Rodolfo Debone Piazza

“Modificação da superfície de óxidos de ferro por dextrana derivatizada para aplicações em liberação de fármaco”

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

Orientador: Prof° Dr. Miguel Jafelicci Junior.

Araraquara

2014

Piazza, Rodolfo Debone
P584m Modificação da superfície de óxidos de ferro por dextrana derivatizada para aplicações em liberação de fármaco / Rodolfo Debone Piazza. –
Araraquara : [s.n], 2014
100 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Miguel Jafelicci Junior

1. Físico-química. 2. Nanopartícula magnética. 3. Dextrano. 4. Polimerização. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

RODOLFO DEBONE PIAZZA

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

Araraquara, 18 de março de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Miguel Jafelicci Junior (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. Marcio José Tiera
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas – UNESP, São José do Rio Preto

Profª. Drª. Carolina Vautier Teixeira Giongo
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Diadema

Súmula Curricular

Dados pessoais

Nome	Rodolfo Debone Piazza
Filiação	Rubens Piazza e Marialice Debone Piazza
Nascimento	17/12/1987
Endereço residencial	Rua Fernando Albarello, Quadra I Lote 16 Campus Ville – Araraquara 14800-719, SP - Brasil Telefone: 16 981735800 E-mail: rodolfo.piazza@gmail.coom
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Físico-Química Rua Professor Francisco Degni nº55 Quitandinha - Araraquara 14800-900, SP - Brasil Telefone: 16 33016600 E-mail: rodolfo.piazza@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2012 - 2014
Mestrado em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.
Título: Modificação de superfície de óxidos de ferro por dextrana derivatizada para aplicação em liberação de fármacos
Orientador: Miguel Jafelicci Junior
Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2008 – 2011
Graduação em Bacharelado em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.
Título: Modificação de nanopartículas de óxido de ferro por dextranas
Orientador: Miguel Jafelicci Junior

Formação complementar

2013 - 2013
Curso de curta duração em Biopolímeros e sistemas nanoestruturados.
Instituto de Química São Carlos - USP, IQSC-USP, Brasil

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. PIAZZA, R. D., NUNES, E. S., JAFELICCI JUNIOR, M.
Iron oxide nanoparticles functionalized with PAA-co-Dextran using inverse miniemulsion In: XII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2013, Campos do Jordão, SP. Livro de resumos do 12° Encontros da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais. , 2013.

2. PIAZZA, R. D., JAFELICCI JUNIOR, M.
Nanopartícula magnética de óxido de ferro encapsulada com ácido poliacrílico In: 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2013, Águas de Lindóia, SP. Livro de resumos da 36ªReunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. , 2013.

Agradecimentos

Aos meus pais, Rubens e Marialice, por, mais uma vez, acreditarem nas minhas idéias e me apoiarem nos momentos mais importantes da minha vida. E também pela paciência durante esse longo período fora de casa. Muito obrigado;

À minha irmã que só me faz rir;

Aos meus avôs;

Ao Prof° Dr. Miguel Jafelicci Junior pela orientação e confiança no trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Materiais Magnéticos e Coloides, pelas discussões, incentivos e momentos de descontração;

À Molíria, Denise e Lívia pelas sessões de liofilização;

À Juliana e ao professor Paulo Bueno, pela gentileza em ceder a chave do laboratório para realização dos experimentos de retenção;

Aos técnicos e servidores do IQ Unesp/CAr que colaboraram com o desenvolvimento do presente trabalho;

Aos professores Sebastião Willian da Silva, José Antônio Huamani Coaquira, José André Filho e Paulo Cesar de Morais, do Instituto de Física da Universidade de Brasília, pela realização das medidas magnéticas;

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica LNNano/CNPEM, pela disponibilidade de utilização de seus microscópios.;

Ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização dos microscópios eletrônicos de varredura;

Aos companheiros de República Xurupita's: Jatobá, Chucky, Tico, Varão, Jen, Bahia, Roberth, João Batera, Sheila, Jardes, Lima Neto, Bryan e Frango.

Aos amigos sempre presentes: Husky, Gota, Tonhão, Tatão, Pedro, Marcelão, Ju, Taty, Fabi, Lívia, Denise. A vida é mais divertida com vocês.

À CAPES pela bolsa concedida;

“Muita coisa é inata, mas muito é feito pelo treinamento.

Por isso ninguém será bem-sucedido se se poupar, se não mergulhar fundo nos temas maiores

e se não estiver em condições de se empenhar até o extremo por causas insignificantes”

Walter Benjamim

(1892 -1940)

Queremos saber,

O que vão fazer

Com as novas invenções.

Queremos notícia mais séria

Sobre a descoberta da antimatéria

E suas implicações

Na emancipação do homem

Das grandes populações
(...)

Queremos saber,

Queremos viver

Confiantes no futuro

Por isso se faz necessário prever

Qual o itinerário da ilusão

A ilusão do poder

Pois se foi permitido ao homem

Tantas coisas conhecer

É melhor que todos saibam

O que pode acontecer.

Queremos saber, todos queremos saber.

Gilberto Gil (1976)

RESUMO

A modificação da superfície de nanopartículas de óxido de ferro tem atraído interesse da comunidade científica devido às várias aplicações deste material em diferentes áreas do conhecimento. A biomedicina é uma área em crescente avanço no uso das nanopartículas, pois a sinergia entre as propriedades magnéticas e a biocompatibilidade da superfície modificada permite o uso destes materiais em diagnóstico e tratamento de doenças, como na liberação controlada de drogas. A aplicação de um campo magnético para guiar as nanopartículas magnéticas conjugadas com fármaco é uma técnica promissora, capaz de reduzir problemas associados a tradicional forma de administração de drogas, aumentando o bem estar de pacientes submetidos a este tratamento. O presente trabalho consiste na funcionalização de nanopartículas magnéticas a base de óxido de ferro pela dextrana derivatizada, utilizando o método da polimerização por miniemulsão inversa, para estudos de liberação de doxorrubicina. As nanopartículas magnéticas de maghemita foram obtidas a partir da oxidação da magnetita sintetizada por coprecipitação, enquanto a dextrana foi derivatizada pelo glicidil metacrilato com intuito de ancorar grupos vinílicos sobre sua estrutura. Estes materiais foram caracterizados por técnicas espectroscópicas, tais como infravermelho, Raman, ressonância magnética de H^1 e C^{13}. O óxido de ferro foi encapsulado na dextrana derivatizada através da polimerização por miniemulsão inversa. Nesta etapa, alguns parâmetros de síntese, tais como o tipo e concentração de surfactante, fração de monômeros e teor de óxido de ferro utilizado, foram variados para obter um sistema estável, permitindo seu uso em aplicações biomédicas. O sistema caroço@casca obtido apresentou eficiência de incorporação superior a 80% de doxorrubicina. Entretanto, a porcentagem de liberação da droga por difusão foi baixa durante o período analisado.

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas. Derivatização dextrana. Miniemulsão. Doxorrubicina.

ABSTRACT

The modification of the iron oxide nanoparticles surface has attracted interest of the scientific community due to the large number of applications of this material in different areas of knowledge. The biomedicine is one area in growing improvement in the use of nanoparticles, because the synergy between the magnetic properties and the biocompatibility of the modified surface allows the use these materials in diagnostic and treatment of diseases, as well as the controlled drug delivery. The application of magnetic field to guide the magnetic nanoparticles conjugated with drugs is one promising technique, capable of reduce the problems associated with the traditional way of drugs administration, increasing the welfare of the patients on these treatments. The present work consists in the functionalization of magnetic nanoparticles based on iron oxide by derivatized dextran, using the miniemulsion polymerization method, for doxorubicin release studies. The magnetic nanoparticles of maghemite were obtained from the magnetite oxidation synthesized by coprecipitation, while the dextran was derivatized by the glycidyl methacrylate with the intention of anchor vinyl groups on the surface. These materials were characterized by spectroscopic techniques, as infrared, Raman, magnetic resonance of H^1 e C^{13}. The iron oxide was encapsulated in the derivatized dextran through inverse polymerization by miniemulsion. In this phase, some parameters of synthesis, as the type and the surfactant concentration, monomers fraction and percentage of iron oxide, were varied to obtain a stable system, allowing its use in biomedical application. The core@shell system obtained showed incorporation efficiency over 80% of doxorubicin, although the drug release percentage from diffusion was low during the analyzed period.

Key words: Magnetic nanoparticles. Dextran derivatization. Miniemulsion. Doxorubicin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Influência da aplicação de campo magnético externo sobre a magnetização e a movimentação das paredes de domínio de material multi-domínios. 25
Figura 2. Curva de histerese magnética, magnetização *versus* campo magnético... 26
Figura 3. Curva de magnetização em função de campo para materiais superparamagnéticos. 27
Figura 4. Representação da célula unitária de estrutura do tipo espinélio inverso.... 29
Figura 5. Esquema da orientação e distribuição dos momentos magnéticos nos sítios tetraédricos (Th) e Octaédricos (Oh) da magnetita. 30
Figura 6. Representação esquemática de uma curva de energia de interação em função da distância entre partículas. 31
Figura 7. Representação estrutura da dextrana. 34
Figura 8. Comparação dos processos de polimerização para: (A) emulsão, (B) miniemulsão e (C) microemulsão. 37
Figura 9. Representação dos mecanismos de degradação da miniemulsão inversa. 38
Figura 10. Esquema do processo de polimerização por miniemulsão inversa. 39
Figura 11 - Representação esquemática das aplicações de nanopartículas magnéticas em biomedicina. 43
Figura 12. Representação da estrutura do cloridrato de doxorrubicina. 45
Figura 13. Estruturas químicas dos principais reagentes empregados nas sínteses. 47
Figura 14. Difratograma de raios X da amostra de óxido de ferro. 57
Figura 15. Espectro de Raman do óxido de ferro 60
Figura 16. Micrografia MET para amostra de óxido de ferro. 61
Figura 17. Curva de potencial zeta versus pH para amostra γ-Fe_2O_3. 62
Figura 18. Espectros IV da amostra de: (a) óxido de ferro e (b) óxido de ferro modificado com ácido acrílico. 63
Figura 19. Reação da dextrana com GMA por abertura do anel epóxido (superior) e transesterificação (inferior). 64
Figura 20. Espectros de RMN H^1 para as amostras de dextrana e dextrana derivatizada. 65
Figura 21. Espectro de RMN C^{13} para amostra dextrana derivatizada. 66

Figura 22. Espectro IV da amostra: (a) dextrana e (b) dextrana derivatizada. 67
Figura 23. Representação da estrutura química dos surfactantes e estabilidade coloidal. 68
Figura 24. Espectro IV da amostra: (a) Dex_GMA, (b) PAA-co-Dex 2%, (c) Acrilato 2%. 71
Figura 25. Espectro RMN H^1 após polimerização por miniemulsão inversa. 71
Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura das amostras: (a) PAA-co-Dex 2%, (b) PAA-co-Dex 3% e (c) PAA-co-Dex 4%. 74
Figura 27. Curva de potencial Zeta versus pH para amostra copolimerizada variando a concentração de surfactante. 75
Figura 28. Microscopia eletrônica de varredura das amostras: (a) X_{Dex}= 25, (b) X_{Dex}= 65 e (c) X_{Dex}= 75. 77
Figura 29. Curva de potencial Zeta versus pH para amostra do copolímero variando a fração de monômero. 78
Figura 30. Perfil da distribuição do diâmetro hidrodinâmico. 80
Figura 31. Microscopia eletrônica de varredura das amostras: (a) Magh@Dex_50, (b) Magh@Dex_100 e (c) Magh@Dex_150. 81
Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura de elétrons retroespalhados para as amostras: (a) Magh@Dex_50, (b) Magh@Dex_100 e (c) Magh@Dex_150. 82
Figura 33. Curva de potencial Zeta versus pH para amostra de copolímero variando o teor de óxido de ferro. 83
Figura 34. Diâmetro hidrodinâmico em função do tempo para as amostras de encapsuladas dispersas nos tampões: (a)TrisHCl e (b) Fosfato. 85
Figura 35. Processo de separação das amostras Magh@Dex_100 (esquerda) e Magh@Dex_150 (direita) por campo magnético externo. 85
Figura 36. Curvas termogravimétricas das amostras de: óxido de ferro puro e de óxido de ferro encapsuladas. 86
Figura 37. Curva de magnetização *versus* campo para as amostras de óxido de ferro sem revestimento e para as amostras encapsuladas pelo polímero, obtidas a 300 K. 88
Figura 38. Espectro de absorção para amostra de doxorrubicina. 90
Figura 39. Curva analítica da doxorrubicina. 90
Figura 40. Perfil da retenção da doxorrubicina em função do tempo. 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulações das sínteses por polimerização via miniemulsão inversa. ...50
Tabela 2. Posições angulares e distâncias interplanares para padrão e amostra de óxido de ferro. ...57
Tabela 3. Parâmetros de rede cristalina para a amostra de óxido de ferro. ...59
Tabela 4. Variação do diâmetro hidrodinâmico em função do tipo de surfactante. ...69
Tabela 5. Variação do diâmetro hidrodinâmico em função da concentração do surfactante Span 80. ...72
Tabela 6. Variação do diâmetro hidrodinâmico em função da fração entre os monômeros. ...76
Tabela 7. Variação do diâmetro hidrodinâmico em função do teor de óxido de ferro. ...79
Tabela 8. Média dos diâmetros hidrodinâmicos e índice de polidispersividade (PDI) determinados em tampão Tris e fosfato para as amostras poliméricas incorporadas com óxido de ferro. ...86
Tabela 9. Encapsulação de óxido de ferro. ...87
Tabela 10. Eficiência de incorporação da doxorrubicina. ...91

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

B	Indução magnética
H	Campo magnético
M	Magnetização
μ_0	Momento magnético
χ	Susceptibilidade magnética
μ	Permeabilidade magnética
T_C	Temperatura de Curie
M_r	Remanência
H_c	Coercividade
$E(\theta)$	Energia magnética anisotrópica
K_{eff}	Constante de anisotropia magnética
K_b	Constante de Boltzman
T	Temperatura
E_T	Energia de interação
E_R	Energia repulsive
E_A	Energia atrativa
DLVO	Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek
PVA	Polivinil álcool
Da	Dalton
MM	Massa molar

Span 60	Monoestearato de sorbitan
Span 80	Monooleato de sorbitan
Twen 80	polioxietileno 20 monooleato de sorbitan
DMSO	Dimetilsulfóxido
GMA	Glicidil metacrilato
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
Dex	Dextrana
MBA	N,N’ – metilenobisacrilamida
APS	Persulfato de amônio
AA	Ácido acrílico
PAA	Poliácido acrílico
ζ	Potencial Zeta
VSM	Magnetrometro de amostra vibrante
UV	Ultra violeta
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
RMN	Ressonância magnética nuclear
GS	Grau de substituição
HLB	Índice de balanço hidrofílico - liofílico
D_h	Diâmetro hidrodinâmico
PDI	Índice de polidispersividade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19

1.1. MOTIVAÇÃO 19
1.2. OBJETIVOS 21
1.3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21
1.3.1. MAGNETISMO 21
1.3.2. DOMÍNIOS MAGNÉTICOS 24
1.3.3. FERRITAS: ESTRUTURA E PROPRIEDADES 28
1.3.4. ESTABILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS 30
1.3.5. MÉTODOS DE POLIMERIZAÇÃO 34
1.3.6. APLICAÇÕES BIOMÉDICAS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICA 39
1.3.7. A DOXORRUBICINA 44

2. MATERIAL E MÉTODO 46

2.1. REAGENTES UTILIZADOS 46
2.2. SÍNTESE E MODIFICAÇÃO DOS ÓXIDOS DE FERRO 46
2.3. DERIVATIZAÇÃO DA DEXTRANA 48
2.4. POLIMERIZAÇÕES 49
2.5. ENCAPSULAÇÃO DE ÓXIDO DE FERRO POR POLIMERIZAÇÃO VIA MINIEMULSÃO INVERSA 49
2.6. INCORPORAÇÃO DA DOXORRUBICINA 50
2.7. LIBERAÇÃO DA DOXORRUBICINA 51
2.8. CARACTERIZAÇÃO 52
2.8.1. DIFRAÇÃO DE RAIOS X 52
2.8.2. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO 52
2.8.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN 52
2.8.4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE H^1 E C^{13} 52
2.8.5. POTENCIAL ZETA 53
2.8.6. ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO 53
2.8.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA 54
2.8.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO 54

2.8.9. Análise Térmica 54
2.8.10. Magnetização 55
2.8.11. Espectroscopia UV-Visível 55

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 56

3.1. Óxidos de ferro 56
3.2. Derivatização da dextrana 63
3.3. Polimerizações 68
3.3.1. Variação do surfactante 68
3.3.2. Variação da concentração de Span 80 70
3.3.3. Variação da fração de monômeros 75
3.4. Encapsulação de óxidos de ferro 78
3.5. Incorporação de doxorrubicina 89
3.6. Estudo de retenção da doxorrubicina 91

4. CONCLUSÃO 93

5. PROPOSTAS FUTURAS 94

REFERÊNCIAS 95

1. Introdução

1.1. Motivação

Materiais magnéticos têm desempenhado importante papel no desenvolvimento da civilização moderna. A magnetita natural foi o primeiro material magnético com aplicações tecnológicas que se tem relatado na história, através da sua utilização como componente principal de bússolas. A partir da segunda metade do século 20, o desenvolvimento de modernas tecnologias resultou em profundas modificações na sociedade e o conhecimento sobre materiais magnéticos foram, e ainda são, fundamentais na elucidação de diversas aplicações. Pesquisadores de diversas áreas da ciência, tais como a química, a física, a farmácia, as engenharias, a biologia e a medicina tem se dedicado ao estudo dos materiais magnéticos e – para muitas das aplicações – se faz necessário colaborações entre as áreas. As principais aplicações incluem o armazenamento de dados, catálise, fluidos magnéticos, biotecnologia, biomedicina [(1)].

Nanomateriais apresentam comprimentos, em pelo menos uma de suas dimensões, compreendidos entre 1 e 100 nm. Os óxidos de ferro vêm sendo utilizados em aplicações biomédicas devido a sua biocompatibilidade e pela possibilidade de ser internalizado em estruturas biológicas devido ao seu reduzido tamanho. Dessa forma, é possível acessar essas estruturas biológicas, tais como as células (10 – 100 μm), os vírus (20 – 450 nm), as proteínas (5 – 50 nm) e o DNA (2 nm de largura e 10-100 nm de comprimento), a partir da modificação adequada de sua superfície, adicionando grupos funcionais ou biomoléculas específicas para sua internalização [(2)].

O revestimento da superfície das nanopartículas magnéticas é uma etapa crucial para a utilização deste material em aplicações biomédicas. Um material na escala nanométrica apresenta área superficial maior quando comparado com o mesmo material no seu estado macroscópico. Um problema a ser superado envolvendo as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro diz respeito à agregação, pois a elevada razão área/volume induz a agregação como forma de reduzir sua energia de superfície. Dessa forma, é necessário revestir a superfície

das nanopartículas de óxido de ferro para manter a estabilidade coloidal do sistema e, também, evitar a oxidação desses óxidos [3].

A realização de estudos *in vivo* requer que todos os componentes da formulação do compósito magnético apresente biocompatibilidade. Um material é biocompatível quando se observa uma resposta favorável na aplicação em tecido ou fluído biológico, com mínima reação alérgica, anti-inflamatória ou tóxica. Diversos biopolímeros têm sido pesquisado para emprego no revestimento de óxido de ferro, tais como a dextrana, carboximetil dextrana, amido, polivinil álcool, polietileno glicol [3]. A dextrana, um polissacarídeo, foi escolhida como opção de recobrimento dos óxidos de ferro, pois é biocompatível, biodegradável, não tóxica, oriunda de matéria – prima renovável e possui grupos reativos capaz de funcionalizar as nanopartículas magnéticas e, também, ancorar sobre sua estrutura moléculas específicas, tais como proteínas, anticorpos e drogas [4].

As propriedades magnéticas das partículas de óxido de ferro em escala nanométrica, somadas aos efeitos de funcionalização da superfície, permitem que moléculas bioativas sejam guiadas para sítios específicos do corpo humano utilizando campo magnético externo. Dessa forma, a comunidade científica tem se dedicado a pesquisas nos campos de liberação controlada de fármacos, agente de contraste de imagem para ressonância magnética nuclear, hipertermia magnética e separação magnética [2; 5].

Na forma atual de administração de drogas o princípio ativo, após ultrapassar as barreiras fisiológicas, é levado para todas as regiões do organismo através do sistema circulatório. Respeitando os limites de toxicidade, o paciente necessita de altas doses para atingir nível satisfatório de atuação do principio ativo, uma vez que este se encontra biodisponível por todo corpo. Diante disso, as doses são administradas constantemente para que o nível de atuação do princípio ativo não fique abaixo da sua concentração limite. A aplicação em transporte e liberação controlada de drogas é possível devido à sinergia entre as propriedades magnéticas das nanopartículas de óxido de ferro e as propriedades de biopolímeros em liberar a droga. O principal benefício no uso de sistemas de liberação controlada consiste na vetorização a alvos específicos dentro do organismo, reduzindo a dose administrada e os efeitos colaterais, resultando em maior ação terapêutica.

A relevância do tema é motivada pelo desenvolvimento da nanotecnologia a qual tornou possível produzir, caracterizar e, especialmente, adequar as propriedades funcionais de nanopartículas para os desafios das aplicações biomédicas, seja como caráter de diagnóstico ou como ação terapêutica. O potencial impacto com que estas novas aplicações irão se impor sobre a sociedade prevê mudanças no cuidado com a saúde de uma maneira sistemática e fundamental [6].

1.2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho consistem na funcionalização de nanopartículas magnéticas a base de óxido de ferro pela dextrana derivatizada, utilizando o método da polimerização por miniemulsão inversa, para estudos de liberação de droga.

Os objetivos incluem:

- Obter nanopartículas de maghemita a partir da oxidação de magnetita sintetizada pelo método da coprecipitação;
- Derivatizar a dextrana através da reação com glicidil metacrilato (2,3 – epoxipropilmetilpropenoato);
- Encapsular as nanopartículas de óxido de ferro através da polimerização por miniemulsão inversa de ácido acrílico e dextrana derivatizada;
- Encapsular doxorrubicina e estudar sua retenção no sistema caroço@casca.

1.3. Revisão Bibliográfica

1.3.1. Magnetismo

As propriedades magnéticas em materiais tem origem, principalmente, nos elétrons dos átomos, que possuem momento magnético devido à sua movimentação. O momento magnético está associado à movimentação do elétron em torno do núcleo que ele orbita, denominado momento angular de orbital, e do movimento de rotação do spin do elétron em torno de seu próprio eixo, chamado de momento de spin, gerando um vetor para cada tipo de movimento. Dessa forma, o

momento magnético de um material é a somatória de todos os momentos eletrônicos [7].

A indução magnética (B), que é definida como a força necessária para mover uma carga ou corrente elétrica, está relacionada com as propriedades magnéticas dos materiais através da equação (1). O valor da indução magnética é função do campo magnético (H) – gerado por corrente elétrica externa ao material tais como um solenoide ou magneto permanente – e da magnetização (M) – gerada pela resultante dos momentos de spin e angular de orbital dos elétrons em movimento [8].

$$B = \mu_0(H + M) \tag{1}$$

Entretanto, as propriedades magnéticas de um material não são caracterizadas apenas em termos de sua magnetização. Informações importantes podem ser obtidas a partir da razão entre a magnetização e o campo magnético, ou ainda pela razão da indução pelo campo magnético. Essas razões são chamadas de susceptibilidade (χ) e permeabilidade magnética (μ), respectivamente, conforme a equação (2) e (3).

$$\chi = \frac{M}{H} \tag{2}$$

$$\mu = \frac{B}{H} \tag{3}$$

Vários tipos de materiais magnéticos são classificados de acordo com o valor de sua susceptibilidade magnética. Os materiais diamagnéticos correspondem ao grupo cujo valor de susceptibilidade é baixo e negativo, na ordem de – 10^{-5}. Exemplos de matérias diamagnéticos são o cobre, a prata e o ouro. Esses átomos apresentam preenchimento total dos níveis eletrônicos, ou seja, os spins de elétrons

estão todos emparelhados, cancelando sua magnetização. Os valores de susceptibilidade para os materiais diamagnéticos são negativos devido ao seu comportamento quando aplicado um campo externo, pois o momento magnético permanece paralelo ao campo, porém em direção oposta.

Os materiais que apresentam susceptibilidade pequena e positiva (10^{-3}) são denominados paramagnéticos. Os níveis eletrônicos não estão totalmente preenchidos nesta classe de materiais, como é o caso do alumínio, platina e manganês. Os momentos magnéticos de um material paramagnético não apresentam direção preferencial de alinhamento, estando distribuído de forma randômica na ausência de campo externo. Quando é aplicado campo, o momento magnético é alinhado paralelamente ao campo, na mesma direção.

Os materiais ferromagnéticos apresentam momento magnético alinhado, devido à sobreposição de orbitais dentro de uma estrutura cristalina. O alto valor de susceptibilidade magnética é decorrente do alinhamento desses momentos já ordenados na mesma direção do campo externo. Entretanto, a agitação térmica dos átomos atua no sentido contrário ao alinhamento, diminuindo o valor de susceptibilidade magnética com o aumento da temperatura. A variação de temperatura está compreendida entre o zero absoluto e uma temperatura máxima, denominada temperatura de Curie, T_c, na qual os materiais ferromagnéticos tornam-se paramagnéticos acima desse valor. Assim como nos materiais paramagnéticos, a estrutura eletrônica dos materiais ferromagnéticos não apresenta spins emparelhados. O momento magnético permanente é resultado do momento de spins, tendo o momento de orbital pouca influência. Outra importante característica de materiais ferromagnéticos é o alinhamento do momento de dipolo magnético em uma mesma direção em regiões volumétricas do cristal, denominadas domínios. Este alinhamento corre mesmo na ausência de campo externo e será abordado detalhadamente na próxima seção.

Existem, ainda, outras classes de materiais magnéticos que são magneticamente ordenados e apresentam comportamento parecido com os materiais ferromagnéticos. Os materiais antiferromagnéticos possuem alinhamento antiparalelo dos momentos magnéticos, resultando em magnetização nula na ausência de campo externo. Com aplicação de campo magnético, o alinhamento do

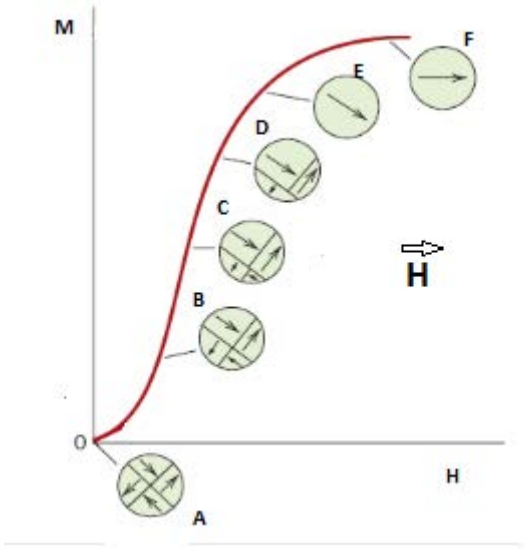
momento magnético torna-se paralelo, gerando uma magnetização diferente de zero, com valor de susceptibilidade baixo e positivo, como é o caso do óxido de manganês, por exemplo. O ferrimagnetismo difere do antiferromagnetismo pelo não cancelamento da magnetização na ausência de campo externo. Os materiais ferrimagnéticos também apresentam alinhamento antiparalelo, porém com magnitude diferente entre os momentos magnéticos opostos, levando a altos valores de susceptibilidade na presença de campo externo, como pode ser observado nas ferritas [8].

