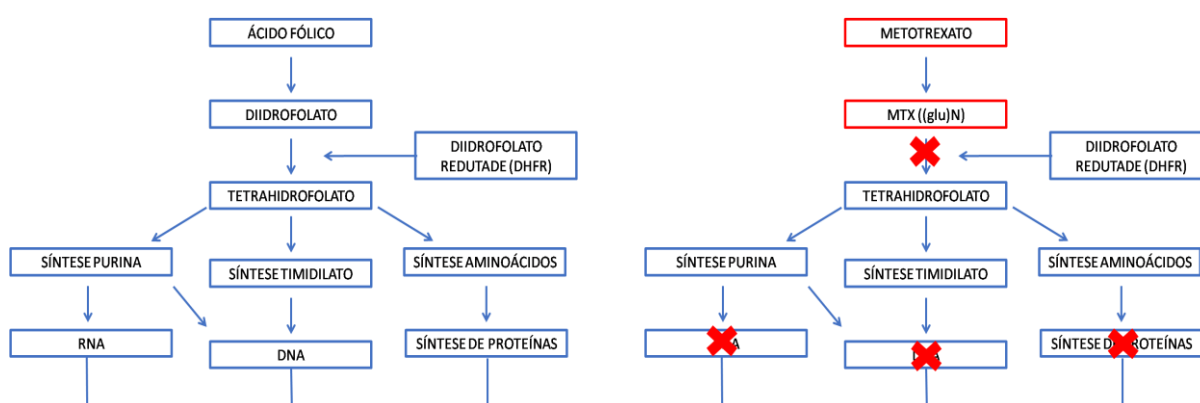


Figura 13 - **A)** Representação esquemática do metabolismo celular do ácido fólico. **B)** Mecanismo de ação do fármaco MTX.
Fonte: adaptado de Chan et al.⁴³

Esta inibição causa a falta de folatos na forma reduzida, os quais são doadores de uma unidade de carbono para a biossíntese dos ácidos nucleicos e alguns aminoácidos, tais como purinas, pirimidinas e poliaminas.^{44,45} Portanto, a utilização do MTX faz com que as células cancerígenas se tornem carentes de precursores dos aminoácidos purina e pirimidina, os quais são requeridos na síntese do DNA, resultando assim na incapacidade dessas células de sintetizarem DNA e RNA, reduzindo a divisão celular das células cancerígenas.^{45,46}

Porém, o MTX pode causar um grande número de efeitos colaterais, como: hepatotoxicidade, náuseas, distensão abdominal entre outros⁴⁸, se administrado em doses elevadas e se exposto por períodos longos no corpo humano.^{47,46} Devido a esses possíveis efeitos colaterais e a dificuldade do fármaco de penetrar as barreiras biológicas, torna-se necessário e vantajoso a sua incorporação em sistemas de liberação de fármacos, como exemplo em nanopartículas magnéticas.⁴⁹

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral a síntese, funcionalização e copolimerização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com copolímeros termossensíveis, para liberação controlada de fármaco e hipertermia magnética.

Os objetivos específicos são:

- Sintetizar nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION) através do método de coprecipitação sonoquimicamente assistida;
- Funcionalizar a superfície das SPION com o alcoxisilano 3-mercaptopropil – trimetoxisilano (MPTS);
- Modificar a superfície das nanopartículas magnéticas funcionalizadas com o copolímero termossensível;
- Encapsular o fármaco anticancerígeno metotrexato no nanosistema;
- Realizar a liberação controlada do fármaco;
- Realizar medidas de magnetotermia;
- Caracterizar as nanopartículas e os copolímeros sintetizados por FTIR, DRX, TG, DLS, Uv-vis, MET.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese das nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas foram obtidas pelo método de coprecipitação. Em um béquer adicionou-se uma solução de sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} , proporção de 1:2, e adicionou-se NaOH 1 mol L^{-1} , obtendo-se um precipitado preto, característico da magnetita. A reação foi sonoquimicamente assistida por 50 min à $80 \text{ }^\circ\text{C}$.¹⁶

Posteriormente, as SPION obtidas foram separadas magneticamente e lavadas diversas vezes com água destilada. A amostra obtida foi nomeada como NP.

4.2 Funcionalização das nanopartículas magnéticas com o 3-mercaptopropil-trimetoxisilano (MPTS)

Após a síntese das NP, a suspensão obtida foi funcionalizada com o MPTS, conforme descrito por Kraus et al.⁵⁰ Dispersou-se 1 g de NP em 50 mL de água destilada, com auxílio de ultrassom. Em seguida, adicionou-se 0,25 mL de MPTS à solução que foi aquecida à $90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 h sob atmosfera de nitrogênio e agitação mecânica constante. As nanopartículas obtidas foram separadas do solvente com ajuda de um ímã e lavadas diversas vezes com água destilada. A amostra obtida foi nomeada como NP@MPTS.

4.3 Copolimerização do P(NIPAAm-co-DMAAm) na superfície das NP@MPTS

A copolimerização na superfície das nanopartículas foi realizada pelo método similar ao descrito por Yeh et al.³⁹, alterando apenas as concentrações do monômero N,N-dimetilacrilamida (DMAAm) a fim de estudar a influência da quantidade de DMAAm na temperatura de transição do copolímero P(NIPAAm-co-DMAAm).

Duas soluções foram preparadas, obtendo-se as amostras: NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm5 com razão molar PNIPAAm/DMAAm igual a 5 e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 com razão PNIPAAm/DMAAm igual a 3.

Adicionou-se respectivamente, 103 μ L e 160 μ L de DMAAm, 0,6 g de PNIPAAm, e 0,1 g de NP@MPTS em 40 mL de água destilada. Os monômeros foram adicionados em um béquer com água destilada, a solução foi aquecida à 50 °C e adicionou-se 0,03 g de persulfato de potássio dissolvido em 10 ml de água destilada, para início da copolimerização. A copolimerização ocorreu por 1 h e então adicionou-se a amostra NP@MPTS, a reação ocorreu por mais 1 h sob atmosfera de nitrogênio e agitação constante. As nanopartículas obtidas foram separadas do solvente com ajuda de um ímã, foram lavadas diversas vezes com água destilada para retirar o excesso de copolímeros. O primeiro sobrenadante da lavagem foi dialisado em água destilada e liofilizado para realização de posteriores caracterizações.

4.4 Encapsulamento e liberação do metotrexato

O encapsulamento de metotrexato na amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 obtida no item anterior, foi realizado pelo seguinte procedimento: 10 mg da amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 foi suspensa em 1,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 e posteriormente aquecido a 45 °C. Em seguida, 1 mg de metotrexato foi adicionado à solução e esta foi agitada constantemente por 4 horas a 45 °C. Por fim, ajustou-se rapidamente a temperatura da solução, colocando-a em banho de gelo pernoite, como ilustrada na Figura 14.

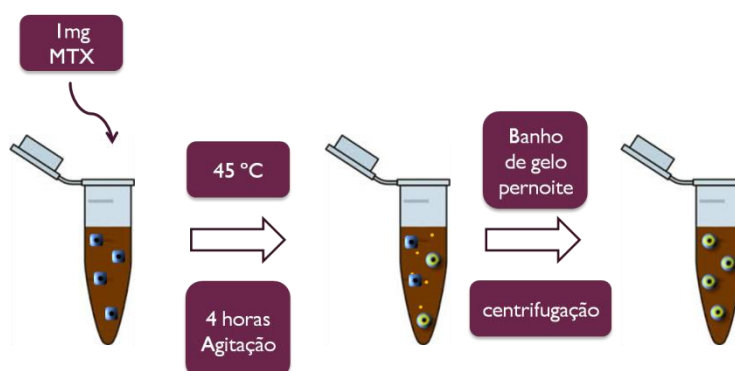


Figura 14 - Representação esquemática do encapsulamento do MTX.
Fonte: autor.

Após esse período, as partículas foram centrifugadas e o sobrenadante com excesso de fármaco que não foi encapsulado nas nanopartículas, foi quantificado por espectroscopia na região do UV-Vis considerando a lei de Lambert-Beer:

$$A = ab[x]$$

Onde a absorção A é proporcional à concentração $[x]$, a é a absorvidade molar e b é o caminho ótico.

A amostra centrifugada foi novamente suspensa em 1,5 ml de tampão fosfato e colocada em uma membrana de diálise (Molecular weightcut-off 6 KDa) e, posteriormente dialisada contra 15 mL de tampão fosfato com agitação e temperatura constantes. Dois experimentos foram realizados, um a 45 °C e outro a 37 °C. Em intervalos de tempo regulares, alíquotas de 1,5 mL foram retiradas do sistema para análise no UV-Vis e posteriormente, 1,5 mL de tampão fosfato foi adicionado novamente ao meio (Figura 15).

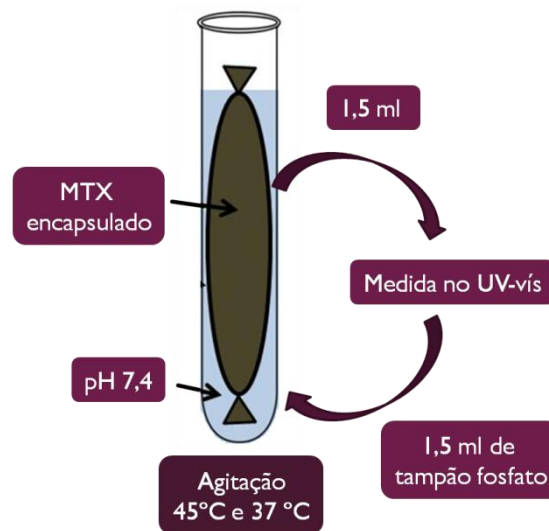


Figura 15 - Representação esquemática do ensaio de liberação de MTX.
Fonte: autor.

5 CARACTERIZAÇÕES

5.1 Difração de raios X (DRX)

O difratograma de raios X foi obtido em um equipamento DIFFRAC PLUS XRD Commande, marca SIEMENS modelo D5000, com radiação Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), nas seguintes condições de trabalho: voltagem 40 KV, corrente 40 mA, velocidade de varredura de $0,2^\circ \text{ min}^{-1}$. A amostra NP foi seca, macerada e posteriormente colocada em porta amostra de alumínio.

5.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um equipamento espectrômetro Perkin Elmer FT-IR Frontier. As amostras NP, NP@MPTS e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 foram secas, maceradas e diluídas em KBr. Os espectros foram obtidos com 128 varreduras entre o intervalo 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As microscopias eletrônicas de transmissão foram realizadas no laboratório de Caracterização Estrutural DEMa – UFSCar, em um microscópio eletrônico analítico de transmissão FEI TECNAI G² F20 HRTEM operado a 200 KV. As amostras NP@MPTS e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 foram dispersas em isopropananol e uma gota da dispersão foi depositada sobre uma grade de cobre revestida com membrana de carbono amorfo. A grade de cobre contendo a amostra foi seca em ar por 24 horas.

Utilizou-se o programa ImageJ® para estimar o tamanho médio das NP sintetizadas. Sendo assim, um círculo sobre cada nanopartícula foi feito, de maneira que o círculo tivesse a mesma área da partícula, sendo o diâmetro desse círculo determinado como o tamanho da NP. Para obter-se a média do tamanho das NP, 100 nanopartículas foram medidas.

5.4 Diâmetro hidrodinâmico

As medidas de diâmetro hidrodinâmico (D_h) e do índice de polidispersão (PDI) das amostras NP, NP@MPTS, NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm5, foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS marca Malvern pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), com ângulo de dispersão fixo de 173° em relação à luz incidente e usando o laser de He-Ne como fonte de luz. As amostras foram dispersas em água destilada com ajuda de uma ponteira ultrassônica a 25°C .

5.5 Diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura

Medidas de diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS, marca Malvern. As amostras NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm5 foram dispersas em água destilada com auxílio de uma ponteira ultrassônica e medidas do diâmetro hidrodinâmico foram realizadas na faixa de temperatura de 25 à 50°C .

