



Obtenção de nanopartículas magnéticas sensíveis a estímulos para aplicações biomédicas

Simone de Fatima Medeiros

► To cite this version:

Simone de Fatima Medeiros. Obtenção de nanopartículas magnéticas sensíveis a estímulos para aplicações biomédicas. Food and Nutrition. Université Claude Bernard - Lyon I; Universidade de São Paulo (Brésil), 2010. Portuguese. NNT: 2010LYO10351 . tel-01614516

HAL Id: tel-01614516

<https://theses.hal.science/tel-01614516>

Submitted on 11 Oct 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

SIMONE DE FÁTIMA MEDEIROS

**Obtenção de nanopartículas magnéticas sensíveis a estímulos para
aplicações biomédicas**

Lorena - SP

2010

SIMONE DE FÁTIMA MEDEIROS

**Obtenção de nanopartículas magnéticas sensíveis a estímulos para aplicações
biomédicas**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena, da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Doutora em Ciências na área: Materiais Aplicados ao
Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Amilton Martins dos Santos

Lorena - SP
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Especializada em Engenharia de Materiais
USP/EEL

Medeiros, Simone de Fátima

Obtenção de nanopartículas magnéticas sensíveis a estímulos para aplicações biomédicas / Simone de Fátima Medeiros ; orientador Amilton Martins dos Santos --Lorena, 2010.
292 f.: il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Materiais. Área de Concentração: Materiais metálicos, cerâmicos e poliméricos) – Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo.

1. *N*-vinilcaprolactama 2. LCST 3. Cinética de polimerização 4. Polimerização em miniemulsão 5. Nanopartículas magnéticas 6. Aplicações biomédicas I. Título.

CDU 666.3

Dedicatória

Aos meus primeiros mestres na vida, os responsáveis pelos meus primeiros ensinamentos. Àqueles que me ensinaram a caminhar, a falar, que me mostraram a diferença entre o certo e o errado, se sentiram felizes quando eu estava feliz, se entristeceram junto comigo nos momentos ruins, se encheram de orgulho nos meus momentos de realização, sentiram minha falta sempre que estive ausente...

A ciência nunca será capaz de transmitir os valores e princípios que vocês me ensinaram e que, com certeza, carregarei por toda minha vida.

E é a vocês, meus pais, Graça e Geraldo, que tanto me incentivaram e lutaram comigo para que eu vencesse cada desafio, que eu dedico essa conquista.

Agradecimentos

À Deus, pela vida.

Ao Prof. Dr. Amilton Martins dos Santos pela orientação, apoio e atenção durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Abdelhamid Elaissari pela co-orientação e pela acolhida no Laboratoire d'Automatique et Génie des Procédés (LAGEP).

À minha família e ao Eduardo, pela compreensão e apoio durante a realização deste trabalho.

À Gizelda por toda ajuda prestada, sempre com muita boa vontade e amizade.

Aos amigos que trabalharam nesta tese, Paulo e Bárbara.

À Prof.^a Dr.^a Jayne, pelas análises de RMN ¹H e pelas aulas de francês..

À Cibele, pelas análises de FTIR.

Ao Prof. Dr. Paulo Suzuki, pelas análises de difratometria de Raios X.

Ao Dr. Marcelo Alves Ferreira e ao Serge Butadier, pelas análises de TEM.

À Dr.^a Maria Inês Ré pelo auxílio com os ensaios de liberação *in-vitro*.

Aos funcionários do IPT, pelo auxílio nos ensaios de encapsulação realizados no Laboratório de Tecnologia de Partículas.

Ao Prof. Manoel Ribeiro da Silva, pelas análises de magnetização

Ao Laboratoire de Chimie et Procédés de Polymérisation (LCPP), pelas análises de cromatografia gasosa.

Ao Prof. Dr. Pedro Carlos de Oliveira pela amizade e ajuda nas correções de relatórios, trabalhos para congressos e artigos.

Aos amigos e companheiros da EEL, Daniella, Paulo e Luciana.

À CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e à FAPESP, pela utilização dos equipamentos adquiridos através de projetos financiados pela instituição.

Aos colegas que tive a oportunidade de conviver no Laboratório de Polímeros da EEL-USP.

Aos colegas do LAGEP, pelo companheirismo durante o período de desenvolvimento do trabalho na Universidade Claude Bernard.

Aos funcionários da EEL-USP.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que eventualmente não foram citados

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana.”

(Louis Pasteur)

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

(Albert Einstein).

Resumo

MEDEIROS, S. F. **Obtenção de nanopartículas magnéticas sensíveis a estímulos para aplicações biomédicas.** 2010. 292 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

Partículas poliméricas com propriedades magnéticas podem ser utilizadas tanto em aplicações terapêuticas *in vivo*, como agentes de liberação controlada de princípios ativos, *ex vivo*, na extração de células cancerígenas do organismo, ou ainda *in vitro*, em diagnósticos. A necessidade de materiais inteligentes e biocompatíveis, como agentes de encapsulação destas partículas magnéticas, leva ao uso de polímeros sensíveis a estímulos. Em aplicações terapêuticas, esta tecnologia é baseada na localização das partículas através da aplicação de um campo magnético e na concentração da droga na área de interesse. Esta etapa é seguida pela liberação da droga, utilizando-se as propriedades sensíveis dos polímeros. Dessa forma, este trabalho de tese se dedica ao estudo da obtenção de nanopartículas constituídas de uma matriz polimérica sensível a estímulos e de partículas de óxido de ferro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e Fe_3O_4). Inicialmente, nanogéis à base de poli(NVCL-*co*-AA) foram obtidos através do método de polimerização por precipitação. A Poli(*N*-vinilcaprolactama) (PNVCL) é um polímero termo-sensível, que possui temperatura crítica inferior de solubilização (LCST) próxima à temperatura fisiológica (35-38 °C) e é conhecida, ainda, por possuir maior biocompatibilidade, em comparação a outros polímeros do gênero. O poli(ácido acrílico) (PAA), por sua vez, é um polímero que apresenta sensibilidade ao pH. Nesta etapa estudou-se a influência de alguns parâmetros de síntese nos diâmetros de partículas, na polidispersidade e na sensibilidade à temperatura dos nanogéis. A sensibilidade ao pH também foi estudada em função da concentração de ácido acrílico adicionado nas sínteses. Em seguida, realizou-se o estudo da encapsulação de nanopartículas magnéticas complexadas com dextrana em nanogéis de PNVCL, utilizando-se a técnica de polimerização em miniemulsão inversa. Os nanogéis magnéticos sensíveis à temperatura foram caracterizados quanto ao diâmetro de partículas (DP) e distribuição do diâmetro de partículas (DDP), pela técnica de espalhamento de luz. A sensibilidade à temperatura dos nanogéis magnéticos também foi estudada por espalhamento de luz, através de medidas de diâmetro de partículas em diferentes temperaturas. As medidas de magnetização foram obtidas em um magnetômetro de amostra vibrante (MAV). Análises de infravermelho (FTIR) e de difratometria de raios X revelaram qualitativamente a encapsulação das nanopartículas magnéticas. A eficiência de incorporação das nanopartículas de óxido de ferro foi estudada através de análises termo-gravimétricas (TGA) e medidas de magnetização. As características morfológicas dos nanogéis magnéticos foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

Palavras-Chave: *N*-vinilcaprolactama. LCST. Cinética de polimerização. Polimerização em miniemulsão. Nanopartículas magnéticas. Aplicações biomédicas.

Abstract

MEDEIROS, S. F. **Preparation of stimuli-responsive magnetic nanoparticles for biomedical applications.** 2010. 292 p. Thesis (Doctorate in Materials Engineering) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

Polymeric particles with magnetic properties can be useful for *in vivo* therapeutic applications, as agents for controlled drug release, for *ex vivo* applications, as agents for the extraction of cancer cells, and finally, for the diagnosis *in vitro*. The search for biocompatible and smart materials as agents for the encapsulation of magnetic particles, leads to the use of stimuli-responsive polymers. In therapeutic applications, this technology is based on the localization and the concentration of the particles containing the drug in the area of interest by applying a magnetic field. This step is followed by the release of the drug, using the sensitive properties of the polymers. In this context, this thesis is devoted to the preparation of nanoparticles constituted by a stimuli-responsive polymer matrix and particles of iron oxide ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e Fe_3O_4). First of all, we performed the synthesis of poly(NVCL-co-AA)-based nanogels using the precipitation polymerization method. Poly(*N*-vinylcaprolactam) (PNVCL) is a thermo-responsive polymer which presents the lower critical solution temperature (LCST) near the physiological temperature (35-38 °C) and it is well known by its greater biocompatibility, in comparison with other thermally-sensitive polymers. On the other hand, the poly(acrylic acid) (PAA) is known by its sensibility to changes in the environmental pH. In this stage, the influence of some synthesis parameters on the particles diameter, polydispersity and thermally-sensitive behavior of the nanogels was evaluated. The pH-sensitivity behavior was also studied as a function of the AA concentration in the synthesis. As a second step, the study of the incorporation of dextran-coated magnetic nanoparticles in the PNVCL-based nanogels using the inverse miniemulsion polymerization was performed. The thermo-responsive magnetic nanogels were characterized in terms of particles diameter (PD) and particles size distribution (PSD) using light scattering. The temperature sensitivity of the magnetic nanogels was also studied by light scattering, with measurements of particles diameter as a function of temperature. The magnetization measurements were obtained on a vibrating sample magnetometer (VSM). Analysis of infra-red (FTIR) and X-ray diffraction revealed qualitatively the incorporation of magnetic nanoparticles. The incorporation efficiency of iron oxide nanoparticles was studied by thermo-gravimetric analysis (TGA) and magnetic measurements. The morphological characteristics of the magnetic nanogels were observed by transmission electron microscopy (TEM).

Keywords: *N*-vinylcaprolactam. LCST. Polymerization kinetics. Miniemulsion polymerization. Magnetic nanoparticles. Biomedical applications.

Lista de ilustrações

Figura 1.1. Ilustração esquemática do efeito da temperatura na transição de fases da PNIPAAm (adaptado de DIMITROV et al., 2007).....	37
Figura 1.2. Efeito da temperatura na aparência de uma solução aquosa (5g/L) de PNVCL.	38
Figura 1.3. Estrutura da <i>N</i> -vinilcaprolactama.	39
Figura 1.4. Representação esquemática da transição de fases de polímeros sensíveis à temperatura e ao pH (presença de grupos carboxílicos) (adaptado de KRATZ et al., 2000)	42
Figura 1.5. Evolução do número de artigos científicos publicados envolvendo liberação de drogas com nanopartículas (LANDEGHEM et al., 2009).....	44
Figura 1.6. Representação dos estados dos sistemas particulados constituídos de Poli(NIPAAm- <i>co</i> -AA) em diferentes temperaturas e pHs (adaptada de ASOH et al., 2006).	46
Figura 1.7. Representação esquemática da síntese de polímeros e géis sensíveis à temperatura e ao pH (adaptado de MEUNIER E ELAISSARI, 2003).....	48
Figura 1.8. Princípio da polimerização em miniemulsão. (adaptado de LANDFESTER, 2003).	52
Figura 1.9. Mecanismos de degradação das gotas de monômero em reações de miniemulsão (adaptado de ASUA, 2002).	52
Figura 1.10. Diagrama de um magnetômetro de amostra vibrante.....	56
Figura 1.11. Curva de histerese e seus parâmetros (COPELTEC – INSPEÇÕES E ENGENHARIA).....	57
Figura 1.12. Difratoograma de raios X das nanopartículas de óxido de ferro.	60

Figura 1.13. Representação do processo de separação (A para B) e dispersão (B para A) de nanopartículas magnéticas revestidas com ácido oléico.	61
Figura 1.14. Representação esquemática do processo de separação de biomoléculas através de magnetismo.	63
Figura 1.15. Representação esquemática das nanopartículas de óxido de ferro complexadas com amino-dextrana.....	66
Figura 1.16. Representação esquemática do comportamento de partículas sensíveis à temperatura abaixo e acima da LCST.	69
Figura 1.17. Representação esquemática do processo de polimerização em miniemulsão na presença de nanopartículas magnéticas e possíveis morfologias e estruturas das partículas magnéticas poliméricas. (a) Estrutura núcleo-casca, (b) distribuição das nanopartículas magnéticas dentro da matriz polimérica e (c) distribuição das nanopartículas de óxido de ferro na superfície das partículas poliméricas (adaptado de SCHILLERMANS e VAN NOSTRUM, 2006).....	70
Figura 1.18. Representação esquemática da encapsulação de colóides magnéticos em polímeros pré-formados constituídos de AA, utilizando o método de nanoprecipitação. ...	73
Figura 1.19. Principais aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas (adaptado de DOBSON, 2006).	75
Figura 1.20. Representação esquemática da utilização de sistemas magnéticos sensíveis a estímulos para monitoramento dentro do organismo, seguido da ação terapêutica, seja por hipertermia ou por liberação controlada do agente ativo.	76
Figura 1.21. Representação esquemática da detecção <i>in vivo</i> de sistemas constituídos de nanopartículas magnéticas usando IRM (adaptado de HU et al., 2006).	79
Figura 1.22. (A) Imagem do corte horizontal do cérebro de três pacientes com glioblastoma multiforme (GBM). (B) Ilustração: a demarcação azul indica GBMs; laranja indica área geográfica necrosada no tumor; verde indica áreas com agregados de nanopartículas magnéticas (LANDEGHEM et al., 2009).	80
Figura 2.1 Estrutura química dos principais reagentes utilizados neste trabalho.	90

Figura 2.2. Espectro de RMN ^1H da NVCL purificada por destilação a vácuo.	91
Figura 3.1. Diâmetro de partículas em função da temperatura dos nanogéis obtidos nas reações não tamponada (P2) e tamponada (P8).	105
Figura 3.2. Diâmetros de partículas em função da temperatura para os nanogéis de poli(NVCL-co-AA) sintetizados com diferentes concentrações de AA.	106
Figura 3.3. Espectros de FTIR dos nanogéis sintetizados com diferentes concentrações de AA.	108
Figura 3.4. Efeito da temperatura no diâmetro dos nanogéis sintetizados com diferentes concentrações de MBA.	111
Figura 3.5. Efeito da temperatura no diâmetro dos nanogéis sintetizados com diferentes concentrações de KPS.	112
Figura 3.6. Efeito da temperatura e do pH no diâmetro de partícula do nanogel sintetizado com 6,5% de AA, 8 % de MBA e 1 % de KPS em massa, em relação à NVCL (reação P2).	114
Figura 3.7. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) do nanogel sintetizado com 6,5% de AA, 8% de MBA e 1% de KPS (reação P2).	115
Figura 4.1. Tensão interfacial entre água e <i>n</i> -hexadecano m função da concentração de Span 80 a 25 °C.	120
Figura 4.2. Coeficientes de partição da NVCL em uma mistura de água e <i>n</i> -hexadecano a 25 e 70 °C.	121
Figura 4.3. Aspecto das dispersões dos nanogéis obtidos utilizando 3 % em massa (à esquerda) e 2 % em massa (à direita) de Span 80 em relação à fase contínua.	125
Figura 4.4. Efeito da concentração de Span 80 nos diâmetros hidrodinâmicos dos nanogéis sintetizados com 3 g de água, após o processo de remoção do <i>n</i> -hexadecano e redispersão em água.	126
Figura 4.5. Esquema do processo de sonificação (ASUA, 2002).	128

Figura 4.6. Diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis obtidos em função do tempo de polimerização e da concentração de Span 80 para as sínteses realizadas com 8 g de água.	129
Figura 4.7. Diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis obtidos em função do tempo de polimerização e da concentração de Span 80 para as sínteses realizadas com 3 g de água.	130
Figura 4.8. Conversão em função do tempo para as sínteses realizadas com 3 g de água e diferentes concentrações de Span 80.	131
Figura 4.9. Potencial zeta dos nanogéis de PNVCL em função do pH e da concentração de Span 80.	133
Figura 4.10. Diâmetros hidrodinâmicos dos nanogéis de PNVCL em função da temperatura e da concentração de Span 80.	134
Figura 4.11. Micrografias de TEM dos nanogéis de PNVCL obtidos na reação MN1.	135
Figura 4.12. Histograma de diâmetro hidrodinâmico (DH) do nanogel magnéticos obtidos na reação MP17.	139
Figura 4.13. Representação em 3D da distribuição de diâmetro hidrodinâmico, obtida para o nanogel magnético sintetizado na reação MP17 após o processo de remoção do ciclohexano e redispersão das partículas em água.	140
Figura 4.14. Influência da quantidade de ferrofluido na sensibilidade à temperatura dos nanogéis magnéticos de PNVCL.	141
Figura 4.15. Espectros de infravermelho (FTIR) das nanopartículas magnéticas puras (A) e dos nanogéis à base de PNVCL sintetizados com diferentes quantidades de ferrofluido (B) 100 μ L, (B) 200 μ L e (C) 300 μ L.	142
Figura 4.16. Curvas de TGA dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL sintetizados com diferentes quantidades de ferrofluido.	143
Figura 4.17. Difrátogramas de raios X das nanopartículas de óxido de ferro puras, do nanogel termo-sensível e dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL.	145

Figura 4.18. Curvas de magnetização obtidas para as nanopartículas de óxido de ferro puras e para os nanogéis magnéticos sintetizados com diferentes quantidades de ferrofluido.	146
Figura 4.19. Micrografias de TEM das nanopartículas de óxido de ferro complexadas com dextrana.	147
Figura 4.20. Micrografias de TEM do nanogel magnético sintetizado com 300µL de ferrofluido (reação MP17).	148
Figura A.1. Modelo de integração dos sinais do trioxano e da NVCL para o cálculo da conversão.	186
Figura A.2. Efeito da concentração inicial de monômero na conversão de NVCL para as polimerizações realizadas em (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol. $[I]_0 = 2,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[CTA] = 6,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 70^\circ\text{C}$	188
Figura A.3. Dependência da velocidade de polimerização na conversão da NVCL com diferentes concentrações iniciais de monômero. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.	189
Figura A.4. Velocidade de polimerização em função da concentração inicial de monômero para as polimerizações realizadas em (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.	190
Figura A.5. Curva de regressão a partir das constantes de decomposição do AIBN em função da temperatura.	194
Figura A.6. Determinação dos valores das pseudo-constantes $k_p/k_t^{0,5}$ para as diferentes concentrações iniciais de NVCL, através das curvas de $\ln(1-x)$ em função de $f(t) = -(8f[I]_0/k_d)^{0,5} [(1-\exp(-k_d t/2))]$. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.	195
Figura A.7. Homopolimerizações da NVCL com diferentes concentrações iniciais de monômero: mudanças na pseudo-constante $k_p/k_t^{0,5}$. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.	196

Figura A.8. Efeito da concentração de iniciador na conversão da NVCL. $[M]_0 = 1,6 \times 10^{-1}$ mol/L, $[CTA] = 6,4 \times 10^{-3}$ mol/L e $T = 70$ °C. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.....	198
Figura A.9. Dependência da velocidade de polimerização na conversão da NVCL para as reações realizadas com diferentes concentrações de iniciador. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.....	199
Figura A.10. Velocidade de polimerização em função da concentração de iniciador. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.....	200
Figura A.11. Efeito da temperatura de polimerização na conversão da NVCL. $[M]_0 = 1,6 \times 10^{-1}$, $[I]_0 = 2,3 \times 10^{-2}$ and $[CTA] = 6,4 \times 10^{-3}$ mol/L. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.....	201
Figura A.12. Dependência da velocidade de polimerização na conversão da NVCL em diferentes temperaturas de polimerização. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.....	202
Figura A.13. Dependência de R_p na temperatura de polimerização. (1,4-dioxano), (B) etanol e (C) isopropanol.....	203
Figura A.14. Efeito da concentração de CTA (ácido 3-mercaptopropiônico) na conversão da NVCL. $[M]_0 = 1,6 \times 10^{-1}$ mol/L, $[I]_0 = 2,3 \times 10^{-2}$ mol/L e $T = 70$ °C. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.....	205
Figura A.15. Efeito da concentração inicial de NVCL na pseudo-constante $k_p/k_t^{0,5}$. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.....	206
Figura A.16. Sobreposição dos cromatogramas de GPC das amostras de PNVCL sintetizadas em (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol, com diferentes concentrações de CTA.....	209
Figura A.17. Efeito da razão $[CTA]/[M]_0$ nas razões $(k_p/k_t^{0,5})/((k_p/k_t^{0,5})_{CTA=0})$ e $M_n/M_{n,CTA=0}$. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.....	210
Figura A.18. Efeito da massa molecular em $k_p/k_t^{0,5}$. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.....	211

Figura A.19. Inverso das massas moleculares em função da razão $[CTA]/[M]$. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.....212

Figura A.20. Efeito da massa molecular na LCST da PNVCL sintetizada em (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.....214

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Exemplos de polímeros termo-sensíveis e seus respectivos valores de LCST para soluções a 1 g L^{-1} (adaptada de KAWAGUCHI, 1999 e LIU et al., 2009).	36
Tabela 3.1 Formulações e condições experimentais utilizadas nas sínteses dos nanogéis de poli(NVCL- <i>co</i> -AA) via polimerização por precipitação.	104
Tabela 3.2. Diâmetros médios de partículas e polidispersidade em função do tempo para os nanogéis obtidos nas sínteses P2, P8 e P11.	109
Tabela 4.1. Influência da concentração de Span 80 e da quantidade da fase aquosa no diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis de PNVCL.	124
Tabela 4.2. Condições de síntese e diâmetros hidrodinâmicos dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL, obtidos a 25 °C.	137
Tabela 4.3. Porcentagem das nanopartículas de óxido de ferro incorporadas nos nanogéis à base de PNVCL.....	144
Tabela A.1. Efeito da concentração de CTA nas massas moleculares e polidispersidade dos polímeros de NVCL sintetizados em 1,4-dioxano.....	207
Tabela A.2. Efeito da concentração de CTA nas massas moleculares e polidispersidade dos polímeros de NVCL sintetizados em etanol.....	207
Tabela A.3. Efeito da concentração de CTA nas massas moleculares e polidispersidade dos polímeros de NVCL sintetizados em isopropanol.....	208

Lista de Símbolos

A_0	Área do deslocamento do próton da dupla ligação no tempo zero
AA	Ácido Acrílico
AAEM	Metacrilato de acetoacetoxietila
AAPH	Diidrocloreto de 2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina)
AB	Acrilato de butila
ABAP	2,2'-azobis-(2-amidinopropano)
ACE	Acenaftileno
AIBN	2,2'-azo-bis-isobutironitrila
$[AIBN]_0$	Concentração Inicial de AIBN
$AlLiH_4$	Hidreto de lítio e alumínio
AMF	campos magnéticos de frequência alternada (<i>frequency alternating magnetic fields</i>)
AR	Agente de reticulação
AS	Ácido salicílico
A_t	Área do deslocamento do próton da dupla ligação num determinado tempo
BBB	barreira hematoencefálica (<i>Blood-barrier brain</i>)
CEA	anti-antígeno carcino-embrionário (<i>anti-carcinoembryonic antigen</i>)
CMC	Concentração micelar crítica
COF_F	Porcentagem de óxido de ferro após o processo de calcinação
COF_I	Porcentagem de óxido de ferro adicionada ao sistema no início da polimerização
CTA	Agente de Transferência de Cadeia
DH	Diâmetro hidrodinâmico de partículas
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dN/dC	Índice de refração
DNR	Daunorrubicina
DOX	Doxorubicina
DLS	Espalhamento dinâmico de luz (<i>dynamic light scattering</i>)

DP	Diâmetro de partículas
DRX	Difratometria de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
E_A	Energia de ativação (<i>Activation energy</i>)
Emu	Unidades de magnetização
EPR	Melhor permeabilidade e retenção (<i>Enhanced Permeability and Retention</i>)
FDA	“Food and Drug Administration”
FTIR	Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
HC	Hospital das Clínicas
H_C	Campo coercivo
H_{CR}	Coercividade de remanência
HD	<i>n</i> -hexadecano
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HLB	Balanço hidrófilo/lipófilo (<i>Hydrophilic-lipophilic balance</i>)
H_{PI}	Número de Prótons do Padrão Interno
$[I]_0$	Concentração inicial de iniciador
INCA	Instituto Nacional do Câncer
k_d	Constante de decomposição do iniciador
$K_{M_{NVCL}}$	Coeficiente de partição da NVCL na mistura água/ <i>n</i> -hexadecano
k_p	Constante de propagação
KPS	Persulfato de potássio
k_t	Constante de terminação
LCST	Temperatura Crítica Inferior de Solubilização (<i>Lower Critical Solution Temperature</i>)
Log P	Coeficiente de partição de uma substância em uma mistura octanol/água
$[M]_0$	Concentração de monômero no tempo igual a zero
MAA	Ácido metacrílico
MAV	Magnetometria de Amostra Vibrante
MBA	<i>N,N</i> -metileno-bis-acrilamida

3-MGD	3- <i>o</i> -metacriloil-1,2:5,6-di- <i>o</i> -isopropilideno- α -D-glicofuranose
$\overline{M}_n$	Massa molecular numérica média
$[M]_p$	Concentração de monômero por partícula
MPA	Ácido 3-mercaptopropiônico
M _R	Remanência
IRM	Imagem por ressonância magnética
MRT	Tomografia de ressonância
MS	Magnetização de saturação
MWD	Distribuição de massas moleculares (<i>molecular weight distribution</i>)
$\tilde{n}$	Número médio de radicais por partícula
N _A	Número de Avogrado
NIPAam	<i>N</i> -isopropilacrilamida
N _M	Número de moles do monômero
N_p	Número de partículas
N _{PI}	Número de moles do padrão interno
NPM	Nanopartículas magnéticas
NVCL	<i>N</i> -vinilcaprolactama
$[NVCL]_a$	Concentração de NVCL em água (% m/m)
$[NVCL]_{HD}$	Concentração de NVCL em <i>n</i> -hexadecano (% m/m)
PAA	Poli(ácido acrílico)
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PCS	Espectroscopia de foto correlação
PEG	Poli(etileno glicol)
PEGDA	Diacrilato de poli(etilenoglicol)
PEO	Poli(óxido de etileno)
PI	Padrão Interno
PLGA	Poli(ácido lático- <i>co</i> -glicólico)
PMAA	Poli(ácido metacrílico)
PNIPAam	Poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida)
PNVCL	Poli(<i>N</i> -vinilcaprolactama)
Poli(NVCL- <i>co</i> -MAA)	Poli(<i>N</i> -vinilcaprolactama- <i>co</i> -ácido metacrílico)
PPC	Calorimetria de pressão de perfusão
PVA	Poli(álcool vinílico)

PVCL-graft-C ₁₁ EO ₄₂	PNVCL-g-Poli(etilenoglicol)
PVP	Poli(vinilpirrolidona)
[R*]	Concentração de radicais
REED	Magnetometria de “Haste Ressonante”
RES	Sistema reticuloendotelial
RF	Radiofrequência
RI	Índice de refração (<i>Refractive index</i>)
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
RNA	Ácido ribonucleico
R_p	Velocidade de polimerização
$R_{p, max}$	Velocidade de polimerização máxima
SAv	Streptavidina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
SNC	Sistema Nervoso Central
Span 60	Monoestearato de sorbitano
Span 80	Monooleato de sorbitano
SQUID	Magnetometria de Interferência Quântica Supercondutora (<i>Superconducting Quantum Interference and Device</i>)
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TGA	Análise termogravimétrica
THF	Tetraidrofurano
TRAMS	Medidas de anisotropia com tempo de resolução (<i>Time-resolved anisotropy measurements</i>)
US	Ultra-som
V-50	Diidrocloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)
χ_0	Susceptibilidade inicial
X (%)	Conversão global
x (%)	Conversão individual

Sumário

Introdução	25
Considerações iniciais.....	25
Justificativa e importância do tema	27
Objetivo da pesquisa.....	30
Conteúdo da tese de doutorado	30
1. Revisão Bibliográfica.....	35
1.1.Polímeros “inteligentes”	35
<i>1.1.1.Polímeros termo-sensíveis</i>	<i>36</i>
<i>Termo-sensibilidade da poli(N-vinilcaprolactama)</i>	<i>38</i>
<i>1.1.2.Polímeros sensíveis ao pH.....</i>	<i>40</i>
<i>1.1.3.Combinação da sensibilidade à temperatura e ao pH</i>	<i>41</i>
1.2.Uso de polímeros sensíveis a estímulos em nanobiotecnologia.	43
1.3.Obtenção de géis sensíveis a estímulos para liberação controlada de agentes ativos.....	45
<i>1.3.1.Polimerização em meio disperso</i>	<i>47</i>
<i>1.3.1.1.Polimerização por precipitação</i>	<i>47</i>
<i>1.3.1.2.Polimerização em emulsão</i>	<i>50</i>
<i>1.3.1.3.Polimerização em miniemulsão</i>	<i>51</i>
<i>1.3.1.4.Polimerização em miniemulsão inversa</i>	<i>53</i>
1.4.Combinação da sensibilidade a estímulos com propriedades magnéticas.....	54
<i>1.4.1.Classificação magnética dos materiais</i>	<i>54</i>
<i>1.4.2.Medidas de magnetização.....</i>	<i>55</i>
<i>1.4.2.1.Magnetômetro de Amostra Vibrante (MAV).....</i>	<i>56</i>
<i>1.4.2.2.Curva de magnetização e desmagnetização (Histerese)</i>	<i>57</i>
<i>1.4.3.Nanobiomagnetismo</i>	<i>58</i>
<i>1.4.3.1.Nanopartículas magnéticas para aplicações biomédicas in vitro.....</i>	<i>61</i>
<i>1.4.3.2.Nanopartículas magnéticas para aplicações biomédicas in vivo.....</i>	<i>64</i>

1.4.4. Incorporação de nanopartículas magnéticas em matrizes poliméricas sensíveis a estímulos.....	67
1.5. Aplicações das nanopartículas magnéticas e nanocompósitos magnéticos sensíveis a estímulos.....	74
1.5.1. Imagem por ressonância magnética (IRM)	77
1.5.2. Liberação controlada de princípios ativos	81
1.5.3. Hipertermia	85
2. Materiais e Métodos.....	89
2.1. Materiais.....	89
2.1.1. Reagentes.....	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
2.2. Métodos.....	90
2.2.1. Purificação da N-vinilcaprolactama (NVCL)	90
2.2.2. Purificação do ácido acrílico (AA)	91
2.2.3. Purificação do 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN)	91
2.2.4. Secagem do 1,4-dioxano	92
2.2.5. Síntese do nanogéis à base de poli(NVCL-co-AA).....	92
2.2.6. Caracterizações dos nanogéis à base de poli(NVCL-co-AA) obtidos via polimerização por precipitação	93
2.2.6.1. Determinação do diâmetro de partículas	93
2.2.6.2. Sensibilidade à temperatura	93
2.2.6.3. Sensibilidade ao pH	93
2.2.6.4. Determinação qualitativa da composição química dos copolímeros.....	93
2.2.6.5. Morfologia.....	94
2.2.7. Síntese de nanogéis de PNVCL via polimerização em miniemulsão inversa	94
2.2.7.1. Determinação da CMC do Span 80 em n-hexadecano	94
2.2.7.2. Coeficiente de partição da NVCL entre água e n-hexadecano.....	94
2.2.7.3. Síntese dos nanogéis termo-sensíveis	95
2.2.7.4. Purificação dos nanogéis de PNVCL.....	95
2.2.8. Caracterização dos nanogéis de PNVCL obtidos via polimerização em miniemulsão inversa.....	96
2.2.8.1. Cinética de polimerização em miniemulsão	96
2.2.8.2. Determinação do tamanho de partículas e do potencial zeta.....	96

2.2.8.3. Espectrometria de infravermelho (FTIR)	97
2.2.8.4. Morfologia das nanopartículas	97
2.2.8.5. Difractometria de raios X.....	97
2.2.9. Encapsulação das nanopartículas magnéticas.....	97
2.2.10. Caracterização dos nanogéis magnéticos sensíveis à temperatura	98
2.2.10.1. Espalhamento de luz	98
2.2.10.2. Medidas de magnetização.....	98
2.2.10.3. Análises termo-gravimétricas (TGA).....	99
 3. Síntese de nanogéis sensíveis à temperatura e ao pH via polimerização por precipitação	103
3.1. Introdução... ..	103
3.2. Síntese dos nanogéis de poli(NVCL-co-AA) via polimerização por precipitação.....	103
3.3. Influência da concentração de ácido acrílico	105
3.4. Influência da concentração do agente de reticulação	110
3.5. Influência da concentração de iniciador	112
3.6. Efeito do pH.....	113
3.7. Morfologia das nanopartículas	114
 4. Síntese de nanogéis magnéticos à base de PNVCL via polimerização em miniemulsão.....	119
4.1. Introdução... ..	119
4.2. Determinação da CMC do Span 80 em <i>n</i> -hexadecano	119
4.3. Determinação do coeficiente de partição da NVCL entre água e <i>n</i> -hexadecano	121
4.4. Influência do co-estabilizante	122
4.5. Influência da concentração de surfatante.....	122
4.6. Estudo cinético	127
4.7. Potencial Zeta dos nanogéis	132

4.8.Avaliação da sensibilidade térmica dos nanogéis de PNVCL.....	134
4.9.Características morfológicas dos nanogéis	135
4.10.Incorporação de nanopartículas de óxido de ferro complexadas com dextrana.....	136
<i>4.10.1.Sensibilidade à temperatura dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL.....</i>	<i>140</i>
<i>4.10.2.Espectrometria de FTIR.....</i>	<i>141</i>
<i>4.10.3.Análises termo-gravimétricas (TGA)</i>	<i>143</i>
<i>4.10.4.Difratometria de raios X.....</i>	<i>144</i>
<i>4.10.5.Medidas de magnetização.....</i>	<i>146</i>
<i>4.10.6.Morfologia dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL.....</i>	<i>147</i>
5. Conclusões.....	151
6. Sugestões para trabalhos futuros.....	155
7. Referências.....	159
Apêndice A - Cinética da polimerização radicalar da NVCL.....	181
Apêndice B - Résumé.....	217
Produção Bibliográfica	289

Introdução

Introdução

Considerações iniciais

Atualmente, muitos trabalhos descrevem a síntese de látices híbridos (KHAN et al., 2009; CAO et al., 2010; COLARD et al., 2009; CHEUNG; BON, 2009; NGUYEN et al., 2010; SHEIBAT-OTHMAN; BOURGEAT-LAMI, 2009) com o objetivo de explorar suas propriedades. O termo látice híbrido é, usualmente, aplicado aos compostos poliméricos contendo um material, inorgânico ou orgânico, ligado covalentemente ao polímero. No entanto, este termo também pode ser usado para designar dois polímeros, usualmente incompatíveis e unidos um ao outro através de uma ligação covalente (GUYOT et al., 2007).

Devido ao tamanho reduzido, nanopartículas (NP) oferecem propriedades únicas e nanopartículas magnéticas (NPMs) baseadas em compósitos de óxido de ferro ou materiais híbridos, essencialmente constituídos de sistemas com morfologia tipo núcleo-casca (*core-shell*), encontram inúmeras aplicações na área biomédica (HÄFELI, 1997; STANCIU et al., 2009; WONG et al., 2008; THAKUR et al., 2009; FARAJI et al., 2010). Os primeiros estudos das propriedades das nanopartículas de óxido de ferro surgiram por volta de 1870 e levaram à produção de partículas magnéticas coloidalmente estáveis por McKeehan e Elmore (1934).

Neste contexto, o termo “nanobiomagnetismo” pode ser definido como a associação do magnetismo e da biomedicina no mesmo sistema visando aplicações biomédicas *in vitro* e *in vivo* (LESLIE-PELECKY; LABHASETWAR; KRAUS, 2006). Nos últimos anos, látices e nanogéis poliméricos vêm sendo utilizados na área biomédica tanto para fins terapêuticos (ELAISSARI, 2009) *in vivo*, como agentes de transporte e liberação de moléculas ativas encapsuladas, quanto em diagnóstico *in vitro* (YANG et al., 2009) (ensaios de imunidade, separação de células, concentração de ácidos nucléicos). Estes sistemas também são utilizados como suportes sólidos para imobilização de biomoléculas. Outro importante fator que leva ao estudo de partículas poliméricas para aplicações biomédicas consiste na versatilidade de obtenção destes sistemas (ELAISSARI,

2009). Vários métodos são descritos na literatura para obtenção de nanopartículas poliméricas com propriedades magnéticas (NPM). Uma das principais características dos materiais magnéticos, que os caracteriza como importantes ferramentas biomédicas consiste na sua capacidade de agir sobre objetos à distância. Na literatura existem alguns trabalhos que descrevem o uso de magnetos na remoção de balas e estilhaços de granada (LESLIE-PELECKY; LABHASETWAR; KRAUS, 2006). A invenção de menores e mais fortes magnetos tornou possível sua utilização em aplicações mais delicadas, tais como a fixação temporária de próteses odontológicas, a inserção de cateteres em várias regiões do corpo e carreadores no cérebro (GILLIES et al., 1994; TILLANDER, 1956).

As propriedades das nanopartículas magnéticas levam ao crescente estudo de diferentes metodologias de preparação destes materiais, visando principalmente o desenvolvimento da tecnologia e as perspectivas de futuras aplicações (CRAIG, 1995). Além disso, NPM baseadas em materiais compósitos constituídos de óxido de ferro, essencialmente distribuídos no interior de matrizes poliméricas, encontram grande interesse como agentes para fins terapêuticos.

Nanomateriais podem ser definidos como materiais os quais pelo menos um dos componentes estruturais possui uma dimensão compreendida entre 1 e 100 nm e possuem especial relevância em biomedicina devido à compatibilidade com o tamanho de células (10-100 μ m), vírus (20-450 nm), proteínas (5-50 nm) e genes (2 nm de largura por 10-100 nm de comprimento). NPM são suficientemente pequenas para serem incorporadas ao corpo humano sem causar distúrbios nas funções normais e, além disso, são capazes de acessar regiões inacessíveis por outros tipos de materiais. As células reagem com os nanomateriais e estas reações podem induzir ao crescimento ou morte celular (LESLIE-PELECKY; LABHASETWAR; KRAUS, 2006). Neste sentido, a importância do estudo de processos envolvendo nanopartículas magnéticas está relacionada com a preparação de sistemas adequados para aplicações *in vivo*.

As propriedades dos materiais utilizados para elaboração de NPM devem ser cuidadosamente estudadas de acordo com a aplicação proposta. Aplicações *in vitro* requerem menor atenção, embora em técnicas envolvendo células vivas, o efeito do material sobre a amostra deve ser sempre considerado. Por outro lado, aplicações *in vivo* necessitam de material não-tóxico, biocompatível e que apresente boa estabilidade coloidal. No entanto, as técnicas de encapsulação mais utilizadas na literatura ainda envolvem o uso de materiais não biocompatíveis. Dessa forma, o interesse neste estudo

consiste na obtenção de nanopartículas poliméricas magnéticas capazes de serem utilizadas para aplicações *in vivo*.

A combinação de NPMs com polímeros visando à obtenção de materiais compósitos coloidalmente estáveis é uma tarefa de grande interesse acadêmico e industrial. Neste caso, a matriz polimérica age como compatibilizante interagindo com o meio, podendo complexar com moléculas biologicamente ativas. Além disso, as propriedades magnéticas das nanopartículas facilitam a manipulação dos respectivos sistemas (SCHMIDT, 2007).

Atualmente, existe um crescente interesse na síntese de novos materiais biocompatíveis. A biocompatibilidade consiste na capacidade de um material de ser bem tolerado pelo corpo humano, levando à adequação destes materiais para aplicações biomédicas *in vivo* (MACAZAGA, 2007). Além da biocompatibilidade, as partículas magnéticas devem ser capazes de adsorver moléculas com grupos funcionais na sua superfície, ter baixa retentividade, ou seja, não podem reter o magnetismo após a interrupção da força magnetizante, ser facilmente separadas da corrente sanguínea e, finalmente, devem ser coloidalmente estáveis, sem a formação de agregados (TARTAJ et al., 2003).

Como exemplo de polímeros biocompatíveis, materiais inteligentes vêm sendo amplamente estudados para aplicações *in vivo*. Polímeros sensíveis a estímulos são macromoléculas que apresentam mudanças em algumas de suas propriedades devido a variações externas, tais como temperatura, pH, campo elétrico ou magnético, entre outros. Este tipo de material vem atraindo muita atenção no campo da biomedicina. Neste sentido, polímeros termo-sensíveis, isto é, macromoléculas que mudam sua conformação em resposta a variações externas de temperatura, são os mais estudados para aplicações biomédicas *in vivo*, uma vez que a termo-sensibilidade está diretamente relacionada com o corpo humano (KONAK et al., 2007).

Justificativa e importância do tema

A forma de administração convencional de princípios ativos requer dosagens periódicas. Isso acontece porque as drogas, quando ingeridas, circulam por toda parte do

corpo e a concentração do agente ativo atinge altos níveis declinando, então, devido à excreção e/ou conversão metabólica. Para conseguir efeito mais prolongado, altas doses são necessárias.

Uma vez que o nível de toxicidade do princípio ativo pode ser ultrapassado, no caso de altas doses serem administradas de uma só vez, a forma ideal de administração deve dar-se, então, em intervalos pequenos de tempo, mantendo-se, assim, uma concentração constante do agente ativo no organismo.

Porém, os métodos convencionais não garantem a liberação localizada do princípio ativo, ou seja, ele agirá nas células doentes, mas, por outro lado, surtirá efeito também nas células saudáveis, ocasionando os efeitos colaterais e, conseqüentemente, à medida que mais doses são necessárias, mais pronunciados se tornam estes efeitos.

Neste sentido, a nanotecnologia e o estudo da utilização de polímeros sob a forma de nanopartículas como agentes de encapsulação e liberação controlada de princípios ativos vem crescendo a cada ano. Fármacos, quando encapsulados no interior de matrizes poliméricas, não estão prontamente disponíveis para o sistema biológico como quando em solução. A degradação ou expansão das cadeias poliméricas permite que a droga difunda a partir da matriz e seja, então, liberada. De qualquer modo, a liberação do fármaco para o meio fisiológico é estendida por período de tempo, em comparação ao fármaco na sua forma livre, sendo esta característica um dos principais fatores para a pesquisa e desenvolvimento dos sistemas nanoparticulados. Dessa forma, o principal objetivo da utilização de polímeros como agentes de transporte e liberação controlada de princípios ativos consiste na preservação das células saudáveis do organismo, uma vez que a liberação da droga acontecerá ao ser atingida a transição de fases do polímero.

O sucesso na cura do câncer está associado a um diagnóstico precoce da doença, assim como uma terapia eficiente. Nos últimos anos, novas formas de diagnósticos e terapias de combate ao câncer têm sido desenvolvidas, aumentando as chances de diagnósticos em estágios iniciais da doença, potencializando as chances de cura. Nesse sentido, a nanotecnologia tem proporcionado uma verdadeira revolução na medicina, ao ponto de ser utilizado o termo “nanomedicina” para esta nova abordagem que utiliza sistemas ou partículas de tamanhos nanométricos.

Os efeitos colaterais causados na terapia de câncer provocam tanto desconforto aos pacientes que, em muitos casos, chegam a interromper o tratamento. A evolução nos métodos de síntese e no entendimento das propriedades das nanopartículas tem

possibilitado o desenvolvimento de sistemas exatos de diagnósticos e de terapia do câncer, como a entrega da droga diretamente na célula cancerosa (*Drug Delivery Systems*), diminuindo os efeitos colaterais e potencializando a ação do princípio ativo. Estima-se que os sistemas entregadores de drogas utilizem uma quantidade 100 vezes menor do agente ativo e sejam 100 vezes mais eficientes. Dessa forma, nanopartículas utilizadas como sistemas de liberação controlada de drogas oferecem vantagens, tais como a redução ou eliminação dos severos efeitos colaterais da quimioterapia, pois atuam diretamente nas células cancerosas e não ficam livres na via sistêmica. A possibilidade de diagnósticos em estágios iniciais da doença e do uso de sistemas precisos (no sentido de atingir um alvo desejado, no caso a célula do câncer) tem contribuído para o desenvolvimento da medicina personalizada com o tratamento de cada paciente de forma individualizada.

Classicamente, os tratamentos envolvendo os sistemas entregadores de drogas podem ser divididos em duas categorias: passivo e ativo. No tratamento passivo o agente terapêutico é incorporado às nanopartículas poliméricas, as quais circulam na corrente sanguínea e são acumuladas dentro do tumor através do aumento da sua permeabilidade e retenção (*Enhanced Permeability and Retention*, ou EPR). Alternativamente, cateteres podem ser utilizados para injetar as nanopartículas contendo o agente terapêutico diretamente no tumor. No tratamento ativo, o agente terapêutico é conjugado com uma nanopartícula que possui um ligante (anticorpo) que reconhece especificamente os antígenos relacionados às células do câncer.

Devido às suas propriedades físicas e químicas, o óxido de ferro possui potencial para produzir avanços importantes no diagnóstico por imagem e na terapia de câncer. A imunolocalização de células tumorais com o uso de magnetita é feita com suas nanopartículas que tem propriedades superparamagnéticas o que permite obter a detecção precoce de tumores através da imagem por ressonância magnética (IRM). A impregnação de células tumorais com nanopartículas de magnetita também pode facilitar a erradicação de tumores, mediante uma lise celular (destruição celular por rebentamento das células, devido à destruição da membrana celular) focal e dirigida pelo processo de magneto-hipertermia. A questão a ser resolvida nesse tipo de tratamento é a incorporação da magnetita pelas células cancerígenas.

Dentro deste contexto, o estudo da síntese de nanopartículas magnéticas sensíveis a estímulos visa à obtenção de materiais que podem ser utilizados, principalmente, para aplicações biomédicas *in vivo*. A amenização dos efeitos negativos de tratamentos em que

os níveis de efeitos colaterais são mais pronunciados e, conseqüentemente, se tornam prejudiciais ao paciente, como a terapia de câncer, leva a um aumento do conforto do paciente ao realizar um tratamento com um princípio ativo.

Objetivo da pesquisa

O objetivo geral desta tese de doutorado consistiu na obtenção de nanogéis sensíveis a estímulos e de nanopartículas magnéticas, constituídas de uma matriz polimérica sensível à temperatura e de partículas de óxido de ferro.

Objetivos específicos

- ✓ Estudo da obtenção de nanogéis à base de poli(*N*-vinilcaprolactama-*co*-AA) poli(NVCL-*co*-AA), sensíveis à temperatura e ao pH, via polimerização por precipitação;
- ✓ Estudo da obtenção de nanogéis termo-sensíveis de poli(*N*-vinilcaprolactama) (PNVCL) via polimerização em miniemulsão inversa;
- ✓ Síntese de nanogéis sensíveis à temperatura na presença de nanopartículas de óxido de ferro complexadas com dextrana, via polimerização em miniemulsão inversa.
- ✓ Caracterização dos nanogéis sensíveis a estímulos e das nanopartículas magnéticas sensíveis à temperatura.

Conteúdo da tese de doutorado

Esta tese de doutorado encontra-se dividida da seguinte forma:

- **Capítulo 1.** Revisão Bibliográfica. Apresentação do estado da arte dos principais temas deste trabalho.
- **Capítulo 2.** Apresenta a metodologia adotada para realização das diferentes etapas deste trabalho.

-
- **Capítulo 3.** Estudo da síntese de nanogéis sensíveis à temperatura e ao pH via polimerização por precipitação.
 - **Capítulo 4.** Estudo da obtenção de nanopartículas magnéticas sensíveis à temperatura através da técnica de polimerização em miniemulsão inversa.
 - **Capítulo 5.** São apresentadas, de forma sucinta, as conclusões sobre os estudos e resultados obtidos através do trabalho de pesquisa em laboratório.
 - **Capítulo 6.** Apresenta um resumo dos estudos que ainda podem ser desenvolvidos sobre o tema, a partir dos resultados já obtidos.
 - **Referências.** Relaciona as origens dos artigos, normas e outros documentos consultados e mencionados na dissertação.
 - **Apêndice A.** Estudo cinético da polimerização em solução da NVCL, empregando-se diferentes solventes.
 - **Apêndice B.** Résumé.
 - **Produção Bibliográfica**

Capítulo 1

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Polímeros “inteligentes”

A resposta a estímulos é um processo básico de sistemas vivos. As proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos são biopolímeros presentes nos organismos vivos, os quais respondem a estímulos físicos ou químicos provocados por variações do meio em que se encontram. O interesse no desenvolvimento de polímeros sintéticos que imitem as funcionalidades destes biopolímeros vem crescendo nos últimos anos, dando origem a uma nova classe de polímeros, os quais são conhecidos como polímeros “inteligentes”. Estes materiais respondem a estímulos externos como temperatura, pH, luz, força iônica, entre outros, e têm sido amplamente estudados em liberação de fármacos. Estas respostas são manifestadas com mudanças na forma, características de superfície, solubilidade, etc (JEONG; GUTOWSKA, 2002). A temperatura é o estímulo mais utilizado nos sistemas constituídos de polímeros inteligentes.

Crescente interesse vem sendo observado nas últimas décadas em novos materiais que apresentam organização supramolecular reversível e a principal razão atribuída a este fato consiste no baixo custo de processamento destes materiais (VOGL; JAYCOX, 1999).

Um requisito adicional aos polímeros sensíveis a estímulos para serem utilizados em aplicações biomédicas é a presença de grupos funcionais nas macrocadeias, capazes de formar interações com outras moléculas. Macromoléculas hidrossolúveis funcionais incluem polímeros com várias arquiteturas que podem ser eletricamente carregadas ou possuir grupos capazes de formar pontes de hidrogênio com outras substâncias, levando a interações físicas reversíveis.

As propriedades dos polímeros sensíveis a estímulos, em geral, tais como solubilidade, viscosidade, transparência e condutividade, podem ser controladas modificando-se a estrutura e organização das cadeias poliméricas (KONAK et al., 2007). Tal característica permite a utilização destes polímeros inteligentes como agentes de liberação controlada de princípios ativos, dentre outras aplicações. Neste sentido, o

principal desafio consiste no desenvolvimento de sistemas que permitam controlar a resposta a determinado estímulo, através da variação dos parâmetros de síntese.

1.1.1. Polímeros termo-sensíveis

Polímeros termo-sensíveis são solúveis em água a baixas temperaturas, porém se separam destas soluções em temperaturas acima da temperatura de transição de fases, a qual é conhecida como LCST (Temperatura Crítica Inferior de Solubilização). Esta transição de fases consiste no foco principal do estudo destes materiais poliméricos como agentes de encapsulação, em sistemas de liberação controlada de princípios ativos (YANUL et al., 2001).

Diversos polímeros são conhecidos por possuírem propriedades termo-sensíveis e os principais estão apresentados na Tabela 1.1, assim como seus respectivos valores de LCST.

Tabela 1.1. Exemplos de polímeros termo-sensíveis e seus respectivos valores de LCST para soluções a 1 g L⁻¹ (adaptada de KAWAGUCHI, 1999 e LIU et al., 2009).

Polímero	LCST/°C
Poli(<i>N</i> -etilacrilamida)	72
Poli(<i>N</i> -metil- <i>N</i> -etilacrilamida)	56
Poli(<i>N</i> -acrilóil pirrolidina)	56
Poli(<i>N</i> -etilmetilacrilamida)	50
Poli(<i>N</i> -ciclopropilacrilamida)	45.5
Poli(<i>N</i> -isopropilmetacrilamida)	44
Poli(<i>N,N</i> -dietilacrilamida)	32
Poli(<i>N</i> -isopropilacrilamida)	30.9
Poli(<i>N</i> -vinilcaprolactama)	31
Poli(<i>N-n</i> -propilmetacrilamida)	28
Poli(<i>N</i> -metil- <i>N</i> -isopropilacrilamida)	22.3
Poli(<i>N-n</i> -propilacrilamida)	21.5
Poli(<i>N</i> -metil- <i>N-n</i> -propilacrilamida)	19.8
Poli(<i>N</i> -acrilóilpiperidina)	5.5

Dentre os polímeros termo-sensíveis, Poli(*N*-isopropilacrilamida), PNIPAAm, é o mais estudado na literatura, possuindo LCST próxima a 31 °C (Tabela 1.1). A transição de

fases da PNIPAAm está esquematicamente ilustrada na Figura 1.1, onde é possível observar que o comportamento inteligente origina do ganho entrópico logo que as moléculas de água complexadas com os grupos amida são liberadas quando a temperatura de transição é atingida.

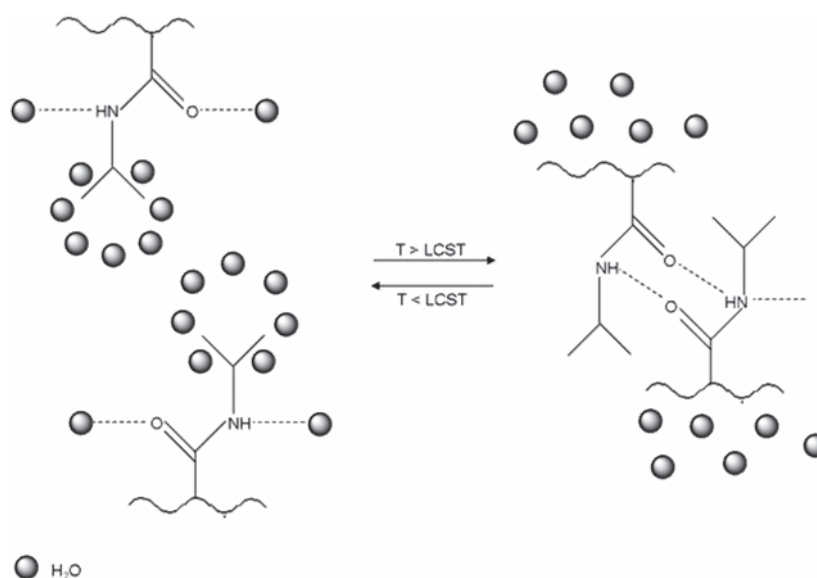


Figura 1.1. Ilustração esquemática do efeito da temperatura na transição de fases da PNIPAAm (adaptado de DIMITROV et al., 2007).

Abaixo da LCST, as interações do tipo pontes de hidrogênio entre as moléculas de água e as macrocadeias são predominantes em relação às interações do tipo polímero-polímero. Dessa forma, as macromoléculas encontram-se solvatadas no meio aquoso, como pode ser observado na Figura 1.1. O aumento da temperatura favorece as interações do tipo polímero-polímero até que, ao atingir-se a LCST, estas interações se tornam dominantes, promovendo uma quebra das pontes de hidrogênio entre as cadeias poliméricas e as moléculas de água e, levando, assim, à separação de fases.

Embora a PNIPAAm seja o polímero termo-sensível mais estudado na literatura, a maioria dos trabalhos descreve a sua utilização somente para aplicações *in vitro*. A perda de grupos amidas com a hidrólise das macromoléculas limita o uso deste polímero para aplicações *in vivo*, devido à ausência de biocompatibilidade.

Neste contexto, outro exemplo de polímero termo-sensível e biocompatível, que vem sendo amplamente estudado para fins terapêuticos é a Poli(*N*-vinilcaprolactama) (PNVCL) (VIHOLA et al., 2005).

Termo-sensibilidade da poli(N-vinilcaprolactama)

Existem inúmeros trabalhos na literatura descrevendo a transição de fases da PNVCL em água (MAKHAEVA et al., 2003; LOZINSKII et al., 2006; PENG; WU, 2000; LAU; WU, 1999). A PNVCL é um polímero sensível à temperatura, que não libera grupos amida quando hidrolisado, o que faz com que seja adequado para aplicações *in vivo* (MAEDA et al., 2001). Além disso, este polímero possui a LCST próxima à temperatura fisiológica (35 – 38 °C) (YANUL et al., 2001), dependendo da massa molecular, da concentração em solução aquosa, e da composição química, no caso de copolímeros (SHTANKO et al., 2003). A Figura 1.2 apresenta a aparência de uma solução aquosa de PNVCL a 5 g/L, em temperaturas abaixo e acima da LCST.

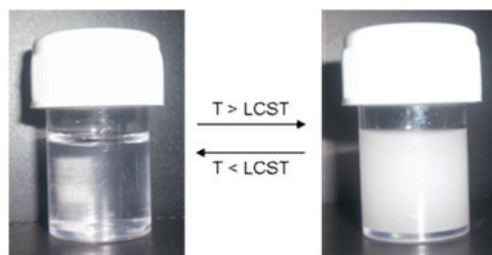


Figura 1.2. Efeito da temperatura na aparência de uma solução aquosa (5g/L) de PNVCL.

O monômero para a preparação da PNVCL é a *N*-vinilcaprolactama (NVCL), uma substância organo-solúvel que dissolve tanto em meio orgânico polar como não-polar (LOZINSKY et al., 2000), cuja estrutura está apresentada na Figura 1.3. A biocompatibilidade da PNVCL, associada com sua habilidade de complexação com outras moléculas viabiliza o uso deste polímero em inúmeras aplicações. Apesar do interesse atual pela PNVCL, os primeiros trabalhos sobre este polímero foram publicados na década de 60, por Solomon et al. (1968) e Solomon et al. (1969). Atualmente, a PNVCL vem sendo amplamente utilizada na fabricação de cosméticos e é comercializada pela BASF, sob o nome Luviskol®Plus, como um diluente para fixadores de cabelo. No entanto, inúmeras pesquisas estão sendo realizadas com relação à sua utilização na estabilização de proteases e como agente de transporte e liberação controlada de princípios ativos (GILLIES et al., 1994; LU et al., 2004).

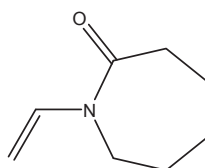


Figura 1.3. Estrutura da *N*-vinilcaprolactama.

Lau e Wu (1999) utilizaram medidas de espalhamento de luz para determinação da LCST da PNVCL, obtendo um valor de temperatura de transição igual a 31°C. Por outro lado, Chee et al. (2006), utilizaram técnicas de fluorescência, em particular, medidas de anisotropia com tempo de resolução, TRAMS, para confirmar que as cadeias de PNVCL sofrem transição conformacional de um estado enovelado (coil) expandido para glóbulo compacto à temperatura crítica inferior de solubilização, LCST. Para estas caracterizações, *N*-vinilcaprolactama foi polimerizada em dioxano a 60°C usando AIBN como iniciador, na presença de Acenaftileno (ACE). Medidas TRAMS revelaram que a transição de fases se iniciou em 38°C. A natureza da mudança conformacional para PNVCL é distinta de outros polímeros termosensíveis, tal como a PNIPAAm, por exemplo. A descontinuidade na dependência térmica da velocidade de movimento macromolecular ocorre em uma faixa de, aproximadamente, 15°C para a PNVCL, enquanto que para PNIPAAm esta faixa compreende entre 31 e 33°C. Além disso, ocorre redução na magnitude da mudança conformacional de PNVCL, quando comparada com PNIPAAm. Experimentos de dissolução em pireno, os quais estão relacionados com a medida da polaridade de determinadas substância, confirmaram a estrutura globular da PNVCL, acima da LCST, com um núcleo hidrofóbico, o qual é estabilizado por unidades mais hidrofílicas na superfície.

Como mencionado anteriormente, sabe-se, ainda, que a LCST é sensível a variações na massa molecular do polímero (SHTANKO et al., 2003). Dessa forma, Laukkanen et al. (2005) estudaram a influência deste parâmetro na LCST da PNVCL e verificaram que para os polímeros obtidos com massas moleculares entre $2,1 \times 10^4$ e $1,5 \times 10^6$ g/mol, a LCST variou de 31 a 38°C, respectivamente. VIHOLA et al. (2005) estudaram a citotoxicidade da PNVCL em função da massa molecular e da concentração do polímero em solução aquosa. Para os ensaios *in vitro* foram utilizadas culturas de células do tipo Caco-2 e Calu-3 e foi observado que os polímeros com concentrações inferiores a 5 mg/mL foram, em geral, bem tolerados. Em relação à massa molecular, valores entre

$3,3 \times 10^5$ g/mol e $1,5 \times 10^6$ g/mol não apresentaram citotoxicidade. No entanto, apesar de este estudo revelar baixa citotoxicidade, mesmo em altas massas moleculares, a síntese de polímeros de NVCL com massas moleculares menores é uma tarefa de grande interesse (INOUE et al., 1997).

Vihola et al. (2008) prepararam homopolímeros de NVCL e copolímeros à base de PNVCL e o macromônomo ω -metoxi poli(óxido de etileno) undecil α -metacrilato (MACC₁₁EO₄₂) via polimerização radicalar em solução. Os polímeros obtidos foram purificados e dissolvidos em água, juntamente com drogas modelo (Nadolol, propanonol ou cetoprofeno) e as soluções foram adicionadas gota a gota a uma solução aquosa contendo ácido salicílico (AS) a 37 °C. O uso do AS visa reticular fisicamente os polímeros formando partículas e encapsulando as drogas. A incorporação dos princípios ativos nas partículas poliméricas e a sua velocidade de liberação *in vitro* foram avaliadas. A reticulação na presença do AS ocorre devido à formação de pontes de hidrogênio entre as hidroxilas do AS e o nitrogênio da PNVCL. Os autores observaram que, abaixo da LCST, a 23 °C, os hidrogéis apresentaram baixa estabilidade, enquanto que, a 37 °C partículas estáveis foram obtidas, devido à precipitação das cadeias de PNVCL. A liberação das drogas das partículas constituídas de homopolímeros de NVCL foi mais rápida em comparação aos copolímeros. Parâmetros como concentração dos princípios ativos e pH afetaram a velocidade de liberação *in vitro* das drogas em soluções tampão. Dessa forma, os autores concluíram que, no caso dos copolímeros, os segmentos de óxido de etileno favoreceram as interações do tipo polímero-polímero, aumentando, assim, a estabilidade do complexo e, conseqüentemente, retardando a liberação da droga.

1.1.2. Polímeros sensíveis ao pH

Polímeros sensíveis ao pH são materiais que variam suas dimensões, através de um intumescimento ou colapso das macromoléculas, em resposta a mudanças no pH do meio. Os polímeros sensíveis ao pH encontram aplicações potenciais em sistemas de transporte e liberação controlada de drogas (LIU et al., 2009). Basicamente, existem dois tipos de materiais sensíveis ao pH: aqueles que possuem grupos ácidos em sua estrutura (-COOH, -SO₃H), os quais intumescem em pH básico, como por exemplo, o ácido acrílico; e aqueles que possuem grupos básicos (-NH₂) e intumescem em pH ácido. Em ambos os casos, o mecanismo de resposta é o mesmo, variando-se apenas o estímulo.

O pH fisiológico varia entre 1,2 e 7,4, sendo que o estômago, por exemplo, possui pH igual a 1,2, enquanto o pH do intestino é de 7,4. Dessa forma, polímeros sensíveis ao pH possuem particular relevância na liberação controlada de drogas ou peptídeos em regiões específicas do trato gastro-intestinal, por exemplo. A liberação pode, igualmente, ser feita, através, de pequenas mudanças de pH na corrente sanguínea ou, ainda, em tecidos com doenças patológicas, tal como os tumores (ALVAREZ-LORENZO et al., 2002). Sabe-se que o pH extracelular de tumores (6.8-6.9) é ligeiramente mais ácido que o pH intracelular (7.2) e o pH extracelular de tecidos sadios (7.4) (YAN et al., 2007). Ácido acrílico é um dos monômeros, com sensibilidade ao pH, mais comumente estudado na literatura.

É importante, ainda, destacar que a incorporação de pequenas quantidades de monômeros com grupos ionizáveis, tais como grupos carboxílicos ou amina, em polímeros termo-sensíveis oferece uma combinação de diferentes propriedades sensíveis.

1.1.3. Combinação da sensibilidade à temperatura e ao pH

Atualmente, existe um crescente interesse na obtenção de macromoléculas e hidrogéis que, em solução aquosa, sofrem alterações reversíveis em resposta a variações simultâneas de temperatura e pH devido ao fato de estas variáveis poderem ser modificadas de acordo com o sistema químico e biológico (YAN et al., 2007). A habilidade de um polímero de responder tanto à temperatura quanto ao pH oferece um controle adicional sobre sua transição de fases (LUBORSKY, 1965). Além disso, a presença de monômeros com grupos ionizáveis modifica a hidrofiliicidade de polímeros termo-sensíveis e, conseqüentemente, altera a sua LCST (ALVAREZ-LORENZO, 2002). A presença de co-monômeros hidrofílicos resulta em aumento na LCST de polímeros termo-sensíveis, enquanto que a presença de co-monômeros hidrofóbicos resulta em diminuição da LCST. Por exemplo, a LCST de copolímeros aumenta rapidamente com o aumento da concentração de moléculas de ácido acrílico em qualquer faixa de pH, devido à sua alta hidrofiliicidade (KHAN, 2008). Dessa forma, a otimização da temperatura de transição pode ser obtida, de acordo com a aplicação proposta, através do ajuste da composição química do copolímero.

O entendimento dos mecanismos envolvidos na variação das propriedades de materiais que combinem sensibilidade à temperatura e ao pH é de grande importância e

facilita a compreensão dos resultados dos perfis de liberação de agentes ativos nestas diferentes condições. Basicamente, abaixo da LCST, tanto os segmentos sensíveis à temperatura quanto aqueles sensíveis ao pH estão solúveis. Por outro lado, acima da LCST, as cadeias termo-sensíveis tornam-se hidrofóbicas e o sistema tende, então, a formar agregados, micelas ou partículas, onde o núcleo é mais rico em cadeias sensíveis à temperatura e a superfície é rica em segmentos sensíveis ao pH, dependendo, obviamente, dos parâmetros de síntese e do tipo de material obtido. A Figura 1.4 ilustra o comportamento de um sistema constituído por segmentos sensíveis tanto à temperatura quanto ao pH.

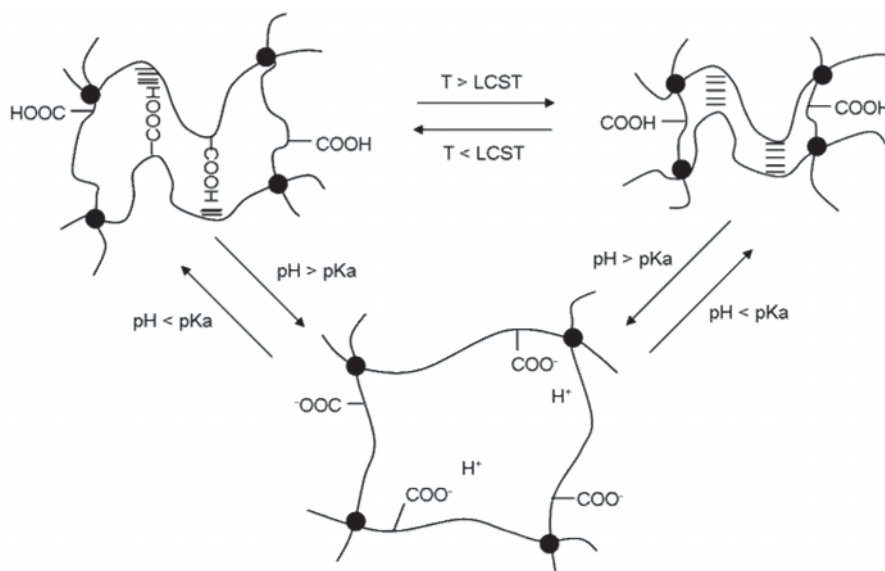


Figura 1.4. Representação esquemática da transição de fases de polímeros sensíveis à temperatura e ao pH (presença de grupos carboxílicos) (adaptado de KRATZ et al., 2000) .

As características conformacionais dos copolímeros variam de acordo com as mudanças de temperatura e pH. A variação na hidrofilicidade e nas interações físicas, tais como pontes de hidrogênio, são os principais fatores que afetam a transição de fases de copolímeros baseados em macromoléculas termo-sensíveis. A maioria dos materiais que respondem a mais de um estímulo pode ser preparada utilizando-se métodos simples, como, por exemplo, a copolimerização aleatória de diferentes monômeros. Neste contexto, SALGADO-RODRIGUEZ et al. (2004) sintetizaram homopolímeros de NIPAAm e copolímeros aleatórios de NIPAAm e AA. Estes experimentos foram realizados visando uma melhor compreensão dos efeitos da formação de pontes de hidrogênio na LCST. Os

autores observaram que no caso dos copolímeros, poli(NIPAAm-*co*-AA), a formação de pontes de hidrogênio entre os grupos carboxílicos provenientes das moléculas de AA e os grupos amida das moléculas de NIPAAm, levaram a interações adicionais do tipo polímero-polímero, tornando a separação de fases sob aquecimento, um processo menos endotérmico, em comparação aos homopolímeros de NIPAAm, devido à diminuição dos grupos capazes de interagirem com as moléculas de água.

Bulmus et al. (2000) sintetizaram copolímeros de Poli(NIPAAm-*co*-AA) com baixas massas moleculares, os quais apresentaram sensibilidade tanto ao pH quanto à temperatura, em uma ampla faixa de pH. Um princípio ativo, genericamente conhecido como Streptavidina (SAv) foi, então, incorporado ao sistema. Os autores observaram, primeiramente, que o decréscimo do pH resultou em contração das macromoléculas e, conseqüentemente, retenção da droga. Por outro lado, o aumento do pH causou o intumescimento das cadeias poliméricas, embora a liberação do princípio ativo ainda não tenha sido observada. Quando o pH foi, então, baixado novamente, as macro-cadeias contraíram e a droga foi liberada. Com relação ao efeito da temperatura, observou-se uma maior porcentagem de retenção da droga a 37 °C, devido ao estado contraído dos segmentos termo-sensíveis. No entanto, a 4 °C, esta porcentagem diminuiu, indicando que uma quantidade maior de SAv foi liberada para o meio. Estas informações são relevantes para a aplicação destes sistemas em processos de separação de biomoléculas, como biosensores, em diagnóstico e na liberação controlada de princípios ativos. Os efeitos do pH e da temperatura na retenção e/ou liberação do agente ativo são de extrema utilidade, especialmente, para os processos de separação de biomoléculas para diagnósticos e para liberação de ativos em regiões do corpo humano onde o pH é significativamente inferior a 7,0, tais como o estômago, a vagina, as glândulas salivares e tecidos intra-celulares, tais como endossomos e lisossomos.