1.3.2. Domínios Magnéticos

Os materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos, quando se encontram abaixo da sua temperatura de Curie, apresentam regiões de pequeno volume, denominadas domínios magnéticos. O momento de dipolo magnético dentro de cada domínio permanece alinhado em uma mesma direção [9]. A magnetização entre dois domínios é separada por paredes que alteram gradativamente a orientação de cada domínio. O processo de formação das paredes de domínios está relacionado com o balanço entre energia magnetostática, que aumenta proporcionalmente com o volume do material, e a energia de parede de domínio, que é proporcional a área das paredes de domínio. As paredes de domínio se movimentam em função do campo externo H, conforme exemplificado na Figura 1. Na região A, onde o campo externo H não está sendo aplicado, a somatória dos vetores de momento magnético em cada domínio é zero, resultando na ausência de magnetização do material. Quando um campo externo é aplicado em uma única direção e as paredes de domínio se movimentam, como observado na região B. É observado aumento do volume dos domínios magnético cujos vetores de momento magnético estão mais alinhados ao campo H aplicado, resultando em aumento do valor de magnetização. Aumentando ainda mais o valor do campo H resulta em aumento do valor de magnetização, conforme pode ser observado nas regiões C, D e E da Figura 1. O aumento do valor de magnetização está relacionado à supressão dos domínios magnéticos menores em função da movimentação de suas paredes, resultando em um monodomínio na região E. Entretanto, a magnetização não aumenta infinitamente com o aumento do campo H. Quando o momento magnético do

monodomínio é alinhado ao campo externo H, o material atinge seu valor máximo de magnetização, denominado magnetização de saturação (Ms), observado na região F da Figura 1.

Figura 1. Influência da aplicação de campo magnético externo sobre a magnetização e a movimentação das paredes de domínio de material multidomínios.



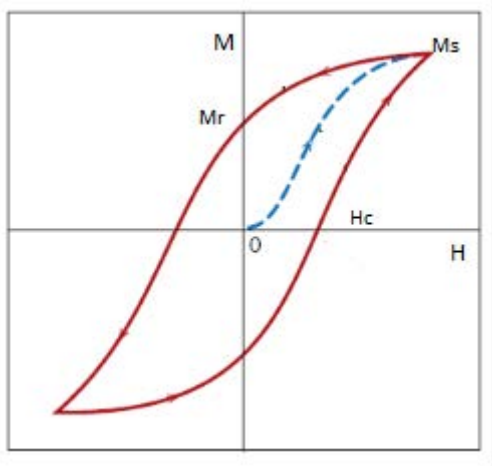
Fonte: Adaptado de Callister [9]

A resistência da movimentação das paredes de domínios provoca o retardamento da magnetização M ao remover a aplicação do campo H. Dessa forma, quando o campo H for nulo, existirá um valor de magnetização residual, denominado remanência (M_r). O ponto no qual magnetização é igual a zero é chamado de coercividade (H_c). Outro valor de saturação é atingido quando o campo H é diminuído até um valor máximo negativo. Valores de remanência e coercividade podem ser positivos ou negativos, dependendo da região da curva de histerese, como pode ser visto na Figura 2.

A formação de um material que apresente características de multi-domínio ou monodomínio está relacionada ao diâmetro destas nanopartículas. A formação de monodomínio é preferencial para nanopartículas com diâmetro inferior a um diâmetro crítico devido ao alto custo energético para manter uma parede de domínio

em um material de pequeno volume. Quando o diâmetro da nanopartícula se encontra acima do diâmetro crítico o material atinge um estado de multi-domínio, que refle no formato da curva de histerese. Partículas grandes que apresentam multi-domínios necessitam de pouca energia de campo para mover suas paredes de domínio, resultando em curva de histerese larga, ou seja, com valores altos de coercividade. Uma curva de histerese estreita, baixo valor de coercividade, indica a presença de um estado de monodomínio, resultado de partículas pequenas [2].

Figura 2. Curva de histerese magnética, magnetização *versus* campo magnético.



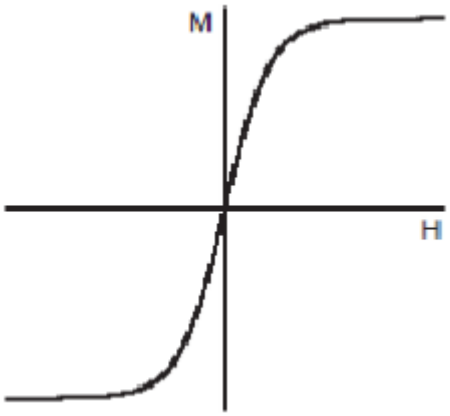
Fonte: Adaptado de Callister [9]

Entretanto, não é possível reduzir o tamanho das partículas magnéticas de forma a reter suas propriedades magnéticas. Quando as nanopartículas magnéticas estão abaixo de seu diâmetro crítico, em um estado de monodomínio, os spins são afetados por flutuações de energia térmica, atingindo um estado denominado superparamagnetismo. O superparamagnetismo é compreendido quando considerado o comportamento de partículas isoladas em um estado de monodomínio. A energia magnética anisotrópica, responsável por manter os momentos magnéticos alinhados em uma determinada direção, pode ser expresso de acordo com a equação 4:, na qual V corresponde ao volume da partícula, K_{eff} é a constante de anisotropia magnética e θ é o ângulo entre a magnetização e o eixo de fácil magnetização do material.

$$E(\theta) = K_{eff} V sin^2\theta \quad (4)$$

Diminuindo o tamanho das partículas, a energia térmica, k_bT, excede a barreira energética $K_{eff}V$, e a magnetização é facilmente invertida. Dessa forma, quando o valor de k_bT for superior a $K_{eff}V$, o sistema se comporta como um paramagneto, porém, ao invés de possuir momentos magnéticos atômico, existirá um momento magnético gigante (super) no interior de cada partícula [1].

Figura 3. Curva de magnetização em função de campo para materiais superparamagnéticos.



Fonte: Adaptado de Pankhurst [2]

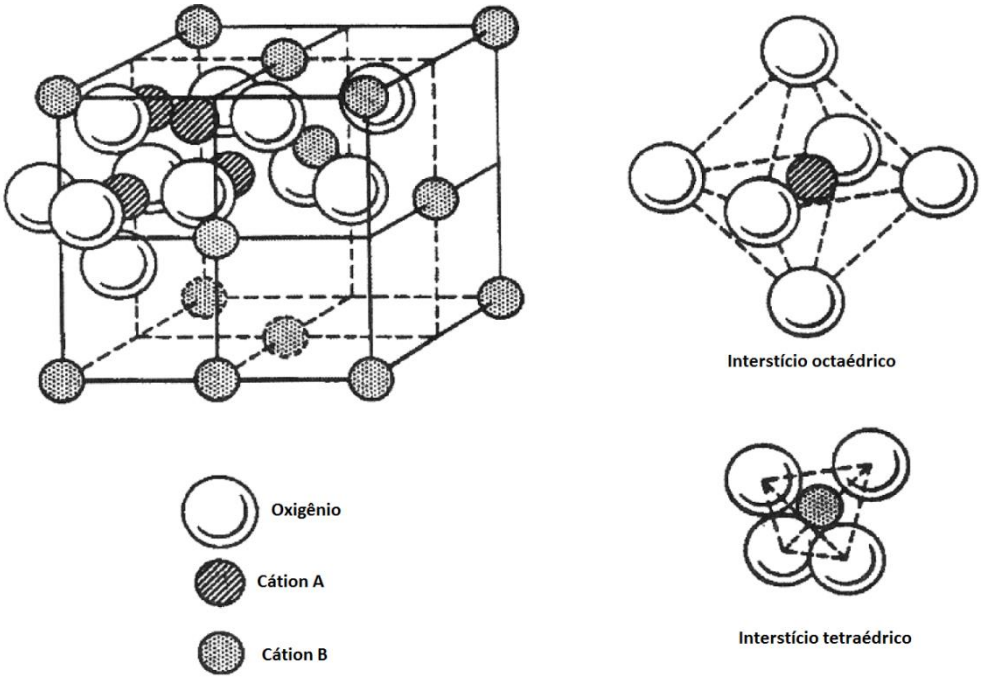
O material deixa de apresentar comportamento superparamagnético quando temperatura do sistema é menor que a temperatura de bloqueio, ou seja, quando a energia magnética se torna superior à variação da energia térmica. A susceptibilidade magnética de um material superparamagnético está compreendida entre os valores para materiais ferromagnéticos e paramagnéticos. A propriedade mais interessante dos materiais superparamagnético é a ausência de histerese. Um campo externo é capaz de alinhar os momentos magnéticos em uma única direção,

porém, ao remover este campo, os valores do campo coercivo e da magnetização residual tornam-se nulos e a curva M versus H é sigmoidal [7; 10], conforme ilustrado na Figura 3.

1.3.3. Ferritas: estrutura e propriedades

Estruturas do tipo espinélio compõe uma variedade materiais cujo arranjo cristalográfico é baseado no empacotamento cúbico de face centrada. O nome espinélio provém do mineral *spinel*, cuja composição é $MgAl_2O_4$. A fórmula geral de um espinélio é AB_2X_4, na qual A é, geralmente, um íon metálico divalente, B um íon metálico trivalente e X um ânion divalente. Porém, quando um material é composto por ânions de oxigênio e por cátions de Fe(III), a denominação mais utilizada é a ferrita. Dentro da estrutura do espinélio, os cátions metálicos podem ocupar dois interstícios formados pelos íons de oxigênios, que são os sítios tetraédricos e octaédricos. A preferência de determinado cátion por sítios tetraédricos ou octaédricos está relacionada à sua configuração eletrônica, à energia eletrostática e, principalmente, ao tamanho do raio [11]. Dessa forma, é esperado que cátions menores tenham preferência em ocupar os sítios tetraédricos, uma vez que este são coordenados por quatro oxigênios, resultando em interstício de menor volume. É o que ocorre no caso da magnetita. A célula unitária da magnetita é composta por 32 íons O^{2-} distribuídos em posições cúbicas ao longo da direção [110] [12]. Os sítios tetraédricos são ocupados exclusivamente pelos íons de Fe(III) – de menor raio, enquanto os sítios octaédricos são ocupados por íons de Fe(II) e Fe(III). Para tornar a visualização da ocupação dos íons dentro da célula unitária mais clara, um sítio tetraédrico é representado pelo cátion metálico como centro do tetraedro e oxigênios ocupando seus vértices, enquanto que o sítio octaédrico corresponde a um cátion metálico ocupando o centro do octaedro (geralmente o meio da aresta da célula unitária) e os oxigênios ocupando os vértices do octaedro, como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4. Representação da célula unitária de estrutura do tipo espinélio inverso.



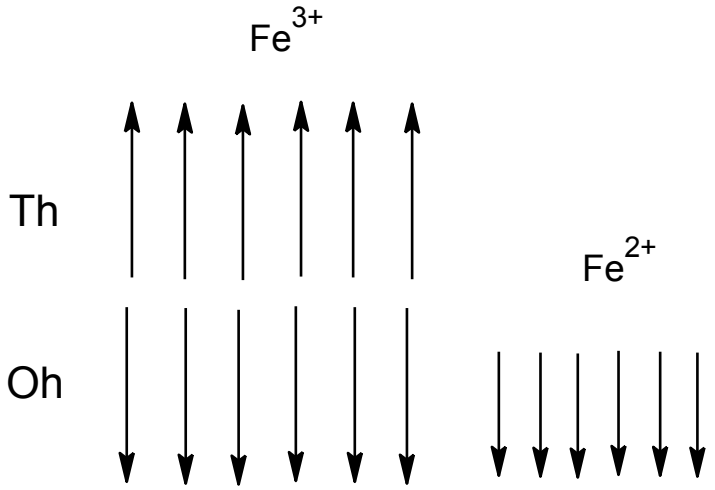
Fonte: Adaptado de Kalendová [9]

A maghemita apresenta estrutura cristalina similar à magnetita. A principal diferença está no estado de oxidação dos íons de ferro – todos ou a maior parte se encontram no estado trivalente. Os íons de Fe(II) deixam de participar da estrutura cristalina, deixando vacâncias. Assim como a magnetita, a célula unitária da maghemita contém 32 O^{2-} distribuídos em posições cúbicas ao longo da direção [1 1 0]. No entanto, os sítios tetraédricos são ocupados por oito íons Fe(III) e os sítios octaédricos são ocupados, randomicamente, pelos Fe(III) restantes [14 – 16].

As propriedades magnéticas das ferritas surgem em decorrência da sua estrutura. A posição de cada íon na estrutura das ferritas permite a sobreposição da função de onda do orbital p do oxigênio com as funções de ondas dos orbitais 3d dos cátions. Os elétrons desemparelhados do oxigênio polarizam os cátions, resultando em acoplamento antiparalelo devido simetria dos orbitais envolvidos. Essa interação é chamada de super-troca. A configuração de menor energia consiste no alinhamento dos momentos magnéticos do sítio tetraédrico paralelamente entre si e antiparalelamente em relação aos sítios octaédricos [10]. Na magnetita, por exemplo, os íons de Fe(III) que ocupam os sítios tetraédricos

apresentam o mesmo momento magnético dos íons Fe(III) situados nos sítios octaédricos, porém com os sentidos opostos, cancelando a resultante da magnetização. Assim, o valor da magnetização da magnetita é resultado apenas do momento magnético do íon Fe(II), como pode ser observado na Figura 5.

Figura 5. Esquema da orientação e distribuição dos momentos magnéticos nos sítios tetraédricos (Th) e Octaédricos (Oh) da magnetita.



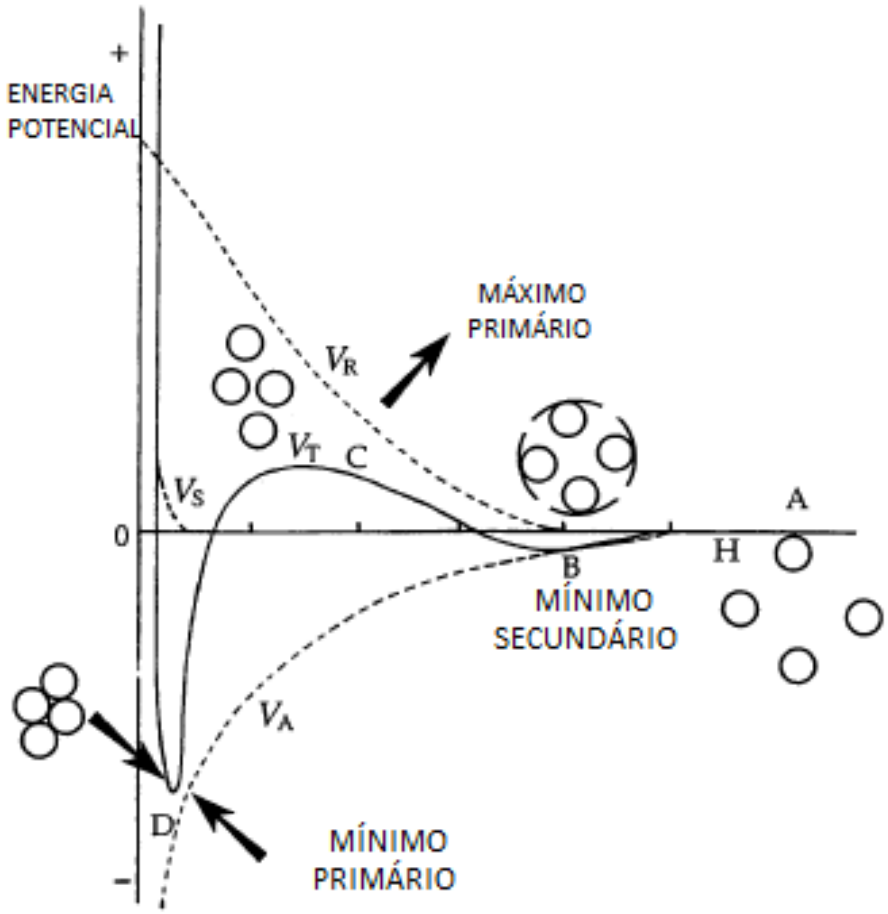
Fonte: Elaborado pelo autor.

1.3.4. Estabilização das nanopartículas magnéticas

A estabilização das nanopartículas de óxido de ferro é uma etapa importante para obtenção de um fluído estável contra agregação em meio biológico ou pela aplicação de campo magnético. A teoria mais aceita que explica a estabilidade coloidal de suspensões foi desenvolvida por Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek (DLVO). De acordo com esta teoria, a estabilidade de uma dispersão depende da energia de interação em função das distâncias que uma partícula matém das outras. A energia de interação, V_T, é o somatório das energias envolvidas na sobreposição da dupla camada elétrica (forças repulsivas, V_R) e na energia de London e van de Waals (forças de carácter atrativo, V_A). A energia de repulsão proveniente da dupla camada decai exponencialmente em função da distância entre duas partículas e a

energia de atração de van de Waals decresce inversamente com o aumento da distância entre as partículas, como pode ser observado na Figura 6 [17].

Figura 6. Representação esquemática de uma curva de energia de interação em função da distância entre partículas.



Fonte: Adaptado de Islam [18]

Quando a distância entre duas partículas for grande, a energia atrativa de van der Waals e a energia repulsiva da dupla camada elétrica não apresentaram efeitos sobre o comportamento da partícula, como pode ser observado na região A. A diminuição da distância entre as partículas leva a um aumento das energias V_A e V_R. Como o termo V_R aumenta mais lentamente que o termo V_A em longas distâncias, o caráter atrativo será predominante na região B, na qual é observada a presença de

um mínimo secundário cuja agregação é reversível. Diminuindo ainda mais a distancia entre as partículas, o valor do termo V_R apresenta efeito repulsivo muito mais forte sobre as partículas, resultando em uma barreira energética que inibe a atração das partículas, como observado na região C. Este comportamento ocorre até que uma distância crítica é atingida, na qual as forças atrativas de van der Waals se sobrepõem as forças repulsivas da dupla camada elétrica, resultando em coagulação irreversível, representada na região D. A energia cinética rege o comportamento da atração entre duas partículas. Se a energia cinética após a colisão entre duas partículas for grande o suficiente para ultrapassar a barreira potencial haverá coagulação no mínimo primário. Dispersões estáveis e/ou fraca agregação (mínimo secundário) são obtidas se as partículas não possuírem energia cinética suficiente para ultrapassar a barreira de potencial. As partículas que se encontram na região do mínimo secundário podem ser facilmente dispersas pela mudança do solvente, força iônica ou através de agitação [18]. Se a barreira de energia potencial é alta comparada com a energia térmica, kT, das partículas, a suspensão é estável. Geralmente, uma barreira energética com kT superior a 25 é suficiente para estabilizar uma suspensão por tempo indeterminado. Isto corresponde a valores de potencial zeta de superfície maiores que 30 mV, em módulo [14].

A estabilização pode ser provocada pela adsorção de cargas, polímeros ou surfactantes sobre a superfície das nanopartícula. O mecanismo de estabilização pode ocorrer por dois efeitos: via estabilização eletrostática e/ou via estabilização estérica. Na estabilização eletrostática, as cargas sobre a superfície de duas partículas são capazes de evitar agregação pela repulsão da dupla camada elétrica interpartículas. Já na estabilização estérica são observados dois efeitos devido à interpenetração da cadeia de polímero ou surfactante. Ao se aproximas duas partículas é observado um efeito osmótico, devido ao aumento na concentração de espécies adsorvidas e um efeito entrópico, devido a perda de graus de liberdade de movimentação das cadeias poliméricas. Estes efeitos causam diminuição da entalpia e entropia, respectivamente. A estabilização ocorre quando ao solvente desloca-se para solvatar novamente as partículas, gerando uma barreira que dificulta a aproximação das partículas, e pela retomada da entropia, na qual forças repulsivas afastam as partículas devolvendo grau de liberdade do movimento das cadeias

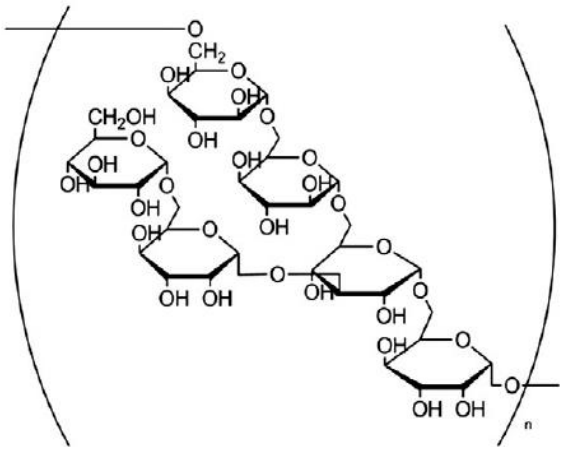
poliméricas [19]. O revestimento nos óxidos de ferro diminui sua energia de superfície, evitando agregação, e, também, evita que estes materiais percam suas propriedades magnéticas devido à oxidação.

O termo “core@shell”, traduzido para o português como caroço@casca, foi cunhado por cientistas na década de 1990. Nas décadas anteriores, os estudos estavam concentrados na caracterização das nanopartículas simples, cujas propriedades são mais interessantes que seu estado *bulk*. Entretanto, com o avanço tecnológico e a necessidade de se obter materiais multifuncionais, os compósitos e estruturas do tipo caroço@casca passaram a atrair mais atenção na área da pesquisa. Como o próprio nome sugere, estruturas do tipo caroço@casca compreendem um núcleo recoberto por uma camada externa, denominada casca [20]. Os materiais utilizados como revestimento são de interesse da comunidade científica, pela capacidade de funcionalização, aumentando as possibilidades de aplicações de um mesmo material. No caso das nanopartículas magnéticas aplicadas a biomedicina, óxidos de ferro compõem o caroço, enquanto a casca é composta por materiais inorgânicos (ouro e sílica, por exemplo) e/ou poliméricos (PVA, amido, quitosana, dextrana) [15].

Para realização deste trabalho foi escolhido como opção de estabilização dos óxidos de ferro os polissacarídeos, pois são biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos, renováveis e possuem grupos reativos capazes de funcionalizar as partículas magnéticas e também ancorar sobre sua estrutura moléculas específicas, tais como proteínas, anticorpos e drogas [4; 21]. Os polissacarídeos são grupos de biopolímeros compostos por unidades repetidas de sacarídeos, unidos através de ligações glicosídicas, formando estruturas lineares ou ramificadas, como é o caso da dextrana (Figura 7). Embora ocorram ramificações, as dextranas comerciais disponíveis no mercado apresentam alto grau de solubilidade em água. Entretanto, a principal característica das dextranas está no prolongado tempo de circulação no sangue, permitindo seu uso como carreadores de fármacos, aumentando a disponibilidade de agentes terapêuticos durante o tratamento [22]. Depois de infusão intravenosa, aproximadamente 70% da dextrana (MM = 40 kDa) é excretada do tecido fisiológico pela urina no período de 24 horas. A porcentagem de dextrana restante é retida por poucos dias e despolimerizada por enzimas no fígado, no baço e no trato gastrointestinal [21]. Dessa forma, é possível desenvolver um sistema de

liberação que é incapaz de liberar seu princípio ativo antes do mesmo ser colocado em ambiente apropriado. Um sistema de liberação ideal deve responder as necessidades fisiológicas sensíveis às mudanças e, consequentemente, alterar seu perfil de liberação. A dextrana possui um grande número de grupos hidroxilas que em meio aquoso e sob condições extremas de pH e força iônica ideais, podem se dissociar, resultando na mudança de conformação e no comportamento de liberação de drogas [23].

Figura 7. Representação estrutura da dextrana.



Fonte: Adaptado de Dias [21]

A princípio, estruturas caroço@casca podem ser obtidas a partir da dispersão de nanopartículas magnéticas em uma matriz polimérica por duas rotas. A primeira consiste em uma única etapa de síntese, na qual a nanopartícula é produzida *in situ* com a matriz polimérica, enquanto que na segunda maneira tem-se primeiro a etapa de síntese da partícula magnética seguida da encapsulação com o polímero [15; 24], como ocorre pelos métodos de polimerização que serão discutidos na próxima seção.

1.3.5. Métodos de polimerização

Nanopartículas poliméricas podem ser preparadas a partir de polímeros pré-formados ou através da polimerização direta de monômeros. Métodos como a

evaporação de solvente, salting – out, diálises e fluído supercrítico são exemplos de preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados [25]. Diversas técnicas podem ser empregadas na polimerização de monômeros. Entre as diversas rotas de polimerização homogênea, a técnica mais simples é a polimerização *bulk.* Nesta técnica, os monômeros são líquidos e o polímero formado está na forma sólida. A reação é conduzida na ausência de impurezas, porém a viscosidade do sistema aumenta significativamente devido a formação das cadeias poliméricas durante a polimerização. O aumento da viscosidade prejudica a homogeneização do sistema. Dessa forma, os radicais serão acumulados em regiões de baixa homogeneidade, levando a formação de moléculas com diferentes massas molares. A polimerização em solução é uma técnica alternativa para polimerização homogênea, na qual se deve empregar um solvente em que tanto os monômeros e como os polímeros sejam solúveis. O uso de solventes elimina os problemas e consequências relacionados à alta viscosidade do sistema, resultando em um polímero cuja distribuição de massa molar seja menor. Entre as técnicas heterogêneas de polimerização, as nanopartículas poliméricas podem ser obtidas por sistemas emulsionados, garantindo maior controle da forma, do tamanho e da estabilidade das nanopartículas. Os sistemas emulsionados são classificados em polimerização em emulsão, miniemulsão e microemulsão [26]. Os três mecanismos de nucleação das nanopartículas poliméricas relatados na literatura caracterizam o tipo de sistema em que a polimerização ocorre e estão esquematizados na Figura 8.

A polimerização em emulsão consiste na dispersão de monômeros em uma fase contínua. Estes monômeros são estabilizados pela adição de surfactante e a polimerização ocorre pela decomposição de um iniciador, gerando radicais. A polimerização em emulsão inicia em uma situação na qual coexistem grandes gotas de monômeros estabilizadas por surfactantes e micelas vazias. O mecanismo de nucleação consiste na difusão de monômeros das gotas maiores para as micelas onde os radicais estão presentes para iniciar a polimerização. Esta etapa é finalizada quando os monômeros da gota são totalmente consumidos e o polímero fica estabilizado pelo surfactante. Este mecanismo é denominado nucleação micelar [27].

