



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS QUÍMICA E
BIOLÓGICA – PPGTQB
LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
QUÍMICOS – LDPQ

NANOPARTÍCULAS DE POLI(PIVALATO DE VINILA)
MAGNÉTICO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS:
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS,
QUERATINÓCITOS E MELANOMA HUMANO

TESE DE DOUTORADO

Robson Teixeira Araujo

Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.

BRASÍLIA, DF - BRASIL
Fevereiro de 2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS QUÍMICA E
BIOLÓGICA – PPGTQB
LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
QUÍMICOS – LDPQ

NANOPARTÍCULAS DE POLI(PIVALATO DE VINILA)
MAGNÉTICO VISANDO APLICAÇÕES BIOMÉDICAS:
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS,
QUERATINÓCITOS E MELANOMA HUMANO

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Tecnologias Química e Biológica.

Robson Teixeira Araujo

Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.

BRASÍLIA, DF - BRASIL
Fevereiro de 2022

DEDICATÓRIA

À minha esposa – Rosimeiry

À minha filha – Martina

AGRADECIMENTOS

- Ao IQ/UnB, IF/UnB e IG/UnB por terem disponibilizado equipamentos e tempo para a realização de análises dos materiais sintetizados durante minha estada no doutorado.

- À Pós-Graduação do IQ/UnB por todas as oportunidades, pelo ensino de qualidade e de alto nível e por conhecer professores incríveis nesta jornada.

Meus sinceros agradecimentos a:

- Aos amigos feitos durante esta jornada como a Erislene, o Gabriel, a Weslany, pelo acolhimento e amizade desde o início e com quem pude trocar opiniões, comentários e receber sugestões a respeito do trabalho nos mais diversos estagios.

- À amiga e companheira de laboratório, de longa data, Gabriela Ribeiro (pós-doc) pelas discussões a respeito de diversos aspectos do trabalho.

- Aos ICs com quem tive a oportunidade de trabalhar, como Suellen, Grazielle, Gabriela, Yago, Thayná, Graciane com os quais pude ensinar e aprender um pouco mais sobre minha área de trabalho e diversos aspectos ligados à vida acadêmica.

-Aos Mestrandos com quem tive oportunidade de conviver como o Fábio (eng.civil), Zhang, Luis, e outros que terminaram suas jornadas como ICs e se tornaram mestrandos durante minha jornada.

- À minha família, consanguínea e não consanguínea, especialmente minha esposa Rosimeiry e minha filha Martina, pela presença e apoio moral que serviram de suporte e espelho ao longo das dificuldades do percurso.

Meu agradecimento muito especial:

- Ao Prof. Dr. Fabricio Machado, meu orientador, sem o qual nada disto teria ocorrido. Agradeço por toda a ajuda, encorajamento, amizade, paciência, orientação, dedicação, profissionalismo e acolhida no universo LDPQ. Sou muito agradecido pois pude entender, mais ainda, a importância do nosso trabalho e dos detalhes necessários para uma vida acadêmica produtiva e de sucesso.

CITAÇÃO

Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.

Hipócrates

NOMENCLATURAS E ABREVIATURAS

Siglas

A	Ampère
AA	Ácido Acrílico
AA20NP20	NP (20%) recoberta com ácido acrílico (20%)
AM	Ácido Metacrílico
AM25NP20	NP (20%) recoberta com ácido metacrílico (25%)
KPS	Persulfato de potássio
ATC	Agente de transferência de cadeia
DISP	Dispersão de massa molar
DMM	Distribuição de massa molar
DRX	Difração de Raios X
DXC	Calorimetria Diferencial de Varredura
Fe ₃ O ₄	Magnetita, tetróxido de triferro
FeCl ₃ ·6H ₂ O	Cloreto férrico hexahidratado
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
MEHQ	Monometil éter de hidroquinona
MET	Microscopia eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MRI	Imagem por Ressonância Magnética
NPM	Nanopartícula magnética
Oe	Oersted
PVi	Pivalato de vinila
PPVi	Poli(pivalato de vinila) polimerizada com KPS a 0,25%
SDS	Dodecil sulfato de sódio (ou laurilsulfato de sódio – SLS)
T _c	Temperatura Curie
TG	Termogravimetria
T _n	Temperatura de Néel
EGDA	Etilenoglicol diacrilato
Melamina	Polimetilenomelamina
PACA	poli(acrilato de alquilciano)
PEI	Polielilenoimina
PHEMA	Poli(metacrilato de 2-hidroxietila)
PLA	Poli(ácido láctico)
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
PS	Poliestireno

SÍMBOLOS GREGOS

ν	Estiramento vibração de deformação angular em altas frequências
δ	Dobramento vibração de deformação angular (dobramento) em baixas frequências
χ	Susceptibilidade magnética
ϕ	Diâmetro

SUBSCRITOS

as	Assimétrico
s	Simétrico

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver um novo tipo de material polimérico, com propriedades magnéticas, visando aplicações biomédicas. As nanopartículas de magnetita sintetizadas foram modificadas com ácidos carboxílicos, como o ácido acrílico ou metacrílico, a fim de melhorar o encapsulamento individual durante a etapa de polimerização, o que provoca uma melhoria na resposta magnética dos nanocompósitos. As nanopartículas foram dispersas em uma matriz termoplástica de poli(pivalato de vinila) através de um processo de polimerização em emulsão, cujos produtos também apresentam propriedades magnéticas. As amostras foram analisadas por FTIR, DTG, DSC, DRX, VSM, MET. A partir dos dados obtidos na difratometria de raios X determinou-se que o tamanho de cristalito das nanopartículas de magnetita pura é de aproximadamente 8 nm. Os resultados da microscopia de transmissão eletrônica mostraram que as nanopartículas possuem morfologia esférica. Nanopartículas puras ou funcionalizadas apresentaram tamanho de cerca de 6 nm, enquanto os nanocompósitos apresentam tamanho de cerca de 7 nm. Medidas de saturação magnética mostraram valores de aproximadamente 75 emu/g, indicando presença de superparamagnetismo no material em temperatura ambiente. Os nanocompósitos mostraram uma temperatura de transição vítrea (T_g) de 65 °C, o que é apropriada para possíveis usos em aplicações biológicas. Os compostos sintetizados foram caracterizados e testados em diferentes linhagens celulares, como queratinócitos (HaCaT), fibroblastos e melanomas (A431), em diferentes tempos de exposição e concentrações a fim de verificar a citotoxicidade. Os resultados obtidos nos testes de citotoxicidade mostraram viabilidades celulares superiores a 70% quando comparados ao grupo de controle sugerindo possíveis aplicações em terapias biomédicas como a hipertermia e a emboloterapia.

Palavras-chave: polimerização em emulsão, termoplástico, poli(pivalato de vinila), superparamagnetismo, citotoxicidade, melanoma, hipertermia.

ABSTRACT

The objective of this work was to develop a new type of polymeric material, with magnetic properties, aiming biomedical applications. The synthesized magnetite nanoparticles were modified with carboxylic acids, such as acrylic or methacrylic acid, in order to improve individual encapsulation during the polymerization step, which improves the magnetic response of the nanocomposites. The nanoparticles were dispersed in a thermoplastic matrix of poly(vinyl pivalate) through an emulsion polymerization process, whose products also have magnetic properties. Samples were analyzed by FTIR, DTG, DSC, XRD, VSM, MET. From the data obtained in X-ray diffractometry, it was determined that the crystallite size of the pure magnetite nanoparticles is approximately 8 nm. The results of transmission electron microscopy showed that the nanoparticles have spherical morphology. Pure or functionalized nanoparticles have a size of about 6 nm, while nanocomposites have a size of about 7 nm. Magnetic saturation measurements showed values of approximately 75 emu/g, indicating the presence of superparamagnetism in the material at room temperature. The nanocomposites showed a glass transition temperature (T_g) of 65 °C, which is suitable for possible uses in biological applications. The synthesized compounds were characterized and tested in different cell lines, such as keratinocytes (HaCaT), fibroblasts and melanomas (A431), at different exposure times and concentrations in order to verify cytotoxicity. The results obtained in the cytotoxicity tests showed cell viability higher than 70% when compared to the control group, suggesting possible applications in biomedical therapies such as hyperthermia and embolotherapy.

Keywords: emulsion polymerization, thermoplastic, poly(vinyl pivalate), superparamagnetism, cytotoxicity, melanoma, hyperthermia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. OBJETIVO DA TESE	22
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1. OBJETIVO	24
2.2. INTRODUÇÃO	24
2.3. PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS MATERIAIS	25
2.4. CLASSIFICAÇÃO DOS MATERIAIS MAGNÉTICOS	26
2.5. PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DE NANOPARTÍCULAS	27
2.6. POLÍMEROS E PROCESSOS DE POLIMERIZAÇÃO	29
2.7. SÍNTESE DE POLÍMEROS POR REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA	31
2.8. POLIMERIZAÇÃO EM EMULSÃO	32
2.8.1. <i>Preparação de polímeros por meio de emulsões</i>	35
2.9. O FERRO	37
2.9.1. <i>Compostos de ferro</i>	37
2.10. ROTAS SINTÉTICAS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	39
2.10.1. <i>Síntese de nanopartículas por coprecipitação</i>	39
2.11. APLICAÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA (Fe ₃ O ₄)	42
2.11.1. <i>Aplicações biomédicas</i>	42
2.11.2. <i>Aplicações tecnológicas</i>	43
2.11.3. <i>Emboloterapia</i>	43
2.11.4. <i>Hipertermia (HT)</i>	45
2.12. NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS	46
2.13. MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL (FUNCIONALIZAÇÃO) DE NANOPARTÍCULAS	49
2.14. MODIFICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE Fe ₃ O ₄ COM ÁCIDO ACRÍLICO E METACRÍLICO	52
2.15. ESTABILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	56
2.15.1. <i>Estabilização estérica</i>	56
2.15.2. <i>Estabilização eletrostática</i>	58
2.16. CONTROLABILIDADE MAGNÉTICA DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	58
2.17. BIOCOMPATIBILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	58
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	60
3.1. OBJETIVOS	60

3.2.	REAGENTES E MATERIAIS.....	60
3.2.1.	<i>Reagentes e Materiais Utilizados na Síntese e Modificação das Nanopartículas de Fe₃O₄</i>	60
3.2.2.	<i>Reagentes e Materiais usados na Síntese dos Polímeros</i>	60
3.3.	SÍNTESES E MODIFICAÇÕES REALIZADAS.....	61
3.3.1.	<i>Síntese de Nanopartículas Magnéticas de Fe₃O₄</i>	61
3.3.2.	<i>Modificação superficial das Nanopartículas de Fe₃O₄</i>	62
3.4.	SÍNTESE DOS NANOCOMPÓSITOS DE Fe ₃ O ₄ /POLI(PIVALATO DE VINILA)	64
3.4.1.	<i>Reações de Polimerização em Emulsão</i>	64
3.5.	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	66
3.5.1.	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	66
3.5.2.	<i>Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</i>	67
3.5.3.	<i>Termogravimetria (TG)</i>	67
3.5.4.	<i>Difração de Raios X (DRX)</i>	67
3.5.5.	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i>	68
3.5.6.	<i>Ensaio de citotoxicidade in vitro</i>	68
3.5.7.	<i>Medidas de magnetização</i>	71
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	72
4.1.	OBJETIVOS	72
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	72
4.3.	CARACTERIZAÇÃO MAGNÉTICA	88
4.4.	VIABILIDADE CELULAR.....	98
4.4.1.	<i>Viabilidade celular da linhagem FIBRO</i>	99
4.4.2.	<i>Viabilidade celular para linhagem HaCaT</i>	101
4.4.3.	<i>Viabilidade celular na linhagem A431</i>	104
5.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	107
5.1.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
5.2.	PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	108
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação de uma curva FC-ZFC de um sistema de nanopartículas de magnetita	28
Figura 2 - Representação de diferentes tamanhos de cadeias para a formação de um polímero	30
Figura 3 - Representação esquemática de uma micela esférica.	33
Figura 4 - Comparação de rotas sintéticas de óxidos de ferro superparamagnéticos.....	38
Figura 5 - Métodos preparativos de ferritas usando sais de Fe^{3+} e M^{2+} como precursores	39
Figura 6 - Representação esquemática de uma partícula magnética coberta com surfactante.....	41
Figura 7 - Representação do número de artigos sobre (A) polímeros, (B) partículas magnéticas e ferritas espinélicas.....	47
Figura 8 - Diferentes morfologias e estruturas de nanopartículas. (a) casca-núcleo, (b) multicasca, (c),(d) partícula sobre partícula, (e) morfologia escovada (brush hair).....	55
Figura 9 - Representação da repulsão entre 2 nanopartículas carregadas positivamente	57
Figura 10 - Estratégias para aplicar nanopartículas magnéticas em áreas biomédicas	59
Figura 11 - Diagrama esquemático da síntese de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)	62
Figura 12 - Representação esquemática da funcionalização da magnetita por ácido acrílico ou metacrílico	63
Figura 13 - Diagrama esquemático das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) com ácido acrílico ou metacrílico.	64
Figura 14 - Diagrama esquemático do sistema reacional de polimerização em emulsão das nanopartículas modificadas de magnetita (Fe_3O_4) com ácido acrílico ou metacrílico.....	65
Figura 15 - Difrátogramas de raios X das nanopartículas de Fe_3O_4 puras, de nanopartículas modificadas com ácido acrílico (AA) ou metacrílico (AM) e dos	

nanocompósitos magnéticos de poli(pivalato de vinila) (AA20NP20 e AM25NP20).....	73
Figura 16 - Histogramas da distribuição do tamanho de particular das nanopartículas magnéticas de Fe ₃ O ₄ e micrografias das análises de MET. (A) Fe ₃ O ₄ não modificada (B) Fe ₃ O ₄ funcionalizada com ácido acrílico, (C) Fe ₃ O ₄ funcionalizada com ácido metacrílico, (D) poli(pivalato de vinila) magnético modificado com ácido acrílico (AA20NP20), e; (E) poli(pivalato de vinila) magnético modificado com ácido metacrílico (AM25NP20).	79
Figura 17 - Medidas de FTIR das nanopartículas de Fe ₃ O ₄ puras, funcionalizadas com ácido acrílico, funcionalizadas com ácido metacrílico e nanocompósitos magnetopoliméricos (AM25NP20 e AA20NP20).	82
Figura 18 - Representação esquemática da ligação entre nanopartículas de Fe ₃ O ₄ e ácidos carboxílicos.	84
Figura 19 - Análise termogravimétrica para (A) Fe ₃ O ₄ puro e funcionalizado com ácido acrílico (Fe ₃ O ₄ /AA) e metacrílico (Fe ₃ O ₄ /AM), e (B) magnetopolímeros (AM25NP20 e AA20NP20) e poli(pivalato de vinila) (PPVi).	86
Figura 20 - Resposta magnética de Fe ₃ O ₄ coloidal em hexano	89
Figura 21 - Curva de magnetização das nanopartículas magnéticas de Fe ₃ O ₄	89
Figura 22 - Curvas de magnetização* de (A) Fe ₃ O ₄ não modificado; (B) Fe ₃ O ₄ modificado com ácido acrílico, (C) Fe ₃ O ₄ modificado com ácido metacrílico (D) poli (pivalato de vinila) magnético contendo Fe ₃ O ₄ modificado com ácido acrílico (AA20NP20), e; (E) poli(pivalato de vinila) magnético contendo Fe ₃ O ₄ modificado com ácido metacrílico (AM25NP20).	91
Figura 23 – Curvas FC/ZFC de (A) Fe ₃ O ₄ não modificado; (B) Fe ₃ O ₄ modificado com ácido acrílico, (C) Fe ₃ O ₄ modificado com ácido metacrílico (D) poli (pivalato de vinila) magnético contendo Fe ₃ O ₄ modificado com ácido acrílico (AA20NP20), e; (E) poli (pivalato de vinila) magnético contendo Fe ₃ O ₄ modificado com ácido metacrílico.	95
Figura 24 - Avaliação da atividade citotóxica das amostras poliméricas (amostra 1 = PPVi; amostra 2 = AA20NP20; amostra 3 = AM25NP20b) em células de fibroblasto (FIBRO) após (A) 24 h (B) 48 h, (C) 72 h de exposição nas concentrações de 0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL. Os asteriscos estão relacionados aos diferentes intervalos de confiança	

associados à significância estatística: *para 95% com $p \leq 0,05$, **99% com $p \leq 0,01$, ***99,9% com $p \leq 0,001$ e ****99,99% com $p \leq 0,0001$ 100

Figura 25 - Avaliação da atividade citotóxica das amostras poliméricas (amostra 1 = PPVi; amostra 2 = AA20NP20; amostra 3 = AM25NP20b) em células de queratinócitos humano (HaCat) após (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72h de exposição nas concentrações de 0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL. Os asteriscos estão relacionados aos diferentes intervalos de confiança associados à significância estatística: * para 95% com $p \leq 0,05$, ** 99% com $p \leq 0,01$, ***99,9% com $p \leq 0,001$ e ****99,99% com $p \leq 0,0001$ 102

Figura 26 - Avaliação da atividade citotóxica das amostras de poliméricas (amostra 1 = PPVi; amostra 2 = AA20NP20; amostra 3 = AM25NP20b) em células de câncer de pele não melanoma (CPNM, A431) humano após (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72h de exposição nas concentrações de 0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL. Os asteriscos estão relacionados aos diferentes intervalos de confiança associados à significância estatística: * para 95% com $p \leq 0,05$, ** 99% com $p \leq 0,01$, ***99,9% com $p \leq 0,001$ e ****99,99% com $p \leq 0,0001$ 104

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Estágios da polimerização em emulsão clássica.	35
Quadro 2 - Comparação das propriedades dos diferentes tipos de emulsão possíveis a partir de óleo, água e emulsificante.....	36
Quadro 3 - Diferenças entre os métodos sintéticos de nanopartícula de óxidos de ferro.....	38
Quadro 4 . Principais áreas de aplicação de nanopartículas magnéticas.	46
Quadro 5 . Tipos de moléculas utilizadas na funcionalização de nanopartículas magnéticas.....	50
Quadro 6 . Abordagens para a preparação e modificação superficial de nanopartículas de óxidos de ferro.	51
Quadro 7 . Compostos usados para a preparação e modificação superficial de nanopartículas magnéticas (NPMs).	52
Quadro 8 . Métodos de funcionalização de partículas.....	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Representação gráfica do comportamento dos momentos magnéticos de diferentes materiais	27
Tabela 2. Cinética reacional da polimerização em emulsão.	36
Tabela 3. Receita para a síntese <i>in situ</i> de nanocompósitos magnéticos de poli(pivalato de vinila).....	66
Tabela 4. Picos característicos associados aos índices de Miller, tamanho de cristalito, parâmetros de rede e estequiometrias das nanopartículas puras, modificadas e dos nanocompósitos magnéticos de poli(pivalato de vinila).	76
Tabela 5. Principais picos e bandas de absorção observados via medidas de FTIR da magnetita recoberta com ácido.	84
Tabela 6 - Estabilidade dos nanocompósitos: material residual após a calcinação e temperaturas de decomposição.	87
Tabela 7. Propriedades magnéticas das nanopartículas de Fe ₃ O ₄ puras, modificadas e dos magnetopolímeros.....	93

1. INTRODUÇÃO

O ferro é um dos elementos mais abundantes na crosta terrestre e tem importância em diversos processos metabólicos no corpo humano. Na forma de seus diferentes compostos, com destaque para os óxidos, tem sido pesquisado e utilizado há décadas na área biomédica.¹

Alguns dos óxidos de ferro, como magnetita e maguemita, apresentam propriedades físico-químicas que fazem com que diversas aplicações envolvendo nanopartículas sejam possíveis, como a facilidade de síntese, estrutura e tamanho ajustáveis, atividade catalítica, superparamagnetismo, estabilidade coloidal, possibilidade de funcionalização superficial e biocompatibilidade.²

Uma vez que nanopartículas não funcionalizadas apresentam propriedades diferentes daquelas que foram funcionalizadas, o procedimento de dispersão de nanopartículas magnéticas (NPMs) em matrizes poliméricas gera uma série de propriedades adequadas para aplicações biomédicas.

Entre essas propriedades, podemos citar: o aumento da compatibilidade com matrizes orgânicas, a redução da tendência à lixiviação, a proteção da superficial da partícula contra a oxidação e o auxílio na formação da nanodispersão magnética contendo nanopartículas em seu interior.³⁻⁴

Deste modo, a funcionalização de nanopartículas tem a capacidade de melhorar a dispersividade e a estabilidade química bem como reduzir a toxicidade dos materiais envolvidos, que são requisitos para aplicações médicas.

Entre os diversos motivos pelos quais nanopartículas de ferro não podem ser usadas diretamente no organismo e precisam ser funcionalizadas, podemos citar a formação de radicais livres, a possibilidade de agregação das nanopartículas, causando trombozes e a oxidação fácil das nanopartículas.⁵

Devido a suas propriedades físico-químicas, biocompatibilidade, baixa toxicidade a possibilidade de controle da morfologia, vários materiais como poli (etileno glicol) (PEG), quitosana, dextrana, álcool polivinílico (PVA), entre outros, podem ser usados em conjunto com materiais inorgânicos como óxidos de ferro para o desenvolvimento de diversas aplicações como agentes embolizantes, em separação de proteínas ou hipertermia, por exemplo.⁶

No caso de nanopartículas magnéticas, como a magnetita, maguemita e outras ferritas, a redução no magnetismo na superfície das nanopartículas pode ocorrer, o que pode dificultar alguns dos possíveis cujo requisito seja de partículas com elevada capacidade magnética.

Esta é uma outra razão para o emprego de diversos compostos como polímeros e ácidos carboxílicos como agentes de cobertura.⁷

Látices poliméricos magnéticos tem encontrado diversos usos em várias aplicações como, por exemplo, agricultura e indústria de alimentos,⁸ separação magnética de compostos diversos,⁹ agentes de contraste¹⁰ e diagnóstico,¹¹ setor têxtil e sensores químicos,¹² controladores de temperatura em tratamentos por hipertermia,¹³⁻¹⁴ sistemas transportadores de fármacos,¹⁵ indústria automotiva e catálise,¹⁶⁻²⁰ e emboloterapia e terapia associadas.²¹⁻²⁵

Muitos estudos na área biomédica têm objetivo de estudar a toxicidade e os efeitos colaterais após a administração de materiais em organismos e células.

As principais preocupações decorrem da citotoxicidade e nefrotoxicidade por conta do tamanho de nanopartículas que podem provocar efeitos como lesões por isquemia e reperfusão, entre outras, causadas por espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas em processos de estresse oxidativo.

No caso particular das nanopartículas de magnetita, devido a suas propriedades catalíticas, é possível a geração de radicais livres por processos de Fenton.²⁶

Essas reações de Fenton danificam as estruturas mitocondriais causando morte celular, uma vez que a geração de radicais livres pode iniciar processos inflamatórios, danos ao DNA, desnaturação proteica e peroxidação lipídica.²⁷

Quando esse processo ocorre em organismo vivos, com seres humanos sendo os mais estudados, podem ser geradas diferentes doenças como envelhecimento, problemas cardiovasculares, degenerativos ou cânceres.