1.2. Uso de polímeros sensíveis a estímulos em nanobiotecnologia.

A nanotecnologia consiste na tecnologia utilizada para manipular estruturas cujos tamanhos encontram-se na casa do nanômetro ou milionésimo do milímetro – número cem mil vezes menor do que o diâmetro de um fio de cabelo. A nanotecnologia pode trazer benefícios enormes e, por este motivo, vem sendo uma das áreas de pesquisa mais

explorada mundialmente. Crescente interesse vem sendo demonstrado no uso da nanotecnologia em biomedicina, para elaboração de sistemas de liberação controlada de princípios ativos (Figura 1.5).

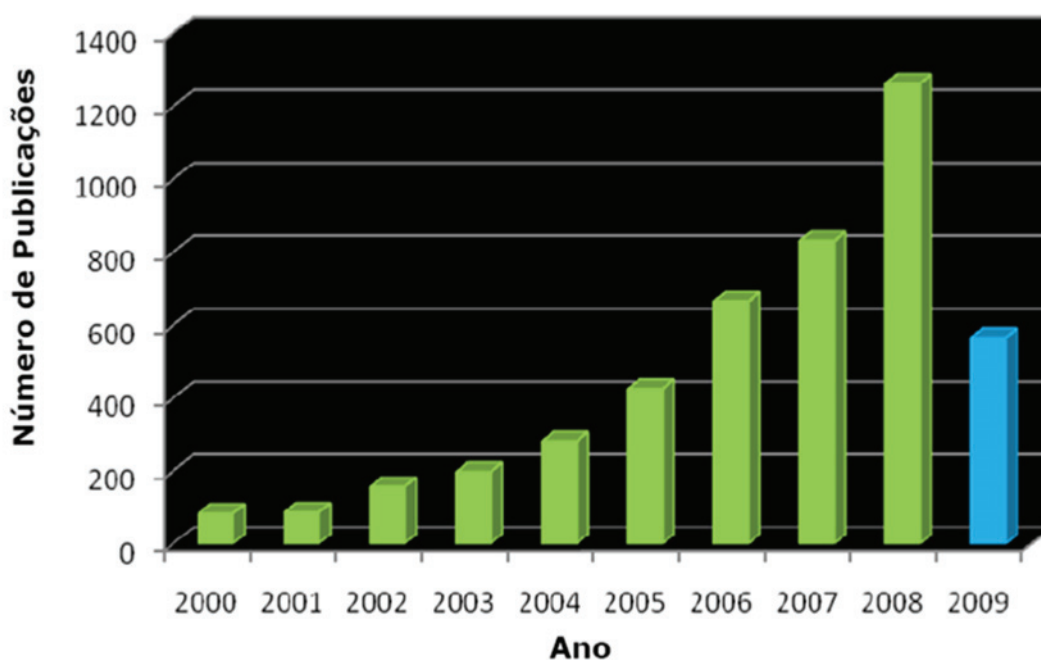


Figura 1.5. Evolução do número de artigos científicos publicados envolvendo liberação de drogas com nanopartículas (LANDEGHEM et al., 2009).

Nanomateriais são materiais com propriedades especiais em virtude de sua escala nanométrica e que são empregados em projetos de nanotecnologia. Os nanomateriais podem variar quanto ao tamanho, composição química, forma e superfície. Nanopartículas, nanoesferas e outros materiais nanoestruturados são produtos de interesse em nanomateriais por apresentarem propriedades especiais em mecânica, óptica, eletrônica, química e bioquímica quando em nanoescala e, portanto, fundamentais para a criação de nanoestruturas. Dentro da nanotecnologia, a nanobiotecnologia pode ser definida como o estudo, processamento, fabricação e desenho de nanomateriais para atuação biológica ou biomateriais, nos quais pelo menos um componente funcional possui tamanho nanométrico. Aplicações importantes da nanobiotecnologia em nanomedicina incluem o diagnóstico de doenças e o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de princípios ativos. Um dos grandes desafios da nanobiotecnologia consiste na obtenção de

diagnósticos precisos e precoces de doenças e, consequentemente, no aumento da eficiência dos inúmeros tratamentos.

A indústria de cosméticos já vem empregando a nanotecnologia na preparação de inúmeros produtos, tais como: partículas metálicas para aumento de brilho em maquiagens, nanoemulsões para utilização como hidratantes de cabelos, encapsulação de vitamina C, sistemas capazes de liberar ativos anti-rugas em camadas mais profundas da pele, protetor-solares, etc.

O estudo de sistemas de encapsulação de fármacos tem se destacado nas últimas décadas devido à possibilidade de redução da toxicidade de drogas, de liberação controlada, além do aumento da eficácia do medicamento, diminuindo as quantidades terapêuticas necessárias. As estratégias para a obtenção de tais sistemas incluem, em geral, o uso de colóides, nas suas mais variadas formas (emulsões múltiplas e inversas, micro e nanogéis, lipossomas, micro e nanopartículas biodegradáveis, micro e nanocápsulas). Estes materiais nanoestruturados mostram propriedades interessantes devido à possibilidade de passagem através de barreiras celulares por endocitose ou fagocitose em leucócitos, monócitos, macrófagos e outras células do organismo endotelial.

1.3. Obtenção de géis sensíveis a estímulos para liberação controlada de agentes ativos

Muitos autores têm investigado diferentes sistemas baseados em polímeros sensíveis a estímulos para liberação controlada de princípios ativos. Um gel polimérico, por exemplo, é constituído de cadeias poliméricas conectadas por agente de reticulação. Géis sensíveis a temperatura e ao pH são partículas reticuladas que podem intumescer ou contrair, dependendo das condições do meio, em resposta a variação destes parâmetros. Estes sistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejados, principalmente, para administração parenteral, oral ou oftálmica. Visando um melhor entendimento do mecanismo de resposta de materiais que combinem sensibilidade à temperatura e ao pH e uma melhor compreensão dos perfis de liberação de agentes ativos nestas diferentes condições, Asoh et al. (2006) definiram quatro estados diferentes para microgéis constituídos de poli(NIPAAm-co-AA), variando-se a temperatura e o pH do meio (Figura 1.6).

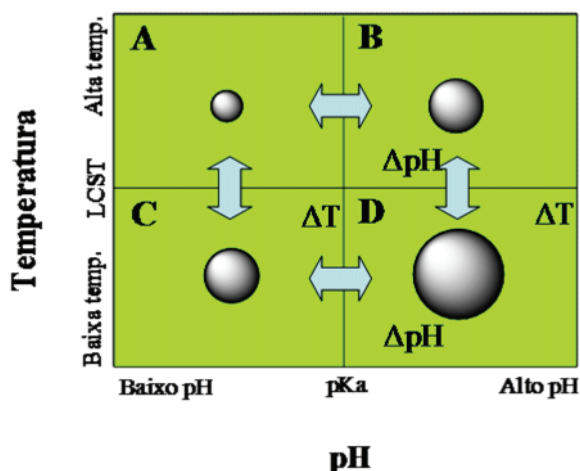


Figura 1.6. Representação dos estados dos sistemas particulados constituídos de Poli(NIPAAm-co-AA) em diferentes temperaturas e pHs (adaptada de Asoh et al., 2006).

A primeira região (A) é caracterizada por um maior grau de encolhimento das partículas. Isto ocorre devido a desidratação dos segmentos de cadeias contituídos de PNIPAAm, uma vez que a temperatura está acima da LCST, enquanto as unidades de AA estão em estado não-ionizado, pois o pH está abaixo do pK_a do PAA. Por outro lado, a região D se caracteriza pelo maior grau possível de entumescimento das partículas, devido à hidratação dos segmentos de NIPAAm numa temperatura inferior à LCST e devido à repulsão causada pela ionização dos grupos carboxílicos do AA, em pH acima do pK_a . Existem, ainda, duas regiões com estados intermediários: a região B, onde, embora os segmentos de NIPAAm se encontrem em um estado desidratado ($T > LCST$), os grupos carboxílicos do AA se encontram no estado ionizado; e ainda uma região C, onde, embora as cadeias de PAA estejam contraídas, devido ao estado não ionizado, as cadeias da PNIPAAm se encontram expandidas devido à temperatura, abaixo da LCST.

Para a preparação de géis, microgéis e nanogéis, sensíveis à temperatura e ao pH, por exemplo, a polimerização radicalar é comumente empregada. O uso de agentes de reticulação é frequentemente necessário. Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanogéis poliméricos para uso em sistemas de liberação controlada de agentes ativos, os quais podem ser, de uma forma geral, classificados em métodos que envolvem polimerizações ou precipitação de polímeros pré-formados. Dentre os métodos de polimerização, destacam-se as polimerizações em meio disperso, tais como emulsão,

miniemulsão, microemulsão (sejam estas diretas ou inversas), por precipitação e em suspensão. Os métodos para obtenção de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados podem ainda ser classificados em quatro categorias: emulsão-evaporação do solvente, emulsão-difusão do solvente e precipitação de sais (*salting-out*). Estas técnicas são similares quanto aos procedimentos empregados, pois envolvem a preparação de uma solução orgânica contendo os componentes que irão contribuir à formação da nanopartícula e de uma solução aquosa contendo um estabilizante.

1.3.1. Polimerização em meio disperso

As polimerizações em meio disperso vêm sendo utilizadas industrialmente para a obtenção de uma extensa variedade de produtos tais como tintas, adesivos, aditivos para a indústria de papel e têxtil, aditivos para tratamento de couro, etc, além da encapsulação de princípios ativos na indústria de cosméticos. Atualmente, estes métodos de polimerização estão sendo estudados para fins farmacêuticos e biomédicos, como sistemas de liberação controlada de ativos.

1.3.1.1. Polimerização por precipitação

Desde a década de 80, a polimerização por precipitação de alquil acrilamidas e outros monômeros hidrossolúveis vem sendo considerada como um eficiente método de obtenção de nanogéis poliméricos. A partir de então, o estudo da preparação de nanogéis sensíveis a estímulos utilizando esse método vem ganhando crescente atenção no meio acadêmico. As características finais apresentadas pelo gel são essencialmente dependentes das condições de síntese. Dentre estas, as principais que podem ser variadas são a concentração e tipo de iniciador, de monômero e do agente reticulante, além da temperatura de síntese e do solvente. O primeiro trabalho descrevendo a síntese de microgéis sensíveis à temperatura foi publicado em 1986 (PELTON; CHIBANTE, 1986). Nesse trabalho, estudou-se a polimerização por precipitação da NIPAAm, utilizando *N*-*N*'-metileno-bis-acrilamida (MBA) como agente de reticulação, persulfato de potássio (KPS) como iniciador e dodecil sulfato de sódio (SDS), como surfatante. O efeito destes parâmetros foi estudado e os autores obtiveram, em geral, microgéis com estreita polidispersidade de tamanho de partículas.

O princípio básico deste método consiste na realização das polimerizações sob condições de precipitação dos oligômeros formados, os quais levam à formação de partículas poliméricas. No caso de polímeros termo-sensíveis, a temperatura de polimerização é, geralmente, superior à LCST, visando promover a precipitação das cadeias em crescimento. A estabilidade coloidal dos géis poliméricos depende dos reagentes empregados. Em geral, utilizam-se surfatantes e iniciadores iônicos ou, ainda, monômeros com grupos ionizáveis. Visando manter a estrutura do gel e prevenir a solubilização das cadeias poliméricas, o uso de um agente de reticulação é indispensável e assegura a eficiência da precipitação destas cadeias sob a forma de micro e nanogéis. (Figura 1.7).

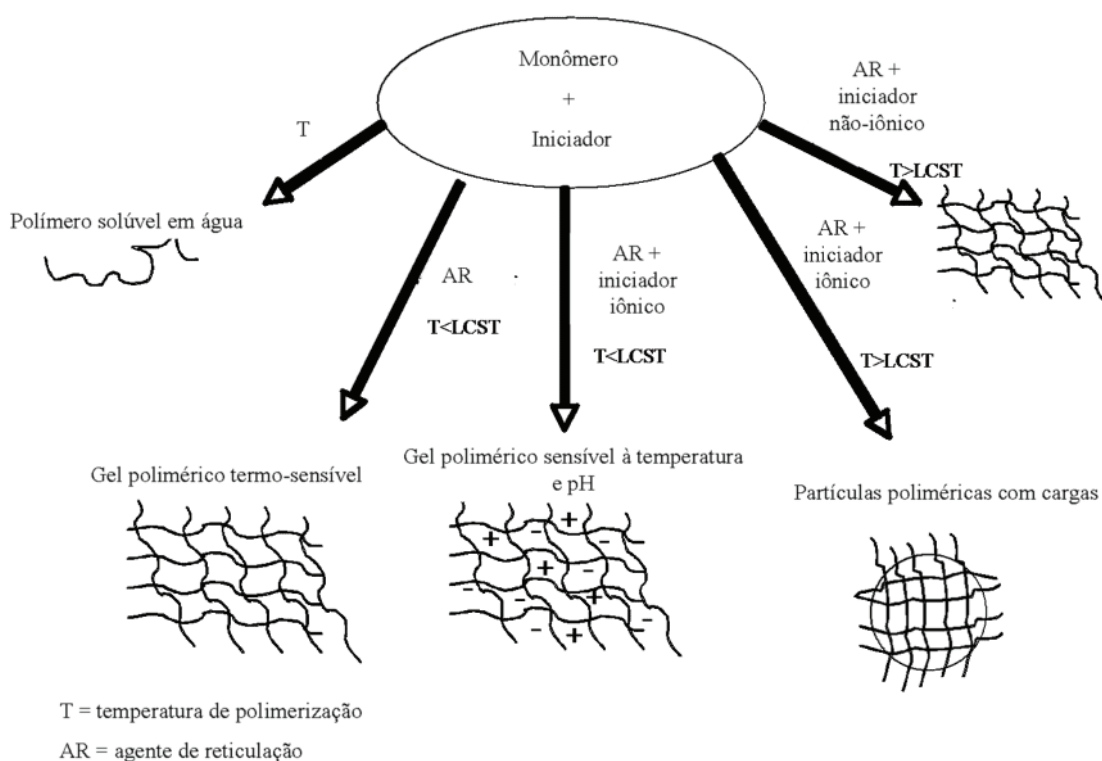


Figura 1.7. Representação esquemática da síntese de polímeros e géis sensíveis à temperatura e ao pH (adaptado de MEUNIER; ELAISSARI, 2003)

Imaz e Forcada (2008) sintetizaram microgéis à base de PNVCL via processo batelada, utilizando *N,N'*-metileno-bis-acrilamida (MBA) com agente reticulante e persulfato de potássio (KPS), como iniciador. O efeito de vários parâmetros, tais como concentração de monômero, de iniciador, de surfatante e temperatura, nas propriedades finais dos microgéis, foi avaliado. A variação do diâmetro de partículas com o aumento da temperatura foi estudada. As polimerizações também foram realizadas em processo semi-

contínuo, estudando-se, de forma separada, o efeito de alimentações contínuas ou de monômero, ou de iniciador, ou do agente reticulante ou, ainda, do surfatante, enquanto os demais reagentes eram mantidos constantes. A sensibilidade à temperatura dos microgéis obtidos por este método também foi avaliada, através de medidas de diâmetro hidrodinâmico médio em função da temperatura. Os autores observaram que todos os microgéis obtidos por processo batelada, apresentaram diminuição do diâmetro hidrodinâmico com o aumento da temperatura, contrariamente aos microgéis obtidos pelo processo semi-contínuo. Neste último caso, a sensibilidade à temperatura foi dependente das condições de alimentação dos reagentes durante o processo de polimerização. Quando o agente de reticulação foi adicionado ao longo da polimerização, os microgéis finais não apresentaram sensibilidade à temperatura. Este resultado se deve ao fato de que o MBA se distribuiu uniformemente nos microgéis, diminuindo o intumescimento em meio aquoso. Quando a NVCL foi alimentada ao longo da reação, também não foi possível determinar o valor de LCST dos microgéis, devido à presença de muitas partículas sem NVCL no início da polimerização. Quando o iniciador e o surfatante foram adicionados ao longo da polimerização, os nanogéis obtidos apresentaram sensibilidade à temperatura. Nestes últimos dois casos, uma vez que os radicais formados reagem preferencialmente com MBA, os microgéis obtidos possuíam um núcleo rico em MBA, recobertos por uma camada mais rica em segmentos de cadeia termo-sensíveis.

Em outro trabalho, os mesmos autores descreveram o estudo do efeito de dois diferentes agentes de reticulação, diacrilato de poli(etilenoglicol) (PEGDA) e *N,N*-metileno-bis-acrilamida (MBA) nas propriedades de microgéis à base de PNVCL sintetizados via processo batelada utilizando KPS como iniciador (IMAZ; FORCADA, 2008). As conversões parciais de NVCL, PEGDA e MBA foram determinadas por ressonância magnética nuclear (RMN ^1H) e os diâmetros médios das partículas foram obtidos por espectroscopia de foto-correlação (PCS). Observou-se que a conversão final da NVCL foi independente do tipo e concentração do agente reticulante. No entanto, os diâmetros de partículas variaram em função do tipo de agente de reticulação utilizado. Ambos MBA e PEGDA são consumidos mais rapidamente que a NVCL. Devido à maior solubilidade dos agentes de reticulação (25,0 e 5,0 g/L, respectivamente), em comparação à NVCL (3,1 g/L), os radicais formados pela decomposição do KPS reagem, preferencialmente, com as moléculas do agente reticulante. Consequentemente, o grau de reticulação é alto no início da polimerização. Como o PEGDA é mais solúvel em água do

que o MBA, este efeito é mais pronunciado, levando a obtenção de géis com diâmetros menores, em comparação àqueles obtidos com MBA.

1.3.1.2. Polimerização em emulsão

Dentre as polimerizações em meio disperso, a polimerização em emulsão consiste em um eficiente método para síntese de diferentes tipos de materiais híbridos (WIECHERS; SCHMIDT-NAAKE, 2008). Esta técnica é um processo heterogêneo, no qual os monômeros se encontram dispersos em uma fase contínua (geralmente água), sendo estabilizados pela adição de um surfatante, e são polimerizados por radicais gerados pela decomposição de um iniciador. A formação de partículas, em uma polimerização em emulsão, pode ocorrer basicamente através de três mecanismos: nucleação micelar ou heterogênea, precipitação de oligômeros na fase aquosa ou nucleação homogênea e entrada de radicais no interior das gotas de monômero. No entanto, em uma polimerização em emulsão convencional, a polimerização ocorre preferencialmente através da nucleação micelar.

Imaz et Forcada (2009) copolimerizaram NVCL com o co-monômero hidrofóbico 3-*o*-metacriloil-1,2:5,6-di-*o*-isopropilideno- α -D-glicofuranose (3-MDG) utilizando a técnica de polimerização em emulsão. MBA foi utilizado como agente de reticulação e a influência das concentrações de co-monômero, MBA, iniciador e surfatante (SDS), bem como da temperatura de reação, na cinética de polimerização, foi avaliada. Os autores verificaram que, em todas as polimerizações, MBA reagiu mais rapidamente que a NVCL e tanto a concentração de iniciador como a temperatura de reação influenciaram a cinética de polimerização. Em relação ao 3-MGD, observou-se que o aumento da concentração deste co-monômero hidrofóbico levou a uma diminuição do grau de intumescimento das partículas. Além disso, a transição de fases com o aumento da temperatura foi menos brusca. Estes resultados são atribuídos à hidrofobicidade do 3-MGD, associada com sua insensibilidade à temperatura. Dessa forma, os autores concluíram que a sensibilidade à temperatura depende da quantidade de NVCL e 3-MGD adicionadas e este parâmetro pode ser otimizado variando-se as concentrações destes monômeros.

1.3.1.3. Polimerização em miniemulsão

A polimerização em miniemulsão consiste em um novo processo de polimerização em meio disperso que tem encontrado crescente interesse por pesquisadores nas duas últimas décadas (QI; JONES; SCHORK, 2007). Miniemulsões são classicamente definidas como dispersões aquosas de gotículas orgânicas, relativamente estáveis, dentro de uma faixa de tamanho de 50-500 nm. Teoricamente, o número e o diâmetro final das partículas de polímeros devem ser iguais ao número e ao diâmetro inicial das gotas de monômero, devido à significativa redução do tamanho e distribuição de tamanhos das gotas de monômero e ao fato do mecanismo predominante de formação de partículas ser a nucleação das gotas.

Uma polimerização em miniemulsão é realizada através de uma combinação adequada de monômeros, surfatante, fase contínua, um eficiente sistema de homogeneização capaz de gerar gotas de monômero com tamanho da ordem de nanômetros e, em alguns casos, à utilização de um co-estabilizante insolúvel na fase contínua (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002). A preparação das miniemulsões é dividida em duas etapas fundamentais. Na primeira etapa, podem-se utilizar diferentes equipamentos de dispersão ou homogeneização, visando alcançar um estado estacionário, obtido pelo equilíbrio entre a taxa de rompimento e a coalescência das gotas (ASUA, 2002; LANDFESTER, 2001). Esta etapa consiste no principal diferencial deste método. O tamanho das gotas, diretamente depois do processo de homogeneização, depende principalmente das quantidades e tipos de surfatante e co-estabilizante e, ainda, das condições de dispersão. Na segunda etapa, as gotas formadas após o processo de homogeneização são, então, polimerizadas. O princípio da polimerização em miniemulsão é representado na Figura 1.8. As gotas de monômero são consideradas “nanoreatores” e levam à obtenção de um sistema mais monodisperso em relação ao diâmetro final das partículas.

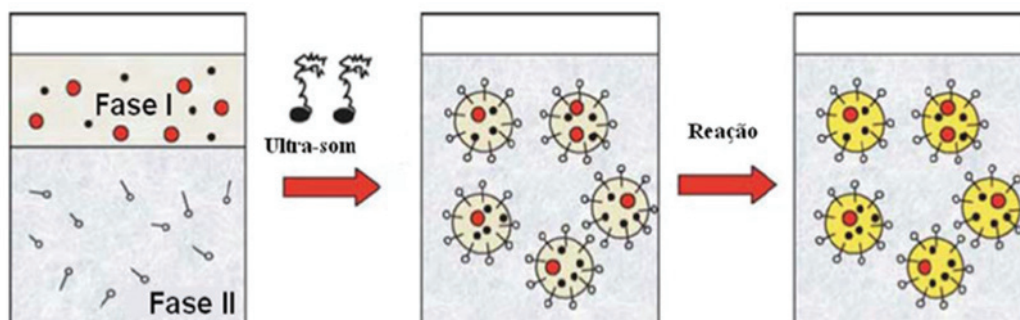


Figura 1.8. Princípio da polimerização em miniemulsão (adaptado de Landfester, 2003).

Devido ao potencial químico das moléculas de monômero presentes nas gotas menores ser maior do que daquelas presentes nas gotas maiores, as moléculas de monômero tendem a difundir para estas gotas maiores, provocando a desestabilização das emulsões (Figura 1.9). A degradação difusional (Ostwald ripening) e a coalescência podem levar a desestabilização e subsequente quebra da emulsão. Para criar uma miniemulsão estável, as gotas devem ser estabilizadas contra a degradação de Ostwald por processos difusionais e contra a coalescência por colisões. No processo de polimerização em miniemulsão, a degradação de Ostwald depende da solubilidade do monômero na fase contínua (ASUA, 2002).

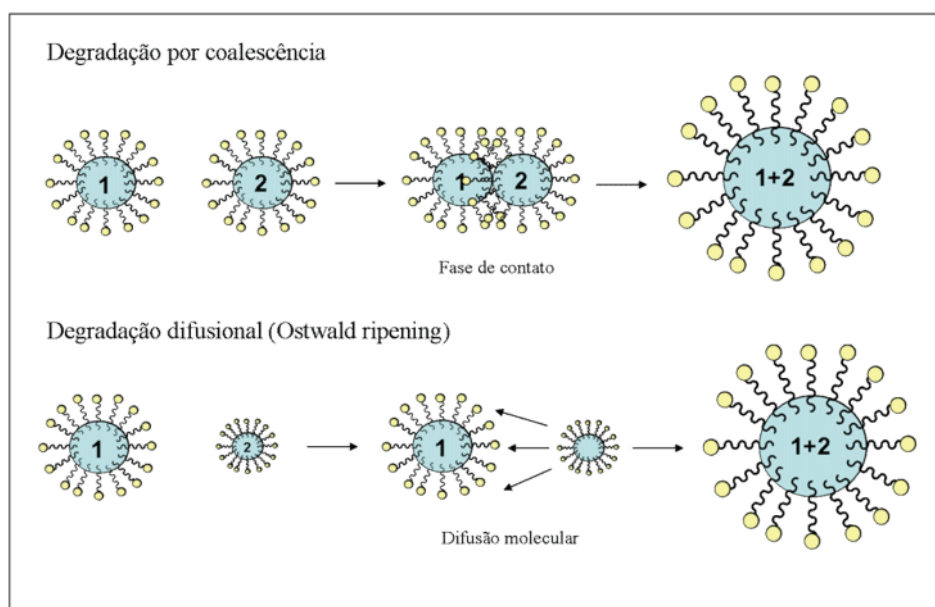


Figura 1.9. Mecanismos de degradação das gotas de monômero em reações de miniemulsão (adaptado de ASUA, 2002).

As gotas de monômero são estabilizadas contra a degradação difusional através da utilização de um co-estabilizante, o qual age como um agente osmótico. Em resumo, o papel do co-estabilizante em polimerizações em miniemulsão é o de reduzir ou, ainda, suprimir a degradação de Ostwald através da introdução do aumento da pressão osmótica visando manter a estabilidade das gotas de monômero durante o processo de polimerização (PRICHANONT et al., 2000).

Além da degradação difusional, a desestabilização das miniemulsões pode também ocorrer por processos de coalescência devido à colisão. Este problema é geralmente resolvido através da adição de surfatantes apropriados na formulação das miniemulsões, que forneçam a estabilização eletrostática ou estérica às gotas (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; GILBERT, 1995; LANDFESTER, 2003). A estabilidade coloidal está relacionada ao tipo e quantidade do surfatante empregado. Após o processo de homogeneização, o tamanho das gotas depende, diretamente, da quantidade de surfatante: quanto maior a quantidade de surfatante, maior é a área referente à interface das gotas de monômeros com o meio disperso que pode ser estabilizada por estas moléculas, reduzindo, assim, o tamanho das gotas.

A utilização desta técnica de polimerização apresenta uma série de vantagens, tais como: (i) uma distribuição mais homogênea no tamanho final das partículas de polímero; (ii) eliminação da competição por surfatante na etapa de nucleação e de crescimento de partículas, o que faz com que o número final de partículas seja menos dependente da variação na composição do sistema, como por exemplo, o tipo de iniciador; e (iii) obtenção de materiais híbridos, do tipo orgânico/inorgânico (TIARKS et al., 2001; MORAES et al., 2006; FAUCHEU et al., 2010) e orgânico/orgânico (LANDFESTER, 2003; LÓPEZ et al., 2008; RODRIGUEZ; BARANDIARAN; ASUA, 2007).

1.3.1.4. Polimerização em miniemulsão inversa

Para a polimerização de monômeros hidrofílicos, como é o caso da NVCL, o método de polimerização em miniemulsão inversa é usualmente requerido (YANG; LIU; ZHANG, 2008). Neste método, uma formulação diferente é utilizada e o surfatante consiste de uma molécula não iônica ou um polímero anfifílico. Contrariamente à miniemulsão direta, no processo inverso as moléculas de monômero estão contidas no interior de gotas de água e são estabilizadas por um surfatante solúvel no solvente orgânico

(ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002). Existem poucos trabalhos na literatura descrevendo o uso do processo de polimerização em miniemulsão inversa.

Do mesmo modo que nas polimerizações em miniemulsão, para criar uma miniemulsão inversa estável, com gotas de tamanho reduzido, deve-se evitar a degradação de Ostwald, por processos difusionais, e a coalescência das gotas, por colisões. Para evitar a degradação de Ostwald, em miniemulsão inversa, é cada vez mais comum o uso de co-estabilizantes, como é o caso do cloreto de sódio (NaCl) (TIARKS et al., 2001). O aumento da força iônica no interior das gotas de monômero leva a uma redução significativa da degradação de Ostwald (KOROLEVA; YURTOV, 2003). Crescente atenção vem sendo dada à preparação de partículas poliméricas através de polimerização em miniemulsão inversa devido à possibilidade de encapsulação de nanopartículas inorgânicas no interior de matrizes poliméricas hidrofílicas.

1.4. Combinação da sensibilidade a estímulos com propriedades magnéticas

1.4.1. Classificação magnética dos materiais

Os materiais magnéticos, de um modo geral, se classificam em três grandes grupos, segundo a influência que sofrem em função do campo magnético:

- ✓ Materiais Ferromagnéticos;
- ✓ Materiais Paramagnéticos;
- ✓ Materiais Diamagnéticos.

Materiais Ferromagnéticos: Permeabilidade (μ) > 1 : são materiais fortemente atraídos por uma força magnetizante, ou por um ímã. Ex: Ferro, Cobalto e quase todos os tipos de aços.

Materiais Paramagnéticos: Permeabilidade (μ) $= 1$: são materiais levemente atraídos por uma força magnetizante, ou por um ímã. Ex: Platina, Alumínio, Cromo, Estanho, Potássio.

Materiais Diamagnéticos: Permeabilidade (μ) < 1 : são materiais levemente repelidos por uma força magnetizante, ou por um ímã. Ex: Prata, Zinco, Chumbo, Cobre, Mercúrio.

Dentre os conceitos importantes no campo de magnetismo, destacam-se, ainda, a retentividade, a força coercitiva, a relutância, o magnetismo remanente e o campo de fuga.

- Retentividade: é a habilidade que o material tem em reter parte do magnetismo, após a interrupção da força magnetizante.
- Força Coercitiva: é a magnetização inversa que, se aplicada no material anula o magnetismo residual.
- Relutância: oposição ou dificuldade de se estabelecer o campo magnético. Um material que possui alta permeabilidade terá baixa relutância.
- Magnetismo Remanente: quantidade de magnetismo retido no material após a desmagnetização.
- Campo de fuga: originam-se quando as linhas de força do campo magnético são perturbadas por uma descontinuidade (trinca).

1.4.2. Medidas de magnetização

As medidas de magnetização são realizadas basicamente por três métodos distintos: i) através de métodos indutivos, ii) através da força ou do deslocamento quando um material magnetizado é submetido a um gradiente de campo magnético, e iii) através da variação de alguma propriedade intrínseca do material tal como efeito Hall, magneto-resistência, magneto-ótica (SAMPAIO et al., 2000).

Dentre as técnicas de magnetometria mais utilizadas, destacam-se:

- ✓ Magnetometria de Amostra Vibrante (MAV);
- ✓ Extração;
- ✓ Magnetometria de Haste Ressonante (REED);

- ✓ Magnetometria de Interferência Quântica Supercondutora ou SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*).

1.4.2.1. Magnetômetro de Amostra Vibrante (MAV)

Desenvolvido por S. Foner em 1955, o MAV é, provavelmente, o magnetômetro mais usado nos laboratórios de pesquisa e caracteriza-se pelo seu bom desempenho, baixo custo e simplicidade de funcionamento.

A Figura 1.10 apresenta um diagrama do MAV. Fazendo-se uma amostra vibrar a uma frequência f , durante um período de tempo t , induzir-se-á uma voltagem alternada nas bobinas de detecção. Esta voltagem é dada por

$$E = \mu G A 2 \pi f \cos(2 \pi f t)$$

onde μ é o momento magnético da amostra, G é função da geometria das bobinas de detecção e A é a amplitude de vibração.

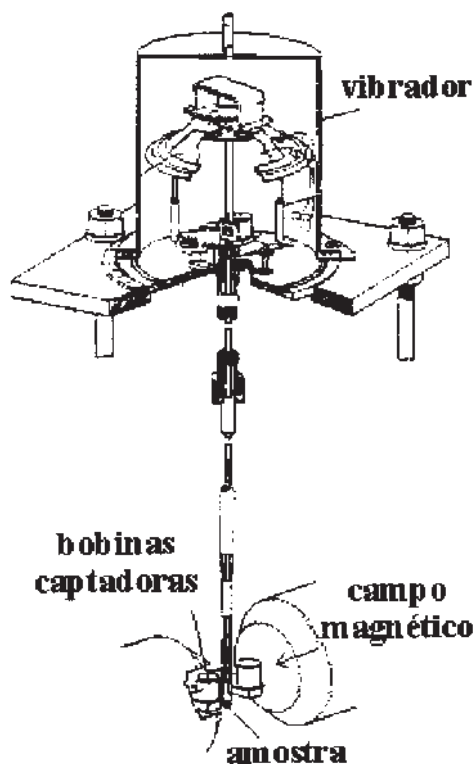


Figura 1.10. Diagrama de um magnetômetro de amostra vibrante.

A amostra é fixada na extremidade de uma haste rígida e o campo pode ser aplicado tanto na direção transversal como na longitudinal à direção de vibração. Usualmente a simetria axial é usada quando a fonte de campo magnético é uma bobina supercondutora. A outra extremidade da haste é fixada à membrana de um alto-falante ou a um motor com um sistema de polias ou engrenagens. O primeiro permite mais baixas amplitudes e mais altas frequências. O MAV possui uma sensibilidade de 10^{-5} emu.

Vale à pena destacar dois detalhes: um deles é que a medida de magnetização, feita com o deslocamento da amostra, permite eliminar outras contribuições que não as provenientes da amostra; o segundo é que a medida é realizada com o auxílio de detecção síncrona com o uso de um amplificador *lock-in*, o que proporciona um grande aumento de sensibilidade.

1.4.2.2. Curva de magnetização e desmagnetização (Histerese)

Essa curva é usada para indicar a magnetização e desmagnetização do material. Cada tipo de material tem uma permeabilidade, a qual pode ser determinada pelo aumento da força magnetizante até o material alcançar o seu ponto de "saturação". O ponto de saturação é o ponto onde o aumento da força de magnetização não exerce mais nenhuma influência sobre o material. A Figura 1.11 mostra detalhadamente esses pontos.

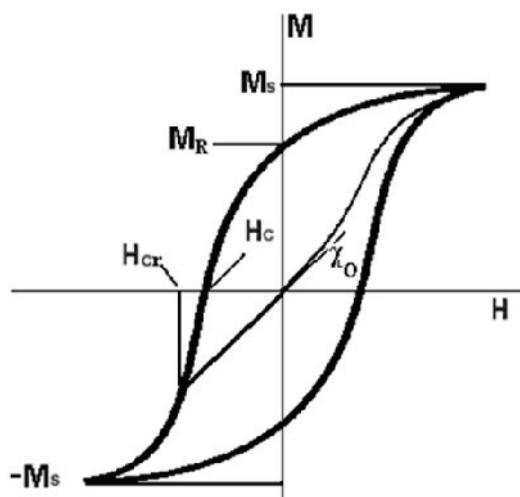


Figura 1.11. Curva de histerese e seus parâmetros (COPEITEC – INSPEÇÕES E ENGENHARIA).

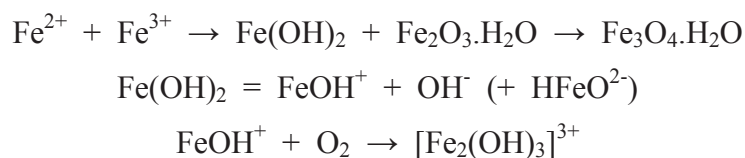
Os parâmetros da curva de histerese são: a magnetização de saturação M_S , a remanência M_R , campo coercivo H_C , susceptibilidade inicial χ_0 , e coercividade de remanência H_{CR} .

A obtenção de uma curva de Histerese "*larga*" indica que esse material é difícil de magnetizar, ou seja, é um material com baixa permeabilidade, alta retentividade, alta força coercitiva, alta relutância e alto magnetismo residual. Contrariamente, uma curva "*estreita*" indica que esse material tem alta permeabilidade, baixa retentividade, baixa força coercitiva, baixa relutância e baixo magnetismo residual.

1.4.3. Nanobiomagnetismo

Como mencionado anteriormente, o nanobiomagnetismo consiste na utilização das propriedades magnéticas de alguns materiais em biomedicina, visando aplicações tanto *in vitro* como *in vivo* (LESLIE-PELECKY; LABHASETWAR; KRAUS, 2006). Colóides magnéticos, também conhecidos como ferrofluido, são dispersões estáveis de nanopartículas magnéticas (NPMs) em um solvente adequado, o qual pode ser tanto polar como apolar (LU et al., 2004). Desde as últimas décadas, quando as primeiras partículas magnéticas foram sintetizadas, o interesse neste tipo de material vem crescendo cada vez mais (SCHERER; NETO, 2005).

Dentre as inúmeras técnicas para obtenção de materiais magnéticos, os métodos físicos, em geral, dão origem a partículas sem nenhum controle de tamanho. Dessa forma, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de obter nanopartículas magnéticas com excelente controle de tamanho, distribuição de tamanho e composição química (ELAISSARI, 2009). O método de co-precipitação, abaixo esquematizado, consiste em uma técnica fácil e amplamente utilizada para preparar nanopartículas de óxido de ferro a partir de soluções aquosas dos sais férrico e ferroso e pela adição de uma solução concentrada de hidróxido de amônio (NH_4OH), com ou sem aquecimento. As propriedades dos produtos dependem de parâmetros, como a razão entre os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} , o pH, força iônica do meio, entre outros.





Usualmente, hidróxidos, ferroso e férrico, são inicialmente formados e, então, transformados em partículas de maghemita e ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ou magnetita (Fe_3O_4) devido ao aumento do pH do meio. A composição do núcleo e as propriedades magnéticas podem variar substancialmente, variando-se as condições de reação (ELAISSARI, 2009). O controle dos parâmetros de síntese visa prevenir a obtenção de partículas extremamente polidispersas e a necessidade de vários passos de purificação do material. A purificação das nanopartículas magnéticas é, usualmente, feita através de centrifugação, filtração, coluna cromatográfica, magnetoforese e sonicação.

No entanto, estas partículas mostram baixa estabilidade, com tendência a formar agregados, o que resulta em aumento no tamanho médio de partículas. A solução para este problema pode ser encontrada através do uso de um agente de revestimento adequado para estas partículas, seja ele uma substância orgânica ou inorgânica. Neste sentido, o desafio consiste no uso de substâncias apropriadas que levam ao desenvolvimento de materiais que podem ser utilizados para aplicações *in vivo*.

O óxido de ferro possui estrutura cristalina, contendo sub-redes alternadas de íons de Fe^{2+} e Fe^{3+} , que estão acopladas antiferromagneticamente. A alternância das duas sub-redes, com números diferentes de elétrons desemparelhados é a razão da forte magnetização ferrimagnética. A Figura 1.12 apresenta um difratograma de raios X típico de uma amostra cristalina de Fe_3O_4 . Pode-se observar que os picos de difração são nítidos e estreitos, os quais indicam que o material está em condição cristalina. Os picos podem ser numerados em (220), (400), (422), (311), (440), e (533) dentro de um plano cúbico, os quais correspondem à estrutura de óxido de ferro. A partir da investigação difratométrica, é possível confirmar as características cristalinas das partículas de Fe_2O_3 .

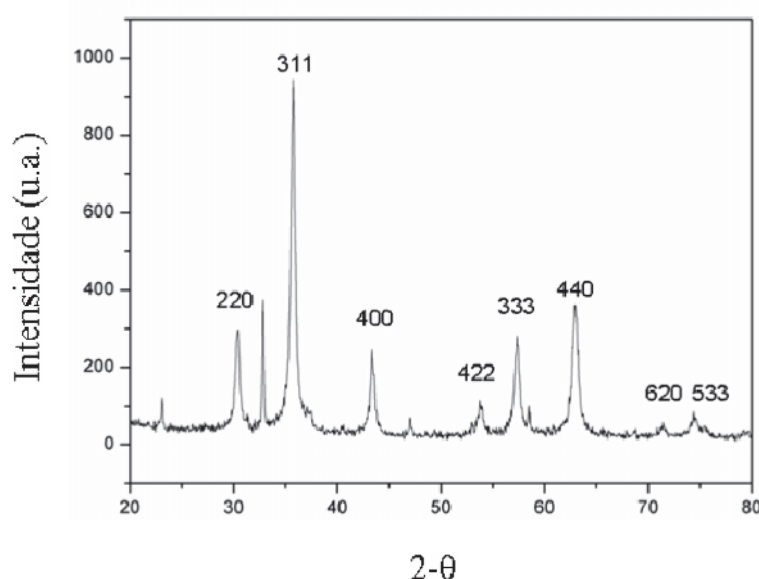


Figura 1.12. Difratoograma de raios X das nanopartículas de óxido de ferro.

Uma das principais características das nanopartículas de óxido de ferro para aplicações biomédicas é o superparamagnetismo, o qual pode, também, prevenir a agregação e permitir que as partículas redispersem rapidamente na solução após a remoção do campo magnético (HÄFELI, 1997). A Figura 1.13 ilustra o processo de separação e redispersão de nanopartículas magnéticas revestidas com ácido olêico. Na ausência do campo magnético externo, a dispersão das NPMs se apresenta sob a forma de um fluido marrom homogêneo (Figure 1.13A). Aproximando-se um ímã da dispersão, as NPMs tendem a se acumular sobre o magneto, separando-se da solução, a qual se torna, então, transparente (Figure 1.13B).

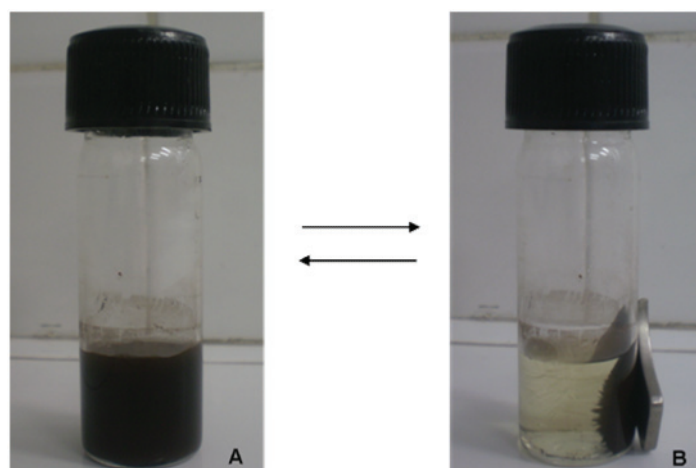


Figura 1.13. Representação do processo de separação (A para B) e dispersão (B para A) de nanopartículas magnéticas revestidas com ácido oléico.

Com o objetivo de evitar a aglomeração, as partículas magnéticas devem ser revestidas com materiais apropriados. De acordo com o material de revestimento, os ferrofluidos podem ser classificados em dois grupos principais: o primeiro deles consiste do material revestido com moléculas pequenas de surfatante, seja este iônico ou não; o segundo consiste no material revestido com polímeros biocompatíveis, capazes de interagir com biomoléculas, células, etc. O desenvolvimento de nanopartículas magnéticas visa a sua aplicação prática, com ênfase especial em novos materiais para aplicações na área biomédica (LACAVA et al., 2004). Estes materiais podem ser utilizados em ensaios *in vitro*, tais como na separação, purificação e diagnóstico de células (WILHELM et al., 2008), além da imobilização de proteínas (LU et al., 2004). As aplicações *in vivo* incluem o uso das NPMs como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética (IRM) (HONG et al., 2008), geradores de calor em hipertermia (HIERGEIST et al., 1999), agentes de liberação controlada de princípios ativos (HIERGEIST et al., 1999), biosensores (ASTALAN, 2004), etc.

1.4.3.1. Nanopartículas magnéticas para aplicações biomédicas *in vitro*

Desde as últimas décadas, partículas constituídas de polímeros vêm sendo utilizadas na área biomédica como agentes para diagnóstico *in vitro*, ou seja, em ensaios de

imunidade, separação e análises de células, concentração de ácidos nucleicos, suporte para imobilização de biomoléculas, etc (ELAISSARI, 2009; FARAJI et al., 2010). Para um eficiente diagnóstico *in vitro*, por exemplo, a separação de fases consiste em uma etapa crucial e é usualmente realizada utilizando-se centrifugação, precipitação ou filtração. Neste contexto, o uso de partículas magnéticas pode oferecer importantes vantagens, em comparação a outros sistemas poliméricos clássicos devido à sua rápida e fácil separação sob a aplicação de um campo magnético externo (ELAISSARI, 2009).

O primeiro trabalho nesta área foi reportado por Ugelstad et al. (1993) (HÄFELI et al., 2007), o qual descreve o preparo de microesferas magnéticas com estreita distribuição de tamanho e sua utilização como suporte para biomoléculas. As dispersões de nanopartículas magnéticas são muito úteis na separação de biomoléculas devido à sua grande área superficial, a qual pode incorporar funções químicas capazes de interagir, de forma seletiva, com diferentes espécies celulares. Aplicações *in vitro* também objetivam a detecção e separação de espécies biologicamente ativas (BURNS et al., 2004; KOUASSI et al., 2006) ou oligonucleotídeos (KRIZOVÁ et al., 2006; HORAK et al., 2001).

A separação de células através de magnetismo pode ser feita de maneira contínua ou não, dependendo da aplicação específica. Em processo batelada, as partículas magnéticas e o material a ser analisado são misturados, sendo fundamental o conhecimento da cinética de reação para determinar precisamente o tempo de espera necessário para que uma quantidade suficiente do material se ligue às partículas magnéticas. Um campo magnético é, então, aplicado, através da utilização de um magneto. As células devidamente ligadas às partículas magnéticas são, então, separadas, como pode ser observado na Figura 1.14. O material mais comumente utilizado neste tipo de aplicação são as nanopartículas magnéticas encapsuladas em matrizes poliméricas.

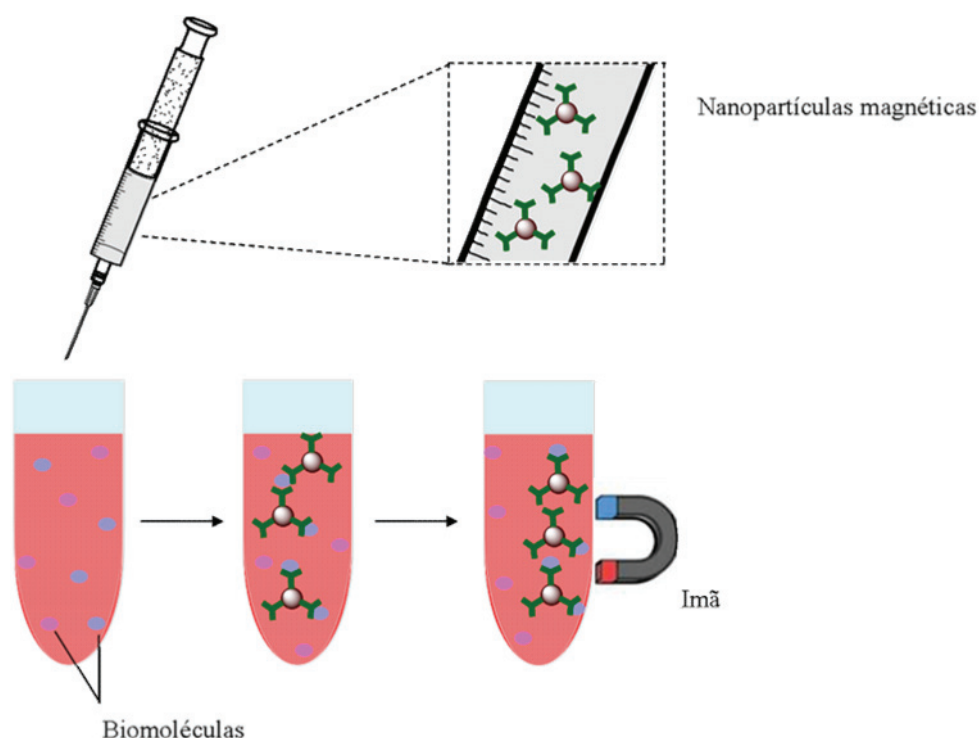


Figura 1.14. Representação esquemática do processo de separação de biomoléculas através de magnetismo.

Partículas magnéticas também possuem grande potencial como agentes de detecção e monitoramento de bactérias, vírus e outros contaminantes patogênicos, podendo realizar, simultaneamente, a separação e análise quantitativa do material. As principais vantagens do uso destes materiais incluem a baixa interferência sofrida por outros agentes, a alta intensidade do sinal, a dispensa de pré-tratamentos e a praticidade devido ao seu tamanho reduzido. Além disso, nanopartículas magnéticas podem detectar mais de uma molécula ao mesmo tempo.

A detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos humanos, virais e bacterianos vem ganhando crescente atenção no diagnóstico de doenças. Neste sentido, a concentração de ácido nucleico oferece um ganho na sensibilidade dos sistemas utilizados no diagnóstico, o qual necessita ser sensível e específico, visando um diagnóstico precoce de uma doença infecciosa, onde a detecção de quantidades muito pequenas de células patogênicas é usualmente requerida. Atualmente, a extração de ácido nucleico de amostras biológicas pode ser facilmente realizada através de vários métodos (TAN et al., 2009; CURY et al., 2008). A literatura descreve o desenvolvimento de alguns processos simples e rápidos utilizando partículas de sílica (DI PINTO et al., 2007). No entanto, algumas

amostras biológicas podem conter quantidades não especificadas de RNA e DNA e isto pode afetar o resultado das análises. Neste sentido, uma captura eficiente (específica e sensível a baixas concentrações de moléculas) é sempre requerida e a extração de ácido nucléico é usualmente feita utilizando-se partículas magnéticas.

A purificação do sangue utilizando-se partículas magnéticas vem sendo amplamente utilizada, desde as últimas décadas, no tratamento de doenças inflamatórias. UGESTALD et al. (1998) e HÄFELI (1997) utilizaram células do tipo T4 e T8 provenientes de pacientes infectados com o vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e as isolaram através de separação magnética. A utilização deste sistema permitiu o isolamento de células endoteliais com concentrações inferiores a 10 células/ mL de sangue. O efeito de várias drogas sobre estas células foi, então, estudado.

1.4.3.2. Nanopartículas magnéticas para aplicações biomédicas *in vivo*

Devido ao seu tamanho reduzido, as nanopartículas magnéticas possuem grande área superficial, o que aumenta a presença de sítios ativos para incorporação de biomoléculas, permitindo a elaboração de diferentes sistemas, formulados de acordo com a aplicação proposta. Tais sistemas podem circular, de forma estável, através da corrente sanguínea, por um longo período de tempo, ser detectados através da imagem por ressonância magnética (IRM) e, finalmente, liberar quantidades desejadas de substâncias ativas em locais específicos (FANG; ZHANG, 2009). Para tais aplicações *in vivo* as nanopartículas precisam exibir altos valores de saturação magnética. Além disso, elas necessitam ser biocompatíveis e coloidalmente estáveis, para que não haja formação de agregados. As partículas superparamagnéticas são, preferencialmente, utilizadas devido ao fato de estas não reterem o magnetismo após a remoção do campo magnético (NAGY et al., 2008).

O revestimento das nanopartículas magnéticas (NPMs) utilizando-se diferentes materiais consiste em uma alternativa interessante para modificação das suas propriedades. Dependendo da propriedade e da sensibilidade ao campo magnético aplicado das NPMs, estes materiais podem ser utilizados como agentes de liberação controlada de drogas anti-câncer em regiões específicas do corpo, como um tumor (ZABLOTSKAYA et al., 2009). Dentro deste contexto, a síntese de ferrofluidos aquosos contendo ligantes biologicamente

ativos na sua superfície, é uma tarefa de grande interesse. Para aplicações *in vivo*, dextrana vem sendo amplamente utilizada como agente de revestimento, devido à sua biocompatibilidade (PRADHAN et al., 2007, YU et al., 2007), com o objetivo de aumentar o tempo de retenção de determinados compostos na circulação sanguínea. A dextrana pode, ainda, ser utilizada em suturas cirúrgicas, como expansora de volume do plasma sanguíneo e no tratamento de anemias tanto em seres humanos como em animais. Além disso, a associação de um polímero natural e biocompatível, tal como a dextrana, que possui grupos funcionais, permite a adsorção de algumas moléculas na superfície de nanopartículas magnéticas, como foi demonstrado por Mouaziz et al. (2009). Nesse trabalho, os autores descreveram a preparação de nanopartículas magnéticas complexadas com amino-dextrana, estudaram as suas propriedades coloidais e avaliaram, ainda, o uso deste material na extração de ácidos nucleicos. A representação esquemática da interação entre as partículas de óxido de ferro e as moléculas de amino-dextrana é mostrada na Figura 1.15. Yu et al. (2007) estudaram a biocompatibilidade de fluídos constituídos de partículas magnéticas revestidas com dextrana, assim como sua utilização *in vivo*. Análises *in vivo* da toxicidade do material foram realizadas em tecidos subcutâneos de ratos. Os autores observaram uma dosagem letal quando a concentração do fluído injetado foi igual a 4409.61 ± 514.93 mg/kg do animal, porém o material foi bem tolerado a concentrações inferiores a 3150 mg/kg. A infiltração do fluído magnético no tecido subcutâneo foi observada através da imagem por ressonância magnética (IRM), desaparecendo após 72 horas de ensaio. A partir destes resultados, foi possível concluir que as partículas magnéticas revestidas com dextrana foram bem toleradas, não causando distúrbios no organismo dos ratos. O uso deste material na concentração de ácido nucleico também foi avaliado e a captura de DNA plasmídico foi eficiente. Além disso, as reações de concentração de ácido nucleico não mostraram inibição das atividades enzimáticas dentro das condições experimentais investigadas.

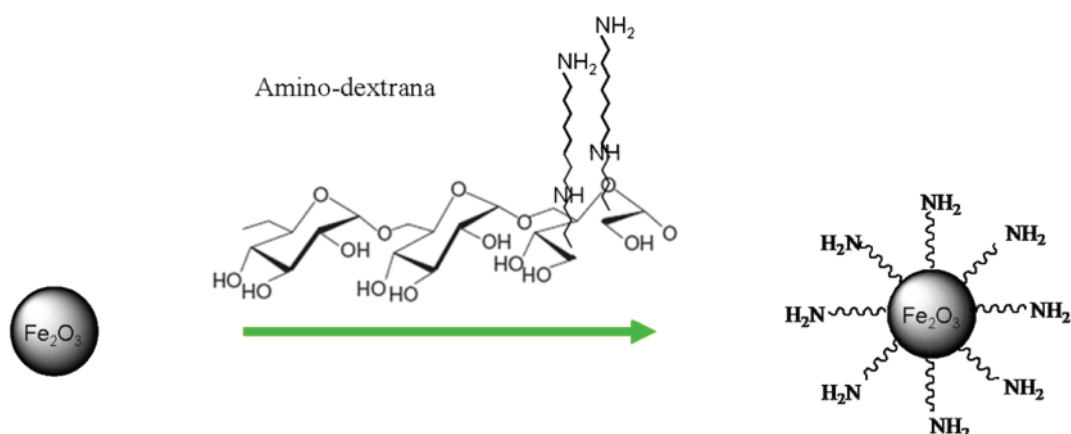


Figura 1.15. Representação esquemática das nanopartículas de óxido de ferro complexadas com amino-dextrana.

Outra promissora molécula que participa do metabolismo humano, desempenhando um papel fundamental na síntese dos hormônios, e que pode ser utilizada para revestimento de partículas magnéticas é o ácido oléico. Zablotskaya et al. (2009) estudaram a interação do ácido oléico com nanopartículas de óxido de ferro. As propriedades físico-químicas, o poder de magnetização, a concentração de magnetita e o diâmetro de partículas foram investigados. Nanopartículas de óxido de ferro com diâmetro médio de 11nm foram obtidas. Os autores também realizaram ensaios *in vitro* utilizando o material obtido e estudaram o efeito da razão óxido de ferro/ácido oléico sobre amostras de dois tipos de sarcomas (tumores malignos) de células: o fibrossarcoma de humanos, que se caracteriza pela proliferação de fibroblastos e miofibroblastos malignos que se encontram dispostos em fascículos e envolvidos por um estroma de colágeno denso; e o hepatoma (câncer de fígado) de ratos. Ensaios *in vivo* em sarcomas de células em ratos revelaram significativa ação antitumoral.

Em sistemas de liberação controlada de drogas, o objetivo principal consiste na prolongação do período de liberação do agente ativo. Neste contexto, o uso de campos magnéticos de frequência alternada (AMF) emerge rapidamente e consiste em uma importante área da pesquisa envolvendo sistemas de liberação controlada de princípios ativos (SATARKAR; HILT, 2008). Sabe-se que a aplicação de campos magnéticos oscilantes de baixa frequência promove deformações em partículas híbridas com propriedades magnéticas, resultando na liberação da substância ativa (LIU et al., 2008). O primeiro estudo do uso de AMF com o objetivo de promover liberação de ativos foi

descrito por Kost et al. (1987). Estes autores observaram uma liberação controlada de insulina a partir de compósitos constituídos de partículas magnéticas e copolímeros de etileno e acetato de vinila pela aplicação de um campo magnético oscilante de baixa frequência. Paoli et al. (2006) também demonstraram uma melhora na liberação de moléculas de dextrana a partir de nanocompósitos magnéticos à base de colágeno através da aplicação de um campo magnético de baixa frequência. Hu et al., 2007 descreveram a encapsulação de nanopartículas de óxido de ferro em hidrogéis à base de gelatina e observam uma eficiente liberação de algumas substâncias ativas a partir dos hidrogéis magnéticos através da aplicação de um campo magnético oscilante de alta frequência (50–100 kHz). No entanto, embora seja crescente o número de trabalhos utilizando campos magnéticos de frequência alternada em liberação controlada de princípios ativos, esta é uma área que necessita, ainda, ser bastante explorada.

Atualmente, a terapia de câncer consiste em uma importante área da pesquisa biomédica, com especial relevância voltada para o desenvolvimento de sistemas capazes de inibir o crescimento de tumores. Dentro deste contexto, o revestimento de nanopartículas magnéticas por polímeros tem sido extensivamente estudado e pode encontrar inúmeras aplicações na terapia de câncer, com o objetivo de aumentar a especificidade de algumas drogas em células cancerígenas (SCHERER; NETO, 2005). Em uma destas aplicações, a idéia é que os sistemas constituídos de nanopartículas magnéticas sejam, primeiramente, injetados no tumor e mantidos neste local durante um período de tempo até que se atinja a máxima intensidade do sinal em imagem por ressonância magnética (IRM). Neste caso, a quantidade de droga necessária é inferior àquela utilizada quando o ativo é disperso diretamente na corrente sanguínea. Após a aplicação da IRM para localização das partículas, remove-se, então, o campo magnético e dá-se início à liberação da droga, através da aplicação de estímulos que promovam a desestabilização das partículas poliméricas. Uma vez que a quantidade da droga liberada será pequena e localizada, os efeitos colaterais serão, praticamente, eliminados.

1.4.4. Incorporação de nanopartículas magnéticas em matrizes poliméricas sensíveis a estímulos

Existe um considerável interesse na preparação de sistemas que podem ser manipulados através da aplicação de estímulos externos, tais como estímulos térmicos,

elétricos ou campos magnéticos (KHAN, 2008). Neste sentido, alguns hidrogéis e nanopartículas que combinam materiais que respondem ao campo magnético e outros estímulos no mesmo sistema, vêm sendo desenvolvidos. A incorporação de nanopartículas de óxido de ferro em matrizes poliméricas consiste em interessante tarefa para a preparação de materiais híbridos, os quais possuem características promissoras para aplicações biomédicas.

O desenvolvimento de géis sensíveis a estímulos não é uma tarefa fácil devido às mudanças estruturais que este tipo de material pode sofrer, tais como mudanças no volume (intumescimento e desintumescimento), por exemplo, e, qualquer que seja a aplicação proposta, um controle efetivo do sistema é requerido.

O campo magnético é um dos estímulos mais práticos, em termos de controle. As partículas coloidais incorporadas aos géis poliméricos, as quais se caracterizam por apresentarem fortes interações com as cadeias poliméricas, respondem facilmente a campos magnéticos externos. Em geral, tais sistemas são caracterizados quanto ao tamanho e distribuição de tamanho de partículas, poder de magnetização, cristalinidade, eficiência de encapsulação, composição química, características morfológicas, etc. As técnicas frequentemente utilizadas incluem a microscopia eletrônica de varredura e transmissão (SEM e TEM), a difratometria de raios X, densidade de cargas na superfície, análises termo-gravimétricas (TG), infravermelho (FTIR), magnetometria, espalhamento de luz (LS), dentre outras.

Na busca de materiais mais adequados para liberação de drogas em terapia de câncer, deve-se sempre levar em consideração que estes sistemas visam a redução da quantidade de distribuição de uma droga citotóxica dentro do organismo e, conseqüentemente, a eliminação de efeitos colaterais e, ainda, a redução da dosagem requerida, devido à liberação localizada e, portanto, mais eficiente da droga (GUPA; HUNG, 1994; CHUNFU et al., 2004). No caso de sistemas constituídos de nanopartículas magnéticas e materiais poliméricos, quando estes são administrados de forma intravenosa, campos magnéticos externos de alta frequência são usados, inicialmente, para concentrar a droga em um local específico dentro do corpo. Este processo de orientação do sistema é baseado em forças competitivas exercidas pelo compartimento sanguíneo e por forças magnéticas geradas pelo campo aplicado, sobre as partículas. Quando as forças magnéticas excedem a velocidade do fluxo de sangue nas artérias (10 cm/s) ou capilares (0,05 cm/s), as partículas magnéticas se acumulam no alvo desejado e podem ser internalizadas pelas

células endoteliais dos tecidos. A droga pode ser então, liberada das partículas, penetrando, assim, nas células cancerígenas, via atividade enzimática ou através de mudanças nas condições fisiológicas, tais como pH e temperatura (ALEXIOU et al., 2000).

Em relação ao efeito da temperatura sobre sistemas magnéticos termo-sensíveis, um exemplo de mecanismo de liberação de agentes ativos é apresentado na Figura 1.16. Pode-se observar que em temperaturas inferiores à LCST, as partículas estão completamente estáveis, retendo o princípio ativo. No entanto, quando a temperatura de transição é atingida, o aumento das interações polímero-polímero ocasiona uma aproximação das cadeias poliméricas e faz com que estas comecem a precipitar, formando agregados e, conseqüentemente, fazendo com que o princípio ativo contido no interior seja, então, expelido.

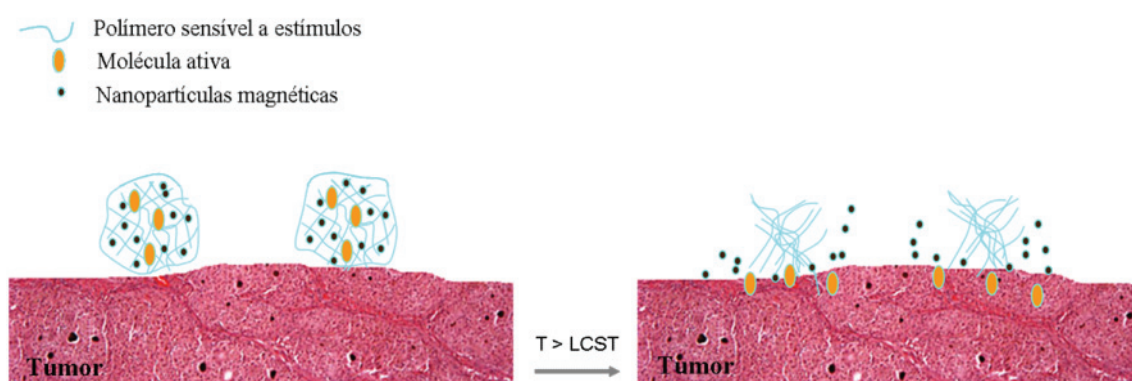


Figura 1.16. Representação esquemática do comportamento de partículas sensíveis à temperatura abaixo e acima da LCST.

Sistemas poliméricos magnéticos foram inicialmente utilizados para liberação de uma droga anti-câncer (DOX) em sarcomas de células na cauda de ratos (WIDDER et al., 1983) e para liberação de outras drogas citotóxicas em tumores no cérebro (PULFER et al., 1999). Recentemente, Gahawar et al. (2009) prepararam nanopartículas com estrutura do tipo núcleo-casca (*core-shell*), onde o núcleo era constituído de nanopartículas de óxido de ferro, enquanto a casca era constituída de polímeros termo-sensíveis, biocompatíveis e biodegradáveis, à base de hidroxipropil celulose. Os produtos foram analisados por difratometria de raios X e medidas de magnetização. O comportamento termo-sensível das partículas foi observado e a LCST do material obtido foi de aproximadamente 41 °C, cujo valor é o mesmo da hidroxipropil celulose pura.

Da mesma forma que os nanogéis e nanopartículas poliméricas, existem diferentes rotas para a preparação de materiais híbridos constituídos de nanopartículas magnéticas, dentre as quais as mais utilizadas são a polimerização em meio disperso e a utilização de polímeros pré-formados (ELAISSARI et al., 2009). A polimerização em meio disperso inclui a utilização de processos clássicos de polimerização, tais como a suspensão, emulsão, miniemulsão, microemulsão, emulsão ou miniemulsão inversa, bem como a utilização de múltiplas técnicas. A Figura 1.17 ilustra esquematicamente a obtenção de nanopartículas poliméricas magnéticas através da técnica de polimerização em miniemulsão. Nesta figura, as diferentes morfologias do material obtido também são apresentadas: (i) estrutura do tipo núcleo-casca bem definida com o núcleo formado por partículas de óxido de ferro e uma casca polimérica, (ii) nanopartículas magnéticas homogeneamente distribuídas no interior das matrizes poliméricas e (iii) deposição das nanopartículas de óxido de ferro sobre as partículas de polímero.

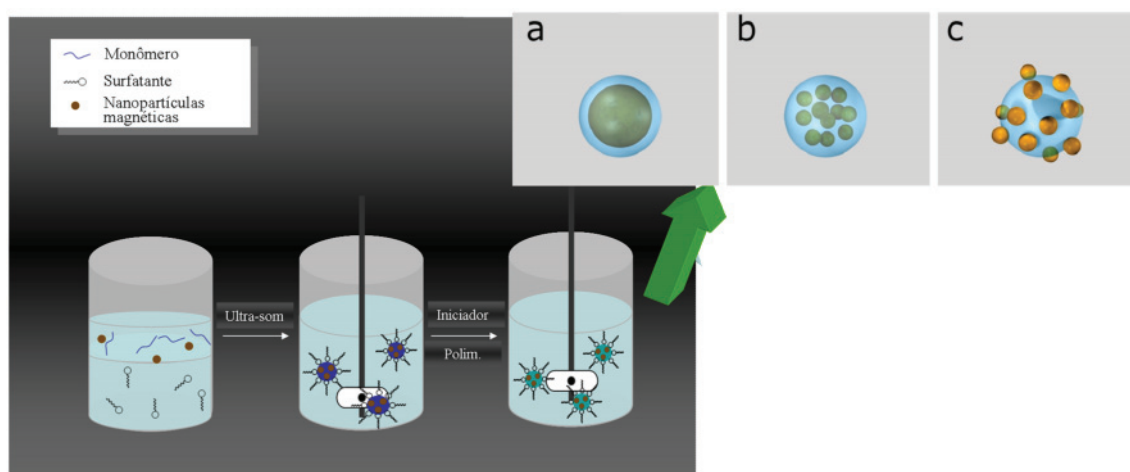


Figura 1.17. Representação esquemática do processo de polimerização em miniemulsão na presença de nanopartículas magnéticas e possíveis morfologias e estruturas das partículas magnéticas poliméricas. (a) Estrutura núcleo-casca, (b) distribuição das nanopartículas magnéticas dentro da matriz polimérica e (c) distribuição das nanopartículas de óxido de ferro na superfície das partículas poliméricas (adaptado de SCHILLERMANS; VAN NOSTRUM, 2006).

Wong et al. (2008) descreveram a síntese e caracterização de microgéis magnéticos à base de PNIPAAm. Para facilitar a deposição das nanopartículas de óxido de ferro sobre os microgéis, a superfície destes foi, inicialmente, modificada com polieletrólitos. A deposição das nanopartículas magnéticas sobre os microgéis através desta técnica mostrou-se satisfatória. O aquecimento indutivo acima da LCST revelou que o calor gerado pelas nanopartículas magnéticas foi suficiente para causar a compactação dos microgéis.

Algumas técnicas, como a polimerização em miniemulsão, por exemplo, apresentam limitações. Características como a distribuição heterogênea das nanopartículas magnéticas dentro das matrizes poliméricas, a presença de partículas de polímero puras e de nanopartículas de óxido de ferro sem polímero, limitam o uso de tais materiais.

O tempo de preparação de nanocompósitos magnéticos poliméricos depende tanto da técnica empregada quanto dos parâmetros de síntese, mas, em geral, os procedimentos duram, no mínimo, três horas. No entanto, Müller-Schulte e Schmitz-Rode (2006) descreveram a preparação destes materiais em apenas vinte minutos, utilizando a técnica de polimerização em suspensão inversa. A fase orgânica consistiu de uma mistura de surfatantes, composta por Span 60, Brij e Prisorine. Segundo estes autores, a chave para a obtenção destes materiais em poucos minutos consiste na avaliação prévia da composição e da viscosidade da fase orgânica. Este procedimento pode resultar não somente na aceleração do processo de síntese, como no aumento da eficiência de encapsulação dos colóides magnéticos e de outras substâncias como agentes ativos. Além disso, esta técnica, a qual permitiu a obtenção de materiais com estreita polidispersidade de tamanho de partículas, oferece, ainda, a possibilidade de preparo de partículas que podem ser usadas em aplicações biomédicas, tanto para fins de diagnóstico como terapêuticos.

Como mencionado anteriormente, nanocompósitos magnéticos poliméricos podem, também, ser obtidos a partir de polímeros pré-formados. Este método é classificado em quatro categorias: emulsão-evaporação, difusão do solvente, emulsificação-difusão e precipitação de sais (*salting-out*); e envolve, em geral, a preparação de emulsões nas quais o polímero é dissolvido em água ou solventes orgânicos, de acordo com sua hidrofilicidade ou hidrofobicidade. As nanopartículas de óxido de ferro são, então, dispersas na mesma fase que o polímero e esta mistura é emulsificada em uma fase contínua contendo um estabilizante, que pode ser outro polímero, tal como poli(álcool vinílico) (PVA), ou um surfatante não-iônico, tal como Pluronic®, no caso de

miniemulsões do tipo óleo em água (O/A). Hamoudeh e Fessi (2006) descreveram o uso do método de emulsão-evaporação para incorporação de nanopartículas magnéticas em poli(ϵ -caprolactona), utilizando poli(álcool vinílico) (PVA) como estabilizante. Neste método, a poli(ϵ -caprolactona) é dissolvida em uma fase orgânica. As nanopartículas magnéticas são, então, dispersas na mesma fase do polímero e esta mistura é emulsificada em uma solução aquosa contendo o estabilizante. Após a obtenção de uma emulsão estável, o solvente orgânico é evaporado através do aumento da temperatura, sob pressão reduzida, ou sob agitação contínua. Este material foi obtido visando sua aplicação como agente de contraste em IRM.