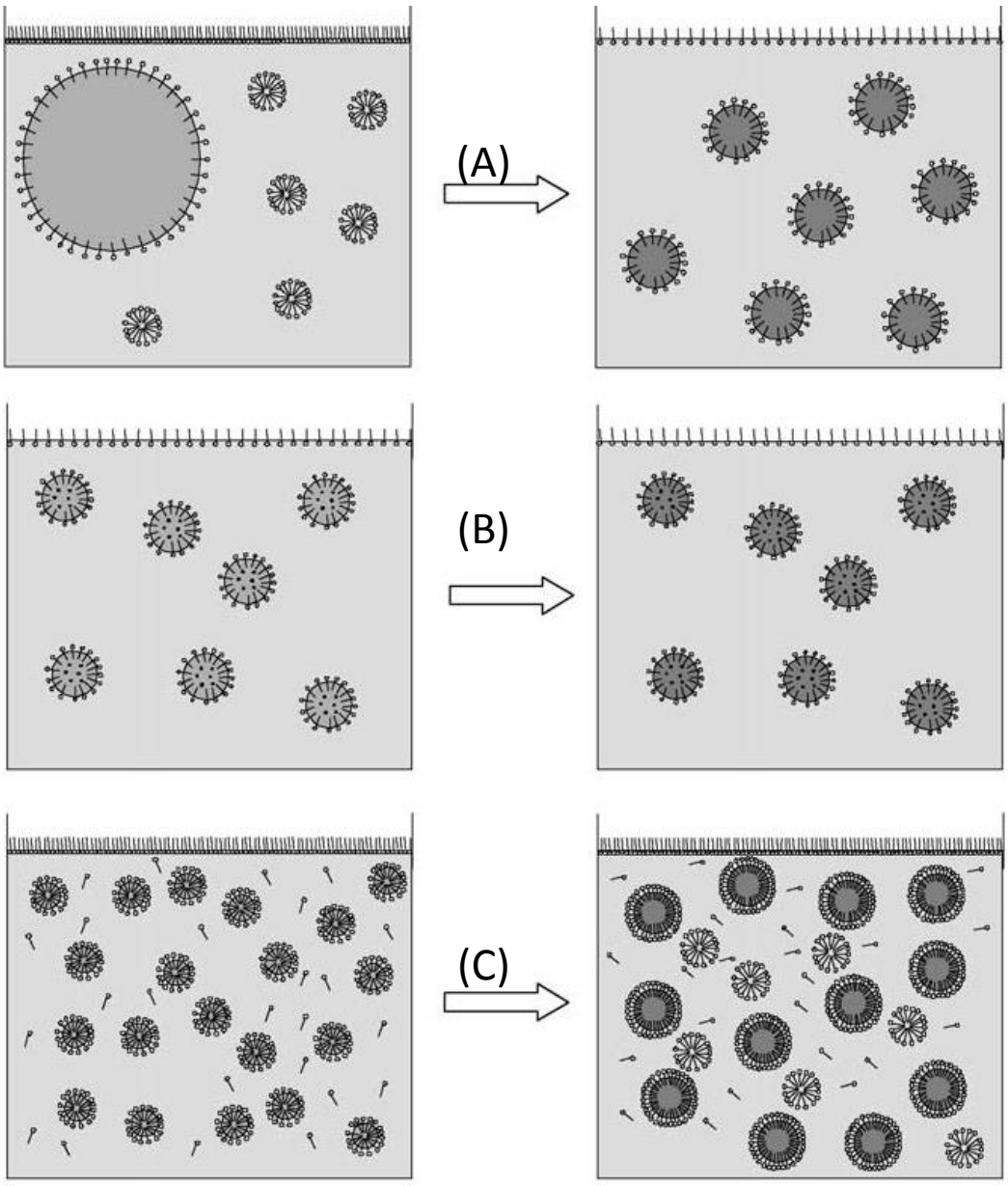
A microemulsão é uma dispersão termodinamicamente estável de, pelo menos, dois líquidos imiscíveis. A microemulsão é formada espontaneamente devido

a grande quantidade de surfactante empregado na sua formulação, diminuindo o valor da tensão interfacial entre a interface água/óleo próximo a zero. Por causa da grande quantidade de surfactante necessária para formar uma microemulsão, a formação de micelas é inevitável e todas as gotas de monômero estão completamente recobertas pelo surfactante. Como a iniciação da polimerização não pode ocorrer em todas as gotas simultaneamente, o mecanismo de nucleação é similar ao caso das emulsões, entretanto são obtidas nanopartículas poliméricas menores. O tamanho das partículas está na faixa de 5 a 50 nm, formando uma dispersão transparente, pois a luz visível não é espalhada pelo diminuto tamanho das partículas [27].

Tal como a polimerização em emulsão, a miniemulsão consiste na dispersão de monômeros em uma fase contínua, conforme observado no esquema da Figura 10. A fase óleo consiste em uma solução contendo surfactante, enquanto a fase aquosa é composta pela mistura de monômeros, iniciador, agente de reticulação cruzada e cosurfactante. A primeira etapa para polimerização via miniemulsão consiste em aplicar um forte sistema de homogeneização, utilizando agitação por rotor estator ou ultrassom. A homogeneização resulta em um sistema disperso na qual pequenas gotículas estão estabilizadas pelo surfactante e cosurfactante. Estas gotículas contendo o monômero e o iniciador atuam como molde para formação do polímero. A segunda etapa consiste na polimerização propriamente dita. A polimerização é desencadeada a partir do momento que ocorre a cisão do iniciador em radicais, podendo ocorrer através de energia térmica, por exemplo. No mecanismo de polimerização via miniemulsão não ocorre difusão de monômeros ou radicais, sendo característica a nucleação dentro gota de monômero. Dessa forma o polímero formado deve apresentar o mesmo diâmetro e distribuição que a gota do monômero [27].

O estado favorável para obtenção do mecanismo de nucleação da gota pode ser atingido ajustando as quantidades de fase aquosa e fase orgânica, quantidade de surfactantes e um forte sistema de homogeneização. O uso de ultrassom, por exemplo, é capaz de reduzir o tamanho da gota de monômero em uma faixa compreendida entre 50 e 500 nm, No inicio da homogeneização, a polidispersividade do sistema aumenta, entretanto, devido à fusão e à fissão das gotas, a polidispersividade diminui e a miniemulsão atinge um estado estável [28].

Figura 8. Comparação dos processos de polimerização para: (A) emulsão, (B) miniemulsão e (C) microemulsão.

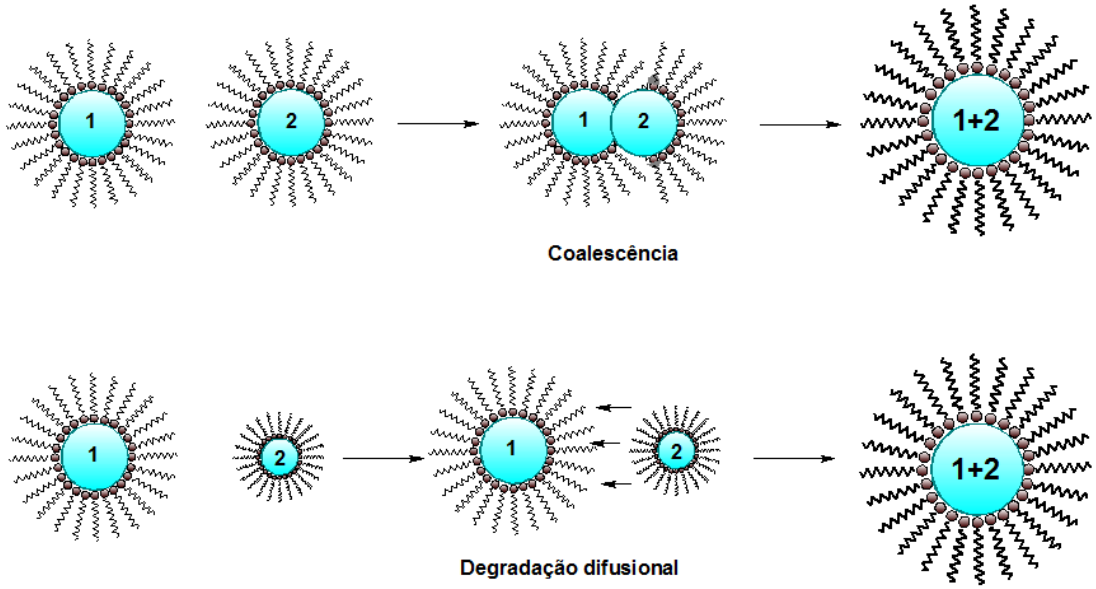


Fonte: Adaptado de Antonietti [26]

A desestabilização das miniemulsões pode ocorrer em função da coalescência e/ou através da degradação difusional (Ostwald ripening), esquematizado na Figura 9. A coalescência ocorre quando há ruptura da camada superficial de duas partículas, devido aos choques causados pelo movimento Browniano. A coalescência pode ser evitada pela adição de surfactante, pois além

de aumentar a camada superficial promove a estabilização estérica das nanopartículas poliméricas. A degradação difusional consiste na transferência de massa de partículas menores para partículas maiores. Isto ocorre devido à pressão osmótica dentro das gotas pequenas ser muito maior que em gotas maiores, favorecendo a difusão de forma a aumentar a estabilidade termodinâmica [29]. A degradação difusional é suprimida pela adição de um cosurfactante. É desejável que o cosurfactante seja insolúvel na fase dispersa, aumentando assim a pressão osmótica dentro da gota de monômero e evitando que o monômero passe para a fase contínua por difusão [30].

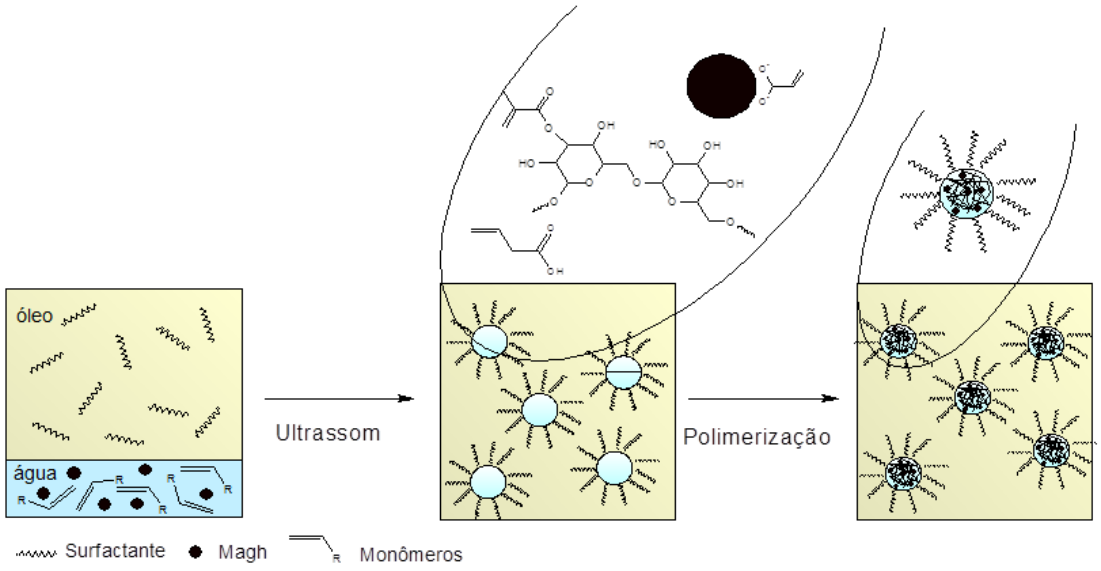
Figura 9. Representação dos mecanismos de degradação da miniemulsão inversa.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dessa forma, com o aumento da intensidade de homogeneização, são formadas gotas menores e a quantidade de surfactante necessário para estabilizar estas gotas é maior, reduzindo o número de surfactantes livres para formação de micelas [28]. Por razões óbvias, é importante maximizar a fração de partículas formadas pela nucleação de gotas para reduzir a possibilidade ocorrer mecanismos diferentes de nucleação.

Figura 10. Esquema do processo de polimerização por miniemulsão inversa.



Fonte: Elaborado pelo autor.

1.3.6. Aplicações biomédicas de nanopartículas magnética

As nanopartículas magnéticas utilizadas na biomedicina podem ser classificadas de acordo com seu local de aplicação: *in vivo* ou *in vitro*. As aplicações *in vivo* podem ter ação terapêutica, como no caso da liberação controlada de drogas e/ou a hipertermia magnética, ou uso no diagnóstico de doenças, atuando como agente de contraste em ressonância magnética nuclear. As nanopartículas magnéticas também podem ser empregadas na separação seletivas de biomoléculas para aplicações *in vitro* [16].

O principal benefício do uso das nanopartículas magnéticas na liberação controlada de drogas reside no uso de gradiente de campo magnético externo para atrair as partículas para um local específico do corpo e mantê-las neste sítio durante a ação terapêutica. As vantagens no uso de sistemas de liberação controlada estão relacionadas à sua biodistribuição no organismo, pois a droga deve permanecer por períodos mais longos na circulação, diminuindo assim o número de doses necessárias para ação terapêutica. A concentração do sistema de liberação em um

sítio específico no corpo diminui a necessidade de grandes doses para garantir alta concentração local, reduzindo a toxidez e o desconforto causado por efeitos colaterais [31].

A droga pode ser conjugada ao sistema de liberação do tipo caroço@casca através de ligações químicas ou interações intermoleculares entre a droga e os grupos funcionais presentes na superfície da “casca”, ou ainda, pode estar inserida dentro de poros. A liberação ocorre quando estímulos químicos ou físicos, tais como a variação de pH, temperatura e força iônica, modificam o meio em que o material está disperso. Estes estímulos provocam mudanças nas características iniciais do sistema, com a conformação das cadeias poliméricas, solubilidade, mudança de fase, facilitando a liberação de drogas.

A hipertermia magnética é outro procedimento terapêutico utilizado para provocar apoptose de células tumorais através do aumento da temperatura em uma região específica do corpo. A hipertermia magnética é um tratamento seletivo, pois diferente de células sadias, a variação de temperatura é prejudicial apenas às células tumorais. De uma forma geral, o procedimento consiste na internalização das nanopartículas magnéticas nas células problemáticas, seguido da aplicação de campo alternado com força e frequência suficiente para causar o aquecimento das nanopartículas. O calor gerado é dissipado para o tecido doente até a destruição das células tumorais, que ocorre na temperatura de 41 a 46°C, aproximadamente. Vários componentes da célula são afetados pelo aumento da temperatura, tais como membrana, citoesqueleto, síntese de macromoléculas ou ainda reparos na fita do DNA. Os mecanismos molecular/biológico causado pelo aumento da temperatura ainda estão sob investigação, mas seus efeitos são os responsáveis pela apoptose celular [2; 16; 32; 33].

O aquecimento ocorre quando um campo magnético alternado é aplicado as nanopartículas magnéticas, dissipando calor durante a reorientação da magnetização do material. Os primeiros testes de hipertermia magnéticas foram realizados por Gilchrist *et al* [34], quando nanopartículas de maghemita com diâmetros compreendidos entre 20 e 100 nm foram expostas a campo magnético alternado de 1,2 MHz. A frequência do campo magnético não pode ser aumentada infinitamente, uma vez que pode estimular músculos periféricos e cardíacos,

causando danos a estes tecidos. O emprego de altas frequências faz da hipertermia magnética um tratamento não seletivo, pois acima de determinada frequência, as células sadias também serão afetadas pelo aquecimento. A faixa de trabalho ideal, segundo Babicova *et al* [35], deve ser de 100 a 1000 kHz. O tamanho e a morfologia das nanopartículas magnéticas apresentam forte dependência na capacidade de aquecimento, devendo ser escolhido uma rota sintética ideal para obter controle na temperatura. A hipertermia magnética é uma ferramenta poderosa no tratamento de tumores, porém necessita de desenvolvimento de equipamentos capazes de aplicar campo magnético alternado. Atualmente, já existe tecnologia para a área de hipertermia magnética no mercado, como, por exemplo, a MagForce Nanotecnologies [36]. Entretanto, a limitação da técnica reside na incapacidade de localizar o tumor, impedindo seu uso na medicina preventiva para descoberta de tumores em estágio inicial.

As aplicações *in vivo* com ações terapêuticas supracitadas são complementas pelo uso das nanopartículas magnéticas como agente de contraste em diagnósticos por ressonância magnética nuclear por imagens. O diagnóstico por ressonância magnética é uma técnica não invasiva e está baseada no alinhamento de prótons de hidrogênio a um campo magnético externo. Os prótons são oriundos principalmente de moléculas de água do próprio tecido. A emissão de uma onda pulsada na frequência de rádio aplicada transversalmente ao campo magnético provoca perturbação nos prótons. A imagem é obtida pela conversão da radiação emitida pelos prótons enquanto os mesmos retornam ao estado inicial. O fenômeno da retomada das posições iniciais dos prótons é chamado de relaxação e é dividido em duas componentes: a relaxação longitudinal e relaxação transversal. A anatomia do tecido é mapeada uma vez que prótons de diferentes tecidos apresentam velocidade diferente de relaxações. Agentes de contraste são aplicados com intuito de melhorar a resolução das imagens através do contraste obtido pela variação dos tempos de relaxação. O aumento da velocidade de relaxação produzido por nanopartículas magnéticas ocorre por mecanismos complexos. As partículas magnéticas apresentam grande momento magnético na presença de campo estático e as interações dipolares entre as nanopartículas e os prótons do solvente resultam no aumento da relaxação transversal e longitudinal, gerando contraste nas imagens. O potencial uso de ressonância magnética por imagens reside na possibilidade de

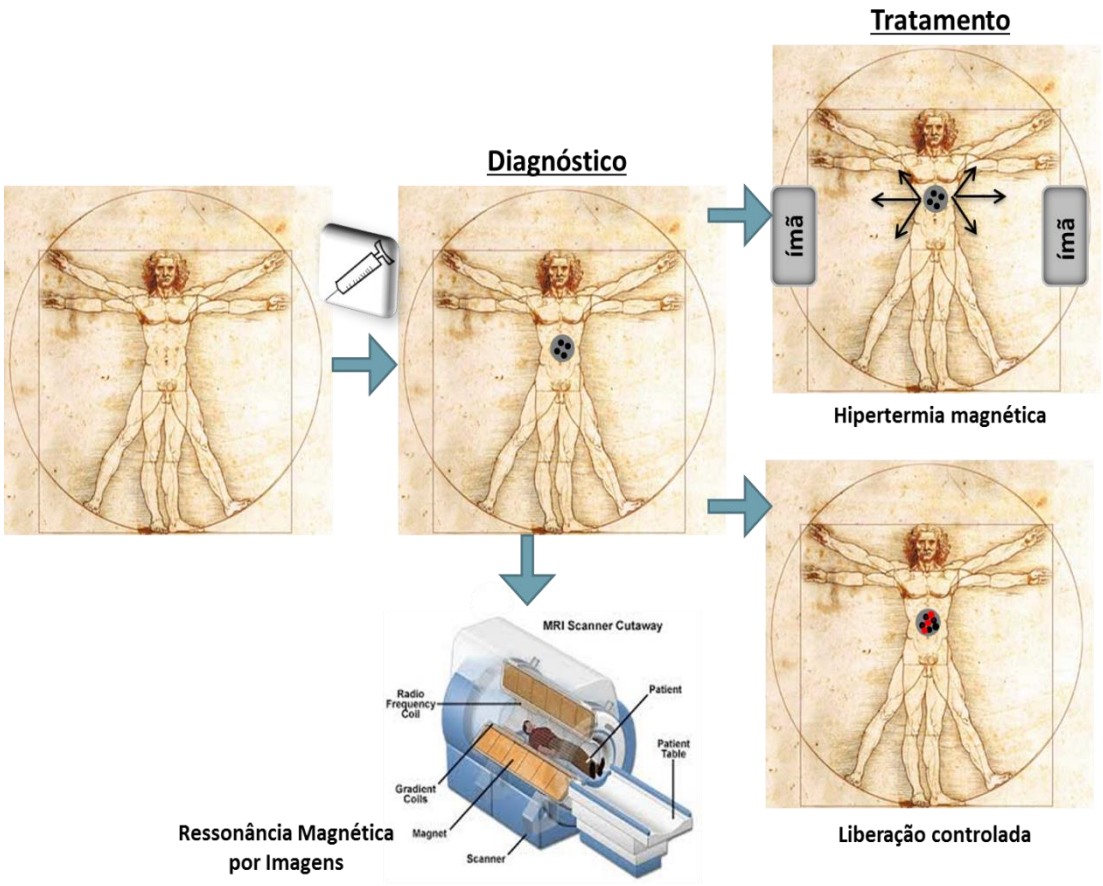
diagnosticar o avanço de inflamações ou tumores, por exemplo. A atividade metabólica de células sadias é diferente das células tumorais, podendo monitorar o avanço de um tumor através da diferença no tempo de relaxação de uma célula saudável e de uma célula problemática [2; 16; 37; 38]. Atualmente, alguns produtos a base de óxidos de ferro superparamgnéticos já estão sendo comercializados como agente de contraste de imagem, tais como o Feridex®, o Endorem ™, o GastroMARK ®, o Lumirem ®, o Sinerem ® e o Resovist ®.

As pesquisas com nanopartículas magnéticas para aplicações *in vivo* buscam unir em um único compósito as características necessárias para diagnosticar e tratar um paciente simultaneamente. A proposta é baseada na detecção da localização exata de tumores através da ressonância magnética nuclear, seguido da concentração das nanopartículas magnéticas nestes sítios detectados, através da utilização de campo magnético externo para promover o tratamento, seja por liberação de drogas, seja por hipertermia magnética, conforme esquematizado na Figura 11.

Como citado anteriormente, as nanopartículas magnéticas precisam ser recobertas ou encapsuladas para evitar a oxidação e promover a estabilização do coloide. Os materiais utilizados precisam apresentar biocompatibilidade para uso em biomedicina. As nanopartículas de magnetita e maghemita são comumente empregadas em biomedicina, por serem mais biocompatíveis do que outras ferritas, tais como a ferrita de cobalto e níquel. O ferro da magnetita é facilmente metabolizado pelo organismo, enquanto o cobalto e o níquel, em altas concentrações, podem ser prejudiciais. De uma forma geral, nanopartículas de magnetita com diâmetros menores que 10 nm são rapidamente removidas pelos rins. Partículas com diâmetros compreendidos entre 100 e 200 nm são removidas pelo sistema de reticuloendotelial, seja por células do baço, seja por macrófagos presente no sangue. As partículas que apresentam maior tempo de circulação estão na faixa de 10 a 100 nm [21]. Embora o sistema de liberação só apresente vantagens quando comparado com sistemas convencionais de administração de drogas, alguns problemas precisam ser superados, como a embolização das nanopartículas magnéticas na corrente sanguínea, bloqueando a circulação, e a profundidade que o campo magnético externo consegue penetrar para guiar partículas em um tecido não superficial ao corpo [39; 40]. A limitação do uso de campo externo pode ser contornada

pela introdução de magnetos localizados próximo ao alvo de estudo através de cirurgia invasiva, como estudado por Fernandez-Pacheco et al [41] e Yellen et al [42].

Figura 11. Representação esquemática das aplicações de nanopartículas magnéticas em biomedicina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A separação de biomoléculas vem resultando em um campo promissor para o uso de nanopartículas magnéticas aplicadas *in vitro*. A extração em fase sólida é um meio eficaz de isolar e pré-concentrar biomoléculas de uma matriz, embora consuma muito tempo. A funcionalização da superfície de nanopartículas magnéticas com moléculas específicas é uma maneira mais rápida e tão eficaz quanto à extração em fase sólida. O método consiste em adicionar as nanopartículas à amostra e aguardar que as moléculas alvos se liguem as nanopartículas modificadas. Utilizando um campo magnético externo, um ímã, por exemplo, separa as nanopartículas com as moléculas alvo da matriz [16]. Kits de separação para diversas biomoléculas já estão

disponíveis no mercado, através da modificação da superfície das nanopartículas com enzimas, DNA, anticorpos, por exemplo, comprovando a eficácia do método.

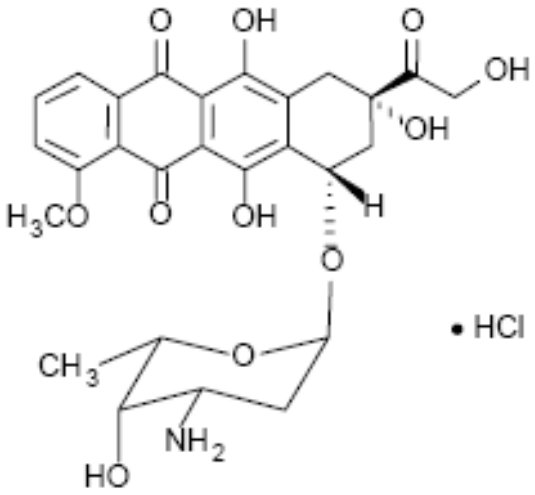
1.3.7. A doxorrubicina

Diversas drogas podem ser utilizadas no estudo de liberação controlada de fármaco. A doxorrubicina foi escolhida por ser comumente utilizada como agente terapêutico em tratamento de diversos tipos de câncer. Segundo a base de dados Scopus, foram publicados mais de 2400 artigos contendo doxorrubicina e nanopartículas magnéticas. A grande quantidade de artigos publicados utilizando a doxorrubicina como droga modelo é devido ao grupo antraciclina, responsável pela fluorescência intrínseca desta molécula. Através da obtenção de imagens baseada na microscopia de fluorescência é possível observar a distribuição da doxorrubicina em tecidos ou células. Assim, com o auxílio das propriedades magnéticas de nanopartículas de óxido de ferro é possível modificar a biodistribuição desta droga através da vetorização a um sítio específico, reduzindo a toxicidade que limita o uso da doxorrubicina. Outro fator que amplia o uso da doxorrubicina como droga modelo deve-se as características físico químicas desta molécula. A doxorrubicina é anfifílica e anfotérica, permitindo que sua molécula seja incorporada tanto em materiais hidrofílicos como em materiais hidrofóbicos, dependendo das condições de pH do meio [43].

O cloridrato de doxorrubicina (Figura 12) é um antibiótico antiblástico antraciclínico isolado de culturas de *Streptmocyces peucetius var.caesius*. O mecanismo de ação do cloridrato de doxorrubicina está relacionado à sua capacidade de se ligar ao DNA e inibir a síntese do ácido nucléico. Estudos em culturas de células mostram a rápida penetração do antibiótico nas células e sua localização principalmente na cromatina perinucleolar. A inibição rápida da atividade mitótica e da síntese do ácido nucléico foi demonstrada juntamente com o aparecimento de aberrações cromossômicas. Há relatos de estudos em animais os quais mostraram que o cloridrato de doxorrubicina é ativo em grande número de tumores experimentais e é imunossupressor. Todavia, provoca uma variedade de efeitos tóxicos, tais como toxidade cardíaca em coelhos e

ratos, atrofia dos testículos em ratos e cachorros e mielossupressão em várias espécies experimentais [44; 45].

Figura 12. Representação da estrutura do cloridrato de doxorrubicina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2. Material e método

2.1. Reagentes utilizados

Todos os reagentes utilizados na síntese e caracterização das amostras apresentam pureza analítica e foram utilizados sem nenhum tratamento prévio para promover a purificação dos mesmos. Os polímeros e monômeros empregados foram: Dextrana 6 kDa e 40 kDa (Sigma Aldrich), glicidil metacrilato (97%, Sigma Aldrich), N,N' – metilenobisacriilamida (99%, Sigma Aldrich), ácido acrílico (90%, Alfa Aesar), Monoestearato de sorbitan – Span 60 (Sigma Aldrich), Monooleato de sorbitan – Span 80 (Sigma Aldrich), polioxietileno 20 monooleato de sorbitan – Tween 80, 4-(dimetilamino)piridina (99%, alfa Aeser). Os sais, ácidos e bases utilizados foram: Cloreto de ferro (II) tetrahidratado (99%, Sigma Aldrich), Cloreto de ferro (III) hexahidratado (97%, Mallincrodt), persulfato de amônio (Mallincrodt), bissulfito de sódio (97%, Mallincrodt), cloreto de sódio (99,9%, Sigma Aldrich), ácido clorídrico (37%, Quemis) e hidróxido de sódio (97%, Synth), fosfato de sódio monobásico anidro, fosfato de sódio dibásico anidro, cloridrato de doxorrubicina (Comercial, Eurofarma 50 mg). Foram utilizados como solvente n-heptano (99,9%, Mallinckrodt), n-hexano (98,5%, Synth), DMSO (99%, Merck). Para as sínteses que necessitaram de uma atmosfera livre de oxigênio e inerte foi utilizado gás nitrogênio (N_2) ou argônio (Ar) comercial.