5.6 Potencial zeta

O potencial zeta foi determinado no aparelho Zetasizer Nano ZS, marca Malvern. As amostras NP, NP@MPTS e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 foram dispersas em solução de NaCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$ e as medidas foram realizadas na faixa de pH de 2 a 10, em temperatura ambiente.

5.7 Espectroscopia na região do Uv-vis

O estudo de incorporação e liberação de fármaco foi realizado em espectrofotômetro UV-Vis da marca Perkim Elmer, modelo Lambda 465. As medidas foram realizadas no comprimento de onda 303 nm , característico da absorção do metotrexato.

5.8 Espectroscopia na região do UV-Vis em função da temperatura

As temperaturas críticas de solução (LCST) podem ser definidas mediante análise de turbidimetria, utilizando-se medidas na região do UV-Vis em função da temperatura para determinar em qual temperatura ocorre o decréscimo de mais da metade da transmitância. A LCST dos copolímeros P(NIPAAm-co-DMAAm) de razão 3 e 5 foram determinadas através de medidas na região do Uv-vis em função da temperatura, no comprimento de onda 500 nm e na faixa de temperatura de 25 a 50 °C. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis da marca Perkin Elmer, modelo Lambda 465.

5.9 Análise termogravimétrica TGA

As análises térmicas das amostras NP@MPTS, NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm5 foram realizadas em equipamento METTLER TOLEDO SC Stare System, atmosfera de ar sintético com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ de 30 a 800 °C.

5.10 Hipertermia magnética

As medidas foram realizadas no equipamento Nanoscale Biomagnetics modelo DM 1000. As amostras NP@MPTS e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3, com concentração de 15 mg mL⁻¹ foram colocadas no centro da bobina onde encontra-se o campo magnético externo, o qual foi utilizado em uma frequência de 420 kHz e amplitude 14 kA m⁻¹, a temperatura foi medida através de uma fibra ótica imersa dentro da solução.

5.11 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em um equipamento espectrômetro Bruker Fourier 300, o qual analisa os núcleos de ¹H e ¹³C de amostras em solução. As amostras de copolímeros P(NIPAAm-co-DMAAm3) e P(NIPAAm-co-DMAAm5) foram dialisadas, liofilizadas e posteriormente

dissolvidas em água deuterada. Uma vez solubilizadas, as amostras foram filtradas e transferidas para tubos de RMN.

5.12 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A cromatografia de permeação em gel foi realizado no equipamento Malvern VISCOTEK GPCmax. As amostras de copolímeros P(NIPAAm-co-DMAAm3) e P(NIPAAm-co-DMAAm5) foram dialisadas, liofilizadas e posteriormente dissolvidas em água destilada. Uma vez solubilizadas, as amostras foram filtradas e transferidas para tubos vial. A fase estacionária utilizada foi a coluna SB-806M HQ e o solvente utilizado como fase móvel, foi uma solução aquosa de NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, o volume injetado foi de $100 \mu\text{L}$, com vazão de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas sintetizadas e funcionalizadas

6.1.1 Difração de raios X

Na Figura 16, está apresentado o difratograma de raios X da amostra NP obtida e o padrão de difração de raios X da magnetita, obtida no banco de dados de estruturas cristalinas (JCPDS-88-315). Observa-se que os picos de difração de raios X em $30,2^\circ$, $35,7^\circ$, $43,4^\circ$, $57,2^\circ$ e $63,4^\circ$ que são atribuídos respectivamente aos planos cristalinos característicos da magnetita (220), (311), (400), (422), (511) e (440) estão presentes na amostra, indicando assim a formação de magnetita através da síntese realizada neste trabalho.¹⁶

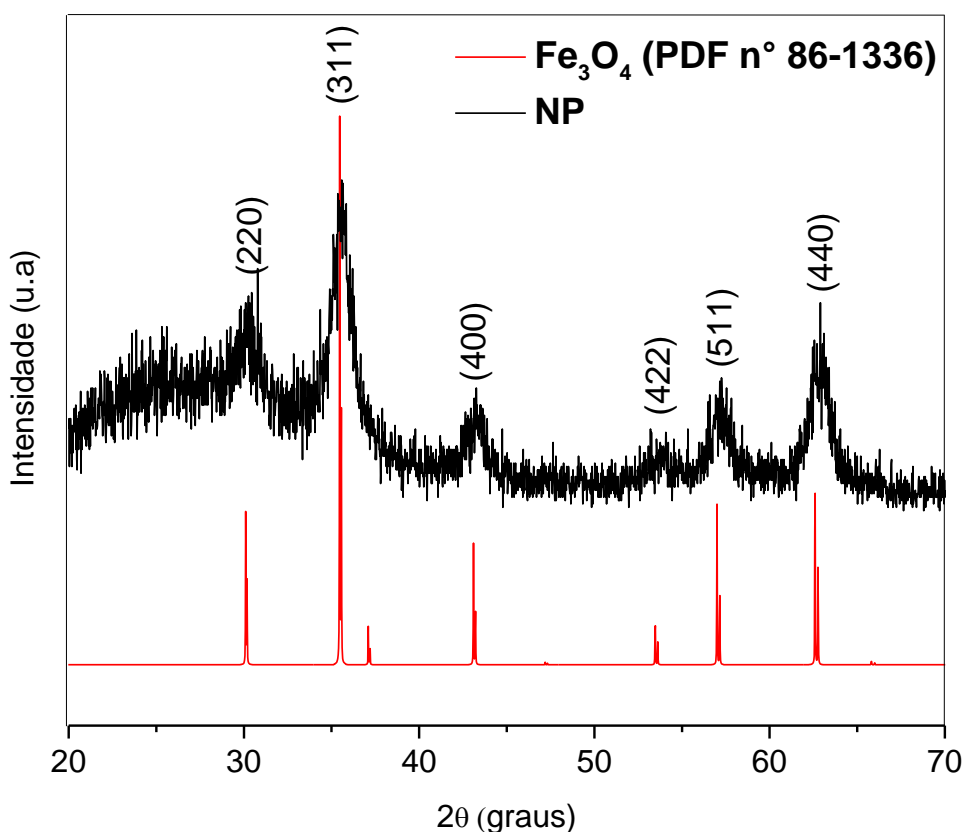


Figura 16 - Difratograma de raios X das NP obtido e do padrão de difração de raios – X da fase magnetita.

Fonte: autor.

O tamanho médio dos domínios cristalinos das nanopartículas pode ser calculado através da equação de Scherer's:

$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad \text{Equação 1}$$

A equação relaciona o comprimento de onda da radiação eletromagnética (λ), com a largura na metade da altura do pico de difração (β) e o ângulo de difração (θ). K é uma constante relacionada à forma das partículas, para partículas esféricas K é igual a 0,94.⁵¹ Utilizando-se a equação acima, obteve-se o tamanho médio do cristalito das nanopartículas de aproximadamente 7 nm. Logo, observa-se que nanopartículas com dimensões superparamagnéticas foram obtidas.^{5,23}

6.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho

Na Figura 17, estão ilustrados os espectros na região do infravermelho das amostras SPION, NP@MPTS e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3.

A magnetita é caracterizada por duas fortes bandas de absorção na região entre 600 e 440 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação Fe-O, e as bandas referentes aos grupos OH na superfície das NP, encontram-se na região em 3400 cm^{-1} , como pode-se observar no espectro da amostra SPION.⁵²

A funcionalização da superfície das nanopartículas com o alcóxissilano MPTS pode ser verificada observando o espectro na região do infravermelho da amostra NP@MPTS. As bandas na amostra funcionalizada com MPTS na região em 1115 e 1032 cm^{-1} correspondem às ligações Fe-O-Si e Si-O, respectivamente e as bandas em 2916 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} , correspondem ao estiramento da ligação C-H presente no grupo propil do MPTS.⁵³ Uma banda fraca aparece em 682 cm^{-1} , referente a ligação C-S presente na molécula.³⁹ Esses resultados comprovam a funcionalização com o alcóxissilano.^{49,54}

As bandas observadas em 3500 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} encontradas na amostra NP@MPTS são referentes, respectivamente, ao estiramento dos grupos -OH e às ligações H-O-H, sugerindo a presença de água adsorvida na superfície das nanopartículas.

Analisando-se o espectro na região do infravermelho da amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3, é possível observar a presença de amidas secundária e terciária, presentes na estrutura do copolímero P(NIPAAm-co-DMAAm), na região entre 1650 e 1550 cm^{-1} , respectivamente.⁵⁵ A banda entre 3420 e 3283 cm^{-1} refere-se à vibração da ligação N-H.⁵⁵ Também é observada uma banda dupla com maior intensidade entre 2800 e 3000 cm^{-1} , referentes ao estiramento das ligações C-H.⁵⁶ Vale ressaltar um pequeno aumento na intensidade da banda em 682 cm^{-1} , referente a ligação C-S entre o alcóxido e o copolímero.

Com os resultados apresentados, pode-se confirmar que a copolimerização na superfície das nanopartículas foi obtida com sucesso.^{39,56}

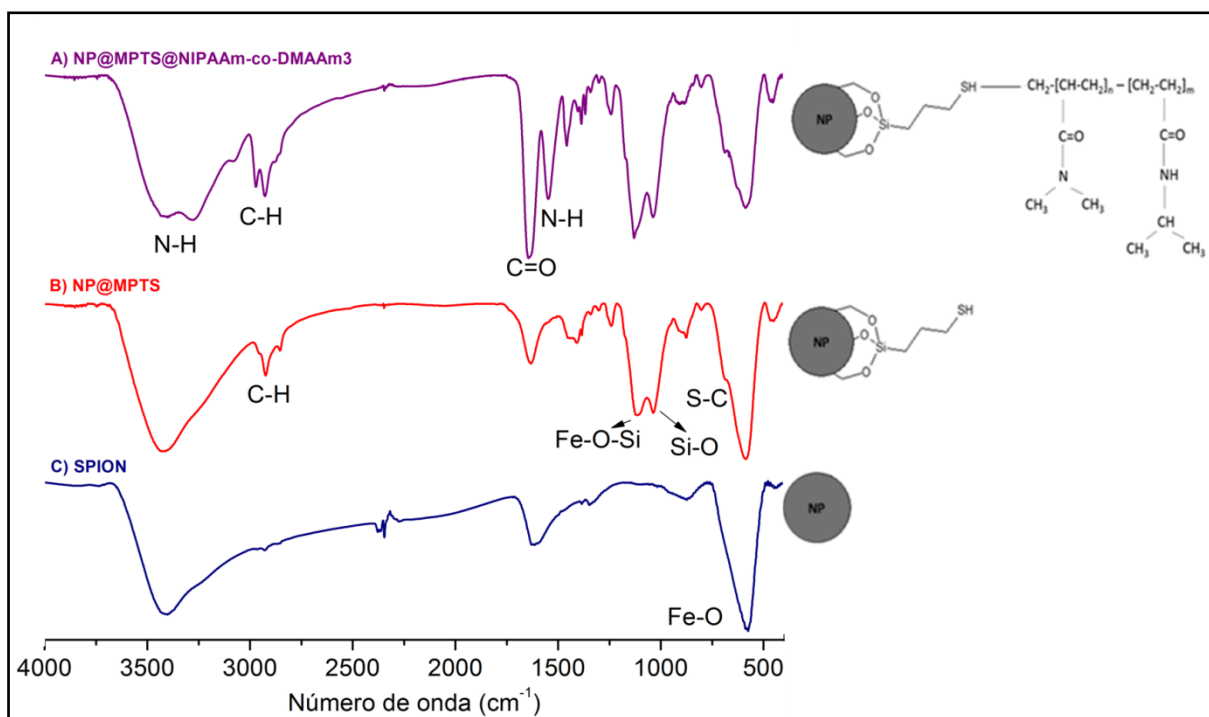


Figura 17 - Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras A) NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3, B) NP@MPTS e C) SPION.

Fonte: autor.

Na tabela abaixo encontram-se as atribuições das principais bandas nos espectros de absorção na região do infravermelho encontradas.