Diversos processos de polimerização podem ser empregados com o intuito de recobrir nanopartículas, cada um com suas vantagens e desvantagens, destacando-se entre esses, o processo de polimerização em emulsão devido à possibilidade de encapsulamento individual de nanopartículas.

Diversos autores têm estudado a citotoxicidade de nanopartículas em diferentes tipos de células. Entre os trabalhos recentes, podemos citar o trabalho de Resende *et al.*²⁸ que apresentou um estudo sobre nanopartículas poliméricas

do tipo casca-núcleo obtidas a partir de polimerização em miniemulsão combinada com polimerização semeada visando aplicações em emboloterapia.

Embora esse trabalho traga inúmeras contribuições, é importante ressaltar que o processo de miniemulsão não é adequado para o encapsulamento individual de nanopartículas magnéticas, pois o tamanho característico das gotas monoméricas está na faixa de 20 a 50 nm, fazendo o produto final apresentar uma grande quantidade de nanopartículas encapsuladas na forma de nanoclusteres, o que pode afetar a resposta magnética do material.

Como mostrado pelos autores, essa nova classe de nanopartículas magnéticas do tipo casca-núcleo composta por PMMA-Fe₃O₄/poli(pivalato de vinila) mostrou uma elevada viabilidade celular para células de melanoma do tipo murina (linhagem celular B16F10) e queratinócitos (linhagem HaCaT).

O estudo de Rehana *et al.*²⁹ mostrou que nanopartículas magnéticas funcionalizadas com diferentes ácidos carboxílicos como o ascórbico, hexanóico, salicílico e aminoácidos como L-arginina e L-cisteína reduzem a toxicidade de drogas anticâncer em células de adenocarcinoma (A549).

Trabalhando com outros tipos de óxidos, como ZnO e SiO₂, Sahu *et al.*³⁰ mostraram que essas nanopartículas apresentam diferentes citotoxicidades de acordo com o tamanho de partículas em células de monócitos (THP-1) e células pulmonares humanas (L-132).

Há pesquisas com outros tipos de nanopartículas metálicas, como ouro e prata. Ma *et al.*³¹ sintetizaram nanopartículas de ouro para entender como a degradação da corona proteica, causada por nanopartículas, influencia a citotoxicidade em células.

Além disso, o estudo citado trouxe a informação que diferentes taxas de degradação enzimática na corona ocorrem e que podem levar à indução de citotoxicidade e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

A corona proteica é a cobertura de biomoléculas, ligadas à superfície de nanopartículas, que se forma de modo natural quando nanopartículas são inseridas em meios biológicos.

O papel biológico deste tipo de estrutura é o de proteger as células dos efeitos tóxicos de nanopartículas, além de reduzir os efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROs).

Vazques-Muñoz *et al.*³² pesquisaram o efeito de nanopartículas de prata em diferentes grupos taxonômicos, a fim de estudar seus efeitos em diversos sistemas vivos, inclusive linhagens de câncer.

De acordo com os autores, organismos de diversas complexidades sofrem inibição *in vitro* na escala de microgramas de prata em suas diferentes apresentações.

Quando nanomateriais com propriedades magnéticas são usados, é importante que as propriedades magnéticas sejam preservadas. Se o objetivo é que o material seja usado em organismos é interessante que haja o encapsulamento da nanopartícula em uma matriz polimérica hidrofóbica, que poderá ser modificada dependendo do tipo de aplicação a que se destina.

Quando são realizadas polimerizações em emulsão, o desafio é que ocorra uma dispersão adequada e o mais uniforme possível na matriz polimérica obtida ao final da reação envolvendo monômero e nanopartículas, em diversas proporções de massa entre as fases presentes.³³

Neste trabalho, de modo a se certificar que as nanopartículas obtiveram a cobertura adequada, o procedimento experimental seguiu 2 importantes passos: O primeiro passo foi realizar a modificação superficial das nanopartículas de Fe₃O₄, com ácidos carboxílicos polimerizáveis, para melhorar a capacidade de encapsulamento.

O segundo passo foi a polimerização em emulsão usando nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄), funcionalizadas com esses 2 ácidos carboxílicos, como locus da polimerização para encapsulamento individual por uma camada de pivalato de vinila de espessura controlada.

Para a síntese de nanopartículas podem ser usados diversos métodos de síntese, destacando-se entre eles, coprecipitação,^{34,35} métodos hidrotérmicos^{36,37} e sonoquímicos^{38,39}, além de processos sol-gel^{40,41}, polióis,⁴²⁻⁴⁴, por injeção em fluxo, aerosol e vapor,⁴⁵ eletroquímicos,¹ microemulsão por zona.⁴⁶

Mesmo existindo diferentes rotas sintéticas de nanopartículas de magnetita, algumas dificuldades inerentes ao processo podem ser citadas, tais como a manutenção da estequiometria adequada entre cátions Fe²⁺ e Fe³⁺; a separação do produto final; a prevenção ou redução da floculação do material obtido e a remoção de surfactantes residuais, entre outros.⁴⁷⁻⁴⁹

Ainda, em relação à síntese de nanopartículas, alguns cuidados devem ser tomados de modo que possam ser empregadas na área biomédica:^{4, 50} *i)* devem ser estáveis em água, uma vez que a maioria dos processos bioquímicos ocorrem neste meio; *ii)* devem ser seguras para a saúde e ambiente; *iii)* a conjugação deve ser bem feita em biomoléculas para tarefas específicas, *iv)* apresentar um elevado grau de cristalinidade, que mantém magnetização elevada.

É desejável, além da escala nanométrica, que as nanopartículas magnéticas apresentem uma distribuição de tamanho estreita e pouca ou nenhuma agregação, o que pode ser determinado a partir da análise das micrografias obtidas na microscopia eletrônica de transmissão (MET).⁵¹

De acordo com o tamanho da nanopartícula, é possível o surgimento de propriedades relacionadas, como o superparamagnetismo, que é fortemente dependente da rota sintética empregada para produzir as partículas. Assim, o controle adequado do tamanho de partícula pode ser efetuado durante a síntese do material magnetopolimérico.⁴⁷

As características citadas acima fazem com que as nanopartículas não se comportem como ímãs permanentes, permitindo o uso em aplicações biomédicas como, por exemplo, os tratamentos por emboloterapia e hipertermia.

Há uma lacuna, em termos de aplicação, entre o tipo de nanopartícula pura e a que será usada em meio biológico.

Um modo de contornar isso é através de estratégias como a funcionalização superficial, o encapsulamento ou a bioconjugação, de modo que estes materiais possam ser usados com sucesso em terapias associadas ao tratamento de diversos tipos de câncer, por exemplo.⁵²

Neste cenário, é comum o uso de agentes de cobertura, normalmente moléculas orgânicas. A ideia fundamental é permitir uma boa compatibilidade com o(s) monômero(s) precursores, uma vez que a cobertura reduz interações entre partículas, o que evita a aglomeração de nanopartículas.⁵³

A combinação de propriedades como o tamanho da partícula e o superparamagnetismo são requisitos para o uso deste tipo de compósitos em aplicações biomédicas como a embolização vascular, por exemplo, que se caracteriza pela introdução de materiais particulados, através de um cateter, de

para efetuar uma obstrução mecânica dos vasos sanguíneos, interrompendo o desenvolvimento de tumores em determinadas partes do organismo.²⁵

1.1. Objetivo da Tese

O desafio desta tese é a síntese de materiais poliméricos com propriedades magnéticas, usando o processo de polimerização radicalar para associar nanopartículas de magnetita e pivalato de vinila, em emulsão, visando seu uso em procedimentos médicos como o de hipertermia, por exemplo.

O objetivo fundamental deste projeto de pesquisa é desenvolver novos materiais poliméricos, com propriedades superiores, consistindo de nanopartículas esféricas de poli(pivalato de vinila) obtidas *in situ* por reação de poliadição do pivalato de vinila, na presença de nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe_3O_4) que são funcionalizadas com ácidos acrílico e metacrílico e encapsuladas individualmente ao final do processo.

1.2. Objetivos Específicos

Para o alcance do objetivo proposto, as principais metas desta tese de doutorado são:

- Sintetizar nanopartículas magnéticas através do método de coprecipitação, visando sua utilização como carga nanoestruturada em nanocompósitos;
- Funcionalizar superficialmente as nanopartículas obtidas usando ácidos acrílico e metacrílico;
- Caracterizar as nanopartículas magnéticas, puras ou funcionalizadas, bem como os nanocompósitos sintetizados, através de técnicas espectroscópicas, análises térmicas, microscopias, medidas de magnetização e difração de raios X;

- Avaliação das propriedades finais dos materiais poliméricos convencionais produzidos a partir de reações via radicais livres do pivalato de vinila em processos de polimerização em emulsão;
- Avaliar as propriedades finais dos nanocompósitos produzidos *in situ* a partir da inserção de nanopartículas magnéticas à matriz polimérica de poli(pivalato de vinila) em processos de polimerização em emulsão;
- Realizar testes de citotoxicidade das nanopartículas de poli(pivalato de vinila) e de compósitos selecionados, obtidas por polimerização em emulsão, em células de fibroblastos, queratinócitos e melanoma humano.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Objetivo

Este capítulo tem como objetivo principal reunir um conjunto de informações gerais sobre materiais nanoestruturados e suas aplicações.

2.2. Introdução

Parte da revisão bibliográfica apresentada nesta tese foi publicada no seguinte artigo:

Robson T. Araujo, Maria S. B. Neta, José A. H. Coaquira, Sacha B. Chaves, Fabricio Machado. *A New Design for Magnetic Poly(vinyl pivalate) for Biomedical Applications: Synthesis, Characterization, and Evaluation of Cytotoxicity in Fibroblasts, Keratinocytes, and Human Melanoma Cells.* **Colloids and Interfaces** 2022: 6(7). <https://doi.org/10.3390/colloids6010007>

Atualmente muito se fala em nanotecnologia, nanocompostos, nanomundo, etc. Quando se trata de nanopartículas, estamos indicando algo que apresenta um tamanho convencionalizado entre 1 e 100 nm em pelo menos uma de suas dimensões.⁵⁴

Há diversas definições que trazem como limite para ser classificado como nanopartícula o valor de 50 nm, valor em torno do qual as propriedades físicas e químicas sejam afetadas.⁵⁵ Uma definição usada pela comunidade europeia, no esforço de delimitar o que é nanopartícula é a seguinte:

“Nanomaterial” é um material natural, incidental ou fabricado, contendo particular, em um estado desagregado ou como agregado ou como aglomerado onde 50% ou mais das partículas em uma distribuição numérica de tamanho apresente uma ou mais dimensões externas na faixa de 1 a 100 nm. Em casos específicos e onde haja garantias de preocupação ambiental, de saúde, segurança ou competitividade, o limite da distribuição numérica de tamanho de 50% pode ser substituído por um limite entre 1% e 50%. Por derrogação [...], fulerenos, grafenos e nanotubos de carbono com uma ou mais dimensões externas abaixo de 1 nm devem ser consideradas nanomateriais. ”

Fonte: Babick et al.⁵⁶

A nanotecnologia tornou-se ao longo dos anos um campo de pesquisa importante que atrai a atenção de pesquisadores de todo o mundo. Com isto, tornou-se importante classificar os materiais de acordo com as suas dimensões.

Deste modo, podemos ter materiais sendo classificados em diversos tipos quanto à dimensionalidade ou quanto a origem das partículas.^{57,58}

Temos materiais zero dimensionais (0D), onde as três dimensões estão na mesma ordem de grandeza, abaixo de 100 nm.

Um segundo tipo de materiais são os unidimensionais (1D), onde duas das dimensões estão na mesma ordem de grandes, o que gera uma estrutura alongada como nanofibras, por exemplo.

Estruturas bidimensionais (2D) possuem apenas uma das dimensões na ordem de grandeza nanométrica, o que confere um formato de folha aos materiais.

Materiais tridimensionais (3D) não possuem as 3 dimensões na mesma ordem de grandeza e são encontrados no formato de pós ou dispersões de nanopartículas.

Em relação à origem, podemos ter materiais de origem natural, produzidos por atividades antropogênicas ou de origem biológica, estando presentes no meio ambiente. Os materiais sintéticos são produzidos por métodos físicos, químicos, biológicos.⁵⁹

2.3. Propriedades físicas e químicas dos materiais

Algumas propriedades de partículas dependem da composição do agregado (*“bulk”*) para gerar propriedades físicas específicas (magnéticas, ópticas, elétricas). Em geral é necessário que a partícula tenha propriedades químicas superficiais específicas, de modo que seja possível ancorar grupos nela.

Em relação à escala, partículas tem propriedades intrínsecas que dependem do tamanho. Exemplos são a elevada área superficial relativa (A_{sp}), que corresponde à área superficial da partícula que é acessível a reagentes, e o surgimento de efeitos quânticos. Tais fatores podem modificar e/ou melhorar as propriedades como reatividade, força e propriedades elétricas.

À medida que o tamanho da partícula é reduzido, há mais átomos expostos na superfície em relação aos que estão no interior. Assim, nanopartículas têm uma quantidade relativa de área muito superior de área por unidade de massa em relação às partículas maiores.

Deste modo, mais sítios reativos podem ser acessados. É possível, ainda, alcançar áreas altamente específicas enquanto as reações são mantidas heterogeneamente, onde os produtos são extraídos das partículas que estão ligadas por métodos físicos, como centrifugação ou separação magnética.⁶

As propriedades magnéticas de um material devem-se aos elétrons nos átomos, devido à presença de momentos magnéticos devidos aos movimentos de spin. Assim, deve-se levar em conta o tipo de momento magnético que surge a partir do tipo de interação que ocorre entre os dipolos.

No caso de nanopartículas de óxidos de ferro, o magnetismo depende do tamanho de partícula, da forma e da composição. À medida que ocorre redução de tamanho, o ferrimagnetismo dá lugar ao superparamagnetismo.⁶⁰⁻⁶¹

2.4. Classificação dos materiais magnéticos

Uma das características dos materiais magnéticos é a presença de dipolos que se formam a partir do alinhamento dos spins nos elétrons – paralelos ou antiparalelos - e que geram respostas magnéticas diferentes.

Deste modo, os materiais magnéticos podem ser classificados de acordo com a susceptibilidade magnética (χ), propriedade relacionada ao alinhamento dos domínios magnéticos dos materiais, como mostrado na tabela 1.

As partículas podem apresentar características de monodomínios magnéticos (partículas menores) ou multidomínios (partículas maiores), diretamente relacionadas ao tamanho limite de partículas (diâmetro crítico – D_{crit}).⁶² Entende-se por domínio, qualquer região onde se observa um ordenamento de spins.

Tabela 1. Representação gráfica do comportamento dos momentos magnéticos de diferentes materiais.

↓↑↓↑↓↑↓↑↓↑ ↓↑↓↑↓↑↓↑↓↑	←↑→↓ ←↑→↓	↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓ ↓↓↓↓↓↓↓↓↓↓
<i>Diamagnéticos</i> ($\chi < 0$)	<i>Paramagnéticos</i> ($\chi > 0$)	<i>Ferromagnéticos</i> ($\chi \gg 1$)

Fonte: Cotton⁶³, Huweey⁶⁴.

2.5. Propriedades magnéticas de nanopartículas

O superparamagnetismo pode ser definido como a propriedade que surge em nanopartículas que apresentam magnetização apenas na presença de um campo magnético externo. Quando retirado o campo magnético externo, a partícula não permanece magnetizada.⁶⁵

No caso de ferritas magnéticas, como a magnetita, que é superparamagnética em temperatura ambiente, essa vantagem de não se manter magnetizada após cessar a ação do campo magnético externo a torna interessante para aplicações biomédicas.

Por convenção, usa-se o termo ferrita para compostos ferrimagnéticos cerâmicos, derivados de óxidos de ferro, que contenham ferro (III). Em geral são frágeis, duros e não são bons condutores de eletricidade.⁶⁶

A determinação de algumas propriedades magnéticas de nanopartículas puras e nanocompósitos, como o superparamagnetismo, pode ser feita por técnicas de caracterização tais como *field cooling* (FC) e *zero field cooling* (ZFC).

Ambas as técnicas avaliam o comportamento dos materiais em função de temperatura e de campos magnéticos externos, pequenos e constantes, bem como efeitos de irreversibilidades na magnetização.

São analisadas transições magnéticas induzidas pela temperatura e, a partir disso, são obtidas informações a respeito das barreiras de energia e temperatura média de bloqueio (T_B) do material.⁶⁷

Como há uma relação entre o aumento de temperatura e o aumento da magnetização, à medida que a temperatura se eleva, a magnetização também sofre um incremento e, com isso, um alinhamento dos momentos das partículas

com o campo magnético até que atinjam um valor máximo, denominado temperatura de bloqueio (T_B).

A temperatura de bloqueio pode ser definida como a temperatura onde os tempos de relaxamento superparamagnéticos se igualam à escala temporal da técnica utilizada, podendo variar de nanosegundos, como no Mössbauer, a picosegundos, como no espalhamento de nêutrons.⁶⁸

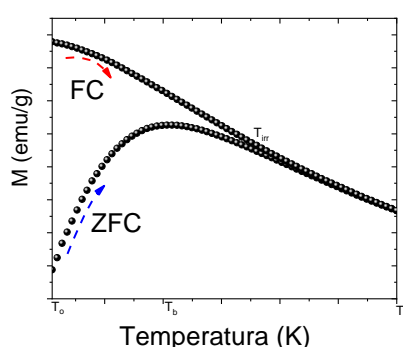
Na magnetização do tipo ZFC, que explora o efeito de blindagem, é medida o momento magnético em função da temperatura em um campo de baixa intensidade, após a amostra ser resfriada em campo nulo. Nesta caracterização parte-se de uma temperatura acima da temperatura crítica.

Deste modo o ponto máximo na curva ZFC corresponde à temperatura (T_p) relacionada à temperatura de bloqueio (T_B).

No caso das curvas de magnetização do tipo FC, explora-se o efeito Meissner e a obtenção da curva é feita de modo semelhante ao ZFC, mas a temperatura do sistema é reduzida a um valor inferior à temperatura de bloqueio (T_B) partindo da temperatura ambiente e com a aplicação de um campo magnético externo e pequeno. Observa-se um incremento da magnetização do sistema com a redução da temperatura.

A figura 1 traz uma representação de uma curva do tipo FC-ZFC para um sistema de nanopartículas magnéticas.

Figura 1 - Representação de uma curva FC-ZFC de um sistema de nanopartículas de magnetita.



Fonte: autoria própria.

Em uma curva do tipo ZFC, quando a temperatura é igual a T_0 , as nanopartículas estão em um estado onde os momentos magnéticos estão bloqueados e dispostos de modo aleatório, o que indica que a magnetização está próxima de zero, uma vez que o sistema se encontra em uma temperatura inferior à temperatura de bloqueio e sem presença de campo magnético externo.

Se houver um incremento no valor da temperatura acima de T_b em direção à T_a , observa-se uma redução no valor da magnetização até zero, pois todas as partículas estão em estado superparamagnético no ponto T_a .

Quando o valor da temperatura é inferior à T_B , a magnetização não se torna nula, uma vez que os momentos magnéticos estão bloqueados e alinhados com o campo magnético externo.

Há um ponto onde as duas curvas se separam, este ponto é denominado temperatura de irreversibilidade (T_{irr}). Nesta temperatura, há a separação de uma fase que é magneticamente irreversível, que se encontra em uma região de baixa temperatura, de outra fase de alta temperatura na qual o comportamento magnético é reversível.

Podemos observar, também, que em sistemas ditos ideais, as partículas são todas iguais, com mesmo tamanho, o que gera uma curva de ZFC com largura estreita no ponto T_B , o que não é observado em sistemas reais onde há tamanhos diversos de partículas e, conseqüentemente, um alargamento na largura do pico.

2.6. Polímeros e processos de polimerização

Polímeros são formados por macromoléculas de elevada massa molar, formadas pela repetição de unidades estruturais menores (“meros”), cujo tamanho de cadeia pode facilmente alcançar centenas ou milhares de unidades métricas, dependendo do tipo de sistema de polimerização empregado.⁶⁹⁻⁷⁰

Para cada tipo de reação química podemos determinar o tipo de materiais de partida a partir do(s) produto(s) formados sob determinadas condições, a partir dos grupos funcionais presentes. Assim, temos grupos mono, bi, tri ou polifuncionais, quando há um, dois, três ou mais pontos de ligação entre as moléculas, respectivamente.⁷¹

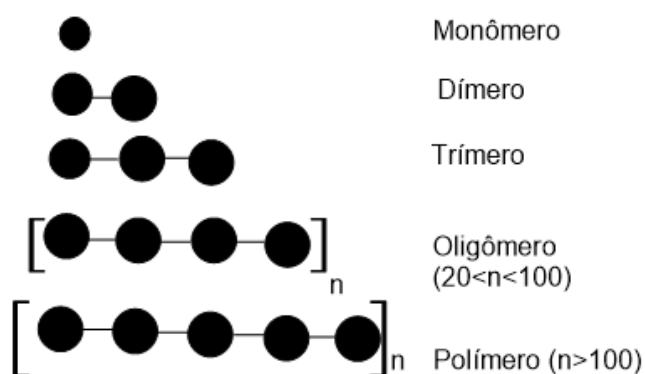
Moléculas que reagem para formar macromoléculas e tem uma funcionalidade mínima de dois em relação à polimerização, são denominadas monômeros. Assim são formadas macromoléculas lineares resultantes de reações entre duas moléculas bifuncionais. Variando a funcionalidade das moléculas, podem ser obtidas polímeros ramificados ou com ligações cruzadas.⁷²

Quando temos materiais de tamanhos medianos em uma série polimérica homóloga como dímeros ou trímeros, por exemplo, estes são chamados de oligômeros, que são materiais com massa molecular intermediária entre materiais de baixo peso molecular e polímeros, geralmente com um grau de polimerização inferior a 100.⁷⁰

Uma vez que não há um limite claro entre a química de polímeros e as outras áreas da química, considera-se que moléculas que possuam uma massa molar acima de 10000 g/mol ou um grau de polimerização de, no mínimo 100, podem ser considerados polímeros. Se esse valor está entre 1000 e 10.000 g/mol, considera-se um oligômero.^{70, 73-74}

A Figura 2 mostra uma representação das diferentes estruturas que se unem na formação de um polímero.

Figura 2 - Representação de diferentes tamanhos de cadeias para a formação de um polímero.



Fonte: Autoria própria.

Assim, podemos dizer que o tamanho de um polímero pode ser definido por massa ou pelo número de unidades métricas na molécula – que é o grau de polimerização. A massa molar relativa é, assim, o produto da massa molar relativa do mero (MM_{mero}) e do grau de polimerização (GP).

$$MM = GP \times MM_{\text{mero}} \quad (1)$$

Materiais macromoleculares que apresentam estruturas semelhantes, com graus de polimerização e massas molares diferentes, são denominados polidispersos. Por conta desta dispersão nas massas molares das cadeias poliméricas individuais em um determinado polímero, a massa molar relativa é calculada em função das médias das massas molares.⁷²

Macromoléculas possuem vários tipos de classificação, podemos ter materiais naturais como o amido, a seda e a borracha natural. Entre de origem sintética podemos ter, por exemplo, o polietileno, o poliestireno e as poliuretanas. No caso de polímeros naturais modificados podemos ter o acetato de celulose, que é um derivado da celulose.⁷⁵

2.7. Síntese de polímeros por reações de polimerização em cadeia

As reações de polimerização podem ocorrer a partir de diversos mecanismos e podem ser catalisadas por diferentes espécies. De acordo com o mecanismo de polimerização, as reações de polimerização são comumente classificadas em: *i*) polimerização em etapas, e *ii*) polimerização em cadeia (crescimento de cadeia por poliadição).