As estruturas químicas dos principais reagentes empregados neste trabalho estão representadas na Figura 13.

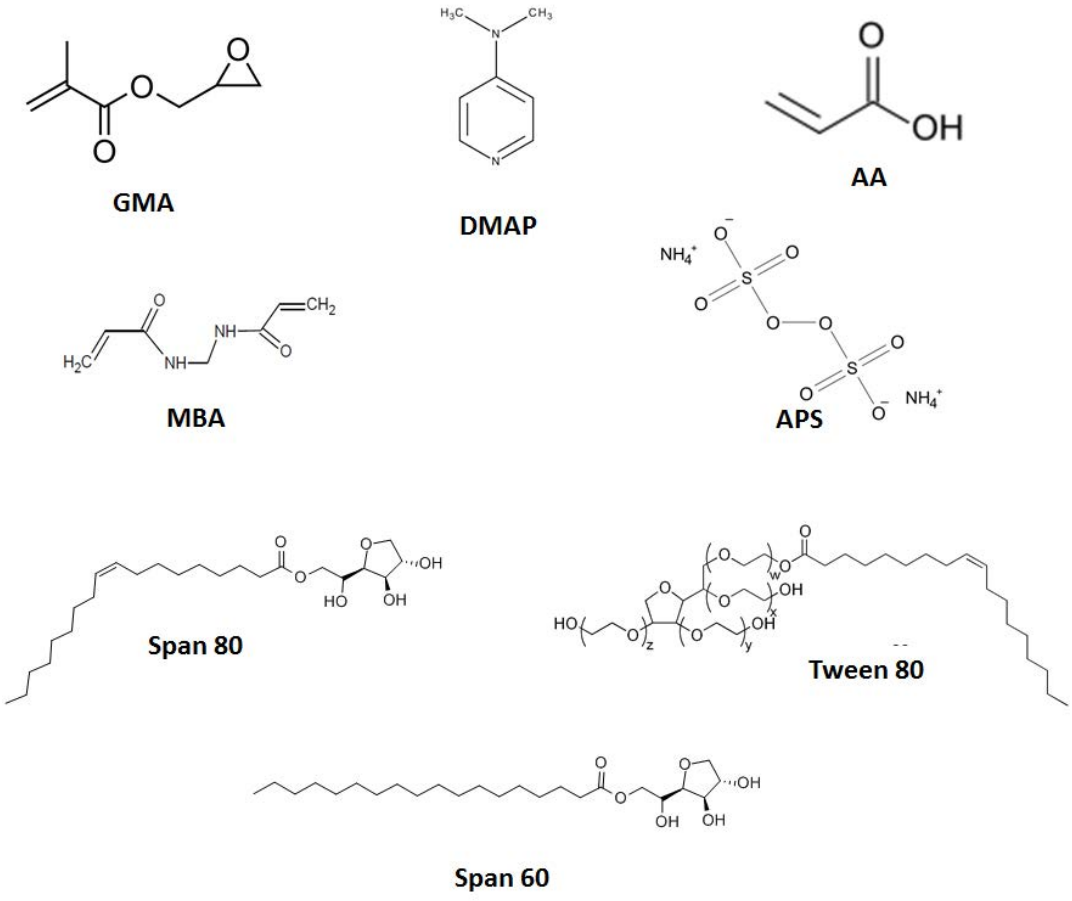
2.2. Síntese e modificação dos óxidos de ferro

As nanopartículas magnéticas de maghemita foram sintetizadas a partir da oxidação da magnetita obtida pelo método da coprecipitação [46]. A oxidação se deu pelo borbulhamento de ar na ausência de atmosfera inerte [47]. Na sequência serão descritos os protocolos para obtenção dos óxidos de ferro.

A magnetita foi sintetizada pelo método da coprecipitação de sais de Fe(II) e Fe(III) em meio alcalino. Foi preparado uma solução contendo 0,08 mol de $FeCl_3.6H_2O$ e 0,04 mol de $FeCl_2.4H_2O$ em 500,0 mL de água. A esta solução foi

adicionado 1,00 mL de HCl concentrado com a finalidade de prevenir a oxidação dos íons Fe(II), bem como a hidrólise dos íons de ferro. Também foi preparado 500,0 mL de uma solução de NaOH 1,5 mol L^{-1}. A água deionizada utilizada no preparo das soluções foi desgaseificada em banho de ultrassom por 15 minutos antes do uso. A solução contendo os íons de ferro foi adicionada lentamente sobre a solução alcalina sob agitação mecânica constante (2000 rpm), fluxo de gás N_2 e temperatura ambiente durante 20 minutos. Ao término da reação é observada a formação de um precipitado preto. O material obtido foi lavado diversas vezes para remoção do excesso de base até que fosse atingido pH igual a 9. A lavagem consistiu em diversos ciclos de adição de água deionizada seguido de decantação das partículas por aplicação de campo magnético

Figura 13. Estruturas químicas dos principais reagentes empregados nas sínteses.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A suspensão de magnetita obtida foi diluída em 300,0 mL de água e o pH do meio foi ajustado em 3,5 pela adição de solução de HCl 1,0 mol L^{-1}. A suspensão foi aquecida em banho de água à temperatura de 98 ºC, sob constante agitação magnética. O sistema foi mantido sob fluxo de ar (oxidante) durante o período de 3 horas. Ao término da reação o sistema foi resfriado a temperatura ambiente e o volume da suspensão foi reduzido por centrifugação. O material foi lavado quatro vezes com água deionizada e dialisado em membrana de acetato de celulose. Para promover a dispersão, o material foi colocado em um ultrassom de ponteira por 5 minutos e o mesmo recebeu a nomenclatura Magh.

A superfície dos óxidos de ferro foi modificada com ácido acrílico para posterior encapsulação com polímeros. Uma alíquota de 3,0 mL de Magh (aproximadamente 54,4 g L^{-1} de ferro) foi misturada em 2,0 mL de ácido acrílico 0,10 mol L^{-1}. A suspensão foi mantida em agitação por tombamento durante 48 horas. O ácido acrílico não adsorvido sobre a superfície do óxido de ferro foi removido através de diálise em água.

2.3. Derivatização da dextrana

O processo de derivatização permite incluir grupos funcionais específicos sobre a estrutura da dextrana. O intuito de derivatizar a dextrana com a o glicidil metacrilato (GMA) é incorporar grupos vinílicos para promover reações de polimerização. Foram derivatizadas dextranas com diferentes massas molares (6 kDa e 40 kDa).

Em um balão de 3 bocas 1,50 g de dextrana foram solubilizados em 30,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) sob agitação magnética e fluxo de N_2 constante. Após a dissolução completa, foi adicionado como catalisador da reação 2,4 mmol de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) e o sistema foi aquecido até a temperatura de 45 ºC. Ao atingir a temperatura de reação, 4,8 mmol de GMA foram adicionados sobre o meio reacional. O sistema permaneceu sob agitação, fluxo de gás e aquecimento durante 24 horas antes da reação ser interrompida pela adição de 2,4 mmol de HCl concentrado. Após resfriamento a temperatura ambiente o polímero foi precipitado em acetona gelada e removido por centrifugação. O precipitado foi dialisado e

liofilizado, obtendo-se flocos brancos. O material foi denominado Dex_GMA_X, na qual X corresponde a massa molecular da dextrana utilizada.

2.4. Polimerizações

O ácido acrílico e a dextrana derivatizada foram polimerizados pelo método da miniemulsão inversa. A fase contínua foi composta de 40,0 mL de uma solução de surfactante (Span 60 ou Span 80) em n-heptano, variando-se as concentrações em 2%, 3% e 4% (m/m). A fase dispersa foi obtida pela dissolução, em 3,0 mL de água deionizada, de quantidades apropriadas de ácido acrílico, Dex_GMA, NaOH ($1{,}12 \times 10^{-3}$ mol), MBA ($9{,}7 \times 10^{-5}$ mol) e APS ($2{,}2 \times 10^{-4}$ mol), conforme a Tabela 1. A miniemulsão foi formada pela mistura da fase dispersa e contínua em um homogeneizador tipo Turrax com velocidade de 20000 rpm durante 2 minutos em banho de gelo - evitando a decomposição do iniciador por aquecimento. Na sequência, ultrassom de ponteira foi aplicado ao sistema por 30 minutos, utilizando amplitude de 30%. O material foi transferido para um balão de 3 bocas e a temperatura do sistema foi elevada a 80°C, mantendo-se assim por 4 horas sob agitação magnética e fluxo constante de argônio. Após resfriamento, o polímero foi removido por centrifugação a 8000 rpm. O processo de lavagem ocorreu em 2 etapas. Na primeira, o polímero foi lavado três vezes com hexano. O solvente foi parcialmente evaporado e o polímero disperso em 8,0 mL de água deionizada e 2,0 mL de solução aquosa de 0,5% de tween 80. Após total dispersão do polímero, o material foi dialisado em água deionizada (segunda etapa).

2.5. Encapsulação de óxido de ferro por polimerização via miniemulsão inversa

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foram encapsuladas através da polimerização via miniemulsão inversa empregado os monômeros de ácido acrílico e dextrana derivatizada na amostra denominada $X_{Dex}65$. A miniemulsão foi obtida tal como na etapa anterior, acrescido de fluído de óxido de ferro modificado com ácido acrílico na fase dispersa, variando as quantidades de óxido de ferro em 50, 100 e 150 mg de óxido. Cinco minutos antes do término da homogeneização no

ultrassom, foram adicionados 1,5 x10^{-4} mol de bissulfito de sódio, agente redox que permite conduzir a polimerização em temperaturas mais baixa. Assim, o material foi transferido para um balão de 3 bocas e a temperatura do sistema foi elevada a 50°C, mantendo-se assim por 4 horas sob agitação magnética e fluxo constante de argônio. As amostras foram denominadas Magh@Dex_X, sendo X a massa de óxido de ferro em miligramas.

Tabela 1. Formulações das sínteses por polimerização via miniemulsão inversa.

Amostra	Span 60 (%m/m)	Span 80 (%m/m)	X_{AA} (%)[a]	X_{Dex_GMA} (%)[b]
PAA_1	2	-	100	-
PAA_2	3	-	100	-
PAA_3		2	100	-
PAA-co-Dex_2		2	50	50
PAA-co-Dex_3		3	50	50
PAA-co-Dex_4		4	50	50
X_{Dex} 25		4	75	25
X_{Dex} 65		4	35	65
X_{Dex} 75		4	25	75

[a] Fração em massa de ácido acrílico

[b] Fração em massa de dextrana derivatizada

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.6. Incorporação da doxorrubicina

O estudo de incorporação de doxorrubicina foi realizado em tampão fosfato, em pH 7,4, empregando diferentes concentrações do fármaco. Uma massa de 5 mg

da amostra Magh@Dex_100 foi dispersa em 2,0 mL de solução de tampão fosfato contendo o fármaco nas concentrações de 0,2 mg mL^{-1}, 0,5 mg mL^{-1} e 0,8 mg mL^{-1}. As dispersões foram mantidas sob agitação magnética durante o período de 24 horas para incorporação do fármaco. Após esse período, as nanopartículas magnéticas foram removidas por centrifugação e os sobrenadantes foram utilizados na análise espectrofotométrica para determinação da eficiência de incorporação. A eficiência de incorporação é determinada considerando a lei de Lambert Beer, A=ab[x], na qual a absorção A é proporcional a concentração [x], a absortividade molar a e ao caminho ótico da cubeta b. A absorção máxima de doxorrubicina ocorre no comprimento de onda de 486 nm, valor fixado para determinação das concentrações do fármaco. A eficiência de incorporação é obtida pela equação 5, na qual C_i corresponde à concentração total de fármaco e C_f corresponde à concentração de fármaco livre, ou seja, fármaco não incorporado.

$$Eficiência\ Incorporação\ \% = \frac{C_i - C_f}{C_i} x100 \qquad (5)$$

2.7. Liberação da doxorrubicina

Uma massa de 25 mg das amostras Magh@Dex_50, Magh@Dex_100 e Magh@Dex_150 foram dispersas em 10,0 mL de solução de fármaco que apresentou melhor eficiência de incorporação. As dispersões foram mantidas sob agitação magnética durante o período de 24 horas para incorporação do fármaco. As amostras foram centrifugadas durante 60 minutos, garantindo que toda a massa de polímero precipitasse. O sobrenadante foi descartado e o precipitado transferido, quantitativamente, para uma membrana de diálise contendo 0,5 mL de tampão fosfato. O material foi dialisado em 5,0 mL de tampão fosfato (pH 7,4) e a liberação foi determinada, em função do tempo, à partir de alíquotas da diálise, utilizando um espectrofotômetro.

2.8. Caracterização

2.8.1. Difração de raios X

Os difratogramas de raios X foram obtidos em um difratômetro Siemens, modelo D5005. O intervalo de varredura 2θ foi de 10° a 80°, com velocidade de varredura de 0,02° por segundo, empregando radiação Cu(Kα).

2.8.2. Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros no infravermelho foram obtidos com o espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier da Shimadzu, modelo 8300. As amostras foram diluídas em brometo de potássio seco. Para coleta dos espectros foram realizadas 128 varreduras entre o intervalo 4000 a 400 cm^{-1}. Os espectros foram obtidos pela técnica de reflectância difusa, que está baseada na penetração do feixe de radiação infravermelho sobre uma ou mais partículas da amostra. A radiação do feixe sai da amostra em diferentes ângulos após percorrer seu interior coletando dados onde são colimados por espelhos e enviados para o detector [48].

2.8.3. Espectroscopia Raman

O espectro de espalhamento Raman foi obtido à temperatura ambiente no intervalo de 200 a 1000 cm^{-1}. Foi utilizado equipamento HORIBA Jobin Yyon, modelo LabRAM HR micro Raman, equipado com 632,8 nm laser, liberando energia de 0,6 mW.

2.8.4. Ressonância magnética nuclear de H^1 e C^{13}

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetro Varian Inova 300 MHz. As amostras foram diluídas em D_2O (aproximadamente 30 mg). A linha de referência empregada na análise foi de 4,8 ppm referente a D_2O.

2.8.5. Potencial Zeta

O potencial Zeta (ζ) foi determinado, indiretamente, em um equipamento Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS. O equipamento calcula o potencial zeta a partir de valores de mobilidade eletroforética, aplicando a equação de Henry (equação 6), na qual U_e corresponde à mobilidade eletroforética, ζ ao potencial zeta, ε à constante dielétrica, n à viscosidade e f(ka) à função de Henry. A mobilidade eletroforética é medida aplicando potencial em cada eletrodo da cubeta. As partículas carregadas migram para o eletrodo de carga oposta quando sua velocidade é determinada. As amostras foram dispersas em solução aquosa de NaCl 0,001mol L^{-1}. Para dispersão das nanopartículas foi utilizada ponteira ultrassônica com amplitude de 25% em modo pulsado (3 segundos ligado e 3 segundos desligado) por 5 minutos. As amostras foram tituladas no intervalo de pH de 2 a 10 e o potencial Zeta foi medido a cada 0,5 unidade de pH [49].

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3n} \quad (6)$$

2.8.6. Espalhamento de luz dinâmico

O diâmetro hidrodinâmico das amostras foi determinado no equipamento Zetasizer Nano ZS, marca Malvern, pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, na qual o detector é posicionado em um ângulo de 173° em relação a luz incidente sobre a amostra, em uma temperatura de 25° C. A técnica de espalhamento de luz dinâmico relaciona o tamanho das partículas com o movimento Browniano. O movimento Browniano refere-se à movimentação das partículas devido a colisões randômicas com as moléculas dos líquidos que as circundam. Dessa forma, o detector registra as flutuações de intensidade de luz espalhada ao incidir um feixe de laser sobre as partículas em movimento, relacionando o tamanho das partículas através da equação de Stokes – Einstein (equação 7), na qual D_h corresponde ao diâmetro hidrodinâmico, D ao coeficiente de difusão translacional, k à constante de Boltzmann, T à temperatura e n à viscosidade [49]. As amostras foram centrifugadas a fim de remover as partículas maiores e manter a homogeneidade do sistema. As

amostras que passaram por inversão de fase foram medidas em água, com pH variando entre 4,5 e 5,0.

$$D_h = \frac{kT}{3\pi nD} \quad (7)$$

2.8.7. Microscopia eletrônica de varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas em microscópio FEI Quanta 650 FEG, situado no Laboratório Nacional de Nanotecnologia, e em microscópio JEOL JSM 7500F, situado nas dependências do IQ-Unesp/CAr. As amostras preparadas à partir da dispersão das nanopartículas em isopropanol foram gotejadas sobre substrato de silício para realização das análises.

2.8.8. Microscopia eletrônica de transmissão

As imagens da amostra de óxido de ferro foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão Philips, modelo CM120, operando a 120 kV. A amostra foi dispersa em isopropanol e uma gota da dispersão foi depositada sobre grade de cobre recoberta com membrana de carbono amorfo. A grade de cobre contendo a amostra depositada foi seca em ar durante 1 hora.

2.8.9. Análise Térmica

A análise termogravimétrica das amostras foram realizadas em um equipamento da marca Netzsch STA 409C/CD sob atmosfera oxidante. As amostras foram aquecidas da temperatura ambiente até 800 °C a uma taxa de aquecimento de 15 °C min^{-1}. Para realização da análise foi utilizado aproximadamente 16,0 mg de cada amostra.

2.8.10. Magnetização

As medidas magnéticas foram obtidas utilizando um magnetômetro de amostra vibrante (VSM) comercial, Lake Shore, modelo 7300. As curvas de histerese (curva de magnetização versus campo aplicado) foram registradas na faixa de -20 a 20 kOe, na temperatura de 300 K.

2.8.11. Espectroscopia UV-Visível

O estudo de incorporação e liberação de fármaco foi realizado em espectrofotômetro UV-Vis da marca Agilent, modelo 8453. As medidas foram realizadas no comprimento de onda 486 nm, característico da absorção da doxorrubicina. A alíquota utilizada para determinação estava isenta de partículas de óxido de ferro, removido através de centrifugação ou membrana de diálise.

3. Resultados e discussão

3.1. Óxidos de ferro

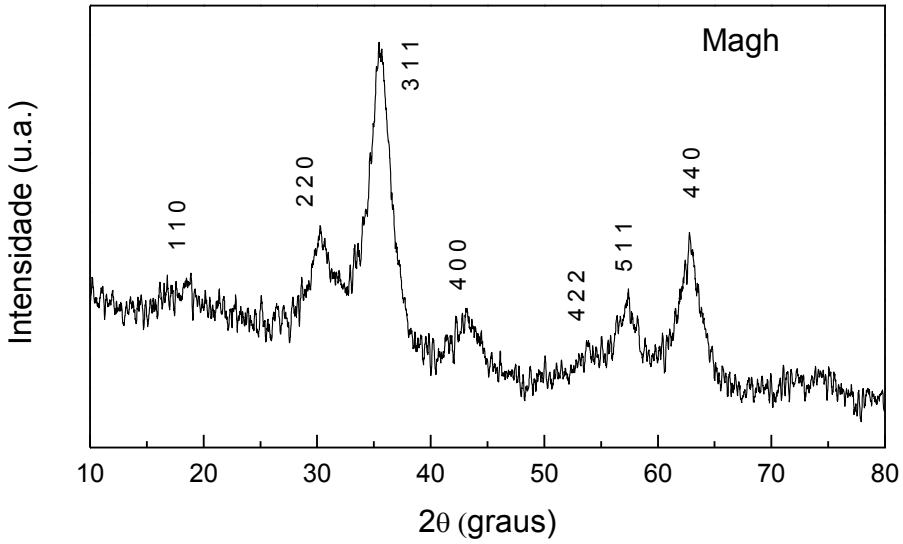
Diversas metodologias têm sido empregadas na síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. Entre os métodos clássicos de síntese, a coprecipitação é, provavelmente, a rota mais simples e eficiente para se obter ferritas [15]. A magnetita (Fe_3O_4) foi obtida pela adição de hidróxido de sódio sobre soluções aquosas de Fe (II) e Fe (III) na razão molar 1:2, resultando em um precipitado de coloração preta. De acordo com fatores termodinâmicos da reação 1, a precipitação da magnetita será completa entre os valores de pH 8 e 14, desde que respeitado a razão molar e um ambiente não oxidante, caso contrário a magnetita pode ser oxidada a maghemita. Uma vez alterado o ambiente de síntese, outros processos são responsáveis pela oxidação da magnetita, como a transferência de íons e/ou elétrons em função do pH da suspensão. Em meio ácido e aeróbico, os íons de Fe(II) são dessorvidos da superfície da partícula, formando hexa-aqua complexos em solução e nanopartículas de maghemita (γ-Fe_2O_3), conforme reação 2 [15; 24].

$$Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^- \rightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O \quad (1)$$

$$Fe_3O_4 + 2H^+ \rightarrow \gamma Fe_2O_3 + Fe^{2+} + H_2O \quad (2)$$

A análise obtida pela difratometria de raios X da amostra de óxido de ferro não nos permite identificar com precisão a formação da fase maghemita, uma vez que tanto a magnetita como a maghemita apresentam picos de difração com ângulos muito próximos devido à semelhança de sua estrutura cristalina. Os picos característicos da maghemita – (2 1 0) e (2 1 1) – estão inseridos dentro da faixa de ruído devido à baixa intensidade, impedindo a identificação direta da fase maghemita [50; 51]. Dessa forma, a partir dos picos obtidos no difratograma da Figura 14, é possível afirmar que o material apresenta estrutura do tipo espinélio.

Figura 14. Difratograma de raios X da amostra de óxido de ferro.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2. Posições angulares e distâncias interplanares para padrão e amostra de óxido de ferro.

Planos	$2\theta_{teórico}$	$d_{teórico}$	$2\theta_{Magh}$	d_{Magh}
220	30,24	2,95	30,29	2,95
311	35,63	2,51	35,80	2,51
400	43,28	2,08	42,53	2,13
422	53,73	1,70	53,79	1,70
511	57,27	1,60	57,45	1,60
440	62,93	1,47	62,96	1,48

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 2 apresenta as distâncias interplanares da amostra γ-Fe_2O_3, calculadas a partir das posições angulares dos principais planos, utilizando a lei de Bragg, equação 8. O padrão de referência utilizado está disponível em bancos de dados como o ICDD – PDF2 (International Center of Difraction Data – Powder Diffraction File) e foi utilizada a ficha cristalográfica 39-1346 como referência.

$$\lambda = 2dsen\theta \tag{8}$$

A partir do valor da distância interplanar e dos índices hkl é possível estimar o valor do parâmetro de rede para cada pico de difração através da equação 9. A comparação dos parâmetros de rede estimado da amostra γ-Fe_2O_3 e do padrão utilizado compõe a Tabela 3. A ficha cristalográfica 19-629, referente à magnetita, apresenta parâmetro de rede no valor de 8,39, enquanto para a maghemita 39-1346, o valor é de 8,35. Dessa forma, pode-se atribuir que a amostra sintetizada tende à fase maghemita.

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \tag{9}$$

A difratometria de raios X também permite estimar o tamanho médio dos cristalitos através da equação 10, denominada equação de Scherrer [52]. Para determinação do tamanho do cristalito utiliza-se a largura a meia altura do pico mais intenso, que corresponde ao plano cristalino (3 1 1) para amostra de maghemita. Quanto mais alargado for o pico de difração, menor será o tamanho do cristalito. O valor de β corresponde a $\sqrt{B^2 - b^2}$, no qual B é a largura a meia altura do pico mais intenso (3 1 1) e b a largura intrínseca obtida do cristal óxido de ítrio, que foi utilizado como padrão. Os demais parâmetros da equação de Scherrer correspondem a uma constante adimensional de morfologia do cristal (o valor 0,89 é referente a esferas), ao valor do comprimento de onda da radiação utilizada (utilizou-se radiação Cu(Kα)

cujo valor é 1,5418 Å e a posição angular do pico mais intenso, θ_B. O software OriginPro 8 foi utilizado para obter os valores de B e θ_B empregados na equação de Scherrer, cujo tamanho do cristalito obtido foi de 6,2 nm.

Tabela 3. Parâmetros de rede cristalina para a amostra de óxido de ferro.

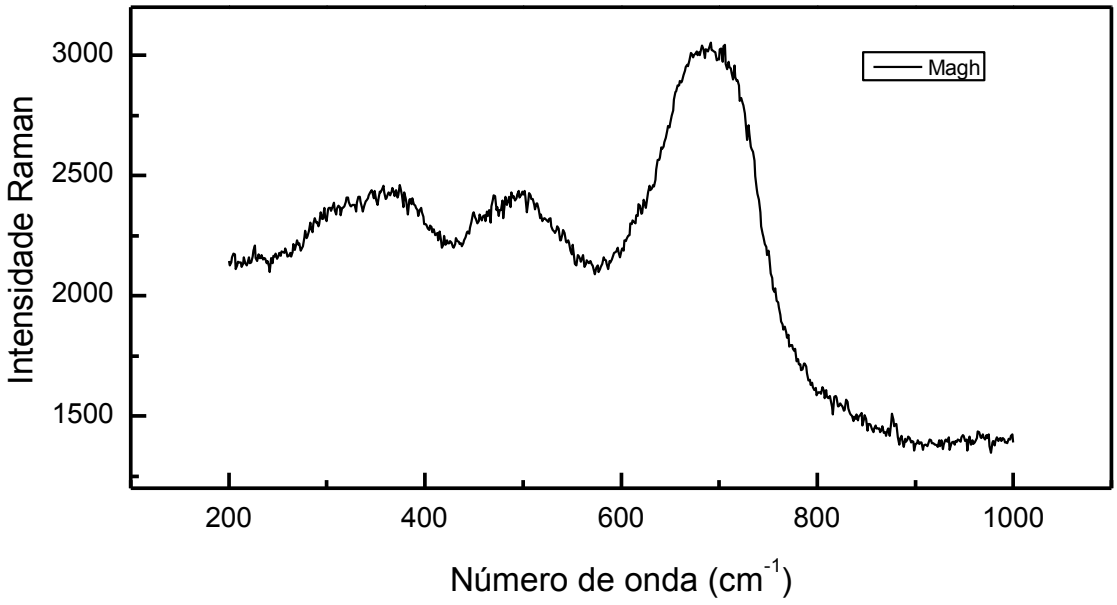
Planos	Magh
2 2 0	8,34
3 1 1	8,31
4 0 0	8,52
4 2 2	8,33
5 1 1	8,33
4 4 0	8,34
Média	8,36±0,08

Fonte: Elaborado pelo autor.