Tabela 1 - Principais atribuições encontradas nos espectros de absorção na região do infravermelho.

| AMOSTRAS | BANDAS (cm-1) | GRUPOS |
|-------------------------|---------------|---------------------------------|
| NP | ~3416 | v(O-H) |
| | ~580 | Fe-O |
| | ~950 | Si-O |
| | ~3416 | v (O-H) |
| NP@MPTS | ~2920-2850 | vs (C-H) grupo -CH ₂ |
| | ~1108 | Fe-O-Si |
| | ~1032 | Si-O |
| | ~682 | C-S |
| | ~580 | Fe-O |
| | ~3420-3283 | v(O-H) e v(N-H) |
| NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm | ~2920-2850 | vs (C-H) grupo -CH ₂ |
| | ~1646 | v (C=O) |
| | ~1547 | C-N |
| | ~1108 | Fe-Si-O |
| | ~1032 | Si-O |
| | ~682 | C-S |
| | ~580 | Fe-O |

v= estiramento; s= simétrico; δ= deformação

Fonte: autor.

6.1.3 Potencial zeta

Para melhor avaliar a modificação da superfície das nanopartículas e a estabilidade coloidal do sistema, medidas do potencial zeta em função do pH foram realizadas. O sinal de carga da superfície está associado a dissociação de grupos funcionais presentes na superfície ou da adsorção de espécies aniônicas do meio de dispersão.⁵⁷

As medidas de potencial zeta em função do pH das amostras NP, NP@MPTS e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 estão ilustradas na Figura 18.

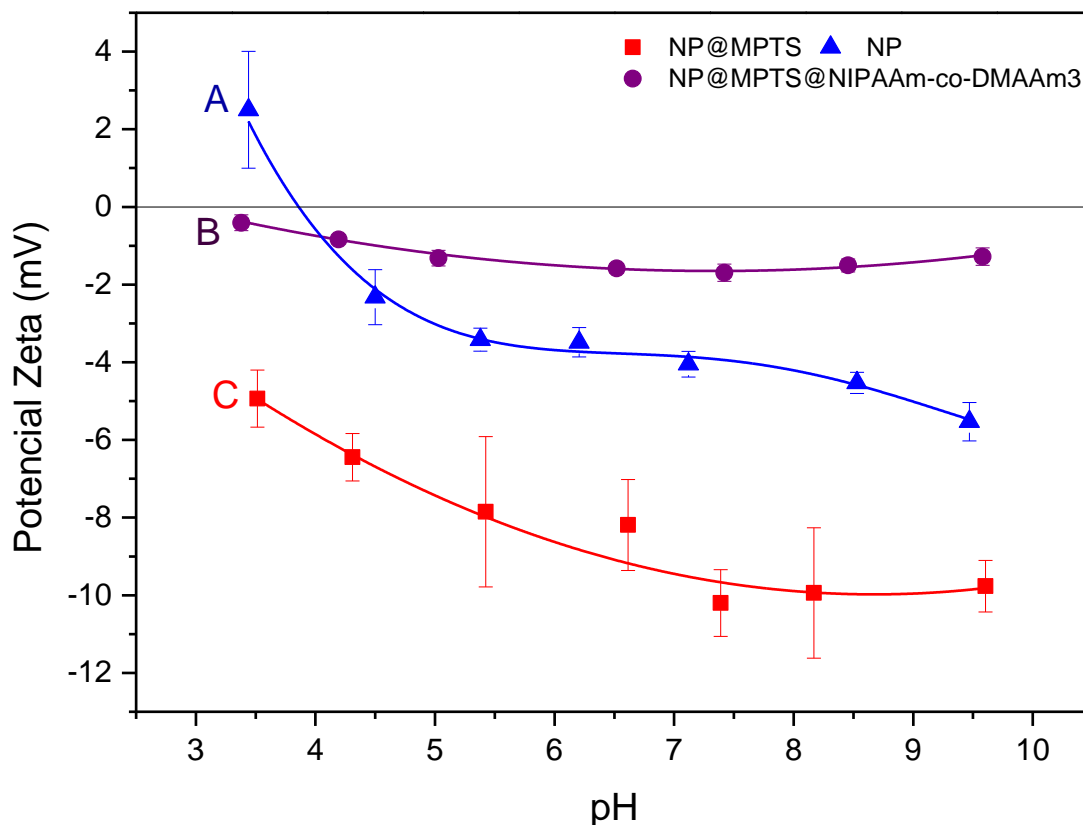


Figura 18 - Curvas de titulação potenciométrica das amostras NP, NP@MPTS e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3.

Fonte: autor.

O ponto isoelétrico (PI), é o valor de pH no qual o potencial zeta da partícula é igual a zero, ou seja, é o ponto onde as cargas negativas e as cargas positivas presentes na superfície da partícula são equivalentes.^{57,58} Logo, o PI pode ser influenciado pelas características ácido-base da superfície. Geralmente, a presença de grupos com caráter básico (aceptores de prótons) produz um valor de PI maior que 7 e a presença de grupos com caráter ácido (doadores de prótons), produz um valor de PI menor que 7.⁵⁸

Observando a curva potenciométrica da amostra NP (Figura 18), verifica-se que em meio ácido os valores de potencial zeta são positivos, pois as espécies predominante sobre a superfície são as protonadas, $Fe^{2+,3+}OH_2^+$. Já em meio alcalino, observa-se valores de potencial zeta negativos, pois as espécies

predominante sobre a superfície são as desprotonadas, $\text{Fe}^{2+3+}\text{O}^-$.⁵⁹ A amostra NP apresentou um PI igual a 4,2, contudo o valor de PI reportado na literatura para nanopartículas magnéticas de magnetita é igual a 6.^{59,60} Essa diferença pode ser devido a presença de grupos sulfatos na superfície das nanopartículas.⁵⁹

A amostra NP@MPTS, apresentou valores negativos de potencial zeta durante toda a faixa de pH estudada. O valor do potencial zeta diminuiu gradualmente de -5 mV à -10 mV e amostra não apresentou ponto isoelétrico. O valor negativo do potencial zeta se deve ao fato que a funcionalização com o MPTS introduz grupos tiol na superfície das NP, os quais são ácidos fracos e formam uma base conjugada.³² Esse resultado, indica que a funcionalização da superfície das nanopartículas com o MPTS foi obtida com sucesso.

A curva potenciométrica obtida para a amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3, não possui variação significativa dos valores de potencial zeta em função do pH, passando de -0,5 mV à -1,5 mV. Esse resultado se deve ao fato de que o copolímero presente na superfície das NP, não apresenta grupos ionizáveis na sua estrutura.³⁹ Ainda sabe-se que os grupos tiol são responsáveis pelo início da copolimerização na superfície das NP, logo as cargas superficiais das NP na amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 apresentam valores de potencial zeta mais positivos e variam menos quando comparados com os valores de potencial zeta da amostra NP@MPTS.

Os valores negativos de potencial zeta da amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 pode ser atribuído à presença de grupos sulfatos (SO_4^-) na superfície das NP, resultantes da clivagem do persulfato de potássio que foi utilizado como iniciador da polimerização.⁶¹ A amostra não apresentou ponto isoelétrico. As medidas de potencial zeta permitem concluir que a copolimerização na superfície das nanopartículas foi realizada com sucesso.

6.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Com o intuito de analisar a morfologia e o tamanho das nanopartículas, micrografias eletrônicas de transmissão foram realizadas. As micrografias obtidas para as amostras NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 e NP@MPTS estão ilustradas na Figura 19.

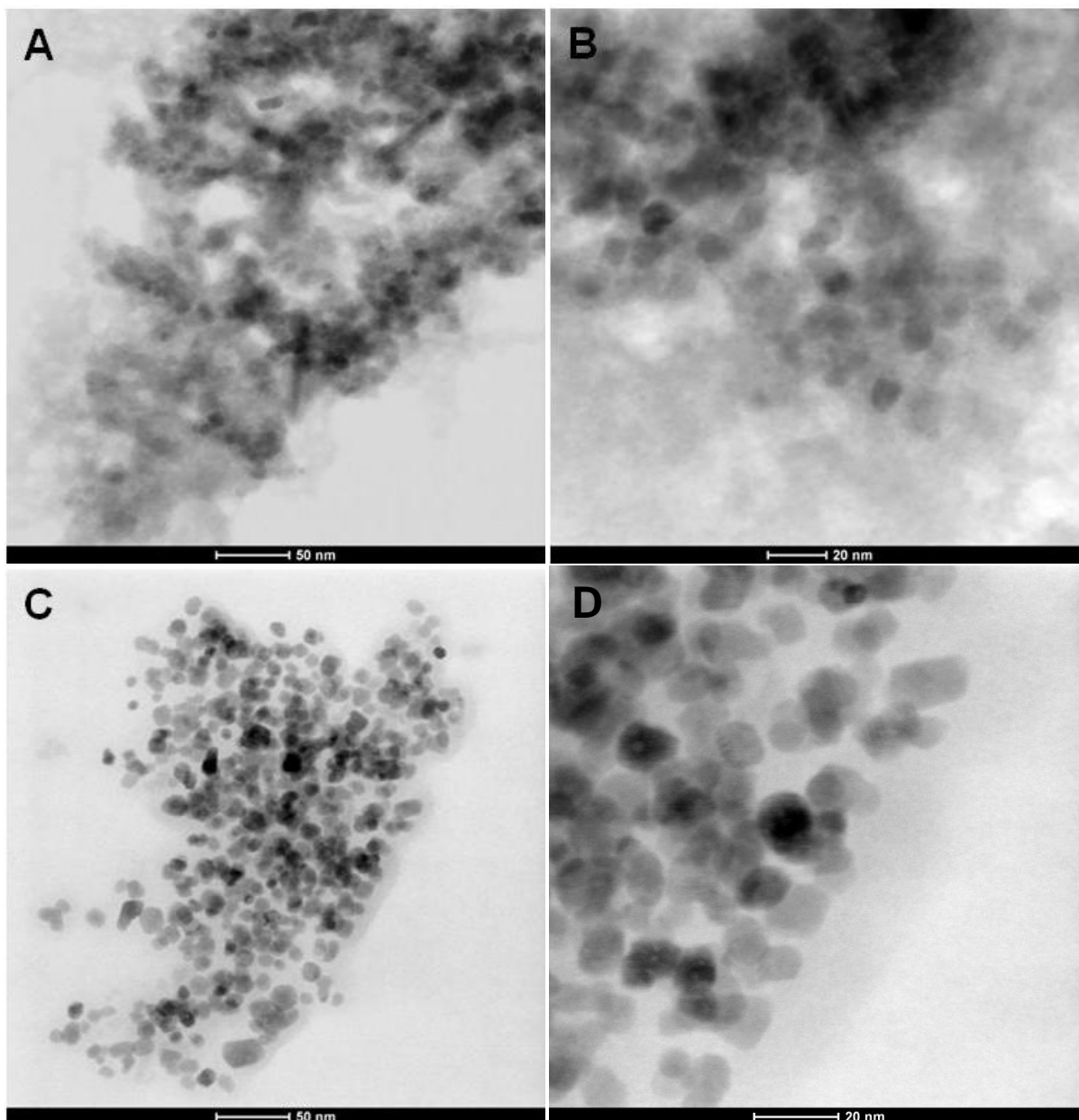


Figura 19 - Micrografias eletrônicas de transmissão obtidas, A) e B) NP@MPTS e C) e D) NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3.

Fonte: autor.

As micrografias obtidas para a amostra NP@MPTS (Figuras 19 A e B), estão desfocadas e não foi possível calcular o tamanho médio das nanopartículas, mas pode-se observar que as nanopartículas apresentam morfologia aproximadamente esférica.

Nas micrografias obtidas para a amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 (Figuras 19 C e D), pode-se calcular o tamanho médio das nanopartículas que foi de $10 \pm 0,7$ nm, resultado que corrobora com o valor calculado na difratometria de raio X. Observa-se que as nanopartículas se aglomeraram em agregados de

aproximadamente 100 nm. É possível verificar uma fina camada recobrando o aglomerado de nanopartículas, a qual é atribuída à presença dos copolímeros na superfície das nanopartículas. Pode-se observar também que, após a modificação da superfície com os copolímeros a morfologia das nanopartículas não mudou e o tamanho médio das NP é adequado para aplicações biomédicas.⁵

6.1.5 Análise termogravimétrica

O princípio da técnica neste trabalho é analisar a perda de massa da amostra em temperaturas variadas, a fim de estimar a quantidade de alcóxido e copolímero funcionalizados na superfície das nanopartículas.