Neste trabalho foram usadas reações de polimerização em cadeia para reações ocorrendo em meio aquoso a fim de formar emulsões magnéticas estáveis. Neste tipo de polimerização, há reação no sítio das duplas ligações, que sofrem quebra para formar ligações simples e, com isso, propagar a cadeia.

Inúmeros polímeros (ou famílias de polímeros) podem ser sintetizados em sistemas de polimerização que diferem entre si quanto à homogeneidade, genericamente classificados em sistemas homogêneos e heterogêneos, dependendo fundamentalmente da solubilidade do(s) monômero(s) e/ou cadeias poliméricas no meio reacional.

Os processos de polimerização, em fase homogênea ou heterogênea, são dotados de características que lhe são peculiares, permitindo, desta forma, a

obtenção de materiais poliméricos dos mais variados tipos e propriedades (tamanho médio de cadeia, morfologia de partícula, composição química, etc.).

Neste cenário, destacam-se os processos de polimerização em fase homogênea: massa e solução; e processos em fase heterogênea: suspensão, emulsão, miniemulsão, microemulsão, dispersão, massa-suspensão, suspensão-emulsão, micro suspensão, entre outros.⁷⁶

2.8. Polimerização em emulsão

Emulsões são dispersões de um líquido (disperso) em outro (dispersante, fase contínua) que geralmente são imiscíveis e cuja estabilização se dá pelo uso de surfactantes.⁷⁷

No processo de emulsão clássico, ocorre a dispersão de um monômero hidrofóbico ou pouco solúvel em água e a reação acontece neste meio, o que influencia decisivamente na formação das partículas e das cadeias poliméricas, afetando sobremaneira tanto a morfologia quanto o peso molecular dos polímeros.

Por conta dos efeitos de polaridade do surfactante, ocorre uma ação efetiva sobre a estabilidade das partículas poliméricas e gotas de monômero que se comportam como reservatórios de fase reativa destinada a formação e ao crescimento das cadeias poliméricas no meio reacional.^{78,79}

Para que seja formada uma emulsão convencional, devem estar presentes 4 componentes: **i)** água: meio dispersante, **ii)** monômero hidrofóbico, em geral com estrutura vinílica ($\text{CH}_2=\text{CH-R}$), **iii)** iniciador termoquímico radicalar hidrossolúvel, como, por exemplo o KPS ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), ou solúvel em solventes orgânicos e monômeros vinílicos e parcialmente solúvel em água como o AIBN ($\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_4$), **iv)** emulsificante com ação estabilizante e fundamental à formação de micelas usadas como o *locus* da polimerização.⁸⁰

O monômero usado na polimerização em emulsão deve ser polimerizável por ação de radicais livres, uma vez que este é um dos mais importantes métodos para ocorrência de polimerização de compostos insaturados. Monômeros vinílicos como o ácido acrílico, butadieno estireno, acrilonitrila, bem

como seus derivados como acetato de vinila e cloreto de vinila são bastante utilizados.

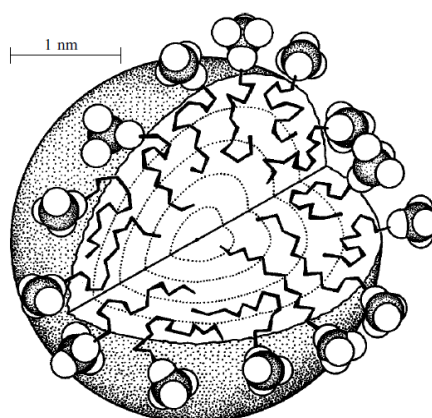
O emulsificante tem um papel importante nas polimerizações pois à medida que sua concentração se eleva, propriedades do sistema como tensão superficial, viscosidade, condutância elétrica e pressão osmótica sofrem alterações.

A uma determinada concentração, as propriedades se modificam rapidamente e este ponto é chamada de concentração micelar crítica (CMC), e é característico para cada tipo de emulsificante.

Abaixo do CMC, o emulsificante se apresenta sob a forma de moléculas individuais dissolvidas, mas acima do CMC, há formação de agregados moleculares organizados, denominados micelas, onde o resíduo hidrofóbico está direcionado para o interior e o hidrofílico para o exterior da estrutura.

Neste caso, a tensão superficial se reduz uma vez que os monômeros hidrofóbicos estão na vizinhança da micela e a reação continua até todas as gotas do monômero acabarem e a micela com os monômeros aumentar de tamanho. As micelas normalmente tem entre 2–10 nm , com cada uma contendo 50–150 moléculas de surfactante.⁶⁹ A Figura 3 ilustra uma micela com geometria esférica.

Figura 3 - Representação esquemática de uma micela esférica.



Fonte: Holmberg *et al*⁶¹.

O surfactante (ou emulsificante) é necessário para dar estabilidade coloidal, reduzindo a energia interfacial, e evitar que ocorra a coagulação das partículas nucleadas na etapa 1 da polimerização.

Em relação aos tipos de emulsificantes, podemos ter 3 tipos diferentes *i)* os iônicos, que apresentam uma terminação de carga positiva, como o cloreto de dodecilamônio, ou negativa, como o laurilsulfato de sódio; *ii)* os não iônicos, como o poli(álcool vinílico) (PVA), que apresentam terminação neutra e, *iii)* colóides protetivos, que são liofílicos e evitam a coagulação de colóides liofóbicos na presença de eletrólitos.⁸²

Uma diferença entre a polimerização em emulsão e os outros tipos de polimerização é quanto à cinética de reação: há uma separação dos radicais livres entre o monômero e as partículas poliméricas durante o processo. Este comportamento único reduz a probabilidade de terminação bimolecular de radicais livre.

As reações radicalares terminam quando dois radicais reagem entre si e formam moléculas do polímero. Assim, ocorre o aumento da massa molar sem redução da velocidade de reação, no caso da polimerização em emulsão. Ambos os parâmetros podem ser variados de modo independente dentro de valores extensos.

O papel dos iniciadores é o de gerar radicais livres por decomposição térmica ou reações redox. Estes compostos entram na micela durante o início da propagação radicalar uma vez que as gotas monoméricas ($\phi > 10 \mu\text{m}$) não são tão eficientes quanto as micelas na captura de radicais livres por conta de sua pequena área superficial.

Estas micelas agem como sítio ativos para iniciadores e monômeros vinílicos hidrofóbicos. Se a polimerização acontece na micela, há um crescimento a partir da adição de gotas de monômero presente no exterior, com a formação do látex.

O processo é heterogêneo e possui mecanismos e cinética diferentes de outros processos de polimerização radicalar. Os produtos da polimerização apresentam partículas hidrofóbicas de tamanhos micrométricos e submicrométricos, dispersas em fase aquosa.

Por conta de sua natureza coloidal, polímeros produzidos através de processos de polimerização em emulsão são amplamente empregados em diversas áreas, destacando-se o uso como tintas, revestimentos, adesivos, borrachas, modificadores de impacto, sistema de liberação de drogas, entre outros.

São materiais de elevado interesse os polímeros a base de acetato de vinila, acrilato de etila, metacrilato de metila, ácido acrílico, butadieno, ácido metacrílico, estireno, cloreto de vinila, acrilato de butila, entre outros.⁸³ A vantagem desta técnica é que separação do látex e da água não é necessária, o que possibilita o uso direto do material sintetizado.

2.8.1. Preparação de polímeros por meio de emulsões

A polimerização em emulsão ocorre em 3 etapas diferentes, que envolvem: **i)** fase de gotas (monomérica), **ii)** fase aquosa (água), **iii)** fase oleosa (de partículas).⁸⁴

A primeira etapa envolve o crescimento de partículas e o processo de nucleação acontece. No final desta etapa, a quantidade de surfactante é mínima e as micelas estão esgotadas. Uma quantidade inferior a 1% das micelas é convertida em partículas de látex.

Durante o processo de nucleação, verifica-se que o processo sofre efeitos da concentração de surfactante presente, uma vez que quanto menor a concentração deste, menor o tempo de nucleação e a distribuição de tamanho do látex.⁸⁵

Na segunda fase do processo de polimerização, a reação continua ocorrendo e as partículas aumentam de tamanho até o término das gotas de monômero, que agem como reservatórios para manter o crescimento das partículas com o fornecimento de monômero e o surfactante.

A terceira fase do processo é a de terminação da reação, o tamanho das partículas poliméricas continua aumentando uma vez que as partículas no látex estão com limitação do monômero, no locus da reação, que continua a reduzir sua concentração até o término da polimerização.⁸⁵

Quadro 1 - Estágios da polimerização em emulsão clássica.

	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3
Características	Gotas de emulsão: 10 µm Micelas monoméricas: 100 Å Partículas monoméricas: 500 Å Fase aquosa contínua	Gotas emulsificadas: 10 µm Partículas monoméricas: 800 Å Fase aquosa contínua	Partículas poliméricas: 1000 Å Fase aquosa contínua

Fonte: Kumar e Gupta⁸⁶ e El-Hoshoudy⁸⁰.

Em termos reacionais o processo assemelha-se a uma reação de adição à dupla ligação iniciada por mecanismo de reação radicalar, o que faz com que a reação seja muito rápida e altamente exotérmica.⁸³

Em termos de cinética reacional, o processo pode ser representado como aparece na Tabela 2.

Tabela 2. Cinética reacional da polimerização em emulsão.

Reação	Explicação
$I \rightarrow 2R^*$, $R^* + M \rightarrow R_1$	Iniciação (decomposição e consumo)
$R_n + M \rightarrow R_{n+1}$	Propagação
$R_n + M \rightarrow P_n + R_1$	Transferência de cadeia para o monômero
$R_n + P_m \rightarrow P_n + R_m$	Transferência de cadeia para o polímero
$R_n + R_m \rightarrow P_{n+m}$	Terminação por combinação
$R_n + R_m \rightarrow P_n + P_m$	Terminação por desproporcionamento

Fonte: Adaptado de Arora *et al.*⁸³ e Chern⁸⁷.

Onde:

I = iniciador

R^* = radical iniciador

M = Monômero

R_m^* = radical livre com **m** unidades monoméricas

Dependendo do tamanho das partículas, as emulsões podem receber outras denominações, como mostrado no Quadro 4, que mostra algumas das diferenças entre os diversos tipos de emulsão e suas características.

Quadro 2 - Comparação das propriedades dos diferentes tipos de emulsão possíveis a partir de óleo, água e emulsificante.

Tipo de emulsão	Raio aproximado	Estabilidade	Razão superfície/massa ($m^2 \cdot g^{-1}$)	Aparência
Emulsão	100 nm - 100 μ m	Metaestável	0,07 - 70	Turva/opaca
Nanoemulsão	10 - 100 nm	Metaestável	70 - 330	Límpida/turva
Microemulsão	2 - 50 nm	Estáveis	130 - 1300	Límpidas

Fontes: McClements *et al.*⁸⁸, Tadros⁸⁹

A instabilidade termodinâmica deve-se à elevada energia interfacial (energia livre positiva muito elevada) associada ao contato entre as duas fases. por conta da baixa solubilidade do polímero na água.

Assim, ocorre um processo de coagulação/floculação de modo a reduzir a área interfacial polímero-água e as partículas perdem estabilidade coloidal e floculam.

2.9. O ferro

É o 4º elemento mais abundante da crosta terrestre (6,2% p/p) e, entre os compostos que forma, os mais importantes são os óxidos, como a hematita, magnetita e limonita e os carbonatos, como a siderita.

Possui um papel econômico relevante para a humanidade e é importante do ponto de vista biológico, uma vez que é parte do grupo heme, que compõe a hemoglobina (transporte de oxigênio no sangue), a mioglobina (armazenagem de oxigênio), e os citocromos (transporte de elétrons).

2.9.1. Compostos de ferro

Atualmente são conhecidos 16 tipos diferentes de óxidos e hidróxidos de ferro, incluídos compostos relacionados. São de origem natural ou sintética.

Compostos naturais são oxidados lentamente em atmosfera normal, de modo que não é necessária proteção adicional. No caso de compostos sintéticos, a oxidação ocorre na etapa de síntese ou no armazenamento.⁹⁰

Alguns dos usos históricos, são como pigmentos e bússolas, que auxiliaram os primeiros navegadores a identificarem o polo norte magnético, considerado como o primeiro uso documentado de óxidos magnéticos de ferro.⁹¹

São conhecidos vários métodos de síntese de nanopartículas magnéticas. Neste trabalho a magnetita possui papel importante por conta de suas propriedades catalíticas e magnéticas diferenciadas.

A Figura 4 traz um resumo comparativo das rotas sintéticas mais usadas atualmente na produção de nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro.

Figura 4 - Comparação de rotas sintéticas de óxidos de ferro superparamagnéticos.



Fonte: Adaptado de Ali *et al.*⁹²

O quadro 3 apresenta algumas das características dos métodos sintéticos de nanopartículas.

Quadro 3 - Diferenças entre os métodos sintéticos de nanopartícula de óxidos de ferro.

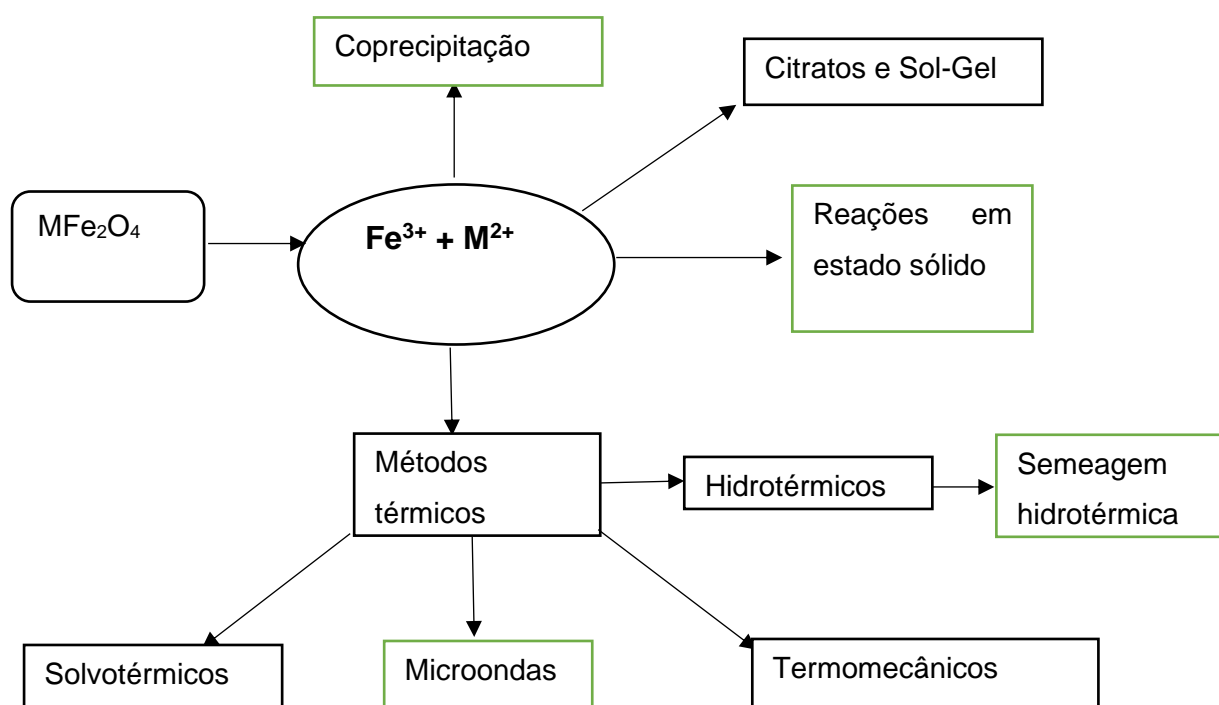
Métodos físicos	Alto custo, demorados, tóxicos, não biocompatíveis, elaborados e sofrem com a falta de controle de tamanho na faixa nanométrica
Métodos químicos	Surfactantes tóxicos, métodos caros, baixa eficiência, não são biocompatíveis nem facilmente escalonáveis. Eficientes onde o tamanho, a composição e mesmo a forma podem ser controladas. Óxidos de ferro podem ser sintetizados por coprecipitação de Fe ²⁺ e Fe ³⁺ por adição de base. O tamanho, forma e composição dependem do tipo de sal usado, da razão entre Fe ²⁺ /Fe ³⁺ , pH, força iônica
Métodos biológicos	Métodos simples e fáceis, Biocompatíveis e síntese verde, hidrofílicidade, podem ser feitos em escala. Disponibilidade de materiais. Biodegradáveis. Elevada eficiência. Atóxicos.

Fonte: Aisida *et al.*,⁹³ e Ali.⁹²

2.10. Rotas sintéticas de preparação de nanopartículas

Atualmente podem ser usados diversos métodos preparativos de nanopartículas, como mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Métodos preparativos de ferritas usando sais de Fe^{3+} e M^{2+} como precursores.



Fonte: Adaptado de Casbeer *et al.*⁹⁴.

2.10.1. Síntese de nanopartículas por coprecipitação

O método é usado para produzir magnetita por conta da facilidade e volume de produto. É o método mais adequado para bioaplicações onde a distribuição de tamanho é controlada em uma faixa estreita.⁹⁵

O aumento de temperatura provoca aumento da velocidade de nucleação e, com isso, o alargamento dos picos e redução do tamanho do cristalito e a temperatura excessiva podem causar endurecimento das partículas.⁹⁶⁻⁹⁷

O método envolve a coprecipitação de íons ferrosos e férricos, de uma solução ácida, que são reduzidos quando colocados em meio básico.^{34-35, 98}

A reação global pode ser descrita por 2 semirreações: *i)* Precipitação de hidróxidos de ferro; *ii)* Formação da ferrita de ferro.



Onde M é um metal que forma cátions divalentes (Fe, Zn, Ni, Co, por exemplo).

A proporção estequiométrica entre Fe^{3+} e Fe^{2+} geralmente usada no processo de produção de magnetita é de 2:1. Quando feita em sistema aberto, com exposição ao ar atmosférico, os íons ferrosos se oxidam a íons férricos, cuja formação é quase independente da concentração dos íons ferrosos, o que faz a oxidação ser praticamente completa.

Como a proporção estequiométrica é difícil de ser mantida, normalmente N_2 é borbulhado na solução a fim de evitar a oxidação da magnetita e ajuda na redução do tamanho da partícula.^{97, 99-100}

Quando a reação é feita em ambientes oxidantes, a proporção inicial é reduzida de modo que após a oxidação a mesma seja alcançada. Proporções de 1,1 a 1,7:1 têm sido usadas.

Um dos problemas desta abordagem é a respeito da caracterização da fase – assume-se que seja magnetita. A dificuldade é devido à similaridade nos padrões de difratometria de raios X da magnetita e maguemita.⁹⁹

Na quimiossíntese da magnetita, a quantidade de O_2 dissolvida, o pH e a temperatura são importantes. O O_2 é extremamente reativo, age em condições ácidas ou básicas, a dissolução varia de 30,8 mL/L H_2O (20°C) a 20,8 mL/L (50 °C), além de oxidar facilmente muitos elementos em temperatura ambiente.

O aumento de pH reduz a tensão interfacial que leva ao aumento da área superficial, e reduz o tamanho da partícula. Sem o uso de surfactantes, não é possível controlar o tamanho e a morfologia das nanopartículas.

Durante a síntese, a nucleação e o crescimento de partículas são afetados por parâmetros como a relação entre Fe^{2+} e Fe^{3+} , a natureza dos sais (sulfatos, cloretos, nitratos), o tipo de base, a concentração da base, a força iônica do meio.

Nanopartículas podem ser usadas em aplicações biomédicas se forem sintetizadas sob condições que atendam regulamentos de nanosseguurança.

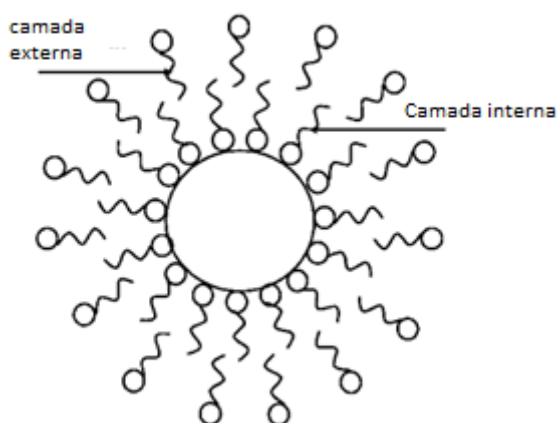
A síntese ideal deve ser: simples, escalável, reprodutível, repetível, sem íons ou moléculas tóxicas, a baixa temperatura/pressão, sem atmosfera especial, sem separação complexa de muitos passos, sem solventes orgânicos ou troca de solventes, sem agentes porogênicos.¹⁰¹

Nanopartículas magnéticas tendem a sofrer agregação por conta da atração magnética dipolo-dipolo fortes, interparticulares, juntamente com forças de Van Der Waals e alta energias superficiais que precisam ser estabilizadas no líquido para evitar aglomeração.¹⁰²

Uma vez que o agente dispersante é adsorvido na superfície das partículas, o número de sítios acessíveis para crescimento de cristal é reduzido afim de se manter o tamanho de partícula pequeno.⁹⁹

A Figura 6 mostra a representação de uma partícula magnética recoberta com surfactante.

Figura 6 - Representação esquemática de uma partícula magnética coberta com surfactante.



Fonte: Adaptado de Agrawal *et al.*⁹⁹.

2.11. Aplicações de nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄)

2.11.1. Aplicações biomédicas

A aplicação de nanopartículas magnéticas (NPMs) tem aumentado nas últimas décadas podem ser aplicadas nos mais diferentes campos, entre eles a biotecnologia e a biomedicina. Essas aplicações podem ser organizadas em 2 tipos: *i) in vitro*, *ii) in vivo*.

Entre as aplicações *in vitro*, podemos destacar o uso principalmente como agentes de diagnóstico e separação de biomoléculas devido as propriedades capazes de solubilizar moléculas polares ou apolares por conta da configuração das fases aquosa e oleosa do sistema.¹⁰³

No caso das aplicações *in vivo*, destacam-se os usos terapêuticos, como a hipertermia e o DDS (*drug delivery system*), e as aplicações diagnósticas, como a ressonância por imagem (MRI).

A aplicação de fármacos ao longo de tratamentos médicos tem alguns inconvenientes devido a solubilidade dos materiais no organismo, danos colaterais a tecidos e órgãos sadios, perda rápida de atividade dos compostos, problemas farmacocinéticos com o fármaco, como a absorção, distribuição, metabolismo e excreção e a falta de seletividade dos compostos, entre outros.