O tipo de óxido de ferro sintetizado foi caracterizado através da espectroscopia Raman. A frequência do modo de vibração da maghemita pode variar com o método de preparação da amostra ou pela distribuição de vacâncias sobre sua estrutura, entretanto seu espectro é característico pela presença de bandas largas encontradas em 350 cm^{-1}, 500 cm^{-1} e 700 cm^{-1}. A magnetita apresenta 5 bandas ativas no espectro Raman, entretanto todas as bandas apresentam baixa intensidade com exceção da banda em 660 cm^{-1} [53-55]. A eficiência no processo de oxidação da magnetita pode ser confirmada, como pode ser observado na Figura 15, na qual as bandas em 324 cm^{-1}, 505 cm^{-1} e 688 cm^{-1} são características da maghemita.

$$d_{DRX} = \frac{0{,}89\lambda}{\beta cos_{\theta B}} \quad (10)$$

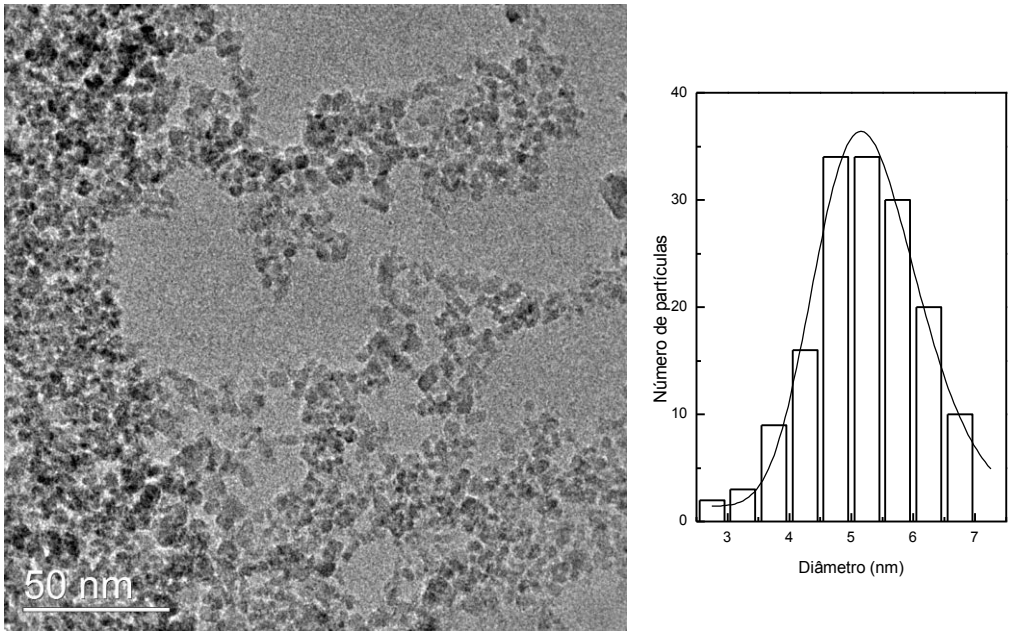
Figura 15. Espectro de Raman do óxido de ferro



Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora a coprecipitação seja considerada a rota mais viável, o método não apresenta controle rigoroso em relação ao tamanho e forma das partículas formadas em função de processos cinéticos. A nucleação dos óxidos de ferro ocorre em um processo rápido e é interrompida quando os íons alcançam um valor crítico de supersaturação. A seguir, ocorre uma etapa lenta de crescimento dos núcleos recém formados. O processo cinético predominante é que dita a distribuição das partículas obtidas. Quando o processo de nucleação predomina, são obtidas grandes quantidades de partículas de menor tamanho, enquanto o processo de crescimento favorece a formação de poucas partículas com maiores diâmetros [15]. Como pode ser observada na imagem de microscopia eletrônica de transmissão, Figura 16, foram obtidas nanopartículas com morfologia aproximadamente esférica, cujo diâmetro médio para a amostra de óxido de ferro foi de 5,2 ± 0,1 nm. O histograma foi obtido pela determinação do diâmetro de 327 partículas, utilizando o software ImageJ.

Figura 16. Micrografia MET para amostra de óxido de ferro.

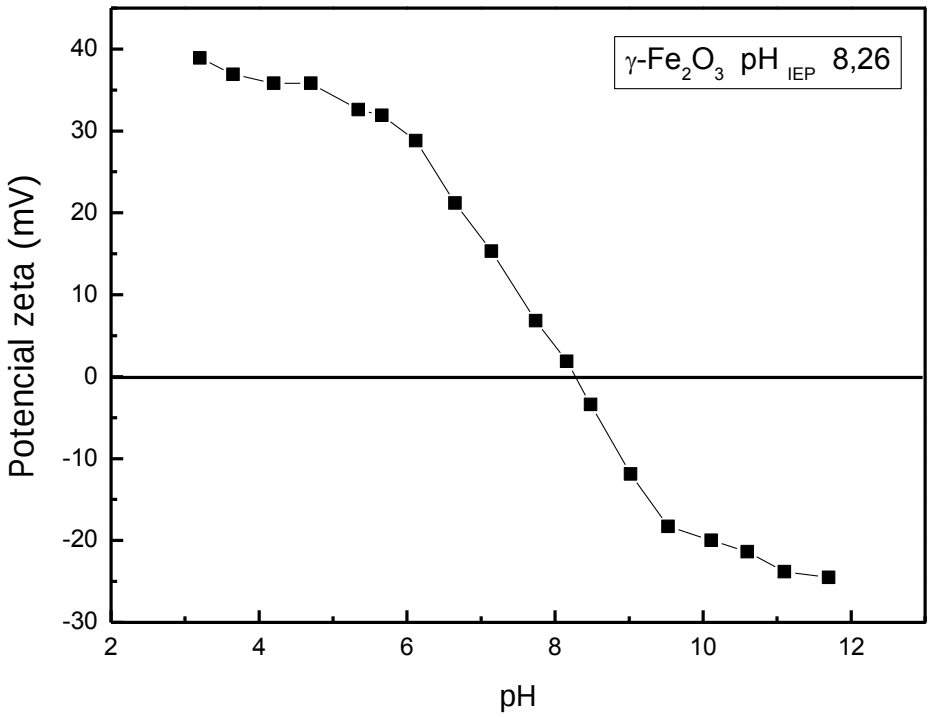


Fonte: Elaborado pelo autor.

A caracterização da superfície da partícula de óxido de ferro sintetizada foi avaliada pelo potencial zeta de superfície em função do pH. A presença de cargas sobre a superfície da partícula afeta a distribuição de íons na região interfacial, formando camadas distintas: i) a região interna, conhecida como camada de Stern, na qual íons de carga opostas a superfície estão fortemente ligados e ii) a região externa, ou difusa, na qual as ligações são enfraquecidas. O potencial zeta é localizado entre o potencial da superfície carregada e da solução eletrolítica [17]. Como será observado no espectro infravermelho, em meio aquoso são encontradas hidroxilas sobre as partículas de ferro, podendo haver a protonação ou desprotonação destas hidrixilas, formando, respectivamente, íons H^+ ou OH^- sobre a superfície em função do valor de pH da solução. Em meio ácido, o valor de potencial zeta é positivo, pois a espécie predominante sobre a superfície é a forma protonada $=Fe^{(2+,\ 3+)}OH_2^+$. Já para meio alcalino se observa a desprotonação, com a presença de $=Fe^{(2+,\ 3+)}O^-$ sobre a superfície. O valor do pH no qual o potencial zeta é zero recebe a denominação de ponto isoelétrico, havendo o equilíbrio de cargas positivas

e negativas sobre a superfície [56]. Analisando a curva obtida na Figura 17, observa-se que o ponto isoelétrico para amostra γ-Fe_2O_3 foi obtido em pH igual a 8,26. Este valor pode variar uma vez que depende de fatores tais como a quantidade de matéria sobre a superfície em questão, preparação e origem da amostra.

Figura 17. Curva de potencial zeta versus pH para amostra γ-Fe_2O_3.

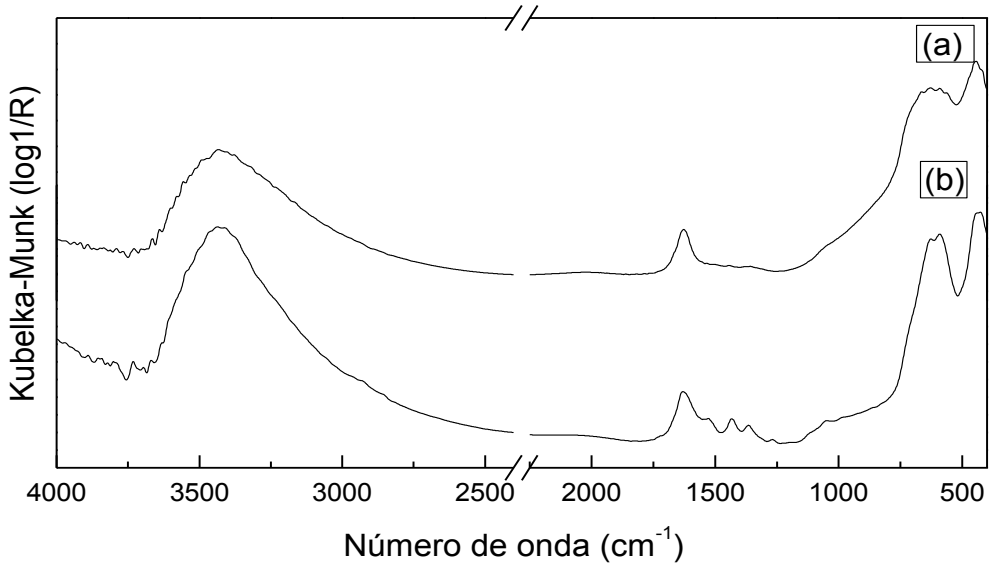


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para caracterizar a modificação da superfície do óxido de ferro pelo ácido acrílico foi utilizada a espectroscopia na região do infravermelho, a qual permite identificar compostos através da energia vibracional entre os elementos que compõe o material. A região do espectro eletromagnético na qual ocorre o estiramento Fe – O está compreendida de 750 a 550 cm^{-1} para coordenação tetraédrica e 550 a 300 cm^{-1} para coordenação octaédrica [57], o que indica a formação do óxido de ferro para a amostra γ-Fe_2O_3. As bandas observadas em 3000 cm^{-1} e em 1600 cm^{-1} correspondem aos estiramentos O – H de moléculas de água, isto por que, em sistemas aquosos, essas moléculas se dissociam resultando em uma superfície

recoberta com grupos hidroxílicos que se coordenam com os átomos de ferro da partícula [14]. Para o espectro da amostra modificada com ácido acrílico, a banda em 1630 cm^{-1} provém do estiramento assimétrico do íon carboxilato. A banda menos intensa observada em 1434 cm^{-1} corresponde à deformação axial simétrica da ligação C – O [58], como pode ser observado no espectro da Figura 18.

Figura 18. Espectros IV da amostra de: (a) óxido de ferro e (b) óxido de ferro modificado com ácido acrílico.



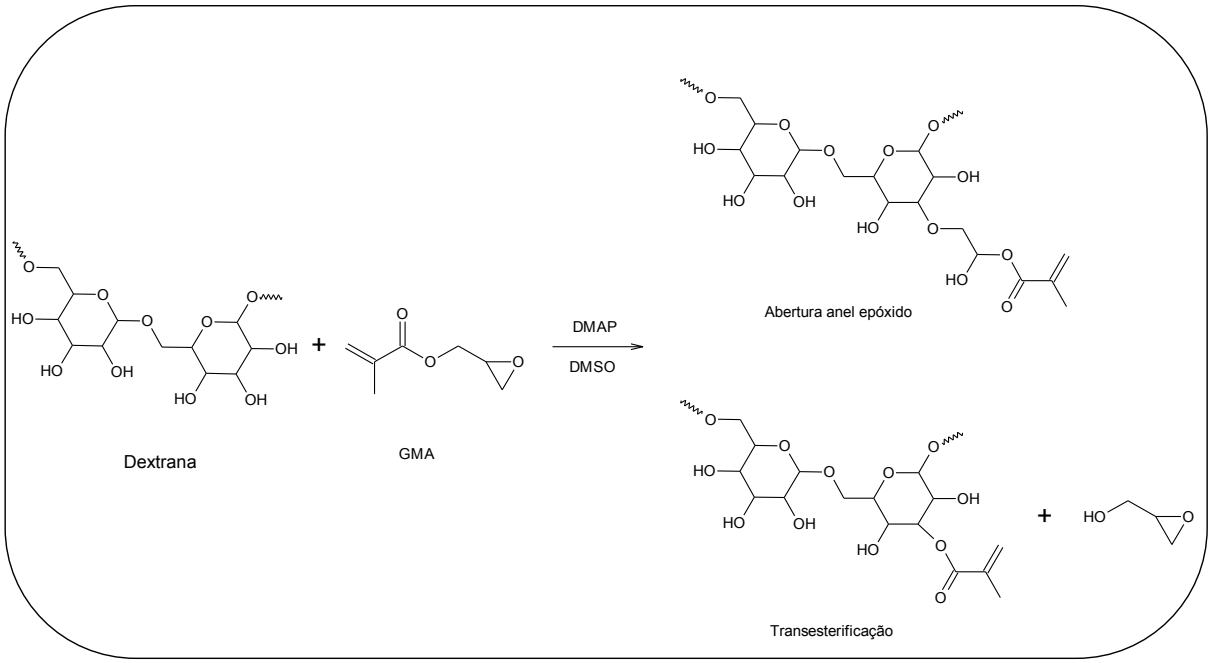
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2. Derivatização da dextrana

O processo de derivatização da dextrana ocorre pelo enxerto de grupos vinílicos sobre a estrutura do polissacarídeo através da reação com o GMA. Para que a reação entre a dextrana e o GMA ocorra foi adicionado o DMAP como catalisador. O DMAP é uma base de Lewis que atua na polarização dos grupos hidroxilas da dextrana, permitindo sua modificação. Segundo a literatura, a derivatização da dextrana pode ocorrer por dois mecanismos distintos: i) pela reação de abertura do anel epóxido e/ou ii) pela reação de transesterificação [59; 60]. No mecanismo de abertura do anel epóxido, o carbono menos substituído do anel

epóxido é submetido ao ataque nucleofílico pelo grupo hidroxílico da dextrana, enquanto a transesterificação resulta no ataque da carbonila de éster do GMA, conforme pode ser observado na Figura 19. Contudo, para que a derivatização ocorra, o meio reacional deve ser composto de um solvente aprótico, como o DMSO, uma vez que o GMA pode reagir com água, diminuindo o grau de substituição. Por outro lado, o mecanismo pelo qual ocorreu a derivatização da dextrana está fora das expectativas de estudo para este trabalho, uma vez que para ambos os mecanismos a presença de grupos vinílicos é mantida, como pode ser confirmado através da espectroscopia de ressonância magnética de H^1 e C^{13}.

Figura 19. Reação da dextrana com GMA por abertura do anel epóxido (superior) e transesterificação (inferior).

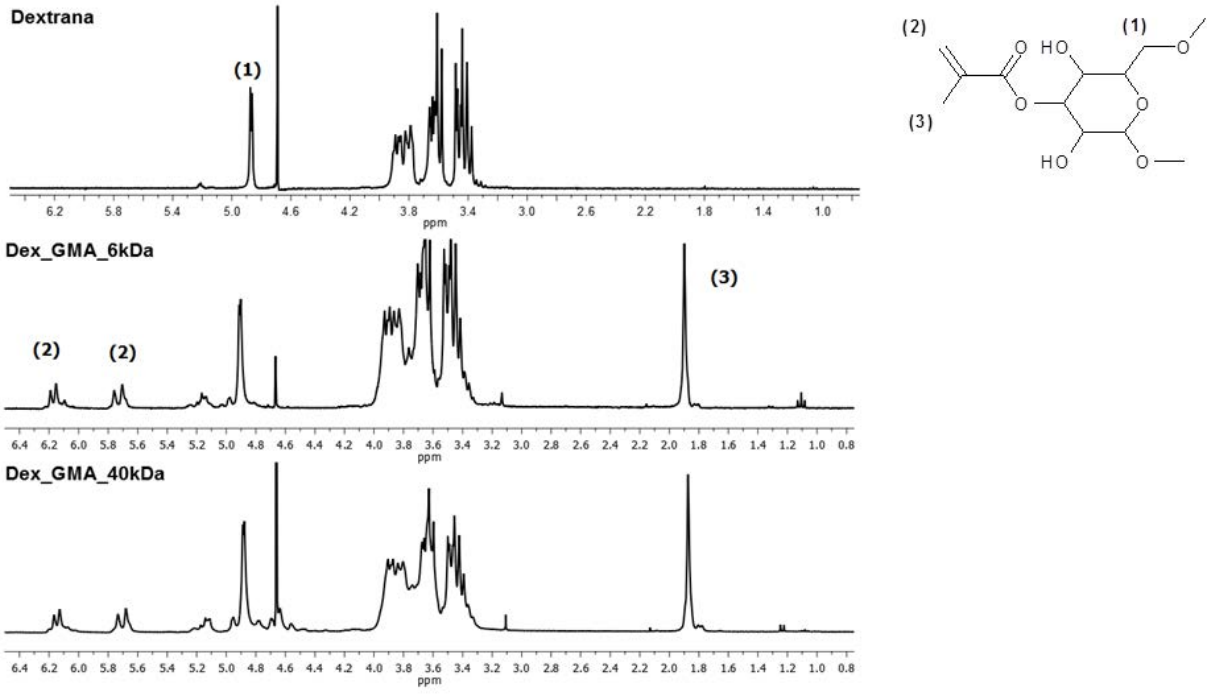


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os espectros de RMN de H^1 apresentados na Figura 20 são referentes a amostra de dextrana e sua derivatização. O pico de D_2O correspondente ao solvente está deslocado em δ 4,6 ppm. Os picos entre δ 3,10 – 5,20 ppm correspondem a estrutura da dextrana, sendo o próton anomérico corresponde ao deslocamento em

δ 4,91 ppm e a ligação α – 1,4 característica entre as unidades glicosídeas da dextrana correspondentes aos picos compreendidos entre δ 4,8 – 5,2 ppm. Para as amostras derivatizadas são observados dubletos em δ 6,19 e 5,70 ppm característicos da presença de hidrogênios vinílicos e o deslocamento em δ 1,90 ppm corresponde aos hidrogênios metílicos provenientes do GMA, confirmando a modificação do polímero.

Figura 20. Espectros de RMN H¹ para as amostras de dextrana e dextrana derivatizada.

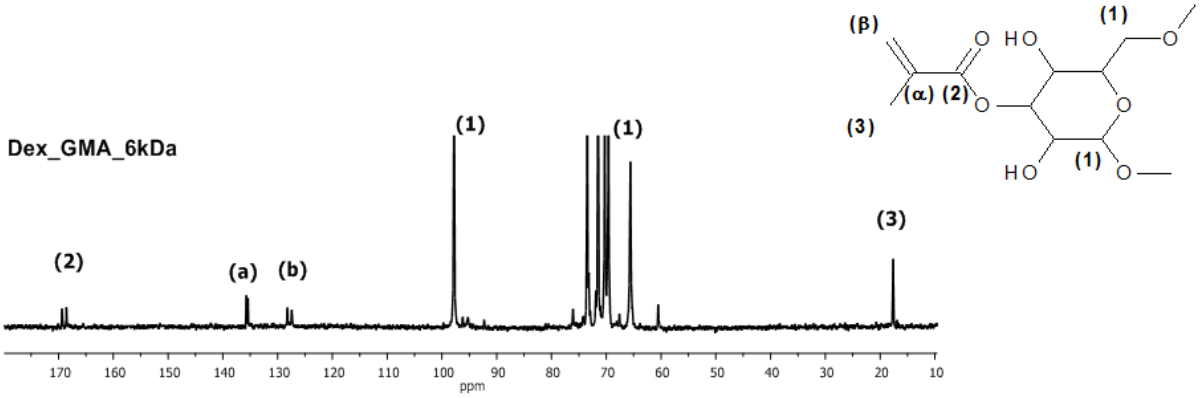


Fonte: Elaborado pelo autor.

Em complemento ao RMN de H^1, foram realizado estudos de RMN de C^{13} para a amostra Dex_GMA_6. Os picos observados entre δ 60,54 – 97 ppm correspondem aos carbonos da estrutura da dextrana, o pico em 17,62 refere-se a um grupo metil, os deslocamentos em δ 169,35 e δ 168,50 ppm são referentes ao carbono da carbonila proveniente do acoplamento do GMA, os picos em δ 127,43 ppm e δ 128,20 ppm correspondem ao carbono localizado na posição β a carbonila,

enquanto que os picos em δ 135,69 ppm e δ 135,42 ppm são referentes ao carbono α à carbonila, conforme pode ser observado na Figura 21.

Figura 21. Espectro de RMN C¹³ para amostra dextrana derivatizada.



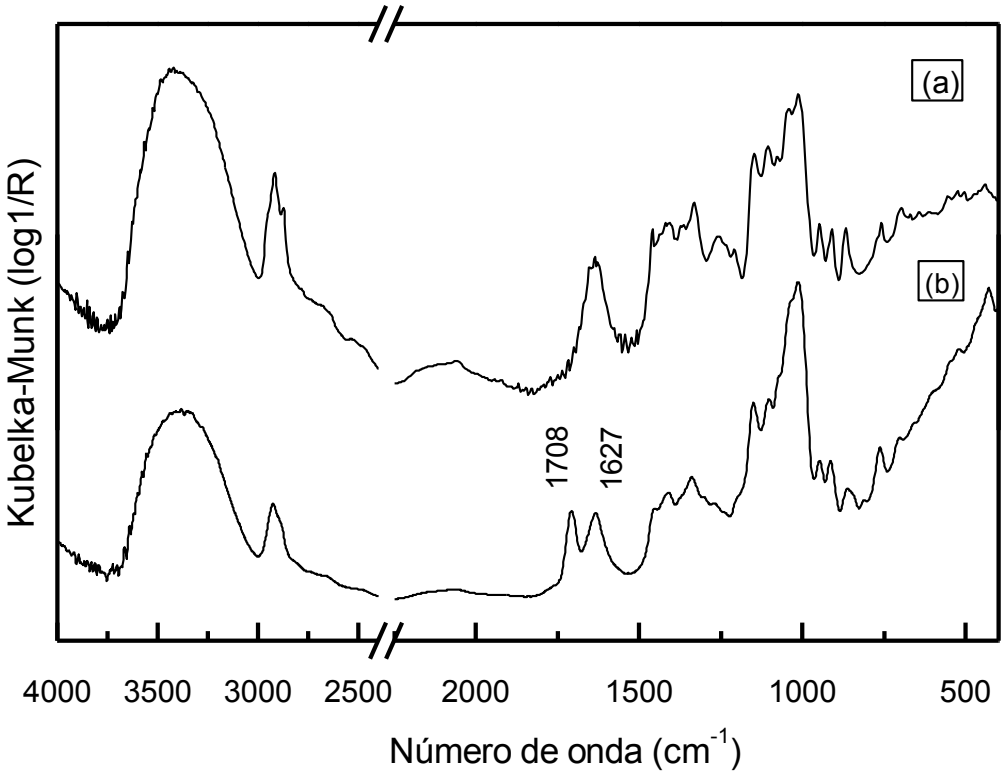
Fonte: Elaborado pelo autor.

O grau de substituição do GMA sobre a dextrana pode ser calculado através dos sinais do espectro de RMN H¹ pela equação 11.*GS = x / y 100*, proposta por van Dijk-Wolthuis et al [(59)], na qual x corresponde a média da integral dos dubletos em δ 5,7 ppm e δ 6,19 ppm; e y a integral do próton anomérico (δ 4,99 ppm) acrescido de 4% da integral das ligações α – 1,4 da unidades glicosídeas. O grau de substituição obtido não apresentou grande variação ao empregar dextranas com diferentes massas molares (GS_{6kDa}= 26,52% e GS_{40kDa}= 28,57%), entretanto o rendimento da reação para a amostra Dex_GMA_6 foi insatisfatório (13,3%). Com o aumento da massa molar foi possível recuperar 80% do polímero após o término da reação, evidenciando a dependência da massa molar na precipitação por solvente. Dessa forma, optou-se em empregar a Dex_GMA_40 no decorrer do presente trabalho.

$$GS = \frac{X}{Y} x100 \qquad (11)$$

A Figura 22 apresenta o espectro infravermelho para a dextrana e a amostra derivatizada. A banda larga observada em 3000 cm^{-1} deve-se ao estiramento O –H e a banda em 2912 cm^{-1} é referente ao estiramento simétrico das ligações C – H do esqueleto da dextrana. A deformação angular simétrica C – H ocorre na região de 1350 cm^{-1} e em 1000 cm^{-1} são observadas as vibrações da ligação C – O – C da cadeia cíclica das dextranas. A principal diferença observada no espectro da amostra Dex_GMA e que confirma a derivatização da dextrana é a presença de uma banda em 1708 cm^{-1} referente a carbonila e a deformação axial C = C em 1627 cm^{-1} provenientes do GMA.

Figura 22. Espectro IV da amostra: (a) dextrana e (b) dextrana derivatizada.



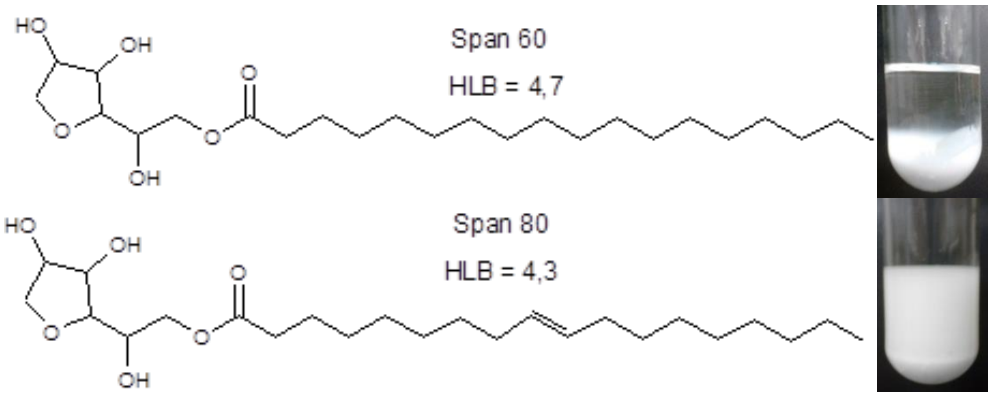
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3. Polimerizações

3.3.1. Variação do surfactante

Alguns fatores devem ser considerados para escolha do surfactante empregado no processo de miniemulsão para uso em aplicações biomédicas. Em primeiro lugar deve ser avaliada a biocompatibilidade do surfactante, seguido de sua solubilidade na fase dispersa e como atua na estabilização do coloide. Ao se adicionar um surfactante a um sistema imiscível, a tensão interfacial diminui auxiliando a formação de emulsão e, consequentemente, aumenta a estabilidade coloidal. Surfactantes não iônicos e zwitteriônico são recomendados para aplicações farmacêuticas, uma vez que apresentam menor toxicidade e são menos afetados durante variação de pH e força iônica [61]. Para facilitar a escolha do surfactante frente à fase dispersa de qualquer sistema emulsionado foi desenvolvido o índice HLB, que considera o balanço entre as partes hidrofílicas e hidrofóbicas do surfactante. Os surfactantes com baixo índice HLB são lipofílicos enquanto altos valores são característicos de surfactantes hidrofílicos, em uma escala entre 0 – 20 [62; 63].