As curvas termogravimétricas e as TG-DTG obtidas para as amostras, encontram-se nas Figuras 20 e 21. Pode-se verificar nas amostras NP@MPTS e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm5, que antes de 200 °C houve uma perda de massa de aproximadamente 4% referente a água adsorvida presente nas amostras. Entre 280 °C e 400 °C houve perda de aproximadamente 15 %, que pode ser atribuído à molécula orgânica MPTS.⁴⁴ Na amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm5, além das perdas citadas anteriormente, entre 398 °C e 498 °C houve uma perda de massa de aproximadamente 19 %, que foi atribuída ao copolímero P(NIPAAm-co-DMAAm).³⁹

Já na amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3, antes de 200 °C houve perda de massa de aproximadamente 7% referente a água adsorvida presente na amostra. Entre 398 e 498 °C, houve uma perda de massa de aproximadamente 42 %, indicando assim que a amostra contendo maior quantidade do monômero hidrofílico DMAAm apresentou maior perda de massa de água adsorvida e também apresentou maior quantidade de copolímero funcionalizado na superfície das nanopartículas magnéticas³⁹, como a copolimerização radicalar não é controlada pode-se assumir que existem cadeias poliméricas de diversos tamanhos e as perdas de massa dessas cadeias ocorrem em temperaturas diferentes.³⁹

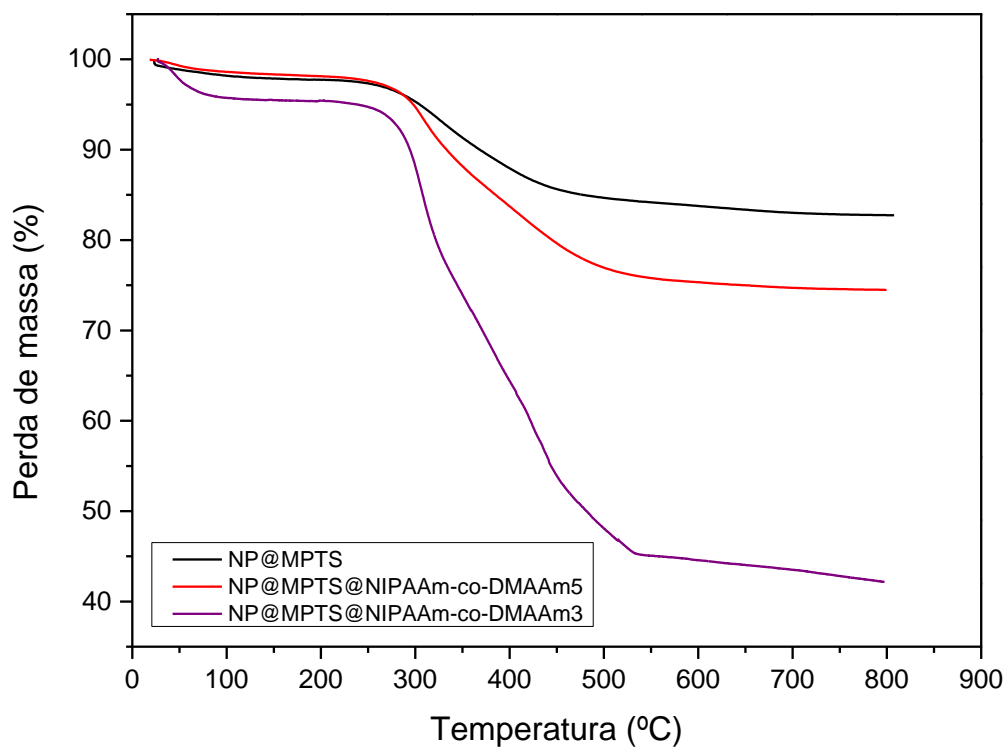


Figura 20 - Análise termogravimétrica das amostras: NP@MPTS, NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm5 e NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3.
Fonte: autor.

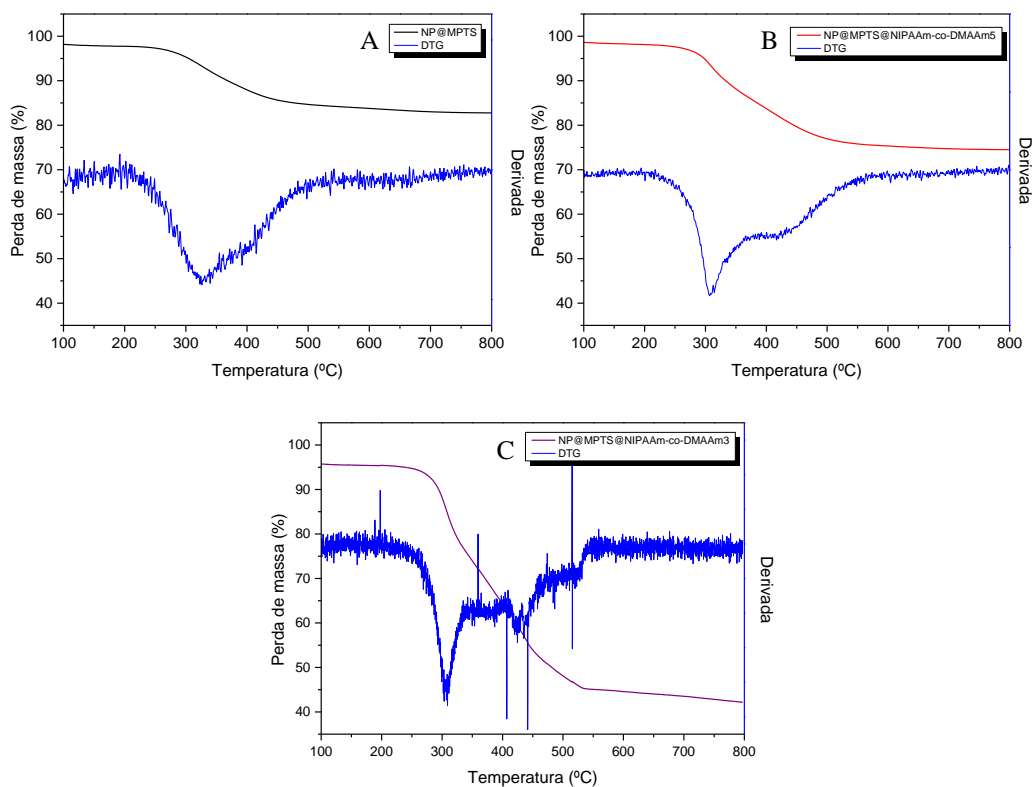


Figura 21 - TG-DTG das amostras A) NP@MPTS, B) NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm5 e C) NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3.
Fonte: autor.

6.1.6 Diâmetro hidrodinâmico

É possível obter o tamanho das nanopartículas através do espalhamento dinâmico de luz (DLS). As partículas estão em constante movimento e colidem aleatoriamente com as moléculas do líquido, esse movimento é conhecido como movimento Browniano. A técnica de espalhamento dinâmico de luz baseia-se no movimento Browniano para medir o tamanho das partículas, ou seja, a técnica baseia-se na relação da velocidade de movimentação da partícula com a intensidade e mudança da frequência da luz espalhada.⁵⁷

Os resultados obtidos para o diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão das partículas estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Medidas de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão das amostras à 25 °C.

| AMOSTRAS | Diâmetro hidrodinâmico (nm) | PDI |
|------------------------------|--|---------------|
| NP | 139,5 ± 0,2 | 0,091 ± 0,027 |
| NP@MPTS | 173,6 ± 0,5 | 0,101 ± 0,016 |
| NP@MPTS@NIPAAm-co- DMAAm5 | 279,2 ± 0,4 | 0,218 ± 0,039 |
| NP@MPTS@NIPAAm-co- DMAAm3 | 547,2 ± 3,3 | 0,284 ± 0,024 |

Fonte: autor

Analisando os valores descritos na tabela, observa-se que os valores de diâmetro hidrodinâmico aumentaram conforme as etapas de cada síntese. O copolímero presente nas amostras cria uma casca polimérica na superfície das NP, logo o diâmetro hidrodinâmico dessas amostras são maiores.⁵⁸

Os valores de diâmetros hidrodinâmicos obtidos corroboram com os valores de perdas de massa observados anteriormente no item 6.1.5. A amostra que apresentou maior diâmetro hidrodinâmico, NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3, é a amostra que apresentou maiores perdas de massas de água e copolímero na análise termogravimétrica, pois essa amostra contém maior quantidade de monômero hidrofílico, logo apresenta maior afinidade pelas moléculas de água.

As amostras NP e NP@MPTS apresentaram apenas uma distribuição de tamanho de partícula e PDI abaixo de 0,1 logo, as amostras são consideradas monodispersas.^{57,58} Porém, as amostras contendo copolímeros na superfície das NP apresentaram valores de PDI maiores que 0,1 mas menores que 0,4, sendo essas amostras consideradas moderadamente polidispersas.^{57,58} Contudo, os valores de índice de polidispersão encontrados indicam que as amostras apresentam estreita distribuição de tamanho.⁵⁸

6.2 Determinação da temperatura crítica de solução dos copolímeros sintetizados

6.2.1 Diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas em função da temperatura

O diâmetro hidrodinâmico das amostras NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm de razão 3 e razão 5 foi medido em função da temperatura como ilustrado na Figura 22.

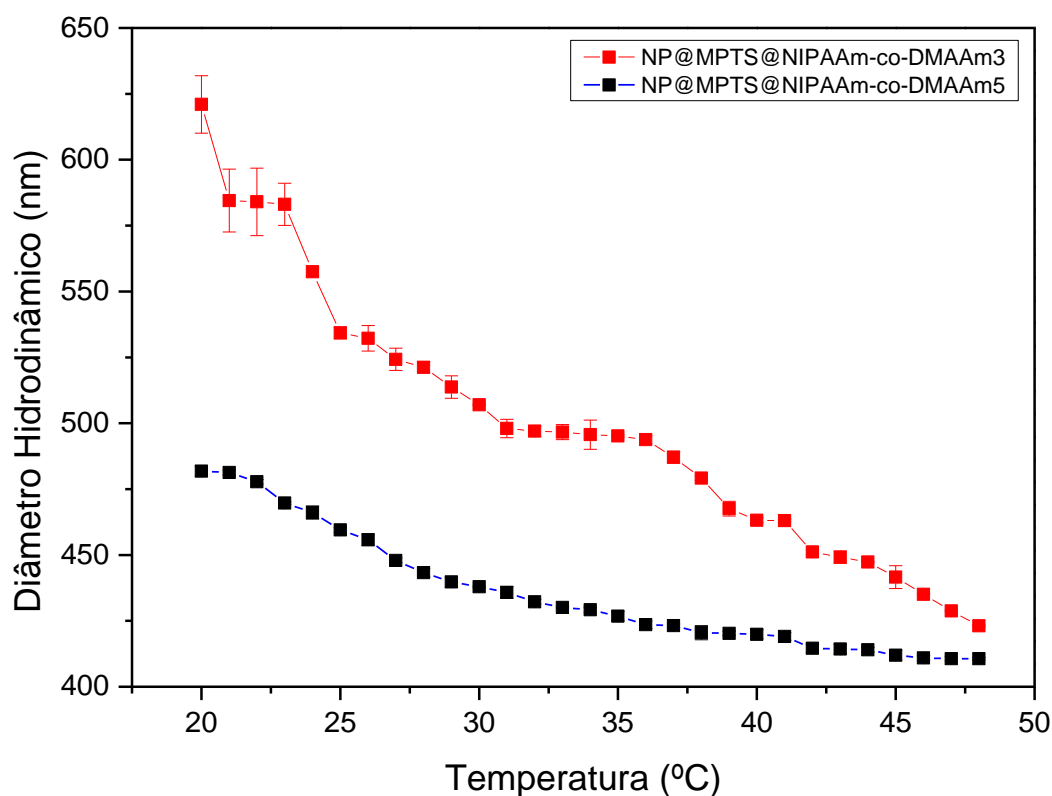


Figura 22 - Medidas de diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura das amostras NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 e da amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm5.