Nanopartículas funcionalizadas podem enganar o sistema imune usando coberturas de moléculas hidrofílicas, não iônicas e biocompatíveis, o que reduz a citotoxicidade, aumenta a estabilidade coloidal, aumenta o tempo de circulação no organismo e a acumulação no local do tumor.

No caso do organismo humano, em algumas terapias as partículas devem ser transportadas até o local e lá são ativadas por campos externos, neste caso, há o problema de tamanho da partícula *versus* magnetização, uma vez que moléculas maiores tem maiores valores de magnetização, porém têm mais dificuldade de transporte ao longo do percurso e tendem a se aglomerar.

2.11.2. *Aplicações tecnológicas*

No caso das aplicações ambientais, NPMs podem ser usadas como materiais absorventes de cátions metálicos no meio ambiente. Devido às propriedades absorventes e magnéticas, nanopartículas de Fe_3O_4 mostram-se materiais com boa capacidade de adsorção de cátions metálicos e, por isso, podem ser usadas em remediação ambiental e na captura de metais pesados do ambiente por adsorção na forma gasosa ou em solução.^{104,105,106}

Uma outra aplicação de nanopartículas é como catalisadores, uma vez que podem ser recobertas e dispersas em solventes orgânicos. A vantagem de seu uso vem de suas propriedades como a elevada área superficial e a facilidade de remoção ao final da reação, o que reduz custos.

Podem ser usados em sínteses assimétricas enantioseletivas,¹⁶ catalisadores de H_2O_2 por reação de Fenton,^{18,17} produção de estireno por desidrogenação de etilbenzeno, processo de Fischer-Tropsch.^{20,19}

2.11.3. *Emboloterapia*

O termo significa a oclusão intencional de um vaso por entrada de material estranho com intenção de reduzir o calibre do vaso e reduzir ou interromper o fluxo através do mesmo.²¹

A técnica é conhecida há décadas e ressurgiu na década de 1970 como um tratamento durável para lesões vasculares de diversos tipos. Entre suas vantagens estão o acesso seguro e fácil em locais de lesões de difícil acesso. É um tratamento pouco invasivo e usado em situações onde a cirurgia não é aconselhável.²²

Deste modo, o procedimento pode ser usado em terapia anticâncer por causar necroses dos tumores. O efeito é potencializado pelo tratamento conjunto com quimioterápicos (quimioembolização). Outra possibilidade de uso é no controle de hemorragias severas devido a tumores que possam afetar o funcionamento do organismo.²¹

Alguns biomateriais usados na embolização líquida são usados com a mínima invasividade nos tratamentos por imageamento de lesões vasculares (MRI).

Quando estes materiais chegam ao sítio de atuação, provocam trombozes ou bloqueios na lesão à medida que a cimentação do material ocorre. De modo a evitar efeitos colaterais, devem ser levadas em conta a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e as propriedades biomecânicas dos materiais usados.

Uma vez que o diâmetro de pequenos capilares se situa em torno de 5-8 μm , é interessante que o embolizante tenha partículas de tamanho superior a 10 μm para que o tratamento seja eficiente.²³

Em relação ao tamanho e forma, embolizantes irregulares podem aglomerar-se em veias de maior calibre. Se forem elásticas possuem um alcance maior no interior dos vasos.

A vantagem do uso de líquidos embólicos em relação a outras técnicas usadas (serpentinhas, balões e partículas) reside no fato de formarem géis que encham o espaço totalmente no interior da lesão.

São usados diversos materiais que possuam biocompatibilidade como o poli(álcool vinílico) (PVA), gelatinas esponjosas, microesferas de amido ou colágeno.²³

Contudo, o PVA apresenta efeitos indesejáveis como a agregação e formação de massas irregulares que podem levar ao entupimento dos cateteres utilizados. Por conta deste efeito colateral, há uma limitação na capacidade de penetração do material na lesão.^{23, 24}

Uma vez que nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas sofrem degradação rápida em ambientes oxidantes ou em sistemas biológicos, há uma aglomeração e alteração das propriedades magnéticas.

Devido a esta necessidade, normalmente são recobertas com moléculas hidrofílicas como dextranas, quitosanas e outras²⁵.

Compostos como a magnetita tem sido testados na forma de Fe_3O_4 -EVOH com sucesso no tratamento de máis formações arteriais (AVMs).¹⁰⁷

2.11.4. Hipertermia (HT)

O uso de calor em tratamentos terapêuticos tem sido usado há séculos. As primeiras referências ao uso de tratamentos no tratamento de câncer usando hipertermia datam da década de 1960.

Neste tipo de abordagem, o princípio da técnica é a diferença de comportamento entre células saudáveis e as doentes em relação aos efeitos térmicos.

No tratamento de câncer o uso de calor em células tumorais tem um efeito similar à remoção cirúrgica. Tal procedimento é denominado **termoablação**, que significa o uso de calor em níveis que causam danos irreparáveis às biomoléculas, causando coagulação e induzindo morte celular.

O princípio da técnica é que NPMs podem gerar calor por perda de histerese sob um campo magnético alternado. As NPMs estão fixadas ao redor do tumor e com o campo magnético oscilante o meio é aquecido a determinada temperatura.

A temperatura a ser alcançada depende das propriedades magnéticas do material usado, da força do campo magnético, da frequência de oscilação do campo e da capacidade de resfriamento do fluxo sanguíneo no local do tumor.³

Quando usado em temperaturas moderadas, que não causem morte celular, apenas reduzindo danos colaterais a tecidos normais além da zona de ablação e ainda ter efeitos terapêuticos, o processo é denominado **hipertermia (HT)** e funciona em uma faixa de temperatura de 41°C a 50°C.¹⁴

Células cancerígenas são destruídas em temperaturas acima de 43 °C, enquanto células normais são mais tolerantes ao calor.³

Assim, temos 2 efeitos neste procedimento: **i)** Efeito celular: indução e regulação de apoptose, transdução de sinais e resistência a multimedicações; liberação de proteína *heat-shock*, **ii)** Efeito tissular: mudança de pH e na perfusão e oxigenação do microambiente do tumor.

No caso da hipertermia, as propriedades importantes das NPMs são a atoxicidade, biocompatibilidade, injetabilidade, alto nível de acumulação no local do tumor e absorção adequada de energia do campo.

A escolha de nanopartículas de alta magnetização, juntamente com o campo externo adequado, faz com que sejam necessárias quantidades

pequenas de material para o tratamento, na ordem de miligramas, que podem elevar a temperatura no local causando necrose celular.³

Contudo, há diversas questões sendo estudadas ainda a respeito do uso de nanopartículas tais como: biocompatibilidade e resistência tissular a nanopartículas, facilidade de carreadores nanométricos, entre outros.

A toxicidade, na hipertermia, se dá de modo que a eficácia da conversão térmica ocorra com um máximo de calor gerado para o um mínimo de partículas utilizadas no tratamento, bem como a ausência de efeitos colaterais nas células saudáveis. Muitos dos estudos são concentrados em nanopartículas de ferro, uma vez que são muito usadas como agentes de contraste para MRI.¹⁰⁸⁻¹⁰⁹

2.12. Nanocompósitos poliméricos

Materiais compósitos são produzidos a partir da união de materiais diferentes de modo a produzir novos material com propriedades melhoradas. Quando a escala possui dimensões nanométricas podemos ter diferentes tipos de nanocompósitos como cerâmicos, poliméricos, metálicos, magnéticos, termoresistentes, entre outros.

A base de nosso trabalho são nanocompósitos magnetopoliméricos, uma vez que os mesmos são responsivos a estímulos externos na forma de campos magnéticos, elétricos ou forças mecânicas.

A nanotecnologia, aplicada ao campo dos nanocompósitos poliméricos, leva em consideração o princípio básico do melhoramento das propriedades dos materiais poliméricos, conduzindo à formação de materiais mais eficientes para usos em diferentes segmentos tecnológicos como mostrado no quadro 4.

Quadro 4. Principais áreas de aplicação de nanopartículas magnéticas.

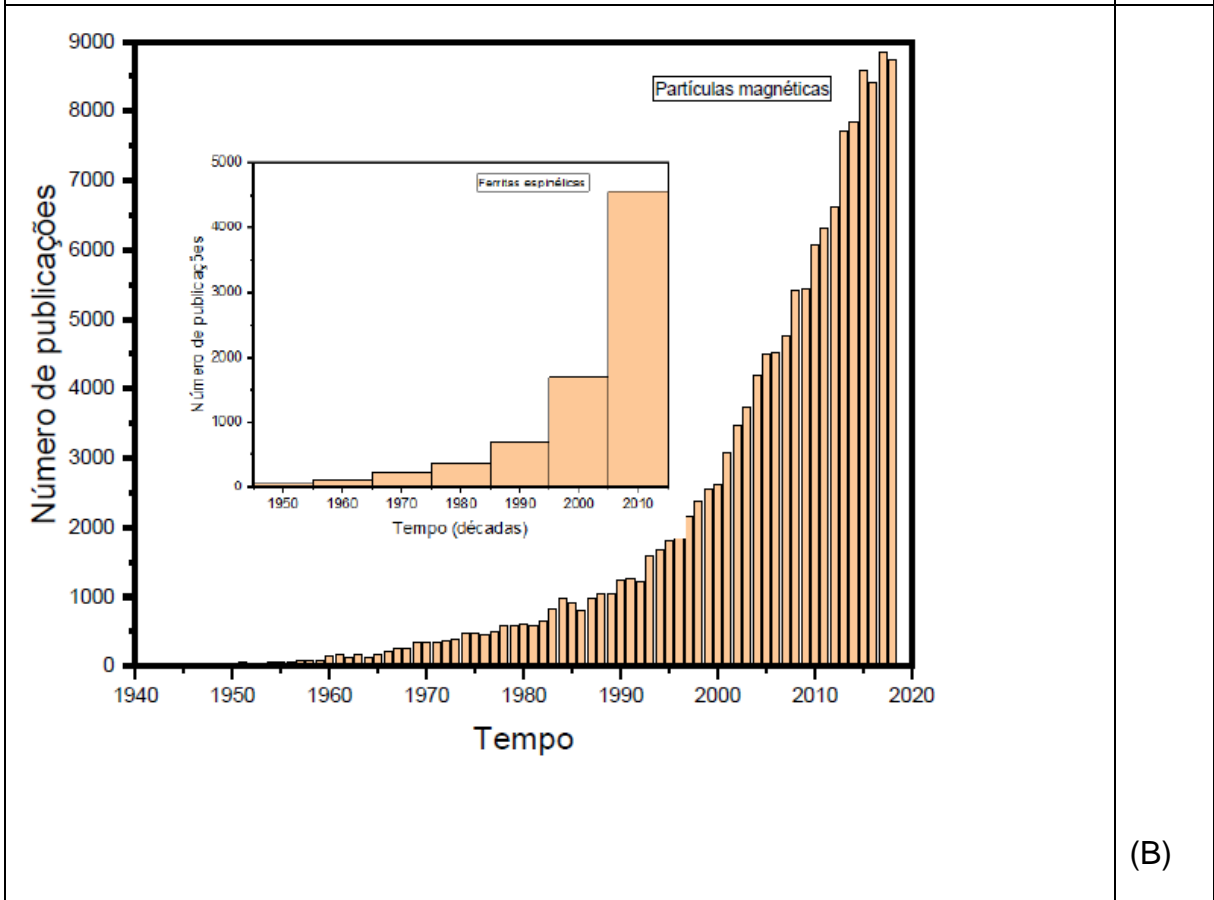
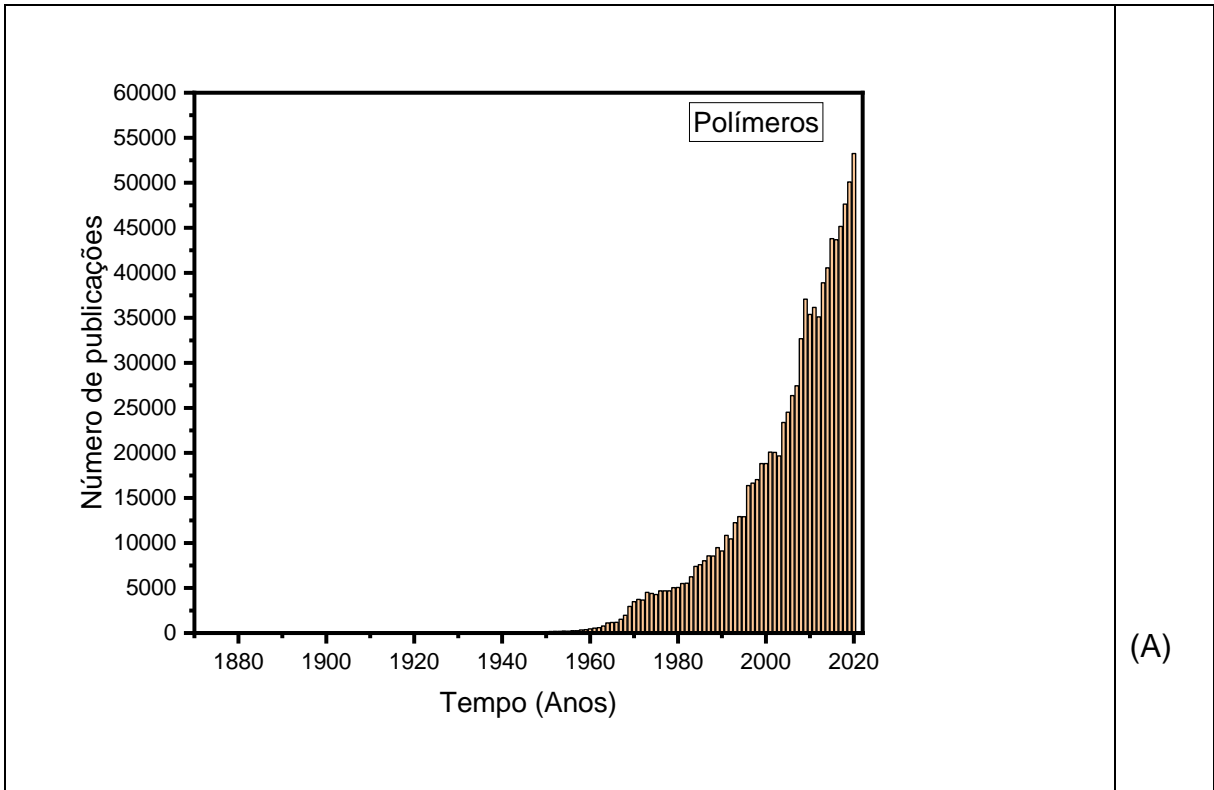
Áreas	Aplicação de nanopartículas magnéticas
Biomédica	Nanopartículas magnéticas recobertas com lipossomos são usadas em sistemas DDS, hipertermia, agentes de contraste, separação magnética, liberação controlada de fármacos, terapias celulares, purificação de células, tratamento de doenças do sistema musculoesquelético, inflamações e dores.
Tratamento de saúde	Alvos terapêuticos em quimioterapia, biosensores, nanocoberturas de superfícies, implantes, nanocarreadores para vacinas, atividades antimicrobianas, nanofototermólises para tratamentos de câncer, hepatite B,

	antivirais contra HIV-1 e herpes tipo 1, antígenos para doenças de fluxo sanguíneo e prevenção contra o envelhecimento da pele.
Agricultura e alimentação	Produtos baseados em nanopartículas (fertilizantes, fungicidas e pesticidas) e nanotubos de carbono para aumentar a produtividade. Melhoria da quantidade de amido, tamanho de folhas e aumento de biomassa. Não há efeitos colaterais no crescimento da planta. Sensores, encapsulamento e coberturas, melhoramento de sementes e membranas nanoporosas.
Remediação ambiental	Prevenção contra poluição (detecção, monitoramento e remediação). Tratamento de águas (barreira permeáveis, filtração por membrana, adsorção). Coberturas catalíticas como Pd. Captura de carbono da atmosfera, carbonatação mineral e biomimética, decomposição de N ₂ O. combustão de CH ₄ . Melhoria em processos de manufatura (eficiência, redução de rejeitos). Redução em quantidade de material usado. Sensoriamento (poluentes, membranas nanoporosas, biosensores e quimiosensores, nanosensores para explosivos). Energia (distribuição de calor por materiais cerâmicos que geram confiabilidade e durabilidade às estruturas).
Energia	Coberturas fotovoltaicas. Melhoria na eficiência de produção e consumo de combustíveis, células e baterias. Nanobioengenharia de enzimas. Materiais termoelétricos e protótipos de painéis solares. Baterias, aerogéis, conversão de calor dissipado em computadores, automóveis, casas e em usinas de força para energia elétrica útil.
Defesa e aeroespacial	Nanocompósitos, nanocoberturas, sensores e eletrônicos. Aditivos para combustíveis e para equipamentos elétricos e materiais inteligentes.
Construção	Nanocoberturas, nanocompósitos, nanosensores, materiais inteligentes, aditivos para concreto. Pigmentos de óxidos de ferro são usados para colorir concreto, tijolos e outros materiais de construção.
Automotiva	Aditivos em catalisadores e lubrificante, nanocoberturas, células de combustíveis, materiais inteligentes, cargas de compósitos.
Têxtil	Sensores, nanofibras, coberturas e materiais inteligentes.
Eletrônica	Eletrônica impressa, nanotubos de carbono, memória em nanoescala, nanofios, sistemas nanoeletromecânicos, spintrônica e quantum dots.

Fonte: Ali *et al.*⁹² e Kudr *et al.*¹¹⁰.

À medida que novas aplicações são desenvolvidas e o conhecimento sobre as nanopartículas magnetopoliméricas aumenta, novas possibilidades de uso destes compostos surgiram nos mais diversos campos, conforme apresentado na Figura 7, que mostram um pouco da evolução da pesquisa sobre partículas magnéticas e ferritas espinélicas.

Figura 7 - Representação do número de artigos sobre (A) polímeros, (B) partículas magnéticas e ferritas espinélicas.



Fonte: Scopus®, data da pesquisa 06/01/2022, palavras-chave usadas: polymers, spinel ferrite, magnetic particles).

2.13. Modificação superficial (funcionalização) de nanopartículas

Nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro não funcionalizadas apresentam superfícies hidrofóbicas e uma razão entre área e volume elevada.

Esta característica pode provocar formação de aglomerados do material, causando aumento do tamanho de partícula e comportamento ferromagnético.¹⁰⁰

Há perda das propriedades superparamagnéticas,³ devido às fortes interações magnéticas interparticulares, bem como forças de Van der Waals e a elevada energia superficial.⁴

A estabilidade coloidal deve-se a um balanço entre as forças repulsivas (força iônica da solução) e isotrópicas atrativas (Van der Waals) como descrito na teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO).

Desta maneira, o uso de compostos orgânicos para apassar a superfície das nanopartículas, durante e após a preparação, auxilia a superar essa dificuldade além de aumentar a possibilidade de aplicações biológicas, biomoléculas são usadas para melhorar a biocompatibilidade.

Uma das vantagens desta abordagem é abertura de possibilidades de aplicação em várias áreas pois a estrutura dos compostos funcionalizados auxilia na preservação das propriedades magnéticas da nanopartícula e das moléculas orgânicas usada na funcionalização.

A funcionalização pode ser feita de 2 modos: **i)** cobertura com materiais orgânicos, como surfactantes, **ii)** cobertura com materiais inorgânicos, como sílica. Em nosso trabalho, a funcionalização das nanopartículas de magnetita é feita usando-se ácidos carboxílicos (acrílico e metacrílico). Dependendo do tipo de NPMs funcionalizadas, podem ser de 3 tipos: **i)** lipossolúvel, **ii)** hidrossolúvel, **iii)** anfifílica.

Quadro 5. Tipos de moléculas utilizadas na funcionalização de nanopartículas magnéticas.

Tipo de molécula usada na funcionalização	Características
Lipossolúvel	Se refere ao tipo de funcionalização da nanopartícula. Geralmente é hidrofóbico, como ácido graxo alquilfenol (n= 6-10, linear ou ramificado).
Hidrossolúvel	A superfície das nanopartículas tem grupos que interagem com meio solvente, em geral são grupos hidrofílicos como sais de amônio, polióis, licina.
Anfifílicos	A superfície funcionalizada contém grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. A cadeia principal dessas moléculas pequenas ou surfactantes mostram regiões estruturais que fazem com que a NP possua solubilidade em água ou óleo, com a licina sulfúrica.

Para aplicações biomédicas, as nanopartículas magnéticas dependem de fatores como a cobertura que possuem e suas propriedades físico-químicas, uma vez que são fatores que influenciam o desempenho biológico.

Além da ação terapêutica desejada, as interações que ocorrem entre nanopartículas e células podem gerar efeitos deletérios.

No caso de compósitos magnéticos, a ajuda trazida pela funcionalização se dá no sentido de disponibilizar mais grupos funcionais superficiais, que ajudam na imobilização de ligantes biológicos e biomoléculas.

Contudo, durante a síntese, pode ocorrer a oxidação da magnetita, provocada pela acidez elevada ou presença de oxidantes fortes, o que provoca a perda ou redução das propriedades magnéticas do material.¹¹¹

Deste modo, materiais que formam coberturas impermeáveis ao oxigênio são úteis, pois as nanopartículas devem ser estáveis e suas coberturas serem inertes em condições biológicas.^{3, 112}

Os principais grupos usados na funcionalização de moléculas são os seguintes:⁶ carboxilatos, aldeídos, aminas aromáticas e alifáticas, hidroxilas, hidrazinas, tiol, epóxido, amida, clorometil e leitos ativados de tosيلاتos.

O uso de polímeros como camadas protetivas entre a partícula e biomoléculas é comum devido ao aumento da estabilidade coloidal, além da redução de interações indesejáveis e a geração de rotas que respondam a estímulos particulares (“materiais inteligentes”).

A combinação de partículas e polímeros pode ser feita de modos diferentes,¹¹³ como apresentado no Quadro 8: i) fisiosorção, ii) copolimerização.

Na fisiosorção, os polímeros são ligados às partículas por interações físicas (eletrostáticas, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio) e são reversíveis.

As estratégias de copolimerização geram uma interação covalente forte com a superfície da partícula,⁶ o que ajuda na estabilidade e controle dos sítios ligantes.¹¹³

Quadro 6. Abordagens para a preparação e modificação superficial de nanopartículas de óxidos de ferro.

Diâmetro (nm)	Abordagens para a preparação e modificação superficial de (IONPs)
1-20	Precipitação de nanopartículas em solução aquosa ou núcleos em microemulsão água-óleo. Ambientes anóxicos e de baixas temperaturas criam nanopartículas com altos valores de magnetização.
20-30(>50)	Precipitação de nanopartículas na presença de polímeros ou surfactantes. As NPs obtidas são monodispersas e levemente solúveis em solução aquosa.
50-100	Cobertura superficial de nanopartículas com surfactantes ou polímeros geram estruturas do tipo casca-núcleo. Ferrofluidos são estáveis <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> e as partículas também podem ser moléculas bioativas.

Fonte: Audonnet,⁶; Aguillar-Arteaga¹¹³.

Biomoléculas podem reagir com estes grupos diretamente ou serem ligados por um agente formador de ligações cruzadas. Os grupos funcionais podem ser ligados diretamente na superfície, em oligômeros ou polímeros, que fazem a função de espaçadores, evitando interações diretas das biomoléculas com a superfície ou aumentando o grau de liberdade.