Outro método, incluindo a utilização de polímeros pré-formados para incorporação de nanopartículas magnéticas, consiste no método de difusão do solvente. Esta técnica consiste no uso de um solvente parcialmente miscível em água, como o acetato de etila, por exemplo. A solução contendo ambos, polímero e nanopartículas magnéticas é, então, emulsificada em uma solução aquosa contendo um agente estabilizante e, esta etapa é seguida pela diluição com um excesso de água para induzir a precipitação do polímero, dando origem a uma suspensão coloidal de nanoesferas. Dessa forma, a co-precipitação ou nanoprecipitação, também conhecida como nanodeposição do polímero pré-formado, é uma técnica simples, reprodutível e facilmente transponível para a produção de nanopartículas em grande escala (BRIGGER et al., 2002). Para a obtenção de nanocápsulas, um óleo e um tensoativo lipofílico são adicionados à fase orgânica da preparação. Após a formação das partículas, as suspensões são submetidas à evaporação para remoção do solvente orgânico e concentração até volume desejado (FESSI et al., 1989; AMMOURY et al., 1990; MONTASSER et al., 2000).

A Figura 1.18 representa esquematicamente um exemplo de obtenção de sistemas magnéticos poliméricos, através do método de co-precipitação, utilizando polímeros pré-formados. Neste caso, o polímero é constituído de segmentos de ácido acrílico, sensível ao pH, os quais possuem grupos carboxílicos capazes de estabilizar as partículas através da formação de cargas negativas na superfície destas, em pH acima do seu pK_a .

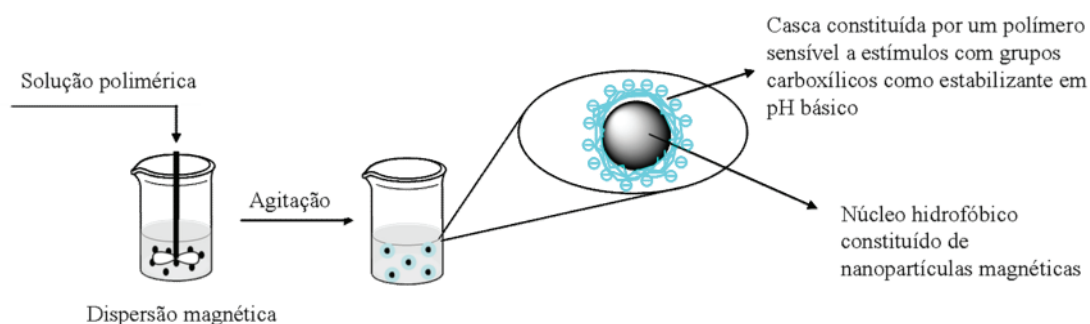


Figura 1.18. Representação esquemática da encapsulação de colóides magnéticos em polímeros pré-formados constituídos de AA, utilizando o método de nanoprecipitação.

Diferentes tipos de polímeros podem ser usados como agentes de revestimento de nanopartículas magnéticas. No entanto, a maioria destes materiais pode ser usada somente para aplicações *in vitro*, limitando, portanto, o uso destes sistemas. Para utilização destes sistemas nanoparticulados em aplicações biomédicas *in vivo* é necessário um conhecimento prévio das características fármaco-cinéticas do material, tais como velocidade de adsorção de drogas, biodistribuição, efeitos metabólicos, toxicidade e eficiência de permanência no alvo desejado. As aplicações *in vivo* destes materiais incluem, em geral, o seu uso como ferramentas de imagem para nanodiagnóstico *in vivo* e como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética (IRM) (HÄFELI, 2004). Além disso, estas nanopartículas podem ser usadas como agentes indutores de calor em hipertermia. Dentro deste contexto, Poli(*N*-vinylcaprolactama) (PNVCL) consiste em um polímero termo-sensível bastante promissor como agente de revestimento de nanopartículas magnéticas, devido, principalmente, à sua biocompatibilidade (LESLIE-PELECKY; LABHASETWAR; KRAUS, 2006). Pich et al. (2004) descreveram a preparação de microgéis híbridos termo-sensíveis à base de PNVCL, com nanopartículas magnéticas adsorvidas em sua superfície. Os microgéis foram, inicialmente, preparados pelo método de emulsão livre de surfatante e copolimerização de metacrilato de acetoacetoxietila (AAEM) e *N*-vinylcaprolactama (NVCL) em água usando diidrocloreto de 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida) (AAPH) como iniciador. A termo-sensibilidade dos microgéis foi confirmada através de análises de espalhamento de luz. Em seguida, os autores realizaram a deposição das nanopartículas de óxido de ferro sobre estes microgéis, através da coprecipitação do óxido de ferro, utilizando soluções dos cloretos férrico e ferroso e uma solução concentrada de hidróxido de amônio (NH₄OH), na presença dos microgéis

sensíveis. Este método levou à obtenção de materiais compósitos os quais combinam sensibilidade à temperatura e propriedades magnéticas. A influência da concentração de magnetita no tamanho, na morfologia e nas características de intumescimento e desintumescimento dos microgéis, foi investigada. Os autores observaram que a estabilidade dos microgéis híbridos não foi influenciada pela concentração de magnetita e que as partículas foram estabilizadas estericamente em meio aquoso pela casca rica em segmentos de NVCL.

1.5. Aplicações das nanopartículas magnéticas e nanocompósitos magnéticos sensíveis a estímulos

O primeiro trabalho descrevendo a aplicação biomédica de ferrofluidos foi publicado na década de 60, quando Meyers et al. (1963) desenvolveram um método experimental de obtenção de partículas magnéticas para uso como agentes de contraste *in vivo*. Quatro anos mais tarde, uma sonda magnética para tratamento de trombose estereotóxica causada por aneurisma cerebral foi proposta por Alksne et al. (1967). Assim, uma série de acontecimentos notáveis durante a evolução das aplicações biomédicas de ferrofluidos foi se sucedendo no sentido da utilização *in vitro* e *in vivo* destes materiais.

Atualmente, as nanopartículas magnéticas podem ser utilizadas em uma ampla variedade de aplicações biomédicas, dentre as quais as mais promissoras estão apresentadas na Figura 1.19. Dentre as aplicações biomédicas *in vivo*, parece conveniente destacar a imagem por ressonância magnética (IRM) e a detecção de câncer.

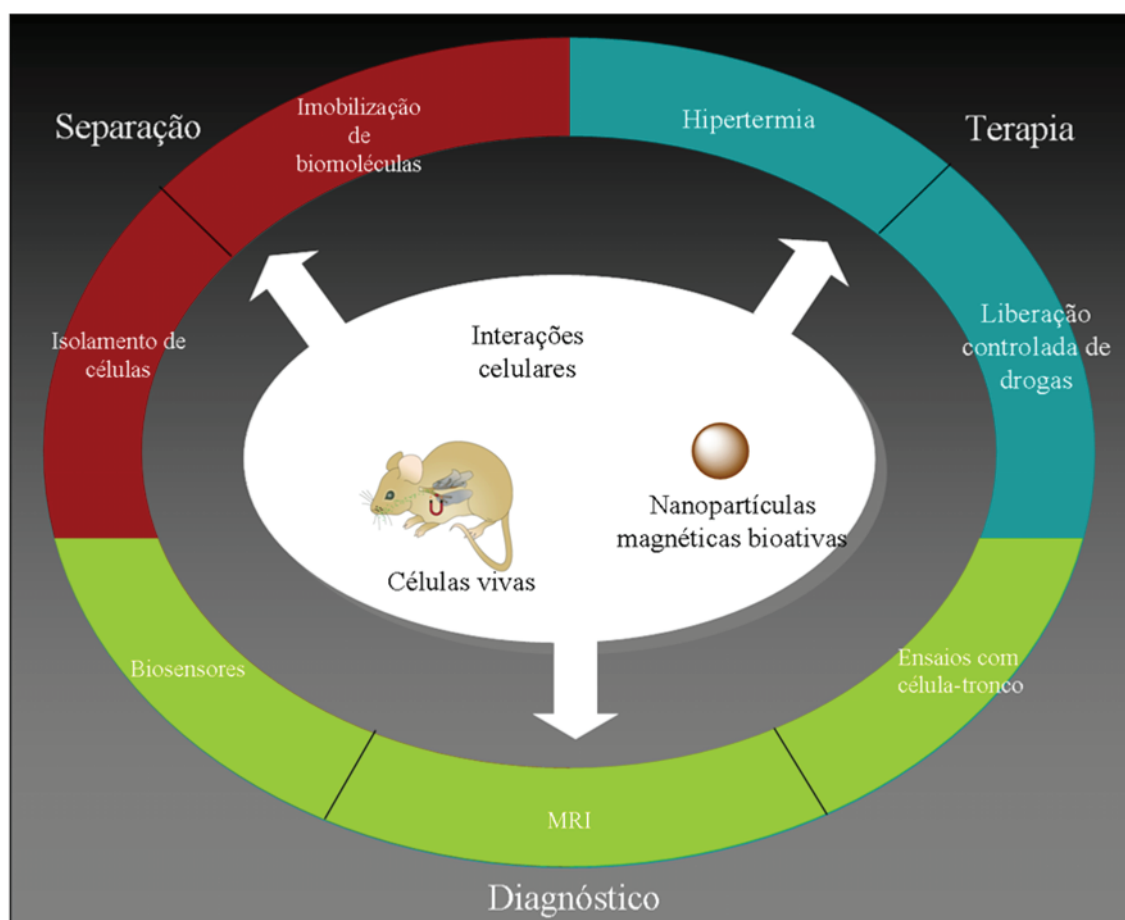


Figura 1.19. Principais aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas (adaptado de DOBSON, 2006).

No contexto das aplicações biomédicas *in vivo*, um sistema magnético ideal, biocompatível e sensível a estímulos, é aquele que possibilita o monitoramento não evasivo da cinética de biodistribuição do princípio ativo no organismo usando IRM. Em seguida, dá-se início ao tratamento da doença, o qual pode ser feito através de hipertermia e da liberação controlada e localizada de drogas, utilizando a propriedade de sensibilidade do polímero, preservando, assim, os tecidos e células saudáveis. A Figura 1.20 ilustra a ação de um sistema magnético ideal para aplicações biomédicas *in vivo*.

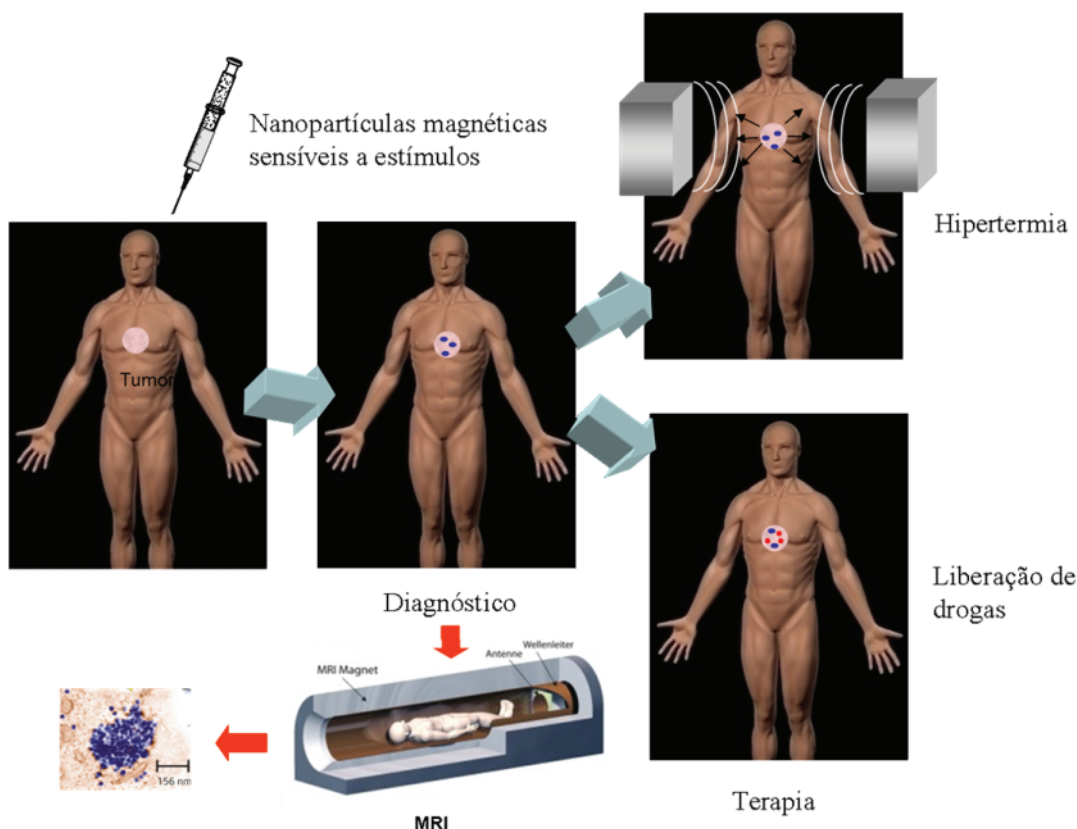


Figura 1.20. Representação esquemática da utilização de sistemas magnéticos sensíveis a estímulos para monitoramento dentro do organismo, seguido da ação terapêutica, seja por hipertermia ou por liberação controlada do agente ativo.

Atualmente, o câncer é uma das maiores causas de mortes no mundo, matando cerca de sete milhões de indivíduos a cada ano, o que corresponde a aproximadamente 12,5% das mortes mundiais (BREAST CANCER. Disponível em WHO website: http://en.wikipedia.org/wiki:Breast_cancer. Acesso em: 24/04/2010). Neste sentido, diferentes estratégias vêm sendo propostas para terapia de câncer, incluindo métodos separados ou combinados de quimioterapia e radioterapia. A radioterapia pode ser realizada de diferentes formas: (1) via radiação externa, (2) embolização arterial, (3) radiometabólica, (4) imuno-radioterapia e (5) braquiterapia (CHAKAROVA et al., 2005; ALEVIZAKI et al., 2006; RIVERA et al., 2006; ANDRATSCHKE et al., 2007; HACKER et al., 2007). Infelizmente, a radioterapia externa destrói os tecidos vizinhos saudáveis e provoca vários efeitos colaterais e complicações (BUONO et al., 2007). No entanto, recentes estudos têm sido realizados no sentido de tratar somente o tumor liberando a radioatividade de forma localizada. Visando a redução da morte de ratos submetidos à

radioterapia convencional e a intensificação dos efeitos em tumores malignos, a ação restrita da radiação somente na área do tumor é altamente desejável (HAMOUDEH et al., 2007). Dentro deste contexto, as pesquisas vêm avançando no sentido da utilização de nanopartículas magnéticas.

Novos tipos de terapia anti-câncer, as quais diminuem consideravelmente a ocorrência de efeitos colaterais vêm sendo cada vez mais pesquisados na área da biomedicina. O tamanho reduzido das nanopartículas, associado com outras propriedades, pode ser bastante útil em oncologia e, particularmente, em IRM. Nos últimos anos tem havido uma tendência no desenvolvimento de sistemas que entreguem as drogas nas células cancerosas de forma ativa ao invés da passiva (acúmulo no tumor devido ao aumento da permeabilidade e capacidade de retenção destes). O desenvolvimento de sistemas multifuncionais, contendo as nanopartículas magnéticas, como agente de contraste, e o agente terapêutico, além de um ligante (anticorpo) que reconhece de forma específica as células do câncer, aumenta a especificidade do tratamento e, consequentemente, reduz os efeitos colaterais.

1.5.1. Imagem por ressonância magnética (IRM)

Desenvolvida por Lauterbur (1973), a imagem por ressonância magnética (IRM) vem sendo amplamente utilizada em hospitais, em todo o mundo, desde a sua aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) no ano de 1985 (YAN; ZHUO, 2001). Durante as últimas décadas, muitas pesquisas vêm sendo realizadas e grande progresso está sendo atingido na área farmacêutica para a síntese de sistemas sofisticados para aplicações biomédicas como novos agentes para liberação controlada de drogas (YANUL et al., 2001). Estes sistemas incluem, em geral, nanomateriais, biocompatíveis e capazes de se degradarem em fragmentos que podem ser facilmente eliminados após a liberação *in vivo* do princípio ativo. Um dos principais objetivos do uso de tais materiais consiste na liberação controlada e localizada de agentes ativos e, dessa forma, a incorporação de agentes de contraste com propriedades superparamagnéticas para IRM vem sendo amplamente estudada. Agentes de contraste em IRM constituem uma classe de substâncias farmacêuticas que melhoram o contraste entre tecidos normais e doentes e indicam o estado funcional do tecido ou órgão ou, ainda, do fluxo sanguíneo, após a sua administração, através da velocidade de relaxação dos prótons da água nos tecidos aos

quais os agentes se acumulam (YAN et al., 2007). Substâncias superparamagnéticas vêm sendo utilizadas como agentes de contraste em IRM devido à suscetibilidade magnética positiva, quando magnetizados na presença de um campo magnético externo (NELSON et al., 1996).

Em IRM, a imagem é resultado da diferença entre as intensidades de sinais que cada tecido produz em resposta a uma sequência particular de pulsos de radiofrequência (RF) aplicada. Esta resposta é dependente da densidade de prótons e dos tempos de relaxação magnética (HÄFELI, 1997). Uma vez que a densidade de prótons de tecidos macios é extremamente baixa através do corpo, o contraste passa a ser basicamente determinado através dos tempos de relaxação, os quais dependem da estrutura química e molecular do tecido (KOENIG, 1996). O contraste em tecidos pode ser manipulado, portanto, através do ajuste dos parâmetros instrumentais incluindo a sequência dos pulsos aplicados. A detecção do ferro pode ser melhorada pela escolha de uma sequência que aumente a sensibilidade e os efeitos de relaxamento.

Em geral, agentes de contraste em tecidos e órgãos específicos são constituídos de dois componentes: uma camada magnética, capaz de alterar a intensidade de sinal nas imagens de IRM e um grupo orientador, a qual possui afinidade por um tipo específico de célula (YAN et al., 2007). Após satisfatórios experimentos *in vitro*, Hu et al. (2006) demonstraram a aplicação *in vivo* de nanopartículas magnéticas revestidas por uma matriz constituída de poli(etileno glicol) (PEG). Um anti-antígeno carcino-embrionário (CEA) para detecção de tumores de colo foi incorporado ao sistema, o qual foi, então, injetado em regiões da coxa de ratos. A Figura 1.21 ilustra o uso de sistemas magnéticos biocompatíveis em IRM e mostra, ainda, os estágios de intensidade de sinal após a injeção do sistema magnético.

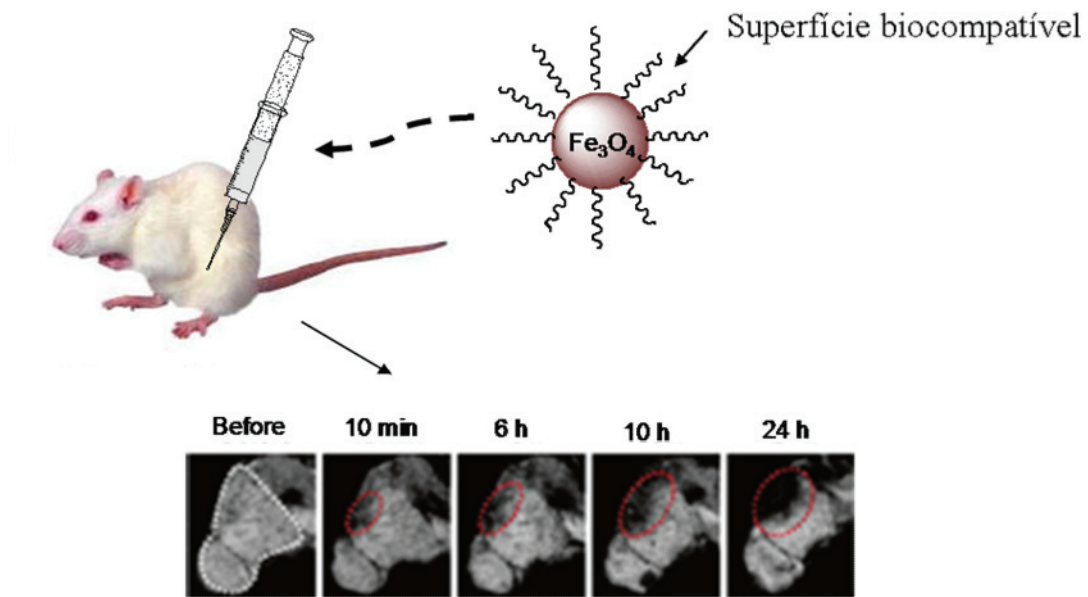


Figura 1.21. Representação esquemática da detecção *in vivo* de sistemas constituídos de nanopartículas magnéticas usando IRM (adaptado de HU et al., 2006).

Pode-se observar, através da Figura 1.21, que uma região do tumor tornou-se escura dez minutos após a injeção do sistema contendo CEA. A intensidade do sinal aumentou com o tempo, atingindo um pico máximo cerca de vinte e quatro horas após a injeção.

Algumas nanopartículas magnéticas já estão sendo testadas em terapias químicas em humanos. A Figura 1.22 mostra imagens de cortes transversais dos cérebros de pacientes que foram tratados com o fluido magnético MFL AS (MagForce Nanotechnologies AG, Berlim, Alemanha), medicamento liberado para estudos e sujeito a órgãos médicos reguladores da Europa. O fluido consiste de uma suspensão de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro revestidas com aminosilanos, com 15 nm de diâmetro. As nanopartículas geram calor quando submetidas a um campo magnético pelo processo de relaxação de Brownian e Néel, induzindo a formação de necrose com subsequente infiltração e ativação dos fagócitos (LANDEGHEM et al., 2009).

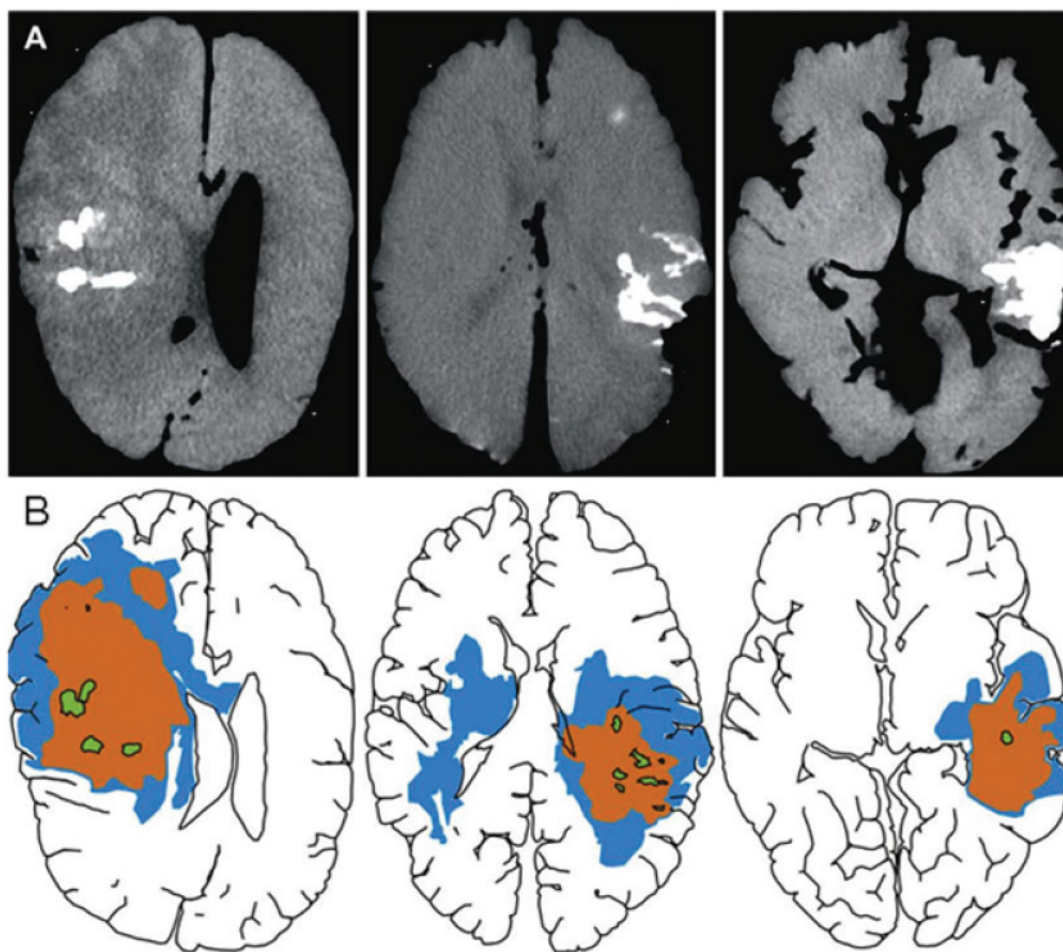


Figura 1.22. (A) Imagem do corte horizontal do cérebro de três pacientes com glioblastoma multiforme (GBM). (B) Ilustração: a demarcação azul indica GBMs; laranja indica área geográfica necrosada no tumor; verde indica áreas com agregados de nanopartículas magnéticas (LANDEGHEM et al., 2009).

Nanopartículas magnéticas vêm sendo, também, utilizadas como agentes de contraste no sistema reticulo endotelial (RES). As aplicações clínicas incluem melhora da imagem do fígado, baço e linfonodos. O mapeamento *in vivo* de grupos receptores de asialoglicoproteína em hepatócitos tem sido possível através da incorporação de substâncias como a arabinogalactana ou a asialofetaina às partículas de óxido de ferro (GROMAN; REINHARDT, 2000). Quando algumas regiões específicas não são diretamente acessíveis a partir da corrente sanguínea, nanopartículas magnéticas são requeridas para penetrar através do endotélio. Para isto, o tamanho reduzido e tempo de meia-vida longo são fatores de grande relevância. Aplicações como mapeamento celular e

transporte *in vivo* estão relacionadas com o uso de IRM no estudo dinâmico celular e, para este propósito, a técnica não deve ser evasiva, ou seja, agressiva ao organismo.

A barreira hematoencefálica ou *blood-brain barrier* (bbb) pode ser definida como o mecanismo seletivo das estruturas no revestimento dos vasos sanguíneos, que evita que muitos compostos saiam do sangue e entrem no cérebro. Um mecanismo similar previne que compostos saiam do sangue e entrem em partes dos olhos e dos ouvidos (WEINSTEIN et al., 2010). O mapeamento *in vivo* de algumas lesões cerebrais usando nanopartículas magnéticas pode ser uma alternativa, desde que estes sistemas sejam capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica, a qual representa um obstáculo para a maioria das drogas, incluindo antibióticos, agentes antineoplásicos e uma variedade de princípios ativos com ação no sistema nervoso central (SNC), especialmente neuropeptídeos (NEUWELT et al., 2008). Uma das alternativas para superar esta barreira consiste na entrega destes tipos de drogas utilizando sistemas nanoparticulados. A utilidade das nanopartículas no tratamento de tumores cerebrais agressivos já foi previamente descrita por Leslie-Pelecky; Labhasetwar; Kraus et al. (2006).

1.5.2. Liberação controlada de princípios ativos

Convencionalmente, agentes ativos são administrados por um sistema periódico. Em tratamentos médicos, drogas são introduzidas em intervalos pequenos de tempo, através da ingestão de pílulas, líquidos ou por injeção. Estas drogas circulam por toda parte do corpo e a concentração do agente ativo aumenta até altos níveis declinando, então, devido à excreção e/ou conversão metabólica. Assim, para conseguir um efeito mais prolongado, altas doses são necessárias, podendo-se ultrapassar o nível toxicológico do princípio ativo.

Dessa forma, a incorporação de um agente ativo em estruturas poliméricas com propriedades magnéticas consiste em tarefa de grande interesse para sistemas de liberação controlada de drogas. Cada droga possui uma faixa de concentração que promove ótimo efeito terapêutico. Quando a concentração da droga é superior ou inferior a esta faixa, esta pode causar efeitos tóxicos ou tornar-se terapeuticamente ineficaz. Portanto, a liberação da droga de uma estrutura polimérica torna-se desejável, pois esta promove liberação de maneira controlada e mantém a concentração do agente ativo dentro da faixa de efeito

ótimo. Além disso, sistemas de liberação controlada podem aumentar o conforto do paciente reduzindo a frequência da administração (WANG et al., 2006).

A liberação controlada de drogas apresenta grandes vantagens:

- Liberação localizada da droga para uma região particular do corpo;
- Prolongamento do tempo de liberação a uma velocidade constante;
- Conveniência de menor número de administrações;
- Redução dos efeitos colaterais, devido às doses não excederem níveis tóxicos;
- Facilidade de manipulação das drogas pela sua permanência nos órgãos-alvo em quantidades e tempo suficientes;
- Potencializarão da atividade por união de um ou mais tipos de drogas no mesmo polímero;
- Melhor interação com a parede celular bacteriana e viral;
- Menor toxicidade, dependendo do princípio ativo e do polímero;
- Aumento do conforto do paciente;

Uma vez que, utilizando sistemas de liberação controlada, a liberação é feita de forma localizada, isso significa uma redução global da dosagem da droga em cerca de 50 - 80%. A liberação localizada também reduz a variação farmaco-cinética em diferentes pacientes, após a administração oral ou intravenosa. A proteção do agente ativo até que ele atinja o local de interesse aumenta a aplicabilidade de alguns tipos de drogas, as quais possuem um tempo de meia-vida curto dentro do organismo.

O uso de nanopartículas em liberação controlada de agentes ativos teve início por volta de 1970, com o desenvolvimento de carreadores para vacinas e algumas drogas anti-câncer e são, atualmente, alvo de intenso estudo (ARRUEBO et al., 2009; HAMOUDEH; FESSI, 2006). Nanopartículas para liberação de drogas devem ser capazes de incorporar quantidade suficiente da droga e não podem ser rapidamente eliminadas da corrente sanguínea. Além disso, as propriedades magnéticas permitem a sua localização dentro do organismo e limitam, assim, a ação da droga a uma região particular.

A liberação do princípio ativo a partir de nanopartículas poliméricas magnéticas sensíveis a estímulos pode ser feita utilizando-se esta propriedade. A escolha cuidadosa dos princípios ativos que podem ser utilizados em determinado sistema é de fundamental importância para a estabilidade das partículas no organismo (LESLIE-PELECKY; LABHASETWAR; KRAUS, 2006). Agentes ativos, ionicamente ligados às matrizes poliméricas, possuem a vantagem de poderem desorver de seus respectivos carreadores

após um intervalo de tempo definido e difundir através da parede vascular para os tecidos. Esta difusão pode mudar, significativamente, a cinética de desorção do agente ativo (BERGEMANN et al., 1999). Como um exemplo disto, temos a desorção de uma droga utilizada em terapia de câncer, conhecida como Epirubicina, quimicamente adsorvida na superfície de partículas poliméricas, devido a uma variação das condições fisiológicas (pH e temperatura) (LÜBBE et al., 1999; 2001). O tempo de meia-vida equivalente à desorção da droga pode ser fixo e correspondente ao tempo necessário para orientação das partículas através da aplicação de um campo magnético.

Partículas magnéticas constituem, também, atrativos candidatos para liberação de altas dosagens de drogas anti-câncer na terapia intracavitária, que consiste na introdução de sistemas terapêuticos nas cavidades naturais do organismo, como o útero (GUPTA; HUNG, 1989). Existem alguns trabalhos na literatura os quais descrevem o uso de antraciclina, uma droga utilizada em quimioterapia, incorporada a micro e nanopartículas magnéticas. Este tipo de droga necessita ser liberada próximo ao tumor, se difundindo através das células malignas, para que o tratamento seja efetivo.

A liberação de fármacos diretamente nos tumores representa um aspecto importante a ser estudado, uma vez que substâncias antineoplásicas são tóxicas para ambas as células normais e tumorais, sendo a dose limitada pela tolerância tecidual normal. Além disso, a liberação de fármacos nos tumores não é uniforme, em decorrência da heterogeneidade da vascularização tumoral, que faz com que o tumor apresente regiões de necrose ou hemorrágicas, bem como regiões densamente irrigadas (BRIGGER et al., 2002). Assim, a resistência aos agentes antitumorais se deve não somente a mecanismos envolvendo alterações bioquímicas das células malignas, como mecanismos não celulares decorrentes da pobre vascularização em certas regiões do tumor, que podem reduzir o acesso do fármaco.

Apesar da heterogeneidade vascular dos tumores, o emprego de suspensões coloidais tem sido considerado uma estratégia promissora para contornar mecanismos de resistência celular e não celular, aumentar a seletividade de fármacos nas células tumorais e reduzir a sua toxicidade nas células normais. A permeabilidade vascular do tecido neoplásico é um fator fisiológico significativo, que deve ser considerado no desenvolvimento de sistemas de liberação em termos de sua capacidade de extravasar os vasos e alcançar o tecido alvo (BRIGGER et al., 2002).

Dessa forma, a associação do mapeamento *in vivo* com a liberação controlada de um agente ativo fornece ao cientista informações valiosas em relação à formulação de sistemas que possibilitem um conhecimento da biodistribuição, localização, bem como da cinética de liberação de drogas (DIMITORV et al., 2007).

Em resumo, um sistema combinado de liberação controlada de drogas consiste de um carreador que combine ambas as aplicações, diagnóstica e terapêutica. Dessa forma, a primeira etapa consiste na administração ou implantação de tal sistema, seguida da obtenção de informações em relação à localização e biodistribuição usando a técnica não evasiva de IRM. Após a obtenção destas informações começa-se então, a liberação do princípio ativo através do fornecimento de estímulos capazes de variar a conformação das cadeias poliméricas.

A detecção precoce do câncer é um dos principais objetivos do diagnóstico moderno, devido ao fato de esta ser um dos pré-requisitos para o sucesso na terapia de câncer. Um tratamento efetivo é baseado na localização exata do tumor e no seu estágio de desenvolvimento. Uma vez que as drogas anti-câncer, em geral, não agem somente nas células cancerígenas, o aumento da especificidade de sistemas contendo os agentes anti-câncer é de grande interesse em quimioterapia. As rotas de administração, biodistribuição e eliminação de agentes quimioterápicos podem ser modificadas empregando-se sistemas de liberação controlada de drogas, visando à otimização da terapia de câncer. A terapia de câncer convencional envolve a aplicação de cateteres, cirurgias, biópsia, quimioterapia e radioterapia. Os princípios ativos utilizados em terapia de câncer não são capazes de diferenciar entre células cancerígenas e células normais e isto leva à ocorrência de inúmeros efeitos indesejáveis. Consequentemente, a aplicação sistêmica destas drogas provoca, muitas vezes, efeitos colaterais graves em outros tecidos (por exemplo, supressão da medula óssea, cardiomiopatia e neurotoxicidade), os quais limitam, consideravelmente, a dosagem máxima da droga. Além disso, a rápida eliminação e a distribuição indesejável em órgãos normais levam à necessidade de administração de maiores quantidades da droga, o que, aumenta os efeitos colaterais tóxicos e não é viável economicamente.

Na busca de um sistema de liberação controlada de drogas mais eficiente em terapia de câncer, a quimioterapia magneticamente controlada começou a ser utilizada por volta de 1990 (GUPA; HUNG, 1994). Idealmente, tais materiais são constituídos em grande parte de drogas anti-câncer e são capazes de orientá-las para o órgão ou tecido cancerígeno e mantê-las neste local durante um determinado período de tempo, liberando o

princípio ativo de forma gradual (CHEN et al., 2008). Os principais objetivos deste método incluem a redução sistemática da quantidade de uma droga distribuída no organismo e, consequentemente, eliminação dos efeitos colaterais, devido a tratamento localizado e mais eficiente (CHUNFU et al., 2004).

Em resumo, a nanotecnologia pode oferecer uma alternativa menos evasiva, aumentando a expectativa e a qualidade de vida do indivíduo com câncer. O diâmetro das células humanas varia entre 10 e 20 μm e, o tamanho das organelas celulares, por sua vez, varia entre alguns nanômetros e algumas centenas de nanômetros. Dessa forma, nanomateriais podem interagir com biomoléculas na superfície celular e dentro das células de uma maneira não evasiva, mantendo intactas as propriedades bioquímicas destas células (KIM, 2003). Neste sentido, macromoléculas compostas de um polímero ligado a nanopartículas de óxido de ferro podem ser usadas como agentes de contraste e liberação controlada de substâncias ativas em quimioterapia. A biodistribuição destes sistemas em diferentes órgãos e tumores depende da sua composição química, da presença de substâncias ligantes, tais como anticorpos e do método de preparação utilizado, os quais influenciam no tamanho e nas características de superfície das partículas. Desse modo, existe uma grande diversidade de materiais que podem ser sintetizados e, consequentemente, um estudo prévio do sistema é sempre requerido com o objetivo de determinar o seu acúmulo no tumor e de escolher o tipo de material que melhor se adapta a cada aplicação.

1.5.3. Hipertermia

O termo hipertermia significa aumento da temperatura corporal. Este aumento pode ser causado por agentes externos (exposição ao sol ou locais de temperatura elevada) ou por agentes internos (reações do organismo). A aplicação da hipertermia, que proporciona um aumento de temperatura significativo (entre 5 a 8 °C), tem-se mostrado promissora na terapia de câncer (VASSEUR et al., 2006) e está sendo utilizada para intensificar a eficácia da quimioterapia e da radioterapia (GUEDES et al., 2005). A hipertermia induzida por partículas magnéticas, um dos tratamentos usados em terapia de câncer, significa a exposição de tecidos cancerígenos a campos magnéticos alternativos (GUPTA; GUPTA, 2005). A idéia da hipertermia tem sido reconhecida como uma modalidade terapêutica útil no tratamento de tumores malignos, levando à possibilidade de

morte das células cancerosas, não pela utilização de drogas, mas pelo uso de sistemas de aquecimento em nanoescala, cuja ação consiste basicamente no cozimento das células cancerígenas até a morte (GAZEAU et al., 2008). A hipertermia é sugerida como uma técnica não evasiva e não tóxica e está relacionada com a dissipação de energia quando um material ferromagnético é submetido a um campo externo variável (WHALTER et al., 2002).

Dentro deste contexto, métodos de hipertermia intracelular utilizando nanopartículas magnéticas (NPMs), nos quais as partículas de óxido de ferro são concentradas no tumor e a região é, então, aquecida, utilizando-se um campo magnético externo, visando atingir a temperatura hipertérmica (42-45 °C), vêm sendo desenvolvidos (FORTIN et al., 2008). Como mencionado anteriormente, quando as NPMs são injetadas próximas a um tumor, elas tendem a se acumular sobre a sua vasculatura desorganizada, aquecendo-o, assim, de maneira eficaz, em oposição ao tecido saudável circundante (BERRY, 2009). Além disso, se as NPMs são submetidas a um campo magnético, o calor será gerado devido à perda de histerese magnética. A quantidade de calor gerada depende da natureza do material magnético e de parâmetros do campo magnético. A injeção do material diretamente no interior do tumor, seguida pela exposição a um campo magnético alternado, tem mostrado ser capaz de induzir à sua regressão. As células cancerosas são destruídas a temperaturas superiores a 43 °C, enquanto que as células saudáveis sobrevivem a altas temperaturas (LIU et al., 2009).

O primeiro trabalho na literatura, descrevendo o uso de hipertemia, utilizando partículas magnéticas, em experimentos com animais surgiu na década de 80 (LUDERER et al., 1983). Já na década seguinte, (CHAN et al., 1993), utilizaram a hipertermia em culturas de células. Estes trabalhos visavam estudar o efeito terapêutico desta técnica em diversos tipos de tumores. Estudos recentes têm realçado o potencial das NPMs em alguns tipos de câncer humano, tais como o câncer de mama, onde nanopartículas de óxido de ferro, com diâmetros entre 10 e 30 nm foram aquecidas de forma eficaz (JIN e KANG, 2007). Outro trabalho recente foi publicado por Johannsen et al. (2007), que mostrou as primeiras experiências clínicas envolvendo o uso de NPMs e hipertermia no tratamento do câncer de próstata. Wust (2006) estudou o efeito da associação da hipertermia com NPMs e a sua tolerância no tratamento de tumores intestinais.

Capítulo 2

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

O monômero utilizado foi a *N*-vinilcaprolactama (NVCL) (98%, Aldrich). Os solventes utilizados foram: 1,4-dioxano (99,8%, Aldrich), etanol (98%, Vetec), isopropanol (99,5% Cromoline), *n*-hexadecano (99%, Acros), ciclohexano (99%, Synth), etanol (99,9%, Synth), Clorofórmio (99%, Acros) e clorofórmio deuterado (99,8%, Aldrich). Como iniciadores foram utilizados o 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN) (grau industrial, cedido gentilmente pela BASF), persulfato de potássio (KPS) (99%, Acros), dihidrocloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (V50) (99%, Aldrich) e 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (ABAP) (99%, Aldrich). Ácido 3-mercaptopropiônico (99%, Aldrich), *N,N'*-meliteno-bis-acrilamida (MBA) (99,8%, Aldrich) e Monooleato de sorbitano (Span 80) (99%, Acros) foram utilizados como recebidos. Foram utilizados ainda trioxano (99%, Aldrich), e brometo de tetrabutílamônio (99%, Aldrich). Nas microscopias eletrônicas de transmissão, uma solução a 1% (g/L) de ácido fosfotúngstico foi utilizada como agente de contraste. Nas sínteses dos nanogéis à base de PNVCL com encapsulação das partículas magnéticas utilizou-se ferrofluido complexado com dextrana (MOUAZIZ et al., 2009).

A Figura 2.1 apresenta a estrutura química dos principais reagentes utilizados e neste trabalho.

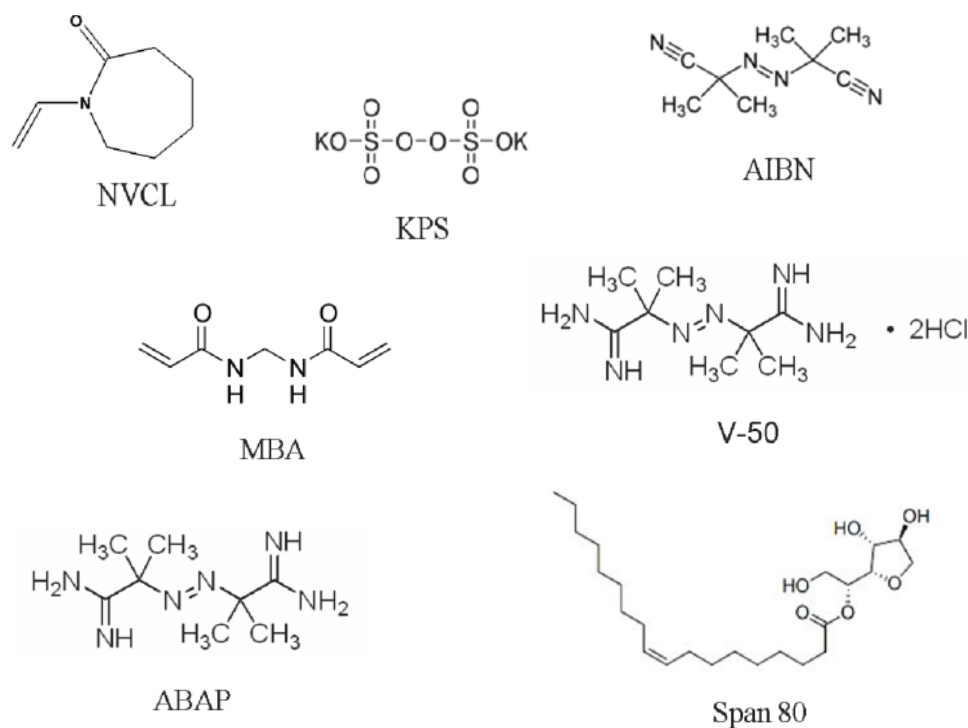


Figura 2.1 Estrutura química dos principais reagentes utilizados neste trabalho.

2.2. Métodos

2.2.1. Purificação da *N*-vinilcaprolactama (NVCL)

A NVCL foi purificada por destilação à vácuo na temperatura de 120°C. A Figura 2.1 ilustra o espectro de RMN ^1H da NVCL, cujos sinais referentes a cada próton da molécula são: δ 1,6 ppm, δ 2,6 ppm e δ 3,6 ppm, dupletos referentes aos grupos CH_2 do anel lactama; δ 4,4 ppm e δ 7,2 ppm, duplo-dupletos referentes aos prótons dos carbonos alfa e beta do grupo vinílico.

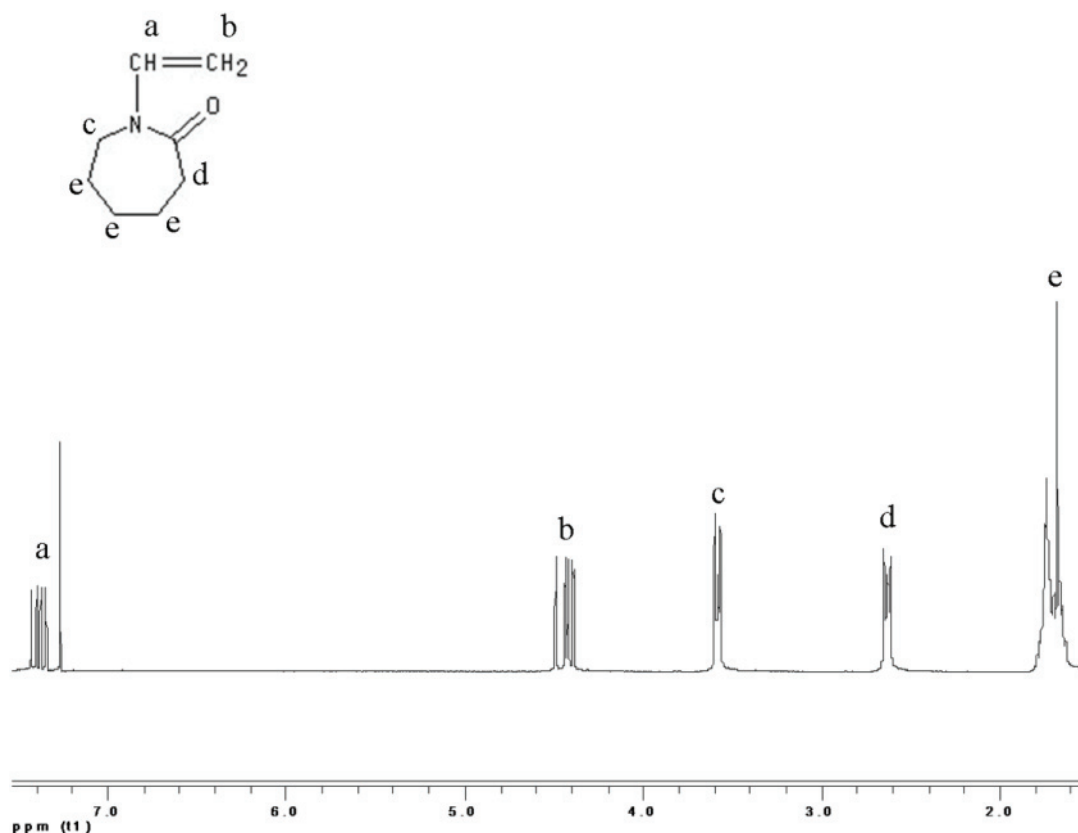


Figura 2.2. Espectro de RMN ^1H da NVCL purificada por destilação a vácuo.

2.2.2. Purificação do ácido acrílico (AA)

O AA foi purificado por destilação à vácuo na temperatura de 70°C.

2.2.3. Purificação do 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN)

O AIBN foi purificado por recristalização em etanol absoluto, de acordo com a seguinte metodologia: 7 g de AIBN foram dissolvidos em 70 mL de etanol absoluto e colocados sob agitação e refluxo por 30 minutos a uma temperatura de 45°C, em seguida a solução foi resfriada e após 1 hora, os cristais foram filtrados em filtro de vidro sinterizado (Porosidade 0) e secos sob vácuo durante 11 horas a temperatura ambiente.

2.2.4. Secagem do 1,4-dioxano

O 1,4-dioxano foi primeiramente deixado sob refluxo na presença de hidreto de lítio e alumínio (AlLiH_4) por 30 minutos e posteriormente destilado, ainda na presença deste hidreto, para remoção da água.

2.2.5. Síntese do nanogéis à base de poli(NVCL-*co*-AA)

Todas as polimerizações foram realizadas em um reator encamisado com capacidade para 200 mL, sob atmosfera de N_2 . A massa de NVCL utilizada foi mantida constante e igual a 3,0792 g durante todo o estudo. Quantidades apropriadas de AA, SDS e MBA foram então pesadas de acordo com a composição desejada. Em seguida, NVCL, AA ou SDS e MBA, foram solubilizados em 190 mL de água deionizada com agitação magnética por cerca de 20 minutos, formando uma solução totalmente homogênea. Nas reações tamponadas 0,2 g de bicarbonato de sódio, foram também solubilizados nessa mistura para a obtenção de pH 5,0. Esta solução foi transferida para o reator de 200 mL sob agitação mecânica de 250 rpm, e durante 15 minutos, borbulhou-se nitrogênio. Depois de decorrido o tempo de degaseificação, o meio reacional foi aquecido utilizando-se um banho termostático até a temperatura de 70 °C. Separadamente, quantidades apropriadas de KPS foram solubilizadas em 10 mL de água deionizada. Ao se atingir 70°C, aguardou-se por 5 minutos para que todo o meio reacional atingisse a temperatura desejada, e então, foi injetada a solução de iniciador para dar início à polimerização. O início da reação pôde ser verificado pela turbidez do meio.

Para a avaliação efeito dos parâmetros de síntese nas propriedades do nanogéis, as reações foram realizadas sob as mesmas condições reacionais, variando-se somente o parâmetro em questão. Todas as reações foram conduzidas sob fluxo de nitrogênio e agitação mecânica de 250 rpm por 4 horas. Depois de decorrido o tempo de polimerização o nanogel foi resfriado à temperatura ambiente, centrifugado a 26000 rpm por 1 hora, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado redisperso em água para ser novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido três vezes e uma parte foi então redispersa em água deionizada, para as análises de diâmetro de partículas (espalhamento de luz), TEM e outra parte foi seca a temperatura ambiente, para as análises de FTIR.

2.2.6. Caracterizações dos nanogéis à base de poli(NVCL-*co*-AA) obtidos via polimerização por precipitação

2.2.6.1. Determinação do diâmetro de partículas

As medidas de diâmetro de partícula (DP) dos nanogéis à base de poli(NVCL-*co*-AA) foram realizadas por espalhamento de luz em um equipamento da marca Malvern, modelo Zetasizer 1000, locado no Laboratório de Polímeros da EEL/USP. Estas medidas foram realizadas após a redispersão dos nanogéis em água deionizada.

2.2.6.2. Sensibilidade à temperatura

A sensibilidade térmica dos nanogéis também foi estudada através de análises de espalhamento de luz, obtendo-se medidas de DP em função da temperatura, a qual variou entre 25 e 70°C, com medidas sendo feitas em intervalos de 2,5°C. Entre cada medida, utilizou-se um tempo de estabilização das amostras à temperatura desejada equivalente a dez minutos.

2.2.6.3. Sensibilidade ao pH

Da mesma forma que a sensibilidade térmica, a sensibilidade ao pH foi verificada por espalhamento de luz através da obtenção de DP em diferentes temperaturas e pH's (4,0; 6,5 e 10,0).

2.2.6.4. Determinação qualitativa da composição química dos copolímeros

A composição química dos nanogéis a base de poli(NVCL-*co*-AA) sintetizados com diferentes quantidades iniciais de AA foram obtidas de forma qualitativa, analisando-se os espectros de infravermelho (FTIR). O material analisado estava na forma sólida e livre de umidade. As análises de FTIR foram conduzidas, utilizando-se pastilhas de KBr, em um aparelho da marca Perkin Elmer modelo Spectrum GX, locado no laboratório de infravermelho do Departamento de Biotecnologia (LOT).

2.2.6.5. Morfologia

Os nanogéis foram caracterizados quanto à morfologia através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Estas análises foram realizadas em um equipamento da marca Philips, modelo Tecnai 10, operado a 80kV, locado no Centro de Microscopia do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo.

2.2.7. Síntese de nanogéis de PNVCL via polimerização em miniemulsão inversa

Em polimerizações em miniemulsão, uma característica importante a ser considerada é a solubilidade do monômero na fase dispersa e na fase contínua. Em outras palavras, o coeficiente de partição é uma medida diferencial da solubilidade de uma substância entre dois solventes imiscíveis. Dentro deste contexto, o conhecimento prévio do coeficiente de partição da NVCL na mistura de água e *n*-hexadecano é de fundamental importância para a escolha dos parâmetros de síntese.

2.2.7.1. Determinação da CMC do Span 80 em *n*-hexadecano

A CMC do Span 80 em *n*-hexadecano foi determinada através de medidas de tensão interfacial realizadas a 25 °C, entre misturas de água e *n*-hexadecano contendo diferentes concentrações de Span 80, variando entre 0 e 20 % em massa. Inicialmente, a quantidade desejada de Span 80 foi dissolvida no *n*-hexadecano e esta solução foi introduzida na seringa do equipamento e gotejada em água. O valor de tensão interfacial foi, então, obtido, da primeira gota que se formou do solvente contendo o surfatante na água. Estas medidas foram realizadas em um tensiômetro da marca Kruss modelo K12, locado no Laboratoire d'Automatique et Génie des Procédés (LAGEP) da Université Claude Bernard, em Lyon, França.

2.2.7.2. Coeficiente de partição da NVCL entre água e *n*-hexadecano

Os coeficientes de partição foram determinados experimentalmente utilizando-se cromatografia gasosa. Primeiramente, água (1 g) e *n*-hexadecano (8 g) foram misturados.

Diferentes quantidades de NVCL foram pesadas e adicionadas à mistura água/*n*-hexadecano, a qual foi mantida sob agitação durante uma hora e sob temperatura controlada (25 e 70 °C). Após este período, as emulsões foram colocadas em um funil de separação, deixadas sob repouso até completa separação de fases. A fase aquosa foi, então, removida e a concentração de monômero foi determinada por cromatografia gasosa. A concentração do monômero em *n*-hexadecano foi determinada por diferença. Dessa forma, o coeficiente de partição da NVCL, $K_{M_{NVCL}}$, foi definido como a razão entre a concentração de NVCL na fase aquosa ($[M_{NVCL}]_a$) e a concentração de NVCL na fase orgânica ($[M_{NVCL}]_{HD}$), segundo a equação 2.3:

$$K_{M_{NVCL}} = \frac{[M_{NVCL}]_a}{[M_{NVCL}]_{HD}} \quad \text{Equação 2.3}$$

2.2.7.3. Síntese dos nanogéis termo-sensíveis

As polymerizações da NVCL utilizando-se o método de miniemulsão inversa foram realizadas em um reator encamisado, com capacidade para 50 mL a 70 °C. Primeiramente, quantidades apropriadas de NVCL (100 mg) e MBA (8 mg) foram dissolvidas em uma solução de NaCl (50 mg) em água deionizada (3 ou 8 g). NaCl foi adicionado com o objetivo de manter a estabilidade das gotas de monômero após agitação. A solução monomérica foi, então, adicionada a uma solução de Span 80 em *n*-hexadecano, variando-se a quantidade do surfatante entre 3 e 8 % em massa, em relação à fase contínua. A mistura foi mantida sob agitação mecânica (500 rpm) durante uma hora. Após esse período, a miniemulsão foi preparada usando um ultra-som Biolock Scientific, modelo 75042, com 500 watts de potência, 90% de amplitude, durante cinco minutos. O meio reacional foi então aquecido a 70°C e o iniciador, KPS (10 mg), foi adicionado. Para assegurar a conversão total do monômero, a reação foi realizada durante três horas.

2.2.7.4. Purificação dos nanogéis de PNVCL

Após o término das reações, as dispersões dos nanogéis termo-sensíveis foram lavadas com 50 mL de clorofórmio e, em seguida, o solvente foi evaporado no evaporador

rotativo da marca Fisatom, modelo 802. Este procedimento foi repetido três vezes, visando à remoção completa da fase contínua.

2.2.8. Caracterização dos nanogéis de PNVCL obtidos via polimerização em miniemulsão inversa

2.2.8.1. Cinética de polimerização em miniemulsão

A conversão da NVCL durante as polimerizações em miniemulsão foi obtida por cromatografia gasosa em um cromatógrafo marca Agilent, modelo 4890D (detector FID e coluna tipo ID Rtx-624 de 30 m X 0.32 mm). Durante a polimerização, amostras do meio reacional foram retiradas, colocadas imediatamente em um banho de gelo e submetidas às análises. Isopropanol foi utilizado como padrão externo para construção da curva de calibração.

2.2.8.2. Determinação do tamanho de partículas e do potencial zeta

Neste tipo de caracterização foi utilizado um equipamento da marca Malvern modelo Zetasizer 1000, locado no Laboratório de Polímeros da EEL/USP e Malvern Zeta Sizer V510, locado no Laboratoire d'Automatique et Génie des Procédés (LAGEP), da Universidade Claude Bernard, Lyon 1 (Lyon – França). Para o acompanhamento da evolução do tamanho de partículas com a conversão, amostras foram retiradas do meio reacional, diluídas no solvente (*n*-hexadecano) e submetidas às análises. Para as medidas do tamanho final de partículas e distribuição de tamanhos, as análises foram realizadas após remoção da fase orgânica e redispersão das partículas em água deionizada. Os tamanhos de partículas foram também obtidos em função da temperatura, a qual variou entre 25 e 60°C, com medidas sendo feitas em intervalos de 2,5°C. Entre cada medida, utilizou-se um tempo de estabilização das amostras à temperatura desejada equivalente a seis minutos.

As medidas de potencial zeta foram realizadas em um equipamento Malvern Zeta Sizer V510, locado no LAGEP, na Universidade Claude Bernard, Lyon 1. Para estas análises, as amostras secas foram redispersas em uma solução aquosa de NaCl (3 mM).

2.2.8.3. Espectrometria de infravermelho (FTIR)

Na caracterização via espectrometria de infravermelho (FTIR) foi utilizado um equipamento da marca Perkin Elmer modelo Spectrum GX, locado no Laboratório de Biotecnologia da EEL-USP. Para a realização das análises de infravermelho, as amostras secas dos nanogéis foram depositadas sobre pastilhas de KBr e as análises foram realizadas em modo de transmitância, numa faixa de ondas entre 400 e 4000 cm^{-1} .

2.2.8.4. Morfologia das nanopartículas

Na caracterização das nanopartículas por TEM foram utilizados dois equipamentos diferentes: um da marca Philips modelo CM120 com uma voltagem de 80kV, locado no Centro Tecnológico de Microestruturas (CTμ) da Universidade Claude Bernard, Lyon 1, em Lyon, França; e outro da marca Philips, modelo Tecnai 10, operado a 80kV, locado no Centro de Microscopia do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo. Para estas análises, as amostras secas foram redispersas e diluídas em água deionizada. Para uma melhor visualização das partículas, uma solução aquosa de ácido fosfotúngstico (1 g/L) foi utilizada como agente de contraste.

2.2.8.5. Difractometria de raios X

O difratômetro de raios X utilizado foi da marca Shimadzu modelo XRD-6000, locado no Laboratório Difractometria de raios X da EEL/USP, com radiação de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), filtrada por Ni, operando a 40 kV e 30 mA a uma taxa de varredura de 1° (2 θ /min). Estudos de Difração de raios X (DRX) foram realizados para as amostras secas dos nanogéis à base de PNVCL, obtendo-se medidas de Intensidade em função do ângulo de difração, o qual variou entre 5 e 80° .

2.2.9. Encapsulação das nanopartículas magnéticas

Para a encapsulação das nanopartículas magnéticas, um ferrofluido previamente sintetizado no Laboratório LAGEP da Universidade Claude Bernard –Lyon 1, em Lyon, França (MOUAZIZ et al., 2009) foi utilizado. Este ferrofluido é constituído das partículas de óxido de ferro complexadas com dextrana. As polimerizações da NVCL em

miniemulsão inversa foram, então, realizadas na presença de diferentes concentrações deste ferrofluido.

Nesta etapa do trabalho de pesquisa, variou-se, ainda, a fase contínua, as concentrações de Span 80 e de MBA, assim como o tipo e concentração de iniciador, visando estudar a influência destes parâmetros no tamanho final e distribuição de tamanhos das nanopartículas magnéticas.

As nanopartículas poliméricas magnéticas foram, então, caracterizadas pelos mesmos métodos utilizados na polimerização em miniemulsão da NVCL, acrescentando-se as medidas de magnetização e análises termo-gravimétricas.

2.2.10. Caracterização dos nanogéis magnéticos sensíveis à temperatura

2.2.10.1. Espalhamento de luz

Para estas análises utilizou-se um equipamento Malvern Zeta Sizer V510, locado no Laboratoire d'Automatique et Génie des Procédés (LAGEP), da Universidade Claude Bernard, Lyon 1 (Lyon – França) e um equipamento de espalhamento de luz NanoSight modelo LM20, locado no laboratório de nanopartículas do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre (RS).

2.2.10.2. Medidas de magnetização

As medidas de magnetização foram realizadas para as amostras secas das partículas poliméricas magnéticas, utilizando um magnetômetro de amostra vibrante (MAV) Lake Shore, modelo 7404, locado no Departamento de Física e Química da Universidade Federal de Itajubá, em Itajubá, operando com campos magnéticos entre 11,8 e 21,7 kOe à temperatura de 300K.

2.2.10.3. Análises termo-gravimétricas (TGA)

Para as análises termo-gravimétricas (TGA) utilizou-se um equipamento TG/DTA marca SII Nanotechnology, modelo EXSTAR 6200, com controlador automático de gases, locado no Laboratório de Análises Térmicas do Departamento de Materiais e Tecnologia da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá – FEG/UNESP.

A determinação da quantidade de nanopartículas de óxido de ferro incorporadas aos nanogéis termo-sensíveis de PNVCL, foi feita através de análises termo-gravimétricas (TG). As amostras secas das partículas poliméricas magnéticas foram submetidas às análises, realizadas com intervalo de temperatura entre 25 e 600 °C e taxa de aquecimento de 5 °C/min, sob atmosfera de N₂.

Primeiramente, o conteúdo das nanopartículas magnéticas foi definido como a porcentagem de material existente após o processo de calcinação. A porcentagem de nanopartículas de óxido de ferro incorporada aos nanogéis, então, estimada, utilizando-se a equação 2.4:

$$NPM(\%) = \frac{COF_F}{COF_I} * 100 \quad \text{Equação 2.4}$$

onde COF_F é a porcentagem de óxido de ferro após o processo de calcinação e COF_I é a porcentagem de óxido de ferro adicionada ao sistema no início da polimerização.

Capítulo 3

3. Síntese de nanogéis sensíveis à temperatura e ao pH via polimerização por precipitação

3.1. Introdução

Este capítulo descreve a preparação de nanopartículas constituídas de poli(*N*-vinilcaprolactama-*co*-ácido acrílico)/poli(NVCL-*co*-AA), sensíveis tanto à temperatura quanto ao pH, utilizando a técnica de polimerização por precipitação. O efeito de parâmetros tais como, concentração de ácido acrílico (AA), iniciador (KPS) e agente de reticulação (MBA) no diâmetro de partículas (DP) e na sensibilidade à temperatura dos nanogéis à base de poli(NVCL-*co*-AA), bem como a adição de um surfatante iônico, é apresentado no presente capítulo. Além disso, estudou-se a sensibilidade ao pH dos nanogéis sintetizados com diferentes concentrações de AA.

3.2. Síntese dos nanogéis de poli(NVCL-*co*-AA) via polimerização por precipitação

Os nanogéis constituídos de poli(NVCL-*co*-AA) foram sintetizados via polimerização por precipitação livre de surfatante, estudando-se a influência dos parâmetros de síntese na sensibilidade à temperatura. Além disso, a sensibilidade ao pH dos nanogéis também foi estudada em função da concentração de AA. A polimerização também foi realizada substituindo-se o ácido acrílico por um surfatante aniônico (dodecil sulfato de sódio ou SDS), visando obter um estudo comparativo da influência dos segmentos de AA na estabilização dos nanogéis.

Para estudar, ainda, o efeito do ácido acrílico na estabilização coloidal das nanopartículas em função do pH do meio reacional, algumas polimerizações foram realizadas na presença de uma solução tampão, visando ajustar o valor do pH em 5.

A tabela 3.1 apresenta as formulações empregadas nas sínteses dos nanogéis à base de poli(NVCL-*co*-AA) via polimerização por precipitação.

Tabela 3.1 Formulações e condições experimentais utilizadas nas sínteses dos nanogéis de poli(NVCL-*co*-AA) via polimerização por precipitação.

Reações	NVCL (g)	AA (%)	MBA (%)	KPS (%)	SDS (%)	Tamponada
P1	3	3	8	1	0	Não
P2	3	6,5	8	1	0	Não
P3	3	10	8	1	0	Não
P4	3	6,5	4	1	0	Não
P5	3	6,5	12	1	0	Não
P6	3	6,5	8	0,5	0	Não
P7	3	6,5	8	2	0	Não
P8	3	6,5	8	1	0	Sim
P9	3	6,5	12	1	0	Sim
P10	3	6,5	8	2	0	Sim
P11	3	0	8	1	2,5	Não
P12	3	12,5	8	1	0	Não
P13	3	1,8	8	1	0	Não

Toda a porcentagem foi calculada, em massa, em relação à quantidade de NVCL

Em relação ao efeito do pH do meio reacional, comparando-se as reações P2 e P8, foi possível observar um aumento da estabilidade coloidal do nanogel obtido na reação tamponada (P8). Para explicar este resultado, é necessário levar em consideração que na reação tamponada, o pH foi ajustado para 5,0, ou seja, acima do pK_a do PAA que é de aproximadamente 4,2 (FUJIWARA et al., 1997). Dessa forma, em pH 5,0, as unidades de AA estão na forma ionizada, o que favorece, desde o início da polimerização, as interações entre os grupos carboxílicos presentes nas nanopartículas e as moléculas de água. Como resultado, observa-se um aumento do tempo de estabilidade do sistema (Tabela 3.2).

Para verificar o efeito da adição do tampão na sensibilidade à temperatura dos nanogéis, medidas de diâmetros de partículas dos produtos das reações P2 e P8 foram, ainda, obtidas em função da temperatura. A Figura 3.1 apresenta os valores de DP em função da temperatura para os nanogéis de poli(NVCL-*co*-AA) obtidos nestas reações.

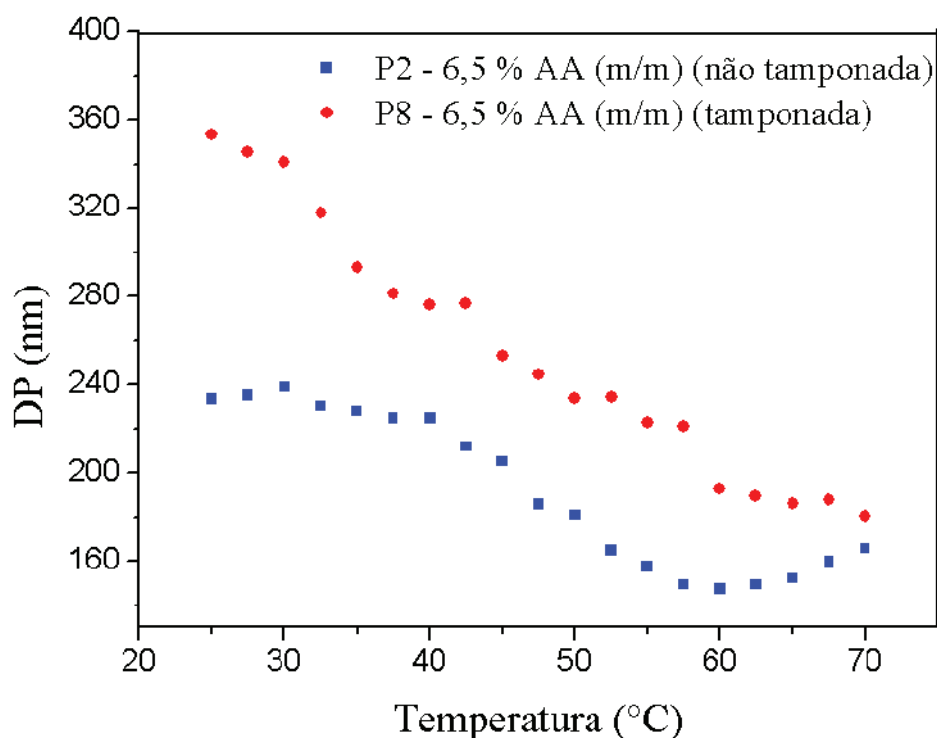


Figura 3.1. Diâmetro de partículas em função da temperatura dos nanogéis obtidos nas reações P2 (não tamponada) e P8 (tamponada).

A partir da Figura 3.1, pode-se observar que o nanogel obtido na reação P8 (tamponada) apresentou valores de diâmetros de partículas maiores, se comparados àqueles obtidos do produto da reação não tamponada. Este fato está relacionado com o efeito da repulsão eletrostática, resultante da ionização dos grupos carboxílicos dos segmentos de AA, em pH acima do pK_a deste monômero. No entanto, o nanogel obtido na reação P8, apresentou maior estabilidade em função do tempo. Além disso, como pode ser verificado, o comportamento termo-sensível não foi afetado pelo tampão.

3.3. Influência da concentração de ácido acrílico

Nesta etapa, variou-se a concentração de AA em 3, 6,5 e 10% em massa, em relação à NVCL. As concentrações de MBA e KPS foram mantidas constantes e iguais a 8% e 1%, respectivamente. A Figura 3.2 apresenta as curvas de diâmetro de partículas em função da temperatura para os nanogéis sintetizados com diferentes concentrações de AA.

A partir desta figura, podemos observar a redução do diâmetro dos nanogéis com o aumento da temperatura, assim como determinar a LCST para cada copolímero.