Fonte: autor.

Nesta figura, observa-se o comportamento termossensível dos copolímeros sintetizados através da diminuição constante do diâmetro hidrodinâmico com o aumento da temperatura. Tal comportamento era esperado, pois acima da temperatura crítica de solução (LCST) do copolímero sintetizado, sua estrutura colapsa em um glóbulo hidrofóbico, as ligações de hidrogênio entre o polímero e as moléculas de água tornam-se energeticamente desfavoráveis com o aumento da temperatura, predominando as ligações hidrofóbicas das cadeias poliméricas e, como consequência, uma redução do diâmetro hidrodinâmico é observada.^{36,40} Observa-se que a estabilidade coloidal do sistema se manteve constante mesmo com o aumento da temperatura, pois a diminuição do diâmetro hidrodinâmico da casca polimérica presente na superfície das nanopartículas diminuiu de forma gradativa.⁶²

Na amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 o diâmetro hidrodinâmico reduziu aproximadamente 205 nm, variando-se a temperatura de 20 °C a 50 °C. Já a amostra de NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm5, apresentou uma redução de

diâmetro hidrodinâmico próximo de 80 nm, na mesma faixa de temperatura. Conclui-se então que, em ambas as amostras ocorreu a copolimerização na superfície das nanopartículas, porém a amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 apresentou maior variação do diâmetro hidrodinâmico, esse resultado é devido à maior presença de copolímero na superfície das nanopartículas e, além disso, o monômero hidrofílico DMAAm presente em maior quantidade nessa amostra apresenta maior afinidade pelas moléculas de água da vizinhança, logo, a variação do diâmetro hidrodinâmico é maior.⁶² Esse resultado também é confirmado pelas análises termogravimétricas.

Apesar das amostras apresentarem comportamento termossensível na análise realizada pela técnica de espalhamento dinâmico de luz, não foi possível verificar satisfatoriamente a LCST do copolímero presente na superfície das nanopartículas. Portanto, utilizou-se a espectroscopia na região do UV-Vis em função da temperatura para determinar a LCST dos copolímeros, essa técnica será melhor discutida na próxima sessão.

6.2.2 Espectroscopia na região do UV-Vis em função da temperatura

A LCST do copolímero pode ser definida mediante análise de turbidimetria, utilizando-se espectrômetro UV-Vis em função da temperatura para determinar em qual temperatura ocorre o decréscimo de mais da metade da transmitância. Essa temperatura é definida como a LCST.³⁹ Para o copolímero P(NIPAAm-co-DMAAm5) a LCST encontrada foi de 38 °C e para o copolímero P(NIPAAm-co-DMAAm3) 40,5 °C, conforme observado na Figura 23.

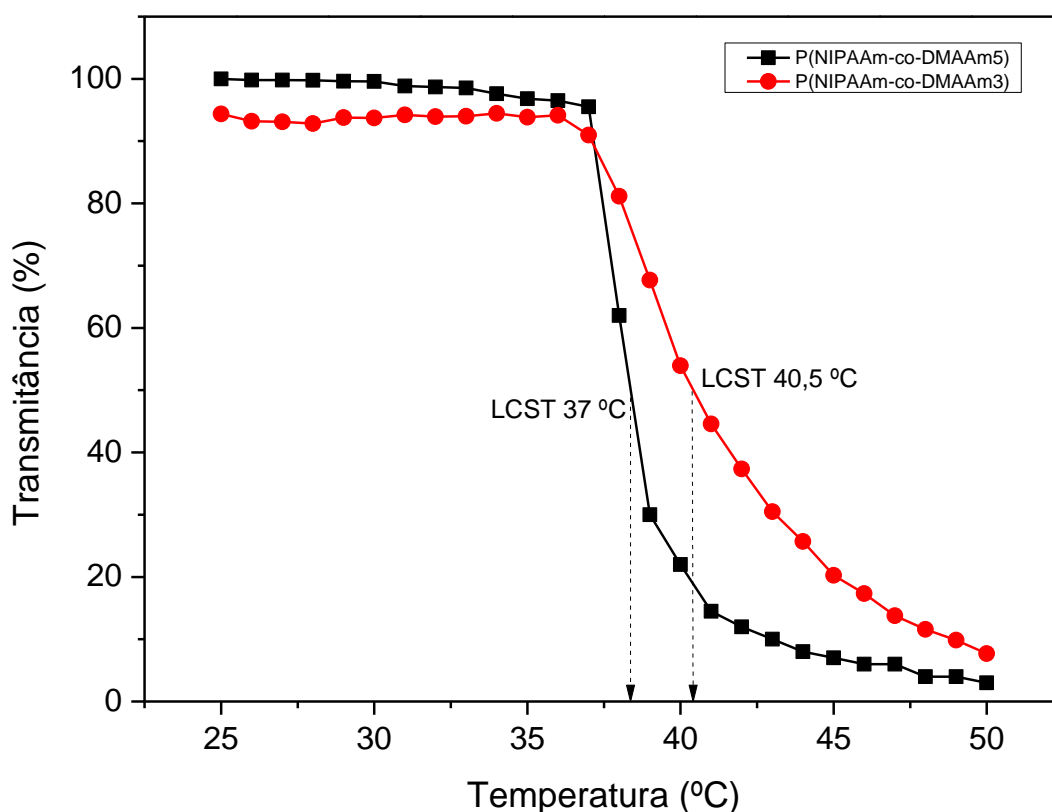


Figura 23 - Temperatura crítica de solução (LCST) dos copolímeros P(NIPAAm-co-DMAAm3) e P(NIPAAm-co-DMAAm5). Transmissão em 500 nm, determinada em solução tampão fosfato PBS (pH 7,4).

Fonte: autor.

A introdução do monômero DMAAm aumentou a temperatura crítica de solução do PNIPAAm como era esperado, pois o DMAAm é mais hidrofílico que o PNIPAAm. Logo, a cadeia do copolímero torna-se mais hidrofílica sendo necessária uma temperatura maior para que ocorra a transição de fase.³⁷

As LCST dos copolímeros P(NIPAAm-co-DMAAm) estão acima da temperatura corpórea como desejado para utilização do sistema na liberação controlada de fármaco.³⁷ Porém, o copolímero P(NIPAAm-co-DMAAm3) apresentou uma temperatura mais adequada para aplicação biomédica, já que o copolímero P(NIPAAm-co-DMAAm5) com LCST à 38 °C poderia liberar o fármaco no momento da introdução deste no corpo.³⁷ Sendo assim, o copolímero P(NIPAAm-co-DMAAm3) foi utilizado tanto nos testes de liberação controlada de fármaco quanto na hipertermia magnética.

6.2.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^1H RMN

As estruturas químicas dos copolímeros sintetizados foram investigadas através da espectrometria ^1H RMN, os espectros obtidos estão ilustrados na Figura 24. Os picos característicos em 1.04 e 3.80 ppm são associados ao grupo propil do PNIPAAm. Em 2.82-2.91 ppm os picos são associados ao grupo metil do monômero DMAAm. Observa-se também dois picos largos entre 1.50-2.0 ppm, que são associados ao grupo $-\text{CH}_2\text{CH}-$ do copolímero. Esse resultado indica que a copolimerização foi realizada com sucesso.³⁹

A partir da integração da área dos picos de sinal **b** e sinal **e**, calculou-se a razão molar do PNIPAAm em relação ao DMAAm.³⁹ Vale ressaltar que os picos de sinal **b** e **e** na amostra P(NIPAAm-co-DMAAm3) apresentam maiores intensidades quando comparados com os picos de sinal **b** e **e** da amostra P(NIPAAm-co-DMAAm5). Na tabela 3 estão descritos os valores das razões PNIPAAm/DMAAm encontrados nos copolímeros sintetizados.

As razões molares PNIPAAm/DMAAm, calculadas a partir dos espectros de ^1H RMN das amostras P(NIPAAm-co-DMAAm3) e P(NIPAAm-co-DMAAm), foram respectivamente iguais à 4,994 e 3,194, esses resultados corroboram com os valores adicionados na síntese dos copolímeros.

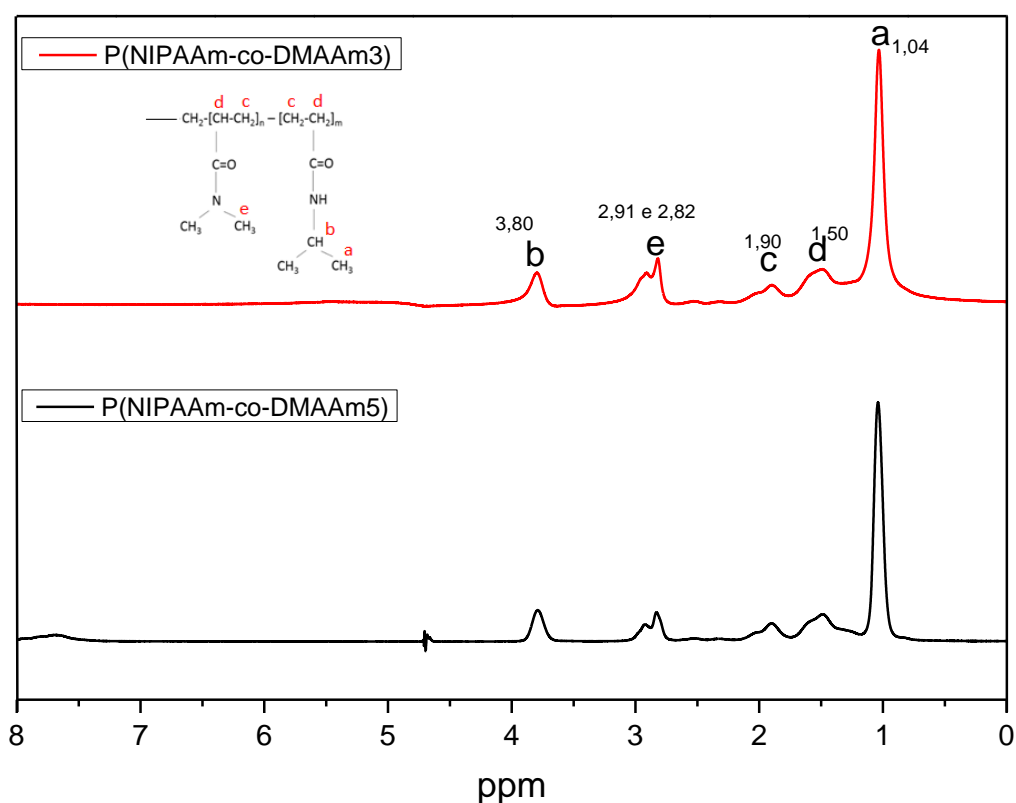


Figura 24 - ¹H RMN espetros obtidos das amostras P(NIPAAm-co-DMAAm3) e P(NIPAAm-co-DMAAm5).

Fonte: autor.

6.2.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A cromatografia de permeação em gel é uma técnica cromatográfica que separa moléculas dissolvidas com base no seu tamanho, bombeando-as através de colunas específicas que contém no seu interior um material microporoso. À medida que a amostra é separada e eluída da coluna, ela é caracterizada por detectores.⁶³ A técnica faz medições de massa molecular, tamanho e estrutura, é utilizada para caracterizar polímeros naturais ou sintéticos, biopolímeros, proteínas ou nanopartículas.⁶³

Afim de obter as massas moleculares dos copolímeros sintetizados, uma curva de calibração foi construída utilizando padrões do polímero Poli(etileno-glicol) (PEG) com massas moleculares de valores conhecidos, respectivamente iguais a 224 kDa; 105 kDa; 44 kDa; 23 kDa; 10250 Da; 6100 Da; 3450 Da; 1090 Da; 630 Da e 195 Da. As amostras P(NIPAAm-co-DMAAm5) e P(NIPAAm-co-DMAAm3) de

massas moleculares desconhecidas, foram analisadas nas mesmas condições em que os padrões foram analisados.