O Quadro 7 apresenta alguns dos compostos utilizados para funcionalização de nanopartículas magnéticas. Para esse processo, podemos usar diversos tipos de estruturas como polímeros sintéticos, como o poliestireno, biopolímeros como o amido, copolímeros como os derivados de poliestireno, e substâncias inorgânicas como óxidos, cerâmicas.⁶

Quadro 7. Compostos usados para a preparação e modificação superficial de nanopartículas magnéticas (NPMs).

Moléculas/polímeros	Benefícios
Polietilenoglicol (PEG)	Melhora a biocompatibilidade por imobilização não covalente do PEG na superfície. Eficiência na internalização das NPs e no tempo de circulação na corrente sanguínea.
Dextrana e Polivinilpirrolidina (PVP)	Estabiliza a solução coloidal e melhora o tempo de circulação na corrente sanguínea.
Ácidos graxos	Funcionalização terminal por grupos carboxila e estabilidade coloidal.
Álcool polivinílico (PVA)	Evita a coagulação de partículas e originam partículas monodispersas.
Ácido poliacrílico	Melhora a biocompatibilidade das partículas. Ajuda na bioadesão e melhora a estabilidade.
Polipeptídios	Bons para citologia como alvos para células.
Fosforilcolina	Ativante de coagulação e estabilizante de solução coloidal.
Poli(d, l-lactídeo)	Baixa toxicidade e biocompatível.
Poli(N-isopropilacrilamida (poliNIPAAM)	Separação de células e transporte de drogas.
Quitosana	Usado como polímero linear catiônico como sistema de transporte de gene não viral. É biocompatível, usado em medicina e alimentação, aplicado em tratamento de água, polímeros, têxteis, biotecnologia, hidrofílico e usado em agricultura.
Gelatina	Biocompatível, polímero natural, emulsificante hidrofílico e usado como agente gelificante.

Fonte: Ali *et al.*¹¹⁴.

2.14. Modificação de nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ com ácido acrílico e metacrílico

A modificação superficial das nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ representa uma etapa essencial à preparação dos materiais poliméricos magnéticos, via polimerização em emulsão *in situ*, pois garante boa compatibilidade entre as nanopartículas magnéticas e o monômero, pivalato de vinila.

Deste modo, é importante também observar a estabilidade das nanopartículas em solventes polares e apolares com materiais adequados que

não alterem as propriedades magnéticas, que são influenciadas por tamanho de partícula e morfologia.¹¹⁵

Coberturas ideais com polímeros, biomoléculas ou surfactantes podem melhorar a estabilidade e proteger a superfícies da magnetita da oxidação, evitando alteração nas propriedades magnéticas. Aditivos melhoram a estabilidade além de preparar a funcionalização superficial para aplicações específicas.¹¹⁵

No caso de partículas do tipo casca-núcleo (*core-shell*), a vantagem é em relação à biocompatibilidade ou biodegradabilidade. Uma desvantagem é que a cobertura afeta as propriedades magnéticas e isso deve ser levado em conta.¹¹⁵

Como as nanopartículas magnéticas apresentam magnetização elevada e podem sofrer aglomeração, um modo de contornar essa dificuldade é através da estabilização coloidal com ácido acrílico. Contudo, este material não pode ser usado diretamente *in vivo*, uma vez que a acumulação hepática é capaz de provocar uma intoxicação crônica.

Uma maneira de contornar essa dificuldade é realizando a produção de compósitos usando processos de polimerização como a emulsão, o que reduz a toxicidade.¹¹⁵

O ácido acrílico é desprotonado em $\text{pH} > 6$ ($\text{pK}_a = 4,2$), espera-se que se ligue aos cátions de ferro na superfície da magnetita além de permanecer em solução gerando estabilidade eletrostática, o que é uma vantagem das nanopartículas em condições fisiológicas como as requeridas para aplicações biomédicas.

Para a formação das nanopartículas magnéticas micrométricas, a dispersão nanopartículas magnéticas /pivalato de vinila sofre conversão gradual, uma vez que no início da reação as nanopartículas magnéticas estão distribuídas de modo homogêneo nas gotas do monômero que está disperso na fase aquosa.

Contudo, observa-se que os valores de magnetização para partículas funcionalizadas é menor que os das partículas nuas devido a presenças de coberturas como a de ácidos carboxílicos (não magnético) na superfície das partículas.⁹⁹

Os métodos de funcionalização, mostrados no quadro 7, dependem do tipo de material. Por exemplo, coberturas poliméricas podem ser estabilizadas por: **i)** polimerização de monômeros na superfície das nanopartículas; **ii)** formação de ligações cruzadas e, **iii)** formação de camada polimérica por conta das ligações químicas formadas entre grupos funcionais e a superfície da nanopartícula magnética.

Quadro 8. Métodos de funcionalização de partículas.

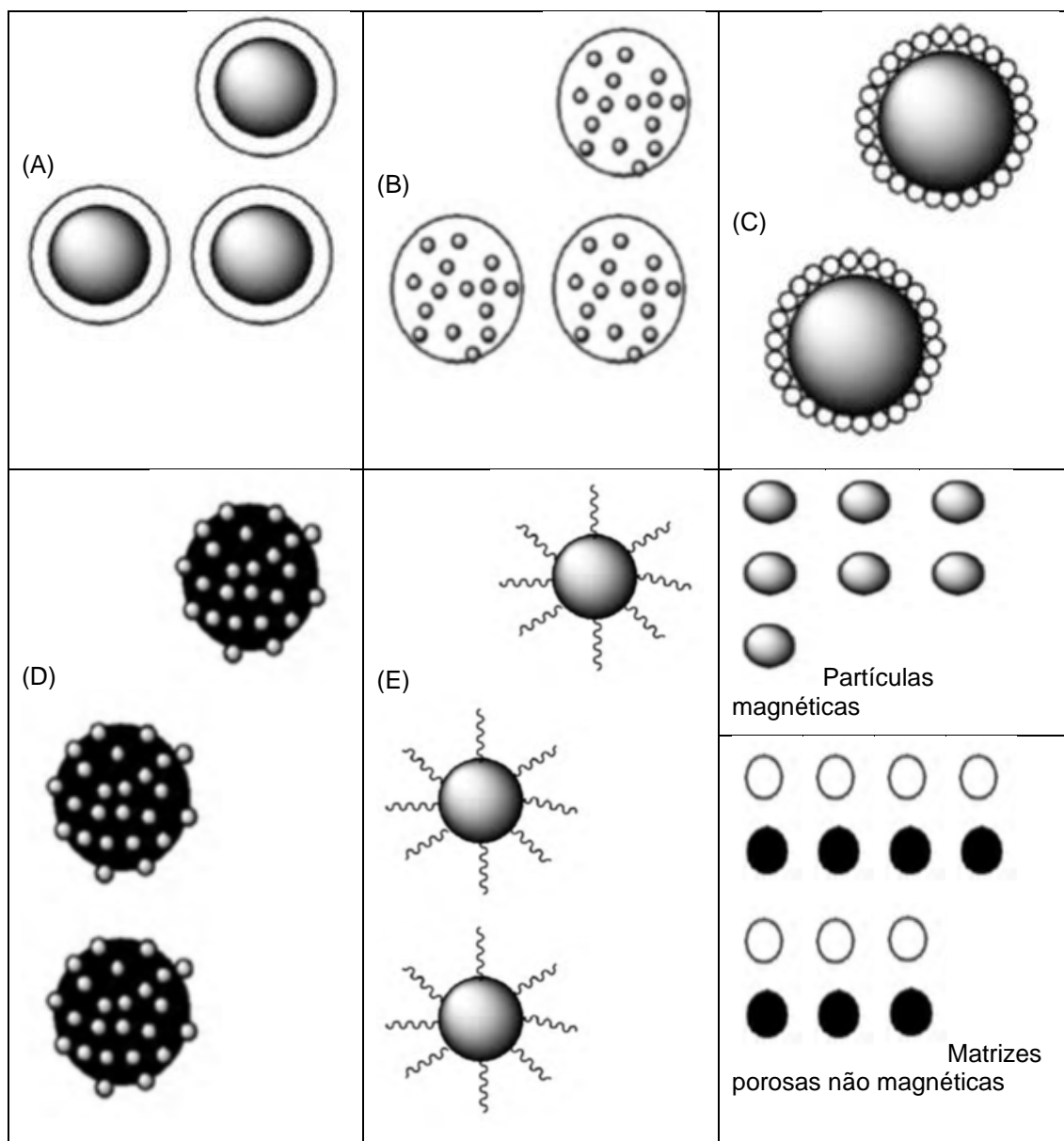
Tipos	Características
In situ	<p>Vantagens do método: Junto com a síntese é feita a funcionalização, que ocorre simultaneamente à nucleação, o que evita o crescimento de partículas. São usados surfactantes ou polímeros. Partículas pequenas e com distribuições de tamanho estreitas podem ser obtidas. Os precursores da nanopartícula magnética e os compostos de funcionalização estão no meio reacional.</p> <p>Limitação do método: incompatibilidade de grupos funcionais com o processo de preparação, uma vez que alguns grupos modificantes podem reagir com a superfície da partícula. Para funcionalização direta, grupos como carboxilatos, fosfonatos e tióis são normalmente usados.</p>
Pós síntese	<p>O procedimento tem 2 etapas: i) síntese de NP, ii) modificação superficial. São usados compostos bifuncionais, onde um grupo quelante reage no início, seguido de um grupo de conversão do sítio de acoplamento ao grupo funcional final.</p> <p>Vantagem: um grande número de agentes acoplantes são disponíveis comercialmente. Estruturas do tipo casca-núcleo garantem forte interação dos grupos funcionais com uma cobertura superficial elevada. Para que haja efetividade, os grupos funcionais devem possuir elevada afinidade com as superfícies das NP e não devem existir na forma de aglomerados isolados.</p>

Fonte: Bohara *et al.*⁴, Ma e Liu³.

Algumas características da funcionalização são necessárias para uma aplicação biológica bem sucedida de nanopartículas magnéticas: **i)** devem fazer com que as nanopartículas não sofram agregação; **ii)** melhoram a estabilidade coloidal; **iii)** aumentam a compatibilidade com a água; **iv)** melhoram a controlabilidade das NPs; **v)** protegem e estabilizam a superfície das NPs; **vi)** melhoram a biocompatibilidade e a atoxicidade; **vii)** devem permitir a ancoragem de grupos funcionais para se ligar a substratos biologicamente ativos.

A morfologia da nanopartícula é controlável de acordo com a rota sintética e gera nanopartículas de diferentes formatos, como mostrado na Figura 8.

Figura 8 - Diferentes morfologias e estruturas de nanopartículas. (a) casca-núcleo, (b) multicasca, (c),(d) partícula sobre partícula, (e) morfologia escovada (*brush hair*).



Fonte: Adaptado de Aguilar-Arteaga *et al.*¹¹³.

Assim, uma cobertura adequada permite a liberação de partículas em determinados locais e, para isso, deve ser considerada atóxica e biocompatível. O tipo de cobertura superficial e a geometria da NP determinam o tamanho do colóide e tem função importante na biodistribuição e biocinética das nanopartículas no corpo.¹⁰⁰

Além disso, a cobertura é específica para o tipo de aplicação e pode ser para respostas inflamatórias ou agentes anticâncer. Assim, drogas, proteínas, enzimas, anticorpos ou nucleotídeos podem se ligar a nanopartículas

magnéticas e podem ser adsorvidas em sítios específicos usando campos magnéticos, ou podem ser aquecidas em campos magnéticos alternados para uso em hipertermia.¹¹⁶

No caso do organismo humano, por exemplo, o sistema retículo endotelial elimina os aglomerados de nanopartícula de óxidos de ferro, uma vez que a alta concentração de íons ferro em um local é tóxica ao organismo em função de sua dissolução do ferro.

Essa situação pode ser contornada por recobrir a superfície da nanopartícula tornando-as hidrofílicas, compatíveis com ambientes biológicos e funcionalizadas.¹⁰⁰

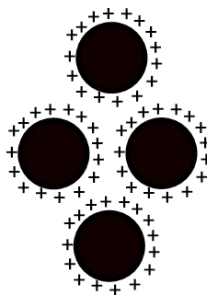
2.15. Estabilização de nanopartículas

A estabilidade de nanopartículas em uma solução tem uma grande importância, uma vez que as aplicações biológicas exigem que o material não sofra aglomeração, o que provoca problemas como bloqueios no sistema circulatório bem como a incapacidade de atingir o alvo destinado em um tratamento médico.

2.15.1. Estabilização estérica

As forças repulsivas devem ser consideradas quando se tratam de nanopartículas magnéticas recobertas. Um fenômeno que controla a interação de partículas coloidais com o meio (solvente e outras partículas) é a eletrostática, uma força que contribui muito fortemente para a estabilidade coloidal das partículas suspensas, como esquematizado na figura 9.

Figura 9 - Representação da repulsão entre 2 nanopartículas carregadas positivamente.



Fonte: autoria própria.

A teoria EDL (*electrical double layer*) prevê a distribuição de íons desta nuvem em função das propriedades intrínsecas da partícula do fluido. Íons com carga oposta à da partícula podem se juntar na superfície da partícula e formar uma camada compacta de íons adsorvidos.

Estas nanopartículas magnéticas, usadas para aplicações biomédicas que requerem estabilidade coloidal sob concentrações salinas elevadas e faixas largas de pH, devem ser estericamente estáveis. Isto pode ser feito por meio de polímeros usados para funcionalização de nanopartículas e é de difícil predição e quantificação.⁴

A cobertura por uma camada de ligante ou como matriz inorgânica ou polimérica incorporada ajuda na estabilização estérica. O potencial repulsivo depende da densidade do polímero, da reversibilidade da ligação e da qualidade do solvente em relação ao polímero. Isto também depende da massa molar do polímero e sua densidade.

Em termos mecanísticos, se 2 núcleos estabilizados estão próximos, as coberturas estão confinadas, reduzindo a entropia dos polímeros e aumentando a pressão osmótica entre as nanopartículas magnéticas, o que gera uma estabilidade coloidal.

A estabilidade de uma partícula em suspensão pode ser modificada pela adsorção de compostos, entre eles, polímeros. Se os compostos forem hidrofóbicos, tendem a excluir a água do volume entre as partículas e promovem

uma redução na energia livre da suspensão por agregação. Se forem hidrofílicos, tendem a permanecer solvatados e aumentarem a estabilidade coloidal.

Quanto mais densa a camada solvatada, maior o alcance das repulsões entre partículas. As propriedades da camada polimérica (espessura, densidade, afinidade com água) são críticas para a estabilidade coloidal.⁶

2.15.2. Estabilização eletrostática

A estabilização eletrostática ocorre devido ao potencial de difusão, relacionado ao potencial zeta e o comprimento de Debye-Hückel, que depende da força iônica e do pH da solução.

A cinética de agregação da suspensão coloidal deve ser feita para testar a estabilidade eletrostática por variações na concentração salina do meio. Isto pode ser feito por meio de medidas turbidimétricas ou de espalhamento de luz.⁴

2.16. Controlabilidade magnética das nanopartículas magnéticas

A magnetização de saturação (M_s) é o parâmetro que descreve a resposta magnética das nanopartículas, que podem ser separadas e carregadas ao local desejado se possuírem magnetização de saturação (M_s) elevado.

A funcionalização possibilita isto, uma vez que a controlabilidade de aglomerados é maior que a de partículas casca-núcleo individuais.⁴

2.17. Biocompatibilização de nanopartículas

A compatibilidade costuma ser definida como “a capacidade de executar uma tarefa adequada como resposta a uma aplicação específica”. Assim, as propriedades e as interações entre materiais e biomoléculas deve ser conhecidas a fim de entender melhor o comportamento de um material *in vivo*.¹¹⁷

Os materiais sintetizados em fase orgânica precisam de temperaturas mais elevadas que os de fase aquosa, o que oferece algumas vantagens. Como nanopartículas funcionalizadas com ligantes apolares são solúveis em solventes apolares, isso é um fator limitante ao uso deste tipo de material em aplicações biomédicas. Este é o motivo a necessidade de a compatibilização ser feita.

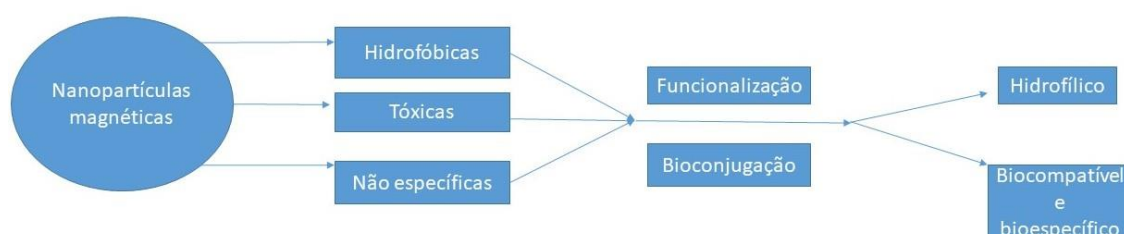
Esta compatibilização significa que a conjugação entre nanopartículas magnéticas não suspensas e ligantes hidrofílicos gera uma solução aquosa coloidal estável. Para ocorrer a compatibilidade, a superfície deve ser funcionalizada pela adição de surfactante ou troca por surfactante.

A adição de surfactante é feita pela adsorção de moléculas anfifílicas que contenham componentes hidrofílicos e hidrofóbicos. A parte hidrofóbica forma uma estrutura de dupla camada com a cadeia de hidrocarboneto original enquanto os grupos hidrofílicos são exposto para fora da nanopartícula, deixando-os solúveis em água.

Deste modo, quando ocorre a troca via surfactante, que é a substituição direta do surfactante original por um novo surfactante, bifuncional e que contenha 2 grupos funcionais, isso faz com que as nanopartículas magnéticas possam ser dispersas em água ou funcionalizadas posteriormente.⁴

A Figura 10 apresenta um conjunto de estratégias que podem ser usadas para tornar nanopartículas biocompatíveis e, assim, possibilitar o uso em terapias biomédicas.

Figura 10 - Estratégias para aplicar nanopartículas magnéticas em áreas biomédicas.



Fonte: adaptado de Bohara *et al.*⁴.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1. Objetivos

Neste capítulo são descritos os procedimentos, métodos analíticos e reagentes usados em cada etapa de obtenção dos nanocompósitos magnéticos produzidos no Laboratório de Desenvolvimento de Processos Químicos (LDPQ) da UnB.

3.2. Reagentes e materiais

3.2.1. *Reagentes e Materiais Utilizados na Síntese e Modificação das Nanopartículas de Fe₃O₄*

Água destilada foi usada como meio reacional. Gás nitrogênio (N₂(g) 99,5%, White Martins Ltda.), usado nas reações para manter a atmosfera inerte, Hidróxido de sódio (NaOH 99%), Cloreto férrico hexahidratado (FeCl₃.6H₂O 97%), Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄.7H₂O 99%), ácido clorídrico (HCl 37%), acetona (99,5 %), Sulfato de alumínio (Al₂(SO₄)₃ 98%), ácido acrílico e ácido metacrílico (ambos 99%, VETEC Química Fina Ltda) . Todos foram usados do modo como foram recebidos.

3.2.2. *Reagentes e Materiais usados na Síntese dos Polímeros*

O pivalato de vinila (estabilizado com 6-15 ppm de monometil éter de hidroquinona (MEHQ) Aldrich, 99%), que é a fase orgânica, usado como monômero nas polimerizações.

A fase contínua usada como meio reacional foi água destilada. A hidroquinona (99%, Merck), adicionada ao final da reação para evitar polimerizações posteriores.

Nas reações de polimerização em emulsão os seguintes reagentes foram utilizados: *i*) como iniciador de reação foi usado o persulfato de potássio (KPS), *ii*) como emulsificante, laurilsulfato de sódio (SLS). Todas as substâncias usadas

não foram purificadas para uso nas reações, tendo sido utilizadas como foram recebidas.

O laurilsulfato de sódio, também conhecido como dodecilsulfato de sódio é um surfactante aniônico, de fórmula $C_{12}H_{25}SO_4Na$ e por ter uma terminação de grupo sulfato, apresenta as propriedades anfipáticas requeridas por um emulsificante.

3.3. Sínteses e modificações realizadas

3.3.1. Síntese de Nanopartículas Magnéticas de Fe_3O_4

Nanopartículas de Fe_3O_4 são obtidas pelo método da coprecipitação, baseado no método descrito por Pu *et al.*¹¹⁸, de modo similar ao descrito por Neto *et al.*¹¹⁹ (Figura 11).

Inicialmente, prepara-se uma solução de ácido clorídrico com volume final de 130 mL de H_2O ($0,45 \text{ mol.L}^{-1}$), a partir da mistura de 5 ml de ácido clorídrico P.A. e 125 mL de água destilada.

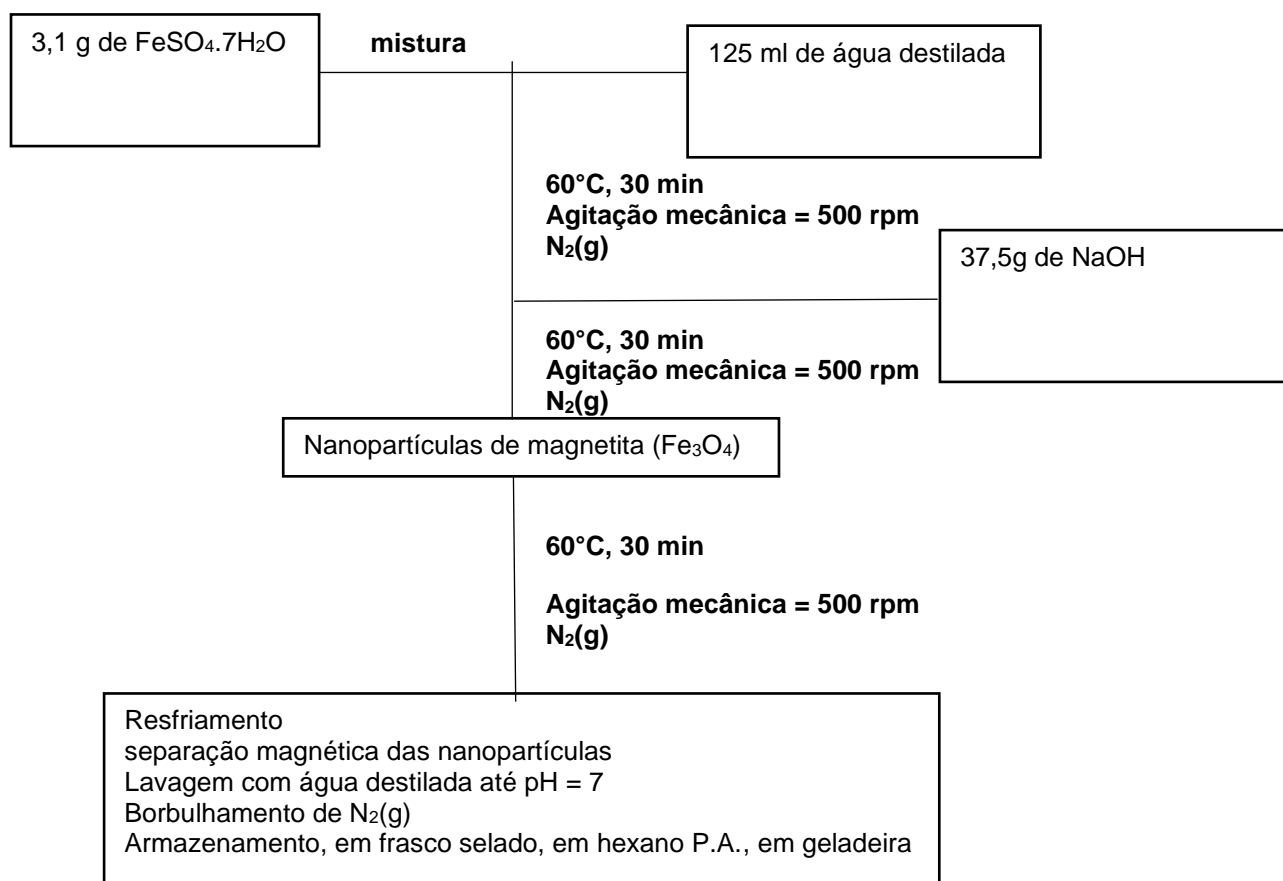
A seguir são adicionados 3,1 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 6,1 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (proporção 1:2 em quantidade de matéria) na solução aquosa de ácido clorídrico e a mistura é aquecida até $60^\circ C$ sob agitação mecânica e em atmosfera de N_2 por 30 minutos.