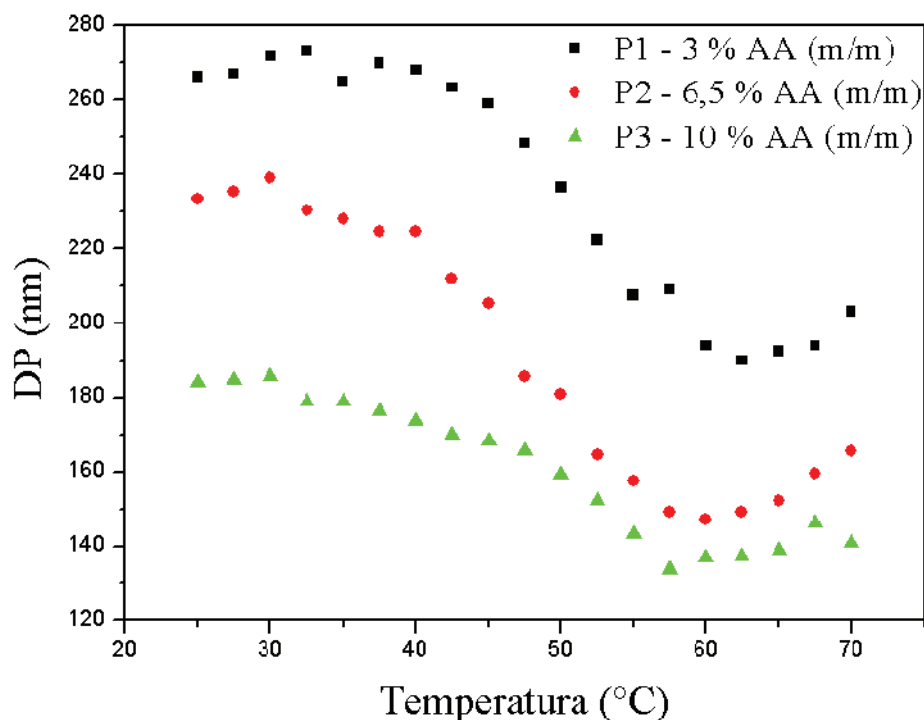


Figura 3.2. Diâmetros de partículas em função da temperatura para os nanogéis de poli(NVCL-co-AA) sintetizados com diferentes concentrações de AA.

A Figura 3.2 mostra que o aumento da concentração de AA levou à diminuição do diâmetro dos nanogéis. Este resultado pode ser explicado pela contribuição do ácido acrílico na etapa de formação das partículas. Vale à pena lembrar que estas reações foram realizadas sem uso de surfatantes convencionais, visando estudar o efeito estabilizante do ácido acrílico. Uma vez que o princípio básico da formação de partículas em polimerizações por precipitação consiste na precipitação de oligômeros na fase aquosa, quanto maior a concentração de AA no meio reacional, maior é a quantidade de moléculas capazes de estabilizar os oligômeros formados sob a forma de partículas. Em outras palavras, o aumento da quantidade de grupos carboxílicos nas cadeias poliméricas leva a um aumento da eficiência de estabilização coloidal de oligômeros de PNVCL. Resultados

semelhantes já foram anteriormente reportados (KRATZ et al., 2000), na copolimerização do ácido acrílico com a *N*-isopropilacrilamida.

Uma vez que as reações foram realizadas a 70°C, ou seja, acima da LCST da PNVCL, os segmentos hidrofóbicos de PNVCL se encontram, provavelmente, em sua maioria, no interior das partículas, enquanto as unidades hidrofílicas do AA se localizam preferencialmente na superfície das partículas, ou seja, na interface entre as nanopartículas e a água, favorecendo, assim, a estabilização dos nanogéis (LEE et al., 2008).

Os valores de LCST foram estabelecidos como a temperatura correspondente ao ponto de inflexão na curva de diâmetro de partículas *versus* a temperatura (Figura 3.2). Observa-se que um aumento na concentração de AA levou a um aumento da LCST. Este fato pode ser atribuído à presença dos segmentos hidrofílicos de AA, que favorecem as interações físicas (pontes de hidrogênio) entre as macromoléculas e a água, aumentando assim, a temperatura necessária para que interações físicas do tipo polímero-polímero se tornem dominantes e, conseqüentemente, para que ocorra a separação de fases. Já é conhecido que fatores, como a massa molecular, influenciam a LCST da PNVCL, como pode ser verificado no estudo da homopolimerização da NVCL em diferentes solventes e com diferentes concentrações de CTA, descrito no Apêndice A. Além, disso, a LCST também é dependente da quantidade de comonômero adicionado em copolimerizações. Comonômeros hidrofílicos, como é o caso do AA, aumentam a LCST, podendo esta desaparecer, se a quantidade de comonômero adicionada for muito alta. (KRATZ et al., 2000). Os valores de LCST encontrados neste estudo foram iguais a 37,5; 42,5 e 50 °C para os nanogéis sintetizados com 3, 6,5 e 10% de AA em massa, em relação à NVCL, respectivamente.

Para a reação realizada com 1,8 % em massa de AA, em relação à NVCL (P13), observou-se a formação de aglomerados durante a polimerização, indicando instabilidade do sistema. Por outro lado, durante a reação realizada com concentração de AA igual a 12,5 % em massa, em relação à NVCL, (P12), não foi possível observar turbidez do sistema, o que provavelmente foi provocado pelo aumento significativo da hidrofilicidade do copolímero.

Visando estudar, de forma qualitativa, a incorporação do AA nos nanogéis a base de poli(NVCL-*co*-AA), análises de espectrometria de FTIR foram realizadas para as reações com diferentes concentrações de AA (P1, P2 e P3). Nos espectros de FTIR as bandas de

absorção características de ambos os monômeros foram analisadas. A Figura 3.3 apresenta os espectros de FTIR dos nanogéis sintetizados com diferentes concentrações de AA.

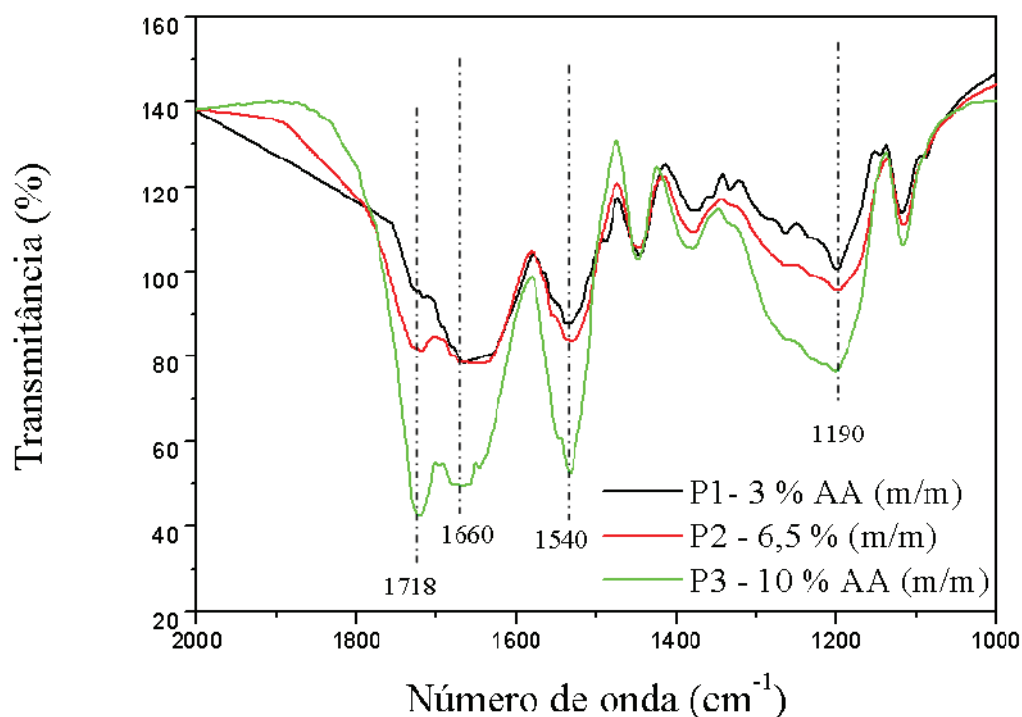


Figura 3.3. Espectros de FTIR dos nanogéis sintetizados com diferentes concentrações de AA.

A partir da Figura 3.3, pode-se identificar as bandas de absorção características da ligação C=O do AA em 1718 cm^{-1} e da deformação axial da ligação C-O-H em 1190 cm^{-1} . Além disso, podemos atribuir à presença das bandas em 1540 cm^{-1} à vibração dos grupos COO⁻ (WU et al., 2008). Estas bandas, além de confirmarem a presença do AA nos nanogéis, mostram o aumento da incorporação desse monômero nos copolímeros, à medida que se aumenta a quantidade de AA adicionada nas sínteses, levando-se em consideração o aumento de suas intensidades. Também pode-se identificar, em 1660 cm^{-1} , a banda característica da ligação C=O da NVCL.

Como mencionado anteriormente, as copolimerizações realizadas visaram estudar o efeito da concentração do AA na estabilidade dos nanogéis à base de poli(NVCL-co-AA). Observou-se, através dos valores dos diâmetros de partículas e da polidispersidade, que os nanogéis apresentaram estabilidade coloidal, o que leva à hipótese de que a

estabilização pelas unidades de AA foi eficiente. No entanto, para confirmar esta hipótese, a reação P11 foi realizada sem AA, mas utilizando-se dodecil sulfato de sódio (SDS) (2,5% m/m em relação à NVCL) como surfatante, o qual é comumente empregado em trabalhos descritos na literatura. As concentrações de MBA e KPS para estas reações foram, novamente, mantidas constantes em 8 e 1 % respectivamente. A Tabela 3.2 apresenta a evolução dos valores de DP e da polidispersidade dos produtos das reações P2, P8 e P11, em função do tempo de estocagem.

Tabela 3.2. Diâmetros médios de partículas e polidispersidade em função do tempo para os nanogéis obtidos nas sínteses P2, P8 e P11.

	Tempo	DP (nm)	Polidispersidade
P2	Logo após a síntese	281,6	0,208
	7 dias após	289,6	0,462
	14 dias após	294,6	1,000
P8	Logo após a síntese	353,2	0,066
	7 dias após	355,7	0,104
	14 dias após	356,1	0,099
P11	Logo após a síntese	106,2	0,123
	7 dias após	102,4	0,124
	14 dias após	105,3	0,175

P2 (6,5% AA, m/m, não tamponada), P8 (6,5% AA, m/m, tamponada) e P11 (2,5% SDS, m/m, não tamponada)

Comparando-se o efeito do AA e do SDS nas reações P8 e P11, respectivamente, pode-se observar, primeiramente, uma redução do diâmetro de partículas quando SDS foi utilizado como surfatante. O dodecil sulfato de sódio é um agente tensoativo, isto é, uma molécula anfifílica, que apresenta uma região apolar e outra polar, e que se associa espontaneamente em solução aquosa, a partir de uma determinada concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC), formando micelas. O valor da CMC deste surfatante em solução aquosa é de 0,24 % em massa. Dessa forma, ele possui uma alta eficiência na formação de micelas e, conseqüentemente, na estabilização de emulsões. Por este motivo, o SDS é comumente utilizado em polimerizações em miniemulsão, devido à

sua eficácia de estabilização de partículas de tamanho reduzido, o que explica a obtenção, no presente estudo, de partículas com diâmetros menores, utilizando SDS.

No entanto, observando-se as polidispersidades dos produtos das reações P8 e P11, verifica-se que os valores são bastante semelhantes. Além disso, em ambos os casos, os diâmetros médios e as polidispersidades praticamente não variaram em função do tempo de armazenagem. Dessa forma, pode-se dizer que dispersões estáveis foram obtidas tanto utilizando o SDS, como surfatante, como o AA, como um estabilizante das nanopartículas obtidas em meio tamponado. Estes resultados confirmam a eficiência do AA na estabilização coloidal dos nanogéis, nas sínteses realizadas em pH superior ao pK_a do AA. Porém, quando as reações foram realizadas em pH inferior ao pK_a deste monômero, as polidispersidades aumentaram significativamente em função do tempo de armazenagem.

3.4. Influência da concentração do agente de reticulação

Nesta etapa, variou-se a concentração de agente reticulante (MBA) em 4, 8 e 12 % em massa, em relação à NVCL, com o objetivo de avaliar a sua influência nas propriedades dos nanogéis. A Figura 3.4 mostra o efeito da concentração do agente reticulante no diâmetro médio das partículas.

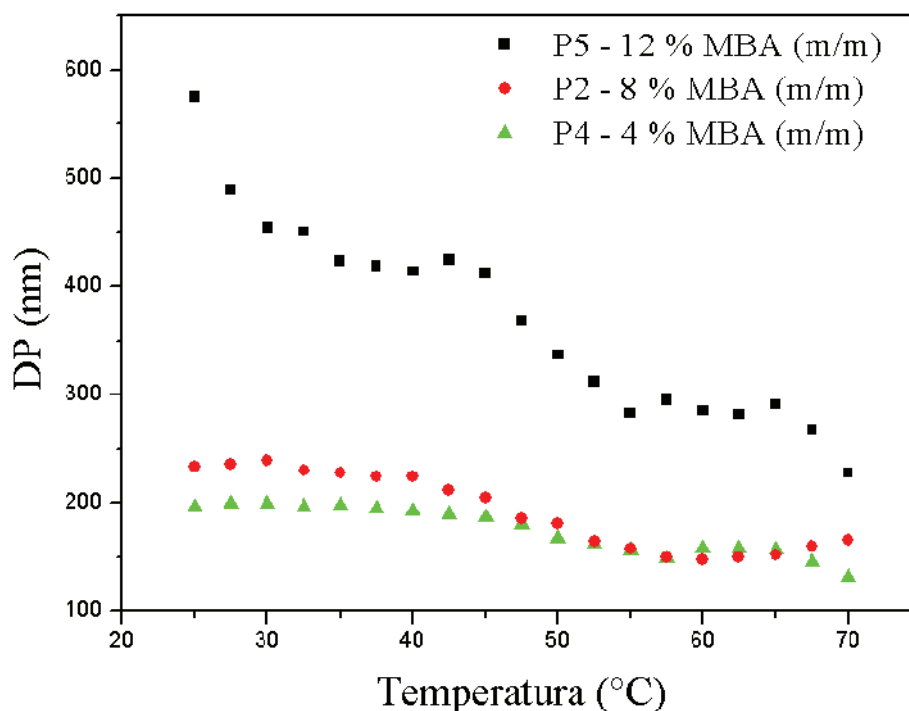


Figura 3.4. Efeito da temperatura no diâmetro dos nanogéis sintetizados com diferentes concentrações de MBA.

É possível observar que, em geral, o aumento da concentração de MBA leva a um aumento do diâmetro médio das partículas e este aumento é bastante significativo utilizando-se 12 % em massa de MBA. Este resultado pode ser atribuído à maior reatividade do MBA, quando comparada à NVCL, o qual é consumido preferencialmente durante o início da polimerização. Este fato, associado à maior solubilidade em água do MBA, em comparação à NVCL, leva a um aumento do tamanho crítico de cadeias para que haja precipitação dos oligômeros formados na fase aquosa. A Figura 3.4 mostra, ainda, que acima da LCST, a diferença nos diâmetros de partículas dos nanogéis sintetizados com diferentes concentrações de MBA foi menos pronunciada. Esse resultado pode estar associado ao aumento do volume das partículas com o aumento de MBA durante a síntese dos nanogéis, o qual permite a retenção de uma quantidade maior de moléculas de água no interior das nanopartículas. Estudos da influência do MBA em sistemas constituídos de PNVCL ou PNIPAM descrevem a obtenção de resultados semelhantes (IMAZ; FORCADA, 2009; DURACHER et al., 1999). Estes autores também explicaram o

aumento dos diâmetros de partículas em termos da diferença de reatividade entre o MBA e os demais monômeros. Em relação a P5, a variação de DP pode estar relacionada tanto com o aumento do tamanho crítico de cadeias para o processo de precipitação e formação das partículas, quanto com a baixa estabilidade coloidal destas partículas. Em outras palavras, o alto grau de reticulação pode resultar em uma maior distribuição dos grupos carboxílicos dos segmentos do AA no interior das partículas, diminuindo, assim, a concentração destes grupos ionizáveis na superfície das partículas.

3.5. Influência da concentração de iniciador

A Figura 3.5 apresenta os diâmetros de partícula em função da temperatura para os nanogéis sintetizados com diferentes concentrações de iniciador (KPS), ou seja, 0,5, 1 e 2 % em massa, em relação à NVCL.

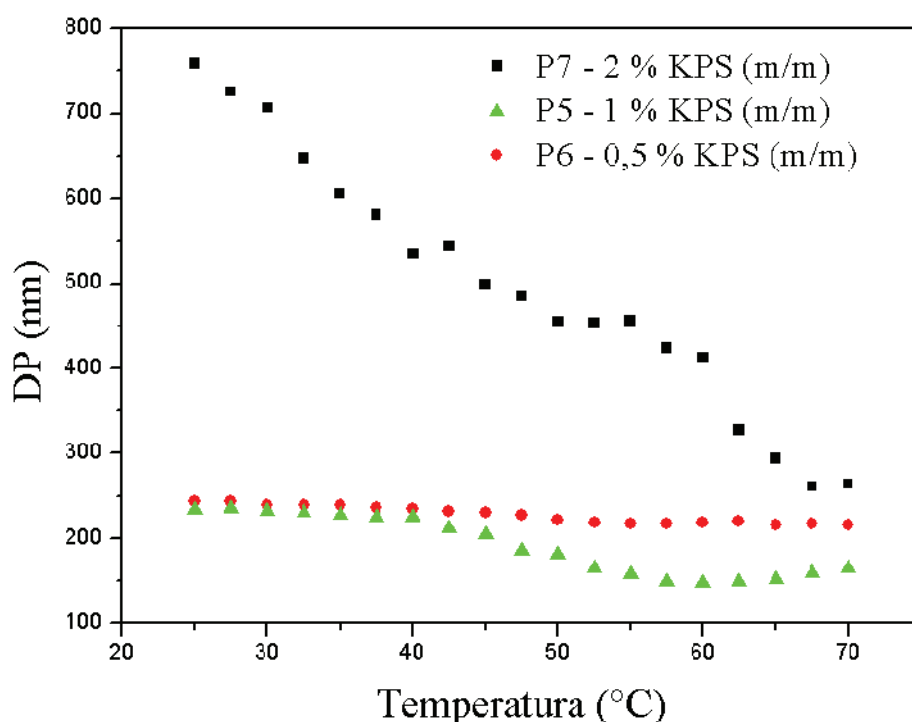


Figura 3.5. Efeito da temperatura no diâmetro dos nanogéis sintetizados com diferentes concentrações de KPS.

Através da Figura 3.5, pode-se observar, primeiramente, que quando o aumento da concentração de iniciador de 0,5 para 1% (m/m) resultou em uma pequena diminuição dos diâmetros dos nanogéis. Obviamente, o aumento da concentração de iniciador leva a um aumento da concentração de radicais livres, diminuindo, assim, os diâmetros finais de partículas, tendo em vista o aumento do número de partículas formadas logo no início da polimerização. No entanto, quando a concentração de iniciador foi aumentada para 2 % em massa, em relação à NVCL, efeito oposto foi observado. Nos estágios iniciais, o crescimento de partículas é em sua maioria devido à reação dos radicais com as moléculas de MBA, devido à sua maior reatividade, em comparação com a NVCL. Se a concentração de radicais em crescimento é muito alta, a probabilidade dos radicais formados reagirem com moléculas do agente reticulante é maior e, como consequência, os diâmetros finais de partículas aumentam. Comportamento semelhante foi verificado por Imaz e Forcada (2009), os quais verificaram uma diminuição significativa no tempo de consumo de MBA com o aumento da concentração de iniciador. Já Macková e Horák (2006) explicaram este resultado inesperado em termos da concentração instantânea de oligômeros em crescimento. Segundo estes autores, o aumento da concentração de iniciador leva ao aumento na velocidade de precipitação de oligômeros e na velocidade de coagulação de núcleos instáveis que originarão partículas maiores. No entanto, para confirmar essas hipóteses, experimentos e análises adicionais são necessários, visando um estudo mais aprofundado da cinética de tais sistemas.

Com relação à LCST, observa-se que este fenômeno foi mais acentuado para o produto da reação realizada com 2 % em massa de KPS, em relação à NVCL.

3.6. Efeito do pH

O intumescimento do nanogel à base de poli(NVCL-*co*-AA) em resposta à variação do pH do meio foi estudado, utilizando-se o produto da reação P2, ou seja, o copolímero sintetizado com 6,5% de AA, 8 % de MBA e 1 % de KPS em massa, em relação à NVCL. A Figura 3.6 apresenta os diâmetros de partículas obtidos em função da temperatura e do pH do meio.

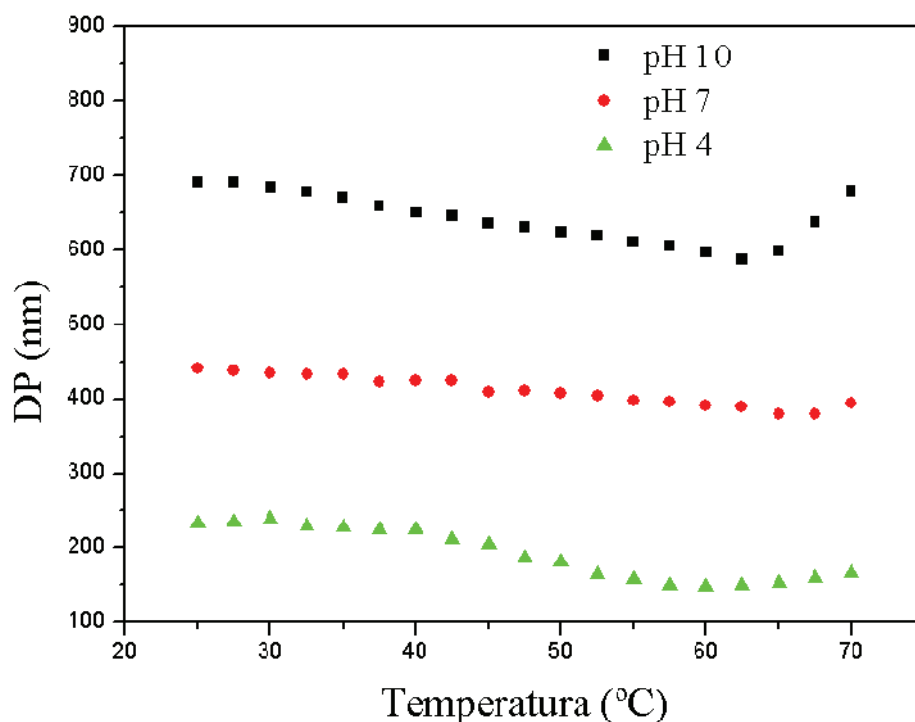


Figura 3.6. Efeito da temperatura e do pH no diâmetro de partícula do nanogel sintetizado com 6,5% de AA, 8 % de MBA e 1 % de KPS em massa, em relação à NVCL (reação P2).

Os resultados revelam o intumescimento do nanogel à medida que se aumenta o pH do meio. Em pH 6,5 e pH 10,0, a presença de forças eletrostáticas repulsivas nas unidades de AA, provoca a expansão das cadeias poliméricas e, consequentemente, o intumescimento dos nanogéis. Efeito oposto acontece abaixo do pK_a do AA, ou seja, em pH 4,0, o estado não ionizado dos segmentos de AA favorece as interações entre as macrocadeias, levando ao desintumescimento das partículas (ZHANG et al., 2007).

3.7. Morfologia das nanopartículas

A morfologia do nanogel obtido na reação P2, com 6,5% de AA, 8% de MBA e 1% de KPS em massa, em relação à NVCL, foi observada por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 3.7).

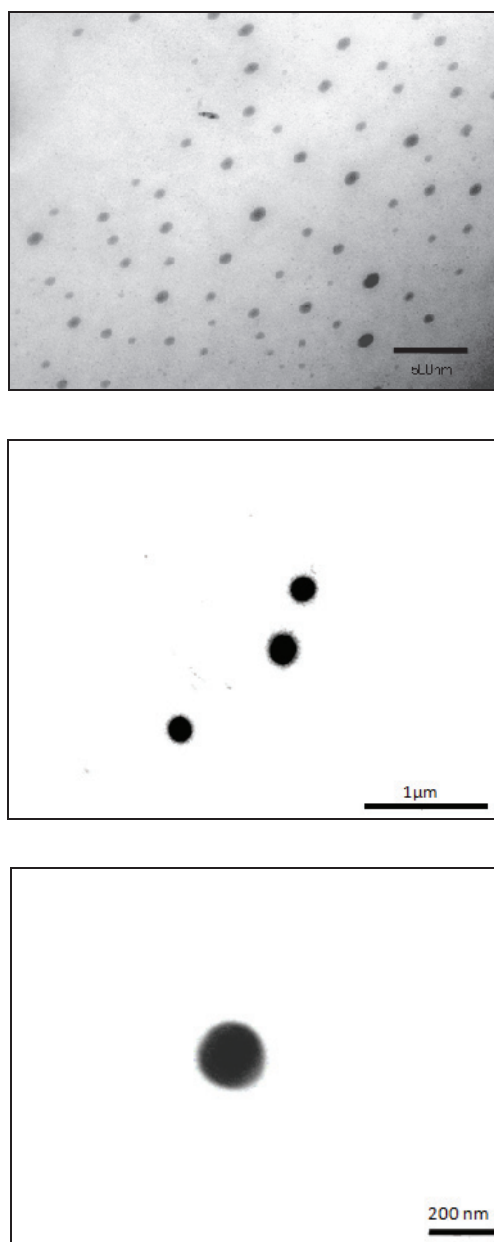


Figura 3.7. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) do nanogel sintetizado com 6,5% de AA, 8% de MBA e 1% de KPS (reação P2).

A Figura 3.7 mostra a morfologia esférica das nanopartículas do nanogel com diâmetro médio de, aproximadamente, 200 nm, o qual é inferior ao resultado obtido por espalhamento de luz e apresentado na Tabela 3.2 (281,6 nm). Esta diferença pode ser atribuída ao processo de secagem durante o preparo das amostras para as análises de TEM. Com relação à polidispersidade, as imagens da Figura 3.7 mostram a presença de partículas de diferentes diâmetros, confirmando a polidispersidade de 0,208 obtida nas análises de espalhamento de luz. No entanto, não foi observada a presença de aglomerados,

confirmando a contribuição do AA na estabilidade das nanopartículas durante a síntese do nanogel. Ainda é possível verificar que as partículas não apresentam as superfícies bem delimitadas, o que pode ser explicado pela presença de segmentos de cadeia ricos em AA na superfície, enquanto o núcleo é mais rico em PNVCL.

Capítulo 4

4. Síntese de nanogéis magnéticos à base de PNVCL via polimerização em miniemulsão

4.1. Introdução

Este capítulo descreve a síntese de nanogéis termo-sensíveis de PNVCL e incorporação de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, utilizando a técnica de polimerização em miniemulsão inversa. *n*-hexadecano e ciclohexano foram estudados como fase contínua e Span 80 foi utilizado como surfatante. O efeito da concentração do Span 80 na cinética de polimerização, na estabilização e na sensibilidade à temperatura dos nanogéis à base de PNVCL, foi previamente estudado. As análises termo-gravimétricas (TGA), a difratometria de raios X e o poder de magnetização confirmaram a incorporação das partículas de óxido de ferro nos nanogéis termo-sensíveis. A morfologia das nanopartículas foi estudada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

4.2. Determinação da CMC do Span 80 em *n*-hexadecano

Nas polimerizações em miniemulsão inversa, a medida da tensão interfacial entre a água e a fase contínua determina o revestimento das gotas pelo surfatante. Dessa forma, medidas da tensão interfacial na interface água/*n*-hexadecano foram realizadas para misturas com diferentes concentrações de Span 80 e os resultados estão apresentados na Figura 4.1

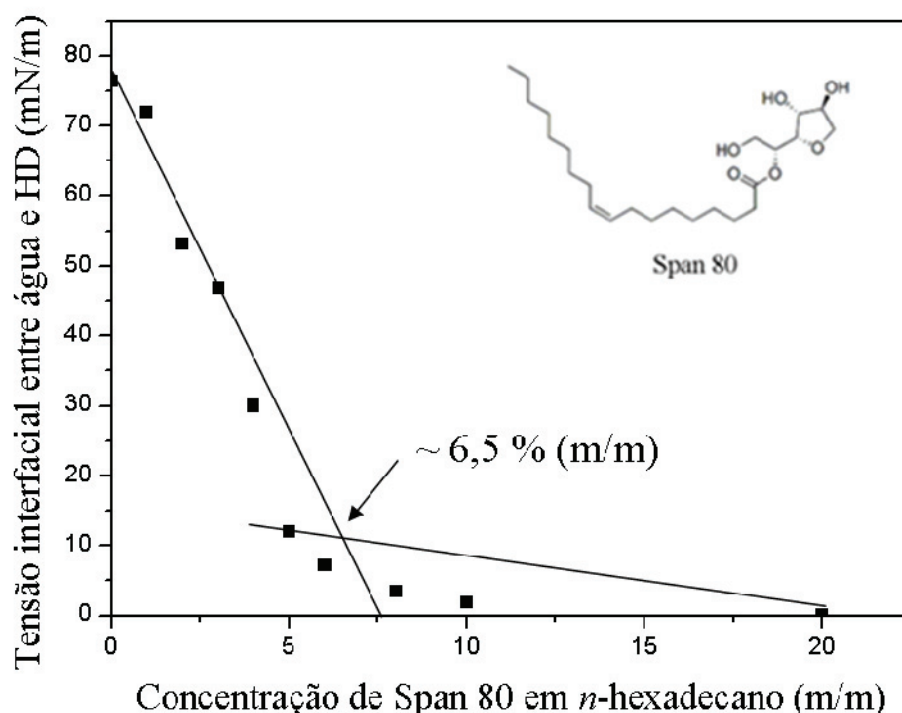


Figura 4.1. Tensão interfacial entre água e *n*-hexadecano m função da concentração de Span 80 a 25 °C.

A Figura 4.1 mostra que o valor de CMC do Span 80 em *n*-hexadecano obtido foi de 6.5 % em massa. Na literatura, não foram encontradas informações referentes à CMC do Span 80 em *n*-hexadecano. No entanto, é conhecido que a dupla ligação presente na molécula do Span 80 aumenta a hidrofobicidade deste surfatante, levando à obtenção de valores mais altos de CMC, quando comparado a outros monoésteres de sorbitano. Lin et al. (2006) obtiveram um valor de CMC do Span 80 em ciclohexano igual a 4 % (m/m). Esta diferença pode ser atribuída à solubilidade do Span 80 no ciclohexano, a qual é superior à sua solubilidade em *n*-hexadecano. Quanto maior é a solubilidade do surfatante no solvente, menor é a CMC.

4.3. Determinação do coeficiente de partição da NVCL entre água e *n*-hexadecano

Uma característica importante a ser considerada em polymerizações em miniemulsão é a solubilidade do monômero na fase dispersa e na fase contínua, respectivamente. O coeficiente de partição consiste na razão da concentração de um composto em uma mistura de dois solventes imiscíveis (LEO, 1971). Em outras palavras, este coeficiente é uma medida diferencial da solubilidade de uma substância entre estes solventes. Dessa forma, os coeficientes de partição da NVCL ($K_{M_{NVCL}}$) em uma mistura de água e *n*-hexadecano foram determinados em função da concentração do monômero, a 25 e 70 °C (Figura 4.2). Os valores de $K_{M_{NVCL}}$ foram obtidos através das concentrações de NVCL na fase aquosa ($[NVCL]_a$) (m/m) e em *n*-hexadecano ($[NVCL]_{HD}$) (m/m), ou seja, $K_{M_{NVCL}} = [NVCL]_a/[NVCL]_{HD}$, e estão apresentados na Figura 4.2 em função da concentração inicial de NVCL na mistura (m/m).

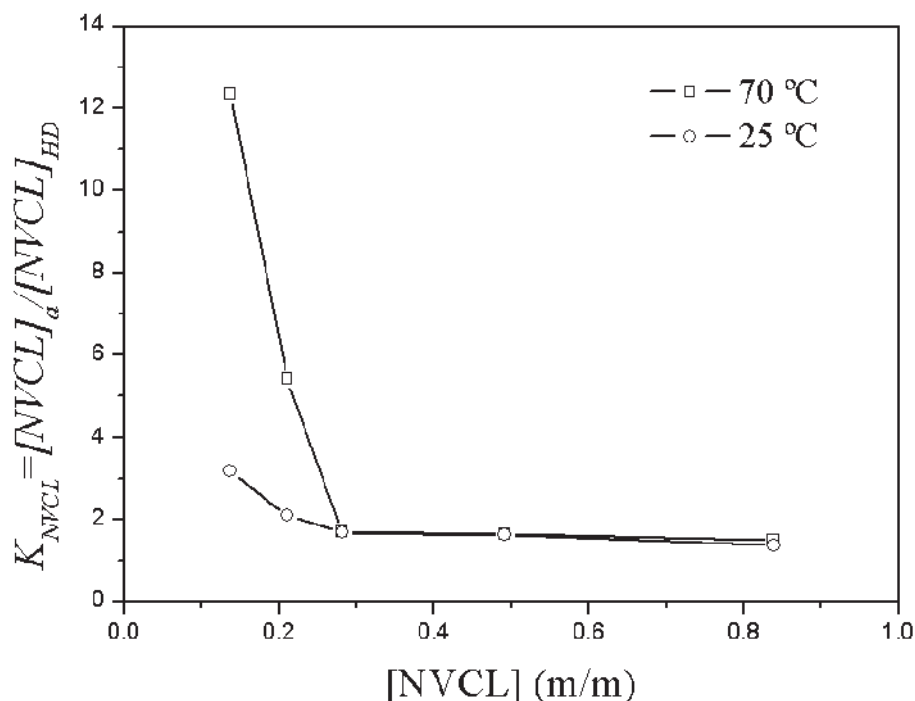


Figura 4.2. Coeficientes de partição da NVCL em uma mistura de água e *n*-hexadecano a 25 e 70 °C.

A partir destes resultados, verifica-se a obtenção de valores relativamente altos de coeficiente de partição da NVCL, o que indica que a sua solubilidade é maior em água do que em *n*-hexadecano, como esperado. Os coeficientes de partição dependem da quantidade de monômero adicionada à mistura até que as duas fases estejam em equilíbrio. À 70 °C a solubilidade da NVCL em água é maior que à 25 °C. No entanto, em ambas as temperaturas, o valor de $K_{M_{NVCL}}$ no equilíbrio parece ser de 1,7. Estes resultados confirmam a importância da adição de um agente de pressão osmótica, como o NaCl, por exemplo, à fase aquosa, visando à estabilização osmótica das gotas de monômero, como visto anteriormente.

4.4. Influência do co-estabilizante

A Figura 4.2 mostra que a NVCL é mais solúvel em água do que em *n*-hexadecano. No entanto, este monômero também é solúvel na fase contínua. Nestes casos, os agentes de pressão osmótica, tal como o NaCl, são bastante utilizados. A função destes agentes é prevenir a difusão das moléculas de monômero pela fase contínua, visando manter a estabilidade destas durante o processo de polimerização através do aumento da pressão osmótica das gotas de monômero.

Para confirmar esta hipótese, foram utilizadas, neste estudo, formulações com adição de NaCl como co-estabilizante na fase aquosa e formulações sem a adição do sal. Em todas as formulações sem a adição de NaCl, observou-se a separação de fases macroscópica das miniemulsões logo após o término das polimerizações e a retirada do sistema de agitação. Uma destas fases foi um líquido de aspecto leitoso, constituído de partículas poliméricas, enquanto a outra foi uma solução transparente, constituída das gotas originais de monômero.

Assim, convencionou-se o uso de NaCl como agente osmótico em todas as reações seguintes de síntese da PNVCL via polimerização em miniemulsão inversa.

4.5. Influência da concentração de surfatante

Na síntese de nanogéis, visando seu uso como agentes de transporte e liberação controlada de princípios ativos, a biocompatibilidade dos reagentes necessita ser

cuidadosamente estudada. A escolha do solvente é um parâmetro extremamente importante a ser considerado na preparação de nanogéis para aplicações biomédicas *in vivo*. Neste sentido, o estudo do coeficiente de partição ou Log P é, mais uma vez, um parâmetro bastante útil. O Log P de um solvente é, usualmente, determinado em uma mistura de 1-octanol e água e representa uma estimativa de sua biocompatibilidade (LAANE et al., 1987). Dessa forma, Log P parece ser um parâmetro adequado para a escolha de um solvente orgânico adequado, uma vez que já existe na literatura uma correlação entre Log P e a atividade de microorganismos (LAANE et al., 1987; OSBORNE et al., 1990). De acordo com os estudos realizados por Prichanont et al. (2000) e Baldascini et al. (2001), solventes cujos valores de Log P estão entre 4,0 e 13,7 não influenciaram a atividade enzimática e, assim, podem ser considerados biocompatíveis. Dessa forma, convencionou-se o uso do *n*-hexadecano (HD), o qual possui Log P igual a 8,8 (PRICHANONT et al., 2000), como fase contínua neste estudo preliminar da síntese dos nanogéis de PNVCL. A escolha do *n*-hexadecano também está relacionada com a solubilidade da NVCL. Sabe-se que este monômero é solúvel em vários solventes orgânicos e o HD é um dos solventes nos quais ela apresenta menor solubilidade.

Para a escolha do surfatante apropriado para a síntese de nanogéis para aplicações biomédicas *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*, existe uma série de fatores que devem ser levados em conta. Dentre estes fatores, os mais importantes são a biocompatibilidade, a interação com a fase contínua, visando uma boa estabilidade coloidal do sistema, e a capacidade de captura de substratos e extração de moléculas, para realização de análises e biotransformações. Surfatantes não-iônicos são mais apropriados para aplicações biomédicas *in vivo* (FORMARIZ et al., 2005) devido ao fato de estes serem menos afetados pelas mudanças do pH e força iônica e de apresentarem menor toxicidade (CRUZ; UCKUN, 2001). Utilizando este critério, e baseando em alguns trabalhos na literatura (LANDFESTER et al., 2000; XU et al., 2004), Span 80 (monooleato de sorbitano) foi selecionado para ser utilizado como surfatante neste estudo. Este surfatante é solúvel na fase contínua e possui um valor de HLB igual a 4,3. O HLB (balanço hidrofílico/lipofílico) é um parâmetro muito utilizado na indústria para prever o grau de estabilidade que um determinado surfatante pode proporcionar, ajudando a selecionar o surfatante adequado para uma dada aplicação (HOLMBERG et al., 2002). O valor HLB de um surfatante aumenta proporcionalmente com o aumento da polaridade da molécula. Uma vez que o

valor de HLB do Span 80 é de 4,3, este surfatante é apropriado para polimerizações em miniemulsão inversa.

Visando estudar o efeito do Span 80 nas propriedades coloidais dos nanogéis de PNVCL, uma série de experimentos foi realizada, variando-se a concentração deste surfatante. Os diâmetros hidrodinâmicos dos nanogéis termo-sensíveis em função da concentração de Span 80 estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Influência da concentração de Span 80 e da quantidade da fase aquosa no diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis de PNVCL.

Reação	H ₂ O (g)	Span 80 ^a (% m/m)	Diâmetros hidrodinâmicos (DH) ^b (nm)
MN1	3	3	193
MN2	3	4	173
MN3	3	6	167
MN4	3	8	190
MN5	8	3	524
MN6	8	4	484
MN7	8	5	467
MN8	8	6	457
MN9	8	7	537
MN10	8	7.7	570
MN11	8	8	635

^aEstas concentrações de Span 80 foram calculadas em função da fase contínua.

^bEstas medidas foram obtidas em *n*-hexadecano, sem tratamento prévio dos nanogéis.

A Tabela 4.1 mostra um ligeiro decréscimo do diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis com o aumento da concentração de Span 80. No entanto, quando a concentração de Span 80 foi superior a 6 % em massa, em relação ao HD, resultado oposto foi observado. Este comportamento foi verificado tanto para os nanogéis sintetizados com 3 g quanto com 8 g de água. Com o aumento da concentração de surfatante a iniciação não acontece, simultaneamente, em todas as gotas e, conseqüentemente, os primeiros radicais são formados somente em algumas gotas de monômero. A presença dos macro-radicaís, por sua vez, tende a aumentar o tamanho da gota, levando à degradação de Ostwald e, conseqüentemente, levando a partículas com diâmetros maiores (ASUA, 2002). Além

disso, a probabilidade de formação de micelas é maior à medida que a concentração de surfatante é aumentada. Este fato, associado à ligeira solubilidade da NVCL no *n*-hexadecano intensifica o fenômeno de difusão das moléculas de monômero das gotas para as micelas, a fim de manter o equilíbrio termodinâmico.

Por outro lado, pode-se observar que, em geral, a variação do diâmetro dos nanogéis em função da concentração de surfatante é pequena. Resultados similares foram obtidos por Hashimoto et al. (2008). Estes autores estudaram o efeito da adição de Span 80 na fase contínua e vários co-estabilizantes na fase aquosa. A adição de surfatantes muda a afinidade entre fases líquidas e superfícies sólidas, através de mudanças de ângulo de contato. Nesse estudo, eles observaram que a influência da concentração de Span 80 no ângulo de contato só foi significativa quando quantidades suficientemente altas de um co-estabilizante com alto valor de HLB (Tween 20) foram utilizadas. Foi sugerido, então, que as gotas aquosas tinham maior afinidade com a superfície hidrofóbica somente quando ambas as fases continham alta concentração de estabilizantes.

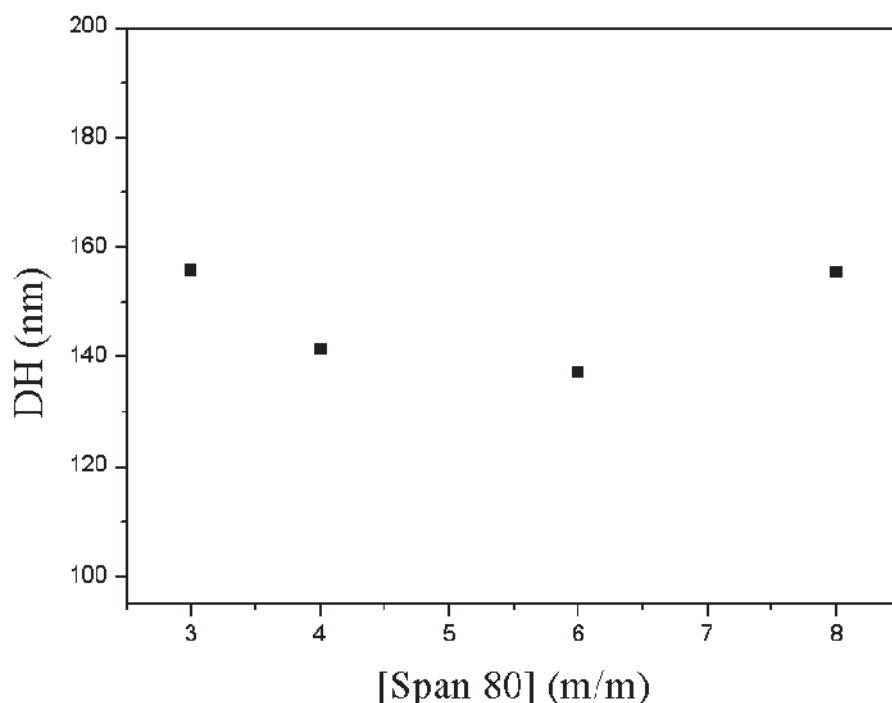
A faixa de concentração de surfatante utilizada neste estudo ficou restrita entre 3 e 8 % em massa, em relação à fase contínua. Isto se deve ao fato de que abaixo de 3 % e acima de 8 % em massa, em relação ao HD, respectivamente, foram obtidos nanogéis com baixa estabilidade coloidal, apresentando separação de fases logo após o término do processo de polimerização, como pode ser visualizado na Figura 4.3. Dessa forma, convencionou-se o uso de concentrações de Span 80 entre 3 – 8 % em massa, em relação à fase contínua, as quais produziram miniemulsões estáveis durante cerca de um mês.



Figura 4.3. Aspecto das dispersões dos nanogéis obtidos utilizando 3 % em massa (à esquerda) e 2 % em massa (à direita) de Span 80 em relação à fase contínua.

Pode-se observar, ainda, através da Tabela 4.1, que a quantidade da fase aquosa influencia no diâmetro dos nanogéis e que as polimerizações realizadas com 3 g de água, foram aquelas nas quais se obteve nanogéis com DH menores. Este fato é de extrema importância para o estudo destes sistemas como agentes de transporte e liberação controlada de drogas, nos quais o tamanho de partículas é um parâmetro crucial, dependendo de cada aplicação.

Considerando as possíveis aplicações biomédicas *in vivo* dos nanogéis de PNVCL, a remoção completa do solvente orgânico é extremamente importante e o sistema necessita apresentar as mesmas propriedades após o processo de remoção do solvente e redispersão em água. Visando, então, estudar a eficiência do método de inversão de fases, o *n*-hexadecano foi removido, utilizando-se três lavagens com clorofórmio, seguido de secagem à vácuo. Em seguida, as nanopartículas foram redispersas em água deionizada. A Figura 4.4 mostra o efeito da concentração de Span 80 no diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis obtidos nas reações MN1-MN4, após a remoção do *n*-hexadecano e redispersão em água.

**Fi**

gura 4.4. Efeito da concentração de Span 80 nos diâmetros hidrodinâmicos dos nanogéis sintetizados com 3 g de água, após o processo de remoção do *n*-hexadecano e redispersão em água.

A Figura 4.4 mostra que a variação do DH dos nanogéis em função da concentração de surfatante, após redispersão em água, seguiu o mesmo comportamento, em comparação às análises realizadas sem a remoção do *n*-hexadecano. Em outras palavras, a partir de 6 % em massa, em relação à fase contínua, os diâmetros apresentaram um ligeiro aumento. Quando o método de inversão de fases foi aplicado, os valores de DH foram, em geral, inferiores àqueles obtidos em *n*-hexadecano, sem tratamento prévio dos nanogéis. Este fato pode ser atribuído à desidratação das partículas durante o processo de secagem, as quais não possuíram o mesmo grau de intumescimento após a redispersão em água.

4.6. Estudo cinético

Uma vez que as miniemulsões são preparadas, o sucesso do processo de polimerização dependerá do mecanismo predominante de nucleação das gotas de monômero. No entanto, desde que estas são preparadas, elas podem sofrer degradação, devido à difusão das moléculas de monômero na fase contínua, dentre outras razões. O uso do ultra-som causa a oscilação das moléculas próximas ao principal local de propagação das ondas, aumentando a distância entre as moléculas. Esta rarefação resulta numa pressão negativa que pode causar a formação de vácuo ou cavitação. As ondas de choque produzidas e o total colapso das bolhas causam a quebra das gotas de monômero. Um exemplo de sonicador, assim como o processo de sonicação, está ilustrado, esquematicamente, na Figura 4.5. Pode-se observar que somente uma pequena região do fluido ao redor do sonicador é diretamente afetada pelas ondas de ultra-som. Logo, para que a quebra ocorra, as gotículas de monômero devem passar através dessa região. Por isso, quando é usada a sonicação para formar a miniemulsão, uma agitação adicional precisa ser usada para garantir que todo o fluido passe através da região de sonicação. Esse processo cria uma miniemulsão que é dependente do tempo de sonicação, sendo que o tamanho das gotículas deve diminuir com o tempo de sonicação. Inicialmente a redução é pronunciada e com o passar do tempo o tamanho das gotas tendem a entrar em equilíbrio, dependendo da formulação, da energia embutida e da quantidade do meio reacional (ASUA, 2002).

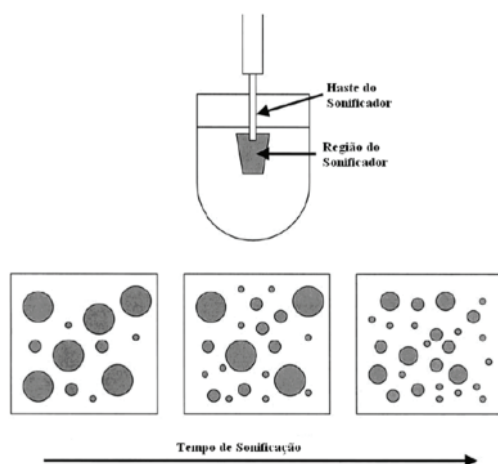


Figura 4.5. Esquema do processo de sonificação (ASUA, 2002)

O uso do ultra-som durante um determinado período de tempo visa a obtenção de um estado estacionário obtido pelo equilíbrio da taxa de quebra e coalescência das gotas. Enquanto alguns autores afirmam que o tamanho das gotas não deve variar com o decorrer do processo de polimerização, outros dizem que a nucleação mais lenta nas miniemulsões leva à obtenção de nanopartículas com larga polidispersidade (ASUA, 2002). Segundo Asua (2002), estas idéias contraditórias podem ser atribuídas a limitações em relação à obtenção de informações confiáveis referentes ao processo de formação das partículas de polímero. Para confirmar esta hipótese, o diâmetro dos nanogéis foi medido, logo após o processo de homogeneização e em função do tempo de polimerização para as sínteses com diferentes concentrações de Span 80. Os resultados obtidos nas polimerizações realizadas com 8 g de água estão apresentados na Figura 4.6.

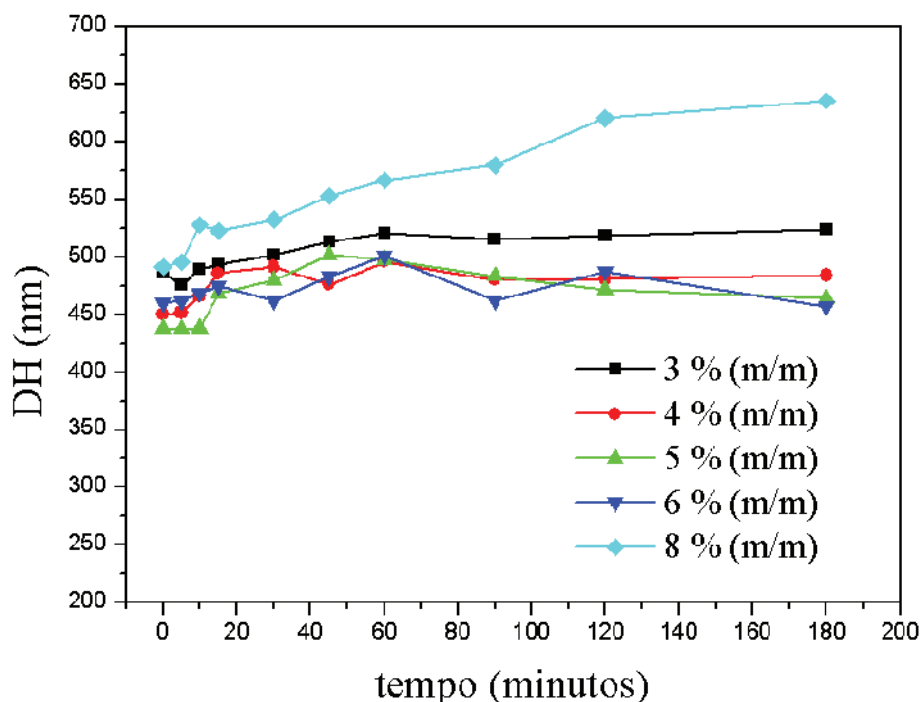


Figura 4.6. Diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis obtidos em função do tempo de polimerização e da concentração de Span 80 para as sínteses realizadas com 8 g de água.

A Figura 4.6 mostra que, para os nanogéis sintetizados com 8 g de água, a variação do diâmetro hidrodinâmico foi insignificante com o decorrer da polimerização, quando a concentração de Span 80 utilizada foi abaixo da inferior a 6 % em massa, em relação ao HD. No entanto, um ligeiro aumento foi observado utilizando-se 8 % em massa de Span 80.

A Figura 4.7 mostra a evolução do diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis sintetizados com 3 g de água, em função do tempo de polimerização.

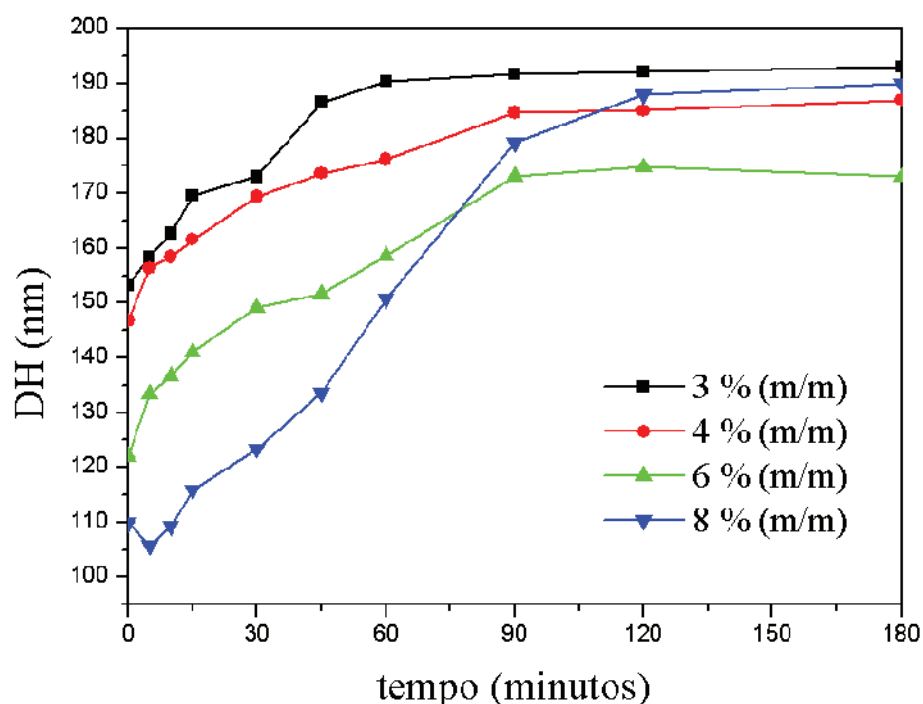


Figura 4.7. Diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis obtidos em função do tempo de polimerização e da concentração de Span 80 para as sínteses realizadas com 3 g de água.

A Figura 4.7 mostra um aumento em DH com o tempo de polimerização. Como mencionado anteriormente, em polimerizações em miniemulsão, é importante maximizar o número de partículas formadas pela nucleação das gotas de monômero. No entanto, algumas micelas também podem estar presentes devido à alta quantidade de surfatante utilizada e ao processo de homogeneização e, conseqüentemente, algumas partículas podem ser formadas por nucleação micelar. Dessa forma, para aumentar a quantidade de partículas formadas através da nucleação das gotas de monômero, deve-se ajustar as condições de homogeneização, para que o surfatante seja totalmente adsorvido na superfície dessas gotas.

Para estudar a cinética das polimerizações em miniemulsão inversa da NVCL, medidas de conversão também foram obtidas em função do tempo, utilizando-se cromatografia gasosa, para as sínteses realizadas com 3 g de água. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.8.

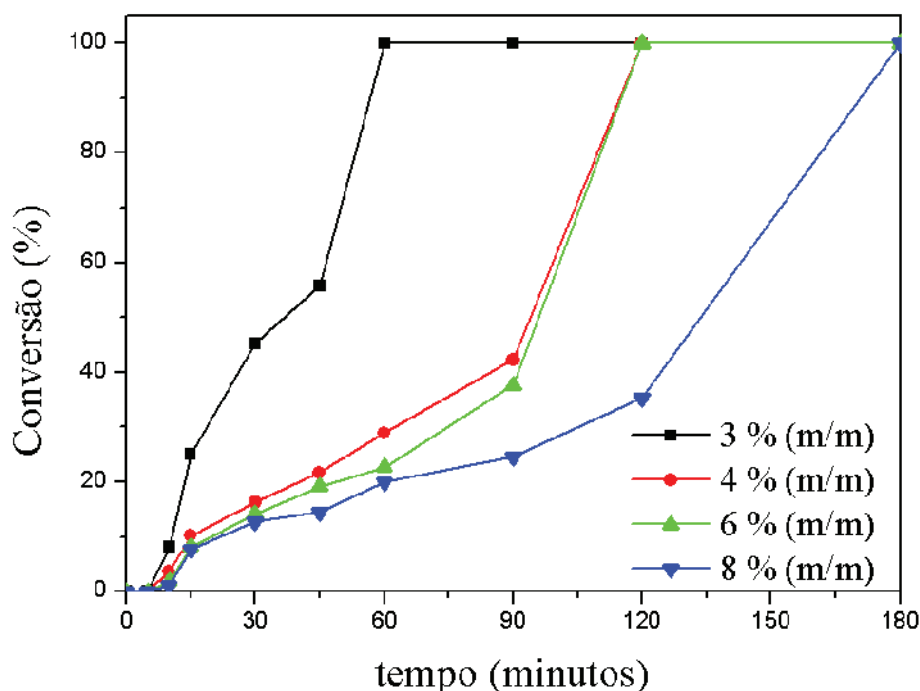


Figura 4.8. Conversão em função do tempo para as sínteses realizadas com 3 g de água e diferentes concentrações de Span 80.

A Figura 4.8 mostra, primeiramente, que, em todas as sínteses, a conversão foi completa após 150 minutos de polimerização e que, o aumento da concentração de surfatante levou a uma diminuição na velocidade de polimerização. Este decréscimo na velocidade de polimerização com o aumento da concentração de Span 80 pode ser atribuído ao decréscimo da concentração de monômero e de radicais por partícula quando concentrações mais altas de surfatante são utilizadas. Para explicar estes resultados, deve-se analisar a equação da velocidade de reação em polimerizações em meio disperso (Equação 4.1) (GILBERT, 1995). De acordo com esta teoria, R_p é dado por:

$$R_p = \frac{k_p [M]_p N_p \tilde{n}}{N_A} \quad \text{Equação 4.1}$$

onde k_p é a constante de velocidade de propagação, $[M]_p$ é a fração em volume de monômero dentro das partículas, $\tilde{n}$ é o número médio de radicais por partículas e N_A é o

número de Avogrado. Uma vez que todas as reações foram realizadas na mesma temperatura, o valor de k_p deve permanecer constante. Além disso, o número de partículas, N_p deve aumentar com o aumento da concentração de Span 80. Consequentemente, a diminuição da velocidade de polimerização em função do aumento da concentração de surfatante pode ser explicada somente por $\tilde{n}$ ou $[M]_p$. Sabe-se que o número médio de radicais por partícula depende do número de partículas. Dessa forma, desde que a concentração de partículas aumenta proporcionalmente com o aumento de Span 80 e, uma vez que, no presente estudo, os outros parâmetros reacionais foram mantidos constantes, o número de radicais por partícula diminuiu e, consequentemente, a reação tornou-se mais lenta. Fatores, tais como, transferência de cadeia ao surfatante, dificuldade de entrada de radicais devido à presença do surfatante na superfície das partículas e ocorrência de efeito gaiola são outros exemplos que podem explicar este decréscimo na R_p .

4.7. Potencial Zeta dos nanogéis

O potencial zeta dos nanogéis de PNVCL sintetizados com diferentes concentrações de Span 80 foi obtido em função do pH após a redispersão em solução aquosa de NaCl (3mM) e os resultados estão apresentados na Figura 4.9.

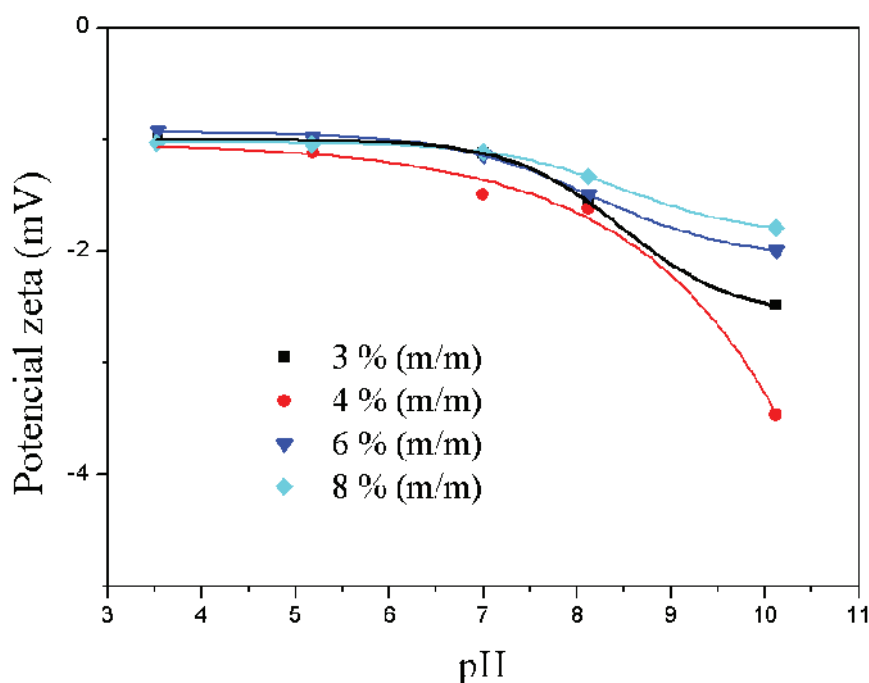


Figura 4.9. Potencial zeta dos nanogéis de PNVCL em função do pH e da concentração de Span 80.

O potencial zeta é uma medida da densidade de cargas na superfície das partículas. Neste caso, observa-se que o potencial zeta dos nanogéis de PNVCL variou, ligeiramente, com a variação do pH do meio de dispersão e com a concentração de Span 80. A Figura 4.9 mostra que, em geral, valores negativos foram obtidos. Este fato é atribuído à presença de cargas negativas provenientes dos grupos persulfato do iniciador (KPS). Além disso, o surfatante utilizado neste estudo, Span 80, é constituído de uma mistura de ácidos graxos (oléico, linoléico, linolênico e palmítico). Dessa forma, a presença de grupos carboxílicos na superfície dos nanogéis pode, também, explicar os valores negativos de potencial zeta e o ligeiro aumento das cargas negativas com o aumento da concentração de Span 80 e do pH.

Por outro lado, em geral, os valores de potencial zeta obtidos são todos próximos de zero e estão, ainda, dentro da faixa de erro, a qual é de, aproximadamente, 5 mV. Assim, pode-se assumir que os nanogéis sintetizados neste estudo não são eletricamente carregados.

4.8. Avaliação da sensibilidade térmica dos nanogéis de PNVCL

A sensibilidade à temperatura dos nanogéis de PNVCL obtidos nas reações MN1, MN2 e MN3, foi estudada através de análises do diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura e da concentração de Span 80. Todas as medidas foram obtidas em solução aquosa, após o processo de remoção do *n*-hexadecano e redispersão em água (Figura 4.10).

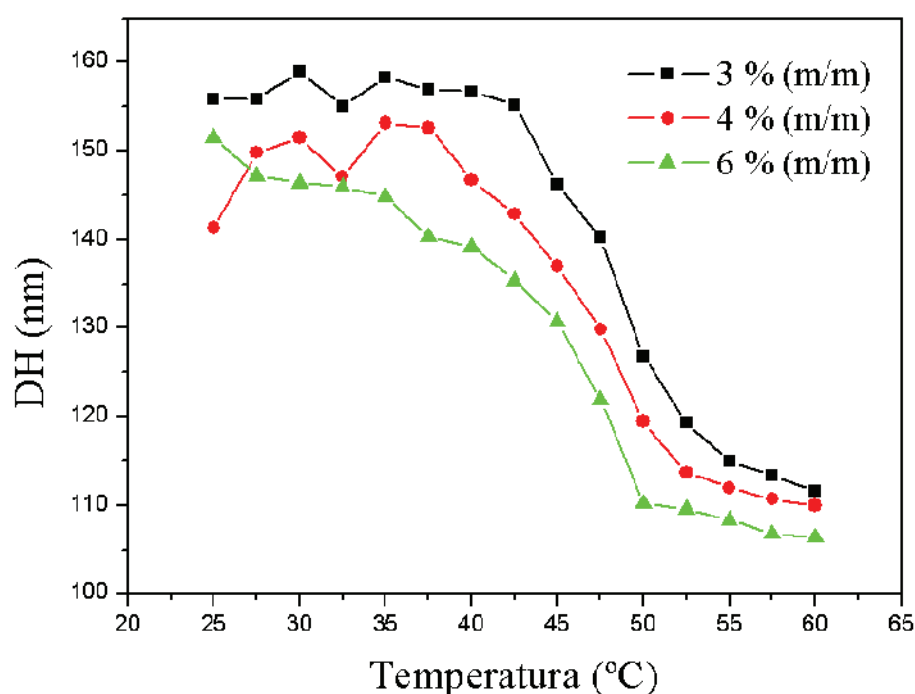


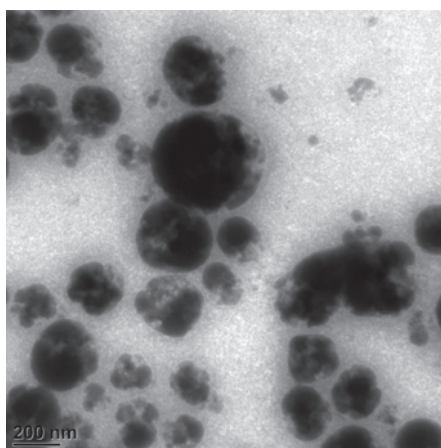
Figura 4.10. Diâmetros hidrodinâmicos dos nanogéis de PNVCL em função da temperatura e da concentração de Span 80.

A Figura 4.10 confirma a sensibilidade à temperatura dos nanogéis, os quais apresentaram uma diminuição no diâmetro hidrodinâmico com o aumento da temperatura. Este comportamento já foi bastante estudado por inúmeros autores usando partículas baseadas em poli(*N*-isopropilacrilamida) (BRIJITTA et al., 2009; WANG et al., 2008; ZHANG et al., 2009). A LCST pode ser definida como o menor valor de temperatura no qual o diâmetro do nanogel começa a apresentar um decréscimo significativo. Neste caso, observa-se que os valores de LCST obtidos foram de 42,5, 40, 0 e 37,5 °C, para os

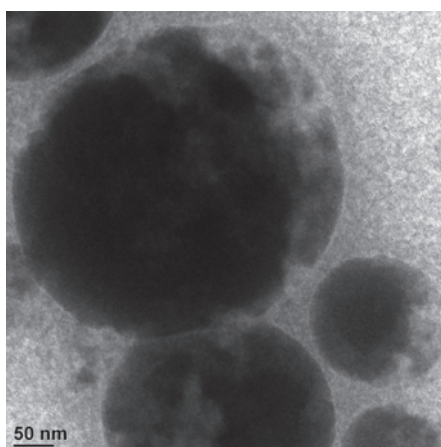
nanogéis sintetizados com 3, 4 e 6 % em massa de Span 80 em relação à fase contínua, respectivamente, evidenciando que o aumento da concentração de surfatante provoca um decréscimo na LCST dos nanogéis de PNVCL.

4.9. Características morfológicas dos nanogéis

A dispersão aquosa do nanogel de PNVCL obtido na reação MN1, utilizando 3 % em massa de Span 80, foi submetida à análise de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) visando a avaliação das características morfológicas das nanopartículas. A Figura 4.11 apresenta as imagens de TEM do nanogel obtido da reação MN1.



A



B

Figura 4.11. Micrografias de TEM dos nanogéis de PNVCL obtidos na reação MN1.

A Figura 4.11 revela o formato esférico das partículas do nanogel obtido na reação MN1, com diâmetros variando entre 150 a 200 nm, os quais concordam com os resultados obtidos por espalhamento de luz. A presença de partículas maiores e o aspecto ligeiramente deformado podem ser atribuídos a imperfeições no processo de sonicação e à adição de NaCl como estabilizante osmótico (LANDFESTER et al., 1999).

4.10. Incorporação de nanopartículas de óxido de ferro complexadas com dextrana

Neste estudo, utilizou-se um ferrofluido constituído de nanopartículas de óxido de ferro complexadas com dextrana, fornecido pelo Laboratoire d'Automatique et Génie des Procédés, LAGEP, (Universidade Claude Bernard – Lyon 1), o qual foi preparado, conforme a metodologia descrita por Mouaziz et al. (2009).

Inicialmente, variou-se uma série de parâmetros, tais como concentração de agente reticulante (MBA), tipo de solvente, quantidade de ferrofluido, concentração de Span 80 e, finalmente, o tipo de iniciador, e verificou-se a influência destas variáveis no diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis magnéticos. A Tabela 4.2 apresenta as condições de síntese e os diâmetros hidrodinâmicos, obtidos a 25 °C, dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL.

Tabela 4.2. Condições de síntese e diâmetros hidrodinâmicos dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL, obtidos a 25 °C.

Reação	MBA (g)	H ₂ O (g)	Fase contínua ^a	Ferrofluido ^b (μL)	Span 80 (% m/m)	Iniciador ^c	DH ^d (nm)
MP1	0,004	3	HD	100	3	AIBN	231
MP2	0,004	3	HD	200	3	AIBN	235
MP3	0,004	3	HD	300	3	AIBN	288
MP4	0,008	3	HD	100	3	AIBN	228
MP5	0,01	3	HD	100	3	AIBN	237
MP6	0,008	3	HD	100	3	AIBN	240
MP7	0,008	3	HD	100	3	KPS	260
MP8	0,008	3	HD	100	3	V50	268
MP9	0,008	3	HD	100	3	APAP	272
MP10	0,008	3	CH	100	3	KPS	263
MP11	0,008	3	CH	100	4	KPS	248
MP12	0,008	3	CH	100	5	KPS	239
MP13	0,008	3	CH	100	6	KPS	268
MP14	0,008	3	CH	100	8	KPS	271
MP15	0,008	3	CH	100	3	KPS	293
MP16	0,008	3	CH	200	3	KPS	274
MP17	0,008	3	CH	300	3	KPS	268

NVCL: 100mg

NaCl: 50 mg (fase contínua: HD) e 100mg (fase contínua: Ciclohexano).

^aFase contínua: 24g^bTeor de sólidos = 21,3%^cIniciador: 80mg^dResultados obtidos diluindo-se as dispersões na fase contínua, sem inversão de fases.