Figura 23. Representação da estrutura química dos surfactantes e estabilidade coloidal.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base nas considerações acima foram testados os surfactantes Span 60 (monoestearato de sorbitan), cujo valor de HLB é 4,7, e Span 80 (Monooleato de sorbitan), HLB = 4,3, na polimerização via miniemulsão do ácido acrílico. Estes

surfactantes apresentam a mesma estrutura na cauda hidrofílica e diferem-se pela presença de dupla ligação na cadeia hidrofóbica do Span 80, como pode ser observado na Figura 23, levando a diminuição no índice HLB deste surfactante. Mesmo apresentando valores de HLB próximos, as estabilidades coloidais dos polímeros formados não apresentaram o mesmo comportamento em função dos surfactantes. A solubilização do Span 60 em n-heptano foi completa após aquecimento da solução. A necessidade de aquecimento para promover a solubilização implica na dificuldade do surfactante em se orientar na interface do sistema, tornando-o termodinamicamente instável e resultando em separação das fases da miniemulsão em todas as concentrações de surfactante empregada [64]. O fenômeno de separação de fases pode ser observado nos tubos de ensaio da Figura 23 para cada surfactante empregado. Através da técnica de espalhamento de luz dinâmico foi determinado o diâmetro hidrodinâmico (Dh) das nanopartículas poliméricas após processo de lavagem, que resultaram em diâmetros maiores e polidispersividade (PDI) alta das sínteses empregando o Span 60 quando comparado com a síntese utilizando o Span 80 como surfactante, conforme pode ser observado na Tabela 4. O uso de Span 80 resultou em um sistema estável durante todo o período da polimerização, sendo escolhido para avaliar a influência da concentração de surfactante sobre o tamanho das nanopartículas do copolímero PAA-co-Dex.

Tabela 4. Variação do diâmetro hidrodinâmico em função do tipo de surfactante.

Amostra	Span 60 (% m/m)	Span 80 (% m/m)	D_h (nm)	PDI
PAA 1	2		860,1± 6	0,439
PAA 2	3		628,7±1	0,577
PAA 3		2	144,3±2	0,290

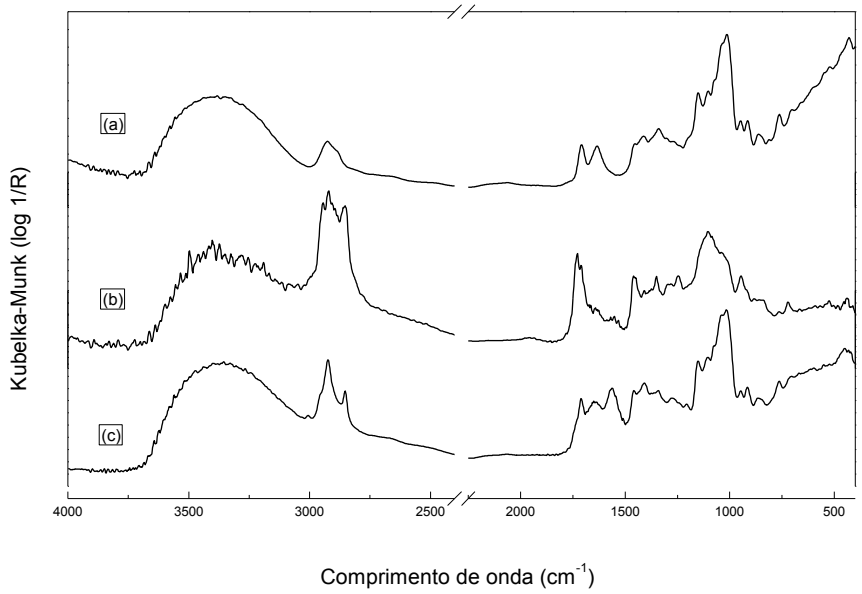
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.2. Variação da concentração de Span 80

A reação de copolimerização entre o ácido acrílico e a dextrana derivatizada foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de H¹. A polimerização entre o monômero de ácido acrílico e a dextrana derivatizada ocorre pela reação dos grupos vinílicos e a ausência desses grupos no espectro indica a efetividade da reação. As absorções características na região do infravermelho do grupo vinílico são as bandas de média intensidade que estão compreendidas acima de 3000 cm^{-1}, entre 1648 – 1638, 995 – 985 e 915 – 905 cm^{-1} e não são observadas no espectro infravermelho das amostras obtidas pelo processo de miniemulsão. As bandas observadas correspondem a deformação axial C – H em: 2959 e 2925 para CH_3, 2837 para CH_2; além de desdobramentos na região de 1466 – 1398 cm^{-1}. Em torno de 1720 cm^{-1} está localizada a banda referente a carbonila dos ácidos carboxílicos, confirmado pela presença da banda larga em 3427 cm^{-1} do estiramento O – H. Também são observadas as vibrações da ligação C – O – C em 1207 à 1000 cm^{-1} da cadeia cíclica das dextranas. A presença de ácido acrílico é evidenciada pela adição extra de hidróxido de sódio durante a polimerização, pois a intensidade da banda em 1720 cm^{-1} diminui com o aparecimento da banda em 1555 cm^{-1}, referente a formação de acrilato de sódio ($-COO^-Na^+$) [65; 66], como pode ser observado nos espectros da Figura 24.

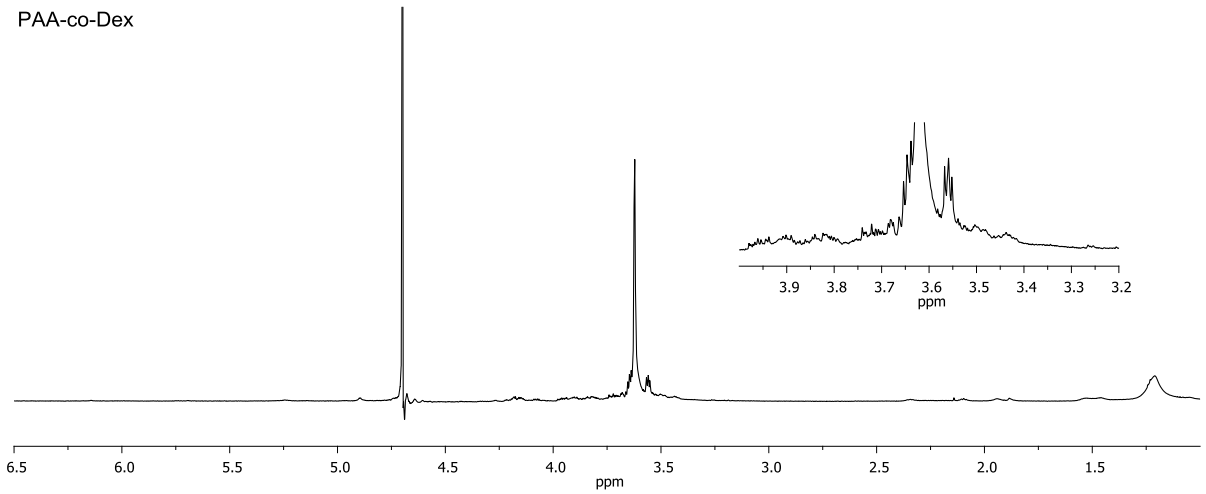
No espectro de ressonância magnética nuclear de H^1, apresentado na Figura 25, fica mais evidente a confirmação da polimerização, pois os dubletos característicos dos grupos vinilicos estão ausentes na região compreendida entre δ 6,5 ppm e δ 5,0 ppm. O pico em δ 1,2 ppm corresponde aos hidrogênios de CH_2 provenientes da cadeia do ácido poliacrílico. No destaque da Figura 25, são apresentados os picos característicos da dextrana, distorcido pelo intenso sinal da água.

Figura 24. Espectro IV da amostra: (a) Dex_GMA, (b) PAA-co-Dex 2%, (c) Acrilato 2%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25. Espectro RMN H^1 após polimerização por miniemulsão inversa.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os diâmetros hidrodinâmicos das amostras do copolímero foram determinados no início e no término da reação de polimerização via miniemulsão, bem como os diâmetros após lavagem e dispersão em água, em função da concentração do surfactante Span 80. Como pode ser observada na Tabela 5, a mudança na concentração do surfactante não resultou em grande variação dos diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas poliméricas. Entretanto a diminuição do diâmetro hidrodinâmico foi significativa em função do tempo de polimerização.

Tabela 5. Variação do diâmetro hidrodinâmico em função da concentração do surfactante Span 80.

Span 80	Início		Término		Dispersão água	
	D_h (nm)	PDI	D_h (nm)	PDI	D_h (nm)	PDI
2%	275,0±3	0,163	111,0±6	0,261	110,0±1	0,186
3%	283,6±4	0,158	124,0±11	0,200	136,2±3	0,121
4%	282,3±1	0,157	111,8±2	0,174	150,8±3	0,394

Fonte: Elaborado pelo autor.

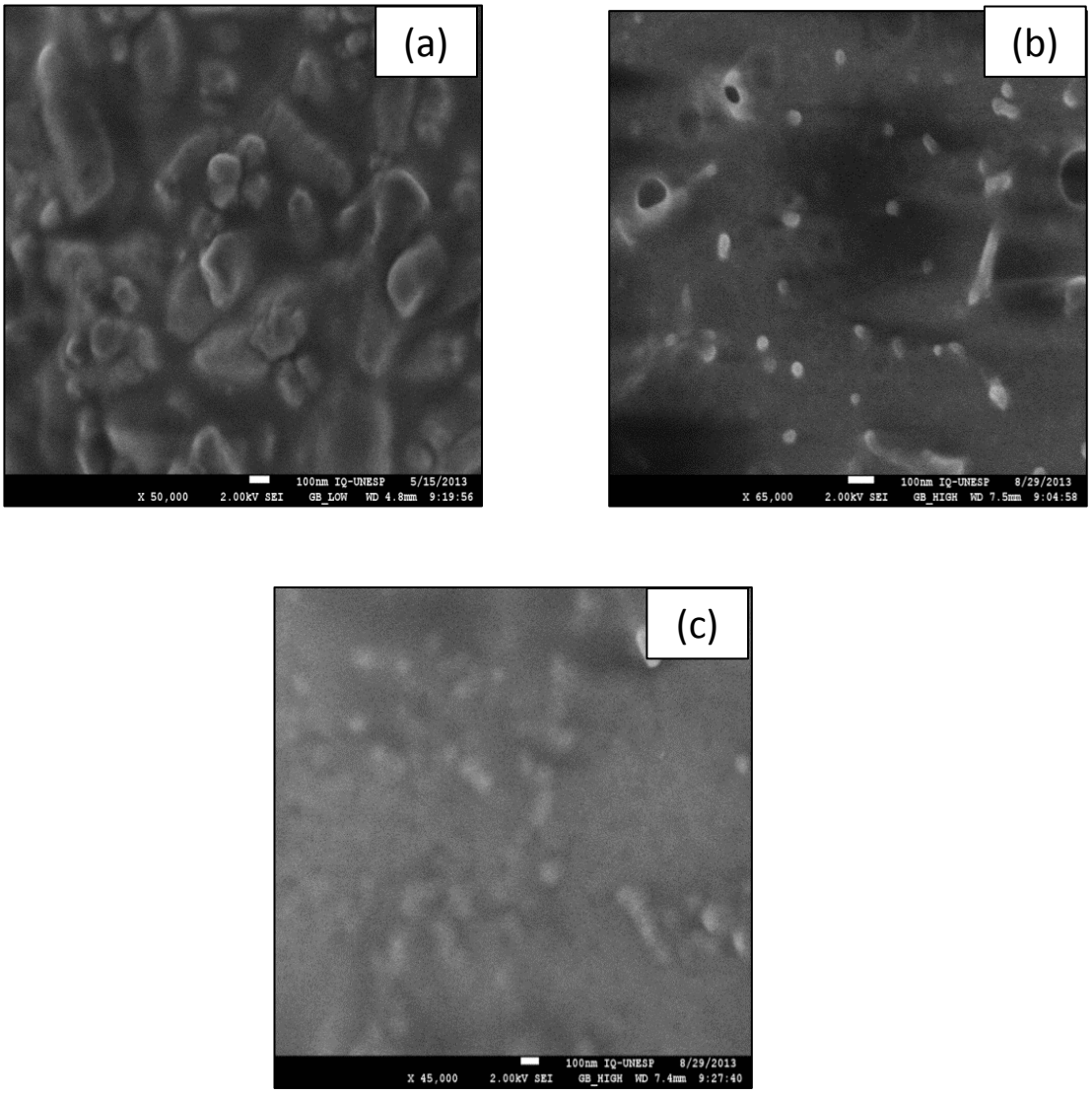
O tamanho e distribuição da gota contendo monômeros é a principal característica da miniemulsão, afetando diretamente o tipo de nucleação que ocorre e, consequentemente, sua a estabilidade. Alguns autores afirmam que a miniemulsão só ocorre quando as características da gota do monômero são idênticas as do polímero formado [67]. As técnicas de caracterização para elucidar os mecanismos de polimerização são limitadas, dificultando a determinação exata da distribuição do tamanho da gota de monnômero. Azad et al. [68] utilizou imagens de microscopia eletrônica de transmissão para determinar o tamanho da gota na miniemulsão de estireno. O método empregou OsO_4 para manchar as gotas e criar contraste nas micrografias, permitindo a comparação do tamanho da gota de monômero e o tamanho do polímero. Os resultados apresentados mostram que o tamanho das partículas aumentou ao término da polimerização, resultando em

partículas com diâmetro fora da faixa considerada na miniemulsão – na ordem de 2 µm. Choi et al. [69] empregou a técnica da fratura criogênica para obter imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Uma pequena quantidade de emulsão foi congelada em nitrogênio líquido, fraturando a amostra em uma câmara de vácuo. A gota de monômero apresentou tamanho na faixa de 50 a 150 nm, diâmetro comparável com o tamanho das partículas poliméricas. Entretanto, a fratura pode não passar pelo exatamente pelo centro das gotas, reduzindo a exatidão da técnica. Espalhamento de luz tem sido frequentemente utilizado na determinação dos diâmetros da gota. A técnica é muito rápida e de fácil execução, porém a diluição da amostra é necessária para evitar múltiplos espalhamentos. A diluição afetará a distribuição do tamanho das gotas, pois pode ocorrer dessorção de surfactante e dissolução do monômero na fase dispersa [28]. Assim, a desvantagem no estudo da miniemulsão é a ausência de um método direto que garanta a exatidão da distribuição do tamanho da gota, não se obtendo um consenso claro na literatura, podendo conduzir a alguns erros.

A diminuição do diâmetro hidrodinâmico pode estar relacionada ao processo de densificação durante a formação do polímero. Considerando que não há perda de massa durante a polimerização e que a densidade do polímero é maior que a dos monômeros, o volume e, consequentemente, o diâmetro hidrodinâmico do polímero deve diminuir ao término da polimerização.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura são apresentadas na Figura 26. Para a amostra contendo 2% de surfactante observa-se a formação de agregados, como distribuição de tamanho e formas irregulares. A agregação das partículas pode estar atribuída ao preparo da amostra, na qual foi empregado o polímero liofilizado. A irregularidade da morfologia pode estar relacionada com a coalescência do material quando utilizado menores concentrações de Span 80, pois é possível observar pequenas esferas para as micrografias (b) e (c) da Figura 26.

Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura das amostras: (a) PAA-co-Dex 2%, (b) PAA-co-Dex 3% e (c) PAA-co-Dex 4%.

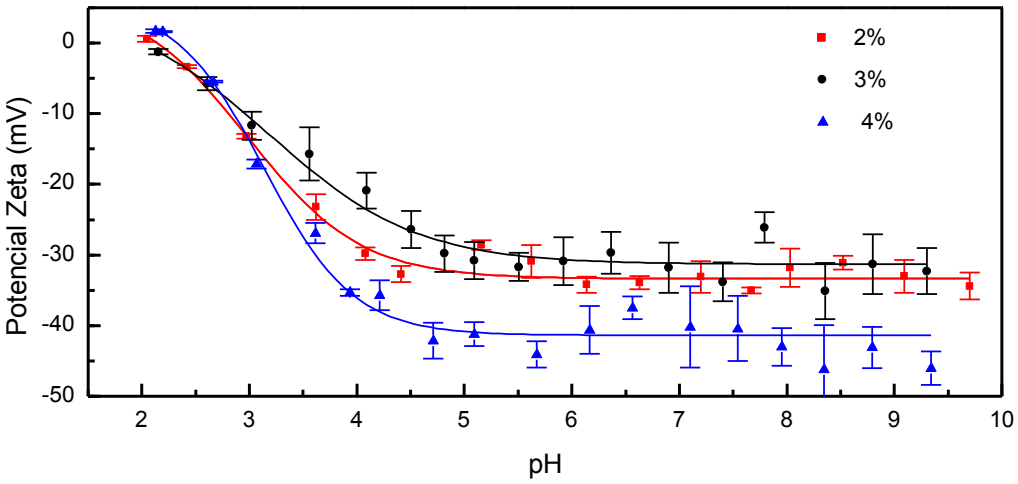


Fonte: Elaborado pelo autor.

O potencial zeta de superfície foi medido com intuito de estudar a carga na superfície das nanopartículas poliméricas em função do pH, que por sua vez indica a estabilidade da suspensão. Como pode ser observado na Figura 27, os polímeros obtidos apresentam carga negativa sobre a superfície em toda a faixa de pH estudada. Este valor negativo pode ser atribuído aos grupos carboxílicos do PAA e dos grupos sulfatos proveniente da cisão do persulfato de amônio utilizado como iniciador da reação de polimerização [70]. O aumento do valor de potencial zeta abaixo do pH 4,25 está relacionado ao pKa do ácido acrílico. Em valores de pH

abaixo do pKa o ácido acrílico é protonado. A amostra com 4% apresenta estabilidade entre pH 5,5 e 8,7, na qual o potencial zeta de superfície apresenta valores inferiores a - 30 mV. Embora a amostra PAA-co-Dex_4% tenha apresentado maior diâmetro hidrodinâmico, a concentração de Span 80 em 4% foi escolhida para dar continuidade ao estudos por apresentar maior estabilidade coloidal, pois apresenta valor potencial zeta mais negativo quando comparado as demais amostras.

Figura 27. Curva de potencial Zeta versus pH para amostra copolimerizada variando a concentração de surfactante.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.3. Variação da fração de monômeros

A Tabela 6 apresenta os diâmetros hidrodinâmicos das amostras em função do tempo de polimerização e após a inversão da fase. Como pode ser observado nas amostras com fração de dextrana superior a 50%, o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas ao término da reação de polimerização não apresenta grande variação em relação ao tamanho inicial das gotas dos monômeros. Polissacarídeos podem ser utilizados nas formulações de miniemulsões como surfactante, conferindo estabilidade extra contra a coalescência e a degradação difusional, como relatado

para a dextrana [71] e para a quitosana [72]. A amostra X_{Dex} = 25 não se manteve estável durante o período de polimerização, resultando em diâmetro hidrodinâmico abaixo do valor obtido após o material ser disperso em água. Em relação à dispersão em água, os diâmetros hidrodinâmicos variam em relação ao tamanho final da polimerização devido à capacidade de intumescimento do polímero após mudança da polaridade do solvente.

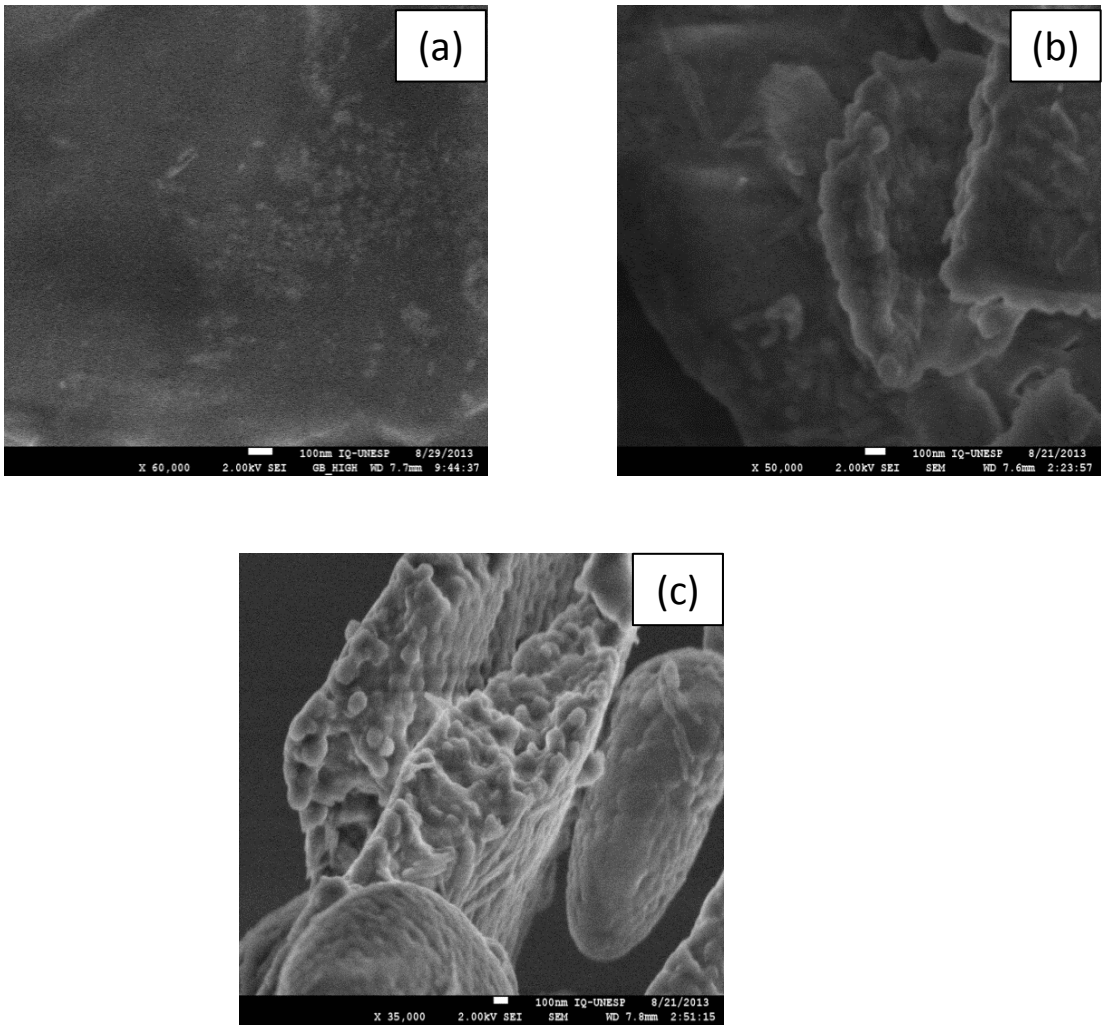
Tabela 6. Variação do diâmetro hidrodinâmico em função da fração entre os monômeros.

Fração de Dextrana	Início		Término		Dispersão água	
	D_h (nm)	PDI	D_h (nm)	PDI	D_h (nm)	PDI
X_{Dex}=25	336,6±3	0,162	47,86±1	0,218	136,0±2	0,148
X_{Dex}=50	282,3±1	0,157	111,8±1	0,174	150,8±3	0,394
X_{Dex}=65	242,7±6	0,125	236±1	0,072	196,2±1	0,229
X_{Dex}=75	245,3±1	0,079	233,5±3	0,110	198,5±3	0,202

Fonte: Elaborado pelo autor.

O resultado da análise morfológica realizada através da microscopia eletrônica de varredura revela que as amostras sintetizadas com maior fração de dextrana formaram esferas, com aproximadamente 100 nm de diâmetro. Estas pequenas esferas estão agregadas, formando blocos formato irregular. A amostra da Figura 28 (a) também resultou em esferas, mas com diâmetro inferior as demais sínteses, conforme foi descrito pelos resultados de espalhamento de luz.

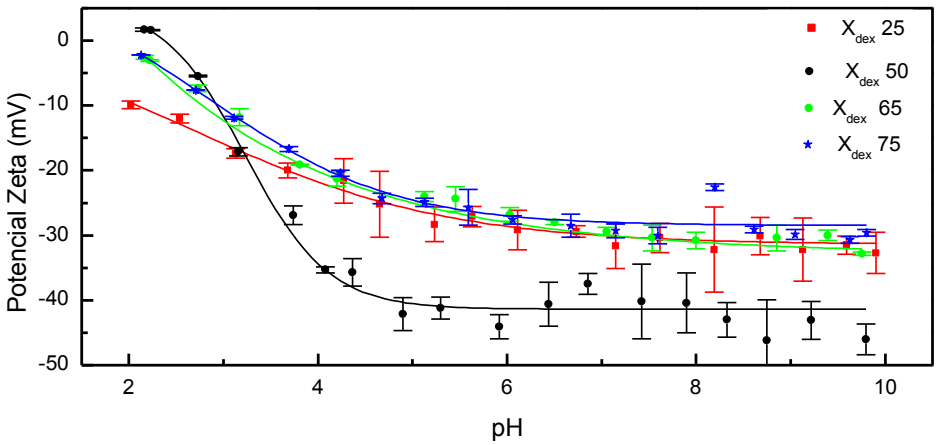
Figura 28. Microscopia eletrônica de varredura das amostras: (a) X_{Dex}= 25, (b) X_{Dex}= 65 e (c) X_{Dex}= 75.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O potencial zeta de superfície foi medido para avaliar a estabilidade das nanopartículas em função da fração de monômero empregada. A carga negativa na superfície sobre toda a faixa de pH estudada mostra que as características da superfície foram mantidas. Esperava-se que com o aumento da fração de ácido acrílico e, consequentemente, o aumento de grupos carboxílicos, houvesse maior variação do potencial zeta. Mesmo assim, foram obtidas suspensões estáveis, como pode ser observado na Figura 29, acima do pH igual a 6,5 até o término da titulação para todas as frações de monômeros empregadas, permitindo seu uso em aplicações biológicas.

Figura 29. Curva de potencial Zeta versus pH para amostra do copolímero variando a fração de monômero.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4. Encapsulação de óxidos de ferro

Para o estudo de incorporação de óxido de ferro foi empregada a formulação do copolímero que apresentou melhor estabilidade coloidal, em função dos resultados de potencial zeta e menor diferença entre os valores de diâmetro hidrodinâmico obtidos no início e ao término do processo de polimerização. Utilizando a composição X_{Dex} = 65, foram realizadas três sínteses para incorporação do ferrofluido contendo 50, 100 e 150 mg de óxido de ferro cada. Nesta etapa foi utilizado bissulfito de sódio como catalisador, auxiliando a formação de radicais livres para polimerização. Os radicais livres são formados a partir da cisão homolítica dos átomos através da transferência de elétrons ou de energia proveniente de calor. É o caso dos iniciadores de persulfato, que necessitam de energia térmica para gerar radicais livres para ruptura de suas ligações O – O. O emprego de persulfato como iniciador de polimerização é dependente do pH do meio reacional. Em meio neutro e alcalino, são formados dois radicais livres para cada molécula de persulfato, enquanto que em pH em meio ácido não é observada a formação de radicais, suprimindo a polimerização, mesmo em temperatura elevada [73]. Já a transferência de elétrons é um modo de iniciação de uma reação redox cuja principal vantagem

quando comparada com a iniciação térmica é a diminuição da energia de ativação, permitindo trabalhar com faixa de temperatura menores. O bissulfito de sódio e o persulfato de amônio atuam como par redox e o radical é formado como de acordo com a reação 3. Na primeira etapa da reação é formado um intermediário. O aumento da concentração de persulfato reduz a concentração de bissulfito livre e, consequentemente, a formação de radicais de bissulfito – reação 4. O persulfato e o bissulfito são considerados um par redox devido ao equilíbrio da figura 4 [74].

Tabela 7. Variação do diâmetro hidrodinâmico em função do teor de óxido de ferro.