O passo seguinte é adicionar a mistura de sais de ferro a um béquer contendo uma solução de hidróxido de sódio ($NaOH \text{ } 1,48 \text{ mol.L}^{-1}$), sob atmosfera de N_2 e também à mesma temperatura, uma vez que a presença de oxigênio, mesmo em baixas concentrações, deve ser evitado pois provoca uma mudança na estequiometria dos produtos obtidos.¹²⁰

O sistema é mantido por 30 minutos em $pH = 11$ nas condições reacionais originais, para que a solução atue como agente precipitante. As nanopartículas formadas são lavadas com água destilada, por diversas vezes, com a separação das nanopartículas e água sendo feita por separação magnética usando um ímã até atingir $pH = 7$.

Para finalizar a etapa de obtenção das nanopartículas, o material é armazenado em hexano P.A e estocado em frasco selado, em atmosfera de nitrogênio, em geladeira.

Figura 11 - Diagrama esquemático da síntese de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4).



Fonte: autoria própria.

3.3.2. Modificação superficial das Nanopartículas de Fe_3O_4

O procedimento experimental adotado para modificação da superfície das nanopartículas é similar aquele proposto por Pich *et al.*¹²¹ e Huang *et al.*¹²² (Figura 13).

A partir da produção de uma batelada de magnetita (Fe_3O_4), 5 g de nanopartículas de Fe_3O_4 , que foram armazenadas após a síntese, são dispersas, sob agitação mecânica em 170 mL de água. O sistema é então aquecido, sob agitação mecânica, a 85°C com borbulhamento de N_2 .

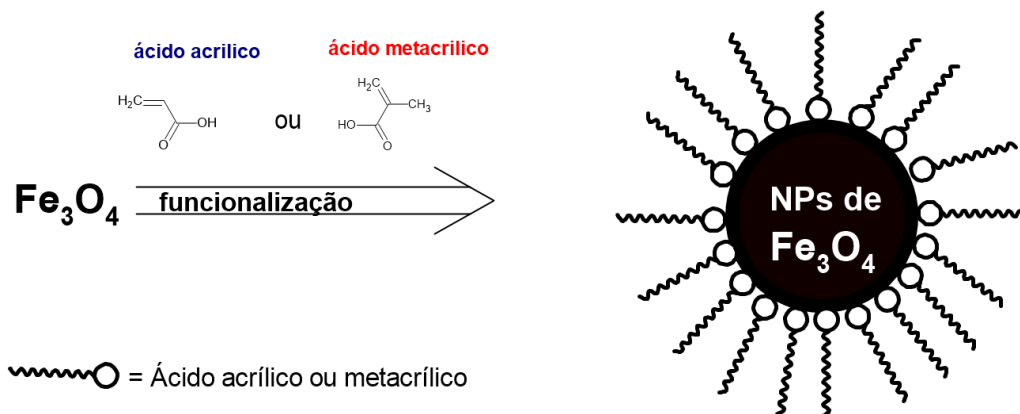
Em seguida, 5,6 mL de ácido acrílico (AA) ou de ácido metacrílico (AM) são adicionados usando-se uma bomba peristáltica Prominent, por gotejamento, a uma taxa máxima de 0,5 mL/min, sob agitação mecânica. Ao final da adição de ácido (AA ou AM), o sistema é deixado em agitação por mais 30 minutos, seguido de resfriamento até a temperatura ambiente.

Um leve excesso de ácido (AA ou AM) é utilizado para inibir a coagulação das nanopartículas de magnetita durante a etapa de funcionalização superficial, e conseqüentemente garantir a dispersão e a modificação apropriada das mesmas.⁴⁷⁻⁴⁹

As nanopartículas com superfícies modificadas por ácido apresentam-se como uma dispersão coloidal estável, cuja separação de fases, após a decantação com um ímã de neodímio, é necessária para recuperação das mesmas.

A figura 12 mostra uma representação da funcionalização de nanopartículas de magnetita.

Figura 12 - Representação esquemática da funcionalização da magnetita por ácido acrílico ou metacrílico.

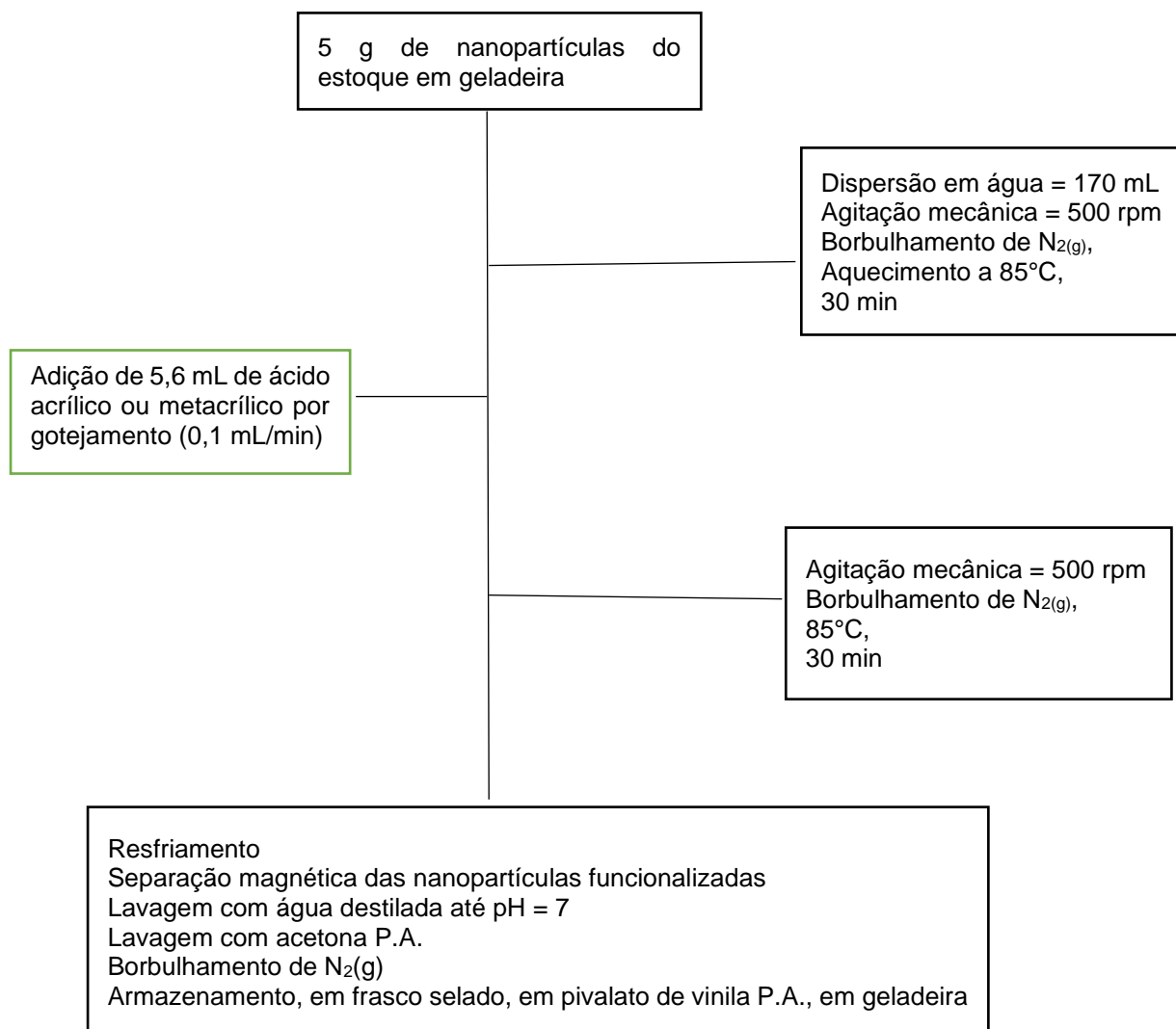


Fonte: autoria própria.

Após segregação de fases, as nanopartículas são lavadas com água destilada até pH = 7. Em seguida o material é lavado três vezes com acetona para remover o excesso de ácido carboxílico usado na funcionalização.

A seguir, as nanopartículas são dispersas em pivalato de vinila, seguido de borbulhamento com nitrogênio e posterior armazenamento em geladeira, como apresentado na figura 13.

Figura 13 - Diagrama esquemático das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) com ácido acrílico ou metacrílico.



Fonte: autoria própria.

3.4. Síntese dos nanocompósitos de Fe_3O_4 /poli(pivalato de vinila)

3.4.1. Reações de Polimerização em Emulsão

As reações de polimerização em emulsão foram conduzidas em um reator de vidro acoplado a um banho térmico de água e condensador.

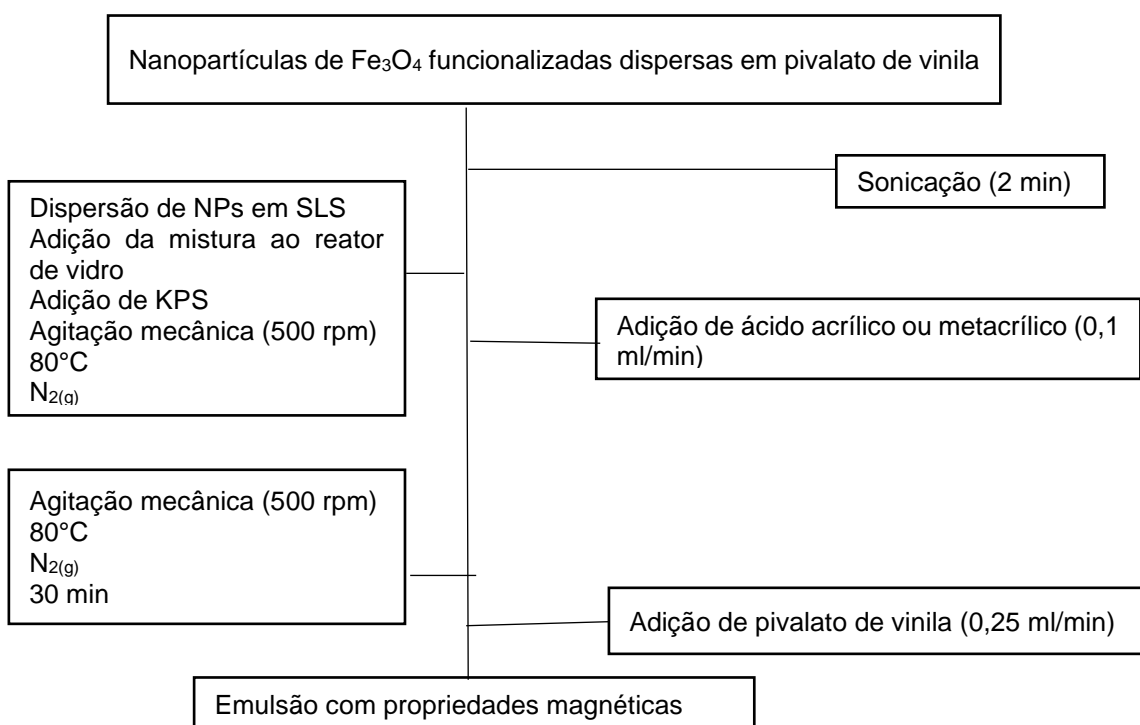
Inicialmente, é preparada uma solução de SLS (laurilsulfato de sódio), de concentração igual a 12 g.L^{-1} e outra de KPS (persulfato de sódio) de concentração igual a $2,5 \text{ g.L}^{-1}$.

As nanopartículas de magnetita modificadas com ácido acrílico ou metacrílico (1 a 4 g, 5 a 20% p/p) são sonicadas por 2 minutos e dispersas na solução de SLS e em seguida é adicionada a solução de KPS ao reator de vidro mantido em atmosfera de N₂, com agitação mecânica (500 rpm) e a temperatura do meio é mantida a 80°C.

Em seguida inicia-se a adição de 2 ml de ácido acrílico ou metacrílico ao sistema reacional em uma taxa de 0,1 ml/min, a fim de proteger as nanopartículas de magnetita da oxidação precoce, provocada por fatores como pH, temperatura e iniciador radicalar.

Ao final da adição do ácido acrílico, o sistema é deixado em agitação por mais 30 minutos antes de se iniciar a adição de pivalato de vinila a uma taxa de 0,25 mL.min⁻¹ usando uma bomba solenóide (Prominent® Gala serie gamma/L PVT 1000, São Paulo, Brasil). A Figura 14 representa o processo de polimerização em emulsão.

Figura 14 - Diagrama esquemático do sistema reacional de polimerização em emulsão das nanopartículas modificadas de magnetita (Fe₃O₄) com ácido acrílico ou metacrílico.



Fonte: autoria propria.

Ao final da adição do monômero o sistema é deixado por mais 30 minutos, para garantir o consumo total do iniciador. Ao final deste tempo, o material é retirado do frasco de reação e são adicionadas gotas de hidroquinona 200 ppm.

A função da hidroquinona, neste sistema, é de inibir polimerizações posteriores indesejáveis, devido suas propriedades redutoras em sistemas aquosos, que permitem se combinar com radicais livres que ainda possam ser gerados no sistema, gerando espécies mais estáveis.

A seguir faz-se uma retirada de alíquota de 10 mL do látex obtido que é mantido em estufa a 60°C por 72 horas para eliminação de eventuais espécies voláteis presentes em sua fase amorfa. Todas as quantidades usadas são mostradas na tabela 3.

Tabela 3. Receita para a síntese *in situ* de nanocompósitos magnéticos de poli(pivalato de vinila).

	Massa (g)	Concentração (g·L ⁻¹)	Volume (mL)
Pivalato de vinila	20	----	23
Fase aquosa	-----	----	45
SDS	0.3	12	25
KPS	0.05	2.5	20
Nanopartículas	1 a 4	-----	-----
Ácido acrílico ou metacrílico	-----	-----	2

3.5. Caracterização dos materiais

Nesta seção são apresentados os principais procedimentos analíticos utilizados para caracterização dos materiais obtidos nas reações de coprecipitação, modificação da superfície das nanopartículas magnéticas e reações de polimerização em emulsão.

3.5.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises foram realizadas em um espectrômetro de infravermelho da marca Varian, modelo FT/IR-4100, em pastilha de KBr, com varredura de espectro na faixa de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹ e média de 64 *scans*.

O objetivo foi o de confirmar se ocorreu a interação entre os ácidos carboxílicos usados na funcionalização das NP de magnetita ocorreu, bem como determinar a interação ocorrida após a polimerização com pivalato de vinila.

3.5.2. *Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)*

É um método analítico que indica as transições térmicas características de um material ou substância. O método pode ser utilizado na caracterização de materiais diversos, como cerâmicas, metais, polímeros, compostos orgânicos e inorgânicos no desenvolvimento de aplicações em diversas áreas como desenvolvimento de materiais, controle de qualidade, análise de fadiga em materiais, desenvolvimento de processos, entre outros.

As transições térmicas dos materiais poliméricos foram avaliadas por meio de calorimetria diferencial de varredura (DSC) com o auxílio de um calorímetro Shimadzu, (modelo TA-60WS, Shimadzu Scientific Instruments, EUA), operado com a taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio com fluxo igual a $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

As análises foram realizadas em cadinhos de alumínio com uma massa de amostra de aproximadamente 5 mg.

3.5.3. *Termogravimetria (TG)*

A estabilidade térmica dos materiais foi avaliada a partir de análises termogravimétricas (TG/DTA) com o auxílio de uma termobalança Shimadzu modelo TA-60WS (Tóquio, Japão), operada a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

As análises foram realizadas em cadinho de platina com uma massa de amostra de aproximadamente 10 mg.

3.5.4. *Difração de Raios X (DRX)*

Para determinação de tamanho e dimensões de cristalito, os materiais foram caracterizados por difração de Raios X utilizando-se um difratômetro Bruker D8 FOCUS (Bruker AXS, Inc., Wisconsin, EUA), com filtro de níquel e

monocromador CBO operando com $\text{CuK}\alpha = 1.54059 \text{ \AA}$ como fonte de radiação, voltagem de 35 kV e amperagem de 15 mA.

A faixa de varredura para os ângulos de Bragg (2θ) foi de $2 \leq 2\theta \leq 80$ com incremento de $0,05^\circ$ e velocidade angular de $1^\circ \cdot \text{min}^{-1}$.

3.5.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia das nanopartículas de Fe_3O_4 e as distribuições de tamanho da magnetita e das partículas de compósitos foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão em um equipamento Jeol, modelo JEM-2100 (Tóquio, Japão), operando com um feixe de elétrons de 200 keV.

Para o caso particular das nanopartículas magnéticas, informações fornecidas pela MET são fundamentais para determinação da distribuição do tamanho de partícula (DTP) e do valor médio do diâmetro das partículas.

A distribuição de tamanho de partículas foi feita a partir da contagem e do processamento com o programa ImageJ (v. 1.53h, <https://imagej.nih.gov/ij/>) e os gráficos foram construídos usando-se o programa Origin (OriginPro 2021 9.8.0.200, Originlab Corp., USA).

3.5.6. Ensaios de citotoxicidade *in vitro*

Para os ensaios *in vitro*, foram utilizadas as linhagens células de fibroblasto e queratinócitos humanos e câncer de pele não melanoma (FIBRO, HaCat e A431, respectivamente).

As linhagens de FIBRO foram doação da Prof. Dr^a Daniela Mara Oliveira do Laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da Universidade de Brasília (UnB) e as linhagens de HaCat e A431 foram obtidas por meio do banco de células do Rio de Janeiro e mantidas em cultura no Laboratório de Nanobiotecnologia da UnB. Manutenção das células e modo de preparação das células para os testes *in vitro*.

Todas as linhagens celulares citadas anteriormente foram cultivadas em meio DMEM (*Eagle Modificado por Dulbecco*). Ambas foram tamponadas com bicarbonato de sódio e suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e antibiótico (100 UI/mL penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomicina) a 1% em $\text{pH} = 7,2$.

As células foram mantidas em frascos de cultura celular em uma incubadora à temperatura de 37°C, em atmosfera de 95% de ar umidificado e CO₂ a 5%. Os experimentos foram realizados com a célula na fase logarítmica de crescimento.

Para a quantificação de células viáveis, 40 µL de solução do corante Azul Trypan foram adicionadas em 10 µL da suspensão celular. Este reagente é um corante capaz de penetrar em uma célula que tenha a membrana plasmática intacta, o que possibilita a distinção das células viáveis pelo princípio de exclusão de Azul Trypan.

Em seguida, 10 µL desta suspensão foram adicionadas em hemocítmetro de Neubauer e a concentração de células foi determinada segundo a contagem dos quadrantes laterais e por meio da equação:

$$\frac{n^{\circ} \text{ de células contadas}}{n^{\circ} \text{ quadrantes contados}} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4 = n^{\circ} \frac{\text{de células}}{\text{mL}} \quad (3)$$

Para a execução dos experimentos após a quantificação, as células foram transferidas para microplacas de cultura de acordo com o planejamento do experimento.

O ensaio de viabilidade celular visa analisar a morte celular nas diferentes linhagens celulares (FIBRO, HaCat e A431) para as amostras utilizadas nos experimentos (1 a 3) em tempos de 24 h, 48 h e 72 h em diferentes concentrações (0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL) e com base nestes resultados, direcionar o experimento para outros ensaios biológicos *in vivo*.

Para realização do ensaio com as amostras as linhagens celulares (FIBRO, HaCat e A431) foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 5x10³, 3x10³ e 5x10³ de células/poço no meio DMEM.

Após 24 horas, o meio de cultura inicial foi substituído por 200 µL de meio de cultura contendo diferentes amostras 1 a 4 nas concentrações (0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL).

A determinação da viabilidade celular foi realizada por meio do método colorimétrico redutor usando o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio).

Este ensaio é usado para avaliar a citotoxicidade das partículas, pois é capaz de indicar a velocidade de proliferação celular em processos que causam apoptose (morte celular), assim reduzindo a viabilidade celular.

O princípio do método colorimétrico é a quantificação da redução do sal de MTT, de cor amarela, em um composto conhecido como formazan, de cor roxo escura e insolúvel.

Após a penetração do MTT na célula, o mesmo sofre redução na mitocôndria em decorrência da ação de desidrogenases succínicas mitocondriais, tendo em vista que a presença de desidrogenases ativas é um indicativo de viabilidade celular.

Contudo, este teste, sozinho, não é um indicador final para refletir o estado de crescimento celular. A citotoxicidade induzida por nanopartículas pode ser avaliada por diversos testes diferentes, cujos resultados juntos indicam, com precisão, os diversos efeitos nas células.

A quantificação foi realizada por espectrofotometria, utilizando o comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram obtidos com uma média de três experimentos independentes em triplicatas.

Após o término das análises dos ensaios biológicos das amostras 1 a 3 (amostra 1 = PPVi; amostra 2 = AA20NP20; amostra 3 = AM25NP20) que foram realizados em triplicatas obtendo média e desvio padrão das médias, os dados foram coletados e tratados.

A análise estatística foi realizada pelo *software* Prism 5, em que a significância considerada foi de $<0,05$, e a avaliação para as possíveis diferenças significativas foi realizada através de testes paramétricos; para de variância utilizada, por sua vez, foi ANOVA, seguido por teste estatístico de Tukey para todos os experimentos. Os dados foram apresentados com recursos gráficos.

Nos testes biológicos os dados apresentados tem o desvio padrão \pm por conta das triplicatas realizadas. O teste t e a análise de variância de Tukey foram aplicados para verificar os efeitos dos tempos de exposição e os grupos foram comparados com o controle.

3.5.7. Medidas de magnetização

As medidas de magnetização foram obtidas usando um magnetômetro comercial do tipo SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*, Quantum Design, modelo MPMS3).