A partir da Tabela 4.2, algumas observações importantes podem ser feitas:

- A concentração de MBA praticamente não influenciou o diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis;
- Em relação à variação da concentração de surfatante, foi observado um comportamento semelhante ao da síntese de nanogéis de PNVCL, ou seja, abaixo da CMC,

o DH diminui com o aumento da concentração de Span 80. No entanto, acima da CMC, efeito oposto foi observado;

- O tipo de iniciador também influenciou o DH dos nanogéis, sendo que o menor diâmetro foi obtido utilizando-se AIBN, o que era esperado, devido à ausência de cargas na molécula deste iniciador. À medida que iniciadores catiônicos ou aniônicos são utilizados, como é o caso do KPS, a presença de cargas na molécula provoca o intumescimento das partículas dos nanogéis e, consequentemente, aumentando o valor de DH;

- Utilizando-se ciclohexano como fase contínua, o aumento na quantidade de ferrofluido nas sínteses levou a um decréscimo do diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis magnéticos. Este resultado é devido à interação entre as nanopartículas de óxido de ferro e as moléculas de monômero, a qual favorece a formação das nanopartículas.

- Estudou-se também a variação da fase contínua e verificou-se que o tipo de solvente utilizado não influenciou no diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis (reações MP7 e MP10). O ciclohexano é um solvente que possui Log *P* próximo de 4 (3,8) (LAANE et al., 1987) e por isso também é adequado para a síntese de nanogéis para encapsulação de princípios ativos e aplicações biomédicas. Além disso, ciclohexano possui temperatura de ebulição de 81 °C e o *n*-hexadecano, de 287 °C, o que, obviamente, torna o ciclohexano um solvente mais fácil de ser removido da dispersão final.

A partir destes resultados, deu-se início ao processo de remoção do solvente dos nanogéis obtidos nas reações MP15, MP16 e MP17. A eficiência da incorporação das nanopartículas de óxido de ferro, complexadas com dextrana, nos nanogéis termo-sensíveis foi, então, avaliada através de análises termo-gravimétricas (TGA), FTIR, difratometria de raios X, medidas de magnetização e, finalmente, microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

A Figura 4.12 apresenta o histograma obtido das análises de diâmetro hidrodinâmico do nanogel magnético sintetizado na reação MP17, utilizando o equipamento de espalhamento de luz Nanosight LM20, após o processo de remoção do ciclohexano e redispersão das partículas em água.

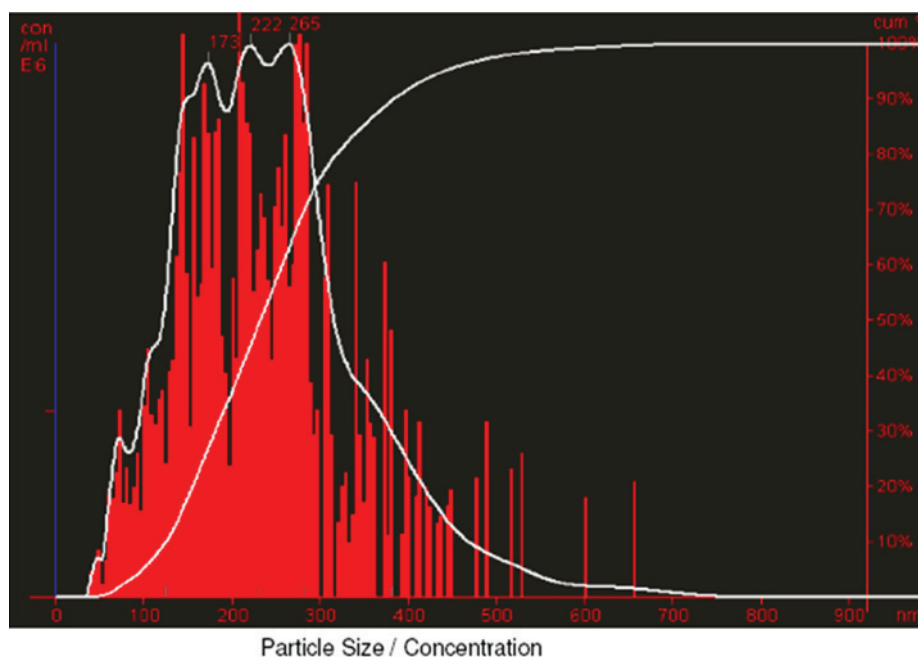


Figura 4.12. Histograma de diâmetro hidrodinâmico (DH) do nanogel magnético obtido na reação MP17.

Pode-se observar que uma larga distribuição de tamanho de partículas foi obtida. Este resultado pode ser atribuído à presença de nanopartículas de óxido de ferro não encapsuladas e nanopartículas puras de PNVCL. Mesmo com a remoção da maioria das nanopartículas de Fe_3O_4 isoladas não encapsuladas, durante o processo de centrifugação, é comum que as nanopartículas, acumuladas sobre as partículas poliméricas durante o processo de miniemulsão, não sejam totalmente removidas. Além disso, no processo de formação das gotas de monômero para a preparação da miniemulsão, algumas destas podem conter apenas moléculas de monômero e de agente reticulante, sem a presença do material inorgânico no interior. A Figura 4.13 apresenta a distribuição de diâmetro hidrodinâmico em 3D, obtida do nanogel magnético sintetizado na reação MP17, utilizando o equipamento de espalhamento de luz Nanosight LM20, após o processo de remoção do ciclohexano e redispersão das partículas em água.

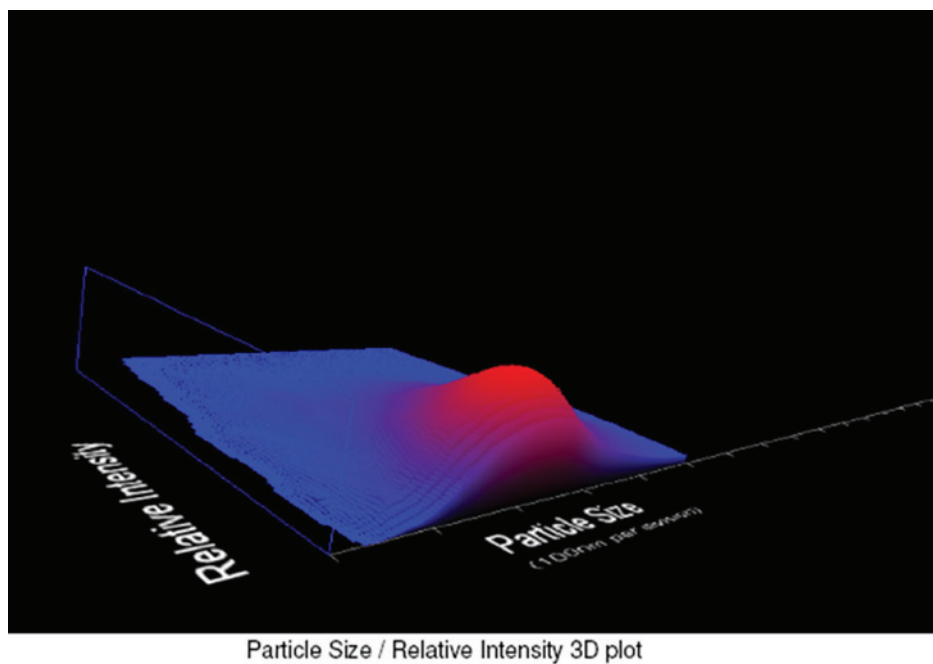


Figura 4.13. Representação em 3D da distribuição de diâmetro hidrodinâmico, obtida para o nanogel magnético sintetizado na reação MP17 após o processo de remoção do ciclohexano e redispersão das partículas em água.

4.10.1. Sensibilidade à temperatura dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL

A Figura 4.14 mostra o efeito da quantidade de ferrofluido na sensibilidade à temperatura dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL sintetizados nas reações MP15, MP16 e MP17.

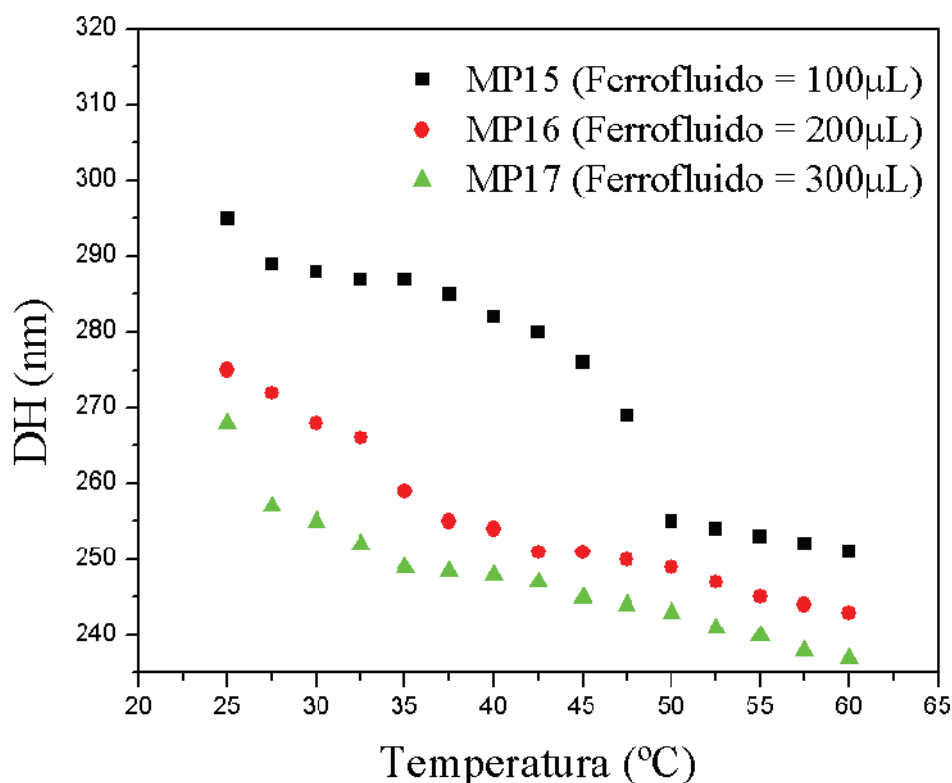


Figura 4.14. Influência da quantidade de ferrofluido na sensibilidade à temperatura dos nanogéis magnéticos de PNVCL.

Como visto anteriormente, o aumento da quantidade de ferrofluido leva a uma diminuição no DH, devido ao aumento da interação entre as nanopartículas magnéticas e os grupos amida presentes nas moléculas de NVCL. A Figura 4.14 mostra que o aumento da quantidade de ferrofluido leva, ainda, a uma diminuição da sensibilidade à temperatura da PNVCL. Uma vez que o grau de intumescimento dos nanogéis em temperatura abaixo da LCST é maior quando uma menor quantidade de ferrofluido é utilizada nas sínteses, as moléculas de água são expelidas mais facilmente quando a temperatura é aumentada acima da LCST.

4.10.2. Espectrometria de FTIR

Com o objetivo de avaliar qualitativamente a incorporação das nanopartículas de óxido de ferro nos nanogéis de PNVCL, os produtos das reações MP15, MP16 e MP17, assim como uma amostra das nanopartículas magnéticas puras, foram caracterizados por

infravermelho (FTIR). Estas análises tiveram como objetivo confirmar a presença da ligação Fe-O proveniente das nanopartículas de Fe_2O_3 e Fe_3O_4 . Dessa forma, a Figura 4.15 apresenta uma comparação entre os espectros de FTIR das nanopartículas de óxido de ferro e dos nanogéis magnéticos sintetizados utilizando-se diferentes quantidades de Fe_3O_4 .

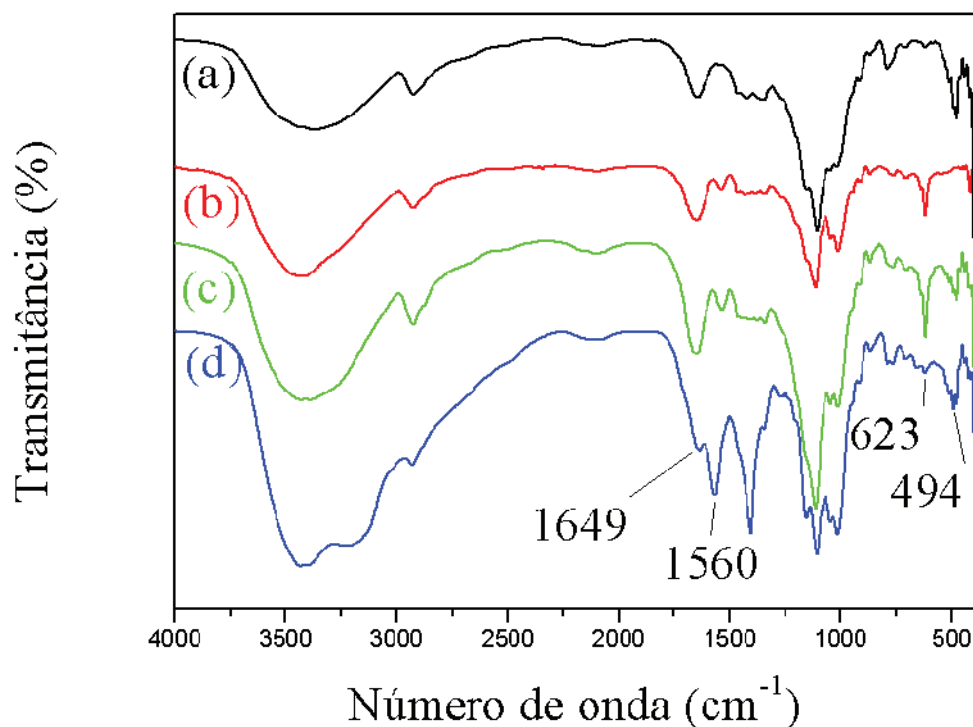


Figura 4.15. Espectros de infravermelho (FTIR) nas nanopartículas magnéticas puras (A) e dos nanogéis à base de PNVCL sintetizados com diferentes quantidades de ferrofluido (B) 100 μL , (C) 200 μL e (D) 300 μL .

Inicialmente, através da análise das bandas de absorção características das vibrações de $\text{Fe}^{2+}-\text{O}^{2-}$ e $\text{Fe}^{3+}-\text{O}^{2-}$ em 494 e 623 cm^{-1} , foi possível verificar um aumento da concentração de Fe_3O_4 no produto da síntese realizada com uma quantidade maior de ferrofluido. Por outro lado, a presença da banda referente à ligação C=O de amidas pode ser visualizada em, aproximadamente, 1650 cm^{-1} , nos espectros dos produtos das reações MP15, MP16 e MP17. Estas bandas não foram observadas no espectro das nanopartículas puras de Fe_3O_4 , revestidas com dextrana, evidenciando, assim, a presença dos nanogéis termo-sensíveis à base de PNVCL.

4.10.3. Análises termo-gravimétricas (TGA)

A Figura 4.16 apresenta os resultados de TGA dos nanogéis magnéticos termo-sensíveis. Em todos os casos, pode-se observar uma perda de massa significativa próxima a 300 °C.

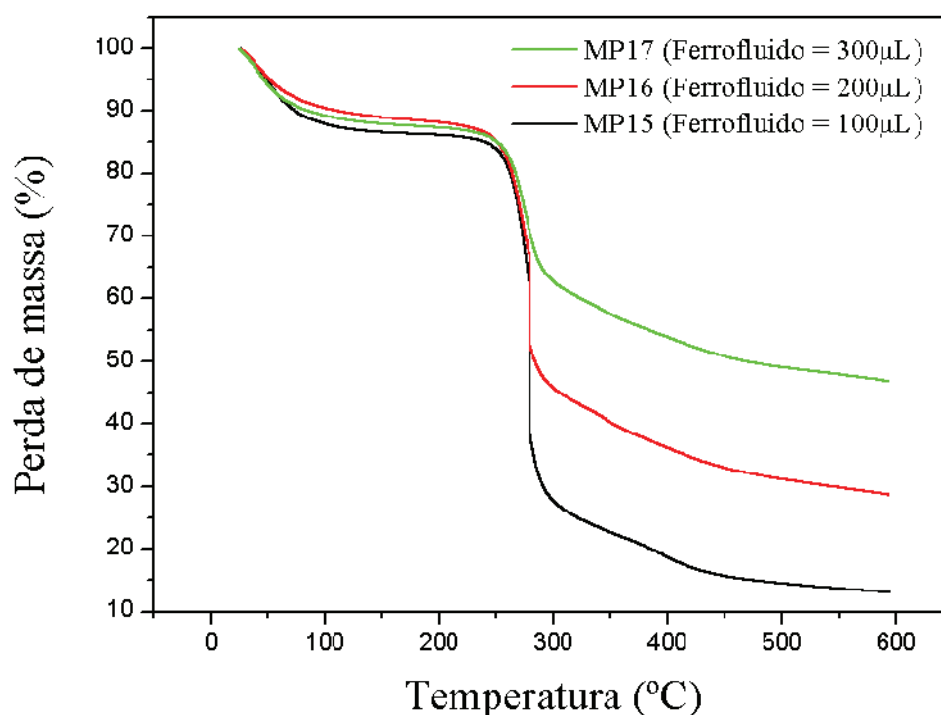


Figura 4.16. Curvas de TGA dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL sintetizados com diferentes quantidades de ferrofluido.

A partir dos dados de massa residual obtidos na Figura 4.16 e da porcentagem teórica de Fe_3O_4 , introduzida no preparo das miniemulsões, foi possível calcular a porcentagem das nanopartículas magnéticas incorporadas nos nanogéis termo-sensíveis para as amostras sintetizadas com diferentes quantidades de ferrofluido. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.3

Tabela 4.3. Porcentagem das nanopartículas de óxido de ferro incorporadas nos nanogéis à base de PNVCL.

Reação	Porcentagem de Fe_3O_4 adicionada nas sínteses (COF_I)	Porcentagem experimental de Fe_3O_4 (COF_F)	Porcentagem de Fe_3O_4 incorporada nos nanogéis, NPM (%)
MN15	21,3	13,0	61,0
MN16	42,6	28,7	67,3
MN17	63,9	46,8	73,2

Porcentagem de incorporação (%) = (% experimental de Fe_3O_4 nas partículas secas/% de Fe_3O_4 introduzidas nas sínteses)*100

A Tabela 4.3 mostra a porcentagem das nanopartículas magnéticas incorporadas nos nanogéis à base de PNVCL, sintetizados com diferentes porcentagens de óxido de ferro. Pode-se observar que o aumento da quantidade de ferrofluido no meio reacional leva a um aumento na incorporação das nanopartículas de Fe_3O_4 , o que significa, obviamente, a presença de uma quantidade maior de nanopartículas magnéticas nos nanogéis termo-sensíveis à base de PNVCL.

4.10.4. Difractometria de raios X

A Figura 4.17 apresenta os difratogramas de raios X, obtidos das nanopartículas de óxido de ferro complexadas com dextrana, dos nanogéis à base de PNVCL puros e dos nanogéis magnéticos termo-sensíveis, sintetizados nas reações MP15, MP16 e MP17.

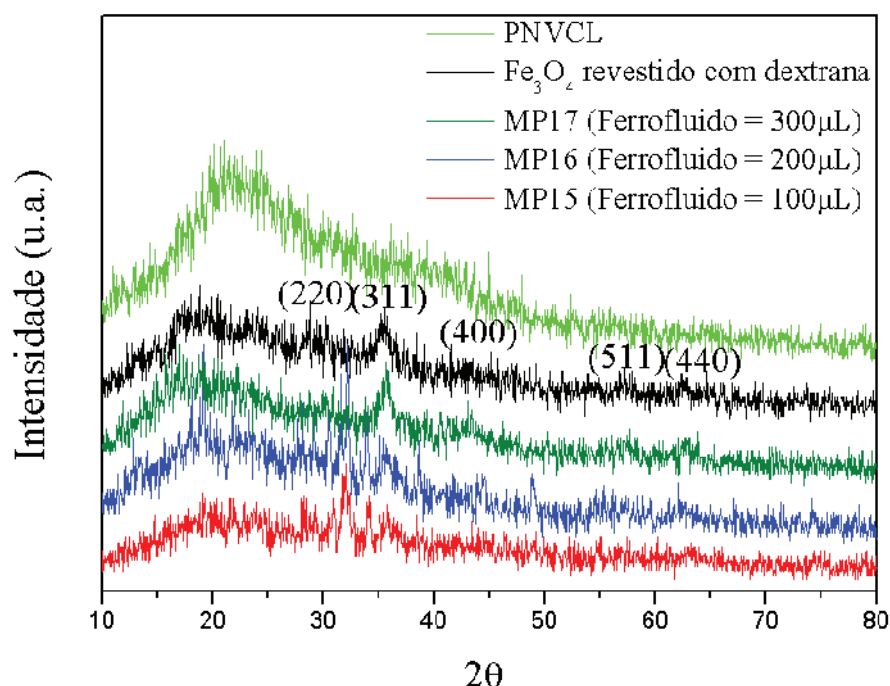


Figura 4.17. Difratomogramas de raios X das nanopartículas de óxido de ferro puras, do nanogel termo-sensível e dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL.

Pode-se observar nesta figura, primeiramente, a presença dos cinco picos característicos das nanopartículas de óxido de ferro em todas as amostras contendo as nanopartículas magnéticas. Estes picos, os quais não estão presentes no difratograma da amostra do nanogel de PNVCL puro, estão marcados por seus índices (220), (311), (400), (333) e (440), e revelam a presença das estruturas cristalinas de Fe_3O_4 nestas amostras. Além disso, para os nanogéis à base de PNVCL sintetizados com diferentes quantidades de ferrofluido, observa-se uma diminuição destes respectivos picos com a redução da quantidade de nanopartículas de Fe_3O_4 , o que confirma a presença da PNVCL na superfície das nanopartículas magnéticas.

4.10.5. Medidas de magnetização

A Figura 4.18 apresenta as curvas de histerese e as medidas de magnetização em função da massa de amostra, obtidas das nanopartículas de óxido de ferro revestidas com dextrana e dos nanogéis obtidos nas reações MP15, MP16 e MP17.

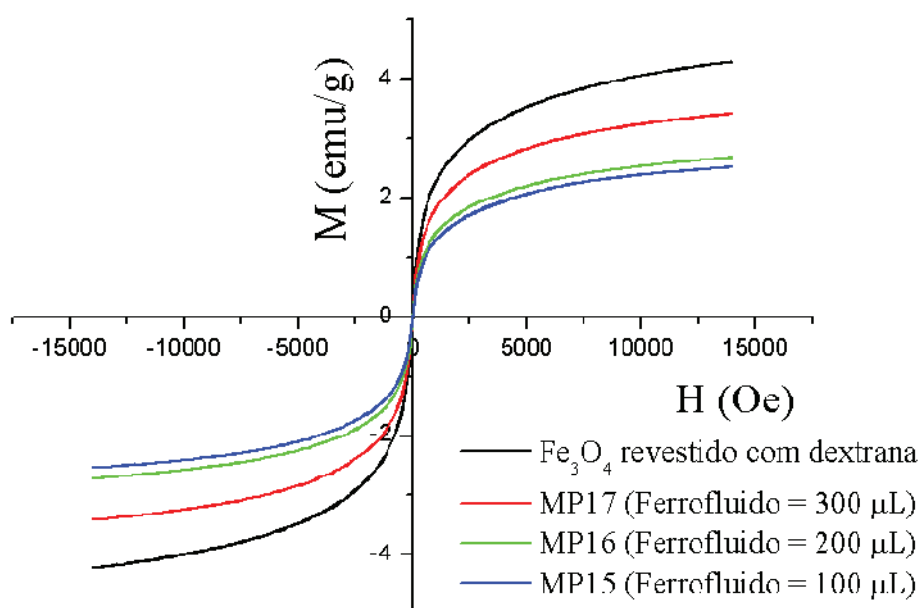


Figura 4.18. Curvas de magnetização obtidas para as nanopartículas de óxido de ferro puras e para os nanogéis magnéticos sintetizados com diferentes quantidades de ferrofluido.

Os valores de magnetização de saturação de nanopartículas de óxido de ferro são, em geral, superiores a 60 emu/g. No entanto, neste caso, foi obtido um valor de 4,3 emu/g para a magnetização de saturação das nanopartículas magnéticas complexadas com dextrana. Sabe-se que a energia de uma partícula magnética em um campo externo é proporcional ao seu tamanho e às suas características de superfície. A presença de moléculas de dextrana reduz significativamente a magnetização de saturação devido ao seu tamanho, reduzindo o momento magnético da amostra. Esta redução foi, ainda, mais significativa nos nanogéis sintetizados com diferentes quantidades de ferrofluido, obtendo-

se valores de magnetização de 3,4, 2,7 e 2,5 emu/g para os nanogéis sintetizados com 300, 200 e 100 μL de ferrofluido, respectivamente, confirmando, assim, a presença da PNVCL na superfície das nanopartículas. A partir destes valores foi possível estimar a eficiência de incorporação do óxido de ferro para os nanogéis sintetizados com diferentes concentrações das partículas magnéticas. Os resultados obtidos foram de 79,1, 62,8 e 58,1 % nos nanogéis sintetizados com 300, 200 e 100 μL de ferrofluido, respectivamente, os quais estão de acordo com os resultados obtidos nas análises termo-gravimétricas, apresentados na seção 4.10.3.

4.10.6. Morfologia dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL

As nanopartículas de óxido de ferro, complexadas com dextrana e os nanogéis magnéticos à base de PNVCL sintetizados com diferentes quantidades de ferrofluido foram, então, caracterizados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). Estas análises foram realizadas visando avaliar o tipo de estrutura e as características morfológicas das nanopartículas obtidas pelo processo de polimerização em miniemulsão. A Figura 4.19 apresenta as imagens obtidas das nanopartículas de óxido de ferro complexadas com dextrana. A Figura 4.20 apresenta as imagens de TEM do nanogel magnético sintetizado com 300 μL de ferrofluido.

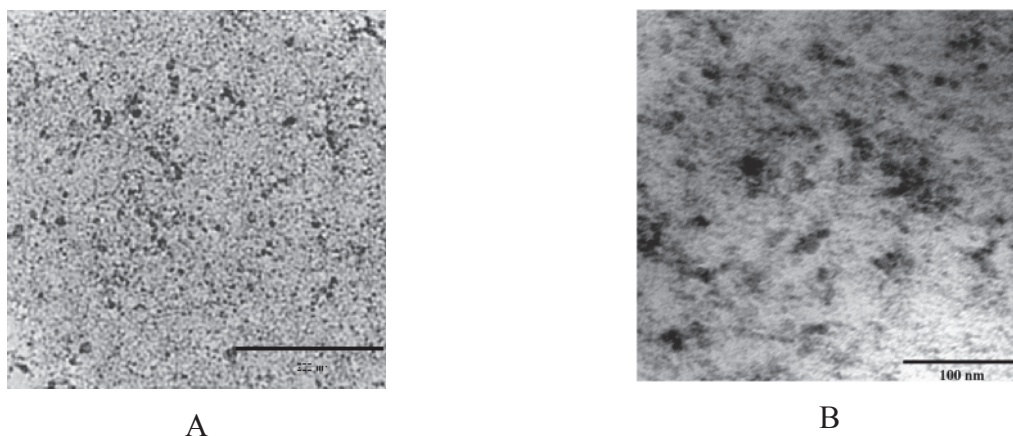
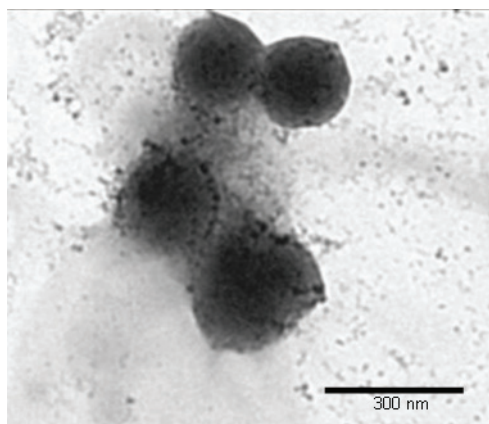
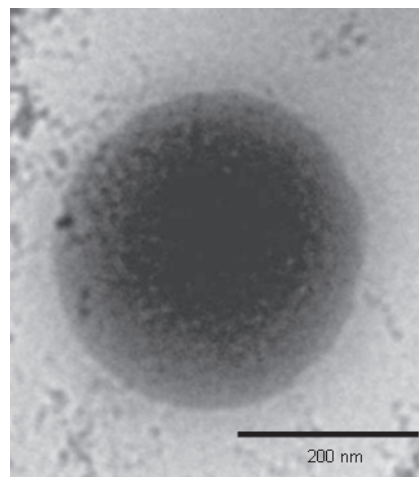


Figura 4.19. Micrografias de TEM das nanopartículas de óxido de ferro complexadas com dextrana.



A



B

Figura 4.20. Micrografias de TEM do nanogel magnético sintetizado com 300 μ L de ferrofluido (reação MP17).

Através da Figura 4.19 pode-se visualizar as nanopartículas de óxido de ferro, enquanto que a partir da Figura 4.20 pode-se obter uma informação importante em relação à estrutura dos nanogéis magnéticos termo-sensíveis. Na imagem B na Figura 4.20 é possível observar uma região mais escura, a qual é atribuída ao núcleo formado pelas nanopartículas magnéticas distribuídas no interior do nanogel, enquanto a outra região, mais clara, é atribuída ao revestimento mais hidrofílico de PNVCL.

Capítulo 5

5. Conclusões

Nanogéis de poli(NVCL-*co*-AA), sensíveis tanto a temperatura quanto ao pH, podem ser obtidos utilizando-se a polimerização por precipitação. Os resultados mostraram que as concentrações de AA, MBA e KPS influenciam no diâmetro das partículas, no intumescimento e na sensibilidade à temperatura dos nanogéis.

Através deste estudo, confirmou-se que, além da massa molecular, a utilização de AA como comonomero nas copolimerizações também influencia a LCST da PNVCL, devido à presença de grupos hidrofílicos, os quais promovem um aumento da hidrofiliabilidade do copolímero. Além disso, pelo fato do ácido acrílico possuir grupos carboxílicos ionizáveis, os nanogéis apresentaram maior estabilidade quando as reações foram realizadas ajustando-se o pH do meio reacional em 5, ou seja, acima do pK_a deste monômero.

O aumento da concentração de MBA levou a um aumento do diâmetro médio das partículas. Este resultado pode ser justificado pela maior reatividade do MBA, em relação à NVCL e ao AA, o qual é consumido preferencialmente durante o início da polimerização. Este fato, associado à maior solubilidade do MBA em água, em relação aos outros monômeros (NVCL e AA), leva a um aumento do tamanho crítico de cadeias para que haja precipitação dos oligômeros formados na fase aquosa.

O aumento da concentração de iniciador de 0,5 para 1 % (m/m) resultou em uma ligeira diminuição dos diâmetros dos nanogéis. No entanto, aumentando-se, ainda a concentração de KPS, efeito oposto foi observado, o que pode ser atribuído ao aumento da probabilidade dos radicais formados de reagirem com moléculas do agente reticulante. Este resultado pode estar relacionado, ainda, com o aumento da velocidade de precipitação de oligômeros e da velocidade de coagulação de núcleos instáveis, originando, assim, partículas maiores.

Além da sensibilidade à temperatura, os nanogéis também apresentaram sensibilidade ao pH, o que também era esperado, devido à presença do AA nas macrocadeias. Diante dos resultados obtidos foi possível verificar que podemos modular o produto final de acordo com a aplicação proposta para o material, através do ajuste das variáveis de síntese.

O processo de polimerização em miniemulsão inversa (a/o) é um eficiente método para a preparação de nanogéis termo-sensíveis de PNVCL. Verifica-se, neste estudo que a NVCL pode ser emulsificada em solventes apolares, como o *n*-hexadecano e o ciclohexano. Para a estabilização osmótica das gotas de monômero e prevenção contra a degradação de Ostwald, a adição de NaCl à fase aquosa contendo o monômero mostrou ser uma alternativa eficaz, aumentando, significativamente, a estabilidade das miniemulsões.

Partículas com diâmetros reduzidos, variando entre 150 e 700 nm, foram obtidas utilizando-se diferentes concentrações de Span 80 como surfatante solúvel na fase contínua e diferentes quantidades de água. O aumento da concentração de Span 80 acima da CMC resultou em um aumento no diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis. Além disso, a velocidade de polimerização diminuiu com o aumento da concentração de Span 80.

As análises de diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura mostraram a sensibilidade dos nanogéis à temperatura e as micrografias de TEM revelaram a morfologia esférica das nanopartículas.

Os resultados obtidos mostram que a utilização do processo de polimerização em miniemulsão inversa possibilitou a obtenção de nanopartículas de PNVCL com estruturas homogêneas. Este fato é essencialmente importante para o estudo deste sistema para a encapsulação de princípios ativos para aplicações biomédicas *in vivo*.

A polimerização em miniemulsão inversa é, também, um eficiente método para a encapsulação de nanopartículas magnéticas e obtenção de sistemas sensíveis a múltiplos estímulos. O diâmetro hidrodinâmico dos nanogéis magnéticos pode ser controlado pelos fatores de síntese, tais como quantidade de ferrofluido, tipo de iniciador, concentração de agente reticulante e surfatante. A incorporação das nanopartículas de óxido de ferro nos nanogéis termo-sensíveis de PNVCL foi comprovada através de análises de FTIR, difratometria de raios X, TG, medidas de magnetização e TEM. A eficiência de incorporação foi obtida através de análises termo-gravimétricas (TG) e medidas de magnetização, as quais também comprovaram as propriedades magnéticas dos nanogéis. Finalmente, as análises de microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a obtenção de nanogéis com morfologia esférica, com a presença das nanopartículas de óxido de ferro no interior e da PNVCL na superfície.

Capítulo 6

6. Sugestões para trabalhos futuros

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir:

- A incorporação de nanopartículas magnéticas nos nanogéis à base de poli(NVCL-co-AA) utilizando a polimerização por precipitação. Algumas reações já foram realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho, utilizando o ferrofluido aquoso constituído de nanopartículas de óxido de ferro complexadas com dextrana. No entanto, após o início da polimerização, a formação de oligômeros na fase aquosa induziu à agregação das nanopartículas magnéticas, as quais perderam a estabilidade e sedimentaram no fundo do reator. Uma vez que estamos estudando a obtenção de partículas poliméricas com propriedades magnéticas para aplicações biomédicas, principalmente, *in vivo*, o tamanho das partículas, em escala nanométrica, é de fundamental importância, e a formação de agregados deve ser sempre evitada. Dessa forma, para a otimização da técnica de polimerização por precipitação para a obtenção de tais sistemas, vários outros experimentos são necessários, principalmente, variando a composição das nanopartículas de óxido de ferro, visando modificar a interação entre as nanopartículas magnéticas e as cadeias poliméricas.
- A substituição do agente reticulante (*N,N'*-metileno-bis-acrilamida ou MBA), utilizado nas sínteses dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL via polimerização em miniemulsão inversa, por uma agente reticulante biocompatível, como por exemplo, o dimetacrilato de etileno glicol (EGDMA).
- A utilização de uma molécula fluorescente hidrossolúvel nas sínteses dos nanogéis magnéticos à base de PNVCL via polimerização em miniemulsão inversa, a qual permite uma rápida e fácil visualização do tamanho e da polidispersidade tanto das gotas de monômero quanto das partículas de polímero.
- A substituição da dextrana por outra molécula biocompatível, como por exemplo, o etileno glicol, no revestimento das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.

-
- A complexação de nanopartículas de óxido de ferro com agentes de polimerização via radical livre controlada, que permitam a polimerização da NVCL a partir da superfície destas nanopartículas, visando o aumento da eficiência de encapsulação e a obtenção de partículas poliméricas, com propriedades magnéticas, com estreita polidispersidade de tamanho de partículas.
 - A encapsulação de um princípio ativo hidrossolúvel, após a substituição do MBA pelo EGDMA, utilizando a técnica de polimerização em miniemulsão inversa, bem como a realização de um estudo da sua cinética de liberação *in vitro*, a partir das nanopartículas termo-sensíveis.
 - O estudo da encapsulação de nanopartículas magnéticas nos homopolímeros de NVCL previamente sintetizados com diferentes massas moleculares, bem como do efeito da massa molecular nas propriedades do material magnético obtido.
 - A encapsulação de um princípio ativo nas partículas poliméricas de PNVCL, com propriedades magnéticas, obtidas a partir de técnicas que utilizam polímeros pré-formados.

Referências

7. Referências

ALEVIZAKI, C.; MOLFETAS, M.; SAMARTZIS, A.; VLASSOPOULOU, B.; VASSIPOULOS, C.; RONDOGIANNI, P.; KOTTOU, S.; HADJICONSTANTINO, V.; ALEVIZAKI, M. Iodine 131 treatment for differentiated carcinoma in patients with end stage renal failure: dosimetric, radiation safety, and practical considerations. **Hormones**, v. 5, p. 276-287, 2006.

ALEXIOU, C.; ARNOLD, W.; KEIN, R. J.; PARAK, F. G.; HULIN, P.; BERGEMENN, C.; ERHARDT, W.; WAGENPFEIL, S.; LÜBBE, A. S. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. **Cancer Research**, v. 60, p. 6641-6648, 2000.

ALKSNE, J. F.; FINGERHUT, A. G.; RAND, R. W. Magnteic probe for the stereotactic thrombosis of intracranial aneurysms. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 30, p. 159-162, 1967.

ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Reversible adsorption by a pH-and tempearture-sensitive acrylic hydrogel. **Journal of Controlled Release**, v. 80, p. 247-257, 2002.

AMMOURY, N.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F.; BENITA, S. In vitro release kinetic pattern of indomethacin from poly(D,L-Lactide) nanocapsules. **Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 79, n. 9, p. 763-767, september 1990.

ANDRATSCHKE, M.; GILDEHAUS, F. J.; JOHANNSON, V.; SCHMITT, B.; MACK, B.; REISBACH, G.; LANG, S.; LINDHOFER, H.; ZEIDLER, R.; WOLLENBERG, B.; LUEBBERS, C. W. Biodistribution and radioimmunotherapy of SCCHN in xenotransplantated SCID mice with a 131I-labeled anti-EpCAM nonoclonal antibody. **Anticancer Research**, v. 27, p. 431-436, 2007.

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

ARRUEBO, M.; VALLADARES, M.; GONZÁLES-FERNÁNDEZ, A. Antibody, conjugated nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Nanomaterials**, v. 2009, p. 1-24, 2009.

ASOH, T.; KANEKO, T.; MATSUSAKI, M.; AKASHI, M. Rapid deswelling of semi-IPNs with nanosized tracts in response to pH and temperature. **Journal of Controlled Release**, v. 110, p. 387-394, 2006.

ASTALAN, A. P.; AHRENTORP, F.; JOHANSSON, C.; LARSSON, K.; KROZER, A. Biomolecular reactions studied using changes in brownian rotation dynamics of magnetic particles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 945-951, 2004.

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

BALDASCINI, H.; KLAASSIEN, J.; GANZVELD, J.; JANSSEN, D. B.; BEENACKRES, A. A. C. M. Effect of mass transfer limitations on the enzymatic resolution of epoxides in a two-liquid-phase system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 73, p. 44-54, 2001.

BEHARI, K.; TAUNK, K.; DAS, R. Polymerization of acrylamide and methacrylamide initiated by a potassium peroxydiphosphate/Mn(II) system. **Polymer International**, v. 46, p. 126-130, 1998.

BERGEMANN, C.; MÜLLER-SCHULTE, D.; OSTER, J.; BRASSARD, L.; LÜBBE, A. S. Magnetic ion-exchange nano- and microparticles for medical, biochemical and molecular biological applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 194, p. 45-52, 1999.

BERRY, C. C. Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 42, p.1-9, 2009.

BRANDRUP, J.; IMMERGUT, E. H.; GRULKE, E. A. **Polymer Handbook**. New York: Wiley, 1999.

BREAST CANCER. Disponível em WHO website: http://en.wikipedia.org/wiki/Breast_cancer. Acesso em: 24/04/2010.

- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 631-65, 2002.
- BRIJITTA, J.; TATA, B. V. R.; KALIYAPPAN, T. J. Phase behavior of poly(*N*-isopropylacrylamide) nanogel dispersions: temperature dependent particle size and interactions. **Nanoscience Technology**, v. 9, p. 5323-5328, 2009.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 631-651, 2002.
- BULMUS, V.; DING, Z.; LONG, C. J.; STAYTON, P. S.; HOFFMAN, A. S. Site-specific polymer-streptavidin bioconjugate for pH-controlled binding and triggered release of biotin. **Bioconjugate Chemistry**, v. 11, p. 78-83, 2000.
- BUONO, S.; BURGIO, N.; HAMOUDEH, M.; FESSI, H.; HILTBRAND, E.; MACIOCCO, L.; HUMBERT, S. M. Brachytherapy: state of the art and possible improvements. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 411-424, 2007.
- BURNS, M. A.; KVESITADZE, G. I.; GRAVES, D. J. Dried calcium alginate/magnetite spheres: a new support for chromatographic separations and enzyme immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 137-145, 1985.
- CAO, Z. H.; SHAN, G. R.; SHEIBAT-OTHMAN, N.; PUTAUX, J. L.; BOURGEAT-LAMI, E. Synthesis of oily core-hybrid shell nanocapsules through interfacial free radical copolymerization in miniemulsion: droplet formation and nucleation. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 48, p. 593-603, 2010.
- CAPEK I. On inverse miniemulsion polymerization of conventional water-soluble monomers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 22, p.35-61, 2010.
- CHAKAROVA, A.; KARANOV, S.; PETKOVA, E.; BACARDJIEV, S.; BOGDANOV, G. Brachytherapy after laser recanalization versus external beam radiotherapy after laser recanalization versus laser alone in inoperable oesophagocardial cancer: a controlled pilot study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 10, p. 511-516, 2005.

CHAN, D. C. F.; KIRPOTIN, D. B.; BUNN Jr, P. A. Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxide for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 122, p. 374-378, 1993.

CHEE, C. K.; RIMMER S.; SOUTAR I.; SWANSON L. Fluorescence investigations of the conformational behaviour of poly(*N*-vinylcaprolactam). **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, p.1-11, 2006.

CHEN, B.; LAI, B.; CHENG, J.; XIA, G.; GAO, F.; XU, W.; DING, J.; GAO, C.; SUN, X.; XU, C.; CHEN, W.; CHEN, N.; LIU, L.; LI, X.; WANG, X. Daunorubicin-loaded magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ overcome multidrug resistance and induce apoptosis of K562-n/VCR cells in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, p. 201-208, 2008.

CHEUNG, D. L.; BON, S. A. F. Interaction of nanoparticles with ideal liquid-liquid interfaces, **Physical Review Letters**, v. 102, p. 1-4, 2009.

CHUNFU, Z. ; JINQUAN, C.; DUANZHI, Y.; YONGXIAN, W.; YANLIN, F.; JIAJU, T. Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 61, p. 1255-1259, 2004.

COLARD, C. A. L. ; CAVE, R. A. ; GROSSIORD, N. ; COVINGTON, J. A. ; BON, S. A. F. Conducting nanocomposite polymer foams from ice-crystal templated assembly of mixtures of colloids, **Advanced Materials**, v. 21, p. 2894-2898, 2009.

COLLINSON, E.; DANTON, F. S.; MCNAUGHTON, G. S. The polymerization of acrylamide in aqueous solution. Part 2.—The effect of ferric perchlorate on the X- and - ray initiated reaction. **Trans Faraday Society**, v. 53, p. 476, 1957.

COPERTEC—INSPEÇÕES E ENGENHARIA, www.copertec.com/ensaio_particulas.htm.

COUTINHO, F. M. B. ; OLIVEIRA C. M. F. **Reações de Polimerização em Cadeia**. Rio de Janeiro: Interciência Publishing Company, 2006.

CRAIG, D; **Magnetism: Principles and Applications**. Chichester :Wiley, 1995.

- CRUZ, D. J. O.; UCKUN, M. F. Gel-microemulsions as vaginal spermicidal and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception, Stoneham**, v. 64, p. 113-123, 2001.
- CURY, J. A.; SEILS, J.; KOO, H. Isolation and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* in suspension cultures and biofilms. **Brazilian Oral Research**, v. 22, p. 216-222, 2008.
- DAINTON, F. S.; TORDOFF, M. The polymerization of acrylamide in aqueous solution. Part-4.- The ferric ion photosensitized reaction at 25 °C and the burial-emergence cycle. **Trans Faraday Society**, v. 53, p. 666, 1973.
- DIMITROV, I.; TRZEBICZA, B.; MÜLLER, A. H. E.; DWORAK, A.; TSVETANOV, C. B. Thermosensitive water-soluble copolymers with doubly responsive interacting entities. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 1275-1343, 2007.
- DI PINTO, A.; FORTE, V. T.; GUASTADISEGNI, M. C.; MARTINO, C.; SCHENA, F. P.; TANTILLO, G. A comparison of DNA extraction methods for food analyses. **Food Control**, v. 18, p. 76-80, 2007.
- DOBSON, J. Magnetic micro-and nano-particle based targeting for drug delivery. **Nanomedicine**, v. 1, p. 31-37, 2006
- DURACHER, D.; ELAISSARI, A.; PICHOT, C. Preparation of poly(N-isopropylmethacrylamide) latexes kinetic studies and characterization. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 37, p. 1823, 1999.
- ELAISSARI, A. Magnetic latex particles in nanobiotechnologies for biomedical diagnostic applications: State of the art. **Macromolecular Symposia**, v. 281, p. 14-19, 2009.
- FANG, C.; ZHANG, M. Multifunctional magnetic nanoparticles for medical imaging applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p. 6258-6266, 2009.
- FARAJI, M.; YAMINI, Y.; REZAEI, M. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications, **Journal Iranian Chemical Society**, v. 7, p. 1-37, 2010.
- FAUCHEU, J.; GAUTHIER, C.; CHAZEAU, L.; CAVAILLÉ, J. Y. ; MELLON V. ; BOURGEAT-LAMI, E. Miniemulsion polymerization for synthesis of structured

clay/polymer nanocomposites: Short review and recent advances. **Polymer**, v. 51, p. 6-17, 2010.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. ; AMMOURY, N. ; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 301-313, 2005.

FORTIN, J. P.; GAZEAU, F. Intracellular heating of living cells through Néel relaxation of magnetic nanoparticles. **Eur Biophys Journal**, v. 37, p. 223-228, 2008.

FUJIWARA, M.; GRUBBS, R. H.; BALDESCHWIELER, J. D. Characterization of pH-Dependent Poly(acrylic Acid) Complexation with Phospholipid Vesicles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 185, p. 210–216, 1997.

GAHARWAR, A. K.; WONG, J. E.; MÜLLER-SCHULTE, D.; BAHADUR, D.; RICHTERING, W. Magnetic nanoparticles encapsulated within a thermoresponsive polymer. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, p. 5355-5361, 2009.

GAZEAU, F.; LÉVY, M.; WILHELM, C. Optimizing magnetic nanoparticle design for nanothermotherapy, **Nanomedicine**, v. 3, p. 831-844, 2008.

GILBERT, R.G. **In Emulsion polymerization. A mechanistic approach**. New York: Academic Press, 1995.

GILLIES G. T., RITTER R. C., BRADDUS W. C., GRADY M. S., HOWARD M. A. MCNEIL R. G. Magnetic manipulation instrumentation for medical physics research. **Review of Scientific Instruments**, v. 65, p. 533-562, 1994.

GROMAN, E. V.; REINHARDT, C. P. Hepatocyte asialoglycoprotein receptor assay using stable isotopes and neutron activation analysis. **Clinical Chemistry**, v. 46, p. 1519-1521, 2000.

GUEDES, M. H. A.; SADEGHIANI, N.; PEIXOTO, D. G.; COELHO, J. P.; BARBOSA, L. S.; AZEVEDO, R. B.; KUCKELHAUS, S.; SILVA, M. F.; MORAIS, P. C.;

GUERRERO, Z.; LACAVA, M. Effects of AC magnetic field and carboxymethyldextran-coated magnetite nanoparticles on mice peritoneal cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 283-286, 2005.

GUPTA, P. K.; HUNG, C. T. Magnetically controlled targeted chemotherapy. In: Willmott, N ; Daly , J.. **Microspheres and Reginal Cancer Therapy**. CRC Press: Boca Raton, 1994, p. 71-116

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

GUPTA, P. K.; HUNG, C. T. Magnetically controlled targeted micro-carrier systems. **Life Science**, v. 44, p. 175-186, 1989.

GUYOT, A.; LANDFESTER, K.; SCHORK, F. J.; WANG, C.. Hybrid polymer latexes. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 1439-1461, 2007.

HACKER, A.; ALKEN P. Therapy options in relapsing prostate cancer after external radiation therapy. **Urologe A**, v. 46, p. 429-437, 2007.

GRÜTTNER, C.; TELLER, J; SCHÜTT, W.; WESTPHAL, F; SCHÜMICHEN, C.; PAULKE, B-R. Preparation and Characterization of Magnetic Nanospheres for in Vivo Application. HÄFELI, U; SCUTT, W.; TELLER, J.; ZBOROWSKI, M. **Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers**. New York: Plenum, 1997

HÄFELI, U. O. Magnetically modulated therapeutic systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 277, p. 19-24, 2004.

HÄFELI, U. The history of magnetism in medicine. In: ANDRÄ, W., NOWAK, H. **Magnetism in Medicine: A Handbook**. Berlin: Wiley, 2007.

HAMOUEDEH, M.; FESSI, F. Preparation, characterization and surface study of poly-epsilon caprolactone magnetic microparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 300, p. 584-590, 2006.

HAMOUEDEH, M.; SALIM, H. BARBOS, D.; PAUNOIU, C.; FESSI, H. Preparation and characterization of radioactive dirhenium decacarbonyl-loaded PLLA nanoparticles for

radionuclide intra-tumoral therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 597-611, 2007.

HASHIMOTO, M.; GARSTECKI, P.; STONE, H. A.; WHITESIDES, G. M. Interfacial instabilities in a microfluidic Hele-Shaw cell. **Soft Materials**, v. 4, p. 1403-1413, 2008.

HIERGEIST, R.; ANDRA, W.; BUSKE, N.; HERGT, R.; HILGER, I.; RICHTER, U.; KAISER, W. Application of magnetite ferrofluids for hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 201, p. 420-422, 1999.

HIGUCHI, W. I.; MISRA, J. Physical Degradation of Emulsions Via the Molecular Diffusion Route and the Possible Prevention Thereof. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 459-466, 1962.

HONG, R. Y.; FENG, B.; CHEN, L. L.; LIU, G. H.; LI, H. Z.; ZHENG, Y.; WEI, D. G. Synthesis, characterization and IRM application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 290-300, 2008.

HORÁK, D.; RITTTICH, B.; SAFÁ, J.; SPANOVÁ, A.; LENFELD, J.; BENES, M. J. Properties of RNase a immobilized on magnetic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) microspheres. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 447-452, 2001.

HU, S-H.; LIU, T-Y.; LIU, D-M.; CHEN, S-Y. Controlled pulsatile drug release from a ferrogel by a high-frequency magnetic field. **Macromolecules**, v. 40, p. 6786-6788, 2007.

IMAZ, A.; FORCADA, J. *N*-Vinylcaprolactam-based microgels: effect of the concentration and type of cross-linker. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 46, p. 2766-2775, 2008.

IMAZ, A.; FORCADA, J. *N*-Vinylcaprolactam-based microgels: synthesis and characterization. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 46, p. 2510-2524, 2008.

IMAZ, A.; FORCADA, J. Optimized buffered polymerizations to produce *N*-vinylcaprolactam-based microgels. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 3164-3175, 2009.

INOUE, T.; CHEN, G.; NAKAMAE, K.; HOFFMAN, A. S. Temperature sensitivity of a hydrogel containing different LCST oligomers grafted to the hydrogel backbone. **Polymers Gels and Networks**, v. 5, p. 561-575, 1997.

ISHIGE, T.; HAMIELEC, A. E. Solution polymerization of acrylamide to high conversion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 17, p. 1479-1506, 1973.

JEONG, B.; GUTOWSKA, A. Lessons from nature: Stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. **Biotechnology**, v. 20, p.305-311, 2002.

JIN, H.; KANG, K. A. Application of novel metal nanoparticles as optical/thermal agents in optical mammography and hyperthermic treatment for breast cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 599, p. 45–52, 2007.

JOHANNSEN, M. Thermotherapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles: feasibility, imaging, and three-dimensional temperature distribution. **European Urology**, v. 52, p. 1653-1662, 2007.

JOVANOVIC, R.; DUBÉ, M. A. Solvent effects in butyl acrylate and vinyl acetate homopolymerizations in toluene. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 94, p. 871-876, 2004.

KALUGIN, D. I.; TALYZENKOV, Y. A.; LACHINOV, M. B. Radical polymerization of *N*-vinylcaprolactam in benzene solutions in a wide conversion range. **Polymer Science Part B**, v. 50, p. 299-304, 2008.

KAWAGUCHI, H. Thermosensitive hydrogel microspheres. In Arshaday; R. **Microspheres, Microcapsules & Liposomes**. 1999, v.1, p. 237-252.

KHAN, A. Preparation and characterization of magnetic nanoparticles embedded in microgels. **Materials Letters**, v. 62, p. 898-902, 2008.

KHAN, A. A.; HABIBA, U.; KHAN, A. Synthesis and Characterization of Organic-Inorganic Nanocomposite Poly-o-anisidine Sn(IV) Arsenophosphate: Its Analytical Applications as Pb(II) Ion-Selective Membrane Electrode. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2009, p. 1-10, 2009.

- KIM, D. K.; MIKHAYLOVA, M.; ZHANG, Y.; MUHAMMED, M. Protective coating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Materials Chemistry Division**, v. 15, p. 1617-1627, 2003.
- KIRSH, Y. E.; YANUL, N. A.; POPKOV, Y. M. Temperature behavior of thermo-responsive poly-*N*-vinylcaprolactam and poly-*N*-isopropylmethacrylamide in aqueous solutions involving organic solutes. **European Polymer Journal**, v.38, p.403-406, 2002.
- KOENIG, S. H. Molecular basis of magnetic relaxation of water protons of tissue. **Academic Radiology**, v. 3, p. 597-606, 1996.
- KONAK, C.; PANEK, J.; HRUBÝ, M. Thermoresponsive polymeric nanoparticles stabilized by surfactants. **Colloid and Polymer Science**, v. 285, p. 1433-1439, 2007.
- KOROLEVA, M. Y.; YURTOV, E. V. Effect of ionic strength of dispersed phase on Ostwald ripening in water-in-oil emulsions. **Colloid Journal**, v. 65, p. 40-43, 2003.
- KOST, J.; WOLFRUM, J.; LANGER, R. Magnetically enhanced insulin release in diabetic rats. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 21, p. 1367-1373, 1987.
- KOUASSI, G. K.; IRUDAYARAJ, J. A nanoparticle-based immobilization assay for prion-kinetics study. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 4, p. 8, 2006.
- KRATZ, K.; HELLWEG, T.; EIMER, W. Influence of colloidal poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgels, **Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 170, p. 137-149, 2000.
- KRIZOVÁ, J.; SPANOVÁ, A.; RITTICH, B. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of *Bifidobacterium* species. **Systematic and Applied microbiology**, v. 29, p. 36-44, 2006.
- KUDYSHKIN, V. O.; ABDURAKHMANOVA, T. R.; BOZOROV, N. I.; VOROAEVA, N. L.; RUBAN I. N.; RASHIDOVA, S. S. Radical polymerization of *N*-vinylcaprolactam in isopropanol. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 75, p. 1465-1467, 2002.
- LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for the optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnol Bioeng**, v. 30, p. 81-87, 1987.

LACAVA, L. M.; GARCIA, V. A. P.; KUCKELHAUS, S.; AZEVEDO, R. B.; SADEGHIANI, N.; BUSKE, N.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M. Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272-276, p. 2434-2335, 2004.

LANDFESTER, K.; BECHTHOLD, N.; TIARKS, F.; ANTONIETTI, M. Miniemulsion polymerization with cationic and nonionic surfactants: a new very efficient use of surfactants for heterophase polymerization. **Macromolecules**, v. 32, p. 5222-5228, 1999.

LANDFESTER, K. Miniemulsions for nanoparticle synthesis. **Topics in Current Chemistry**, v. 227, p. 75-123, 2003.

LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. **Macromolecular Rapid Communication**, v. 2, p. 898-936, 2001.

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

LANGEGHEM, F. K. H.; MAIER-HAUFF, K.; JORDAN, A.; HOFFMANN, K. T.; GNEVECKOW, U.; SCHOLZ, R.; THIESEN, B. BRUCK, W.; DEIMLING, A. Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with chemotherapy using magnetic nanoparticles. **Biomaterials**, v. 30, p. 52-57, 2009.

LAU, A. C. W.; WU, C. Thermally sensitive and biocompatible poly(*N*-vinylcaprolactam): synthesis and characterization of high mass linear chains. **Macromolecules**, v. 32, p. 581-584, 1999.

LAUKKANEN, A.; VALTOLA, L.; WINNIK, F. M.; TENHU, H. Thermosensitive graft copolymers of an amphiphilic macromonomer and *N*-vinylcaprolactam: Synthesis and solution properties in dilute aqueous solutions below and above the LCST. **Macromolecules**, v. 46, p. 7055-7065, 2005.

LAUTERBUR, P. C. Image formation by induced local interactions: example employing nuclear magnetic resonance. **Nature**, v. 242, p. 190-191, 1973.

LEO, A.; HANSCH, A.; ELKINS, D. Partition coefficients and their uses. **Chemical Reviews** v. 71, p. 525-616, 1971.

LESLIE-PELECKY, D.; LABHASETWAR, V.; KRAUS Jr, R. H. **Nanobiomagnetics. Materials Research Science and Engineering Center**. Lincoln: University of Nebraska , 2006.

LIN, C-L.; CHIU, W-Y.; DON, T-M. Superparamagnetic thermoresponsive composite latex via W/O miniemulsion polymerizaion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 100, p. 3987-3996, 2006.

LIN, H-R. Solution polymerization of acrylamide using potassium persulfate as an initiator: kinetic studies, temperature and pH dependence. **European Polymer Journal**, v. 37, p. 1507-1510, 2001.

LIU, C.; SHAN, Y.; ZHU, Y.; CHEN, K. Magnetic monolayer film of oleic acid-stabilized Fe₃O₄ particles fabricated via Langmuir-Blodgett technique. **Thin Solid Films**, v. 518, p. 324-327, 2009.

LIU, T. Y.; HU, S. H.; LIU, K. H.; LIU, D. M.; CHEN, S. Y. Study on controlled drug premeation of magnetic-sensitive ferrogels: effect of Fe₃O₄ and PVA. **Journal of Controlled Release**, v. 126, p. 228-236, 2008.

LÓPEZ, A.; CHIEMTOB, A.; MILTON, J. M.; MANEA, M.; PAULIS, M.; BARANDIARAM, M.; THEISINGER, S.; LANDFESTER, K.; HERGETH, W. D.; UDAGAMA, R.; MCKENNA, T.; SIMAL, F.; ASUA, J. M. Miniemulsion of monomer-resin hybrid systems. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 6298-6297, 2008.

LOZINSKII, V. I.; SIMENEL, I. A.; KHOKLOV, A. R. Catalytic properties of the protein-like copolymer of *N*-vinylcaprolactam and *N*-vinylimidazole in the hydrolyses of an ester substrate. **Russian Academy of Sciences**, v. 410, p.487-490, 2006.

LOZINSKY, V. I.; SIMENEL, I. A.; KURSKAYA, E. A.; KULAKOVA, V. K.; GALAEV, I. Y.; MATTIASSON, B.; GRINBERG, V. Y.; GRINBERG, N. V.; KHOKHLOV, A. R. Synthesis of *N*-vinylcaprolactam polymers in water-containing media. **Polymer**, v. 41, p.6507-6518, 2000.

LU, A-H.; SCHMIDT, W.; MATOUSSEVITCH, N.; BÖNNEMANN, H.; SPLIETHOFF, B.; TESCHE, B.; BILL, E.; KIEFER, W.; SCHÜTH, F. Nanoengineering of a magnetically separable hydrogenation catalyst. **Angewandte Chemie International Ed**, v. 43, p. 4303-4306, 2004.

LÜBBE, A. S.; ALEXIOU, C.; BERGEMANN, C. Clinical applications of magnetic drug targeting. **Journal of Surgical Research**, v. 95, p. 200-206, 2001.

LÜBBE, A. S.; BERGEMANN, C.; BROCK, J.; McCLURE, D. G. Physiological aspects in magnetic drug-targeting. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 194, p. 149-155, 1999.

LUBORSKY, F. E.; DRUMMOND, B. J.; PENTA, A. Q. Recent advances in the removal of magnetic foreign bodies from the esophagus, stomach and duodenum with controllable permanent magnets. **Eye Ear Nose & Throat Monthly.**, v. 44, p. 66-72, 1965.

LUDERER, A. A.; BORRELLI, N. F.; PANZARINO, J. N.; MANSFIELD, G. R.; HESS, D. M.; BROWN, J. L.; BARNETT, E. H. Glass-ceramic-mediated, magneticfield- induced localized hyperthermia: response of a murine mammary carcinoma. **Radiation Research**, v. 94, p.190-198, 1993.

MAEDA, Y.; YAMAMOTO, H.; IKEDA, I. Effects of ionization of incorporated imidazole groups on the phase transitions pf poly(*N*-isopropylacrylamide), poly(*N,N*-diethylacrylamide), and poly(*N*-vinylcaprolactam) in water. **Langmuir**, v. 17, p. 6855-6859, 2001.

MAHDAVIAN, A.R.; ABDOLLAHI, M.; BIJANZADEH, H. R. Kinetic study of radical polymerization. III. Solution polymerization of acrylamide by ¹H-NMR. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 93, p. 2007-2013, 2004.

MAKHAEVA, E. E.; TENHU, H.; KHOKHLOV, A. R. Behaviour of poly(*N*-vinylcaprolactam-co-methacrylic acid) macromolecules in aqueous solution: interplay between coulombic and hydrofobic interaction. **Macromolecules**, v. 35, p.1870-1876, 2003.

MATYJASZEWSKI, K.; DAVIS, T. **Handbook of Radical Polymerization**. New York: Wiley, 2002.

McKEEHAN, L. W.; ELMORE, W. C. Surface magnetization in ferromagnetic crystals.II. **Physical Review**, v. 46, p. 529-531, 1934.

MCKENNA, T. F.; VILLANUEVA, A. Effect of solvent on the rate constants in solution polymerization. Part II. Vinyl acetate. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 37, p. 589-601, 1999.

MCKENNA, T. F.; VILLANUEVA, A.; SANTOS, A. M. Effect of solvent on the rate constants in solution polymerization. Part I. Butyl acrylate. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 37, p. 571-588, 1999.

MEUNIER, F.; ELAISSARI, A. Poly(*N*-isopropylacrylamide-based microgels : preparation and colloidal characterization). In: ELAISSARI, A. **Colloidal Polymers : Synthesis and characterization**. New York: CRC Press, 2003.

MEEUSSEN F, BERGHMANS H, VERBRUGGHE S, GOETHALS E, DU PREZ F. Phase transition of poly(*N*-vinylcaprolactam) in water. **Polymer**, v. 41, p. 8597-8602, 2000.

MEYERS, P. H.; CRONIC, F.; NICE, C. M. Jr. Experimental approach in the use and magnetic control of metallic iron particles in the lymphatic and vascular system of dogs as a contrast and isotopic agent. **American journal of roentgenology, radium therapy, and nuclear medicine**, v. 90, p. 1068-1077, 1963.

MONTASSER, I.; BRIANÇON, S.; LIETO, J.; FESSI, H. Méthodes d'obtention et mécanismes de formation de nanoparticules polymériques. **Journal de Pharmacie Belgique**, v. 55, n. 6, p. 155-167, 2000.

MORAES, R. P.; SANTOS, A. M.; OLIVEIRA, P. C.; SOUZA, F. C. T.; DO AMARAL, M.; VALERA, T. S.; DEMARQUETTE, N. R. Poly(styrene-co-butyl acrylate)-Brazilian montmorillonite nanocomposites, synthesis of hybrid latexes via miniemulsion polymerization. **Macromolecular Symposia**, v. 254, p. 106-115, 2006.

MOUAZIZ, H.; BRACONNOT, S.; GINOT, F.; ELAISSARI, A. Elaboration of hydrophilic containing submicron magnetic latex particles. **Colloid Polymer Science**, v. 287, p. 287-297, 2009.

MOUAZIZ, H.; VEYRET, R.; THERETZ, A.; GINOT, F.; ELAISSARI, A. Aminodextran containing magnetite nanoparticles for molecular biology applications: preparation and evaluation. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 1-10, 2009.

MÜLLER-SCHULTE, D.; SCHIMITZ-RODE, T. Thermosensitive magnetic polymer particles as contactless controllable drug carriers. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 302, p.267-271, 2006.

NAGY, L.; RAUWERDINK, A.; ZHANG, G.; WEAVER J. **Magnetic nanoparticle imaging: on the binding and localization of nanoparticles using combination magnetic fields**. Dartmouth: Center for Nanomaterials Research., 2008.

NELSON, K. L.; RUNGE, V. M. Principles of MR contrast. In: RUNGE, V. M. **Contrast-enhanced clinical magnetic resonance imaging**. Lexington: The University Press of Kentucky, 1996.

NEUWELT, E.; ABBOTT, N. J.; ABREY, L.; BANKS, W. A.; DAVIS, T.; ENGELHARDT, B.; GRAMMAS, P.; NEDERGAARD, M.; NUTT, J.; PARDRIDGE, W.; ROSENBERG, G. A.; SMITH, Q.; DREWES L. R. **Strategies to Advance Translational Research into Brain Barriers**, v. 7, p. 84-96, 2008.

NGUYEN, D.; DUGUET, E.; BOURGEAT-LAMI, E.; RAVAINÉ, S. An easy way to control the morphology of colloical polymer-oxide supraparticles through seeded dispersion polymerization, **Langmuir**, v. 4, p. 6086-6090, 2010.

OSBORNE, S. J.; LEAVER, J.; TURNER, M. K.; DUNNILL, P. Correlation of biocatalytic activity in an organic-aqueous two-liquid phase system with solvent concentration in the cell membrane. **Enzyme Microbiol Technol**, v. 12, p. 281-291, 1990.

PAOLI, V. M.; LACERDA, S. H. P.; SPINU, L.; INGBER, B.; ROSENZWEIG, Z.; ROSENZWEIG, N. Effect of an oscillating magnetic field on the release properties of magnetic collagen gels. **Langmuir**, v. 22, p. 5894-5899, 2006.

PELTON RH AND CHIBANTE, P. Preparation of aqueous lattices with γ -V-isopropylacrylamide. **Colloid Surfaces**, v. 20, p. 247-256, 1986.

PENG, S.; WU, C. Surfactant effect on pH and temperature sensitivities of poly(*N*-vinylcaprolactam-co-sodium acrylate) microgels. **Macromolecules**, v. 34, p.568-571, 2000.

PICH, A.; BHATTACHARYA, S.; LU, Y.; BOYKO, V.; ADLER, H. P. Temperature-sensitive hybrid microgels with magnetis properties. **Langmuir**, v. 20, p. 10706-10711, 2004.

POLBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. New York: John Wiley & Sons, 2002.

PRADHAN, P.; GIRI, J.; BANERJEE, R.; BELLARE, J.; BAHADUR, D. Cellular interations of lauric acid and dextran-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, p. 282-287, 2007.

PRICHANONT, S.; LEAK, D. J.; STUCKEY, D. C. The solubilization of mycobacterium in a water in oil microemulsion for biotransformations: system selection and characterization. **Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects**, v. 166, p. 177-186, 2000.

PULFER, S. K.; COCCOTTO, S. L.; GALLO, J. M. Distribution of small magnetic particles in brain tumor-bearing rats. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 41, p. 99-105, 1999.

QI, G.; JONES, C. W.; SCHORK, F. J. Raft inverse miniemulsion polymerization of acrylamide. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 28, p. 1010-1016, 2007.

RIGGS, J. P.; RODIGUEZ, F. Persulfate-initiated polymerization of acrylamide. **Journal of Polymer Science: Part A**, v. 5, p. 3151-3165, 1967.

RIVERA, L.; GIAP, H.; MILLER, W.; FISHER, J.; HILLEBRAND, D. J.; MARSH, C.; SCHAFFER, R. L. Hepatic intra-arterial infusion of yttrium-90 microspheres in the treatment of recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation; a case report. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 5729-5732, 2006.

RODRIGUEZ, R.; BARANDIARAN, M. J.; ASUA, J. M. Particle nucleation in high solids miniemulsion polymerization. **Macromolecules**, v. 40, p. 5735-5742, 2007.

RUSSEL, G. T. The Kinetics of Free-Radical Polymerization: Fundamental Aspects. **Australian Journal of Cemistry**, v. 55, p. 399-414, 2002.

- SALGADO-RODRÍGUEZ, R.; CLAVERÍE, A. L.; ARNDT, K. F. Random copolymers of *N*-isopropylacrylamide and methacrylic acid monomers with hydrophobic spacers: pH-tunable temperature sensitive materials. **European Polymer Journal**, v. 40, p. 1931-1946, 2004.
- SAMPAIO, L. C.; GARCIA, F.; CERNICCHIARO, G. R. C.; TAKEUCHI, A. Técnicas de magnetometria. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, p. 406-410, 2000.
- SATARKAR, N. S.; HILT, J. Z. Magnetic hydrogels nanocomposites for remote controlled drug release. **Journal of Controlled Release**, v. 130, p. 246-251, 2008.
- SCHERER, C.; NETO, A. M. F. Ferrofluids: properties and applications. **Brazilian Journal of Physics**, v. 35, p. 718-727, 2005.
- SCHILLERMANS, J. P.; VAN NOSTRUM, C. F. Molecularly imprinted polymer particles: synthetic receptors for future medicine. **Nanomedicine**, v. 1, p. 437-447, 2006.
- SCHMIDT, A. M. Thermoresponsive magnetic colloids. **Colloid and Polymer Science**, v. 285, p. 953-966, 2007.
- SCOTT, R. A.; PEPPAS, N. A. Kinetic study of acrylic acid solution polymerization. **AIChE Journal**, v. 43: p. 135-144, 1997.
- SHEIBAT-OTHMAN, N.; BOURGEAT-LAMI, E. Use of Silica Particles for the Formation of Organic-Inorganic Particles by Surfactant-Free Emulsion Polymerization, **Langmuir**, v. 25, p. 10121-10133, 2009.
- SHTANKO, N. I.; LEQUIEU, W.; GOETHALS, E. J.; DU PREZ F. E. pH-and Thermo-responsive properties of poly(*N*-vinylcaprolactam-co-acrylic acid) copolymers. **Polymer International.**, v. 52, p.1605-1610, 2003.
- SOLOMON, O. F.; CORCIOVEL, M.; BOGHINA, C. Radical bulk polymerization of *N*-vinylcaprolactam. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 12, p. 1843-1851, 1968.
- SOLOMON, O. F.; VASILESCU, D. S.; TARARESCU, V. Radical polymerization of *N*-vinylcaprolactam in homogeneous solution. II. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 13, p. 1-7, 1969.