Os polímeros apresentam uma distribuição de tamanho, pois consistem de agrupamento de moléculas de vários tamanhos, logo, as massas moleculares de polímeros não podem ser calculadas da mesma forma que as massas moleculares de compostos puros pequenos são determinadas.⁶⁴

As massas moleculares numérica \bar{M}_n e ponderal médias \bar{M}_w são determinadas, considerando-se que a altura do pico do cromatograma correspondente a cada volume eluído (h_i) seja proporcional à quantidade daquela fração em peso na amostra.

A massa molecular ponderal média M_w , depende do número e do peso das moléculas de polímero na solução, qualquer que seja sua estrutura e tamanho e é calculada através da seguinte equação:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum N_i \cdot M_i^2}{\sum N_i \cdot M_i} \quad \text{Equação 2}$$

onde M_i é a massa molecular, N_i é o número de moléculas da espécie i e pode ser definido como:

$$N_i = \frac{m_i}{M_i} \text{ e } m_i \propto h_i \quad \text{Equação 3}$$

onde m_i é a massa do polímero analisada. Sendo assim, a massa molecular ponderal média é definida como:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum h_i \cdot M_i}{\sum h_i} \quad \text{Equação 4}$$

A massa molecular numérica média \bar{M}_n , também foi calculada, esta depende do número de moléculas de polímero na solução, qualquer que seja a sua estrutura ou tamanho e é calculada pela seguinte equação:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} \quad \text{Equação 5}$$

ou,

$$\bar{M}_n = \frac{\sum h_i}{\sum h_i/M_i} \quad \text{Equação 6}$$

A razão entre as massas moleculares ponderal média e numérica média é definida como o índice de polidispersão (PDI).⁶⁴

Através da integração dos picos obtidos nas análises das amostras e com as equações citadas anteriormente, determinou-se as massas moleculares \bar{M}_n e \bar{M}_w e o índice de polidispersão (PDI) dos copolímeros sintetizados. Os valores obtidos estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Caracterizações dos copolímeros sintetizados.

| AMOSTRAS | \bar{M}_w (Da) ¹ | \bar{M}_n (Da) ¹ | PDI | Razão PNIPAAm/DMAAm ² | LCST (° C) ³ |
|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------|-------------------------------------|-------------------------|
| P(NIPAAm-co-DMAAm5) | 2065 | 595 | 3,475 | 4,994 | 38 |
| P(NIPAAm-co-DMAAm3) | 7152 | 1353 | 5,283 | 3,194 | 40,5 |

¹Dados obtidos por GPC; ²Dados obtidos por ¹H RMN; ³Dados obtidos por UV-Vis.

Fonte: autor.

Na amostra P(NIPAAm-co-DMAAm5), a massa molecular ponderal média calculada (2065 Da) foi menor que o valor encontrado para a amostra a P(NIPAAm-co-DMAAm3) (7152 Da), este resultado era esperado, pois foi adicionado maior quantidade de monômero DMAAm na amostra P(NIPAAm-co-DMAAm3) logo, a massa molar do copolímero é maior. A quantidade de PNIPAAm adicionada nos dois copolímeros sintetizados foi igual.

Os valores de PDI calculados para os copolímeros, sugerem que há uma larga distribuição de tamanhos das cadeias dos polímeros, ou seja, o tamanho das cadeias poliméricas formadas são diferentes, pois a polimerização radicalar não é controlada, portanto as amostras são polidispersas.⁶³

6.3 Hipertermia magnética

Medidas de magnetotermia foram utilizadas a fim de verificar a capacidade de aquecimento das nanopartículas magnéticas, para aplicação da terapia de hipertermia magnética. A técnica baseia-se na aplicação de um campo magnético alternado suficiente para a introdução da magnetização das partículas e em seguida, aplica-se um campo alternado de frequência elevada que leva a conversão da energia magnética para energia térmica.⁶⁵

A capacidade de um material magnético de absorver energia de um campo magnético variável, é quantificada pelo SAR (taxa de energia absorvida específica ou energia absorvida específica). O SAR é definido pela taxa de energia absorvida pela amostra, em razão de unidade de massa (W Kg^{-1}):

$$SAR = \frac{P}{m_{NP}} \quad \text{Equação 7}$$

Onde P é a energia absorvida por unidade de tempo (W) e m_{NP} é a quantidade de nanopartículas da amostra (Kg). Se assumirmos que o sistema é adiabático, então a energia absorvida pelo material magnético durante a análise é igual ao calor gerado por unidade de tempo, portanto, o SAR também pode ser definido como a quantidade de energia convertida em calor por unidade de tempo e massa.

$$SAR = \frac{1}{m_{NP}} \frac{Q}{\Delta t} \quad \text{Equação 8}$$

Onde Q é o calor gerado (J) e Δt é o tempo em segundos.

O calor gerado, Q, é determinado pela seguinte equação:

$$Q = (m_{NP}c_{NP} + m_l c_l + m_d c_d)(\Delta T) \quad \text{Equação 9}$$

onde,

m_{NP} : massa das nanopartículas (Kg);

m_l : massa do líquido (Kg); m_d : massa do frasco Dewar;

c_{NP} : calor específico das NP [J (Kg.K)^{-1}];

c_l : calor específico do líquido [J (Kg.K)⁻¹];

c_d : calor específico do frasco vial [J (Kg.K)⁻¹];

ΔT : aumento da temperatura da amostra [K].

Substituindo-se a equação 3 em 2 e desconsiderando o frasco de Dewar, a equação obtida é:

$$SAR = \frac{m_{NP} c_{NP} + m_l c_l}{m_{NP}} \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad \text{Equação 10}$$

O valor do aumento da temperatura com seu respectivo tempo, utilizado para calcular o SAR é o máximo valor do gradiente de temperatura da curva, o que corresponde ao gradiente inicial. Portanto, a equação final para encontrar o SAR é:

$$SAR = \frac{m_{NP} c_{NP} + m_l c_l}{m_{NP}} \frac{dT}{dt} \quad \text{Equação 11}$$

O SAR é dependente de diversos parâmetros tais como: tamanho da partícula, distribuição do tamanho, composição química, modificação na superfície, saturação de magnetização das partículas, frequência e amplitude de campo magnético aplicado.⁶

Os resultados das análises de aquecimento das amostras, estão ilustrados na Figura 25.

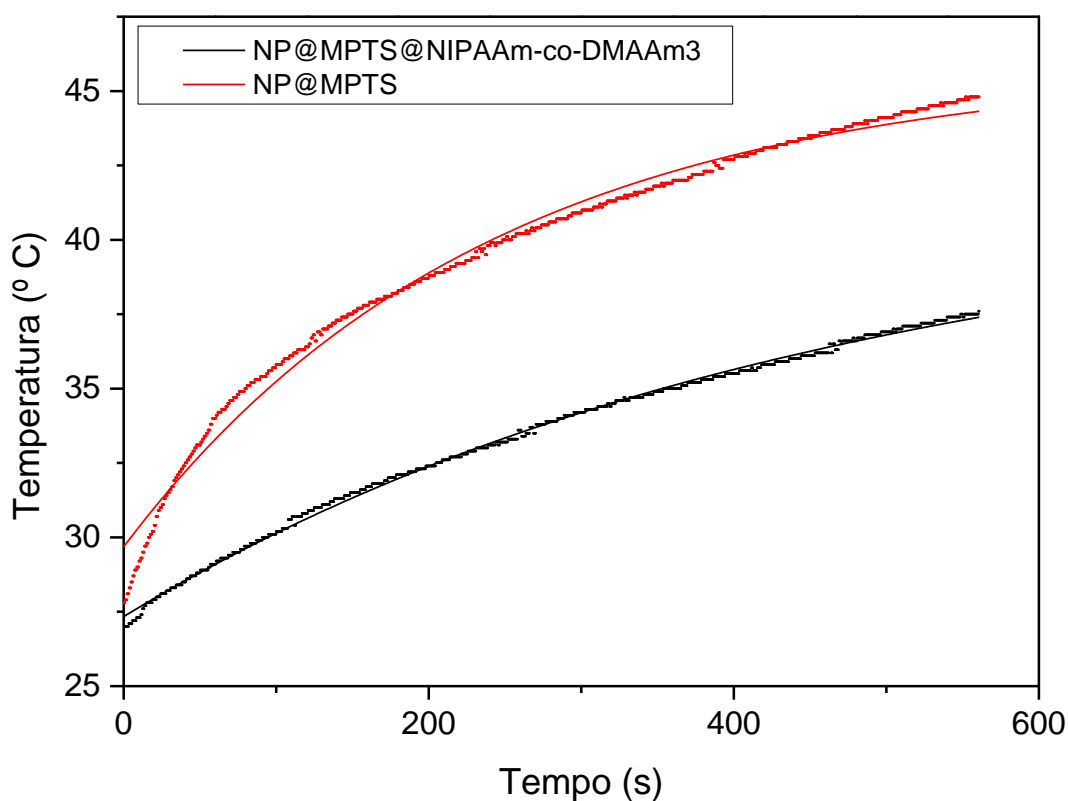


Figura 25 - Temperatura das amostras em função do tempo, sob aplicação de um campo magnético (420 kHz, 14kA/m).

Fonte: autor.

Na tabela abaixo, estão descritos os resultados do SAR para cada amostra. Utilizou-se um campo magnético externo de frequência de 420 kHz e amplitude 14 kA m⁻¹.

Tabela 4 - Taxas de aquecimento e SAR obtidas das amostras com concentração de 15mg ml⁻¹.

| AMOSTRAS | dT/dt (°C s ⁻¹) | SAR (W g ⁻¹) |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| NP@MPTS | 0,101 | 135,75 |
| NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 | 0,034 | 81,21 |

Fonte: autor.

Como visto na tabela 4, os valores de SAR e a taxa de aquecimento dT/dt obtidos da amostra NP@MPTS são maiores que os valores encontrados para a

amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3. Pode-se dizer, que a modificação da superfície das nanopartículas com o copolímero resultou em um abaixamento da taxa de aquecimento da amostra quando submetido a um campo magnético externo variável. Essa diminuição na capacidade de aquecimento é devido a presença da casca polimérica na superfície das nanopartículas, que atua como uma barreira limitando a difusão de calor gerado pelas NP. Quanto maior for a casca polimérica na superfície das nanopartículas, menor será o valor de SAR.^{24,66}

Entretanto, a temperatura máxima atingida pela amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 em 10 minutos de análise foi de 41 °C, e está adequada para aplicação biomédica quando esta é combinada com outras terapias como a liberação controlada de fármaco.^{6,67}

6.4 Encapsulamento e liberação do metotrexato

A amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 foi utilizada para realização do encapsulamento e liberação do MTX, como explicado anteriormente no item 4.4. A fração de metotrexato encapsulado na amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 foi quantificado através da diferença entre as concentrações de fármaco total e livre, utilizando a espectroscopia na região do UV-Vis. A concentração do fármaco livre é determinada no sobrenadante, enquanto que a concentração total é a quantidade de fármaco adicionado a suspensão de nanopartículas durante o procedimento de encapsulamento.

A eficiência de encapsulamento e o teor de MTX foram calculados através das respectivas equações:

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = \left(1 - \frac{m_f}{m_i}\right) \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

$$\text{Teor de fármaco (\%)} = \left(\frac{m_{\text{fármaco incorporado}}}{m_{\text{fármaco incorporado}} + m_{\text{polímero}}}\right) \times 100 \quad \text{Equação 13}$$

Onde m_i é a massa inicial de metotrexato, m_f é a massa de fármaco livre.

Sabendo-se que a massa inicial de MTX foi de 1,0 mg e a massa encontrada de MTX livre foi de 0,0191 mg, a eficiência de encapsulamento obtida foi de 98 % e

o teor de fármaco foi de 70 %, sabendo-se que em 10 mg de amostra contém 4,2 mg de copolímero.