Teor de Magh	Início		Término	
	D_h (nm)	PDI	D_h (nm)	PDI
50	236±1	0,106	215±1	0,125
100	235±3	0,191	224±6	0,200
150	225±1	0,174	223±1	0,169

Fonte: Elaborado pelo autor.

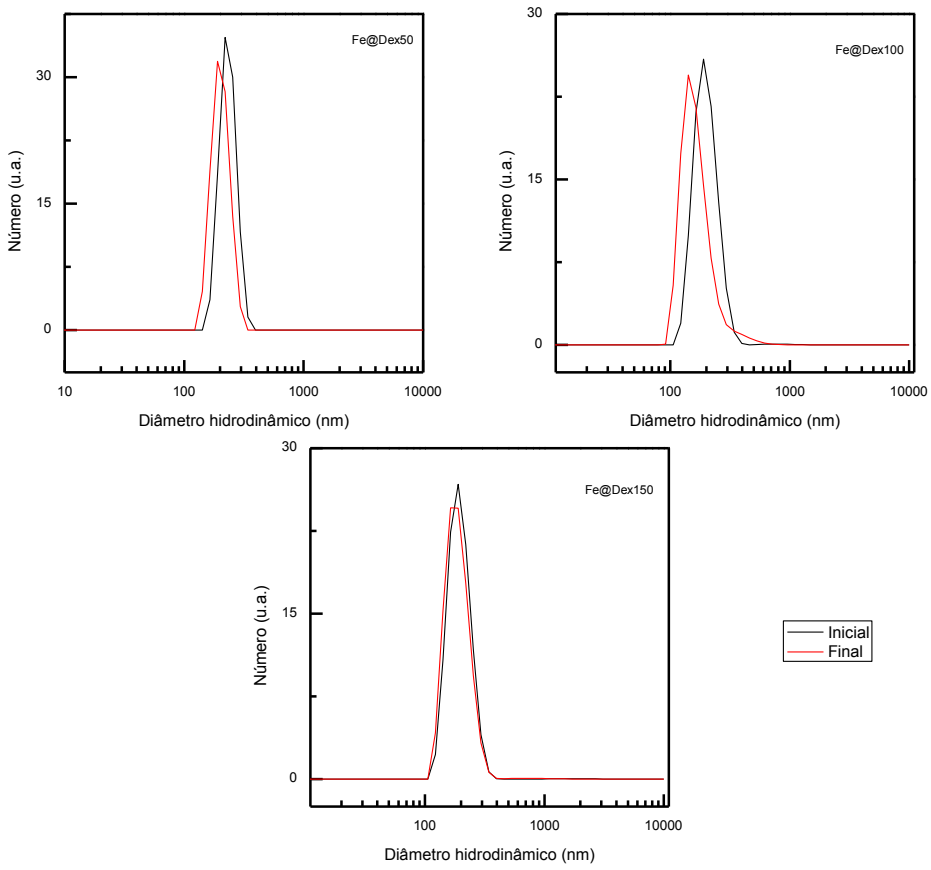
Com os resultados de espalhamento de luz era esperado que com o aumento da quantidade de ferrofluido o diâmetro hidrodinâmico do nanocompósito diminuísse. Isso porque durante a etapa de homogeneização por ultrassom, as gotas de monômeros sofrem processo de fusão/fissão até atingir um valor de diâmetro estacionário. Na presença de nanopartículas de óxido de ferro, a fissão é favorecida em detrimento a fusão, devido à regulação da pressão osmótica em função da presença dos óxidos. Dessa forma, as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro atuam como liófobo, ou seja, um agente insolúvel na fase contínua. Como os liófobos não se difundem para a fase contínua por serem insolúveis, eles exercem pressão osmótica dentro da gota de monômeros, evitando o colapso dessas gotas (degradação difusional), melhorando sua estabilidade [75]. No entanto foi observado (Tabela 7) que o diâmetro hidrodinâmico apresentou pequena diminuição durante o período de polimerização, porém as partículas estão distribuídas entre 100 e 400 nm

(Figura 30), região compreendida para o tamanho de partículas obtidas pelo processo de miniemulsão.

$$S_2O_8^{2-} + HSO_3^- \rightarrow [S_2O_8^{2-} \cdot HSO]^{3-} \quad (3)$$

$$SO_4^{-\cdot} + HSO_3^- \rightarrow SO_4^{2-} + HSO_3^{\cdot} \quad (4)$$

Figura 30. Perfil da distribuição do diâmetro hidrodinâmico.

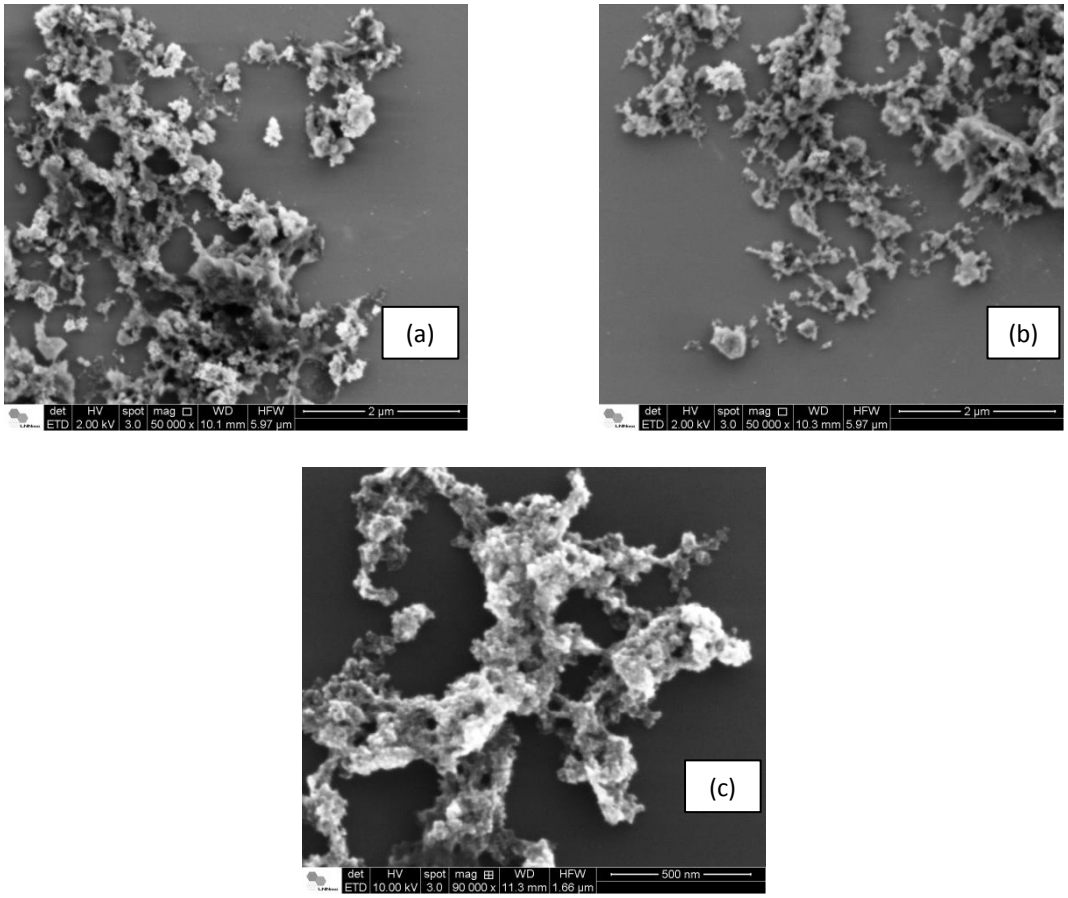


Fonte: Elaborado pelo autor.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas com intuito avaliar a morfologia do compósito. O material apresentou-se aglomerado para todas as imagens obtidas, entretanto é possível observar (Figura 31) que este aglomerado

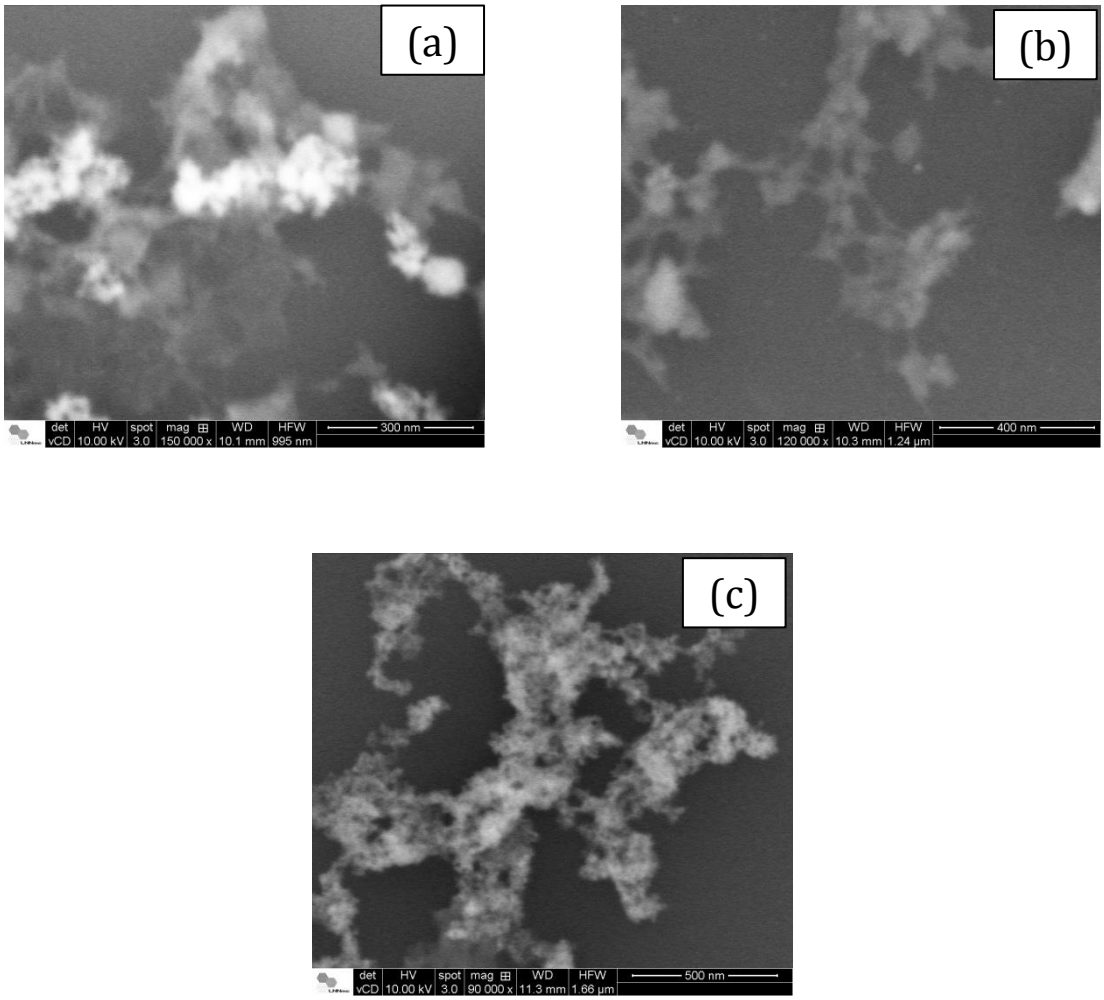
é composto por pequenas esferas. As formas não definidas correspondem a polímero segregado não removido durante o processo de lavagem. Também foram obtidas imagens de elétrons retroespalhados. A detecção de elétrons retroespalhados gera um contraste de composição em função do número atômico. Isso significa que através das imagens de elétrons retroespalhados é possível distinguir regiões com diferentes composições. Dessa forma, através das imagens da Figura 32, podemos concluir que a encapsulação das nanopartículas de óxido de ferro foram efetivas, justificado pela ausência de contraste destas micrografias.

Figura 31. Microscopia eletrônica de varredura das amostras: (a) Magh@Dex_50, (b) Magh@Dex_100 e (c) Magh@Dex_150.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura de elétrons retroespalhados para as amostras: (a) Magh@Dex_50, (b) Magh@Dex_100 e (c) Magh@Dex_150.

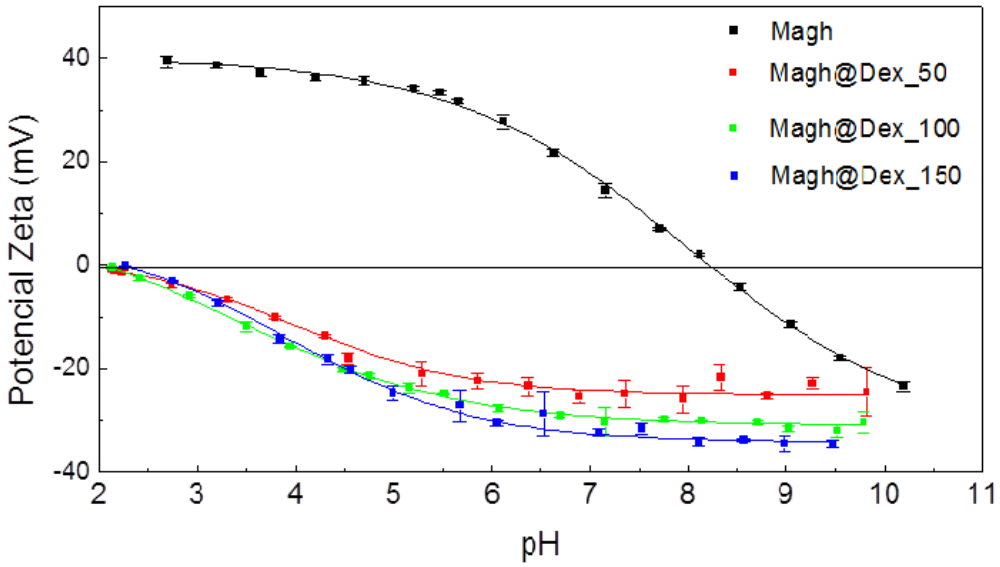


Fonte: Elaborado pelo autor.

A titulação do potencial zeta de superfície em função do pH também nos permite caracterizar a encapsulação das nanopartículas de óxido de ferro. Como pode ser observado na Figura 33, o óxido de ferro sem revestimento apresenta valor de potencial zeta positivo em condições ácidas devido ao seu caráter anfótero, conforme discutido anteriormente. Para as amostras nas quais o óxido de ferro foi encapsulado não é observado valor de potencial zeta positivo na faixa de pH estudada e o comportamento da curva apresenta perfil similar ao obtido para o material sem óxido de ferro, indicando que a encapsulação foi efetiva para todas as amostras estudadas. Em relação à estabilidade coloidal, acima de pH 6,0 as

amostras encapsuladas são consideradas estáveis no meio, podendo ser utilizadas em aplicações biomédicas.

Figura 33. Curva de potencial Zeta versus pH para amostra de copolímero variando o teor de óxido de ferro.



Fonte: Elaborado pelo autor.

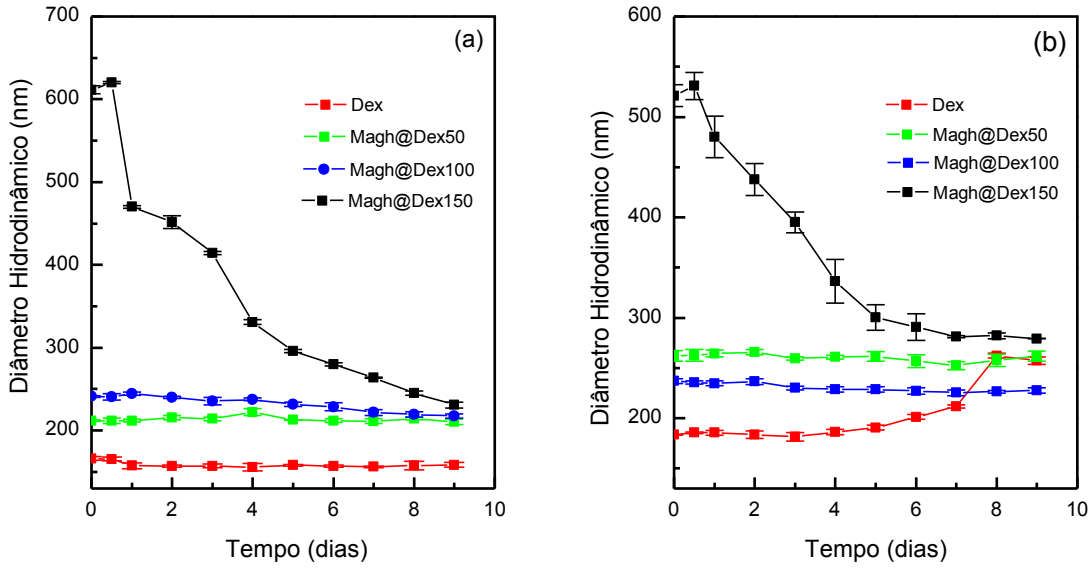
Os protocolos para incorporação e liberação de drogas são, geralmente, realizados em meios tamponados. A estabilidade coloidal do copolímero contendo óxido de ferro foi estudada em tampão tris.HCl e fosfato (0,01 mol L^{-1}), ambos em pH 7,4. O diâmetro hidrodinâmico das dispersões foi determinado em função do tempo durante o período de nove dias, conforme pode ser observado na Figura 34. A amostra de óxido de ferro sem revestimento mostrou-se instável em todos os meios empregados, formando agregados e sedimentando em poucos minutos não sendo detectadas partículas no sobrenadante. A amostra dispersa em tampão fosfato apresentou D_h de 8258 nm e índice de polidispersividade (0,598), enquanto que a amostra dispersa em tris.HCl apresentou D_h de 5891 nm com índice de polidispersividade (0,400). Em meio de tris.HCl, as amostras se apresentaram estáveis durante o período analisado, não sendo observado aumento no valor do D_h, exceto para a amostra Magh@Dex_150. As partículas desta amostra se agregaram

no primeiro dia de análise, como pode ser observado com o aumento do D_h. Os agregados se sedimentaram e o D_h diminui em função do tempo, caracterizando esta amostra como instável. As amostras também foram dispersas em tampão fosfato. As dispersões apresentaram comportamento similar em ambos os meios, exceto para a amostra controle Dex, na qual o D_h apresentou aumento de 183,4 nm (PDI=0,334) para 263,2 nm (PDI=0,361). Os valores médios do D_h e PDI das amostras poliméricas incorporadas com óxido de ferro são apresentados na Tabela 8. Ao aplicar campo magnético (0,3 T) sobre a suspensão não houve separação imediata das nanopartículas magnéticas. A separação completa ocorreu após 24 horas de contato com o campo externo, como pode ser observado na Figura 35.

A estimativa do grau de encapsulação dos óxidos de ferro foi realizada através dos valores de perda de massa obtidos pelas curvas termogravimétricas, conforme a Figura 36. A curva da amostra Magh apresenta única etapa de perda de massa, que corresponde à perda de água adsorvida sobre a superfície (10,0%) até a temperatura de 150 °C. Para as amostras encapsuladas com copolímero são observadas duas etapas de perda de massa. A primeira redução de massa ocorre até 130 °C e pode ser atribuída a perda de moléculas de água adsorvidas no compósito. A segunda redução, compreendida entre 190 – 340 °C, corresponde a decomposição das cadeias da dextrana [76; 77]. Essa perda de massa corresponde a 83,9%, 81,8% e 81,0% para as amostras contendo 50, 100 e 150 mg de óxido de ferro, respectivamente.

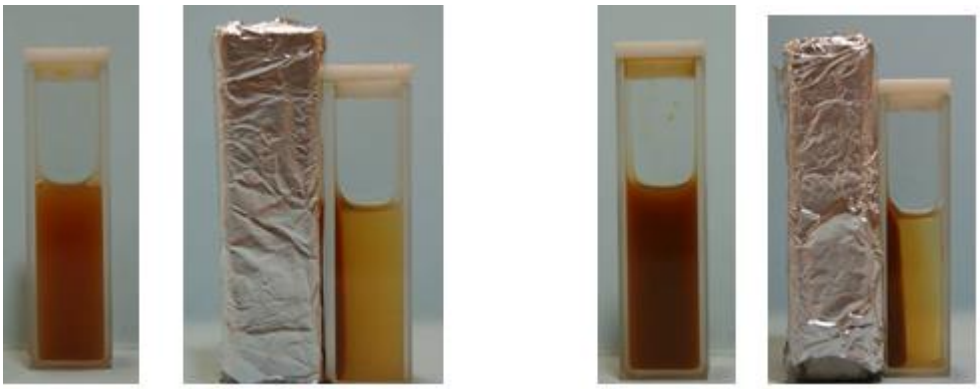
Algumas considerações são necessárias para o cálculo da estimativa de encapsulação: que o resíduo da combustão é composto apenas da massa de óxido de ferro e que todo polímero e água adsorvida foram eliminados. A Tabela 9, apresenta a porcentagem de encapsulação de óxido de ferro pelo copolímero. Pode-se observar que a porcentagem máxima encapsulação foi de 35,7% de óxido de ferro para a amostra Magh@Dex_100, ou seja, para amostras com teor de óxido de ferro superior a 100 mg a incorporação torna-se ineficiente. A baixa porcentagem de encapsulação pode estar relacionada ao processo de miniemulsão, pois algumas gotas de polímero são formadas na ausência do óxido de ferro e o óxido de ferro não encapsulado é removido junto com o polímero segregado.

Figura 34. Diâmetro hidrodinâmico em função do tempo para as amostras de encapsuladas dispersas nos tampões: (a)TrisHCl e (b) Fosfato.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35. Processo de separação das amostras Magh@Dex_100 (esquerda) e Magh@Dex_150 (direita) por campo magnético externo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8. Média dos diâmetros hidrodinâmicos e índice de polidispersividade (PDI) determinados em tampão Tris e fosfato para as amostras poliméricas incorporadas com óxido de ferro.

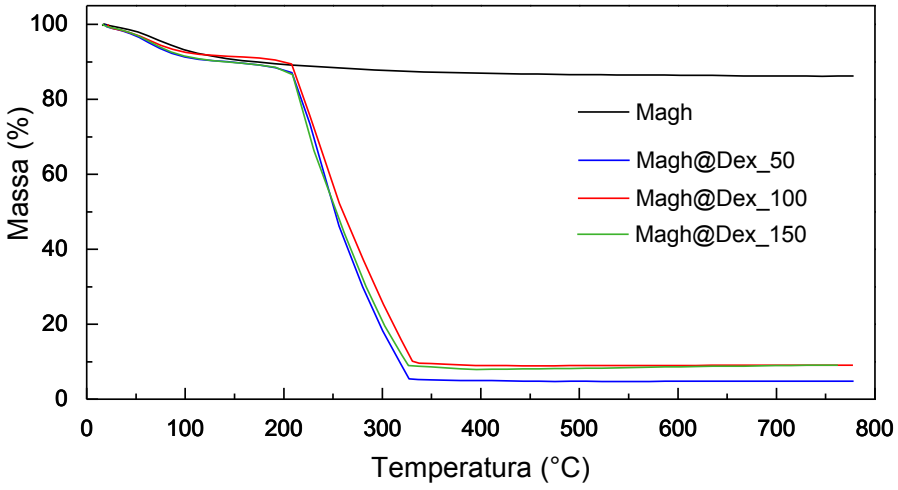
	Tris (pH 7,4)		Fosfato (pH 7,4)	
Amostra	D_h (nm) / PDI [a] t= 0 (dias)	D_h (nm)/ PDI [a] t= 30 (dias)	D_h (nm) / PDI [a] t= 0 (dias)	D_h (nm) / PDI [a] t= 30 (dias)
Dex	166,3 / 0,281	158,4 / 0,223 [b]	183,4 / 0,335	257,3 / 0,403 [b]
Magh@Dex50	212,0 / 0,256	234,5 / 0,244	259,2 / 0,230	273,6 / 0,220
Magh@Dex100	241,0 / 0,199	160,9 / 0,204	237,0 / 0,381	246,9 / 0,121
Magh@Dex150	611,5 / 0,428	248,9 / 0,424	527,3 / 0,295	218,5 / 0,205

[a] Média do diâmetro hidrodinâmico baseado em experimento realizado em triplicata.

[b] 8 dias

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 36. Curvas termogravimétricas das amostras de: óxido de ferro puro e de óxido de ferro encapsuladas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9. Encapsulação de óxido de ferro.

Amostra	Magh teórico (mg)	Magh experimental (mg)	Encapsulação de Magh (%)
Magh@ Dex_50	50	15,9	31,8
Magh@Dex_100	100	35,7	35,7
Magh@Dex_150	150	36,3	24,2

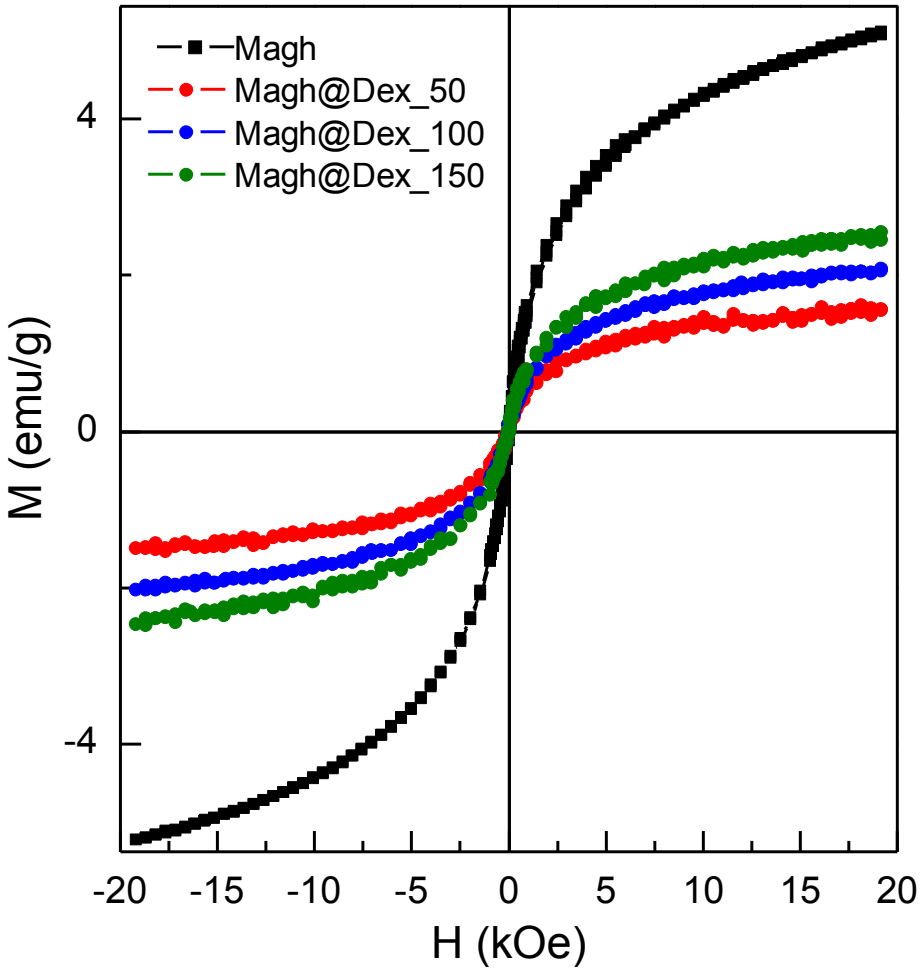
Fonte: Elaborado pelo autor.