STANCIU, L.; WON, Y. H.; GANESANA, M.; ANDREESCU, S. Magnetic Particle-Based Hybrid Platforms for Bioanalytical, **Sensors Sensors**, v. 9, p. 2976-2999, 2009.

SZAFKO, J.; FEIST, W. Solvation effect in thermal decomposition of 2,2'-azoisobutyronitrile on the *N,N*-dimethylformamide/methyl methacrylate system. **Journal of Polymer Science: Part A : Polymer Chemistry**, v. 33, p. 1637-1642, 1995.

TAN, S. C.; YIAP, B. C. DNA, RNA, and protein extraction; the past and the present. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, p. 1-10, 2009.

TARTAJ, P.; MORALES, M. P.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; GONZÁLEZ-CARREÑO, T.; SERNA, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D Applied Physics**, v. 36, p. R182-R197, 2003.

THAKUR, D.; DENG, S.; BALDET, T.; WINTER, J. O. pH sensitive CdS-iron oxide fluorescent-magnetic nanocomposites **Nanotechnology**, v. 20, p. 1-9, 2009.

TIARKS, F.; WILLERT, M.; LANDFESTER, K.; ANTONIETTI, M. The controlled generation of nanosized structures in miniemulsions. **Colloid and Polymer Science**, v. 279, p. 110-113, 2001.

TINKER, A. J.; GEORGE, M. H.; BARRIE, J. A. Thermal polymerization of styrene in the presence of some ferrocene derivatives. II. Low concentrations of vinylferrocene and ethylferrocene. **Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry**, v. 41, p. 2621-2633, 2003.

UGELSTAD, J.; MERK, P. C.; SCHMIDT, R.; ELLINGSEN, T.; BERGE, A. Preparation and biochemical applications of new monosized polymer particles. **Polymer International**, v. 30, p. 157-168, 1993.

VAIDYA, A.A.; RAKU, T.; TOKIWA, Y. Enzymatic transesterification of purine nucleoside having a low solubility in organic medium. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 805, 2001.

VASSEUR, S.; DUGUET, E.; PORTIER, J.; GOGGIO, G.; MORNET, S.; HADOVÁ, E.; KNÍZEK, K.; MARYSKO, M.; VEVERKA, P.; POLLERT, E. Lanthanum manganese

perovskite nanoparticles as possible in vivo mediators for magnetic hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 302, p. 315-320, 2006.

VIHOLA, H.; LAUKKANEN, A.; TENHU, H.; HIRVONEN, J. Drug release characteristics of physically cross-linked thermosensitive poly(*N*-vinylcaprolactam) hydrogel particles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, p. 4783-4793, 2008.

VIHOLA, H.; LAUKKANEN, A.; VALTOLA, L.; TENHU, H.; HIRVONEN, J. Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(*N*-isopropylacrylamida), poly(*N*-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(*N*-vinylcaprolactam). **Biomaterials**, v. 26, p.3055-3064, 2005.

VOGL, O.; JAYCOX, G. D. Trends in polymer science. **Progress in Polymer Science**, v.24, p. 3-6, 1999.

WANG, Q. ; XU, H. ; YANG, X.; YANG, Y. Drug release behavior from in situ gelatinized thermosensitive nanogel aqueous dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 361, p. 189-193, 2008.

WANG, Y.; WANG, Y.; YANG, J.; PFEFFER, R.; DAVE, R.; MICHNIAK, B. The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery. **Powder Technology**, v. 164, p.94-102, 2006.

WEINSTEIN, J. S.; VARALLYAY, C. G.; DOSA, E.; GAHRAMANOV, S.; HAMILTON, B.; ROONEY, W. D.; MULDOON, L. L.; NEUWELT, E. A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: diagnostic magnetic resonance imaging and potential therapeutic applications in neurooncology and central nervous system inflammatory pathologies, a review. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, p. 15-35, 2010.

WIDDER, K. J.; MORRIS, R. M.; POORE, G. A.; HOWARD, D. P.; SENYEL, A. Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low-dose doxorubicin: total remission in Yoshida sarcoma-bearing rats. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 19, p. 135-139, 1983.

WIECHERS, S.; SCHMIDT-NAAKE, G. Copolymerization of 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid and 1-vinylimidezole in inverse miniemulsion. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 2, p. 126-134, 2008.

WILHELM, C.; GAZEAU, F. Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles. **Biomaterials**, v. 29, p. 3161-3174, 2008.

WONG, J. E.; GAHARWAR, A. K.; MÜLLER-SCHULTE, D.; BAHADUR, D.; RICHTERING, W. Dual-stimuli responsive PNIPAM microgel achieved via layer-by-layer assembly: magnetic and thermoresponsive. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 324, p. 47-54, 2008.

WU, J.; TANG, Q.; SUN, H.; LIN, J.; AO, J.; HUANG, M.; HUANG, Y. Conducting Film from Graphite Oxide Nanoplatelets and Poly(acrylic acid) by Layer-by-Layer Self-Assembly. **Langmuir**, v. 24, p. 4800-4805, 2008.

WUST, P. Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy—feasibility, tolerance and achieved temperatures. **International Journal of Hyperthermia**, v. 22, p. 673–685, 2006.

XU, Z. Z.; WANG, C. C.; YANG, W. L.; DENG, Y. H.; FU, S. K. Encapsulation of nanosized magnetic iron oxide by polyacrylamide via inverse miniemulsion polymerization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 277, p. 136-143, 2004.

YAN, G.; ZHUO, R. Research progress of magnetic resonance imaging contrast agents. **Chinese Science Bulletin**, v. 46, p. 1233-1237, 2001.

YAN, G.; ROBINSON, L.; HOGG, P. Magnetic resonance imaging contrast agents: overview and perspectives. **Radiography**, v. 13, p. e5-e19, 2007.

YANG, S.; LIU, H.; ZHANG, Z. A facile route to hollow superparamagnetic magnetite/polystyrene nanocomposite microspheres via inverseminiemulsion polymerization. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 46, p. 3900-3910, 2008.

YANG, Z.; LEON, J.; MARTIN, M.; HARDER, J. W.; ZHANG, R.; LIANG, D.; LU, W.; TIAN, M.; GELOVANI, J. G.; QIAO, A.; LI, C. Pharmacokinetics and biodistribution of near-infrared fluorescence polymeric nanoparticles, **Nanotechnology**, v. 20, p. 1-11, 2009.

YANUL, N. A.; KIRSH, Y. E.; VERBRUGGHE, S.; GOETHALS, E. J.; DU PREZ, F. E. Thermoresponsive properties of poly(*N*-vinylcaprolactam)-poly(ethylene oxide) aqueous systems: solutions and block copolymer networks. **Macromolecular Chemistry Physics**, v. 202, p.1700-1709, 2001.

YU, Z.; XIAOLIANG, W.; XUMAN, W.; HONG, X.; HONGCHEN, G. Acute toxicity and irritation of water-based dextran-coated magnetic fluid injected in mice. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 85, p. 582-587, 2007.

ZABLOTSKAYA, A.; SEGAL, I.; LUKEVICS, E.; MAIOROV, M.; ZABLOTSKY, D.; BLUMS, E.; SHESTAKOVA, I.; DOMRACHEVA, I. Water-soluble magnetic nanoparticles with biologically active stabilizers. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, p. 1428-1432, 2009.

ZHANG, A.; JIANG, Q.; JIANG, F.; DING, G.; ZHANG, R.; WANG, L.; ZHANG, L.; ROBIN, A. M.; KATAKOWSKI, M.; CHOPP, M. In vivo magnetic resonance imaging tracks adult neural progenitor cell targeting of brain tumor. **Neuroimage**, v. 23, p. 281-287, 2004.

APÊNDICE A

Estudo cinético da polimerização
radicalar da NVCL em diferentes
solventes

A.1. Introdução

A determinação dos valores elementares dos coeficientes cinéticos da polimerização da NVCL via radical livre é de fundamental importância para o conhecimento das propriedades da PNVCL e de suas aplicações. Devido à influência da LCST na cinética de liberação de um princípio ativo, como uma droga, por exemplo, o conhecimento dos parâmetros que causam variações nesta temperatura de transição é de grande interesse em se tratando da PNVCL para aplicações biomédicas como agentes de liberação controlada de princípios ativos. Desta forma, o objetivo principal deste estudo é avaliar a influência das concentrações de monômero, iniciador, CTA, bem como da temperatura na cinética de polimerização da NVCL. O efeito da massa molecular na LCST da PNVCL também foi avaliado.

A.2. Síntese da PNVCL via radical livre em solução

Nesta etapa do trabalho, homopolímeros de NVCL foram sintetizados por polimerização via radical livre, a 70 °C, utilizando-se 1,4-dioxano, etanol ou isopropanol como solventes. As polimerizações foram realizadas em um reator encamisado, com capacidade para 50 mL, sob atmosfera de nitrogênio (N₂). Primeiramente, a quantidade desejada de NVCL, juntamente com quantidades apropriadas de padrão interno (trioxano) e do agente de transferência de cadeia, ácido 3-mercaptopropiônico, foram introduzidos no reator. Em seguida, aproximadamente, 75% do solvente foi adicionado e a solução foi purgada com N₂ durante vinte minutos, para remoção do oxigênio presente, o qual pode inibir a polimerização. Uma solução de iniciador (AIBN) foi, então, preparada, separadamente, utilizando-se os 25% restantes do solvente e, esta permaneceu também sob fluxo de N₂ durante vinte minutos. Quando o meio reacional atingiu a temperatura de 70 °C, a polimerização foi iniciada através da adição da solução de AIBN. Uma seringa foi utilizada para a transferência do iniciador ao meio reacional. Neste instante, uma amostra foi retirada do meio para a análise de RMN ¹H, correspondendo ao tempo zero da reação. As polimerizações foram conduzidas durante três horas. Todas as polimerizações foram realizadas em duplicata.

A.2.1. Determinação da massa de padrão interno

A massa de padrão interno (trioxano), utilizada nas reações, foi determinada em função do número de moles do monômero e do número de prótons do padrão interno, para uma equivalência de área de picos nos espectros de RMN ^1H , conforme Equação A.1.

$$N_{PI} = \frac{N_M}{H_{PI}} \quad \text{Equação A.1}$$

onde

N_{PI} = Número de moles do padrão interno;

N_M = Número de moles do monômero;

H_{PI} = Número de prótons do padrão interno (6 para o trioxano)

A.2.2. Purificação dos homopolímeros de NVCL

Para as análises de UV-visível e determinação da LCST da PNVCL sintetizada via polimerização em solução, os polímeros foram purificados pelo método de precipitação em água quente (45 °C, acima da LCST da PNVCL), sob agitação. Após a sedimentação do precipitado, a fase aquosa foi removida e os polímeros foram novamente solubilizados em água fria, utilizando-se um banho de gelo. Este procedimento foi repetido três vezes para completa remoção do monômero residual e outros reagentes utilizados na polimerização e, finalmente, os polímeros foram secos à vácuo na temperatura de 45 °C, durante vinte e quatro horas (VAIDYA et al., 2001; ZHANG et al., 2004).

A.3. Caracterização dos homopolímeros de NVCL obtidos via polimerização em solução

A.3.1. Estudo da Cinética de Polimerização por Ressonância magnética nuclear de Próton (RMN ^1H)

O equipamento utilizado nas caracterizações químicas por RMN ^1H foi da marca Varian, modelo Mercury 300, locado no Laboratório de Química Fina da EEL-USP. A

cinética das polimerizações foi estudada empregando-se esta técnica, através de amostras coletadas em diferentes tempos de reação. Ao serem retiradas das reações, as amostras foram introduzidas em banho de gelo e, pequenas alíquotas destas amostras, foram solubilizadas em clorofórmio deuterado e submetidas às análises.

Nos espectros de RMN ^1H , o sinal referente ao deslocamento correspondente ao padrão interno Trioxano (5,2 ppm) foi integrado e à sua área foi atribuído o valor 1,00. Com este valor de área como referência, foram integrados os sinais correspondentes aos deslocamentos dos prótons da dupla ligação da NVCL (7,2 ppm) (Figura A.1). Os valores das áreas obtidas por integração dos prótons da dupla ligação diminuem ao longo da reação, indicando assim o consumo dos monômeros e formação dos polímeros. Dessa forma foi possível calcular a conversão da reação, utilizando a Equação A.2.

$$x(\%) = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad \text{Equação A.2}$$

onde

$x(\%)$ = conversão da reação de polimerização;

A_0 = Área do sinal referente ao deslocamento correspondente ao próton da dupla ligação no tempo zero (0);

A_t = Área do sinal referente ao deslocamento correspondente ao próton da dupla ligação num tempo conhecido (t).

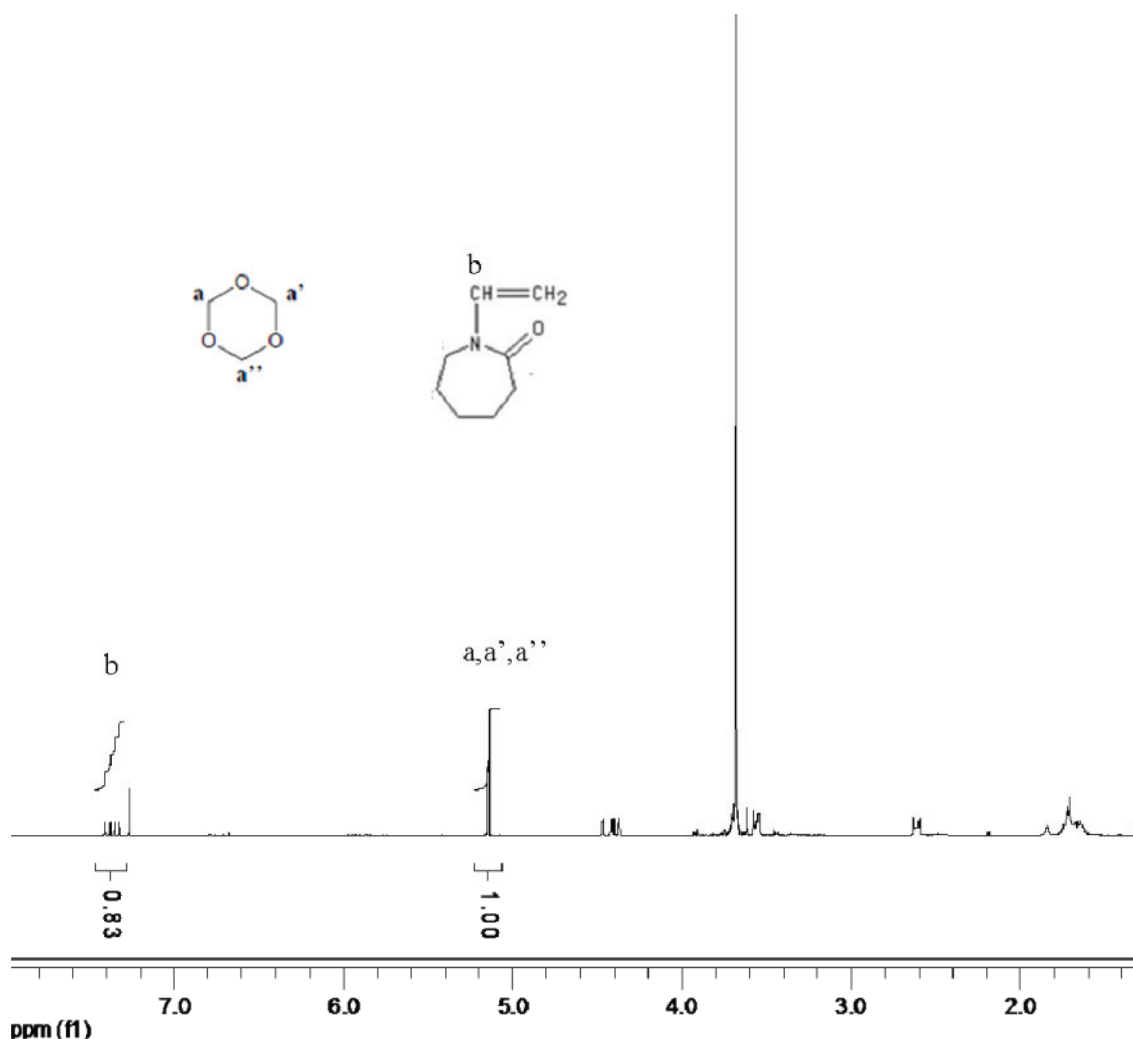


Figura A.1. Modelo de integração dos sinais do trioxano e da NVCL para o cálculo da conversão.

A.3.2. Determinação da LCST

O equipamento utilizado nesta caracterização foi o espectrômetro de UV/visível da marca Thermo Scientific modelo Spectronic Genesys 10 com um controlador de temperatura Peltier, locado no Laboratório de Polímeros da EEL-USP. Após o processo de purificação, as soluções aquosas de PNVCL (5g/L) foram caracterizadas por espectrometria de UV/Visível, visando determinar a sua Temperatura Crítica Inferior de Solubilização (LCST). As transmitâncias ópticas das soluções poliméricas foram medidas em um comprimento de onda constante de 570nm, para um intervalo de temperatura entre 28 e 42°C. A LCST das soluções poliméricas foi estabelecida como sendo o valor correspondente ao ponto de inflexão na curva de transmitância versus temperatura.

A.3.3. Obtenção da massa molecular absoluta e distribuição de massas moleculares (MWD)

As massas moleculares foram determinadas utilizando-se a técnica de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) num equipamento da marca Waters, com detector de índice de refração (RI) modelo 2414 e injetor automático 717 e outro detector de viscosidade da marca ViscoteK, modelo TDA 302. Uma série de três colunas Phenogel (Phenomenex), com porosidades de 10^3 , 10^4 e 10^6 Å foi utilizada.

Para a caracterização das massas moleculares dos homopolímeros de NVCL sintetizados via polimerização em solução, foram preparadas soluções poliméricas em tetrahidrofurano (THF) a uma concentração de 10 mg/mL. Estas soluções foram previamente filtradas em filtros para solventes orgânicos (0,45 µm) antes de serem injetadas no aparelho. O volume de solução polimérica injetado foi de 100 µL. Como eluente foi utilizada uma solução 0,25% (m/v) de brometo de tetrabutilamônio em THF, num fluxo de 1 mL/min, com o compartimento das colunas operando a uma temperatura de 35 °C. O dn/dC para a PNVCL foi previamente calculado, utilizando-se soluções com diferentes concentrações do polímero e o valor obtido foi de 0,1349 mL g⁻¹.

A.4. Influência da concentração inicial de monômero

A influência da concentração inicial de NVCL na cinética de polimerização em 1,4-dioxano, etanol e isopropanol foi estudada. As concentrações iniciais de monômero utilizadas foram as seguintes: $6,0 \times 10^{-2}$, $1,6 \times 10^{-1}$ e $3,2 \times 10^{-1}$ mol/L. As concentrações de iniciador e CTA foram mantidas constantes a $2,3 \times 10^{-2}$ e $6,4 \times 10^{-3}$ mol/L, respectivamente. A Figura A.2 mostra a curva de conversão em função do tempo para os diferentes valores de $[M]_0$ e solventes estudados.

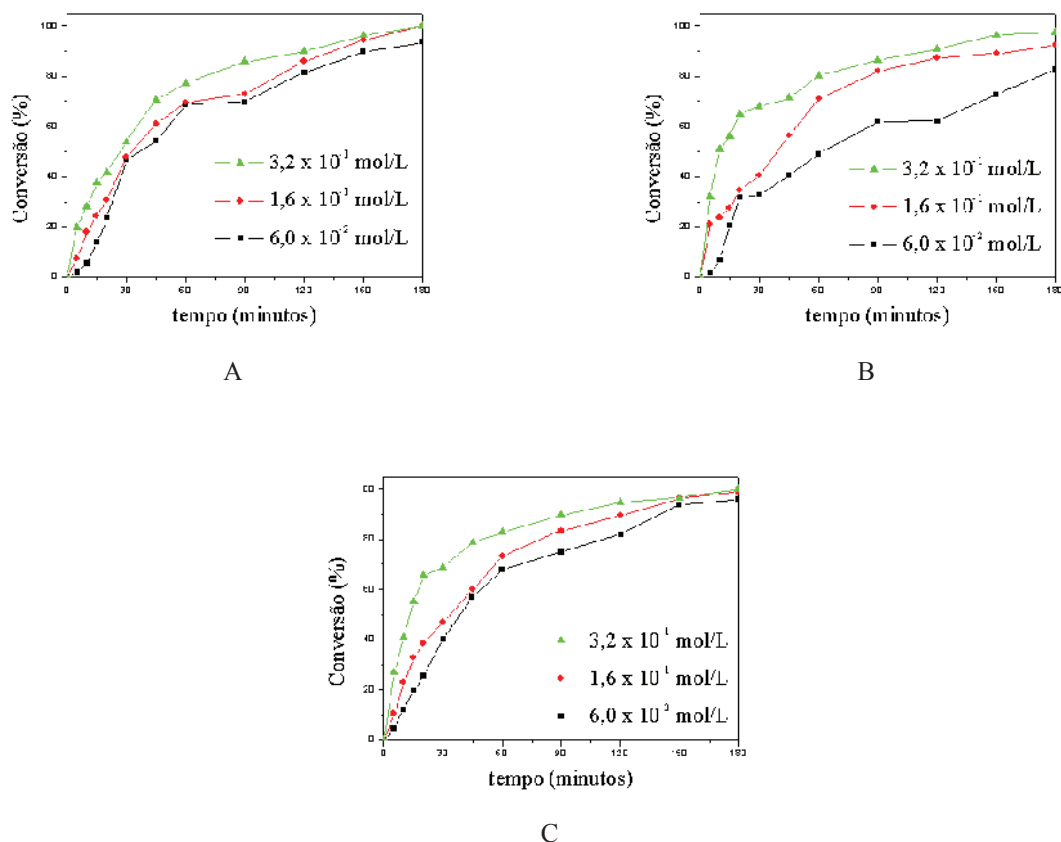


Figura A.2. Efeito da concentração inicial de monômero na conversão de NVCL para as polimerizações realizadas em (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol. $[I]_0 = 2,3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, $[CTA] = 6,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $T = 70^\circ \text{C}$.

Uma vez que a mobilidade dos radicais e, conseqüentemente, o efeito gel, variam de acordo com a concentração de monômero em solução, a cinética de polimerização também é fortemente dependente deste parâmetro. A taxa inicial de liberação de calor depende da concentração inicial de monômero. Os perfis de velocidade de polimerização em função da conversão para as reações realizadas com diferentes concentrações de NVCL estão apresentados na Figura A.3.

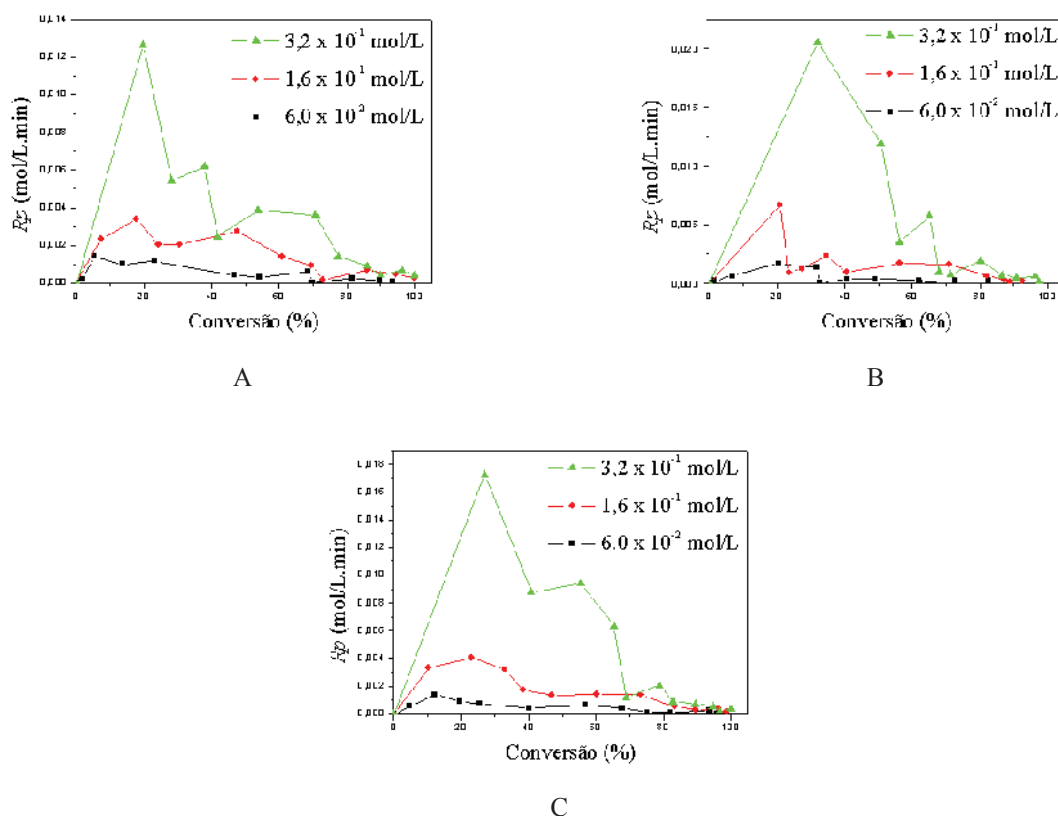


Figura A.3. Dependência da velocidade de polimerização na conversão da NVCL com diferentes concentrações iniciais de monômero. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

As Figuras A.2 e A.3 mostram que, em todos os solventes estudados, o valor da concentração inicial de NVCL afeta fortemente a cinética de polimerização. Obviamente, em todas as polimerizações, a conversão aumentou com o decorrer do tempo de reação e as velocidades de polimerização instantâneas foram maiores na primeira hora. A Figura A.3 mostra, ainda, que as polimerizações realizadas com maiores concentrações de NVCL atingiram maiores valores de $R_{p,max}$. Além disso, observando-se o valor de conversão correspondente à $R_{p,max}$ para cada $[M]_0$, pode-se verificar que este parâmetro também aumentou juntamente com a concentração inicial de NVCL. Este fato pode ser atribuído à aceleração da velocidade de formação de radicais na presença de maiores razões monômero/solvente, levando, assim, a um aumento na velocidade de iniciação (KUDYSHKIN et al., 2002). A relação entre a velocidade de formação de radicais e a concentração de monômero, utilizando AIBN como iniciador, foi previamente estudada

por SZAFKO e FEIST (1995). Estes autores interpretaram os resultados com base na teoria de solvatação das moléculas de monômero. Além disso, R_p depende, igualmente, da viscosidade do meio reacional e outro fator importante a ser considerado neste caso é a significativa mudança nos parâmetros difusionais quando o valor de $[M]_0$ é aumentado (SCOTT e PEPPAS, 1997). Observa-se, também, nas Figuras A.2 e A.3 que, os valores máximos de R_p foram obtidos até 30 minutos de polimerização. Este fato pode ser explicado pela alta concentração de cadeias poliméricas, presentes quando altos valores de conversão são atingidos. Nestas condições, as cadeias menores difundem-se mais facilmente e, conseqüentemente, têm um efeito significativo na constante de terminação (LIN, 2001).

A velocidade de polimerização, R_p , para cada concentração inicial de monômero foi, então, obtida a partir da inclinação da região linear das curvas de conversão em função do tempo, ou seja, até 20 minutos de reação, considerando baixas conversões (Figura A.2). A Figura A.4 mostra as curvas de R_p em função de $[M]_0$.

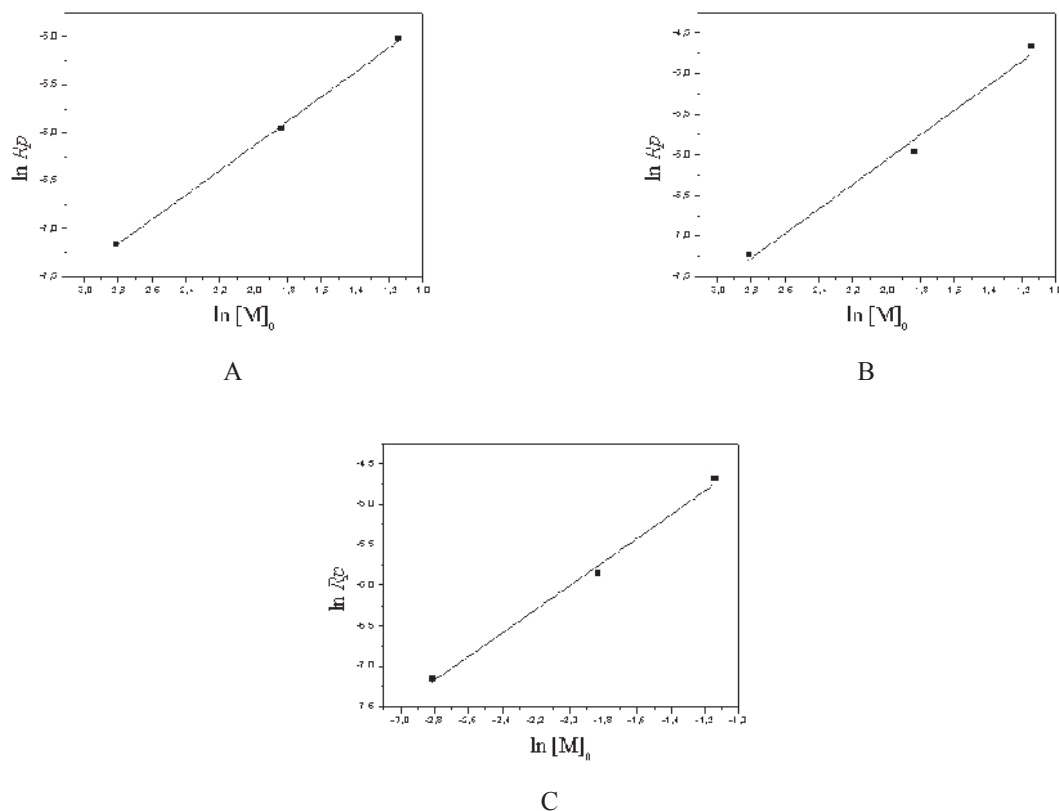


Figura A.4. Velocidade de polimerização em função da concentração inicial de monômero para as polimerizações realizadas em (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

Observa-se que R_p aumenta linearmente com a concentração inicial de monômero. A inclinação da curva de $\ln R_p$ em função de $\ln [M]_0$ é uma medida da ordem de reação em relação à concentração de monômero. Neste caso, os valores obtidos foram de 1,32 para as reações realizadas em 1,4-dioxano, 1,51, em etanol e 1,46, em isopropanol. Assim, a relação da velocidade de polimerização com a concentração inicial de NVCL foi de $R_p \propto [M]_0^{1,32}$ (1,4-dioxano), $R_p \propto [M]_0^{1,51}$ (etanol) e $R_p \propto [M]_0^{1,46}$ (isopropanol) e os coeficientes de correlação foram de 0,999, 0,978 e 0,990, respectivamente. Estes resultados diferem daqueles obtidos por Kalugin et al. (2008). Estes autores observaram que as polimerizações foram de primeira ordem com relação ao monômero. No entanto, o fato da ordem de dependência da velocidade de polimerização com relação à concentração de monômero ser maior que uma unidade pode estar associada com a dependência da velocidade de iniciação em $[M]_0$. Além disso, de acordo com Scott e Peppas (1997), o impacto causado pelo efeito gel é mais pronunciado em concentrações mais altas de monômero. Se a concentração de iniciador não varia durante o processo de polimerização e a eficiência de iniciação é independente da concentração de monômero, a cinética de polimerização deve ser de primeira ordem com relação ao monômero (KALUGIN et al., 2008). No entanto, a polimerização em solução de alguns monômeros é acompanhada por um acentuado desvio da cinética clássica e este comportamento incomum surge devido ao efeito do aumento significativo da velocidade de reação e das massas moleculares, conhecido como auto-aceleração ou efeito gel. Este efeito é dependente do tipo e concentração de iniciador e deve-se à influência da difusão na terminação. Em outras palavras, um decréscimo na velocidade na qual as macromoléculas se difundem no meio viscoso leva a uma diminuição da habilidade de dois macro-radicaís se encontrarem e terminarem a polimerização. O decréscimo da velocidade de terminação ocasiona, por consequência, um aumento da velocidade de polimerização global e nas massas moleculares, ou seja, a dependência da difusão na viscosidade do meio leva à ocorrência do efeito gel a altas concentrações de macro-cadeias. Velocidades de polimerização com ordens de dependência superiores a uma unidade com relação à concentração de monômero, como as observadas neste estudo, também foram obtidas por outros trabalhos, como, por exemplo, àquele de Lin (2001), utilizando acrilamida como monômero. Estes resultados também concordam com os estudos de Riggs e Rodriguez (1967), para a acrilonitrila e metacrilato

de metila e de Ishige e Hamielec (1973) para a acrilamida. Lin (2001) explicaram tal anormalidade em termos de transferência ao solvente e da teoria do efeito gaiola.

Para confirmar o efeito da concentração inicial de NVCL em R_p , aplicou-se, ainda, o mesmo método usado por McKenna et al. (1999) e McKenna e Villanueva (1999). Neste método, a velocidade de polimerização em processo batelada é dada pela seguinte expressão:

$$R_p = -\frac{[M]_0 d(1-x)}{dt} = k_p [M]_0 (1-x) [R^*] \quad \text{Equação A.3}$$

onde $[M]_0$ é a concentração inicial de monômero, x é a conversão e $[R^*]$ é a concentração instantânea de radicais poliméricos, a qual, assumindo-se a hipótese do estado pseudo-estacionário, pode ser calculada através da seguinte equação:

$$[R^*] = \sqrt{\frac{2fk_d[I]}{k_t}} \quad \text{Equação A.4}$$

onde f é a eficiência do iniciador, assim como k_d e k_t são as constantes de decomposição e terminação, respectivamente. Temos então a solução para a equação A.3:

$$\ln(1-x) = -\frac{k_p}{\sqrt{k_t}} \sqrt{\frac{8f[I]_0}{k_d}} \left(1 - e^{-k_d t/2}\right) \quad \text{Equação A.5}$$

Dessa forma, assumindo-se que f , k_d e $[I]_0$ são valores conhecidos e, obtendo-se valores de conversão em função do tempo, $x(t)$, torna-se possível estimar o valor da constante $k_p/k_t^{0.5}$ através da regressão dos dados da curva de $\ln(1-x)$ versus $-(8f[I]_0/k_d)^{0.5} [(1-\exp(-k_d t/2))]$.

Considerando-se a representação clássica da cinética de polimerização radicalar, onde a velocidade de reação em um processo batelada é dada pela equação A.5, percebe-se que a hipótese subjacente a esta equação (estado *quasi*-estacionário para a formação de radicais e independência da concentração inicial de monômero nas constantes de velocidade) leva a uma expressão na qual a conversão de monômero em função do tempo é independente de $[M]_0$. Para examinar esta hipótese, o valor da pseudo-constante de velocidade, $k_p/k_t^{0.5}$, foi estimado para cada concentração inicial de NVCL e, para este propósito, foi necessário estimar os valores dos parâmetros f e k_d . Sabe-se que a eficiência de iniciação, f , é função do tipo de iniciador e dos parâmetros de síntese (MCKENNA et

al., 1999; MCKENNA; VILLANUEVA, 1999). No entanto, não existe uma informação totalmente confiável sobre os exatos valores de f para o sistema estudado no presente trabalho e o consenso geral foi o de utilizar o valor de $f=0,6$, apesar de algum erro poder ser introduzido ao incorporarmos este valor ao cálculo de $k_p/k_t^{0,5}$. Para a estimativa de k_d para o AIBN e escolha do valor que melhor se adapta às condições experimentais aqui estudadas, dados de k_d em tolueno, benzeno e em uma mistura de 1,4-dioxano e água, no caso das polimerizações em 1,4-dioxano (Equação A.6); ácido acético, isobutanol, *n*-butanol e *n*-ftalato de dibutila, no caso do etanol (Equação A.7) e, finalmente, álcool *terc*-amílico, isobutanol, *n*-butanol e *n*-ftalato de dibutila, no caso do isopropanol (Equação A.8) foram utilizados. Todos os dados foram extraídos do (BRANDRUP et al., 1999), plotados em função do valor inverso da temperatura absoluta, dentro da faixa de 40 a 105 °C (Figura A.4) e regressados visando à obtenção de uma estimativa razoável. O resultado da regressão foi:

$$k_d = 4.032 * 10^{15} \exp\left(\frac{-15824}{T}\right) \text{ Equação A.6}$$

$$r^2 = 0.996$$

$$k_d = 1.27150 * 10^{15} \exp\left(\frac{-15379}{T}\right) \text{ Equação A.7}$$

$$r^2 = 0.9905$$

$$k_d = 7.9392 * 10^{14} \exp\left(\frac{-15193}{T}\right) \text{ Equação A.8}$$

$$r^2 = 0.991$$

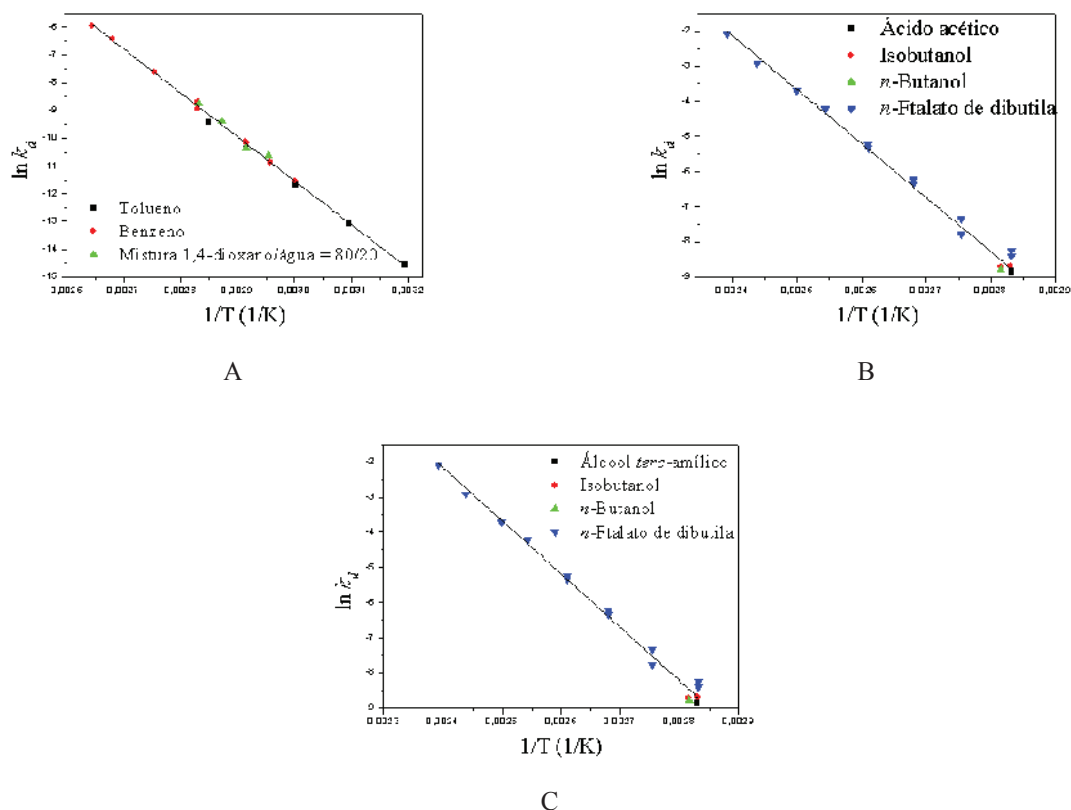


Figura A.5. Curva de regressão a partir das constantes de decomposição do AIBN em função da temperatura.

Dessa forma, obteve-se um valor k_d a 70 °C igual a $3,789 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($2,273 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) em 1,4-dioxano, $4,370 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($2,622 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) em etanol e, finalmente, $4,692 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($2,815 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$) em isopropanol. Estes valores são próximos àqueles citados no Brandrup et al. (1999) ($3,20 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ em uma mistura de 1,4-dioxano/água = 80/20 (v/v) e $1,67 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ em isobutanol) e, por este motivo, parecem ser razoáveis.

Os valores de f e k_d foram, então, utilizados para resolver a equação A.5 e para a obtenção dos valores de $k_p/k_t^{0,5}$ para as diferentes concentrações iniciais de monômero, como pode ser visto na Figura A.6.

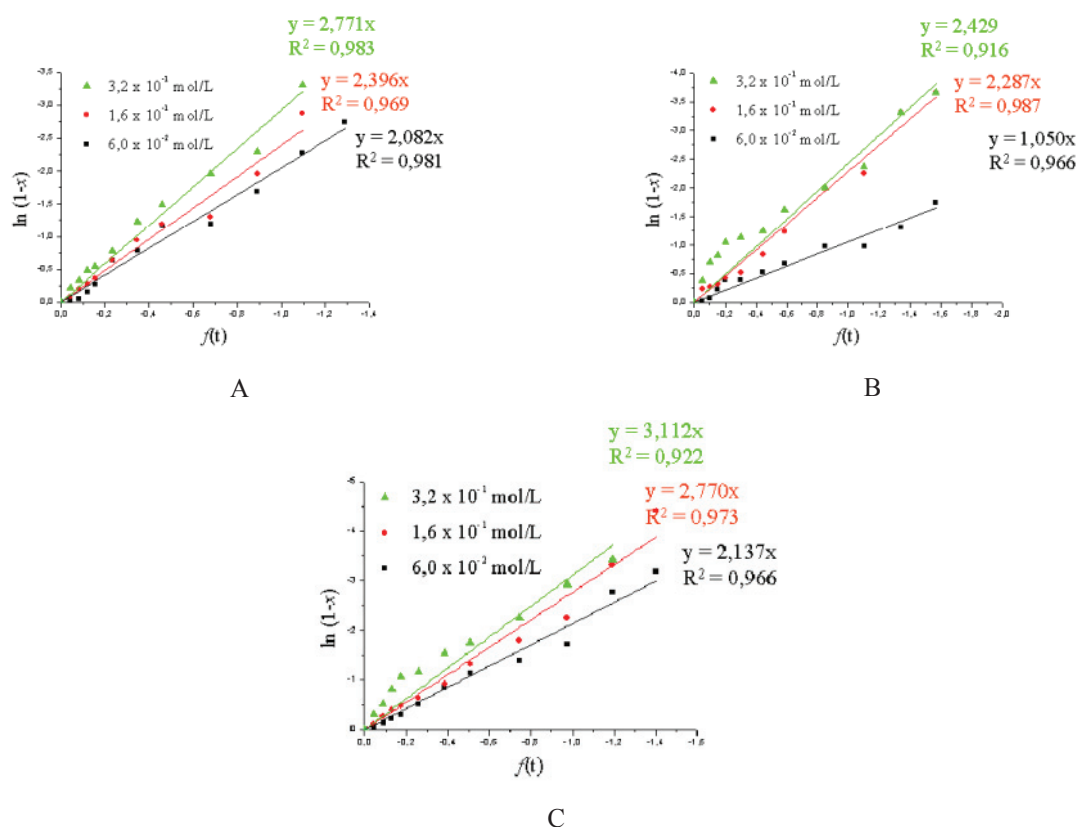


Figura A.6. Determinação dos valores das pseudo-constantes $k_p/k_t^{0,5}$ para as diferentes concentrações iniciais de NVCL, através das curvas de $\ln(1-x)$ em função de $f(t) = -(8f[I]_0/k_d)^{0,5} [(1-\exp(-k_d t/2))]$. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

De forma contrária ao esperado da Equação A.5, porém em concordância com as Figuras A.2 e A.3, parece razoável afirmarmos que o valor $k_p/k_t^{0,5}$ depende da concentração inicial de NVCL. Estes valores obtidos foram, então, plotados em função da concentração inicial de NVCL, podendo-se notar a linearidade da variação de $k_p/k_t^{0,5}$ em função de $[M]_0$ (Figura A.7).

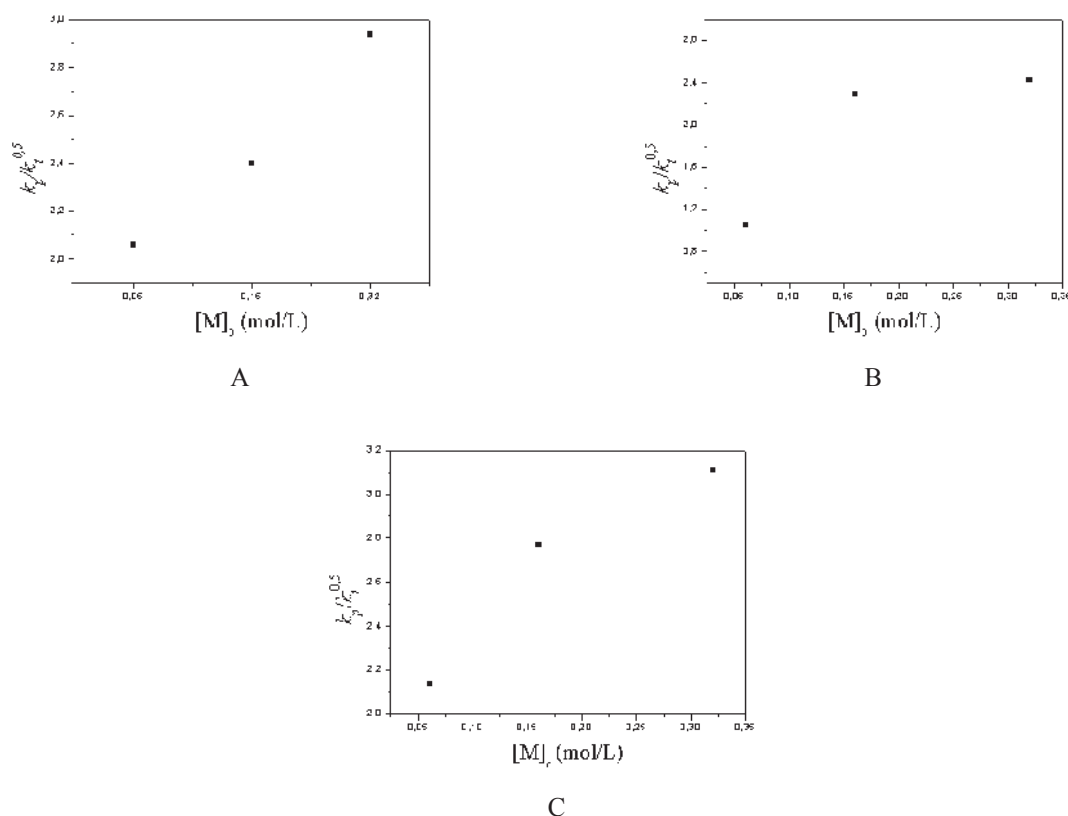


Figura A.7. Homopolimerizações da NVCL com diferentes concentrações iniciais de monômero: mudanças na pseudo-constante $k_p/k_t^{0.5}$. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

Em todos os solventes estudados, o valor de $k_p/k_t^{0.5}$ aumentou com o aumento da concentração inicial de NVCL. Russel (1995) sugeriu que, uma vez que o valor de k_t para um macro-radical é controlado pelo seu centro de difusão de massa, a presença de cadeias mais longas leva a uma diminuição de k_t e, conseqüentemente, ao aumento de $k_p/k_t^{0.5}$. Partindo-se deste conceito, espera-se, então, que em casos onde o aumento da concentração de solvente leva a um aumento da transferência de cadeias a moléculas menores, uma quantidade significativa de populações de cadeias curtas e com alta mobilidade, levarão a um aumento do valor global de k_t .

Resultados similares foram obtidos por McKenna et al. (1999) para a polimerização em solução do acrilato de butila (AB). Nesse trabalho, os autores também observaram uma dependência de $k_p/k_t^{0.5}$ na concentração inicial de AB. O aumento de $k_p/k_t^{0.5}$ em função da concentração inicial de monômero foi explicado em termos da diminuição da concentração de solvente no meio reacional. Os autores mencionaram,

ainda, que este efeito pode estar relacionado à diminuição da razão monômero/solvente com o consumo de monômero, levando a uma situação similar àquela da variação da concentração inicial de monômero.

Dessa forma, pode-se assumir que a velocidade de terminação na polimerização da NVCL é controlada pelo tamanho das cadeias em crescimento, principalmente em conversões baixas. Em outras palavras, a constante de terminação dos macro-radicaís é função das velocidades de difusão e, por consequência, do crescimento das cadeias (COUTINHO; OLIVEIRA, 2006; MATYJASZEWSKI; DAVIS, 2002) e, consequentemente, a concentração inicial de NVCL tem influência em $k_p/k_t^{0.5}$.

A.5. Influência da concentração de iniciador

A influência da concentração de iniciador na velocidade de polimerização foi estudada, variando-se $[I]$ em $1,6 \times 10^{-2}$, $2,3 \times 10^{-2}$ e $3,1 \times 10^{-2}$ mol/L. As concentrações de monômero e CTA foram mantidas constantes em $1,6 \times 10^{-1}$ e $6,4 \times 10^{-3}$ mol/L, respectivamente. A Figura A.8 mostra as curvas de conversão em função do tempo para as polimerizações realizadas com diferentes concentrações de iniciador. Os perfis de velocidade de polimerização estão apresentados na Figura A.9.

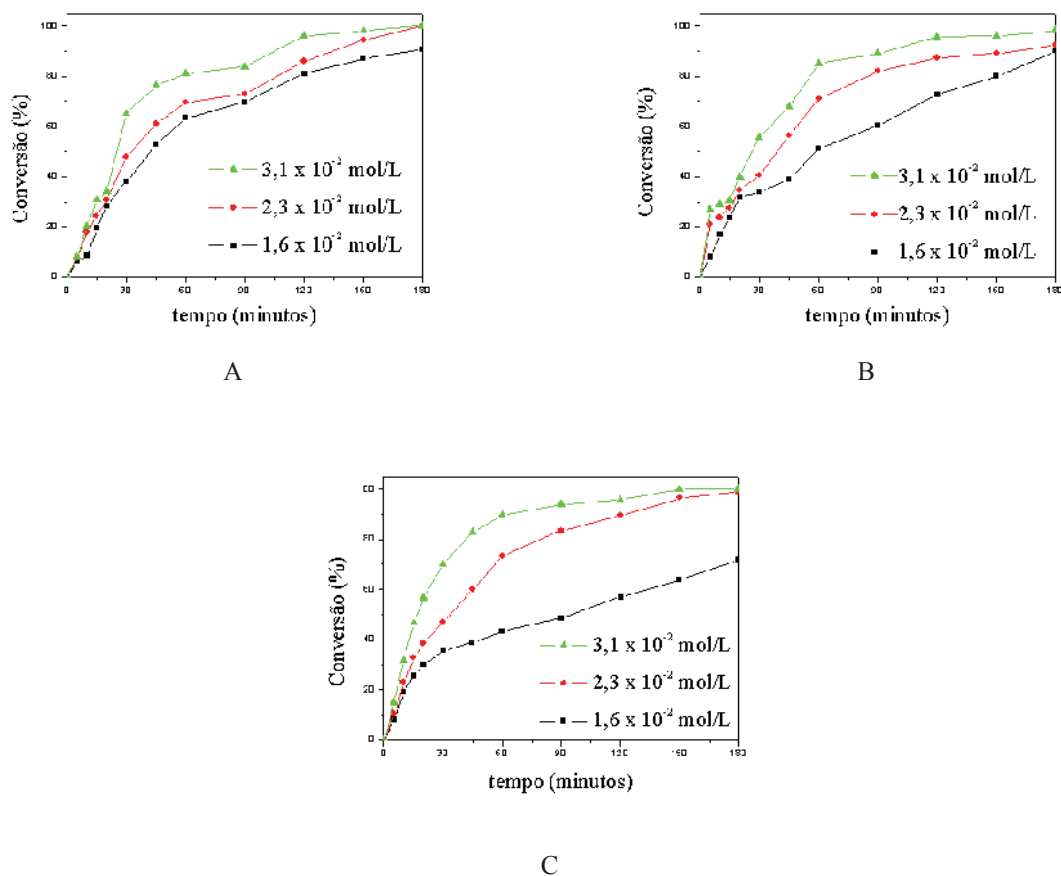


Figura A.8. Efeito da concentração de iniciador na conversão da NVCL. $[M]_0 = 1,6 \times 10^{-1} \text{ mol/L}$, $[CTA] = 6,4 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ e $T = 70^\circ \text{C}$. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

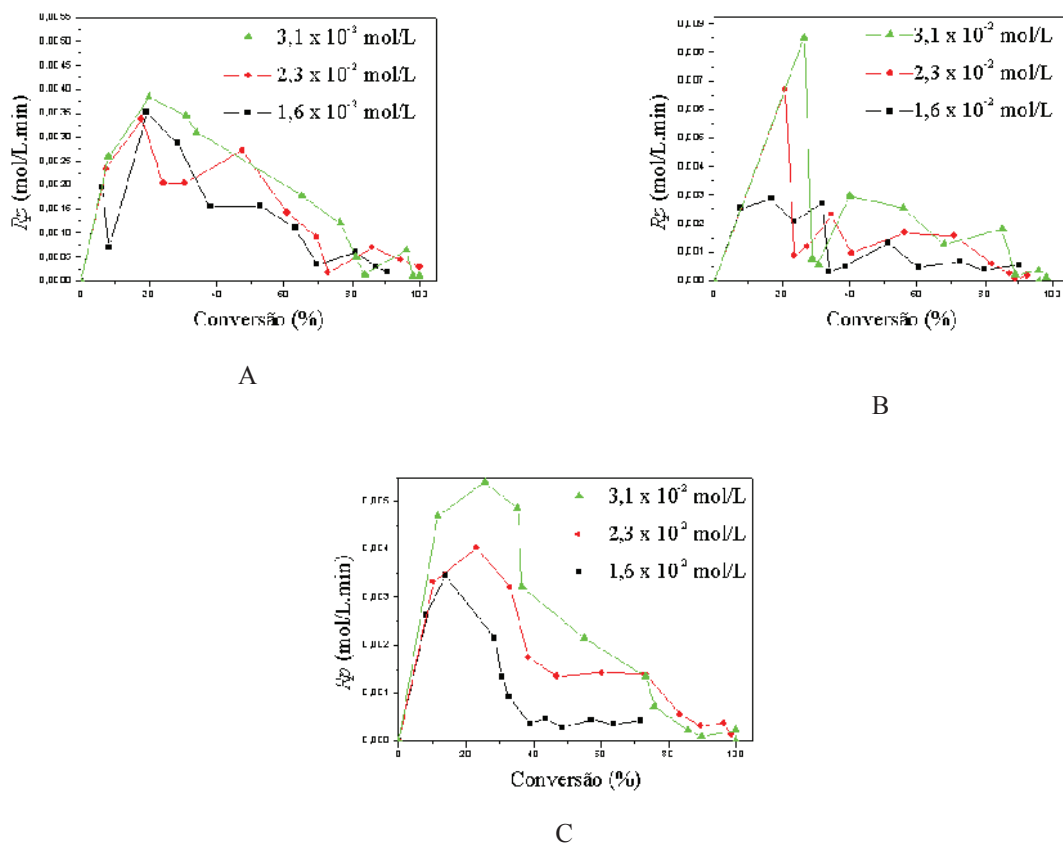


Figura A.9. Dependência da velocidade de polimerização na conversão da NVCL para as reações realizadas com diferentes concentrações de iniciador. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

As Figuras A.8 e A.9 mostram o aumento da conversão com o aumento da concentração de iniciador, o que pode ser, obviamente, explicado pelo aumento da concentração de radicais no meio reacional. O fato de que a velocidade de polimerização depende da raiz quadrada da concentração de iniciador, $[AIBN]^{1/2}$, foi demonstrado, para todos os solventes estudados, plotando-se $\ln R_p$ em função de $\ln [AIBN]_0$ (Figura A.10).

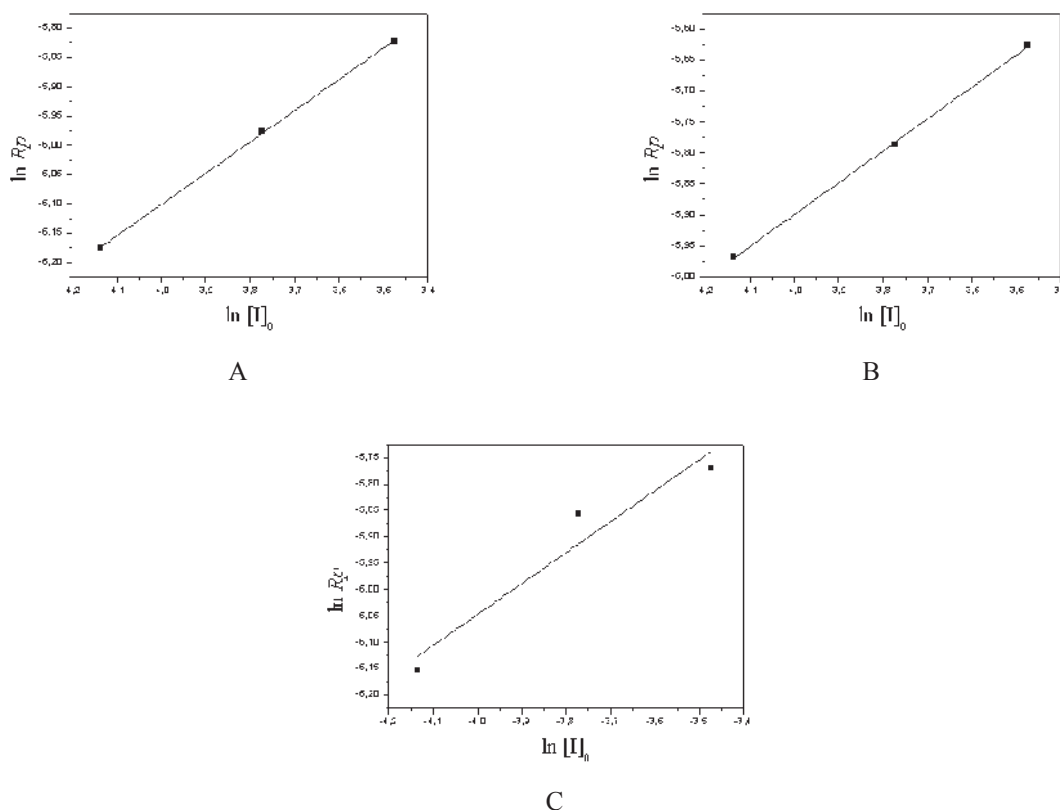


Figura A.10. Velocidade de polimerização em função da concentração de iniciador. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

Em todos os casos, R_p aumentou linearmente com a concentração de iniciador. Os valores de R_p foram obtidos da região linear (até 20 minutos, com baixas conversões) das curvas plotadas na Figura A.8. A inclinação obtida foi igual a 0,52 para 1,4-dioxano, 0,49 para o etanol e 0,59 para o isopropanol, com coeficientes de correlação iguais a 0,999, 0,998 e 0,875, respectivamente. Estes resultados indicam a ocorrência de terminação através de interações bimoleculares das cadeias em crescimento (BEHARI; TAUNK, 1998). Dessa forma, a dependência da velocidade de polimerização com relação à concentração de iniciador é consistente com a teoria clássica da cinética de polimerização e foi, igualmente, indicada em trabalhos anteriores (COLLINSON et al., 1957; DANTON; TORDOFF, 1973).

A.6. Influência da temperatura de polimerização

A influência da temperatura na velocidade de polimerização foi estudada a 60, 70 e 80 °C, como mostrado na Figura A.11. As concentrações de monômero, iniciador e CTA foram mantidas constantes a $1,6 \times 10^{-1}$, $2,3 \times 10^{-2}$ e $6,4 \times 10^{-3}$ mol/L, respectivamente. A Figura A.11 mostra que a velocidade de polimerização é fortemente dependente da temperatura.

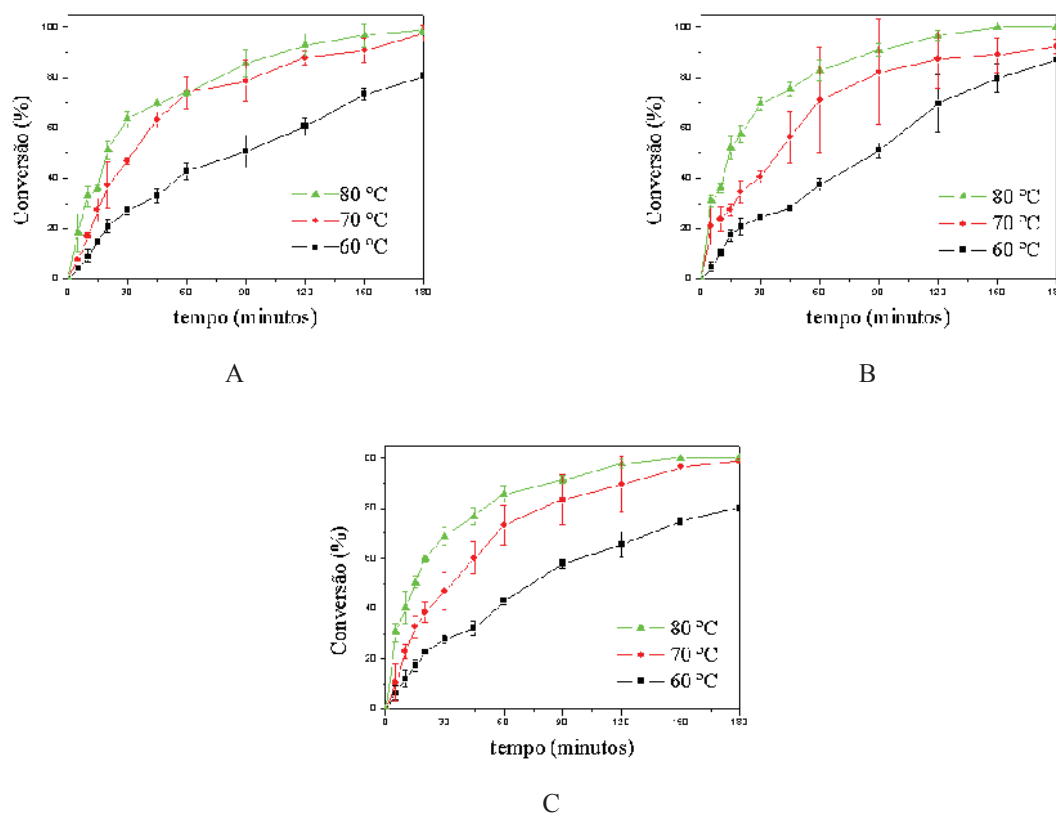


Figura A.11. Efeito da temperatura de polimerização na conversão da NVCL. $[M]_0 = 1,6 \times 10^{-1}$, $[I]_0 = 2,3 \times 10^{-2}$ and $[CTA] = 6,4 \times 10^{-3}$ mol/L. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

A influência da temperatura de polimerização na R_p também pode ser vista na Figura A.12.

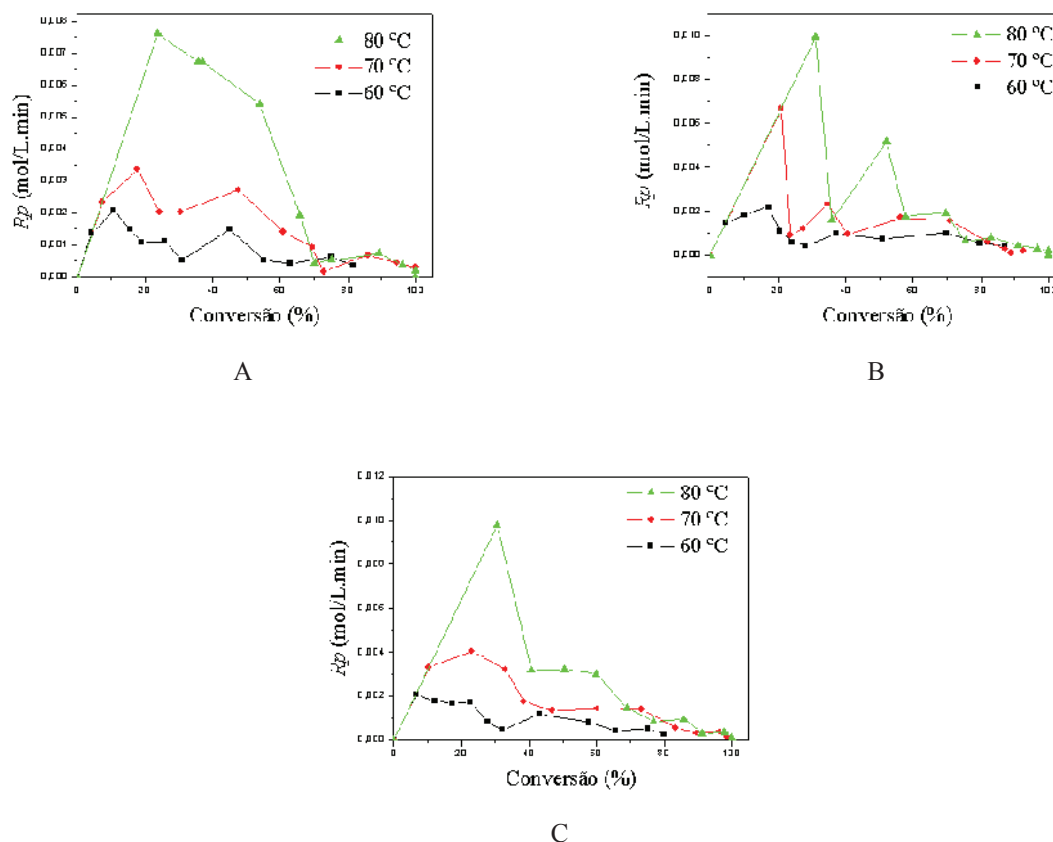


Figura A.12. Dependência da velocidade de polimerização na conversão da NVCL em diferentes temperaturas de polimerização. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

Como já é conhecido, a influência da temperatura na cinética das polimerizações radicalares é descrita pela equação de Arrhenius, a qual relaciona as constantes k_p , k_t e k_d ⁵⁰ (SCOTT; PEPPAS, 1997). Obviamente, as polimerizações se iniciam mais rapidamente em temperaturas mais elevadas e atingem conversões mais altas em intervalos de tempo menores. A Figura A.13 apresenta os valores de R_p obtidos da região linear das curvas mostradas da Figura A.11 em função dos valores inversos da temperatura.

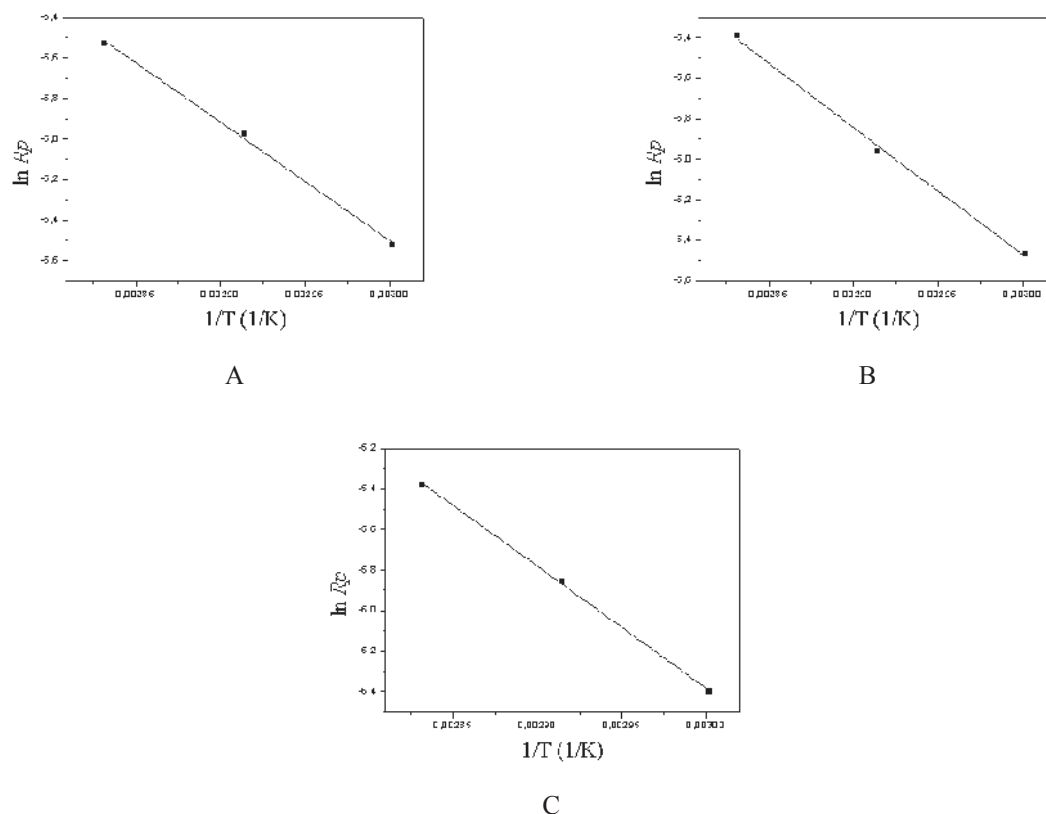


Figura A.13. Dependência de R_p na temperatura de polimerização. (1,4-dioxano), (B) etanol e (C) isopropanol.

A Figura A.13 mostra a dependência linear de $\ln R_p$ na temperatura de polimerização ($1/T$), em todos os solventes estudados. Estes resultados já eram esperados, uma vez que estão de acordo com a teoria de Arrhenius. A energia de ativação E_A é dada pela inclinação das curvas mostradas na Figura A.13 e os valores obtidos neste estudo foram de 53,6, 52,5 e 48,6 kJ/mol nas polimerizações realizadas com 1,4-dioxano, etanol e isopropanol, respectivamente. Estes valores são inferiores àqueles típicos de energia de ativação em polimerizações iniciadas através da decomposição térmica do iniciador (BRANDRUP et al., 1999). Tinker et al. (2003), por exemplo, encontraram um valor de E_A para o AIBN em 1,4-dioxano igual a 84,0 kJ/mol. Se compararmos estes valores, é óbvio que as energias de ativação obtidas neste estudo são menores que muitos valores encontrados na literatura. No entanto, é conhecido que a E_A pode ser alterada pela etapa de formação dos radicais monoméricos, ou seja, quanto mais rapidamente estes radicais se formam, maior será a energia de ativação. Além disso, devido à proximidade entre os

radicais gerados, alguns deles podem ficar presos na gaiola de solvatação (efeito gaiola), retardando, assim, a sua reação com moléculas de monômero. De acordo com a teoria do efeito gaiola, alguns radicais primários podem auto-terminar ou, ainda, reagir com moléculas monoméricas vizinhas antes de difundirem para fora da gaiola.