O espectro de absorção do MTX apresenta três bandas características em 258, 303 e 371 nm (Figura 26 A), a absorção em 303 nm foi fixada para a determinação das concentrações do fármaco. Na Figura 26 B, está ilustrada a curva analítica obtida a partir de soluções de concentrações conhecidas do metotrexato em tampão fosfato pH 7,4. O valor de absorvidade molar encontrado foi de $0,0304 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, com coeficiente de correlação igual a 0,9976.

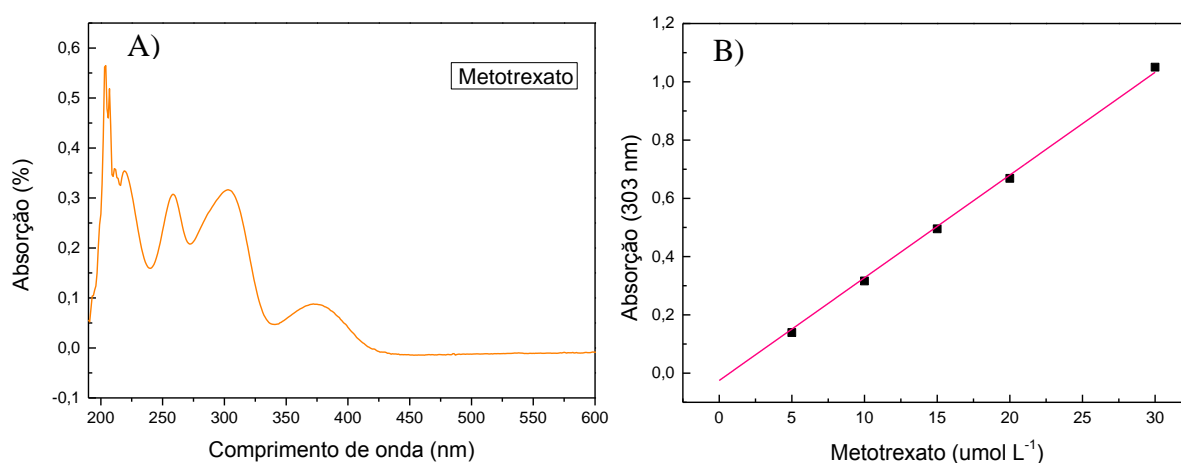


Figura 26 - A) Espectro de absorção de metotrexato. B) Curva analítica para o MTX no comprimento de onda 303 nm.

Fonte: autor.

A liberação do fármaco foi realizada pelo método de difusão através de membrana de diálise, o qual consiste na adição da suspensão de nanopartículas em membranas de diálises, que são mantidas no meio de liberação (tampão fosfato pH 7,4) sob agitação e temperatura constante.

Os perfis de liberação à 45 °C e à 37 °C estão ilustrados na Figura 27.

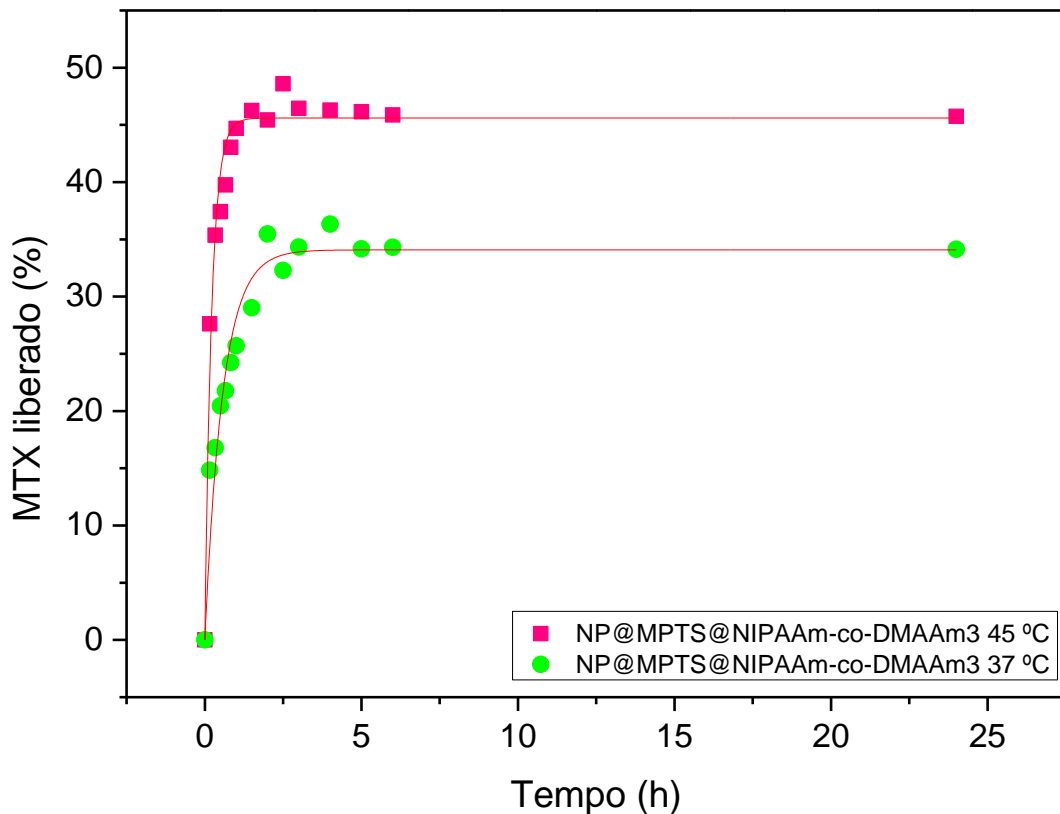


Figura 27 - Liberação de MTX da amostra NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3 à 45 °C e a 37 °C.
Fonte: autor.

A liberação cumulativa foi calculada pela equação abaixo:

$$\text{Liberação (\%)} = \frac{V_t \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{m_{MTX}} \times 100$$

Onde m_{MTX} é a massa de metotrexato presente nas nanopartículas, V_0 é o volume total do meio de liberação ($V_0 = 15$ mL), V_t é o volume de alíquotas removidas com o tempo t ($V_t = 1,5$ mL) e C_n é a concentração de metotrexato na amostra.

Os resultados apresentados na Figura 27 mostram que aproximadamente 45 % do MTX foi liberado à 45 °C e que 35 % foi liberado à 37 °C. Observa-se também que nas duas primeiras horas a liberação ocorreu rapidamente. É possível verificar que a liberação a 45 °C foi mais rápida e eficiente quando comparada com a liberação a 37 °C. Este resultado se deve ao fato de que, o copolímero presente na superfície das nanopartículas magnéticas tem LCST acima de 40 °C, como mostrado

anteriormente no item 6.2.2. A liberação do fármaco encapsulado nas nanopartículas, está prevista para ocorrer através do colapso do copolímero termossensível que ocorre acima da sua LCST, que é quando o copolímero torna-se hidrofóbico e colapsa expulsando as moléculas de água e de fármaco da sua cadeia³⁰, resultando assim em uma liberação mais eficiente e rápida à 45 °C. Após 24 h observa-se que a liberação cessou.

6.5 Análise da cinética da liberação

Em sistemas de liberação controlada de fármaco, o uso de modelos matemáticos é importante para determinar o mecanismo e a taxa de liberação do fármaco de um sistema.^{8,68} Os modelos mais aplicados correspondem a mecanismos conhecidos de sistemas de liberação controlada, os quais são classificados como difusão, inchaço e erosão.^{68,69}

Para determinar o possível mecanismo e a taxa de liberação do fármaco do sistema do presente trabalho, utilizou-se os principais modelos cinéticos encontrados na literatura para sistemas poliméricos: Primeira Ordem e Korsmeyer-Peppas.

O mecanismo de cinética de primeira ordem é dependente da concentração e é dada pela seguinte equação:

$$M_t = M_\infty [1 - \exp(-K_1 t)] \quad \text{Equação 14}$$

onde M_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t , M_∞ é a quantidade de fármaco liberado a um tempo infinito e K_1 é a constante de liberação de primeira ordem.

O modelo de Korsmeyer-Peppas descreve a liberação do fármaco de uma matriz polimérica e é expressa pela equação:

$$M_t = M_\infty K_{kp} t^n \quad \text{Equação 15}$$

onde K_{kp} é a constante de liberação característica do fármaco e o expoente n é dependente do mecanismo de liberação.⁸

Segundo a literatura, o modelo que apresenta o maior valor do coeficiente de correlação é o modelo que melhor explica o mecanismo de liberação do fármaco.⁸

Para verificar o modelo que mais se aproxima com perfis de liberações obtidos, ajustou-se os dados das liberações com as equações dos modelos citados anteriormente e comparou-se o coeficiente de regressão para cada modelo (R^2), os quais estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Coeficientes de correlação e parâmetros das liberações, obtidos pelas equações dos modelos matemáticos.

| TEMPERATURA (° C) | Primeira ordem | | Korsmeyer-Peppas | | |
|-------------------|----------------|-------|------------------|-------|-------|
| | K_1 | R^2 | K_{kp} | R^2 | n |
| 37 | 4,51 | 0,972 | 10,82 | 0,901 | 0,047 |
| 45 | 1,74 | 0,942 | 4,57 | 0,829 | 0,153 |

Fonte: autor.

O modelo de Kosmeyer-Peppas descreve o mecanismo de liberação de fármacos encapsulados em polímeros termossensíveis, abaixo e acima da LCST, representado por um ciclo de inchamento e colapso do polímero, respectivamente, sendo a liberação do fármaco dependente do colapso da matriz polimérica e da difusão Fickiana.⁷⁰⁻⁷² Determinando-se o valor de n , é possível interpretar e caracterizar os mecanismos envolvidos na liberação. Quando $n < 1$, o mecanismo que descreve a liberação é a difusão Fickiana. Para $0,45 < n < 0,89$, observam-se os mecanismos Não-Fickiana e Anômalo, $n=0,89$ tem-se um mecanismo limitante de transporte Caso II (liberação de ordem zero).⁷³ Entretanto, os valores de n encontrados para a liberação do MTX do nanosistema NP@MPTS@NIPAAm-co-DMAAm3, à 37 °C e 45 °C foram respetivamente iguais a 0,047 e 0,0153.

Logo, obteve-se pelo modelo de primeira ordem, o qual apresentou o maior valor de R^2 como observado na tabela 5. Sabe-se que quando sistemas poliméricos de liberação controlada são imersos diretamente no meio de liberação, estes apresentam uma liberação imediata e, em seguida apresentam um perfil de liberação estável⁷⁰, como pode ser observado no perfil de liberação apresentado na Figura 27.

Sendo assim, o sistema de liberação do MTX não é devido a difusão pela matriz polimérica, mas sim através do mecanismo de liberação imediata ("burst effect").⁷³ Conclui-se então que o modelo matemático de primeira ordem é o modelo que melhor explica a liberação do MTX do nanosistema e o mecanismo de liberação observado é o de liberação imediata.⁷³

7 CONCLUSÕES

A síntese e a funcionalização das nanopartículas superparamagnéticas com o alcoxisilano MPTS e a posterior modificação com o copolímero termossensível P(NIPAAm-co-DMAAm) foram realizadas com sucesso. A funcionalização e a copolimerização na superfície das NP foram confirmadas por espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica, medidas de potencial zeta e por medidas do diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura. Determinou-se as LCST dos copolímeros sintetizados através da espectroscopia na região do UV-vis em função da temperatura, as LCST encontradas foram de 38 °C e 40,5 °C para os copolímeros de razão molar PNIPAAm/DMAAm igual a 5 e 3 respectivamente e, estão dentro do esperado para aplicações biomédicas. Pela microscopia eletrônica de transmissão, observou-se que as nanopartículas superparamagnéticas apresentam forma esférica e estreita distribuição de tamanho mesmo após serem modificadas com o copolímero. Os resultados obtidos na magnetotermia mostraram que as amostras aquecem quando são submetidas a um campo magnético externo, atingindo temperaturas esperadas para a terapia de hipertermia. E por fim, o encapsulamento e a liberação do metotrexato foram realizados com êxito, sendo que a liberação do fármaco acima da LCST do copolímero apresentou melhor resultado, conforme o esperado.