As características magnéticas das amostras foram determinadas a partir das curvas de histerese magnética, na temperatura de 300 K. De acordo com a literatura, o valor da magnetização de saturação para a maghemita bulk é de 83,5 emu g^{-1}, enquanto a valor obtido para a amostra Magh foi de 30,6 emu g^{-1}. A diminuição nos valores da magnetização de saturação para as amostras nanométricas é frequentemente observada e pode ser atribuída a uma camada superficial desordenada das nanopartículas, na qual os spins estão randomicamente orientados. A diminuição da magnetização de saturação pode estar relacionada a presença vacâncias ou ligações rompidas. A intensidade e a direção da anisotropia na superfície também influenciam na diminuição destes valores (78).

O valor de magnetização de saturação foi determinado para as nanopartículas poliméricas com o óxido de ferro encapsulado. O valor da magnetização se saturação diminuiu à medida que a quantidade de óxido de ferro presente na amostra foi reduzida, conforme apresentado na Figura 37. A amostra Magh@Dex_50 possui uma camada de polímero mais espessa, uma vez que contém menor quantidade de óxido de ferro, justificando a diluição magnética observada. Embora a caracterização correta da propriedade de superparamagnetismo seja através da determinação da temperatura de bloqueio, as amostras não apresentaram valores para remanência e coercividade, como observado na curva de magnetização *versus* campo aplicado da Figura 37, sendo um forte indício do comportamento superparamagnético nesta temperatura. Devido a esta propriedade, os materiais podem ser utilizados em aplicações biomédicas *in*

vivo, pois, a partir da remoção do campo externo, as nanopartículas não apresentaram comportamento magnético remanescente dentro do corpo.

Figura 37. Curva de magnetização *versus* campo para as amostras de óxido de ferro sem revestimento e para as amostras encapsuladas pelo polímero, obtidas a 300 K.



* Os valores de magnetização para a amostra sem revestimento foi dividido por 5 para efeito de comparação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir das caracterizações da encapsulação dos óxidos de ferro pelo copolímero, a amostra Magh@Dex_100 foi a que apresentou, até o momento, os melhores resultados para futuras aplicações na área biomédica. O valor de

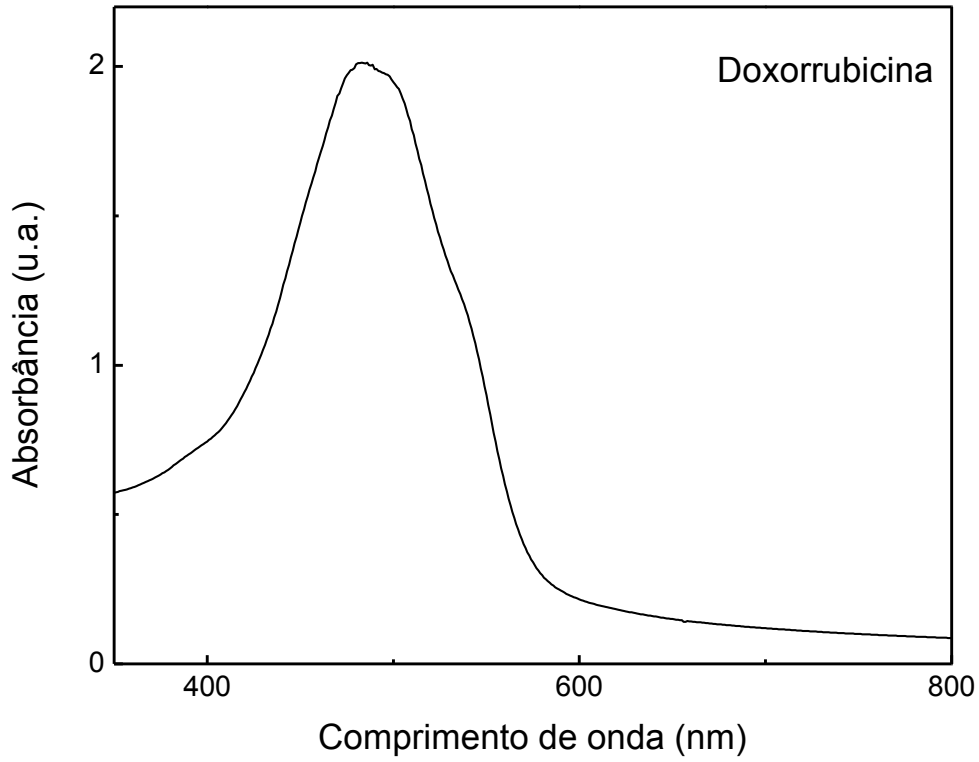
magnetização de saturação foi intermediário quando comparado com as outras amostras, entretanto sua estabilidade coloidal e a porcentagem de incorporação se mostraram satisfatórias.

3.5. Incorporação de doxorrubicina

Na determinação da capacidade máxima de incorporação da doxorrubicina nas nanopartículas poliméricas com óxido de ferro foram utilizadas soluções de doxorrubicina nas concentrações de 0,2 mg mL^{-1}, 0,5 mg mL^{-1} e 0,8 mg mL^{-1}. A concentração após o período de incorporação foi determinada utilizando a espectroscopia UV-Vis. O espectro de absorção da amostra de doxorrubicina é apresentado na Figura 38. Como pode ser observado, a doxorrubicina apresenta absorção máxima no comprimento de onda de 486 nm, o qual foi utilizado para construção da curva analítica, Figura 39. A lei de Lambert – Beer foi obedecida na construção da curva analítica, resultando em uma reta com coeficiente angular de 8,908.

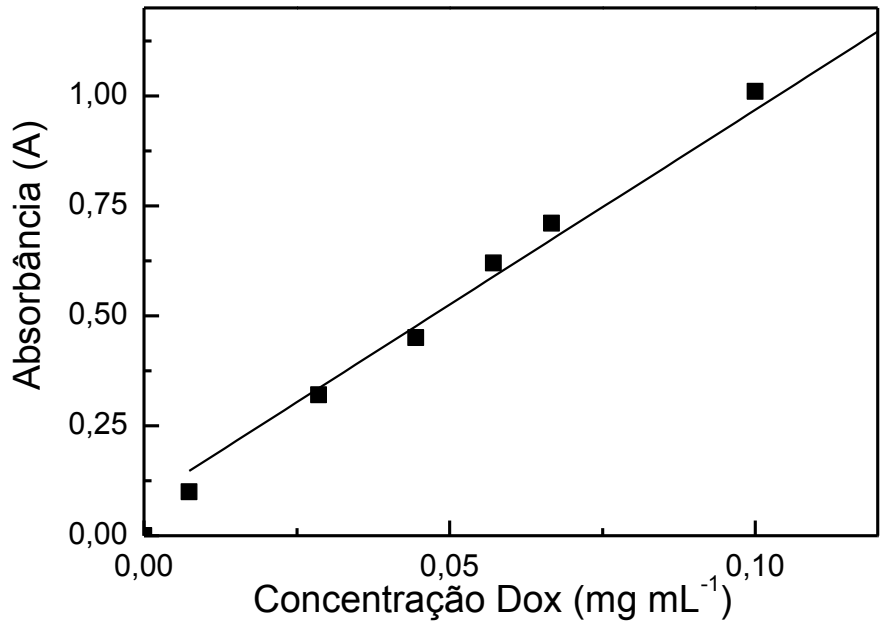
A concentração de 0,8 mg mL^{-1} de doxorrubicina resultou em maior eficiência de incorporação, 85,81%, conforme resultados da Tabela 10. Características físico-químicas da doxorrubicina, tais como a hidrofilicidade/hidrofobicidade e solubilidade são dependentes do pH. O pKa da doxorrubicina é 8,2, portanto, sua solubilidade será maior quando a droga se apresenta em sua forma protonada. A incorporação da droga é atribuída às interações dos grupos amino e hidroxila da doxorrubicina com os grupos hidroxila presentes na superfície da dextrana [79; 80]. Aumentando a camada de dextrana espera-se um aumento na conjugação com a droga, o que resultará em menores taxas de liberação.

Figura 38. Espectro de absorção para amostra de doxorrubicina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 39. Curva analítica da doxorrubicina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10. Eficiência de incorporação da doxorrubicina.

Amostra	Concentração total Dox (mg mL^{-1})	Absorbância após incorporação	Concentração livre Dox (mg mL^{-1})	Eficiência de incorporação (%)
1	0,200	0,702	0,077	60,60
2	0,500	0,902	0,101	79,74
3	0,800	1,011	0,113	85,81

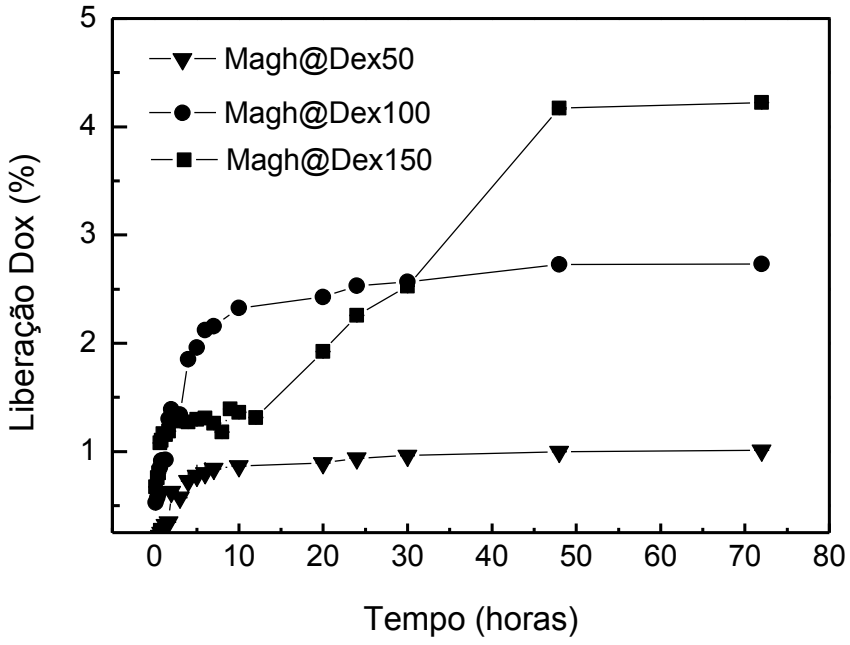
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6. Estudo de retenção da doxorrubicina

A retenção da doxorrubicina foi estudada em tampão fosfato, em pH 7,4, em função do tempo. Após o processo de incorporação de doxorrubicina nas amostras Magh@Dex, o material foi seco e transferido para uma membrana de diálise. Esta membrana foi inserida dentro de um tubo contendo solução tampão fosfato em pH 7,4. Alíquotas do material liberado foram removidas para análise durante 74 horas, obtendo o perfil de liberação em função do tempo, conforme apresentado na Figura 40. A concentração de doxorrubicina foi determinada pelo aumento do valor da absorbância da solução da diálise. As amostras Magh@Dex_50 e Magh@Dex_100 resultaram em perfil de liberação similares. A taxa de liberação da droga foi elevada durante as primeiras 3 horas de liberação. Após as 3 horas, a taxa de liberação diminuiu até atingir 10 horas, seguido de outra diminuição da velocidade de liberação da doxorrubicina. Para a amostra magh@Dex_150 é observado um patamar durante o período de 3 a 12 horas de liberação. Após 12 horas é observado aumento da taxa de liberação. A liberação rápida durante as primeiras horas do estudo é atribuída à elevada quantidade de moléculas da doxorrubicina presente na superfície. Passado 48 horas do inicio do estudo todas as amostras atingiram um patamar de liberação, no qual a liberação máxima de doxorrubicina foi de 4,2% para a amostra Magh@Dex_150. A quantidade de óxido de ferro encapsulada reflete na porcentagem liberada. O uso de menor teor de ferro resulta em mais sítios livres da dextrana para conjugação com o fármaco.

Devido à baixa porcentagem de liberação da doxorrubicina é possível concluir a droga fica retida na cadeia polimérica da dextrana. A doxorrubicina não é liberada após nova dispersão em tampão fosfato, conservando suas características iniciais. A baixa porcentagem de liberação pode ser atribuída a forte interação entre a molécula da droga e a dextrana, através de ligações de hidrogênio. A porcentagem que foi liberada em cada amostra é referente a moléculas de doxorrubicina fracamente adsorvidas na superfície do compósito. Este resultado indica que a liberação pode ser controlada por estímulos externos, tais como temperatura, pH, campo magnético, abrindo novas possibilidades de estudo. Se o tipo de interação entre a doxorrubicina e o compósito for eletrostática, o aquecimento é capaz de romper as interações, facilitando sua liberação. O campo magnético pode ser utilizado na indução de calor aplicando campo alternado sobre as nanopartículas de óxido de ferro [81; 80]. Assim, concluímos que a doxorrubicina fica retida na estrutura da dextrana, trabalhos futuros permitirão estudar os mecanismos de liberação, ajustando condições ideais para seu emprego na biomedicina.

Figura 40. Perfil da retenção da doxorrubicina em função do tempo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4. Conclusão

As nanopartículas magnéticas de maghemita foram obtidas a partir da oxidação da magnetita sintetizada pelo método de coprecipitação. A caracterização deste óxido de ferro pela difratometria de raio X confirmou a presença da estrutura do tipo espinélio, a qual confere propriedades magnéticas ao material. Através da espectroscopia Raman foi possível caracterizar o óxido como maghemita devido as bandas características apresentadas. A maghemita apresentou morfologia esférica, com tamanho médio de 5,2 nm.

A dextrana foi derivatizada com intuito de ancorar grupos vinílicos sobre a cadeia do polissacarídeo. A utilização de dextrana com massa molecular alta (40kDa) apresentou maior grau de substituição e melhor rendimento da reação.

A derivatização permitiu que fossem realizadas reações de copolimerização por miniemulsão inversa entre a dextrana e acído acrílico para encapsular o óxido de ferro. Para otimizar a polimerização por miniemulsão foi estudada a variação do tipo e concentração de surfactante, fração dos monômeros de dextrana e ácido acrílico e a quantidade de óxido de ferro capaz de ser encapsulada. As técnicas utilizadas para caracterizar os copolimeros quanto a formação, morfologia e estabilidade coloidal foram as espectroscopia na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, medidas de espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta de superfície. A amostra que apresentou melhor eficiência de incorporação de óxido de ferro foi formulada empregando Span 80 como surfactante na concentração 4%(m/m) em n-heptano e fração em massa de 0,65 de dextrana. Essa formulação foi capaz de incorporar 35,7% do óxido de ferro, apresentando boa estabilidade coloidal em tampões com pH fisiológico.

O sistema caroço@casca obtido foi aplicado no estudo de incorporação e retenção de droga. O sistema apresentou eficiência de incorporação superior a 80% e capacidade de retenção de 96% da doxorrubicina incorporada. Os altos valores de incorporação e retenção são devidos à forte interação entre a doxorrubicina e e o compósito magnético modificado com a dextrana derivatizada.

5. Propostas futuras

- Investigar o grau de substituição no processo de derivatização com a finalidade de aumentar a eficiência de incorporação de óxido de ferro e drogas;
- Investigar a estabilidade coloidal das partículas contendo drogas;
- Aplicar estímulos (pH e campo magnético) na liberação de drogas;
- Estudar o mecanismo de liberação;

REFERÊNCIAS

1 SCHÜTH, F.; LU, A. H.; SALABAS, E. L. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization and application. **Angewandte Chemie**, v. 46, p. 1252-1265, 2007.

2 PANKHURST, Q. A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D**: Applied Physics, v. 36, p. R167-R181, 2003.

3 EASO, S. L.; MOHANAN, P. V. Dextran stabilized iron oxide nanoparticles: synthesis, characterization and *in vitro* studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 726-732, 2013.

4 LIU, Z. et al. Polysaccharides - based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1650-1662, 2008.

5 PANKHURST, Q. A. et al. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D**: Applied Physics, v. 42, p. 1-15, 2009.

6 ROSZEK, B. **Nanotechnology in medical applications**: state-of-the-art in materials and devices. 2005. p. 123. Disponível em: <http://www.nanowerk.com/nanotechnology-report.php?reportid=13>. Acesso em: 13 nov. 2013.

7 CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to magnetic materials**. 2nd. ed. Totowa: John Wiley, 2009. 544 p.

8 JILES, D. **Introduction to magnetism and magnetic materials**. 2nd. ed. London: Chapman & Hall, 1998. 536 p.

9 CALLISTER, W. D. Magnetic materials. In: _____. **Materials science and engineering**: an introduction. New York: John Wiley & Sons, 2008. Cap. 20, p. 76-113.

10 O'HANDLEY, R. C. **Modern magnetic materials**. New York: John Wiley, 2000. 740 p.

11 SHRIVER, D. F. et al. Química do estado sólido e química dos materiais. In: _____. **Química inorgânica**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008. Cap. 23, p. 609-660.

12 HOU, Y.; YANG, C.; WU, J. Fe2O3 nanostructures: synthesis, growth mechanism, properties. **Chemical Communications**, v. 47, p. 5130-5141, 2011.

13 KALENDOVÁ, A.; VESELÝ, D.; BRODINOVÁ, J. Anticorrosive spinel-type pigments of the mixed metal oxides compared to metal polyphosphates. **Anti-corrosion Methods and Materials**, v. 51, p. 6-17, 2004.

14 CORNEL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The iron oxide**: structure, properties, reactions, occurences and uses. 2nd. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. 664 p.

15 LAURENT, S. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 2064-2110, 2007.

16 TARTAJ, P. et al. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D**: Applied Physics, v. 36, p. R182-R197, 2003.

17 SHAW, D. J. Charged interface. In: _____. **Introduction of colloids and surface chemistry**. 4th. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. Cap. 7, p. 174-199.

18 ISLAM, A. M.; CHOWDHRY, B. Z.; SNOWDEN, M. J. Hetroaggregation in colloidal dispersions. **Advances in Colloidal and Interfaces Science**, v. 62, p. 109-136, 1995.

19 MYERS, D. **Surfaces, interfaces and colloids**. 2nd. ed. New York: VCH, 1991. 433 p.

20 CHAUDHURI, R. G.; PARIA, S. Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 2373-2433, 2012.

21 DIAS, A. M. G. C. et al. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 142-145, 2011.

22 MEHVAR, R. Dextrans for targeted and susteined delivery of therapeutic and imaging agents. **Journal of Controlled Release**, v. 69, p. 1-25, 2000.

23 PAL, K.; PAULSON, A. T.; ROUSSEAU, D. Biopolymers in controlled release delivery systems. In: KASAPIS, S.; NORTON, I. T.; UBBINK, J. B. **Modern biopolymer science**. Amsterdam: Elsevier, 2009. Cap. 16, p. 519-557.

24 GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 26, p. 3995-4021, 2005.

25 RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887-913, 2011.

26 MITTAL, V. **Miniemulsion polymerization technology**. Salem: Scrivener, 2010. 71 p.

27 ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. **Progress in Polymer Science**, v. 27, p. 689-757, 2002.

28 ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 27, p. 1283-1346, 2002.

29 ROSS, S.; MORRISON, I. D. **Colloidal systems and interfaces**. New York: John Wiley, 1988. 422 p.

30 SCHORK, F. J. et al. Miniemulsion polymerization. **Advances in Polymer Science**, v. 175, p. 129-255, 2005.

31 BERRY, C. C.; CURTIS, A. S. G. Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D**: Applied Physics, v. 36, p. R198-R206, 2003.

32 WUST, P. et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. **Lancet Oncology**, v. 3, p. 487-497, 2002.

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

34 GILCHRIST, R. K. et al. Seletive inductive heating of lymph nodes. **Annals of Surgery**, v. 146, p. 596-606, 1957.

35 BABICOVÁ, M. et al. Selective treatment of neoplastic cells using ferritin-mediated eletromagnetic hyperthermia. **Medical Hypotheses**, v. 54, p. 177-179, 2000.

36 MAGFORCE AG The Nanomedicine Company. **Nanotherm® particles switch their polarity 1000,000 times every second**. Disponível em: <http://www.magforce.de/en/produkte/nanoactivatorr.html>. Acesso em: 04 mar. 2014.

37 KANE, S. A. Magnetic ressonance imaging. In: _____. **Introduction to physics in modern medicine**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2009. Cap. 8, p. 347-401.

38 RÜMENAPP, C.; GLEICH, B.; HAASE, A. Magnetic nanoparticles in magnetic ressonance imaging and diagnostics. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 1165-1179, 2012.

39 DOBSON, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Drug Development Research**, v. 67, p. 55-60, 2006.

40 ARRUEBO, M. et al. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Nano Today**, v. 32, p. 22-32, 2007.

41 FERNÁNDEZ-PACHECO, R. et al. Magnetic nanoparticles for local drug delivery using magnetic implants. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, p. 318-322, 2007.

42 YELLEN, B. B. et al. Targeted drug delivery to magnetic implants for therapeutic applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 647-654, 2005.

43 GAUTIER, J. et al. Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 169, p. 48-61, 2013.

44 PLATAFORMA HiDOCTOR. **Cloridrato de doxorrubicina**. 2013. Disponível em: < http://www.bulas.med.br/bula/294770/cloridrato+de+doxorrubicina.htm>. Acesso em: 04 mar. 2014.

45 KEIZER, H. G. et al. Doxorubicin (Adriamycin): a critical review of free radical dependent mechanisms of cytotoxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, p. 219-231, 1990.

46 MASSART, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. **IEEE Transaction on Magnetics**, v. 17, p. 1247-1248, 1981.

47 KANG, Y. S. et al. Shynthesis and characterization of nanometer size Fe3O4 and Fe2O3 particles. **Chemical Materials**, v. 8, p. 2209-2211, 1996.

48 ARMAROLI, T.; BÉCUE, T.; GAUTIER, S. Diffuse reflections infrared spectroscopy (DRIFTS): applications to the *in situ* analysis of catalysts. **Oil and Gas Science and Technology**, v. 59, p. 215-237, 2004.

49 MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer nano series user manual**. Worcestershire, 2004. 269 p. Disponivel em: <http://www.malvern.com/en/>. Acesso em: 13 dez. 2013.

50 DAOU, T. J. et al. Hydrothermal synthesis of monodispersive magnetite nanoparticles. **Chemical Materials**, v. 18, p. 4399-4404, 2006.

51 GNANAPRAKASH, G. et al. Effect of initial pH and temperature of iron salt solutions on formation of magnetite nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 103, p. 168-175, 2007.

52 CULLITY, B. D. **Elements of x-ray diffraction**. 2nd. ed. Reading: Addison-Wesley, 1978. 555 p.

53 SOLER, M. A. G. et al. Study of molecular surface coating on the stability of maghemite nanoparticles. **Surface Science**, v. 601, p. 3921-3925, 2007.

54 DE FARIA, D. L. A.; SILVA, S. V.; OLIVEIRA, M. T. de. Raman microspectroscopy of some iron oxides and oxyhydroxides. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 28, p. 873-878, 1997.

55 JUBB, A. M.; ALLEN, H. C. Vibrational spectroscopic characterization of hematite, maghemite and magnetite thin films produced by vapor deposition. **Applied Materials and Interfaces**, v. 2, p. 2804-2812, 2010.

56 SUN, Z. et al. Surface characteristics of magnetite in aqueous suspensions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 197, p. 151-159, 1998.

57 VIDAL-VIDAL, J.; RIVAS, J.; LÓPEZ-QUINTELA, M. A. Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method. **Colloid andSurfaces A**: Physicochemical and Engennering Aspects, v. 288, p. 44-51, 2006.

58 WEBSTER, F. X.; SILVERSTEIN, R. M.; Infrared spectroscopy. In:_____. **Spectroscopy identification of organic compounds**. 6th. ed. New York: John Wiley & Sons, 1998. Cap. 3, p. 71-143.

59 VAN DIJK-WOLTHUIS, W. N. E. et al. Synthesis, characterization and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran. **Macromolecules**, v. 28, p. 6317-6322, 1995.

60 VAN DIJK-WOLTHUIS, W. N. E. et al. Reaction of dextran with Glycidyl Methacrylate: an unexpected transesterification. **Macromolecules**, v. 30, p. 3411-3413, 1997.

61 UCKUN, F. M.; D'CRUZ, O. J. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, v. 64, p. 113-123, 2001.

62 GRIFFIN, W. C. Classification of surface active agents by HLB. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311-326, 1949.

63 GRIFFIN, W. C. Calculation of HLB values of nonionic surfactants. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 5, p. 249-256, 1954.

64 ROSEN, M. J. Emulsification by surfactants. In: _____. **Surfactants and interfacial phenomena**. 3rd. ed. Totowa: John Wiley & Sons, 2004. Cap. 8, p. 303-331.

65 CHIU, H.; LIN, Y.; HSU, Y. Effects of acrylic acid on preparation and swelling properties of pH sensitive dextran hydrogels. **Biomaterials**, v. 23, p. 1103-1112, 2002.

66 CHIU, H.; WU, A.; LIN, Y. Synthesis and characterization of acrylic acid-containing dextran hydrogels. **Polymer**, v. 42, p. 1471-1479, 2001.

67 LANDFESTER, K. et al. Evidence for the preservation of the the particle identity in miniemulsion polymerization. **Macromolecular Rapid Communication**, v. 20, p. 81-84, 1999.

68 AZAD, A. R. M. et al. Emulsification and emulsion polymerization of styrene using mixtures of cationic surfactant and long chain fatty acid alcohols or alkanes as emulsifiers. In: PIIRMA, I. et al. **Emulsion polymerization**. Washington, DC: American Chemical Society, 1976. Cap. 1, p. 1-23.

69 CHOI, Y. T. et al. Polimerization of styrene miniemulsions. **Journal of Polymer Science**: Polymer Chemistry Edition, v. 23, p. 2973-2987, 1985.

70 EISSA, M. M. et al. Reactive magnetic poly(divinylbenzene-co-glycidyl methacrylate) colloidal particles for especific antigen detection using microcontact printing technique. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 5573-5582, 2013.

71 ROTUREAU, E. et al. Application of amphiphilic polysaccharides as stabilizers in direct and inverse free radical miniemulsion polymerization. **Colloids and Surfaces A**: Physicochemical and Engeneering Aspects, v. 331, p. 84-90, 2008.

72 MARIE, E.; LANDFESTER, K.; ANTONIETTI, M. Synthesis of chitosan stabilized polymer dispersions, capsules and chitosan grafting products via miniemulsiom. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 475-481, 2002.

73 MISHRA, M. K.; YAGCI, Y. **Handbook of radical vinyl polymerization**. New York: Mercel Dekker, 1998. 424 p.

74 POHL, K.; RODRIGUEZ, F. Adiabatic polymerization of acrylamide using a persulfate-bissulfite redox couple. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 26, p. 611-618, 1980.

75 WANG, C. C. et al. Encapsulation of nanosized magnetic iron oxide by polyacrylamide via inverse miniemulsion polymerization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 277, p. 136-143, 2004.

76 JURÍKOVÁ, A. et al. Thermal analysis of magnetic nanoparticles modified with dextran. **Acta Physica Polonica A**, v. 121, p. 1296-1298, 2012.

77 CARP, O. et al. Thermal analysis of two types of dextran-coated magnetite. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 101, p. 181-187, 2010.

78 KODAMA, R. H. Magnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 200, p. 359-372, 1999.

79 KAYAL, S.; RAMANUJAN, R. V. Doxorrubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, p. 484-490, 2010.

80 QI, J. et al. Nanoparticles with dextran/chitosan shell and BSA/chitosan core - doxorubicin loading and delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 393, p. 176-184, 2010.

81 SANSON, C. et al. A simple method to achive high doxorubicin loading in biodegradable polymersomes. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p. 428-435, 2010.