Não foram encontrados na literatura resultados de E_A para a NVCL nas mesmas condições experimentais deste trabalho. No entanto, os resultados obtidos neste estudo são similares àqueles encontrados por Lin (2001) e Mahdavian et al. (2004) para a polimerização da acrilamida.

A.7. Influência da concentração de CTA na cinética de polimerização, nas massas moleculares e nas distribuições de massas moleculares (*MWD*)

A influência da concentração de um agente de transferência de cadeia (CTA) (ácido 3-mercaptopropiônico) na velocidade de polimerização, massas moleculares e *MWD* foi estudada variando [CTA] em 0, $1,6 \times 10^{-3}$, $3,2 \times 10^{-3}$, $6,4 \times 10^{-3}$ e 16×10^{-3} mol/L. As concentrações de monômero e iniciador foram mantidas constantes em $1,6 \times 10^{-1}$ e $2,3 \times 10^{-2}$ mol/L, respectivamente. A Figura A.14 mostra a influência da adição de CTA na conversão da NVCL. Todas as polimerizações foram realizadas a 70 °C.

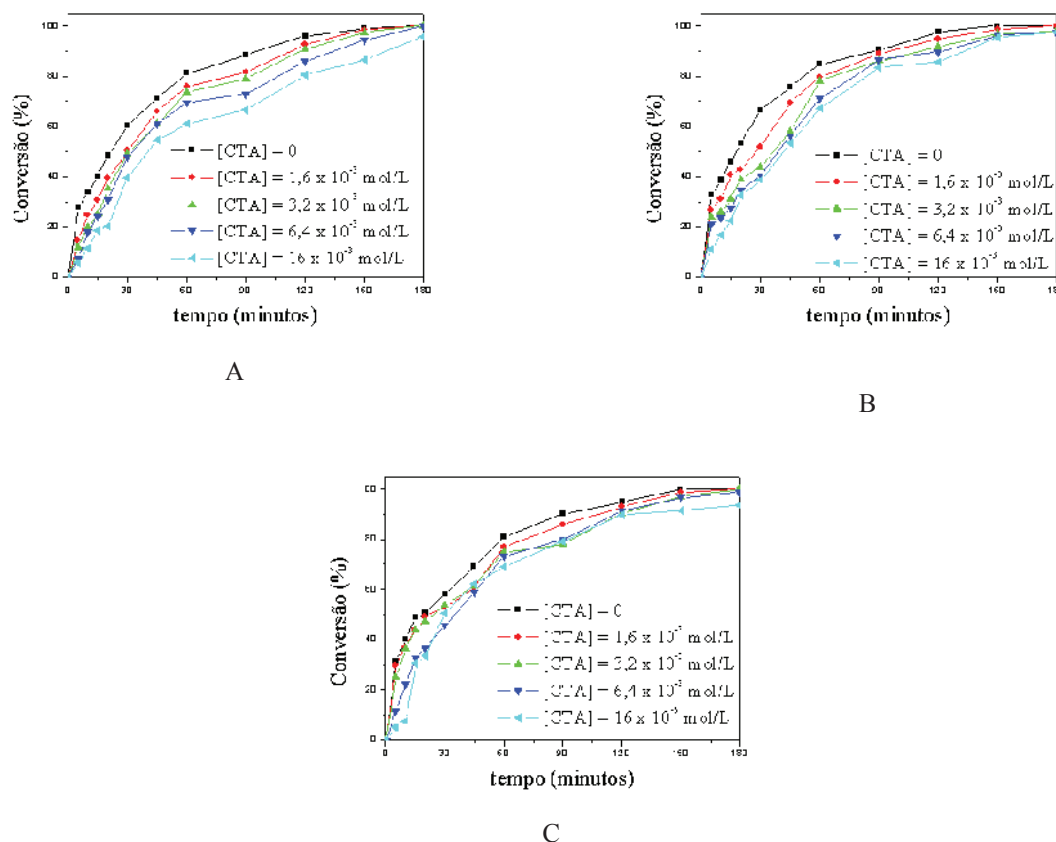


Figura A.14. Efeito da concentração de CTA (ácido 3-mercaptopropiônico) na conversão da NVCL. $[M]_0 = 1,6 \times 10^{-1}$ mol/L, $[I]_0 = 2,3 \times 10^{-2}$ mol/L e $T = 70^\circ\text{C}$. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

A Figura A.14 mostra que a adição de CTA afetou a velocidade de polimerização da NVCL. Tradicionalmente, acredita-se que a presença de CTA afeta somente a massa molecular dos polímeros (JOVANIC; DUBÉ, 2004). No entanto, considerando-se a dependência da constante k_t no crescimento de cadeias, algum efeito em R_p é, igualmente, possível. Para confirmar a influência da concentração de CTA em k_t , a Equação 3.3 foi usada para obter os valores de $k_p/k_t^{0,5}$ para diferentes concentrações de CTA (Figura A.15).

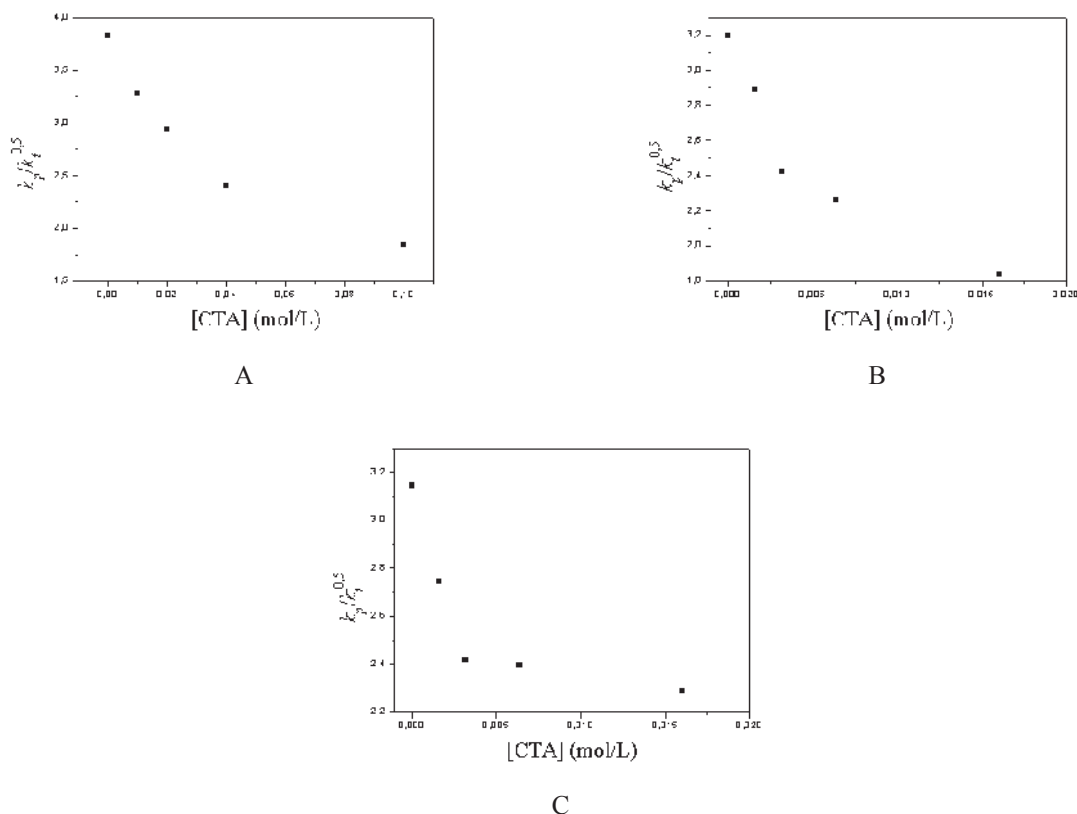


Figura A.15. Efeito da concentração inicial de NVCL na pseudo-constante $k_p/k_t^{0.5}$. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

A Figura A.15 mostra o aumento de $k_p/k_t^{0.5}$ com a concentração de CTA. Sabe-se que existe uma combinação entre as concentrações de CTA e solvente na qual o efeito destes parâmetros em R_p torna-se significativo. Em outras palavras, para as polimerizações realizadas com concentrações mais altas de CTA, observa-se a formação de uma quantidade maior de cadeias curtas. Este aumento se torna significativo ao ponto do efeito CTA se expressar não somente nas massas moleculares como também em k_t .

O efeito da concentração de CTA nas massas moleculares e distribuição de massas moleculares para os polímeros de NVCL sintetizados em 1,4-dioxano, etanol e isopropanol estão apresentados nas Tabelas A.1, A.2 e A.3, respectivamente. Como esperado, a adição de CTA reduziu significativamente as massas moleculares dos polímeros. No entanto, não foram observadas variações significantes nas distribuições de massas moleculares.

Tabela A.1. Efeito da concentração de CTA nas massas moleculares e polidispersidade dos polímeros de NVCL sintetizados em 1,4-dioxano.

[CTA] x 10 ³ (mol/L)	Conversão (%)	Massa molecular ($\bar{M}_n$) x 10 ⁻³ g/mol)	<i>MWD</i>
0	100	59,03	1,81
1,6	100	52,03	1,67
3,2	100	47,47	1,79
6,4	100	34,11	1,65
16	95,8	24,87	1,98

Tabela A.2. Efeito da concentração de CTA nas massas moleculares e polidispersidade dos polímeros de NVCL sintetizados em etanol.

[CTA] x 10 ³ (mol/L)	Conversão (%)	Massa molecular ($\bar{M}_n$) x 10 ⁻³ (g/mol)	<i>MWD</i>
0	100	28,71	1,53
1,6	100	23,05	1,93
3,2	98,07	21,03	1,95
6,4	97,42	16,03	2,27
16	96,04	12,51	2,21

Tabela A.3. Efeito da concentração de CTA nas massas moleculares e polidispersidade dos polímeros de NVCL sintetizados em isopropanol.

[CTA] x 10 ³ (mol/L)	Conversão (%)	Massa molecular ($\bar{M}_n$) x 10 ⁻³ (g/mol)	<i>MWD</i>
0	100	16,66	1,61
1,6	100	11,89	1,54
3,2	100	10,91	1,95
6,4	98,8	7,07	1,55
16	93,4	5,86	2,24

A Figura A.16 apresenta a sobreposição dos cromatogramas de GPC referentes aos resultados apresentados nas Tabelas A.1, A.2 e A.3, podendo-se confirmar através destas figuras a diminuição da massa molecular da PNVCL, com o aumento na concentração de CTA.

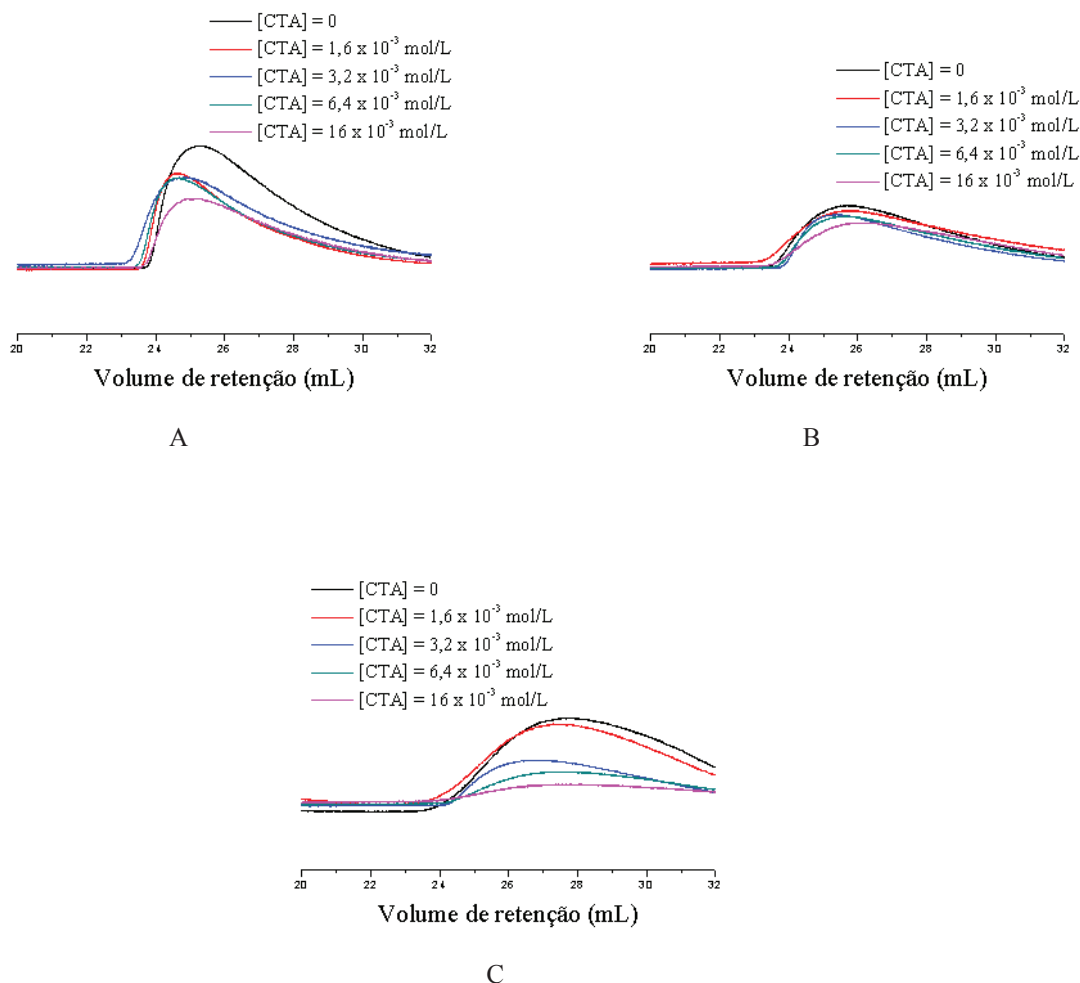


Figura A.16. Sobreposição dos cromatogramas de GPC das amostras de PNVCL sintetizadas em (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol, com diferentes concentrações de CTA.

Plotando-se a razão $(k_p/k_t^{0,5})/(k_p/k_t^{0,5})_{CTA=0}$ e a razão $M_n/M_{n,CTA=0}$, ambos em função da razão $[CTA]/[M]$ (Figura A.17), observa-se que, em todos os solventes, as curvas seguem a mesma tendência, o que significa que $k_p/k_t^{0,5}$ varia de forma quase linear com a massa molecular da PNVCL. Este comportamento pode, ainda, ser confirmado através da Figura A.18.

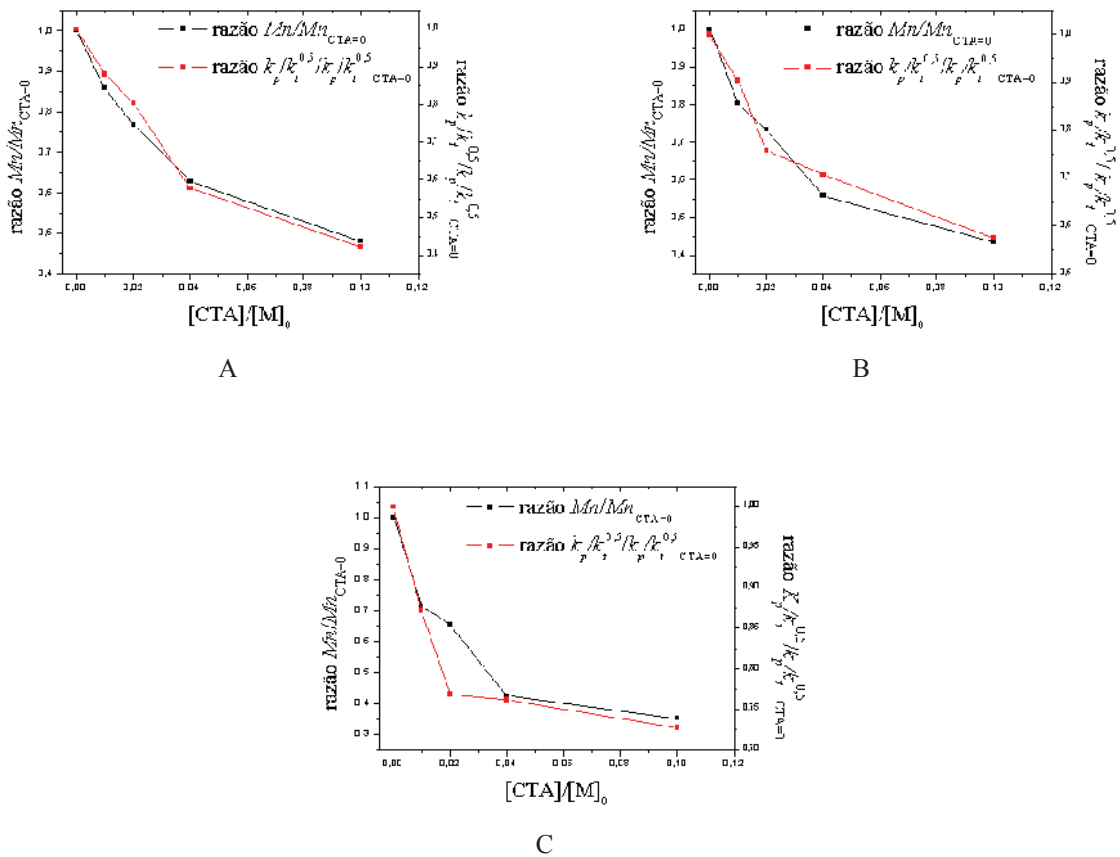


Figura A.17. Efeito da razão $[CTA]/[M]_0$ nas razões $(k_p/k_t^{0.5})/((k_p/k_t^{0.5})_{CTA=0})$ e $M_n/M_{n,CTA=0}$.
(A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

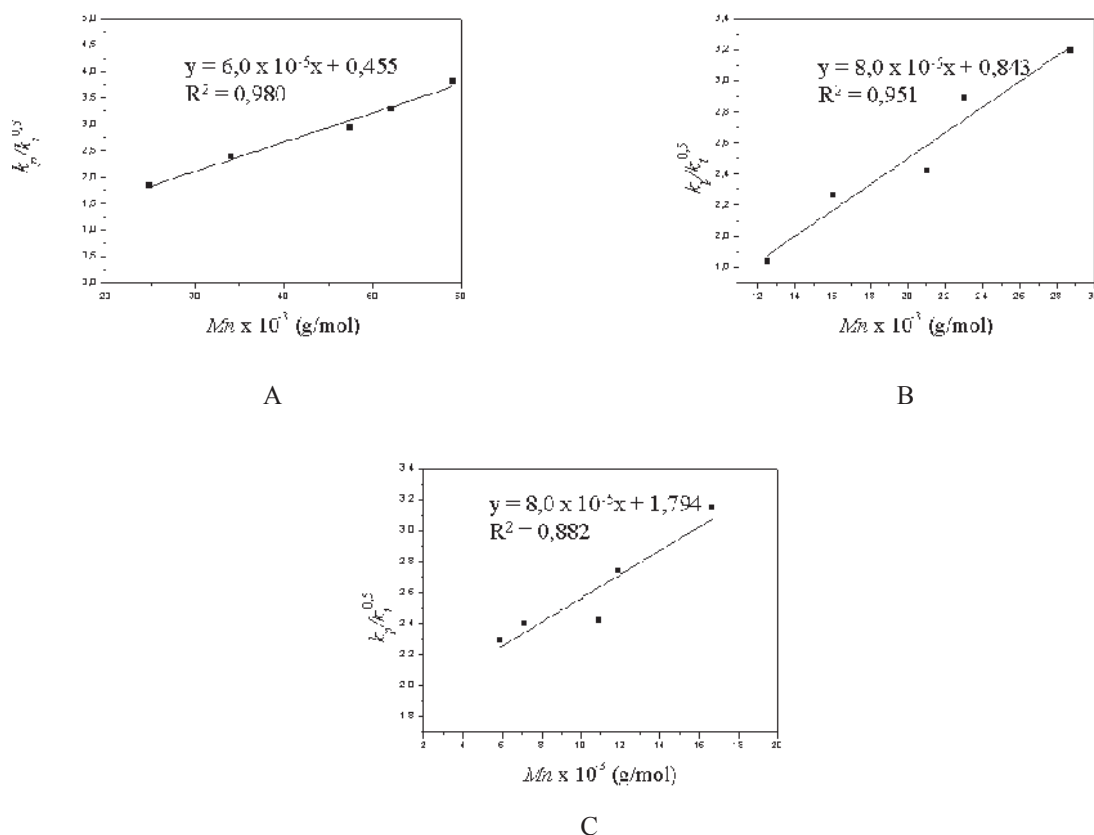


Figura A.18. Efeito da massa molecular em $k_f/k_t^{0.5}$. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

A partir das análises dos dados mostrados nas Tabelas A.1, A.2 e A.3, foi possível estimar os valores das razões entre a constante de transferência de cadeia ao CTA e as constantes de velocidade de propagação, $C = k_f/k_p$. Estes valores foram obtidos da inclinação da curva do valor inverso da massa molecular em função da razão $[CTA]/[M]_0$. A Figura A.19 apresenta estas curvas, a partir das quais foram estimados os valores de $C = k_f/k_p = 2,0 \times 10^{-4}$, para as polimerizações realizadas em 1,4-dioxano, $C = k_f/k_p = 4,37 \times 10^{-4}$, em etanol e, finalmente, $1,07 \times 10^{-3}$, para o isopropanol.

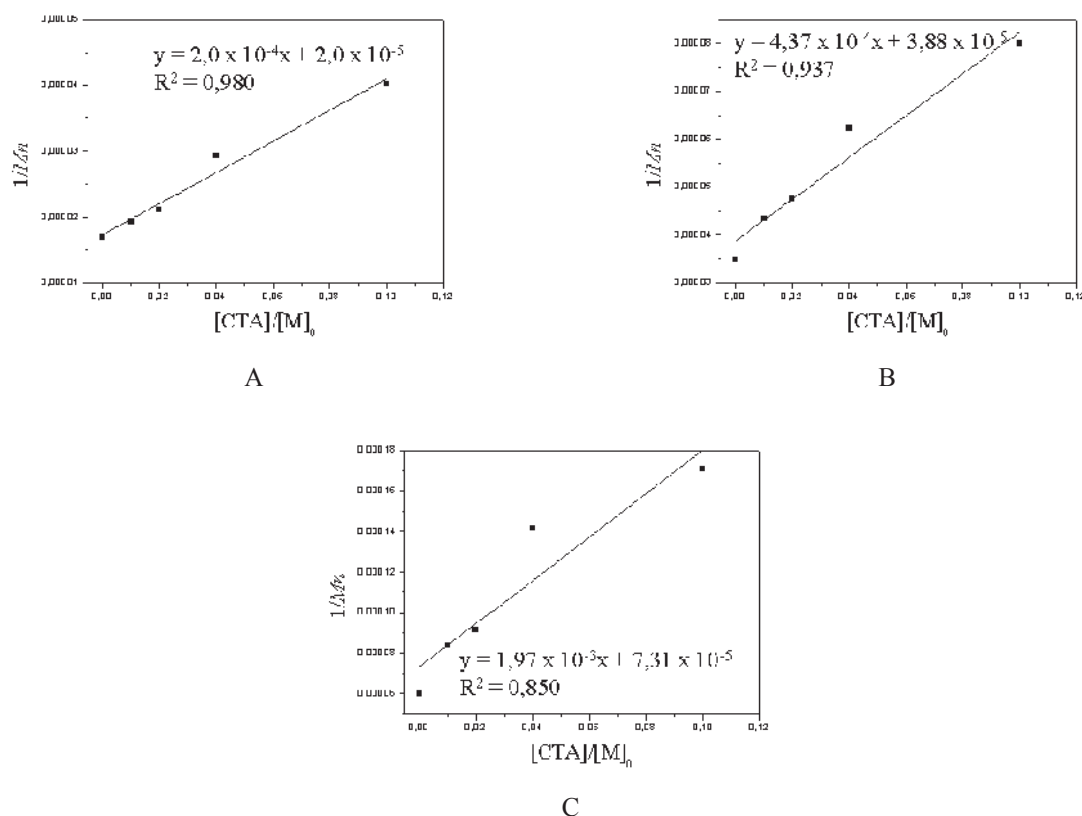


Figura A.19. Inverso das massas moleculares em função da razão $[CTA]/[M]$. (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

Através das Tabelas A.1, A.2 e A.3, observa-se que à medida que varia-se o solvente, a faixa de massas moleculares obtidas foi significativamente diferente. Este resultado está relacionado com o coeficiente de transferência de cadeia ao solvente, ou seja, à medida que este aumenta, massas moleculares menores são obtidas. Os valores das constantes $C = k_f / k_p$ obtidos da Figura A.19 confirmaram a influência da transferência ao solvente. Isopropanol foi o solvente que apresentou o maior valor de $C = k_f / k_p$, seguido do etanol e 1,4-dioxano. Isopropanol foi, também, o solvente cujas massas moleculares obtidas foram menores. É conhecido que, no caso de solventes próticos, as moléculas de NVCL podem formar pontes de hidrogênio com o solvente. Estas pontes de hidrogênio aumentam a polaridade do grupo vinil devido à conjugação com grupos $C=O$ através dos átomos de nitrogênio (KIRSH, 2002). Dessa forma, isopropanol e etanol são capazes de formar pontes de hidrogênio com as moléculas de NVCL e, como resultado, eles podem ser usados como agentes de transferência de cadeia, devido ao alto coeficiente de transferência de cadeia e, conseqüentemente, à redução nas massas moleculares dos

polímeros. Este fato foi observado por Kudyshkin et al. (2002), que estudou a influência da variação da concentração de isopropanol nas massas moleculares da PNVCL, e explica as massas moleculares menores obtidas neste estudo, em comparação com os outros solventes utilizados.

A.8. Efeito da massa molecular na LCST

É conhecido que a LCST da PNVCL aumenta com o decréscimo da massa molecular do polímero (MEUSSEN et al., 2000). Este fenômeno é atribuído ao fato de que o comportamento da PNVCL em solução aquosa corresponde à teoria de Flory-Huggins (SHTANKO et al., 2003). De acordo com as Tabelas A.1, A.2 e A.3 maiores concentrações de CTA resultam em polímeros com massas moleculares mais baixas. A Figura A.20 mostra o efeito da massa molecular na LCST da PNVCL em solução aquosa na concentração de 5g/L. Como pode ser observado, a LCST diminuiu com o aumento da massa molecular, para todos os solventes estudados. Os valores variaram entre 34 e 36 °C, no caso dos polímeros sintetizados em 1,4-dioxano, 35 e 37 °C, no caso do etanol e, finalmente, entre 37 e 38,5°, no caso do isopropanol. Esta variação pode ser, obviamente, explicada em termos da variação das massas moleculares obtidas para cada solvente estudado. O decréscimo da massa molecular ocasiona um aumento das interações entre o polímero e o meio aquoso.

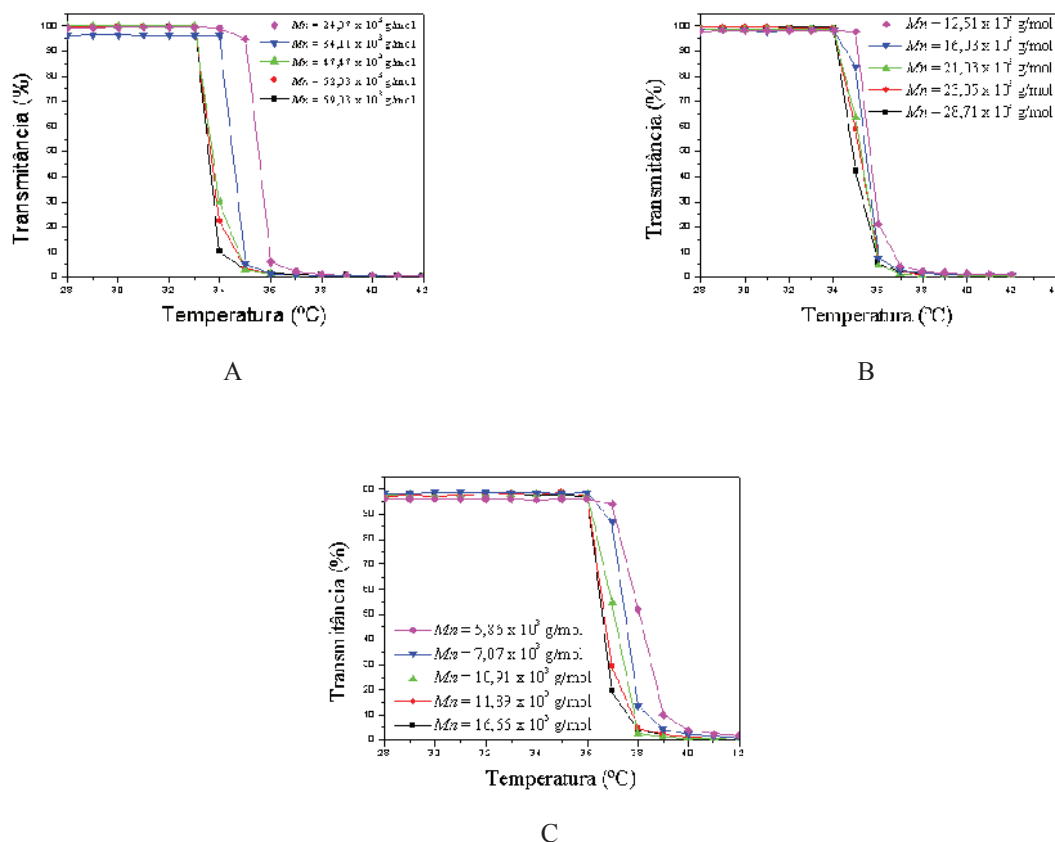


Figura A.20. Efeito da massa molecular na LCST da PNVCL sintetizada em (A) 1,4-dioxano, (B) etanol e (C) isopropanol.

O aumento da hidrofiliicidade da PNVCL pode, ainda ser explicado pela contribuição dos grupos carboxílicos presentes na molécula do ácido 3-mercaptopropiônico (CTA), como foi previamente discutido por Inoue et al. (1997). Estes autores sintetizaram polímeros de NVCL com massas moleculares entre 650 e 6040 g/mol. No entanto, como as massas moleculares obtidas, no presente estudo, foram maiores que aquelas obtidas por Inoue et al. (1997), obviamente, o efeito dos grupos carboxílicos, neste caso, é menos evidenciado. Dessa forma, o aumento da massa molecular da PNVCL parece ter um efeito efetivo na sua LCST.

A.9. Conclusões

Neste trabalho, foi demonstrado que a cinética de polimerização da *N*-vinilcaprolactama em 1,4-dioxano, etanol e isopropanol foi influenciada pelas condições de

polimerização. A cinética da polimerização em solução da NVCL depende fortemente das concentrações de monômero, de iniciador e, ainda, da temperatura de polimerização. Observou-se que $k_p/k_t^{0,5}$ depende não somente da concentração inicial de NVCL, a uma concentração fixa de iniciador, como, também, da concentração de CTA. O aumento das reações de transferência de cadeia, quando concentrações maiores de CTA foram utilizadas, levou à obtenção de polímeros com massas moleculares mais baixas. A variação do solvente também influenciou a massa molecular da PNVCL. Isopropanol foi o solvente que apresentou maior coeficiente de transferência de cadeia e, portanto, foi aquele no qual os polímeros possuíam as menores massas moleculares.

A velocidade de polimerização teve ordem de dependência, em relação ao monômero, superior a uma unidade, e este resultado foi atribuído à influência do crescimento de cadeias em k_t e, embora exista um desvio do modelo clássico de cinética de polimerização, está de acordo com alguns trabalhos da literatura. A ordem de dependência com relação à concentração de iniciador, por sua vez, seguiu a teoria clássica.

As polimerizações foram mais rápidas com o aumento da temperatura de reação. As energias de ativação obtidas foram de 53,6, 52,5 e 48,6 kJ/mol nas polimerizações realizadas com 1,4-dioxano, etanol e isopropanol, respectivamente.

As razões entre as constantes de transferência de cadeia ao CTA (ácido 3-mercaptopropiônico) e as constantes de velocidade de propagação foram equivalentes a $C = k_f / k_p = 2,0 \times 10^{-4}$, para as polimerizações realizadas em 1,4-dioxano, $C = k_f / k_p = 4,36 \times 10^{-4}$, em etanol e, finalmente, $1,07 \times 10^{-3}$, para o isopropanol, o que explica as massas moleculares menores obtidas nas sínteses realizadas em isopropanol.

Finalmente, observou-se que a LCST da PNVCL aumentou com o decréscimo na massa molecular do polímero. Este fato foi, principalmente, atribuído ao aumento da interação da PNVCL com o meio aquoso, com o decréscimo da sua massa molecular. Algum efeito foi também relacionado à presença de grupos carboxílicos nas moléculas de CTA. No entanto, como, em geral, altas massas moleculares foram obtidas neste estudo, este efeito não foi muito evidenciado.

APÊNDICE B

Résumé

Année 2010

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE DE SAO PAULO – L'ECOLE D'INGENIERIE DE LORENA

et

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

En vue de l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR

Formation doctorale : Matériaux polymères

Présentée par

Simone de Fátima Medeiros

Titre:

L'obtention de nanoparticules magnétiques stimulables pour les applications médicales

Jury :

M. Hatem FESSI

M. Amilton Martins dos SANTOS

M. Abdelhamid ELAISSARI

M. Edvani Curti MUNIZ

M. Mohamed Chehimi

Mme Jayne Carlos de Souza BARBOZA

Président

Directeur

Co-directeur

Examineur et rapporteur

Examineur et rapporteur

Examinatrice

Résumé

MEDEIROS, S. F. **L'obtention de nanoparticules magnétiques stimulables pour les applications médicales**, 2010. 292 p. Thèse (Doctorat en Ingénierie des Matériaux) – Ecole d'Ingénierie de Lorena, Université de São Paulo, Lorena/São Paulo.

Les particules des polymères avec des propriétés magnétiques sont utilisées dans des applications thérapeutiques *in vivo*, comme des agents de libération contrôlée de principes actifs, pour des applications *ex vivo*, dans l'extraction de cellules cancéreuses dans le corps, et finalement pour le diagnostic *in vitro*. La nécessité de matériaux biocompatibles et intelligents, comme agent d'encapsulation de nanoparticules magnétiques, conduit à l'utilisation de polymères hydrophiles, biodegradables, biocompatibles et dans certains cas stimulables. Dans les applications thérapeutiques, cette technologie est basée sur le déplacement des particules en appliquant un champ magnétique et sur la concentration du médicament dans la zone d'intérêt. Cette étape est suivie par la libération du médicament, en utilisant les propriétés des polymères stimulables. Ainsi, cette thèse est consacrée à l'étude de la préparation de nanoparticules composées d'une matrice polymère sensible aux stimuli et des particules d'oxyde de fer ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et Fe_3O_4). Tout d'abord, nous avons étudié l'obtention de nanogels à base de poly(NVCL-co-AA) en utilisant la polymérisation par précipitation. La poly(N-vinylcaprolactame) (PNVCL) est un polymère qui possède une température critique inférieure de solubilité (LCST), proche de la température physiologique (35-38°C). Ce polymère est connu pour avoir une bonne biocompatibilité plus haute, par rapport à des autres polymères sensibles à la température. En plus, le poly(acide acrylique) (PAA) est un polymère qui présente la sensibilité au pH. Dans cette étape, on a étudié l'influence de quelques paramètres de synthèse sur les diamètres des particules, la distribution de la taille des particules et la sensibilité à la température des nanogels. La sensibilité au pH a été également évaluée en fonction de la concentration d'AA ajoutée dans les synthèses. Ensuite, nous avons effectué l'étude de l'incorporation de nanoparticules magnétiques stabilisées par le dextran dans les nanogels de PNVCL réticulé en utilisant la technique de polymérisation en miniémulsion inverse. Les nanogels magnétiques thermosensibles ont été caractérisés en termes de taille (DP), distribution de la taille des particules (DTP) en utilisant la diffusion de la lumière. Le caractère thermosensible des nanogels magnétiques a également été étudié en mesurant le diamètre hydrodynamique en fonction de la température. Les propriétés magnétiques (aimantation spécifique et la magnétisation) ont été examinées en utilisant un magnétomètre à échantillon vibrant (VSM). L'analyse par infrarouge (FTIR) et par diffraction des rayons X ont montré qualitativement l'incorporation des nanoparticules magnétiques dans la matrice polymère. L'efficacité d'encapsulation de nanoparticules d'oxyde de fer a été étudiée par l'analyse thermo-gravimétrique (TGA) et par les mesures d'aimantation. Les caractéristiques morphologiques des nanogels magnétiques et stimulables ont été examinées par la microscopie électronique en transmission (TEM).

Mots-clé : N-vinylcaprolactame, LCST, cinétique de polymérisation, miniémulsion, nanoparticules magnétiques, applications biomédicales.

Chapitre 1

1. L'Etude Bibliographique

1.1. Les polymères thermo-sensibles

Les polymères thermo-sensibles sont solubles dans l'eau à basse température, mais ils précipitent de ces solutions à des températures supérieures à la température de transition de phase, connue sous le nom LCST (*Low Critical Solution Temperature*). Cette transition de phase est à l'origine d'utilisation de ces polymères dans les systèmes de libération contrôlée de principes actifs (YANUL et al., 2001).

Au-dessous de la LCST, des interactions de type hydrogène entre les molécules d'eau et ces chaînes macromoléculaires sont dominantes par rapport aux interactions polymère-polymère. Ainsi, ces chaînes polymères sont très solvatées en milieu aqueux. L'augmentation de la température favorise la rupture des liaisons hydrogène entre le polymère et l'eau, ce qui induit sa précipitation et généralement une séparation de phase est observée.

Le poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) est le polymère thermosensible le plus étudié dans la littérature. Cependant, la plupart des études décrivent son utilisation dans des applications *in vitro*. En revanche son utilisation dans des applications *in vivo* reste très prospective et hésitante suite à des divergences sur sa toxicité.

Dans ce contexte, un autre polymère thermosensible et biocompatible (la poly(*N*-vinylcaprolactame), PNVCL) est actuellement étudié pour des fins thérapeutiques (VIHOLA et al., 2005).

La sensibilité à la température de poly(N-vinylcaprolactame)

Actuellement, il y a de nombreuses études décrivant principalement la transition de phase de PNVCL dans l'eau (MAKHAEVA et al., 2003; LOZINSKII et al. 2006; PENG ; WU, 2000; LAU ; WU, 1999). Le PNVCL est un polymère sensible à la température et biocompatible, ce qui la rend un bon candidat pour les applications *in vivo* (MAEDA et al., 2001). La LCST de ce polymère est proche de la température physiologique (35-38 °C) et cette transition est modulable en fonction de son masse moléculaire et de son composition chimique (SHTANKO et al., 2003).

Le monomère utilisé pour la préparation de PNVCL est la *N*-vinyl-caprolactam (NVCL), une molécule soluble dans un milieu organique polaire, comme l'éthanol, ou dans un milieu non polaire, comme le 1,4-dioxane (LOZINSKY et al., 2000). La biocompatibilité de PNVCL, combinée avec sa capacité à complexer d'autres molécules permet son utilisation dans des domaines divers et variés. En effet, ce polymère est actuellement utilisé dans les produits cosmétiques et commercialisé par BASF sous la dénomination Luviskol®Plus, pour des applications capillaires. Cependant, de nombreuses études sont menées sur son utilisation pour la stabilisation des protéases et en tant que transporteur de principes actifs (GILLIES et al., 1994; LU et al., 2004).

1.2. L'utilisation des polymères stimulables en bionanobiotechnologie

Les nanomatériaux sont des matériaux avec des propriétés particulières et qui sont utilisés dans des domaines direct avec les nanotechnologies. Ils peuvent varier en termes de la taille, la composition chimique, la forme, la surface et les propriétés intrinsèques (optique, électronique et photophysique) et par conséquent, ils sont fondamentaux pour la création de nanostructures à très haute valeur ajoutée. Dans le domaine de la nanotechnologie, la nanobiotechnologie peut être définie comme l'étude, la transformation, la fabrication et la conception de nanomatériaux pour applications dans les sciences de la vie. Le défi majeur de la nanobiotechnologie est d'obtenir un diagnostic précoce et précis des maladies et d'accroître ainsi l'efficacité des divers traitements thérapeutiques.

L'industrie utilise déjà la nanotechnologie dans la préparation de nombreux produits, tels que les particules métalliques pour augmenter la briance des couches de maquillage, la nanoémulsion pour l'hydratant cheveux et effet capillaire, l'encapsulation de la vitamine C, des systèmes capables de libérer des actifs anti-rides et des crèmes de protection solaire.

La science de l'encapsulation des médicaments a émergé ces dernières décennies en raison de la possibilité de réduire la toxicité de certains médicaments, la libération contrôlée, l'augmentation de l'efficacité de la drogue et de réduire les quantités thérapeutiques nécessaires. Les stratégies pour l'obtention des molécules actives et de réduire les quantités thérapeutiques nécessaires. Les stratégies pour l'obtention de tel

systèmes comprennent, en général, l'utilisation de colloïdes, sous ses diverses formes (les émulsions multiples, les micro et nanogels, les liposomes, les nanocapsules, les micro et nanoparticules, etc). Ces matériaux nanostructurés présentent des propriétés intéressantes en raison de la possibilité de passage à travers les barrières cellulaires par l'endocytose et la phagocytose des leucocytes, des monocytes, des macrophages et d'autres cellules endothéliales.

1.3. L'obtention de gels stimulables et utilisables pour la libération contrôlée des principes actifs

Des nombreux auteurs ont étudié différents systèmes à base de polymères sensibles aux stimuli pour la libération contrôlée de principes actifs. Un gel d'un polymère, par exemple, se compose de chaînes de polymères assemblées de réticulation. Les gels sensibles à la température et au pH sont des particules réticulées qui peuvent gonfler ou rétracter selon les conditions environnementales, en réponse aux stimuli. Ces systèmes ont été développés pour de nombreuses applications thérapeutiques, destinés principalement à l'administration parentérale, orale ou ophtalmique.

Pour préparer des gels, microgels et nanogels sensibles à la température et le pH, par exemple, la polymérisation radicalaire est souvent utilisée. L'utilisation d'agents de réticulation est nécessaire pour maintenir la cohésion des chaînes. Il existe plusieurs méthodes reportées dans la littérature décrivant la préparation de nanogels qui sont utilisés comme systèmes de libération contrôlée de principes actifs. Ces méthodes incluent en général les procédés de polymérisation ou les techniques de précipitations de polymères préformés. Parmi les méthodes de polymérisation, nous pouvons citer la polymérisation en émulsion, la miniémulsion, la microémulsion (direct ou inverse), la polymérisation en dispersion ou par précipitation. Concernant les méthodes utilisant les polymères préformés, l'émulsion-évaporation de solvant, l'émulsion-diffusion de solvant et la précipitation sont fréquemment utilisés. Le principe de base de ces méthodes est relativement similaire, car il implique tout simplement la préparation d'un polymère (ou un mélange de polymères) dans un bon solvant et sa précipitation par la suite dans un mauvais solvant.

1.3.1. La polymérisation en milieu dispersé

La polymérisation en milieu dispersé est fréquemment utilisée industriellement pour obtenir une grande variété de produits comme les peintures, les adhésifs, les additifs pour l'industrie textile et du papier, des additifs pour le traitement du cuir, etc. La polymérisation en milieu dispersé est également utilisée pour l'encapsulation des principes actifs dans l'industrie thérapeutique et cosmétique. Actuellement, ces procédés de polymérisations sont à l'étude pour l'obtention de systèmes particuliers de libération contrôlée des actifs pour les applications pharmaceutiques et biomédicales.

1.3.1.2. La polymérisation en émulsion

Parmi les méthodes de polymérisation en milieu dispersé, la polymérisation en émulsion est un procédé efficace pour la synthèse des différents types de matériaux hybrides (WIECHERS ; SCHMIDT-NAAKE, 2008). Cette technique est un processus hétérogène dans lequel les monomères sont dispersés dans une phase continue (habituellement de l'eau), avec ou sans tensioactif, et en présence d'un amorceur de polymérisation radicalaire. La formation des particules dans une polymérisation en émulsion, peut se produire principalement par trois mécanismes différents: par la nucléation micellaire ou hétérogène, par la précipitation d'oligomères dans la phase aqueuse ou par la nucléation homogène et l'entrée des radicaux dans les gouttelettes de monomère. Toutefois, dans une polymérisation en émulsion classique, la polymérisation se fait préférentiellement par nucléation micellaire.

1.3.1.3. La polymérisation en miniémulsion

La polymérisation en miniémulsion est un procédé relativement plus maîtrisé que les autres et largement exploité des deux dernières décennies (QI et al., 2007). La miniémulsion est définie comme une dispersion de gouttelettes organiques stabilisées par un tensioactif dans l'eau. La taille des gouttelettes est comprise entre 50 et 300 nm. Théoriquement, la taille moyenne et le nombre de particules finales sont de même ordre de grandeur que pour les gouttelettes de monomère utilisées. Ceci se traduit par le fait que le mécanisme prédominant de la formation des particules est la nucléation de gouttelettes de monomère.

La préparation d'une miniémulsion est divisée en deux étapes. La première étape consiste à préparer la miniémulsion via la dispersion de monomère (en présence d'un tensioactif) dans une phase continue en utilisant une forte énergie de cisaillement comme un homogénéiseur ou les ultrasons (ASUA, 2002; LANDFESTER, 2001). La taille des gouttelettes dépend principalement de la formation utilisée, nature de monomère, le type de tensioactif et co-tensioactif, ainsi que des conditions de dispersion. La deuxième étape consiste à transformer les gouttelettes de monomère en particules solides via la polymérisation. Dans la polymérisation en miniémulsion, les gouttelettes de monomère sont considérées comme des «nanoréacteurs» et conduisent à l'obtention d'un système relativement monodisperse en taille.

La différence de potentiel chimique entre le monomère dans les petites gouttelettes et le monomère dans les grosses gouttelettes force les molécules de monomère à diffuser dans les grosses gouttelettes, ce qui provoque la déstabilisation colloïdale des émulsions. La dégradation diffusionnelle (maturation d'Ostwald) et la coalescence peuvent conduire à la déstabilisation de l'émulsion (ASUA, 2002). Pour créer une miniémulsion stable, les gouttelettes doivent être stabilisées contre le mûrissement d'Ostwald et contre la coalescence simple. En ce qui concerne le mûrissement d'Ostwald, il peut être réduit via l'utilisation d'un co-tensioactif, qui s'agit comme un agent osmotique. En résumé, le rôle d'un co-tensioactif dans la polymérisation en miniémulsion est de réduire ou même d'éliminer le mûrissement d'Ostwald via l'introduction d'une pression osmotique afin de maintenir la stabilité des gouttelettes de monomère au cours du processus de polymérisation (PRICHANONT et al., 2000). D'autre part, la coalescence de la dispersion peut être réduite par l'addition de quantités appropriées de tensioactifs dans la formulation afin de renforcer la stabilisation électrostatique ou stérique des gouttelettes (ANTONIETTI ; LANDFESTER, 2002 ; GILBERT, 1995; LANDFESTER, 2003). Ainsi, la stabilité colloïdale est liée à la nature et la quantité de tensioactif utilisé. Après le processus d'homogénéisation (i.e. fragmentation), la taille des gouttelettes dépend entièrement de la quantité de tensioactif. En effet, plus la quantité de tensioactif est importante, plus la taille des particules est réduite. L'utilisation de cette technique de polymérisation a plusieurs avantages: (i) relativement simple à mettre en oeuvre, (ii) la bonne maîtrise de la taille finale et de la distribution en taille, (iii) la polymérisation est rapide, car elle est généralement localisée dans les gouttelettes, (iv) une distribution plus homogène de la taille finale des particules de polymère, (v) l'élimination de la concurrence

en tensioactif dans l'étape de nucléation et de la croissance des particules, qui fait que le nombre final de particules doit moins dépendre des variations dans la composition du système, tels que le type d'amorceur, et (vi) l'utilisation pour l'encapsulation et l'obtention de particules hybrides organique/inorganiques (TIARKS et al., 2001; MORAES et al., 2006; FAUCHER et al., 2010) et organiques/biologiques (LANDFESTER, 2003; LOPEZ et al., 2008; RODRIGUES et al., 2007).

1.3.1.4. La polymérisation en miniémulsion inverse

Pour la polymérisation de monomères hydrophiles, comme c'est le cas de monomère utilisé dans notre étude, le NVCL, le procédé de polymérisation en miniémulsion inverse est utilisé (YANG et al., 2008). Ceci consiste de réaliser des gouttelettes de monomères hydrophiles stabilisées par des tensioactifs et dispersées dans une phase organique. (ANTONIETTI ; LANDFESTER, 2002). Ce procédé est largement utilisé pour l'élaboration de particules dispersées dans une phase organique comme illustré pour les nombreux articles publiés dans ce domaine (MACKOVÁ ; HORÁK, 2006 ; LIN, 2001 ; LANDFESTER et al., 2000) ; .

Pour éviter le mûrissement d'Ostwald en miniémulsion inverse, l'utilisation des co-tensioactifs, tels que le chlorure de sodium (NaCl) est plus d'usage (TIARKS et al., 2001). L'augmentation de la force ionique dans les gouttelettes de monomère conduit à une réduction significative de mûrissement d'Ostwald (KOROLEV ; YURTOV, 2003). Une attention croissante est dédiée à la préparation des particules de polymère via la polymérisation en miniémulsion inverse en raison de la possibilité d'encapsuler des nanoparticules inorganiques dans les matrices de polymères hydrophiles.

1.4. La combinaison des propriétés magnétiques et stimulables

Ces dernières années, une attention particulière est dédiée à l'élaboration des particules hybrides et stimulables via des stimuli extérieurs tel que le pH, la température, le champ magnétique, le champ électrique, etc (KHAN, 2008). Dans ce cas, les hydrogels stimulables et les nanoparticules (organiques et inorganiques) avec des propriétés magnétiques ont été développés ((MACKOVÁ ; HORÁK, 2006 ; LIN, 2001). L'incorporation de nanoparticules magnétiques (l'oxyde de fer) dans des matrices de

polymères est un domaine intéressant pour la préparation de matériaux hybrides à finalités bionano. Cependant, le développement de gels stimulables reste un challenge en raison des propriétés et des potentialités que ces matériaux offrent pour les applications ciblées et en particulier dans le domaine biomédical.

Le champ magnétique est l'un des stimuli le plus pratique en termes de contrôle. Les nanoparticules incorporées dans des gels de polymères sont caractérisées par de fortes interactions avec les chaînes de polymères et sont capables de répondre rapidement aux champs magnétiques externes. En général, ces systèmes sont caractérisés en termes de taille et distribution en taille des particules, les propriétés magnétiques, la cristallinité, l'efficacité d'encapsulation, la composition chimique, la morphologie, la stabilité colloïdale, etc. Les techniques couramment utilisées sont la microscopie électronique à balayage et à transmission (MEB et MET), la diffraction des rayons X, la densité de charge de surface, l'analyse thermo-gravimétrique (TGA), l'infrarouge (FTIR), la magnétométrie, la diffusion de la lumière (LS), etc.

À la recherche de nouveaux matériaux plus appropriés pour la livraison de médicaments pour traitement du cancer, la recherche doit prendre en considération que ces systèmes visent à réduire les effets indésirables des fortes doses de médicament injecté dans l'organisme. Par conséquent, le ciblage localisé d'une dose optimale de molécules actives reste la solution incontournable pour éliminer des effets secondaires (GUPTA ; HUNG, 1994; CHUNFU et al., 2004). Quand les systèmes constitués de nanoparticules magnétiques et de matériaux polymères sont administrés en intraveineuse, un champ magnétique externe de haute fréquence est utilisé afin de concentrer le médicament à un endroit précis dans le corps. Ce processus de guidage et de concentration localisée dépend principalement des propriétés magnétiques des nanoparticules utilisées en générale et des propriétés magnétiques résultantes des hybrides en particulier. Lorsque les forces magnétiques dépassent la vitesse du flux sanguin dans les artères (10 cm/s) ou dans les capillaires (0,05 cm/s), les particules magnétiques s'accumulent dans la cible et peuvent être internalisées par les cellules endothéliales des tissus. Le médicament peut être alors libéré des particules, en pénétrant dans les cellules cancéreuses via l'activité enzymatique ou par des changements dans les conditions physiologiques tels que le pH et la température (ALEXIOU et al., 2000).

Tout comme les nanoparticules polymériques et les nanogels, la polymérisation en milieu dispersé et l'utilisation de polymères préformés sont des voies différentes pour la

préparation de matériaux hybrides constitués de nanoparticules magnétiques (ELAISSARI et al., 2009). La polymérisation en milieu dispersé comprend l'utilisation de procédés de polymérisation classiques, comme la suspension, l'émulsion, la miniémulsion, la microémulsion, l'émulsion ou la miniémulsion inverse, et encore l'utilisation de techniques multiples ou combinées.

Malheureusement, certaines techniques, comme la polymérisation en miniémulsion, par exemple, ont des limitations liées à la distribution en taille hétérogène des nanoparticules magnétiques dans les matrices polymériques, la présence de particules de polymère sans l'oxyde de fer et la présence de nanoparticules d'oxyde de fer sans le polymère (non encapsulées).

Comme mentionné précédemment, les nanoparticules magnétiques à base de polymères peuvent également être obtenues à partir de polymères préformés en utilisant plusieurs procédés : (i) l'émulsion-évaporation du solvant, (ii) l'émulsion-diffusion du solvant, (iii) la coacervation-diffusion et (iv) la précipitation. Le procédé le plus utilisé implique généralement la préparation d'une émulsion contenant le polymère. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont dispersées dans la même phase que le polymère et ce mélange est émulsionné dans une phase continue contenant un tensioactif ou un polymère stabilisant, tel que le poly(alcool vinylique) (PVA) ou le Pluronic®, dans le cas des émulsions de type d'huile dans l'eau.

Concernant la méthode de l'émulsion-diffusion du solvant, cette technique est basée sur l'utilisation d'un solvant partiellement miscible avec l'eau, tel que l'acétate d'éthyle, par exemple. La phase organique contenant le polymère et les nanoparticules magnétiques est ensuite émulsionnée dans une solution aqueuse contenant un agent stabilisant. Cette étape est ensuite suivie d'une dilution avec un excès d'eau, afin d'induire la précipitation du polymère et, par conséquent, la formation des nanosphères. Cette méthode est reproductible et facile à appliquer pour production de nanoparticules à grande échelle (BRIGG et al., 2002).

1.5. Applications des nanoparticules magnétiques stimulables

La première publication décrivant les applications biomédicales des ferrofluides a été publiée dans les années 60, lorsque Meyers et al. (1963) ont décrit l'utilisation d'une méthode expérimentale pour la préparation de particules magnétiques comme agents de

contraste pour les applications *in vivo*. Quatre ans plus tard, une sonde magnétique pour le traitement stéréotaxique d'accident vasculaire cérébral causé par un anévrisme cérébral a été proposé par Alksne et al.(1967). Ainsi, une série de travaux remarquables est cours de l'évolution et révolutionne tous les jours le monde biomédical où ces matériaux sont utilisés aussi *in vitro* que *in vivo*.

Actuellement, les nanoparticules magnétiques sont utilisées dans une grande variété d'applications biomédicales. Parmi les applications biomédicales *in vivo*, il semble opportun de souligner l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la détection du cancer.

Dans le cadre des applications biomédicales *in vivo*, le système idéal magnétique, biocompatible et sensible aux stimuli, est celui qui permet une surveillance non invasive de la cinétique de biodistribution du principe actif dans le corps humain en utilisant l'IRM. Puis on commence le traitement de la maladie, qui peut être fait soit via une hyperthermie soit par la libération localisée et contrôlée de médicaments, en utilisant la propriété de sensibilité du polymère, préservant ainsi les cellules et les tissus sains.

Actuellement, le cancer est une cause majeure de mortalité dans le monde, près de sept millions de personnes tuées chaque année, ce qui correspond à environ 12,5% des décès dans le monde entier (Source: Site de l'OMS). Pour cette raison, différentes stratégies sont proposées pour le traitement de cancer et en général comprennent la chimiothérapie et la radiothérapie. La radiothérapie peut être réalisée de différentes façons: (1) par l'irradiation externe, (2) l'embolisation artérielle (3) la radiothérapie métabolique, (4) l'immuno-radiothérapie et (5) la curiethérapie (CHAKAROV et al., 2005; ALEVIZAKI et al., 2006; RIVERA et al., 2006; ANDRATSCHKE et al., 2007; HACKER et al., 2007). Malheureusement, la radiothérapie externe détruit les tissus sains environnants et provoque de nombreux effets secondaires et des complications (BUONO et al., 2007). Toutefois, des études récentes ont été menées afin de ne traiter que la tumeur en libérant localement la radioactivité. Visant à réduire la mortalité des rats soumis à une radiothérapie conventionnelle et l'intensification des effets sur les tumeurs malignes, l'action localisée de la radiothérapie limitée dans le domaine de la tumeur est très souhaitable (HAMOUDEH et al., 2007). Dans ce contexte, les études progressent vers l'utilisation de nanoparticules magnétiques.

De nouveaux types de traitements anti-cancéreux, qui réduisent considérablement les risques d'effets secondaires sont de plus en plus étudiés dans le domaine biomédical. La

petite taille des nanoparticules associées à d'autres propriétés, peut être très utile en oncologie, et en particulier pour l'IRM. Ces dernières années il y a eu une tendance à développer des systèmes qui vectorisent des médicaments dans les cellules cancéreuses sous une forme active plutôt que passive (accumulation dans la tumeur en raison de sa perméabilité accrue et sa capacité de rétention). Le développement de systèmes multifonctionnels contenant des nanoparticules pour le contraste, l'agent thérapeutique et un ligand (anticorps) capable de reconnaître d'une manière spécifique les cellules cancéreuses, augmente la spécificité du traitement et, par conséquent, réduit les effets secondaires.

Chapitre 2

2. Partie expérimentale

2.1. La synthèse des nanogels à base de poly(NVCL-*co*-AA) en utilisant la polymérisation par précipitation

Toutes les polymérisations ont été effectuées dans un réacteur à double enveloppe avec une capacité de 200 mL sous l'atmosphère de N₂. La quantité de NVCL a été maintenue constante à 3,0792 g pendant toute l'étude. Les montants correspondants à l'AA, le MBA et le SDS ont ensuite été pondérés en fonction de la composition désirée. Puis la NVCL, l'AA ou SDS, et le MBA ont été dissous dans 190 mL d'eau déminéralisée et filtrée sous l'agitation magnétique pendant environ 20 minutes, pour obtenir une solution tout à fait homogène. Dans les réactions tamponnées, 0,2 g de bicarbonate de sodium ont également été dissous dans le mélange pour obtenir un pH de 5,0. Cette solution a été transférée au réacteur de 200 mL sous la vitesse d'agitation de 250 tours/minute, pendant 15 minutes, sous flux d'azote. Après ce temps, le milieu réactionnel a été chauffé à l'aide d'un bain thermostaté à 70 °C. Par ailleurs, des quantités appropriées de KPS ont été dissous dans 10 mL d'eau déminéralisée et filtrée. Après avoir atteint 70 °C, nous avons attendu pendant 5 minutes pour bien homogénéiser le milieu réactionnel à la température désirée, puis on a injecté une solution d'amorceur pour commencer la polymérisation. Le début de la réaction peut être vu par la turbidité du milieu.

Afin d'évaluer l'effet des paramètres de synthèse sur les propriétés des nanogels, les réactions ont été effectuées dans les mêmes conditions réactionnelles, ne variant que le paramètre en question. Toutes les réactions ont été réalisées sous flux d'azote et l'agitation mécanique de 250 tour/min pendant 4 heures. Après ce temps, les nanogels ont été refroidi à la température ambiante, centrifugé à 26.000 tour/min pendant 1 heure, le surnageant a été écarté et le précipité redispersé dans l'eau pour une autre étape de centrifugation. Cette procédure a été répétée trois fois et une partie a ensuite été remis en dispersion dans l'eau déminéralisée et filtrée pour l'analyse du diamètre des particules (diffusion de la lumière) et de TEM. L'autre partie a été séchée à température ambiante pour l'analyse FTIR.

2.1.1. La caractérisation des nanogels à base de poly(NVCL-*co*-AA) obtenus en utilisant la polymérisation par précipitation

2.1.1.1. La détermination des diamètres des particules

Les mesures du diamètre des particules (DP) des nanogels à base de poly(NVCL-*co*-AA) ont été obtenues par la diffusion de la lumière en utilisant un équipement Malvern, modèle Zetasizer 1000, engagé au Laboratoire de Polymères de l'EEL/USP. Ces mesures ont été prises après la redispersion des nanogels dans l'eau déminéralisée et filtrée.

2.1.1.2. La sensibilité à la température

La thermo-sensibilité des nanogels a également été étudiée par les analyses de diffusion de la lumière, avec des mesures de DP en fonction de la température, qui se situaient entre 25 et 70 °C. Les mesures ont été effectuées à des intervalles de 2,5 °C. Entre chaque mesure, nous avons attendu un temps de stabilisation des échantillons à la température désirée équivalent à dix min.

2.1.1.3. La Sensibilité au pH

Tout comme la thermo-sensibilité, la sensibilité au pH a été observée par la diffusion de la lumière à travers l'acquisition des valeurs de DP en fonction de la température et du pH (4,0, 6,5 et 10,0).

2.1.1.4. La détermination qualitative de la composition chimique des copolymères

Les compositions chimiques des nanogels à base de poly(NVCL-*co*-AA) synthétisés avec différentes quantités initiales d'AA ont été obtenues d'une manière qualitative, en analysant les spectres infrarouge (FTIR). Les matériaux ont été analysés dans l'état solide et exempt d'humidité. Les analyses FTIR ont été réalisées, à l'aide de pastilles de KBr sur un appareil Perkin Elmer modèle Spectrum GX, situé au Laboratoire de FTIR du Département de Biotechnologie (LOT) de l'EEL/USP.

2.1.1.5. La morphologie

La morphologie des nanogels à base de poly(NVCL-*co*-AA) a été caractérisé en utilisant la microscopie électronique en transmission (TEM). Ces tests ont été effectués dans un appareil Philips, modèle Tecnai 10 fonctionnant à 80kV, situé au centre de microscopie de l'Hospital das Clinicas (HC), Faculdade de Medicina, USP, São Paulo.

2.2. La synthèse des nanogels à base de PNVCL par la polymérisation en miniémulsion inverse

2.2.1. Coefficient de partage de la PNVCL entre l'eau et le *n*-hexadécane

Les coefficients de partage ont été déterminés expérimentalement en utilisant la chromatographie gazeuse. Premièrement, l'eau (1 g) et le *n*-hexadécane (8 g) ont été mélangés. Différentes quantités de NVCL ont été pesées et ajoutées à ces mélanges sous l'agitation et sous température contrôlée (25 ou 70 °C) pendant une heure. Après cette période d'incubation, les émulsions ont été placées dans une ampoule à décanter, jusqu'à une séparation claire des deux phases. La phase aqueuse a été ensuite retirée et la concentration du monomère dans cette phase a été déterminée par la chromatographie en phase gazeuse. La concentration du monomère dans le *n*-hexadécane a été déterminée par différence. Ainsi, le coefficient de partage de la NVCL, K_{NVCL} , a été défini comme le rapport entre la concentration de NVCL dans la phase aqueuse ($[M_{NVCL}]_a$) et la concentration de NVCL dans la phase organique ($[M_{NVCL}]_o$), selon l'équation 2.3.

2.2.2. La synthèse des nanogels thermo-sensibles

Les polymérisations de la NVCL en utilisant la technique de miniémulsion inverse ont été réalisées à 70 °C, dans un réacteur à double enveloppe avec une capacité de 50 mL. Tout d'abord, des quantités appropriées de NVCL (100 mg), MBA (8 mg) et d'amorceur, KPS (10 mg) ont été dissous dans une solution de NaCl (50 mg) dans de l'eau dionisée et filtrée (3 ou 8 g). NaCl a été ajouté afin de maintenir la stabilité des gouttelettes de monomère après l'agitation. Cette solution de monomère a été ensuite ajoutée à une solution de Span 80 dans le *n*-hexadécane, faisant varier la quantité de tensioactif entre 3 et 8% en poids, par rapport à la phase continue. Le mélange a été maintenu sous agitation (500 rpm) pendant une heure. Après cette période, la mini-émulsion a été préparée en utilisant une sonde Bioblock scientifique, modèle 75042, avec 500 watts de puissance et amplitude de 90% pendant cinq minutes. Le milieu réactionnel a été ensuite chauffé à 70 °C pour commencer la polymérisation. Pour assurer la conversion totale du monomère, la réaction a été conduite pendant trois heures.

2.2.3. La purification des nanogels de PNVCL

A la fin des polymérisations en miniémulsion inverse, les nanogels thermosensibles ont été lavés avec 50 mL de chloroforme, puis le solvant a été évaporé dans l'évaporateur rotatif de marque Fisatom, modèle 802. Cette procédure a été répétée trois fois, visant à l'élimination complète de la phase continue.

2.2.4. La caractérisation des nanogels de PNVCL obtenus par la polymérisation en miniémulsion inverse

2.2.4.1. L'étude de la cinétique de la polymérisation en miniémulsion inverse

La conversion de la NVCL au cours des polymérisations en miniémulsion a été obtenue par la chromatographie en phase gazeuse en utilisant un chromatographe Agilent, modèle 4890D (avec le détecteur FID et la colonne ID RTX-624, 30 m X 0,32 mm). Lors de la polymérisation, des échantillons du milieu réactionnel ont été retirés, immédiatement placés dans un bain de glace et soumis à l'analyse. Isopropanol a été utilisé comme étalon externe pour la construction de la courbe d'étalonnage.

2.2.4.2. La détermination de la taille des particules et du potentiel zêta

Dans ce type de caractérisation, un équipement Malvern Zetasizer modèle 1000, situé au Laboratoire de polymères de l'EEL/USP et un Malvern Zetasizer modèle V510, situé au Laboratoire d'Automatique et Génie des Procédés (LAGEP) de l'Université Claude Bernard, Lyon 1 (Lyon - France) ont été utilisés. Pour suivre l'évolution de la taille des particules avec la conversion de polymérisation, les échantillons ont été prélevés du milieu réactionnel, dilués dans le solvant (*n*-hexadécane) et soumis à l'analyse. Pour les mesures de la taille finale des particules (DP) et la distribution de la taille des particules (DTP), les analyses ont été effectuées après l'extraction de la phase organique et la redispersion des particules dans l'eau dionisée et filtrée. Les tailles des particules ont également été obtenues en fonction de la température, entre 25 et 60 °C, avec un pas de 2,5 °C et un temps de stabilité de la température de six minutes.

Les mesures du potentiel zêta ont été réalisées dans un équipement Malvern Zeta Sizer V510, situé au LAGEP, Université Claude Bernard Lyon 1. Pour ces analyses, les échantillons ont été séchés et redispersés dans une solution aqueuse de NaCl (3 mM).

2.2.4.3. L’Infrarouge (FTIR)

Pour la caractérisation par infrarouge (FTIR), un équipement Perkin Elmer modèle Spectrum GX, situé au Laboratoire de Biotechnologie de l'EEL/USP a été utilisé. Pour ces analyses, les échantillons ont été séchés et déposés sur les pastilles de KBr et les analyses ont été effectuées en mode de transmission, dans une bande de fréquence comprise entre 400 et 4000 cm^{-1} .

2.2.4.4. La morphologie des nanoparticules

Pour la caractérisation des nanoparticules par la microscopie électronique en transmission (MET), nous avons utilisé deux appareils différents: un Philips modèle CM120 avec une tension de 80kV, situé au Centre de la Technologie de la Microstructure (CTμ) de l'Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, et un autre Philips modèle Tecnai 10, fonctionnant à 80kV, situé au Centre de la Microscopie de l'Hospital das Clinicas (HC) de la Faculdade de Medicina de l'USP, São Paulo. Pour ces analyses, les échantillons séchés ont été dilués et redispersés dans l'eau dionisée et filtrée. Pour une meilleure visualisation des particules, une solution aqueuse d'acide phosphotungstique (1 g/L) a été utilisé comme un agent de contraste.

2.2.4.5. La diffraction des rayons X

Le diffractomètre à rayons X utilisé est un Shimadzu modèle XRD-6000, situé au laboratoire de diffraction des rayons X de l'EEL/USP, avec une radiation $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) filtré par Ni, fonctionnant à 40 kV et 30 mA avec une vitesse de balayage égale à 1° (2 θ /min). Ces études de diffraction des rayons X (DRX) ont été réalisées pour les échantillons secs des nanogels de PNVCL, et nous avons pu obtenir des mesures de l'intensité en fonction de l'angle de diffraction, qui a varié entre 5 et 80° .

2.2.5. L’encapsulation des nanoparticules magnétiques

Pour l'encapsulation des nanoparticules magnétiques, nous avons utilisé un ferrofluide précédemment synthétisé dans le laboratoire LAGEP de l'Université Claude Bernard-Lyon 1, Lyon, France (MOUAZIZ et al., 2009). Ce ferrofluide est constitué de particules d'oxyde de fer complexé avec le dextran polymère. Les polymérisations en

miniémulsion inverse de la NVCL ont ensuite été effectuées en présence de différentes concentrations du ferrofluide.

Dans cette phase de la recherche nous avons fait varier certains paramètres de synthèse, tels que le solvant utilisé comme la phase continue, les concentrations de Span 80 et MBA, ainsi que le type et la concentration d'amorceur, afin d'étudier l'influence de ces paramètres sur la taille finale des particules et la distribution de la taille des particules magnétiques.

Les nanoparticules polymères et magnétiques ont ensuite été caractérisées par les mêmes méthodes utilisées dans le cas des nanogels de PNVCL. Cette étude est complétée par les mesures de l'aimantation et les analyses thermo-gravimétriques.