PERSPECTIVAS

Para finalizar esse trabalho serão realizados estudos de viabilidade celular, para verificar a citotoxicidade do sistema. Posteriormente, testes *in vivo* e *in vitro* serão realizados com e sem a presença de um campo magnético alternado externo, a fim de avaliar o nanosistema desenvolvido.

REFERÊNCIAS

- 1 GOSS, P. E. et al. Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. **The Lancet Oncology Commission**, v. 14, p. 391-436, 2013.
- 2 LIMA-TENÓRIO, M. K. et al. Magnetic nanoparticles: in vivo cancer diagnosis and therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 493, n. 1/2, p. 313-327, 2015.
- 3 SUN, C. et al. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1252-1265, 2008.
- 4 FIGUEROLA, A. et al. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 126-143, 2010.
- 5 MODY, V. V. et al. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. **Applied Nanoscience**, v. 4, n. 4, p. 385-392, 2013.
- 6 HERVAULT, A. et al. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. **Nanoscale**, v. 6, n. 20, p. 11553-11573, 2014.
- 7 LOUGUET, S. et al. Thermoresponsive polymer brush-functionalized magnetic manganite nanoparticles for remotely triggered drug release. **Polymer Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 1408-1417, 2012.
- 8 HERVAULT, A. et al. Doxorubicin loaded dual pH- and thermo-responsive magnetic nanocarrier for combined magnetic hyperthermia and targeted controlled drug delivery applications. **Nanoscale**, v. 8, n. 24, p. 12152-12161, 2016.
- 9 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.
- 10 LU, A. H. et al. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222-1244, 2007.
- 11 PILLAI, V.; SHAH, D. O. Synthesis of high-coercivity cobalt ferrite particles using water-in-oil microemulsions. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 163, n. 1/2, p. 243-248, 1996.
- 12 NICOARA, G. et al. Ni-Zn ferrite nanoparticles prepared by Ball Milling. **Materials Science Forum**, v. 235/238, p. 145-150, 1997.
- 13 SHAFI, K. V. P. M.; GEDANKEN, A. Sonochemical approach to the preparation of barium hexaferrite nanoparticles. **Nanostructured Materials**, v. 12, n. 99, p. 29-34, 1999.

- 14 ZHANG, S. et al. Preparation of core shell particles consisting of cobalt ferrite and silica by sol-gel process. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 415, n. 1/2, p. 257-260, 2006.
- 15 KIM, Y. I. et al. Synthesis and characterization of CoFe_2O_4 magnetic nanoparticles prepared by temperature-controlled coprecipitation method. **Physica B: Condensed Matter**, v. 337, n. 1/4, p. 42-51, 2003.
- 16 BINI, R. A. **Síntese e funcionalização de superfície de óxidos de ferro superparamagnéticos**. 2011. 122 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- 17 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.
- 18 ISSELS, R. D. Hyperthermia adds to chemotherapy. **European Journal of Cancer**, v. 44, n. 17, p. 2546-2554, 2008.
- 19 VAN DER ZEE, J. Heating the patient: a promising approach? **Annals of Oncology**, v. 13, n. 8, p. 1173-1184, 2002.
- 20 KERR, J. F.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, n. 8, p. 2013-2026, 1994.
- 21 GORDON, R. T.; HINES, J. R.; GORDON, D. Intracellular hyperthermia a biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations. **Medical Hypotheses**, v. 5, n. 1, p. 83-102, 1979.
- 22 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.
- 23 DAVE, R. S.; GAO, X. Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 1, p. 583-609, 2009.
- 24 SALAS, G.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; MORALES, D. P. M. Relationship between physico-chemical properties of magnetic fluids and their heating capacity. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p. 768-776, 2013.
- 25 CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to magnetic materials**. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2013.
- 26 GUARDIA, P. et al. Controlled synthesis of iron oxide nanoparticles over a wide size range. **Langmuir**, v. 26, n. 8, p. 5843-5847, 2010.
- 27 FONSECA, M. G.; OLIVEIRA, A. S.; AIROLDI, C. Silylating agents grafted onto silica derived from leached chrysotile. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 240, n. 2, p. 533-538, 2001.

- 28 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.
- 29 CORRIU, R. J. P. The control of nanostructured solids: a challenge for molecular chemistry. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 5, p. 1109-1121, 2001.
- 30 KOHLER, N. et al. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. **Langmuir**, v. 21, n. 12, p. 8858-8864, 2005.
- 31 WILLIAMS, R. L. et al. Thiol modification of silicon-substituted hydroxyapatite nanocrystals facilitates fluorescent labelling and visualisation of cellular internalisation. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 35, p. 4370-4378, 2013.
- 32 KUO, C. H. et al. Effect of surface chemical composition on the surface potential and iso-electric point of silicon substrates modified with self-assembled monolayers. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 9, p. 3649-3653, 2011.
- 33 LEE, H. et al. Modification of nafion(R) using 3-mercaptopropyl trimethoxysilane. **Journal of the Korean Physical Society**, v. 56, n. 4, p. 1215-1222, 2010.
- 34 BAG, D. S. et al. Smart polymers and their applications. **Journal of Polymer Materials**, v. 23, n. 3, p. 225-248, 2006.
- 35 AGUILAR, M. R.; SAN ROMÁN, J. Smart polymers and their applications as biomaterials. In: ASHAMMAKHI, N.; REIS, R. L.; CHIELLINI, E. (Ed.). **Topics in tissue engineering**. [S.l.]: Elsevier, 2007. v. 3, chap. 6. Disponível em: <http://www oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol3/abstracts/aguilar_01.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2017.
- 36 LAS HERAS ALARCON, C.; PENNADAM, S. ALEXANDER, C. Stimuli responsive polymers for biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 34, n. 3, p. 276-285, 2005.
- 37 WARD, M. A.; GEORGIU, K. T. Thermoresponsive polymers for biomedical applications. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1215-1242, 2011.
- 38 QIU, Y.; PARK, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 49-60, 2012. Suppl.
- 39 YEH, J. C. et al. Synthesis and characteristics of biodegradable and temperature responsive polymeric micelles based on poly(aspartic acid)-g-poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 421, p. 1-8, 2013.
- 40 HOCINE, S.; LI, M. H. Thermoresponsive self-assembled polymer colloids in water. **Soft Matter**, v. 9, p. 5839-5861, 2013.

- 41 YE H, J. C. et al. Preparation and characterization of biocompatible and thermoresponsive micelles based on poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide) grafted on polysuccinimide for drug delivery. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, n. 3, p. 442-453, 2014.
- 42 RUBINO, F. M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 764, n. 1/2, p. 217-254, 2001.
- 43 CHAN, E. S. L.; CRONSTEIN, B. N. Methotrexate - how does it really work? **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, p. 175-178, 2010.
- 44 KOHLER, N. et al. Methotrexate-immobilized poly(ethylene glycol) magnetic nanoparticles for MR imaging and drug delivery. **Small**, v. 2, n. 6, p. 785-792, 2006.
- 45 GUPTA, J.; BHARGAVA, P.; BAHADUR, D. Methotrexate conjugated magnetic nanoparticle for targeted drug delivery and thermal therapy. **Journal of Applied Physics**, v. 115, n. 17, 2014. doi:10.1063/1.4866080.
- 46 ESPINOSA-MANSILLA, A. et al. Kinetic fluorimetric determination of the antineoplastic methotrexate (MTX) in human serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 5, p. 851-858, 2002.
- 47 WIDEMANN, C. B.; ADAMSON, C. P. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. **The Oncologist**, v. 11, n. 6, p. 694-703, 2006.
- 48 VAN DOOREN-GREEBE, R. J. et al. Methotrexate revisited: effects of long-term treatment in psoriasis. **British Journal of Dermatology**, v. 130, n. 2, p. 204-210, 1994.
- 49 SARTORI, T. et al. Development and validation of a fast RP-HPLC method for determination of methotrexate entrapment efficiency in polymeric nanocapsules. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, n. 6, p. 505-509, 2008.
- 50 KRAUS, A. et al. Synthesis of MPTS-modified cobalt ferrite nanoparticles and their adsorption properties in relation to Au(III). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 338, n. 2, p. 359-365, 2009.
- 51 ZAITSEV, V. et al. Physical and chemical properties of magnetite and magnetite-polymer nanoparticles and their colloidal dispersions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 212, n. 1, p. 49-57, 1999.
- 52 MA, M. et al. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 212, n. 2/3, p. 219-226, 2003.
- 53 SUN, X.-Y. et al. Facile graft of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) onto Fe₃O₄ nanoparticles by ATRP: synthesis, properties, and biocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101A, n. 2, p. 607-612, 2013.

- 54 ZHOU, Y. et al. Modification of magnetite nanoparticles via surface-initiated atom transfer radical polymerization (ATRP). **Chemical Engineering Journal**, v. 138, n. 1/3, p. 578-585, 2008.
- 55 BARTH, A.; ZSCHERP, C. What vibrations tell about proteins. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 35, n. 4, p. 369-430, 2002.
- 56 ZHANG, J. L.; SRIVASTAVA, S. R.; MISRA, K. D. R. Core-shell magnetite nanoparticles surface encapsulated with smart stimuli-responsive polymer: synthesis, characterization, and LCST of viable drug-targeting delivery system. **Langmuir**, v. 23, n. 11, p. 6342-6351, 2007.
- 57 MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer nano series user manual**. Worcestershire, 2004. 270 p. Disponível em: <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf> Acesso em: 13 maio 2017.
- 58 SUTTIPONPARNIT, K. et al. Role of surface area, primary particle size, and crystal phase of titanium dioxide nanoparticle dispersion properties. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, n. 27, p. 1-8, 2010.
- 59 SUN, Z.-X. et al. Surface characteristics of magnetite in aqueous suspension. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 197, n. 1, p. 151-159, 1998.
- 60 BERG, J. M. et al. The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. **Nanotoxicology**, v. 3, n. 4, p. 276-283, 2009.
- 61 EISSA, M. M. et al. Reactive magnetic poly(divinylbenzene-co-glycidyl methacrylate) colloidal particles for specific antigen detection using microcontact printing technique. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 3, p. 5573-5582, 2013.
- 62 LIU, T. Y. et al. Biomedical nanoparticle carriers with combined thermal and magnetic responses. **Nano Today**, v. 4, n. 1, p. 52-65, 2009.
- 63 AGILENT TECHNOLOGIES. **An introduction to gel permeation chromatography and size exclusion chromatography**. 2015. 32 p. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5990-6969EN%20GPC%20SEC%20Chrom%20Guide.pdf>>. Acesso em: 22 maio 2017.
- 64 LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. Técnicas para determinação de peso molecular ponderal médio. In: _____. **Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001. Cap. 5, p. 89-110. (Série Instituto de macromolécula).
- 65 MA, M. et al. Size dependence of specific power absorption of Fe₃O₄ particles in AC magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 268, n. 1/2, p. 33-39, 2004.

66 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.

67 WUST, P. et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. **The Lancet: Oncology**, v. 3, n. 8, p. 487-497, 2002.

68 ARIFIN, D. Y.; LEE, Y. L.; WANG, H. C. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: implications to drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 12/13, p. 1274-1325, 2006.

69 FU, Y.; KAO, J. W. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert Opinion Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 429-444, 2010.

70 KAMALY, N. et al. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2602-2663, 2016.

71 CALICETI, P. et al. Controlled release of biomolecules from temperature-sensitive hydrogels prepared by radiation polymerization. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 1/2, p. 173-181, 2001.

72 MARTELLINI, F. et al. Water and drug transport in radiation-crosslinked poly(2-methoxyethylacrylate-co-dimethylacrylamide) and poly(2-methoxyethylacrylate-co-acrylamide) hydrogels. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 66, p. 155-159, 2003.

73 TRONGSATITKUL, T.; BUDHLALL, M. B. Microgels or microcapsules? Role of morphology on the release kinetics of thermoresponsive PNIPAm-co-PEGMA hydrogels. **Polymer Chemistry**, v. 4, n. 5, p. 1502-1516, 2013.