Os ciclos de histerese foram feitos a temperaturas de 5 K e 300 K aplicando-se um campo magnético superior a 70 kOe (7 T). Medidas de ZFC (*zero field-cooled*) e FC (*field-cooled*) foram feitas em campo reduzido (30 Oe) e com temperatura variando de 5 K a 300 K.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Objetivos

Parte dos resultados e discussão apresentados nesta tese foram publicados no seguinte artigo:

Robson T. Araujo, Maria S. B. Neta, José A. H. Coaquira, Sacha B. Chaves, Fabricio Machado. *A New Design for Magnetic Poly(vinyl pivalate) for Biomedical Applications: Synthesis, Characterization, and Evaluation of Cytotoxicity in Fibroblasts, Keratinocytes, and Human Melanoma Cells. Colloids and Interfaces* 2022: 6(7). <https://doi.org/10.3390/colloids6010007>

Neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais referentes a produção de materiais poliméricos magnéticos a base de poli(pivalato de vinila) – PPVi e magnetita (Fe_3O_4) obtidos através de processos de polimerização em emulsão.

Foram feitas diversas reações envolvendo: *i)* Síntese de magnetita, *ii)* modificação da magnetita com ácidos carboxílicos, *iii)* polimerizações em emulsão do monômero pivalato de vinila, *iv)* síntese de compósitos poliméricos ,de magnetita e pivalato de vinila, com propriedades magnéticas.

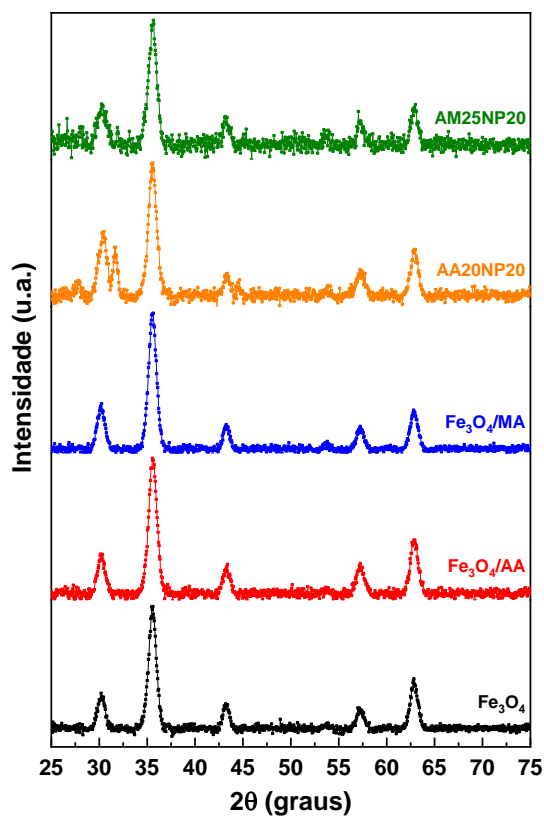
4.2. Caracterização das Nanopartículas magnéticas

A fim de determinar o tamanho do cristalito (D_{DRX}), bem como a estrutura cristalina da magnetita (Fe_3O_4) sintetizada e, indiretamente, a presença ou não de superparamagnetismo nas nanopartículas, uma vez que tal fenômeno está relacionado ao tamanho do cristalito, a análise por difração de raios X (DRX) foi realizada.

Este tipo de análise fornece informações sobre a estrutura cristalográfica, a composição química e propriedades físicas dos nanomateriais.¹²⁰

A Figura 15 mostra os difratogramas dos nanocompósitos magnetopoliméricos com diferentes concentrações de ácido carboxílico como agente adicional de cobertura bem com as diferentes concentrações de nanopartículas de Fe_3O_4 dispersas na matriz de poli(pivalato de vinila).

Figura 15 - Difratoogramas de raios X das nanopartículas de Fe_3O_4 puras, de nanopartículas modificadas com ácido acrílico (AA) ou metacrílico (AM) e dos nanocompósitos magnéticos de poli(pivalato de vinila) (AA20NP20 e AM25NP20).



Fonte: autoria própria.

Os picos característicos das nanopartículas em 2θ foram observados aproximadamente em 30° , $35,5^\circ$, 43° , 54° , 57° , 63° e 74° (Figura 15). Estes picos estão relacionados aos índices de Miller para os planos de reflexão (220), (311), (400), (422), (511), (440) e (533), que confirmam a formação de uma estrutura do tipo espinélio.^{113,99}

Espinélios são estruturas cristalinas do tipo XY_2O_4 onde X e Y são íons metálicos e há um arranjo do tipo cúbico de face centrada (CFC) onde há 16 sítios octaédricos ocupados por cátions (Fe^{2+} e Fe^{3+}) e 8 sítios tetraédricos ocupados por ânions O^{2-} .

Padrões de difração das amostras fornecem informações importantes sobre o tamanho médio dos cristalitos do material inorgânico. Para estimar o tamanho de cristalito, a relação de Debye-Scherrer¹²³ (equação 4) foi usada:

$$D_{XRD} = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos(\theta)} \quad (4)$$

Onde k é uma constante de proporcionalidade que varia de 0,62 a 2,08. Para o cálculo dos resultados deste trabalho, o valor adotado de 0,9 é o recomendado para estruturas que apresentam simetria cúbica e geometria esférica.¹²⁴

O comprimento de onda da radiação utilizada (λ) foi igual a 0,154059 nm ($\text{CuK}\alpha_1$), θ é o ângulo de difração de Bragg e β corresponde à largura à meia altura (FWHM) das reflexões de Bragg.

Usando a linha do pico mais intenso, associado ao índice (311), obteve-se um tamanho de cristalito de $8,2 \pm 0,2$ nm.

Há uma possibilidade de formação de maguemita uma vez que os padrões de difração são semelhantes. Os valores das reflexões de Bragg (440) podem trazer mais informações sobre a formação desta fase.

De acordo com a literatura sobre o assunto, os picos são comparados com os padrões para magnetita,¹²⁵ a posição deste pico em $62,8^\circ$ (Figura 15 e Tabela 4) sugere a presença de maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ou magnetita não estequiométrica provavelmente na superfície da partícula, uma vez que os difratogramas mostram uma reflexão (440).

A Tabela 4 mostra os picos característicos da magnetita pura juntamente com os magnetopolímeros.

Uma vez que os padrões são semelhantes entre as partículas puras e as não modificadas, a presença do ácido acrílico ou metacrílico não afeta as propriedades em termos de estrutura e cristalinidade.^{120, 126}

O parâmetro de rede, (a), traz informações sobre a estequiometria das substâncias cristalinas. No caso de substâncias com padrões de difração semelhantes, como a magnetita e a maguemita, que também apresentam

estruturas cristalinas e o mesmo tipo de espinélio cubico, a valor o parâmetro de rede para a magnetita é de 8.396 Å.¹²⁷⁻¹²⁹

Como a magnetita pode ser oxidada a maguemitita, durante a etapa sintética, como resultado da oxidação dos cátions instáveis de Fe²⁺ a cátions mais estáveis de Fe³⁺, esse fenômeno causa variações leves na estequiometria da magnetita.¹²⁷⁻¹²⁸

O parâmetro de rede, (*a*), da magnetita nos materiais magnéticos foi calculado tomando por base a distância interplanar (*d_{hkl}*) associada ao plano de reflexão (311), de acordo com a Equação 5:¹¹⁹

$$a = d_{hkl} \sqrt{h^2 + k^2 + l^2} \quad (5)$$

Magnetita não estequiométrica (parcialmente oxidada) geralmente é representada como Fe_{3-δ}O₄ com 0.00 ≤ δ ≤ 0,33, que pode ser utilizado para inferir desvios da magnetita estequiométrica (δ = 0.00, Fe₃O₄) para a forma completamente oxidada (δ = 0.33, γ-Fe₂O₃ @ Fe_{2,67}O₄).¹²⁷⁻¹²⁸

A equação 6 apresenta uma relação linear entre o parâmetro de rede e as proporções molares Fe²⁺/Fe³⁺ (*x*). A equação 7 correlaciona o parâmetro δ com as proporções molares Fe²⁺/Fe³⁺ (0.0 ≤ *x* ≤ 0.5).^{119, 130}

$$a = 8.34134 + 0.10512x \quad (6)$$

$$x = \frac{Fe^{2+}}{Fe^{3+}} = \frac{1 - 3\delta}{2 + 2\delta} \quad (7)$$

De modo a avaliar diretamente o parâmetro de estequiometria δ, para permitir o estabelecimento da estequiometria das nanopartículas (Fe_{3-δ}O₄) presentes nos materiais magnéticos, as equações 6 e 7 podem ser combinadas gerando a Equação 8:

$$\delta = -\frac{8.39390 - a}{8.18366 - a} \quad (8)$$

De acordo com esta equação, o parâmetro estequiométrico (δ) se encontra no intervalo entre 0,14 e 0,29, mostrando que as nanopartículas iniciais sofreram oxidação parcial a maguemita, o que resultou em uma estequiometria variando de $\text{Fe}_{2.71}\text{O}_4$ a $\text{Fe}_{2.86}\text{O}_4$ (Tabela 4), entre magnetita e a maguemita.

É importante ressaltar que o tamanho médio de cristalitos, obtidos via difração de raios X, corrobora a hipótese de superparamagnetismo das nanopartículas de Fe_3O_4 , o que normalmente é atribuído a materiais que apresentam monodomínios magnéticos, cujo tamanho do cristalito é inferior ao valor crítico equivalente a 25 nm.¹³¹⁻¹³²

Tabela 4. Picos característicos associados aos índices de Miller, tamanho de cristalito, parâmetros de rede e estequiometrias das nanopartículas puras, modificadas e dos nanocompósitos magnéticos de poli(pivalato de vinila).

Picos e amostras (2 θ)	Índices de Miller						D_{DRX} (nm)	a (Å)	Estequiometria ($\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$)
	(220)	(311)	(400)	(422)	(511)	(440)			
Fe_3O_4	30.2	35.5	43.3	54.2	57.2	62.8	8.44	8.358	$\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{AA}$	30.2	35.6	43.4	54.0	57.2	63.1	8.00	8.368	$\text{Fe}_{2.86}\text{O}_4$
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MA}$	30.2	35.6	43.3	54.0	57.2	63.1	8.29	8.347	$\text{Fe}_{2.71}\text{O}_4$
AA20NP20	30.4	35.5	43.3	53.7	57.3	63.1	8.07	8.357	$\text{Fe}_{2.79}\text{O}_4$
AM25NP20	30.3	35.6	43.3	54.0	57.2	62.9	8.04	8.346	$\text{Fe}_{2.71}\text{O}_4$

Fonte: Aguilar-Arteaga *et al.*¹¹³, Agrawal e Maity⁹⁹.

Quando as partículas estão recobertas, há uma mudança nos padrões dos picos, que sofrem um alargamento em relação às partículas nuas. Podem surgir picos adicionais devido à presença de $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ que podem estar presente em pós recobertos.⁹⁹

A Figura 16 apresenta a morfologia das partículas de Fe_3O_4 obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), sem recobrimento e as que foram modificadas com ácido acrílico e metacrílico e sofreram polimerização em emulsão.

O tamanho médio (D_{MET}) encontrado para as partículas de magnetita pura (figura 16) sintetizadas foi de $7,0 \pm 1,6$ nm (N = 338 partículas, Fe_3O_4), $6,4 \pm 1,7$ nm para as nanopartículas modificadas com ácido acrílico (N = 603 partículas, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{AA}$) e $5,8 \pm 1,6$ nm para as nanopartículas modificadas com ácido metacrílico (N = 718 partículas, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{AM}$).

Para os nanocompósitos, os valores determinados foram iguais a $7,4 \pm 2,2$ nm (N = 316 partículas, AA20NP20) e $7,1 \pm 1,8$ nm (N = 273 partículas, AM25NP20) como mostrado na Figura 16.

Os valores menores obtidos pela microscopia para as nanopartículas de magnetita modificada com ácidos carboxílicos podem ser atribuídos a uma possível dissolução das nanopartículas magnéticas em meio ácido.

É importante frisar que a dissociação da magnetita pode ocorrer em valores aproximados de pH = 3. Assim, é possível assumir que ambos os ácidos carboxílicos (acrílico pKa = 4,25, metacrílico pKa = 4,66) utilizados no processo, nas condições reacionais utilizadas, podem ser os responsáveis por esta variação de tamanho.¹³³⁻¹³⁵

Estes fatos indicam que o procedimento experimental adotado na funcionalização não modifica, de modo significativo, o tamanho e a morfologia do material de partida.

As diferenças observadas entre os valores obtidos na microscopia de transmissão (tamanho médio, D_{MET}) e difratometria (tamanho de cristalito, D_{DRX}) são consistentes com as características de cada técnica analítica.

Os valores de DRX mostram uma representação estatística das características do cristal em nanoescala com o D_{DRX} estimado é baseado na informação no índice de Miller referente ao plano (311), enquanto o MET mostra uma análise da distribuição dos tamanhos de partículas para uma população específica.¹³⁶

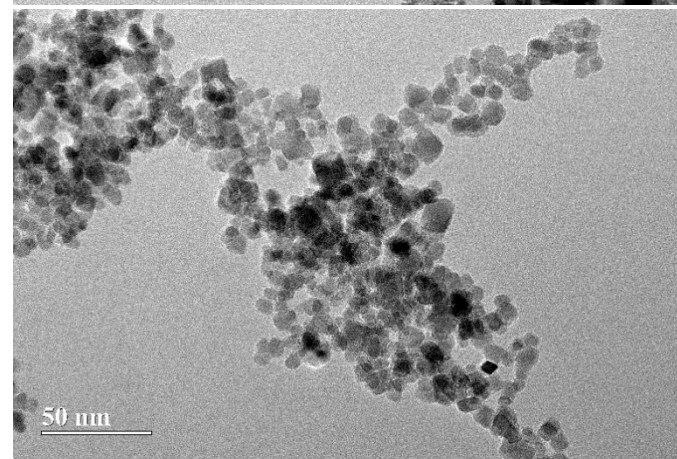
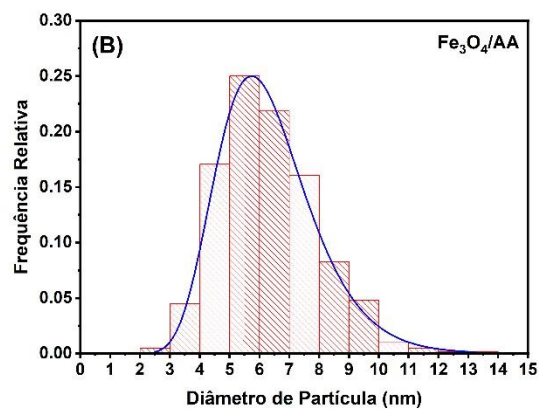
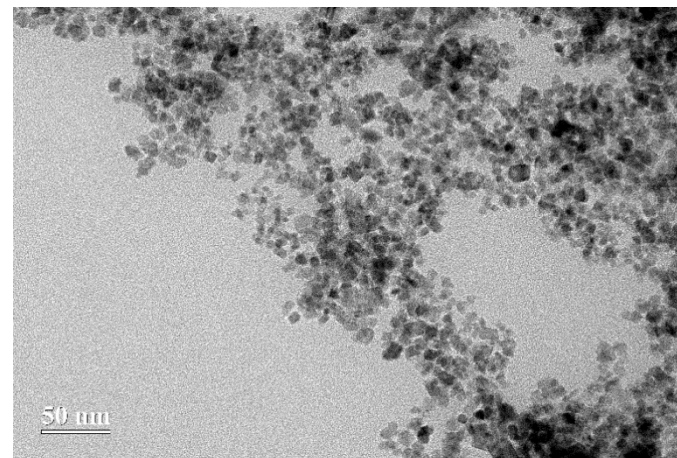
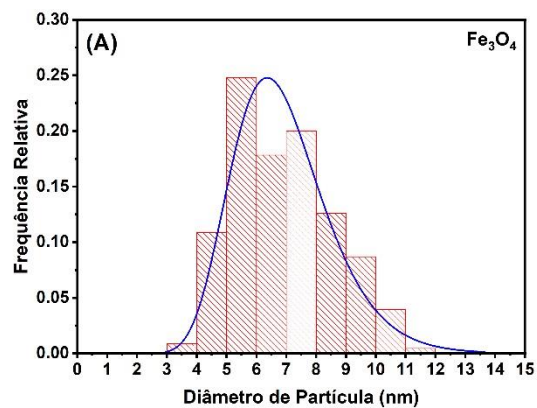
Uma vez que as aplicações biomédicas são dependentes do tamanho de partícula, a relação entre o tamanho crítico e o de partícula, obtidos por medidas de MET e DRX dever ser observadas. No caso da magnetita, o tamanho crítico fica em torno de 20 nm.¹³⁷

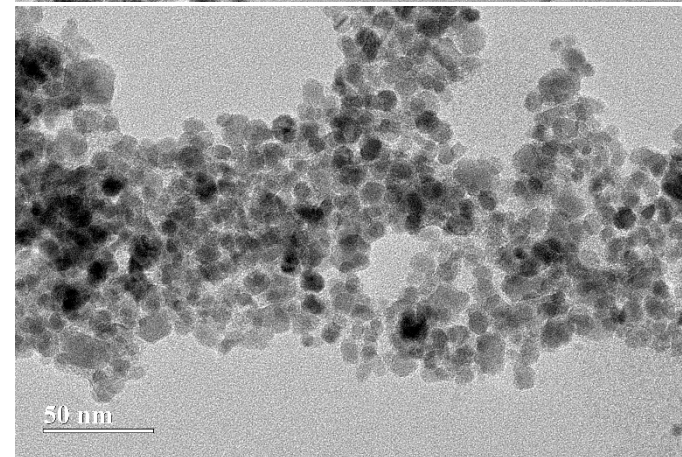
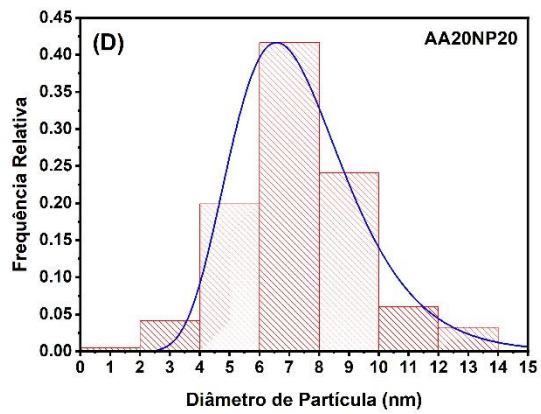
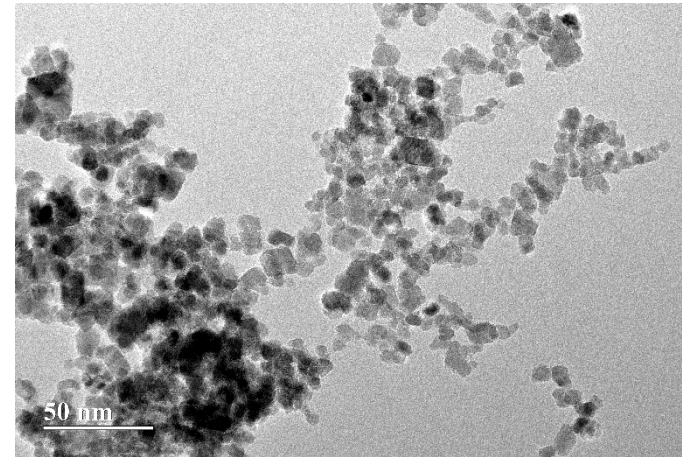
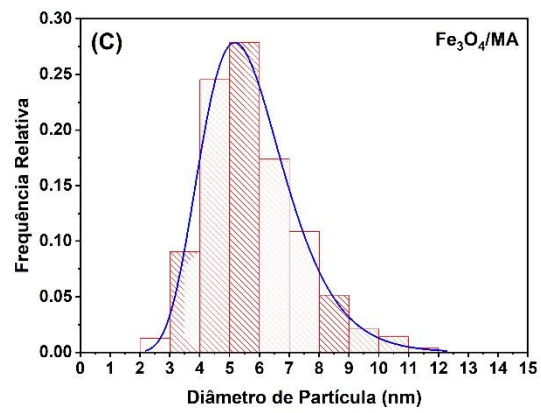
Deve-se observar que para ambos os nanocompósitos (amostras AA20NP20 e AM25NP20), o D_{MET} aumentou em comparação em relação às amostras modificadas de nanopartículas de magnetita (amostras Fe₃O₄/AA e Fe₃O₄/AM), o que indica, claramente, a presença da matriz termoplástica de poli(pivalato de vinila) na superfície das nanopartículas.

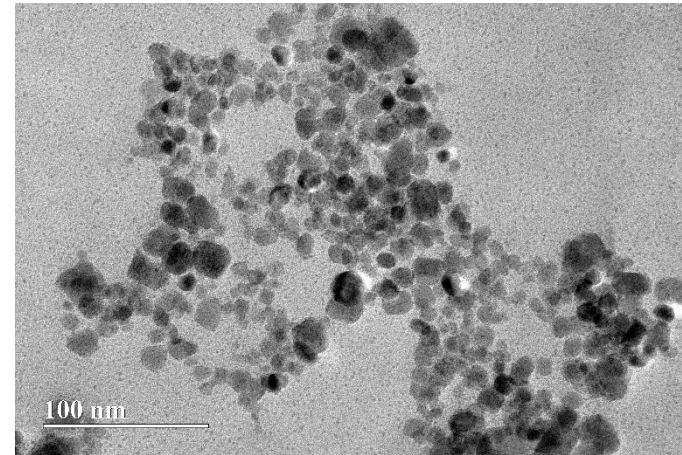
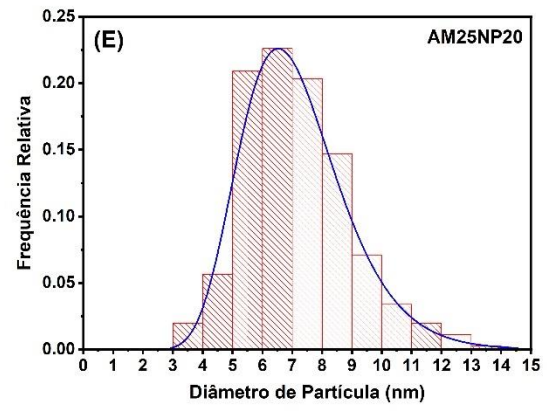
O uso dos ácidos carboxílicos polimerizáveis para funcionalizar a superfície das nanopartículas auxilia na formação de material superparamagnético com elevada resposta magnética.

Além disso, a partir dos dados de distribuição de tamanho partículas do homopolímero e dos dados de microscopia dos magnetopolímeros, podemos confirmar que, neste contexto, a estratégia de encapsulamento individual das nanopartículas se mostra um processo adequado .

Figura 16 - Histogramas da distribuição do tamanho de partícula das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 e micrografias das análises de MET. (A) Fe_3O_4 não modificada (B) Fe_3O_4 funcionalizada com ácido acrílico, (C) Fe_3O_4 funcionalizada com ácido metacrílico, (D) poli(pivalato de vinila) magnético modificado com ácido acrílico (AA20NP20), e; (E) poli(pivalato de vinila) magnético modificado com ácido metacrílico (AM25NP20).