2.2.6. La caractérisation des nanogels magnétiques sensibles à la température

2.2.6.1. La diffusion de la lumière

Pour ces analyses, nous avons utilisé un Malvern Zeta Sizer modèle V510, situé au Laboratoire d'Automatique et Génie des Procédés (LAGEP), de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (Lyon - France) et un autre équipement LM20 NanoSight modèle, situé dans le laboratoire de nanoparticules d'Institut de Chimie de l'Université Fédérale de Rio Grande do Sul (UFRGS) à Porto Alegre (RS).

2.2.6.2. Les mesures d'aimantation

Les mesures d'aimantation ont été effectuées à 300K, pour les échantillons des particules polymères et magnétiques secs, en utilisant un magnétomètre à échantillon vibrant (VSM) Lake Shore modèle 7404, situé au Département de Physique et Chimie de l'Université de Itajubá, en faisant varier le champ magnétique entre 11,8 et 21,7 kOe.

2.2.6.3. Les analyses thermo-gravimétriques (TGA)

Pour les analyses thermo-gravimétriques (TGA) nous avons utilisé un équipement TG/DTA marque SII nanotechnologie, modèle EXSTAR 6200 avec un régulateur automatique de gaz, situé dans le laboratoire des analyses thermiques du Département des Matériaux et de la Technologie de la Faculté de Génie de Guaratinguetá, FEG/UNESP.

La détermination de la quantité de nanoparticules d'oxyde de fer incorporées dans les nanogels thermosensibles de PNVCL a été réalisée par ces analyses thermogravimétriques. Les échantillons secs des particules polymères et magnétiques ont été soumis à l'analyse, qui a été effectuée avec des températures comprises entre 25 et 600 °C et un taux de chauffage de 5 °C/min sous l'atmosphère de N₂. Premièrement, le contenu des nanoparticules magnétiques a été défini comme le pourcentage de matière restant après le procédé de calcination. Les pourcentages de nanoparticules d'oxyde de fer incorporées aux nanogels ont été ensuite estimés en utilisant l'équation 2.4. Dans cette équation, COFF est le pourcentage d'oxyde de fer restant après la calcination et le COFI est le pourcentage d'oxyde de fer ajouté au système au début de la polymérisation.

Chapitre 3

3. La synthèse des nanogels sensibles à la température et le pH en utilisant la polymérisation par précipitation

3.1. Introduction

Ce chapitre décrit la préparation des nanoparticules de poly(*N*-vinylcaprolactama-*co*-acide acrylique), poly(NVCL-*co*-AA), sensibles aussi à la température que le pH, en utilisant la polymérisation par précipitation. L'effet de paramètres tels que la concentration d'acide acrylique (AA), l'amorceur (KPS) et l'agent de réticulation (MBA) sur les diamètres des particules (DP) et la sensibilité à la température des nanogels a été étudié. Nous avons évalué également l'ajout d'un tensioactif ionique (SDS). En plus, l'étude de la sensibilité au pH des nanogels synthétisés avec des différentes concentrations en AA est aussi présentée dans ce chapitre.

3.2. La synthèse des nanogels à base de poly(-NVCL-*co*-AA) en utilisant la polymérisation par précipitation

Les nanogels constitués de poly(NVCL-*co*-AA) ont été synthétisés en utilisant la polymérisation par précipitation sans tensioactif et l'influence de certains paramètres de réaction sur la sensibilité à la température a été examinée. En outre, nous avons étudié la sensibilité au pH des nanogels en fonction de la concentration en AA. La polymérisation a également été réalisée en remplaçant l'acide acrylique par un agent tensioactif anionique (dodécylsulfate de sodium ou SDS) en vue d'obtenir une étude comparative de l'influence des segments d'AA sur la stabilisation des nanogels.

Pour évaluer l'effet d'AA sur la stabilité colloïdale des nanoparticules en fonction du pH, quelques polymérisations ont été réalisées en présence d'une solution tampon, afin d'ajuster la valeur du pH en 5,0.

Le tableau 3.1 présente les formulations utilisées dans la synthèse des nanogels à base de poly(NVCL-*co*-AA) en utilisant la polymérisation par précipitation.

En ce qui concerne l'effet du pH, en comparant les réactions P2 et P8, il est possible d'observer une augmentation de la stabilité colloïdale du nanogel obtenu dans la réaction P8. Pour expliquer ce résultat, il est nécessaire de prendre en considération que

dans le pH 5,0, c'est à dire, au-dessus du pK_a d'AA (4,17), les unités d'AA sont sous la forme ionisée, ce qui favorise les interactions entre les groupes carboxyles présents dans les nanoparticules et les molécules d'eau depuis le début de la polymérisation,. En conséquence, on peut voir une augmentation de la stabilité du système en fonction du temps (Tableau 3.2).

Pour vérifier l'effet de l'ajout d'un tampon sur la sensibilité à la température des nanogels, les mesures des diamètres de particules des produits des réactions P2 et P8 ont également été obtenues en fonction de la température. La figure 3.1 montre les valeurs de DP en fonction de la température pour les nanogels à base de poly(NVCL-*co*-AA) obtenus dans ces réactions.

A partir de la Figure 3.1, on peut observer que le nanogel obtenu dans la réaction P8 a présenté une valeur plus élevée de diamètre de particules. Ce fait peut être attribué à la répulsion électrostatique résultant de l'ionisation des groupes carboxyles d'AA, quand le pH est plus élevé que le pK_a de ce monomère. Cependant, le nanogel obtenu dans la réaction P8 a présenté une stabilité plus élevée en fonction du temps. En plus, comme on le voit, la thermo-sensibilité n'a pas été touchée par la solution tampon.

3.3. L'influence de la concentration en acide acrylique

Dans cette étape, on a fait varier la concentration en AA en 3, 6,5 et 10% en poids, par rapport à NVCL. Les concentrations en MBA et KPS ont été maintenue constante et égale à 8% et 1% en poids, par rapport à NVCL, respectivement. La Figure 3.2 montre les courbes des diamètres des particules en fonction de la température pour les nanogels synthétisés avec différentes concentrations en AA. A partir de cette figure, nous pouvons observer la réduction du diamètre des nanogels à mesure que la température augmente, ainsi que déterminer la LCST pour chaque copolymère.

La Figure 3.2 montre que l'augmentation de la concentration en AA a conduit à une diminution du diamètre des nanogels. Ce résultat peut être expliqué par la contribution d'acide acrylique dans l'étape de formation des particules. C'est important rappeler que ces réactions ont été réalisées sans l'utilisation de tensioactifs classiques, afin d'étudier l'effet de stabilisation d'acide acrylique. Une fois que le principe de base de la formation des particules en utilisant la polymérisation par précipitation est la précipitation des oligomères dans la phase aqueuse, plus élevée est la concentration en AA, plus est la quantité de

molécules qui stabilisent les oligomères formés sous la forme de particules. En d'autres termes, l'augmentation de la quantité de groupes carboxyles dans les chaînes des polymères conduit à une augmentation de l'efficacité de stabilisation colloïdale des oligomères de PNVCL. Des résultats similaires ont été rapportés précédemment (KRATZ et al., 2000), avec copolymérisation d'acide acrylique avec la *N*-isopropylacrylamide.

Toutes les réactions ont été effectuées à 70 °C, c'est à dire, au-dessus de la LCST de la PNVCL. Par conséquent, la plupart des segments hydrophobes de PNVCL sont probablement à l'intérieur des particules, tandis que les unités hydrophiles d'AA sont situés préférentiellement à la surface des particules, c'est à dire, à l'interface entre les nanoparticules et l'eau, favorisant ainsi la stabilisation des nanogels (LEE et al., 2008).

Les valeurs de LCST ont été établies comme la température correspondant au point d'inflexion dans la courbe de diamètre des particules en fonction de la température (Figure 3.2). On observe que l'augmentation de la concentration en AA a conduit à une augmentation de la LCST. Cela peut être attribué à la présence des segments hydrophiles d'AA, qui favorisent les interactions physiques (liaisons de hydrogène) entre les macro-chaînes et l'eau, augmentant ainsi la température requise pour que les interactions physiques type polymère-polymère devient dominantes et pour produire la séparation de phase. Il est bien connu que la masse moléculaire influe la LCST de la PNVCL, comme on peut vérifier avec l'étude de la homopolymérisation de la NVCL dans des solvants différents et avec différents concentrations en agent de transfert de chaîne, décrit dans l'appendice A. En plus, le phénomène de la LCST est aussi dépendent de la quantité de comonomère ajouté dans les copolymérisations. Les comonomères hydrophiles, comme l'AA, augmentent la LCST, qui peut venir à disparaître, si la quantité du comonomère est très élevée (KRATZ et al., 2000). Les valeurs de LCST obtenues dans cette étude ont été égaux à 37,5, 42,5 et 50 °C, pour les nanogels synthétisés avec 3, 6,5 et 10% en poids d'AA, respectivement.

Pour la réaction réalisée avec 1,8 % en poids d'AA, par rapport à NVCL (P13), nous avons observé la formation d'agglomérats lors de la polymérisation, ce qui indique une instabilité du système. En outre, avec 10% en poids d'AA, par rapport à NVCL (P12), on n'a pas observé la turbidité du système, qui a été probablement causée par l'augmentation significative du caractère hydrophile du copolymère en solution aqueuse.

Afin d'étudier, qualitativement, l'incorporation d'AA dans les nanogels à base de poly(NVCL-*co*-AA), des analyses de spectrométrie FTIR ont été effectuées pour les

réactions avec différentes concentrations en AA (P1, P2 et P3). Dans les spectres FTIR les bandes d'absorption caractéristiques des deux monomères ont été analysées. La Figure 3.3 montre les spectres FTIR des nanogels synthétisés avec différentes concentrations en AA.

D'après la Figure 3.3, on peut identifier les bandes d'absorption caractéristiques de la liaison C=O d'AA à 1718 cm^{-1} et de la déformation axiale de la liaison C-O-H à 1190 cm^{-1} . En plus, nous pouvons attribuer la présence des bandes à 1540 cm^{-1} à la vibration des groupes COO^- (WU et al., 2008). Ces bandes, peuvent confirmer la présence d'AA dans les nanogels et montrent l'augmentation de l'incorporation de ce monomère dans les copolymères, car elles augmentent en fonction de la quantité d'AA ajouté dans la synthèse. Nous voyons également, à 1660 cm^{-1} , la bande caractéristique de la liaison C=O de la NVCL.

Comme on a déjà mentionné, les copolymérisations réalisées ont eu l'objectif d'étudier l'effet de la concentration en AA sur la stabilité des nanogels à base de poly(NVCL-co-AA). Il a été observé à travers les valeurs des diamètres des particules et la polydispersité, que les nanogels ont présenté une grande stabilité colloïdale, ce qui conduit à l'hypothèse de que la stabilisation par les unités d'AA a été efficace. Cependant, pour confirmer cette hypothèse, la réaction P11 a été effectuée sans l'AA, mais en utilisant le dodécyle sulfate de sodium (SDS) (2,5% en poids, par rapport à NVCL) comme le tensioactif, qui est couramment utilisé dans les travaux décrits dans la littérature. Les concentrations en KPS et MBA ont été encore maintenues constants à 8 et 1%, respectivement. Le tableau 3.2 présente l'évolution des valeurs de DP et de la polydispersité en fonction du temps de stockage des produits des réactions P2, P8 et P11,.

En comparant l'effet d'AA et du SDS dans les réactions P8 et P11, respectivement, nous observons, dans un premier moment, une réduction du diamètre des particules quand SDS a été utilisé comme un tensioactif. Le dodécyle sulfate de sodium est un tensioactif consistant d'une molécule amphiphile, qui présente une région polaire et d'autre non polaire et qui s'associe spontanément dans une solution aqueuse, à concentrations plus élevées que sa concentration micellaire critique (CMC), et, par conséquent, des micelles sont formées. La valeur de CMC du SDS dans une solution aqueuse est égale à 0,24 % en poids. Ainsi, il a une haute efficacité de formation des micelles et, par conséquent, de stabilisation des émulsions. Pour ce motif, le SDS est fréquemment utilisé dans les polymérisations en miniémulsion, en raison de son efficacité de

stabilisation des particules de petites tailles, ce qui peut expliquer l'obtention, dans cette étude, des particules plus petites en utilisant le SDS comme tensioactif.

Cependant, si nous observons les polydispersités des produits des réactions P8 et P11, nous pouvons vérifier que les valeurs sont similaires. En plus, tous les diamètres et les polydispersités presque n'ont pas varié en fonction du temps de stockage. Ainsi, nous pouvons affirmer que des dispersions stables ont été obtenues en utilisant aussi le SDS que l'AA pour stabiliser les nanoparticules. Ces résultats montrent l'efficacité d'AA dans l'stabilisation colloïdale des nanogels, quand les réactions sont réalisées en pH supérieur au pK_a d'AA. Cependant, en l'absence de la solution tampon, les polydispersités ont augmenté de manière significative en fonction du temps de stockage.

3.4. L'influence de la concentration en agent de réticulation

Dans cette étape, nous avons fait varier la concentration en réticulant (MBA) à 4, 8 et 12% en poids, par rapport à NVCL, afin d'évaluer son influence sur les propriétés des nanogels à base de poly(NVCL-*co*-AA). La Figure 3.4 montre l'effet de la concentration en réticulant sur les diamètres des nanogels.

Il est possible de constater que, en général, l'augmentation de la concentration en MBA conduit à une augmentation significative de la taille moyenne des particules et la différence plus marquée a été observée en utilisant 12% de MBA. Ce résultat peut être attribué à la réactivité plus élevée du MBA, par rapport à NVCL et l'AA, lequel est consommé de préférence lors de l'initiation de la polymérisation. Ce fait, conjugué à la solubilité accrue du MBA dans l'eau, par rapport à NVCL et l'AA, conduit à l'augmentation de la taille critique des chaînes pour avoir la précipitation des oligomères formés dans la phase aqueuse. La Figure 3.4 montre également qu'au-dessus de la LCST, la différence entre les diamètres des particules est moins marquée. Ce résultat peut être associé à l'augmentation du volume des particules, au cours de la synthèse des nanogels, avec l'augmentation de la concentration en MBA, ce qui permet de retenir une quantité plus grande des molécules d'eau à l'intérieur des nanoparticules. D'autres études concernant l'effet du MBA dans les systèmes constitués de PNVCL ou PNIPAm, décrivent l'obtention de résultats similaires (IMAZ ; FORCADA, 2009; DURACHER et al., 1999). Ces auteurs ont également expliqué l'augmentation des diamètres des particules en termes de la différence de réactivité entre le MBA et les autres monomères. En ce qui

concerne la réaction P5, la variation de DP peut être liée aussi à l'augmentation de la taille critique des chaînes dans le processus de précipitation et de formation des particules, que la faible stabilité colloïdale de ces particules. En d'autres termes, l' haut degré de réticulation peut aboutir à l'augmentation des groupes carboxyles d'AA dans l'intérieur des particules, ce qui diminue la concentration de ces groupes ionisables à la surface des particules.

En ce qui concerne la LCST, nous pouvons observer que ce phénomène a été moins marqué pour le produit de la réaction réalisée avec 2 % en poids de KPS, par rapport à NVCL.

3.5. L'influence de la concentration en amorceur

La Figure 3.5 montre les diamètres des particules en fonction de la température pour les nanogels synthétisés avec différentes concentrations en amorceur (KPS) (0,5, 1 ou 2% en poids, par rapport à NVCL). A partir de cette figure, nous pouvons voir, dans un premier moment, que l'augmentation de la concentration en amorceur de 0,5 pour 1 %, a abouti à la diminution des diamètres des nanogels. Évidemment, l'augmentation de la concentration en amorceur conduit à une concentration accrue des radicaux libres, ce qui réduit les diamètres des particules, en raison de l'augmentation du nombre des particules formées au début de la polymérisation. Cependant, quand la concentration en amorceur a été augmentée à 2 % en poids, par rapport à NVCL, l'effet opposé a été observé. Au début de la polymérisation, la croissance des particules est principalement due à la réaction des radicaux avec les molécules de MBA en raison de sa réactivité plus élevée, par rapport à NVCL et l'AA. Si la concentration des radicaux croissants est très élevée, la probabilité de ces radicaux à réagir avec les molécules d'agent de réticulation est plus grande et, par conséquent, des diamètres des particules plus grands sont obtenus. Un comportement similaire a été vérifié par Imaz et Forcada (2009), qui ont constaté une diminution significative du temps de la consommation de MBA avec l'augmentation de la concentration en amorceur. Cependant, Macková et Horak (2006) expliquent ce résultat inattendu en termes de la concentration instantanée des oligomères croissantes. Selon ces auteurs, l'augmentation de la concentration en amorceur conduit à une augmentation de la vitesse de précipitation des oligomères et de la vitesse de coagulation des noyaux instables qui vont survenir des particules plus grosses. Cependant, pour confirmer ces hypothèses,

d'autres expériences et d'autres analyses sont requises, en vue d'obtenir une étude plus approfondie de la cinétique de tels systèmes.

3.6. L'effet du pH

Le gonflement du nanogel à base de poly(NVCL-*co*-AA) en réponse à la variation du pH a été étudiée, en utilisant le produit de la réaction P2, c'est à dire, le copolymère synthétisé avec 6,5% d'AA, 8 % de MBA% et 1 % de KPS en poids, par rapport à NVCL. La Figure 3.6 présente les diamètres des particules obtenus en fonction de la température et le pH.

Les résultats montrent le gonflement du nanogel à mesure que le pH augmente. A pH 6,5 et pH 10,0, la présence de forces électrostatiques de répulsion dans les unités d'AA, provoque l'expansion des chaînes des polymères et, par conséquent, le gonflement des nanogels. L'effet inverse se produit au-dessous du pK_a d'AA, c'est à dire, à pH 4,0, la forme non ionisée des groupes carboxyles favorisent les interactions entre les macro-chaînes, conduisant à la contraction des particules (ZHANG et al., 2007).

3.7. La morphologie des nanoparticules

La morphologie du nanogel synthétisé avec 6,5% d'AA, 8% de MBA et 1% de KPS en poids, par rapport à NVCL (réaction P2) a été obtenue par la microscopie électronique à transmission (Figure 3.7). Cette figure présente la morphologie sphérique des nanoparticules avec un diamètre moyen d'environ 200 nm, lequel est inférieure à celui obtenu par la diffusion de la lumière, présent dans le Tableau 3.2 (281,6 nm). Cette différence peut être attribuée au procédé de séchage pendant la préparation d'échantillons pour l'analyse de TEM. En ce qui concerne la polydispersité, les images montrent la présence des particules avec des diamètres différents, ce qui confirme la valeur de polydispersité de 0,208, obtenue par la diffusion de la lumière. Cependant, nous ne voyons pas la présence d'agrégats de nanoparticules, ce qui confirme la contribution d'AA sur la stabilité des particules pendant la synthèse du nanogel. Il est encore possible de voir que les particules ne présentent pas les surfaces bien définies, ce qui peut s'expliquer par la présence des segments d'AA sur la surface, tandis que le noyau est plus riche en PNVCL.

Chapitre 4

4. La synthèse des nanogels magnétiques de PNVCL via la polymérisation en miniémulsion inverse

4.1. Introduction

Ce chapitre décrit la synthèse des nanogels à base de PNVCL et de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer en utilisant la miniémulsion inverse comme procédé de polymérisation. L'effet de la concentration en Span 80 sur la cinétique de polymérisation, la stabilisation et la sensibilité à la température des nanogels élaborés a été étudié. Des analyses thermo-gravimétriques (TGA), la diffraction des rayons X et les mesures d'aimantations ont confirmé l'incorporation des particules d'oxyde de fer dans la matrice des nanogels. La morphologie des nanoparticules a été étudiée par la microscopie électronique en transmission (TEM).

4.2. L'influence de la concentration de tensioactif

Pour étudier l'effet du Span 80 sur les propriétés colloïdales des nanogels à base de PNVCL, une série de polymérisations a été réalisée en faisant varier la concentration de tensioactif. Les diamètres hydrodynamiques (DH) des nanogels thermo-sensibles en fonction de la concentration de Span 80 sont présentés dans le Tableau 4.1. Dans ce tableau, on remarque une légère diminution des diamètres hydrodynamiques des nanogels avec l'augmentation de la concentration de Span 80. Toutefois, lorsque la concentration en Span 80 dépassait 6% en poids, le résultat inverse a été observé. Ce comportement a été observé non seulement pour les nanogels synthétisés avec 3 g d'eau mais aussi pour ceux synthétisés avec 8 gau. Avec l'augmentation de la concentration de tensioactif, l'amorçage ne se produit pas simultanément dans toutes les gouttes de monomère et, par conséquent, les radicaux sont formés uniquement dans quelques gouttelettes de monomère. La présence des macro-radicaux, à son tour, tend à augmenter la taille des gouttelettes, ce qui conduit au mûrissement d'Ostwald ce qui favorise l'obtention de particules avec des diamètres plus importants. Il est à noter que la probabilité de formation de micelles est élevée quand la concentration de tensioactif est très importante. La solubilité du NVCL dans le *n*-hexadécane favorise sa diffusion des gouttelettes de monomère vers les micelles afin de maintenir l'équilibre.

Comme discuté plus haut, le tensioactif n'a pas d'effet notable sur la taille moyenne et des résultats similaires ont été obtenus par Hashimoto et al. (2008). Ces auteurs ont étudié l'effet de l'addition de Span 80 dans la phase continue et d'autres co-tensioactifs dans la phase dispersée. L'addition de tensioactif modifie l'affinité entre les surfaces solides et la phase liquide, par des changements de tension interfaciale. Ainsi, ils ont noté que l'influence de la concentration de Span 80 sur l'angle de contact est significative lorsque la quantité d'un co-tensioactif de fort HLB (Tween 20) est suffisamment importante. Ils ont ensuite suggéré que les gouttelettes aqueuses ont probablement une plus grande affinité avec la surface hydrophobe, quand les deux phases contenaient des hautes concentrations de tensioactifs.

Nous pouvons également observer à travers le Tableau 4.1, l'ensemble des résultats relatifs à l'effet de la quantité de phase aqueuse sur la polymérisation et l'obtention des nanogels. Les polymérisations effectuées avec 3 g d'eau donnent des nanogels stables et de taille moyenne faible.

En ce qui concerne la synthèse des nanogels de PNVCL pour des applications biomédicales *in vivo*, l'élimination complète du solvant organique est extrêmement importante et les nanogels doivent présenter les mêmes propriétés après l'élimination du solvant et redispersion dans l'eau. Ainsi, nous avons conduit une étude d'inversion de phase. Pour ce faire, le *n*-hexadécane a été éliminé en utilisant trois lavages avec du chloroforme suivies de séchage sous vide et redispersion. La Figure 4.4 montre l'effet de la concentration du Span 80 sur le diamètre hydrodynamique moyen des nanogels obtenus dans les réactions MN1-MN4, après avoir enlevé le *n*-hexadécane et redispersé dans l'eau. Cette figure montre que la variation de diamètre hydrodynamique en fonction de la concentration de tensioactif, après la redispersion dans l'eau, suit le même comportement par rapport à les analyses effectuées dans les solutions diluées de *n*-hexadécane. Lorsque la méthode d'inversion de phase a été appliquée, les valeurs de diamètre hydrodynamique ont été généralement inférieures aux valeurs obtenues dans le *n*-hexadécane. Cette différence peut être attribuée à la déshydratation des particules pendant le processus de séchage et que le gonflement dans l'eau n'est pas forcément le même dans le solvant organique utilisé.

4.3. L'étude cinétique

Pour l'étude cinétique, le diamètre des nanogels ont été mesurées immédiatement après le procédé d'homogénéisation et en fonction du temps pour des synthèses réalisées avec des différentes concentrations de Span 80. Les résultats obtenus pour des polymérisations effectuées avec 8 g d'eau sont présentés dans la Figure 4.6 et montrent que la variation du diamètre hydrodynamique est négligeable au cours de la polymérisation, et ceci lorsque la concentration de Span 80 utilisée est inférieure à 8% en poids, par rapport à NVCL. Toutefois, une légère augmentation a été observée en utilisant 8% en poids de Span 80.

La Figure 4.7 montre l'augmentation de DH avec le temps de polymérisation pour les nanogels synthétisés avec 3g d'eau. Comme déjà mentionné plus haut, lors de la polymérisation en miniémulsion, il est important de maximiser le nombre des particules formées par le mécanisme de nucléation des gouttelettes de monomère. Toutefois, certaines micelles peuvent également être présentes en raison de la quantité importante de tensioactif utilisé et du processus d'homogénéisation. Par conséquent, certaines particules peuvent être aussi formées par la nucléation micellaire. Ainsi, pour augmenter la quantité des particules formées par la nucléation des gouttelettes de monomères, on doit adapter les conditions d'homogénéisation, d'une façon que le tensioactif est complètement adsorbé à la surface de ces gouttelettes.

Pour étudier la cinétique de polymérisation du NVCL en miniémulsion inverse, des mesures de la conversion ont également été obtenues en fonction du temps, en utilisant la chromatographie en phase gazeuse, pour les synthèses réalisées avec 3 g d'eau. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.8 et montrent que dans toutes les synthèses, la conversion est complète après 150 minutes de polymérisation et que l'augmentation de la concentration de tensioactif a conduit à une diminution de la vitesse de polymérisation. Ce résultat peut être attribué à la diminution de la concentration de monomère et des radicaux par particule lorsque les concentrations plus élevées de Span 80 sont utilisées. Pour expliquer ce résultat, l'équation de vitesse de polymérisation en milieu dispersé (équation 4.1) (GILBERT, 1995) a été clairement analysée. Dans cette équation k_p est la constante de vitesse de propagation, $[M]_p$ est la fraction en volume de monomère au sein de la particule, $\bar{n}$ est le nombre moyen des radicaux par particule et NA est le nombre d'Avogadro. Comme toutes les réactions ont été réalisées à la même température, la valeur de k_p doit rester

constante. En outre, le nombre de particules, N_p décroît avec la concentration de Span 80. Par conséquent, la diminution de la vitesse de polymérisation avec l'augmentation de la concentration en tensioactif ne peut s'expliquer que par $\bar{n}$ ou $[M]_p$. Il est connu que le nombre moyen des radicaux par particule dépend du nombre de particules. Ainsi, si la concentration de particules augmente proportionnellement avec l'augmentation de Span 80 et comme les autres paramètres de réaction ont été maintenus constants, le nombre de radicaux par particule diminue et, par conséquent, la réaction est de plus en plus lente. Des facteurs tels que le transfert de chaîne par le tensioactif, la difficulté d'entrée des radicaux en raison de la présence de tensioactif à la surface des particules et l'effet cage sont d'autres facteurs qui pourraient expliquer cette diminution de R_p .

4.4. Le potentiel zêta des nanogels

Le potentiel zêta des nanogels de PNVCL synthétisés en utilisant différentes concentrations de Span 80 a été mesuré en fonction du pH après la redispersion des nanoparticules dans une solution aqueuse (3 mM NaCl). La Figure 4.9 montre que le potentiel zêta des nanogels varie légèrement en fonction du pH et de la concentration en Span 80 (utilisé dans la formulation). En général, des valeurs négatives ont été obtenues et attribuées à la présence des groupes persulfate originaires d'amorceur (KPS). Il est à noter également que le Span 80 est composé d'un mélange d'acides gras (oléique, linoléique, linolénique, palmitique, etc). Ainsi, la présence des groupes carboxyles à la surface des nanogels peut également expliquer les valeurs négatives du potentiel zêta et la légère augmentation de la charge négative en fonction de la concentration croissante du Span 80 et du pH.

4.5. L'évaluation de la thermo-sensibilité des nanogels à base de PNVCL

La sensibilité à la température des nanogels obtenus dans les réactions MN1, MN2 et MN3, a été étudiée par mesure de diamètre hydrodynamiques en fonction de la température. Toutes les mesures ont été réalisées en solution aqueuse, après l'élimination du *n*-hexadécane et redispersion dans l'eau. La Figure 4.10 confirme bien le caractère thermosensible des nanogels synthétisés dans cette étude. En effet, le diamètre hydrodynamique réduit avec l'augmentation de la température comme attendue. Nous

avons observé que la LCST obtenue est de 42,5, 40,0 et 37,5 °C, pour les nanogels synthétisés avec 3, 4 et 6% en poids de Span 80, respectivement. Ceci montre que l'augmentation de la concentration en tensioactif dans la formulation induit une diminution de la LCST des nanogels.

4.6. Les caractéristiques morphologiques

La Figure 4.11 montre la forme sphérique des particules du nanogel obtenu dans la réaction MN1 et également une taille comprise entre 150 et 200 nm, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par la diffusion dynamique de la lumière. La présence des particules plus grandes et légèrement déformées peut être attribuée à des imperfections dans le processus de sonication et à l'ajout de NaCl comme un stabilisateur osmotique (LANDFESTER et al., 1999) ou également à une possible affaïssement des nanogels lors de l'analyse.

4.7. L'incorporation de nanoparticules d'oxyde de fer complexées avec le dextran

Dans cette étude, nous avons utilisé un ferrofluide constitué de nanoparticules d'oxyde de fer complexé avec le dextran, élaboré par le Laboratoire d'Automatique et Génie des Procédés, LAGEP (Université Claude Bernard - Lyon 1) et qui a été préparé selon la méthodologie décrite par Mouaziz et al. (2009).

Tout d'abord, une série de paramètres comme la concentration d'agent de réticulation, le type de solvant, la quantité de ferrofluide, la concentration de Span 80 et, enfin, la nature d'amorceur, a été examinée. Une attention particulière est dédiée à l'effet de ces paramètres sur le diamètre hydrodynamique des nanogels magnétiques finaux. Le tableau 4.2 présente les conditions de synthèse et les diamètres hydrodynamiques obtenus à 25 °C. D'après ce tableau, certaines observations importantes peuvent être faites:

- La concentration en MBA (l'agent de réticulation) n'a pratiquement pas d'influence sur le diamètre hydrodynamique des nanogels;
- En ce qui concerne la variation de la concentration en tensioactif, nous avons observé un comportement similaire à la synthèse des nanogels de PNVCL, c'est à dire, au-dessous de la CMC du Span 80, le diamètre

hydrodynamique diminue avec l'augmentation de ce dernier. Cependant, au-dessus de la CMC, l'effet inverse a été observé;

- La nature d'amorceur a également une influence sur la valeur de diamètre hydrodynamique des nanogels, et le diamètre le plus faible a été obtenu en utilisant AIBN comme amorceur, en raison de sa propriété non chargée. Quand des amorceurs chargés sont utilisés, la taille hydrodynamique augmente suite à un gonflement dû à la charge apportée;
- L'augmentation de la quantité de ferrofluide dans la formulation a conduit à une diminution de diamètre hydrodynamique des nanogels. Ce résultat est dû à la diminution du caractère hydrogel des nanoparticules formées ;
- Le solvant utilisé pour l'élaboration de ces nanogels hybrides n'a pas d'effet drastique sur le diamètre hydrodynamique des nanogels. Le cyclohexane s'est révélé un bon milieu de polymérisation permettant l'obtention de nanogels hybrides. Ce solvant a un point d'ébullition de 81 °C ce qui rend facile son élimination, tandis que le *n*-hexadécane a un point d'ébullition de 287 °C.

Après l'élimination du solvant et transfert dans l'eau, les synthèses suivantes MP15, MP16 et MP17 ont été caractérisées. L'efficacité d'encapsulation des nanoparticules d'oxyde de fer complexées avec le dextran dans les nanogels thermosensibles a été évaluée, en utilisant l'analyse thermo-gravimétrique (TGA), FTIR, la diffraction des rayons X, les mesures d'aimantation, et enfin, les images de la microscopie électronique en transmission (TEM).

La Figure 4.12 montre l'histogramme présentant la distribution des diamètres hydrodynamiques des nanogels magnétiques (MP17) après l'évaporation du cyclohexane et la redispersion dans l'eau en utilisant un équipement Nanosight LM20.

Une large distribution de la taille des particules est observée, ce qui peut être attribué à la présence des nanoparticules d'oxyde de fer non encapsulées et des particules de PNVCL sans l'oxyde de fer.

4.7.1. Le caractère thermosensible des nanogels magnétiques de PNVCL

Comme mentionné plus haut, l'augmentation de la quantité de ferrofluide conduit à une diminution notable de diamètre hydrodynamique, en raison des interactions entre les nanoparticules magnétiques et les groupes amide présents dans le NVCL. La Figure 4.14 montre que l'augmentation de la quantité de ferrofluide conduit également à une diminution du caractère thermosensible des nanogels hybrides. Le degré de gonflement des nanogels à une température inférieure à la LCST est plus élevé quand la quantité en ferrofluide utilisée est faible. Intuitivement, plus la quantité en ferrofluide est importante, plus le cœur des particules élaborées est faiblement sensible à la température et par conséquent le degré de gonflement diminue.

4.7.2. L'étude spectroscopique FTIR

Afin d'évaluer de façon qualitative l'incorporation des nanoparticules d'oxyde de fer dans les nanogels de PNVCL, les produits des réactions MP15, MP16 et MP17, ainsi que un échantillon des nanoparticules magnétiques complexés avec le dextran ont été caractérisés par l'infrarouge (FTIR). L'objectif de ces analyses est de confirmer la présence de liaison Fe-O des nanoparticules de Fe_2O_3 et Fe_3O_4 . Ainsi, la Figure 4.15 montre une comparaison entre les spectres des nanoparticules d'oxyde de fer et des nanogels magnétiques synthétisés avec des quantités différents d'oxyde de fer.

Tout d'abord, à partir de l'analyse des bandes d'absorption caractéristiques des vibrations $\text{Fe}^{2+}-\text{O}^{2-}$ et $\text{Fe}^{3+}-\text{O}^{2-}$ à 494 et 623 cm^{-1} , respectivement, il y a été possible d'observer l'augmentation de la concentration de Fe_3O_4 dans le produit de la synthèse avec une quantité plus grande de ferrofluide. En plus, la présence de la bande de la liaison $\text{C}=\text{O}$ à partir des groupes amides peuvent être observés à 1650 cm^{-1} dans les spectres des produits des réactions MP15, MP16 et MP17. Ces bandes ne sont pas observées dans le spectre des nanoparticules pures d'oxyde de fer, ce qui démontre la présence des molécules thermo-sensibles de PNVCL.

4.7.3. Les analyses thermo-gravimétriques (TGA)

Après calcination, les masses résiduelles obtenues (Figure 4.16) et des pourcentages de Fe_3O_4 , initialement introduits lors de la préparation des miniémulsions, permettent de déduire le pourcentage massique des nanoparticules magnétiques incorporées dans les nanogels thermosensibles et les résultats sont récapitulés dans le

tableau 4.3. Nous pouvons observer que l'augmentation de la quantité de ferrofluide dans le milieu réactionnel conduit à une augmentation du pourcentage d'incorporation des nanoparticules de Fe_3O_4 dans la matrice polymère PNVCL.

4.7.4. La diffraction des rayons X

La Figure 4.17 montre la présence de cinq pics caractéristiques des nanoparticules d'oxyde de fer dans tous les échantillons contenant des nanoparticules magnétiques. Ces pics, qui ne sont pas présents dans le diffractogramme d'échantillon du nanogel seul (100 % PNVCL), sont marqués par leurs indices (220), (311), (400), (333) et (440), et révèlent la présence des structures cristallines de Fe_3O_4 dans ces échantillons. En outre, pour les nanogels de PNVCL synthétisés avec des différentes quantités de ferrofluide, on peut observer une réduction de ces respectifs pics caractéristiques avec la diminution de la quantité des nanoparticules de Fe_3O_4 , ce qui confirme la présence de la PNVCL à la surface des nanoparticules magnétiques.

4.7.5. Les mesures d'aimantation

Les valeurs d'aimantation à saturation des nanoparticules d'oxyde de fer sont généralement supérieures à 60 emu/g. Cependant, dans notre cas, nous avons observé une valeur de 4,3 emu/g pour l'aimantation à saturation des nanoparticules magnétiques complexées avec le dextran polymère. Il est connu que l'énergie magnétique d'une particule dans un champ externe est proportionnelle à sa taille et ses caractéristiques de surface. La présence des molécules de dextran réduit de manière significative l'aimantation à saturation en raison de l'augmentation de la quantité organique (dextran) par rapport à la partie magnétique. Cette réduction a été encore plus significative pour les nanogels synthétisés avec des différentes quantités de ferrofluide. Les valeurs d'aimantation de saturation de 3,4, 2,7 et 2,5 emu/g ont été obtenues pour les nanogels synthétisés avec 300, 200 et 100 μL de ferrofluide, respectivement, ce qui confirme la présence de la PNVCL sur la surface des nanoparticules. Avec ces résultats, nous avons pu également estimer l'efficacité d'incorporation d'oxyde de fer dans les nanogels synthétisés avec des différentes concentrations des particules magnétiques. Les résultats obtenus sont égaux à 79,1, 62,8 et 58,1% pour les nanogels synthétisés avec 300, 200 et 100 μL de ferrofluide, respectivement.

4.7.6. La morphologie des nanogels magnétiques de PNVCL

La morphologie a été examinée par TEM. Sur la Figure 4.19, nous pouvons voir les nanoparticules d'oxyde de fer complexés avec le dextran, tandis que sur la Figure 4.20 on observe la structure des nanogels magnétiques et thermosensibles. L'image B de la Figure 4.20, montre une région plus foncée, qui peut être attribuée au noyau plus riche en nanoparticules d'oxyde de fer. L'autre région, plus claire, peut être attribuée au revêtement par le PNVCL.

Chapitre 5

5. Conclusions

Les nanogels de poly(NVCL-*co*-AA), sensibles aussi à la température que le pH, peuvent être obtenus en utilisant la polymérisation par précipitation. Les résultats ont montré l'effet des concentrations d'AA, MBA et KPS sur les diamètres de particules, le gonflement et la sensibilité à la température des nanogels.

A partir de cette étude, il a été possible de confirmer que, ainsi comme la masse moléculaire, l'utilisation d'AA comme un comonomère dans les copolymérisations ont influence sur la LCST de la PNVCL, en raison de la présense des groupes hydrophiles, lesquels resultent à l'augmentation de la hydrophilicité du copolymère. En plus, en raison des groupes carboxyles ionisables d'AA, les nanogels ont présenté une stabilité plus élevée quand les réactions sont réalisées à pH 5,0, c'est à dire, au-dessus de la valeur de pK_a d'AA.

L'augmentation de la concentration de MBA a conduit à une augmentation de la taille moyenne des particules. Ce résultat peut être attribué à la plus grande réactivité du MBA, par rapport à NVCL et AA, lequel est principalement consommé pendant le début de la polymérisation. Ce fait, associé à la solubilité plus élevée du MBA, par rapport à NVCL et AA, conduit à une augmentation de la taille critique des chaînes pour lesquelles il y a la précipitation des oligomères formés dans la phase aqueuse.

L'augmentation de la concentration d'amorceur de 0,5 pour 1 % en poids a conduit à une légère diminution des diamètres des nanogels. Cependant, en augmentant encore la concentration de KPS, l'effet opposé a été observé, ce qui peut être attribué à l'augmentation de la probabilité des radicaux formés de réagir avec des molécules du MBA. Ce résultat peut être également attribué à l'augmentation de la vitesse de précipitation des oligomères et de la vitesse de coagulation des noyaux instables, qui vont resulter en particules plus grosses.

Le procédé de polymérisation en miniémulsion inverse est une méthode efficace pour la préparation de nanogels thermo-sensibles à base de PNVCL. Nous deduisons de cette étude, que le NVCL peut être émulsionnée dans les solvants non polaires comme le *n*-hexadécane et le cyclohexane. Pour la stabilité osmotique des gouttelettes de monomère et pour éviter le mûrissement d'Ostwald, l'ajout de NaCl dans la phase aqueuse contenant le

monomère est une alternative efficace, ce qui augmente considérablement la stabilité de la miniémulsion.

Des particules de diamètre entre 150 et 700 nm ont été obtenues en utilisant différentes concentrations de Span 80 et des différentes quantités d'eau. Pour des concentrations de Span 80 au-dessus de sa CMC, une augmentation des diamètres hydrodynamiques des nanogels a été observée avec une diminution de la vitesse de polymérisation lorsque la concentration en Span 80 augmente.

L'analyse de diamètre hydrodynamique en fonction de la température a montré la sensibilité à la température des nanogels et les micrographies de TEM ont montré la morphologie sphérique des nanoparticules.

Les résultats montrent que l'utilisation du procédé de polymérisation en miniémulsion inverse a permis l'obtention des nanoparticules de PNVCL avec des morphologies homogènes.

La polymérisation en miniémulsion inverse s'est révélée être une méthode efficace pour l'encapsulation des nanoparticules magnétiques afin d'obtenir des systèmes multi-stimulables. Le diamètre hydrodynamique des nanogels magnétiques peuvent être contrôlés par des paramètres de la synthèse comme quantité de ferrofluide, le type d'amorceur, la concentration d'agent de réticulation et de tensioactif. L'incorporation des nanoparticules d'oxyde de fer dans les nanogels thermo-sensibles de PNVCL a été confirmée par FTIR, la diffraction des rayons X, l'analyse thermo-gravimétrique (TGA), le TEM et les mesures d'aimantation. L'efficacité d'incorporation a été obtenue par les analyses de TGA et par les mesures d'aimantation, qui ont également montré les propriétés magnétiques des nanogels finaux. Enfin, l'analyse de TEM a confirmé la morphologie sphérique des nanogels contenant des nanoparticules d'oxyde de fer dispersées dans la matrice de PNVCL avec une domination de distribution surfacique.

Chapitre 6

6. Perspectives

A partir des résultats obtenus dans ce travail, nous proposons:

- L'incorporation des nanoparticules magnétiques dans les nanogels à base de poly(NVCL-*co*-AA) en utilisant la polymérisation par précipitation. Certaines réactions ont été déjà réalisées pendant le développement de ce travail, en utilisant le ferrofluide aqueux constitué de nanoparticules d'oxyde de fer complexés avec le dextran polymère. Cependant, après le début de la polymérisation, la formation d'oligomères dans la phase aqueuse a conduit à l'agrégation des nanoparticules magnétiques, qui ont perdu sa stabilité et ont sédimenté au fond du réacteur. Une fois que l'obtention de ces particules polymères avec des propriétés magnétiques pour des applications biomédicales, principalement, *in vivo*, la taille des particules, dans l'échelle nanométrique, est d'une importance fondamentale, et la formation d'agrégats doit être évitée. Ainsi, pour optimiser la technique de polymérisation par précipitation et pour obtenir tels systèmes, d'autres expériences sont nécessaires, principalement, en faisant varier la composition des nanoparticules d'oxyde de fer afin de changer l'interaction entre les nanoparticules magnétiques et les chaînes de polymère.
- Le remplacement du réticulant (*N,N'*-méthylène-bis-acrylamide ou MBA), utilisé dans la synthèse des nanogels magnétiques à base de PNVCL en utilisant la polymérisation en miniémulsion inverse, par un agent de réticulation biocompatible, tel que le diméthacrylate d'éthylène glycol (EGDMA).
- L'utilisation d'une molécule fluorescente soluble dans l'eau dans la synthèse des nanogels magnétiques à base de PNVCL en utilisant la polymérisation en miniémulsion inverse, qui permet une visualisation rapide et facile de la taille et polydispersité aussi des gouttelettes de monomère que des particules de polymère.

- Le remplacement du dextran par une autre molécule biocompatible, comme par exemple, l'éthylène glycol, dans le revêtement des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer.
- La complexation des nanoparticules d'oxyde de fer avec des agents de polymérisation radicalaire contrôlée, permettant la polymérisation de la NVCL à partir de la surface de ces nanoparticules, afin d'augmenter l'efficacité d'encapsulation et d'obtenir des particules de polymère avec des propriétés magnétiques, avec une fine polydispersité de la taille des particules.
- Le encapsulção d'un principe actif soluble dans l'eau, après le remplacement du MBA par l'EGDMA, en utilisant la polymérisation en miniémulsion inverse, et la réalisation d'une étude de sa cinétique de libération *in vitro* à partir des nanoparticules thermo-sensibles.
- L'étude de l'encapsulation des nanoparticules magnétiques dans les homopolymères de NVCL précédemment synthétisés avec des différents masses moléculaires, ainsi que l'effet de la masse moléculaire sur les propriétés du matériau magnétique obtenu.
- L'encapsulation d'un principe actif dans les particules de PNVCL avec des propriétés magnétiques obtenues par des techniques qui utilisent des polymères préformés.

APPENDICE A

A. L'étude cinétique de la polymérisation radicalaire de la NVCL dans différents solvants

A.1. Introduction

La détermination des valeurs élémentaires des coefficients cinétiques de la polymérisation radicalaire du NVCL est d'une importance fondamentale pour la compréhension des propriétés du PNVCL et de ses applications. En raison de l'influence de la LCST sur la cinétique de libération d'un actif, la connaissance des paramètres qui affectent la température de transition est d'un grand intérêt pour mieux contrôler la libération des agents actifs. Ainsi, l'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'influence des concentrations de monomère, d'amorceur, de CTA, et la température sur la cinétique de polymérisation de ce système. L'effet de la masse moléculaire sur la LCST de la PNVCL a également été évalué.

A.2. La synthèse radicalaire des PNVCL en solution

Dans cette étape, les homopolymères de NVCL ont été synthétisés par la polymérisation radicalaire à 70 ° C, en utilisant le 1,4-dioxane, l'éthanol ou l'isopropanol comme des solvants. Les polymérisations ont été effectuées dans un réacteur avec une capacité de 50 mL sous l'atmosphère d'azote (N₂). La température du milieu a été contrôlée par un bain thermostaté. Tout d'abord, une quantité fixe de NVCL, ainsi que des quantités appropriées d'étalon interne (trioxane) et l'agent de transfert de chaîne (l'acide 3-mercaptopropionique) sont introduits dans le réacteur. Puis, une quantité de solvant (environ 75%) est ajouté et la solution purgée sous azote pendant vingt minutes pour éliminer l'oxygène présent, ce qui peut inhiber la polymérisation. Une solution d'amorceur (AIBN) préparée dans le 25% de solvant résiduel purgée sous azote pendant vingt minutes est ajoutée au milieu réactionnel. Lorsque la température du milieu atteint 70 ° C, la polymérisation est alors amorcée par l'addition de la solution d'AIBN. Des échantillons sont prélevés afin de suivre la polymérisation para RMN ¹H. La durée totale de la polymérisation est de trois heures et chaque polymérisation a été reproduite.

2.1.1. La détermination de la masse de l'étalon interne

La masse d'étalon interne (trioxane), utilisé dans les réactions a été déterminée par le nombre de moles du monomère et le nombre de protons de l'étalon interne, selon l'équation A.1, pour l'obtention de pics uniformes dans les spectres RMN ^1H . Dans cette équation, N_{PI} est le nombre de moles de l'étalon interne; N_M est le nombre de moles du monomère et H_{PI} est le nombre de protons de l'étalon interne (6, dans le cas du trioxane).

2.2.2. La purification des homopolymères de NVCL

Pour les analyses par UV-visible et la détermination de la LCST des polymères des PNVCL synthétisés par la polymérisation en solution, ces polymères ont été purifiés par la méthode de précipitation dans l'eau chaude (45 ° C, supérieure à la LCST de la PNVCL) sous agitation. Après la sédimentation du précipité, la phase aqueuse a été éliminée et les polymères sont par la suite dissous dans l'eau froide, en utilisant un bain de glace. Cette procédure a été répétée trois fois pour enlever complètement le monomère résiduel et des autres réactifs et, enfin, les polymères ont été séchées sous vide à 45 °C pendant 24 heures (VAIDYA et al., 2001; ZHANG et al., 2004).

2.2.5. Caractérisation des homopolymères obtenus par la polymérisation de NVCL en solution

2.2.5.1. L'étude de la cinétique de polymérisation par RMN ^1H

L'équipement utilisé dans la caractérisation chimique par RMN ^1H est un Varian, modèle Oxford 300, situé dans le Laboratoire de Chimie Fine de l'EEL/USP. La cinétique de polymérisation a été étudiée en utilisant des échantillons prélevés à différents temps de réaction. Ces échantillons ont été introduits dans un bain de glace, et de petites aliquotes ont été dissouts dans le chloroforme deutéré avant l'analyse.

Dans les spectres RMN ^1H , le signal lié au déplacement correspondant à l'étalon interne (5,2 ppm) a été intégré et la valeur 1 lui est attribuée. Avec cette zone de référence, nous avons intégré les signaux correspondants aux déplacements des protons de la double liaison de la NVCL (7,2 ppm) (Figure A.1). Les valeurs des zones obtenues par l'intégration des protons de la double liaison diminuent au cours de la réaction, ce qui indique la consommation du monomère et, par conséquent, la formation du polymère. Ainsi, il a été possible de calculer la conversion de la réaction de polymérisation, en utilisant l'équation A.2. Dans cette équation, $X(\%)$ est la conversion de la réaction; A_0 est

la surface du signal liée au déplacement correspondant au proton de la double liaison à l'instant zéro et A_t est la surface du signal en fonction du déplacement correspondant au proton de la double liaison dans un temps connu.

2.2.5.2. La détermination de la LCST

La technique utilisée est basée sur l'analyse de la turbidité de la solution de polymère en fonction de la température. Pour ce faire, un spectrophotomètre UV/visible Thermo Scientific Spectronic Genesys modèle 10 avec un régulateur de température à l'effet Peltier, situé dans le Laboratoire de Polymères de l'EEL/USP, a été utilisé. Après le procédé de purification des polymères, les solutions aqueuses de PNVCL (5 g/L) ont été caractérisées par la spectrophotométrie UV/Visible, afin de déterminer sa température critique inférieure de solubilité (LCST). La turbidité des solutions de polymères ont été mesurées à une longueur d'onde constante de 570nm, pour des températures comprises entre 28 et 42 °C. La LCST des solutions de polymères a été établie comme la valeur correspondant au point d'inflexion de la turbidité versus la température.

2.2.5.3. L'obtention des masses moléculaires absolues et les distributions des masses moléculaires (MWD)

Les masses moléculaires ont été déterminées en utilisant la technique de chromatographie sur gel perméable (GPC) avec un équipements de marque Waters, équipé d'un détecteur à indice de réfraction (RI) modèle 2414, un échantillonneur automatique modèle 717 et un détecteur de viscosité Viscotek modèle TDA 302. Une série de trois colonnes Phenogel (Phenomenex), avec des porosités correspondant à 10^3 , 10^4 et 10^6 Å a été utilisée.

Pour la caractérisation des masses moléculaires des homopolymères de NVCL synthétisés via la polymérisation en solution, les solutions des polymères dans le tétrahydrofurane (THF) ont été préparées à une concentration de 10 mg/mL. Ces solutions ont été préalablement filtrées en utilisant des filtres pour solvants organiques (0,45 µm) avant d'être injecté pour l'analyse. Le volume de solution de polymère injecté était de 100 µL. Une solution à 0,25% (m/v) de bromure de tétrabutylammonium dans le THF a été utilisé comme éluant à une vitesse de 1 mL/min, et une température de 35 °C. Le dn/dc du PNVCL trouvé égale à 0,1349 g/mL a été précédemment calculé, en utilisant des solutions de concentrations différentes du polymère.

3.2. L'influence de la concentration initiale de monomère

L'influence de la concentration initiale du NVCL sur la cinétique de polymérisation en utilisant le 1,4-dioxane, l'éthanol ou l'isopropanol, comme solvant, a été étudiée. Les concentrations de CTA et d'amorceur ont été maintenues constantes à $2,3 \times 10^{-2}$ et $6,4 \times 10^{-3}$ mol/L, respectivement. La Figure A.2 montre la courbe de conversion en fonction du temps pour les différentes valeurs de $[M]_0$ et solvants étudiés.

Les Figures A.2 et A.3 montrent que, dans tous les solvants étudiés, la valeur de la concentration initiale de NVCL affecte fortement la cinétique de polymérisation. En effet, dans toutes les polymérisations, la conversion augmente en fonction du temps de réaction et les vitesses de polymérisation instantanées sont plus élevées dans la première heure. Ce fait peut être attribué à l'accélération de formation des radicaux en raison du rapport concentration de monomère sur solvant plus élevé. Ceci conduit ainsi à une augmentation de la vitesse d'initiation (KUDYSHKIN et al., 2002). La relation entre le taux de formation des radicaux et la concentration du monomère, en utilisant l'AIBN comme amorceur, a déjà été étudiée par Szafko et Feist (1995). Ceci est interprétée sur la base de la théorie de solvation des molécules de monomère. En plus, la vitesse de polymérisation dépend également de la viscosité du milieu réactionnel et le changement significatif de la diffusion lorsque la valeur de $[M]_0$ est augmenté (Scott et Pepper, 1997) est un autre facteur important en considération.

La Figure A.4 montre les courbes de vitesse de polymérisation en fonction de la concentration initiale en monomère. Nous pouvons voir que R_p augmente linéairement avec la concentration initiale de monomère. Dans ce cas, l'ordre de réaction obtenue est de 1,32 pour les réactions effectuées dans le 1,4-dioxane, 1,51 dans l'éthanol et 1,46 dans l'isopropanol. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Kalugin et al. (2008). Ces auteurs ont observé que la polymérisation est de premier ordre en ce qui concerne la concentration de monomère. Toutefois, l'ordre de dépendance de la vitesse de polymérisation supérieure à une unité peut être associée à la dépendance du rapport amorceur sur $[M]_0$. Par ailleurs, selon Scott et Pepper (1997), l'impact causé par l'effet de gel est plus prononcé à des concentrations plus élevées de monomère. Si la concentration d'amorceur ne varie pas au cours de la polymérisation et l'efficacité de l'initiation est indépendante de la concentration de monomère, la cinétique de polymérisation doit être de premier ordre (en ce qui concerne la concentration de monomère) (KALUGIN et al., 2008). Cependant, la polymérisation en

solution de certains monomères est accompagnée d'un changement marqué de la cinétique classique et ce comportement inhabituel est dû à l'effet de la vitesse de réaction plus élevée et la masse moléculaire, appelé d'effet de l'auto-accélération ou d'effet de gel. Cet effet est dépendant de la nature et la concentration d'amorceur et est due à l'influence de la diffusion sur les réactions de termination. En d'autres termes, une diminution de la vitesse à laquelle les macromolécules diffusent dans le milieu visqueux conduit à une diminution de la capacité de deux macro-radicaux de terminer la réaction de polymérisation. La diminution de la termination provoque donc une augmentation du taux global de polymérisation et des masses moléculaires. Ces résultats sont en accord avec des études reportées par Riggs et Rodriguez (1967), en utilisant l'acrylonitrile et le méthacrylate de méthyle comme monomères et Ishige et Hamielec (1973) en utilisant l'acrylamide. Lin (2001) explique cette anomalie par des réactions possibles de transfert au solvant et par la théorie de «l'effet de cage».

Dans tous les solvants étudiés, la valeur de $k_p/k_t^{0.5}$ augmente avec la concentration initiale du NVCL. Des résultats similaires ont été obtenus par McKenna et al. (1999) pour la polymérisation en solution d'acrylate de butyle (BA). L'augmentation de $k_p/k_t^{0.5}$ en raison de la concentration initiale de monomère a été expliqué en termes de diminution de la concentration du solvant dans la réaction. Les auteurs ont mentionné également que cet effet peut être lié à la diminution du rapport entre le monomère et le solvant, avec la consommation de monomère, conduisant à une situation semblable à la variation de la concentration initiale de monomère. Ainsi, on peut supposer que le taux de termination de la polymérisation est contrôlée par la croissance des chaînes de PNVCL, en particulier pour les faibles taux de conversion. En d'autres termes, le coefficient de termination des macro-radicaux dépend de la vitesse de la diffusion et, par conséquent, de la croissance des chaînes (COUTINHO ; OLIVEIRA, 2006; MATYJASZEWSKI ; DAVIS, 2002) et donc la concentration initiale du NVCL aura effet sur le rapport $k_p/k_t^{0.5}$.

3.3. L'influence de la concentration d'amorceur

L'influence de la concentration d'amorceur sur la vitesse de polymérisation a été étudiée en utilisant des concentrations constantes de monomère et du CTA à $1,6 \times 10^{-1}$ et $6,4 \times 10^{-3}$ mol/L, respectivement. La Figure A.8 montre les courbes de conversion en fonction du temps pour les polymérisations effectuées avec différentes concentrations

d'amorceur et les profils de vitesse sont présentés dans la Figure A.9. Ces figures montrent l'augmentation de la conversion avec une concentration croissante d'amorceur, qui peut évidemment être expliquée par la concentration accrue des radicaux dans le milieu réactionnel. La Figure A.10 montre que dans tous les solvants utilisés, la vitesse de polymérisation augmente linéairement avec la concentration d'amorceur. L'ordre de réaction obtenue par rapport à la concentration d'amorceur est égal à 0,52 pour le 1,4-dioxane, 0,49 pour l'éthanol et 0,59 pour l'isopropanol. Ces résultats indiquent la présence de couplage par des interactions bimoléculaires des chaînes en croissance (BEHARI ; TAUNK, 1998). Ainsi, la dépendance de la vitesse de polymérisation par rapport à la concentration d'amorceur est en accord avec la théorie classique de la cinétique de polymérisation comme reportée dans des études antérieures (COLLINSON et al., 1957; DAINTON ; TORDOFF, 1973).

3.4. L'influence de la température de polymérisation

L'influence de la température sur la vitesse de polymérisation a été étudiée avec des concentrations du monomère, l'amorceur et le CTA constants à $1,6 \times 10^{-1}$, $2,3 \times 10^{-2}$ et $6,4 \times 10^{-3}$ mol/L, respectivement. La Figure A.11 montre que la vitesse de polymérisation est fortement dépendante de la température. En effet, l'influence de la température sur la cinétique de polymérisation radicalaire est décrite par l'équation d'Arrhenius, qui contient les constantes k_p , k_t et k_d (SCOTT ; PEPPER, 1997). De toute évidence, les polymérisations sont amorcées plus rapidement à des températures plus élevées et des conversions relativement importantes sont rapidement obtenues. La Figure A.13 montre l'effet de la température sur la vitesse de propagation et les résultats obtenus sont en accord avec la théorie d'Arrhenius. Les valeurs d'énergie d'activation E_A obtenues sont de 53,6, 52,5 et 48,6 kJ/mol dans les polymérisations effectuées avec le 1,4-dioxane, l'éthanol et l'isopropanol, respectivement. Ces valeurs sont inférieures à celles typiques de l'énergie d'activation dans les polymérisations initiées par la décomposition thermique d'amorceur (BRANDRUP et al., 1999). Toutefois, il est connu que l'énergie d'activation, E_A , peut être modifiée par l'étape liée à la formation des radicaux monomères, c'est à dire, plus rapide ils sont formés, plus élevée est l'énergie d'activation. En plus, en raison de la proximité entre les radicaux générés, certains peuvent être prisonniers dans la cage de solvation (effet de cage), ce qui retarde la réaction avec les molécules de monomère. Selon la théorie

de l'effet de cage, certains radicaux peuvent s'auto-terminer, ou même réagir avec des molécules de monomères voisins avant de diffuser à l'extérieur de la cage. Les résultats de cette étude sont semblables à ceux reportés par Lin (2001) et Mahdavian et al. (2004) pour la polymérisation de l'acrylamide.

3.5. L'influence de la concentration de CTA sur la cinétique de polymérisation, les masses moléculaires et les distributions des masses moléculaires (MWD)

L'influence de la concentration d'un agent de transfert de chaîne ou CTA (l'acide 3-mercaptopropionique) sur la vitesse de polymérisation, les masses moléculaires et les distributions des masses moléculaires a été en conservant les concentrations de monomère et d'amorceur constantes et égales à $1,6 \times 10^{-1}$ et $2,3 \times 10^{-2}$ mol/L, respectivement. La Figure A.14 montre que l'ajout de CTA affecte la vitesse de polymérisation de la NVCL. Traditionnellement, on pense que la présence du CTA affecte uniquement la masse moléculaire des polymères (JOVANIC ; DUBE, 2004). Toutefois, l'effet de la croissance des chaînes sur la constante k_t peut expliquer ce résultat.

La Figure A.15 montre l'augmentation de $k_p/k_t^{0,5}$ en fonction de la concentration du CTA. Pour des polymérisations effectuées avec des concentrations plus élevées de CTA, on observe la formation d'une plus grande quantité de chaînes courtes. Quand cette augmentation est significative, le CTA a également un effet notable sur k_t .

Les résultats de l'effet de la concentration de CTA sur les masses moléculaires et les distributions des masses moléculaires des PNVCL synthétisées dans le 1,4-dioxane, l'éthanol et l'isopropanol sont présentés dans les tableaux A.1, A.2 et A.3, respectivement. Comme prévu, l'ajout de CTA a conduit à des masses moléculaires plus petites.

A partir de l'analyse des résultats présentés dans les tableaux A.1, A.2 et A.3, il a été possible d'estimer le rapport entre la constante de transfert de chaîne pour le CTA et la vitesse de propagation, $C = k_f/k_p$. La Figure A.19 montre les courbes, à partir de laquelle nous avons estimé les valeurs de $C = k_f/k_p = 2,0 \times 10^{-4}$, pour les polymérisations effectuées dans le 1,4-dioxane, $4,37 \times 10^{-4}$, dans l'éthanol, et enfin $1,07 \times 10^{-3}$, dans l'isopropanol.

Sur les tableaux A.1, A.2 et A.3, on peut observer qu'en faisant varier la nature de solvant, la gamme des masses moléculaires obtenues sont différentes. Ce résultat est lié au coefficient de transfert des chaînes au solvant. Plus il est élevé, plus petites sont les masses

moléculaires. Les valeurs des constantes $C = k_f/k_p$ obtenues à partir de la Figure A.19 confirment l'influence du transfert au solvant. Isopropanol est le solvant qui a la plus grande valeur de $C = k_f/k_p$, suivie par l'éthanol et le 1,4-dioxane. Isopropanol est le solvant qui donne des masses moléculaires les plus petites. L'isopropanol et l'éthanol peuvent former des liaisons hydrogène avec les molécules de NVCL et, par conséquent, ils peuvent être utilisés comme des agents de transfert de chaîne.

3.6. L'effet de la masse moléculaire sur la LCST

Les tableaux A.1, A.2 et A.3, montrent que des concentrations plus élevées de CTA aboutissent à de petites masses moléculaires et la Figure A.20 montre l'effet de la masse moléculaire sur la LCST de la PNVCL dans une solution aqueuse à concentration de 5 g/L. Comme montré sur la Figure A.20, la LCST diminuée avec l'augmentation de la masse moléculaire, pour tous les solvants étudiés. En général, les valeurs obtenues de la LCST sont entre 34 et 36 °C pour les polymères synthétisés dans le 1,4-dioxane, 35 et 37 °C dans le cas d'éthanol, et enfin entre 37 et 38,5 ° dans le cas d'isopropanol. Cette variation peut être expliquée en termes des variations des masses moléculaires obtenues pour chaque solvant étudié. La diminution de la masse moléculaire provoque une augmentation des interactions entre le polymère et milieu aqueux. En plus, la présence des groupes carboxyles dans la molécule d'acide 3-mercaptopropionique (CTA) peut expliquer l'augmentation de la hydrophilie des polymères, comme discuté également par Inoue et al. (1997). Ces auteurs ont synthétisé des polymères à base de NVCL avec des masses moléculaires entre 650 et 6040 g/mol. Toutefois, les masses moléculaires obtenues dans la présente étude sont plus élevées que celles obtenues par Inoue et al. (1997) et, par conséquent, l'effet des groupes carboxyles dans notre cas, est donc moins évidente. En résumé, l'augmentation de la masse moléculaire de la PNVCL semble avoir un effet réel sur sa LCST.

3.7. Conclusions

Dans cette étude, nous avons démontré que la cinétique de polymérisation du *N*-vinylcaprolactame dans le 1,4-dioxane, l'éthanol et l'isopropanol est principalement influencée par des conditions de polymérisation. La cinétique de polymérisation en solution du NVCL dépend fortement de sa concentration dans le milieu, d'amorceur utilisé,

et également de la température de polymérisation. Nous avons observé que le rapport $k_p/k_t^{0.5}$ dépend de la concentration initiale du NVCL et de la concentration du CTA. Lorsque que la concentration en CTA dans le milieu réactionnel est importante des polymères de faibles masses moléculaires ont été obtenus suite à une des réactions de transfert de chaînes. Le changement du solvant a également une influence notable sur la masse moléculaire de PNVCL. Lors de cette étude, l'isopropanol se trouve être le solvant avec le plus grand coefficient de transfert de chaîne et, par conséquent, la polymérisation dans ces conditions donne lieu à des polymères de faibles masses moléculaires.

Une attention particulière a été dédiée à la cinétique de croissance des chaînes et à l'effet de cette croissance sur la constante k_t et sur la vitesse de polymérisation. L'ordre cinétique par rapport à l'amorceur utilisé est en bon accord avec les prédictions théoriques. La vitesse de polymérisation est rapide quand la température de réaction augmente et l'énergie d'activation obtenue est de l'ordre de 53,6 kJ/mol dans le cas de 1,4-dioxane, 52,5 kJ/mol dans l'éthanol et 48,6 kJ/mol dans l'isopropanol. Le rapport entre la constante de transfert de chaîne au CTA (l'acide 3-mercaptopropionique) et la constante de vitesse de propagation ($C = k_t/k_p$) est de $2,0 \times 10^{-4}$, pour les polymérisations réalisées dans le 1,4 - dioxane, $4,36 \times 10^{-4}$, dans l'éthanol, et enfin $1,07 \times 10^{-3}$, dans l'isopropanol, ce que explique les masses moléculaires plus faibles obtenues en utilisant l'isopropanol dans les synthèses.

Enfin, nous avons observé que la LCST des PNVCL synthétisés augmente avec la diminution de la masse moléculaire du polymère. Cette augmentation est attribuée à des interactions plus fortes entre les molécules de PNVCL et le milieu aqueux et également à la présence des groupes carboxyles dans les molécules du CTA.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Produção bibliográfica

Artigos publicados em periódicos

- Medeiros, S. F.; Santos, A. M.; Fessi, H.; Elaissari, A. Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, *in press*, 2010.
- Medeiros, S. F.; Santos, A. M.; Fessi, Abdelhamid Elaissari. Synthesis of biocompatible and thermally-sensitive poly(*N*-vinylcaprolactam) nanogels via inverse miniemulsion polymerization: effect of the surfactant concentration. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 48, p.3932-3941, 2010.
- Simone F. Medeiros, Jayne C. S. Barboza, Maria I. Ré, Reinaldo Giudici, Amilton M. Santos. Solution polymerization of *N*-vinylcaprolactam in 1,4-dioxane. Kinetic dependence on temperature, monomer and initiator concentrations. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 118, p. 229-240, 2010.

Artigos em fase de correção

- Simone F. Medeiros, Jayne C. S. Barboza, Reinaldo Giudici, Amilton M. Santos. Thermally-sensitive and biocompatible poly(*N*-vinylcaprolactam): A kinetic study of free radical polymerization in ethanol solution.
- Simone F. Medeiros, Jayne c. S. Barboza, Reinaldo Giudici, Amilton M. Santos. Synthesis of thermo-responsive and bicompatible poly(*N*-vinylcaprolactam) in isopropanol. Kinetic dependence on temperature, monomer and initiator concentrations.
- Medeiros, S. F.; Santos, A. M.; Fessi, H.; Elaissari, A. Thermally-sensitive Magnetic Poly(*N*-vinylcaprolactam) Nanoparticles via Inverse Miniemulsion Polymerization.

Trabalhos publicados em eventos científicos

➤ World Congress on Emulsions

Lyon – França Data: 12 a 14 de outubro de 2010.

Título do trabalho: Synthesis of biocompatible and thermally-sensitive poly(*N*-vinylcaprolactam) nanogels via inverse miniemulsion polymerization: effect of the surfactant concentration.

➤ Dechema 2010

Hamburgo – Alemanha Data: 10 a 13 de outubro de 2010.

Título do trabalho: Stimuli-responsive poly(*N*-vinylcaprolactam-co-acrylic acid) coated magnetic nanoparticles: synthesis and characterization.

➤ Macro 2010

Glasgow – UK Data: 11 a 16 de julho de 2010.

Títulos dos trabalhos: -Solution polymerization of *N*-vinylcaprolactam in different solvents. Kinetic dependence on temperature, monomer and initiator concentrations.

-Thermo-responsive and biocompatible poly(*N*-vinylcaprolactam) coated magnetic nanoparticles for biomedical applications: synthesis and characterization.

➤ XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Cobeq/2010

Foz do Iguaçu - PR Data: 19 a 22 de setembro de 2010.

Título do trabalho: Síntese de nanogéis de poli(*N*-vinilcaprolactama-co-ácido acrílico) sensíveis à temperatura e ao pH via polimerização por precipitação.

➤ Isnapol 2010

Gramado – RS Data: 7 a 10 de setembro de 2010.

Título do trabalho: Thermo- and pH-responsive nanogels of poly(*N*-vinylcaprolactam-co-acrylic acid): synthesis and characterization.

➤ ARCUS-Brésil Thematic Scholl-Nano.

Annecy-França. Data: 22 a 27 de março de 2009.

Título do trabalho: Synthesis of magnetic thermally sensitive poly(*N*-vinylcaprolactam) for in vivo applications.

➤ FBPOL-2008-2nd French-Brasilian Meeting on Polymers.

Florianópolis– SC Data: 20 a 25 de abril de 2008.

Título do trabalho: Synthesis of poly(*N*-vinylcaprolactam), a thermo-responsive and biocompatible polymer, by solution polymerization: effect of solvent, temperature, monomer and initiator concentration on kinetic.

➤ Polychar 15

Búzios - RJ Data: 16 a 20 de abril de 2007.

Título do trabalho: Characterization of polymerization of poly(*N*-vinylcaprolactam-co-acrylic acid) by ¹H NMR and determination of the lower critical solution temperature (LCST) by UV/visible analyses.

➤ XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Cobeq/2006

Santos - SP Data: 24 a 27 de setembro de 2006.

Título do trabalho: Estudo da influência do ácido acrílico na termo-sensibilidade do poli(*N*-vinilcaprolactama-co-ácido acrílico).

➤ MACRO – IUPAC, World Polymer Congress

Rio de Janeiro - RJ Data: 16 a 21 de julho de 2006.

Título do trabalho: Synthesis of poly(*N*-vinylcaprolactam-co-acrylic acid) and study of thermo-responsive propertie.