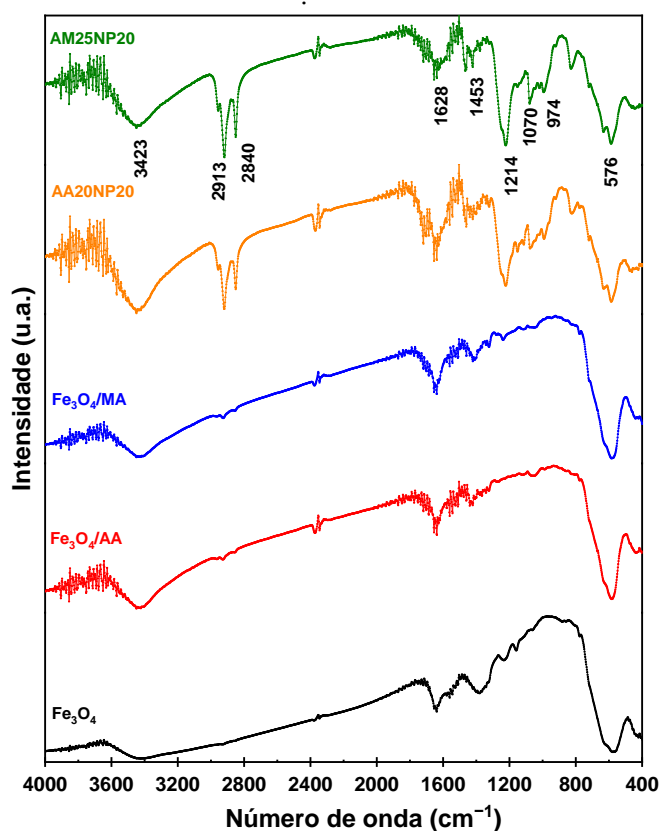
A Figura 17 mostra o espectro de infravermelho (FTIR) das nanopartículas de magnetita pura, funcionalizadas e dos nanocompósitos. As nanopartículas modificadas foram caracterizadas pelo aparecimento de novos picos e bandas.

Bandas em $3400\text{-}3430\text{ cm}^{-1}$ (O-H, estiramento), e picos em 2913 cm^{-1} e 2840 cm^{-1} (CH_2) são característicos da modificação de nanopartículas com ácido acrílico^{98, 138-139}.

O pico em 1628 cm^{-1} (estiramento simétrico de COO^- , ν_{as}) indica a modificação superficial com ácido metacrílico.¹⁴⁰⁻¹⁴² O pico em 576 cm^{-1} caracteriza o estiramento Fe-O no site octaédrico.⁹⁹

Os picos em 1453 cm^{-1} , 1214 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} (C-O estiramento), 974 cm^{-1} (dobramento C=CH) são característicos do poli(pivalato de vinila) e indicam a ocorrência da polimerização.

Figura 17 - Medidas de FTIR das nanopartículas de Fe_3O_4 puras, funcionalizadas com ácido acrílico, funcionalizadas com ácido metacrílico e nanocompósitos magnetopoliméricos (AM25NP20 e AA20NP20).



Fonte: autoria própria.

Além disso, deve-se buscar entender o modo de interação entre os ácidos carboxílicos usados na funcionalização e a superfície da partícula. Um dos métodos de verificação deste tipo de interação é a espectroscopia de infravermelho, como mostram os dados contidos na Tabela 6.

Uma vez que há uma interação, ela pode ocorrer de vários modos, pois as estruturas dos ácidos e das nanopartículas são diferentes. A interação dos carboxilatos-metals pode ser caracterizada por quatro tipos diferentes: monodentado, bidentado (ponte ou quelante) e interação iônica.

A diferença de números de onda Δ , entre o estiramento assimétrico $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ e o simétrico $\nu_s(\text{COO}^-)$ das bandas de infravermelho (IR) auxiliam na identificação da conformação.

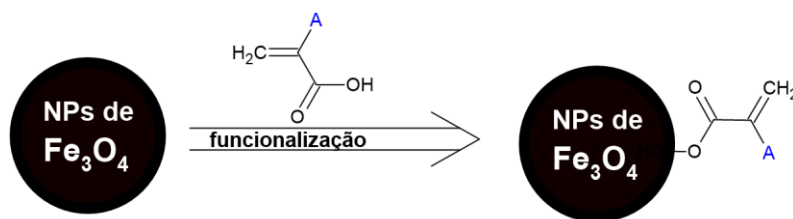
Por exemplo, a ausência de um pico de COO^- e o aparecimento um de modo de vibração $\text{C}=\text{O}$ pode ser um indicativo de que a carboxila se ligue de modo monodentado à superfície da nanopartícula.¹⁴³

Deve-se levar em conta, também, que as moléculas do AA e do AM no estado adsorvido são sujeitas a fenômenos de superfície que podem gerar bandas características deslocadas para regiões de frequências mais baixas indicando, deste modo, que as cadeias do ácido carboxílico na monocamada ao redor da nanopartícula estão empacotadas.¹⁴⁴

Em particular para as nanopartículas magnéticas modificadas com ácidos carboxílicos, o valor observado para Δ [$\Delta = \nu_{as}(\text{COO}^-) - \nu_s(\text{COO}^-)$] equivale a 279 cm^{-1} , o que sugere uma interação monodentada entre o carboxilato e o átomo de ferro.^{140, 145}

Nas análises realizadas para este trabalho, os valores encontrados foram de 1626 cm^{-1} e 1412 cm^{-1} para ácido acrílico e 1614 cm^{-1} e 1412 cm^{-1} para ácido metacrílico, sugerindo interação monodentada em ambos os casos, como representado na figura 18.

Figura 18 - Representação esquemática da ligação entre nanopartículas de Fe_3O_4 e ácidos carboxílicos.



A = H, ácido acrílico

A = CH_3 , ácido metacrílico

Fonte: autoria própria.

A distinção entre interações monodentada e bidentada é observada através de frequências específicas do carboxilato que auxiliam a interpretação do infravermelho e do modo de coordenação.

A tabela 5 sumariza os principais picos e bandas observados via medidas de FTIR.

Tabela 5. Principais picos e bandas de absorção observados via medidas de FTIR da magnetita recoberta com ácido.

Pico e bandas	Explicação	Ref.
3700-3030	Estiramento de hidroxila $\nu(\text{O-H})$ do H do ácido	98-99, 140, 142, 146
2922 forte	Estiramento assimétrico de grupos metileno $\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$ do ácido	98-99, 140-141, 143, 147-148
2853 forte	Estiramento simétrico de grupos metileno $\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$ do ácido	99, 140, 142-143, 145, 147
1749	$\nu(\text{C=O})$ no COOH da cobertura monomérica.	141
1708	$\nu(\text{C=O})$ no COOH da cobertura dimérica	98-99, 140-141, 143, 147
1646	Estiramento simétrico $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ do carboxilato do ácido em combinação com o Fe da superfície da magnetita que formam uma ligação parcial que enfraquece a ligação C=O e reduz a frequência de estiramento.	140, 142
1601	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ do COOH quimicamente adsorvido	141
1457	Dobramento $\delta_{\text{as}}(\text{C-H})$ do CH_3 do ácido. Normalmente se sobrepõem às vibrações assimétricas dos grupos metileno, junto	98, 142-143, 145, 147-148

	com o estiramento simétrico indica que o ácido está ligado à superfície da magnetita de modo covalente.	
1367	Estiramento assimétrico $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ do carboxilato	142
1142	Estiramento $\nu(\text{C-O})$	148
948	Dobramento de O-H fora do plano $\delta_{oop}(\text{O-H})$	147-148
577	Pico característico da magnetita, estiramento da ligação Fe-O do sítio tetraédrico	98-99, 138

Para a verificação da estabilidade térmica dos materiais, a realização de análises térmicas como o DSC se faz importante e com os resultados obtidos pode-se determinar a T_g para o material obtido após a polimerização.

A temperatura de transição vítrea (T_g) de um material é uma transição reversível em um material amorfo ou regiões amorfas em um material semicristalino, de um estado rígido a um estado mais macio ou borrachoso.

Durante este processo, ocorrem mudanças em propriedades físicas como, por exemplo, a capacidade calorífica específica.

Como a T_g de um material polimérico está relacionada à mobilidade das cadeias poliméricas amorfas presentes, o material pode apresentar cadeias poliméricas de diferentes comprimentos.¹⁴⁹

O efeito da concentração de iniciador é observado quando a temperatura de transição vítrea (T_g) dos homopolímeros de PVi são comparadas. Para um valor de concentração de iniciador de 0,25%(p/p), foi obtido um homopolímero de T_g igual a 65 °C.

Desta forma, para um mesmo tipo de polímero sintetizado pelo mesmo tipo de polimerização, é esperado que valores baixos de T_g caracterizem baixas massas molares médias, que exibem maior mobilidade molecular.^{69, 150}

Uma vez que a T_g para o poli(pivalato de vinila) é de 86 °C, podemos concluir que a quantidade de iniciador (0,25%) foi insuficiente no sistema.

Uma possibilidade para que este fenômeno esteja ocorrendo é que parte do iniciador oxida a magnetita e uma quantidade menor de iniciador permanece disponível no sistema para provocar a polimerização do pivalato de vinila. Deste modo, há uma concentração elevada de monômero competindo no sistema e que sofre polimerização também.

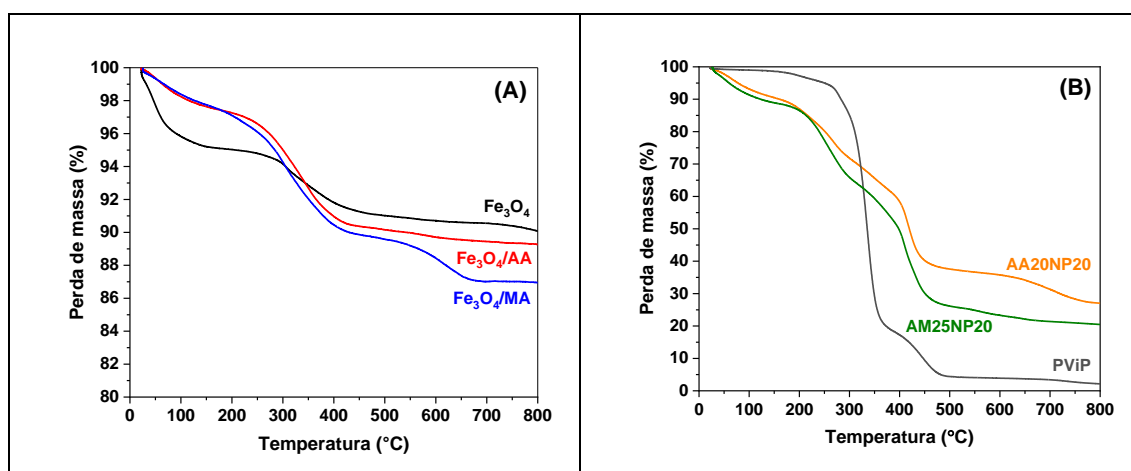
A estabilidade térmica dos magnetopolímeros sintetizados e o efeito da magnetita incorporada foram investigados por análise termogravimétrica (TGA).

As amostras escolhidas para esta análise foram a AA20NP20, contendo 20% de nanopartículas de magnetita, em relação à fase monomérica, foram protegidas com 20% de ácido acrílico.

A segunda amostra, AM25NP20 passou pelo mesmo procedimento, onde foi usado 25% de ácido metacrílico ao invés do ácido acrílico. A perdas de massa de 75% para AA20NP20 e 80% para AM25NP20 ilustram a quantidade de matéria orgânica ligada à superfície das nanopartículas, como mostrado na Figura 19.

As diferenças entre as quantidades de material perdido podem ser explicadas devido à diferença das massas molares dos ácidos carboxílicos utilizados na funcionalização que, devido às suas estruturas, ligam-se em quantidades diferentes às superfícies das nanopartículas.

Figura 19 - Análise termogravimétrica para (A) Fe_3O_4 puro e funcionalizado com ácido acrílico (Fe_3O_4 /AA) e metacrílico (Fe_3O_4 /AM), e (B) magnetopolímeros (AM25NP20 e AA20NP20) e poli(pivalato de vinila) (PPVi).



Fonte: autoria própria.

Para investigar o efeito na magnetita na degradação térmica dos materiais magnetopoliméricos sintetizados, os termogramas dos materiais mostrados na Figura 19 foram comparados com a amostra em branco.

A avaliação das perdas de massa relacionadas à temperatura foi feita nos percentuais de 25% (T_{d25}), 50% (T_{d50}) e no resíduo a 800°C, como mostrado na Tabela 6.

Foi observado um aumento na temperatura de degradação relacionada ao aumento do teor de magnetita nos nanocompósitos. Este efeito sugere que as interações entre as nanopartículas e as cadeias poliméricas podem interferir na degradação térmica dos nanocompósitos magnéticos, elevando suas temperaturas de degradação.

Um outro fator que auxilia no entendimento do motivo pelo qual as temperaturas de decomposição se elevam, nos magnetopolímeros, reside no fato que a concentração de nanopartículas de magnetita aumenta, conforme os dados apresentados na tabela 6.

Esse efeito pode decorrer das propriedades dos materiais utilizados, uma vez que compostos inorgânicos, como os óxidos de ferro, em geral não são bons condutores devido à presença de umidade e alterações superficiais dos compostos em micro e nanoescala.¹⁵¹

Tabela 6 - Estabilidade dos nanocompósitos: material residual após a calcinação e temperaturas de decomposição.

Amostra	MNPs (% p/p)	Td ₂₅ (°C)	Td ₅₀ (°C)	Resíduo a 800 °C (%)
PPVi	0	317	336	2.2
Fe ₃ O ₄	100	-----	-----	90.0
Fe ₃ O ₄ /AA ^a	100	-----	-----	89.3
Fe ₃ O ₄ /MA ^a	100	-----	-----	87.0
AA20NP20	20	277	421	27.0
AM25NP20	25	258	398	20.0

^a relacionada à quantidade total de magnetita (5 g) dispersa em água (170 mL) junto com 5,6 mL de ácido carboxílico.

O perfil de estabilidade térmica observado deve-se essencialmente a degradação térmica do material presente na superfície das nanopartículas de magnetita, como mostrado na Figura 19, o que equivale a um percentual de aproximadamente 10% em massa.

Verificou-se que os materiais sofreram degradação numa faixa de temperatura entre 100 e 650 °C, exibindo três perdas de massa características:

- i)* A primeira perda de massa ocorre na faixa situada entre 25°C e 150°C corresponde a aproximadamente 5% (m/m), atribuída à água livre adsorvida, no caso das nanopartículas de Fe₃O₄. Para as nanopartículas funcionalizadas, essa perda situa-se em torno de 3%.

- ii)* A segunda perda de massa, relacionada à decomposição da fisiosorção e de matéria orgânica, é observada na faixa situada entre 200 °C e 450 °C, correspondendo a aproximadamente 7% m/m;
- iii)* O terceiro patamar de massa, entre 450 °C e 700 °C, diz respeito à decomposição da quimiosorção do agente de cobertura que forma cinzas, contendo óxidos de ferro e resíduos da reação de polimerização.¹⁵²

Os dados difratométricos apresentados ajudam a explicar as pequenas variações observadas nas análises termogravimétricas. Observa-se a existência de um sinal muito pequeno referente à presença de magnetita nas amostras.

Uma vez que o ácido metacrílico (MM = 86 g/mol) tem uma cadeia ramificada e massa molecular mais elevada que o ácido acrílico (MM = 72 g/mol), é possível atribuir a temperatura de degradação mais elevada da amostra AA20NP20 por conta das características do ácido usado.

Como a molécula de ácido metacrílico possui um maior volume, provoca um impedimento estérico na superfície da nanopartícula fazendo com que haja uma interação de um número menor de moléculas na superfície da nanopartícula, em relação às moléculas de ácido acrílico.¹⁵³

Além disso, análises por DSC avaliaram a temperatura de transição vítrea (T_g) dos magnetopolímeros, chegando a valores de 63°C para AM25NP20, 62 °C para AA20NP20 e 65 °C for poli(pivalato de vinila) – PPVi, indicando que a incorporação das nanopartículas magnéticas não afeta significativamente o material magnetopolimérico final em comparação com o polímero puro de poli(pivalato de vinila).

4.3. Caracterização magnética

O caráter magnético, necessário para a aplicação biomédica como, por exemplo, o uso como agentes de hipertermia se apresentarem caráter superparamagnético e, por isso, podem promover com sucesso a elevação de temperatura de modo controlado em lesões, quando submetidos a campos magnéticos externos.

Figura 20 - Resposta magnética de Fe_3O_4 coloidal em hexano.

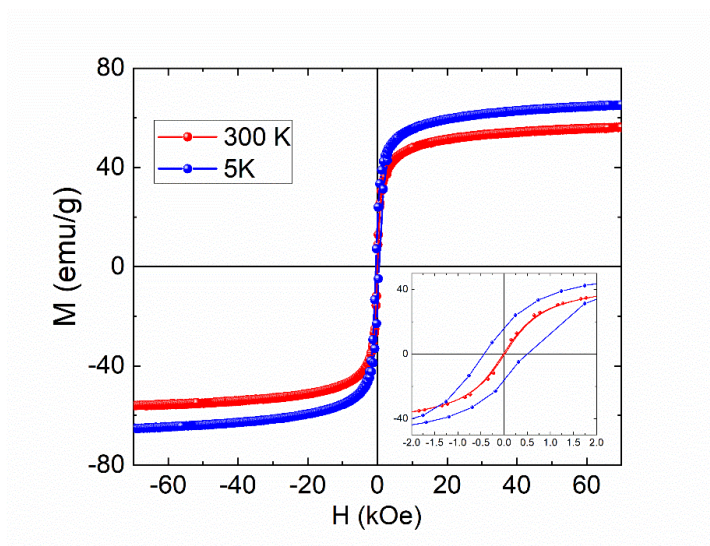


Fonte: autoria própria.

Uma vez que há diferenças nas propriedades magnéticas das diferentes fases dos óxidos, a medida do magnetismo pode ajudar na determinação das fases. Os resultados de VSM fornecem a variação da magnetização em função do campo aplicado.

A Figura 21 exemplifica os perfis de magnetização da magnetita em diferentes temperaturas (5 Kelvin e 300 Kelvin) pura.

Figura 21 - Curva de magnetização das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 .



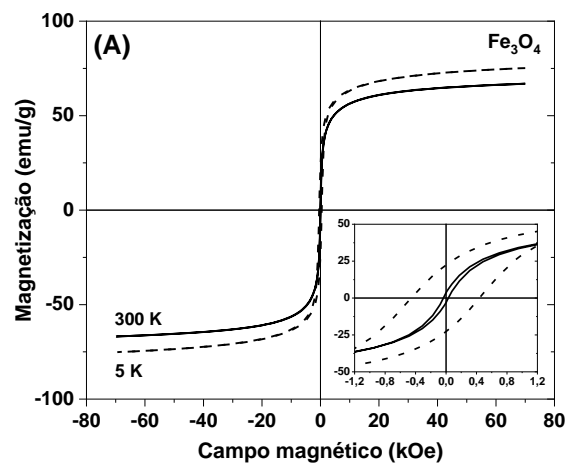
Fonte: autoria própria.

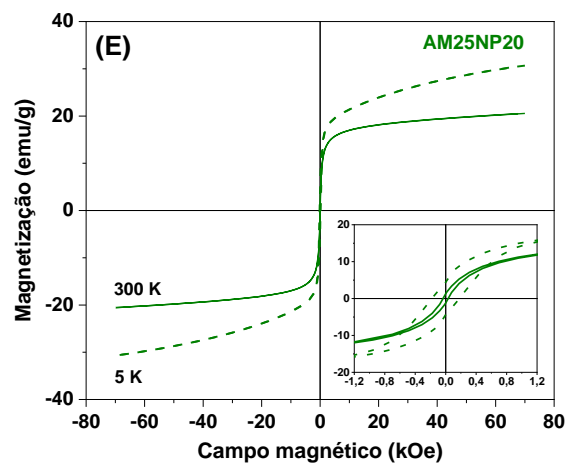
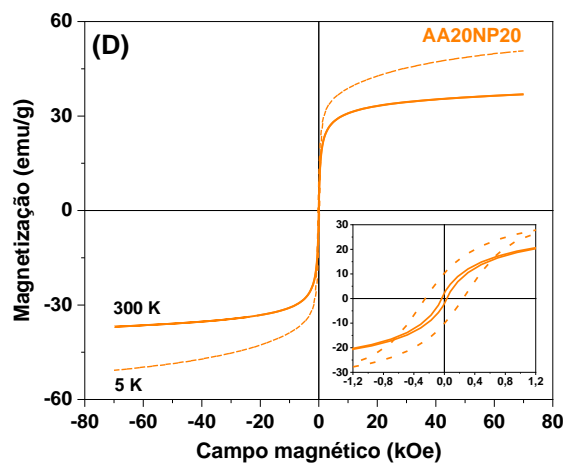
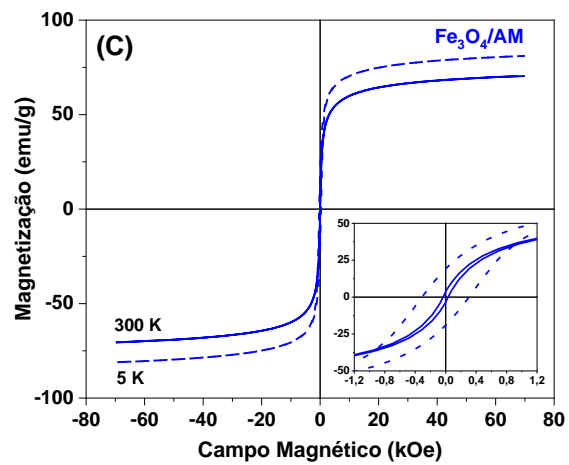
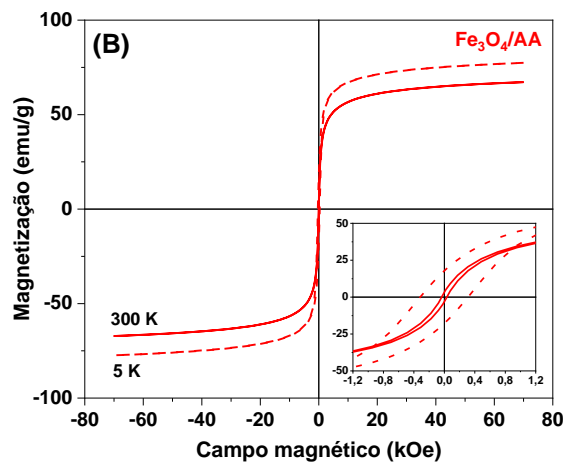
As propriedades magnéticas dos nanocompósitos foram avaliadas a partir das medidas de magnetização. A figura 22 mostra as curvas de histerese dos materiais magnéticos.

Os valores da saturação magnética a 5K para as nanopartículas puras e modificadas ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{AA}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{AM}$) se encontram na faixa de 75 a 81 emu/g, sendo maior para as nanopartículas de magnetita modificada com ácido metacrílico ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{AM}$).

Figura 22 - Curvas de magnetização* de (A) Fe_3O_4 não modificado; (B) Fe_3O_4 modificado com ácido acrílico, (C) Fe_3O_4 modificado com ácido metacrílico (D) poli (pivalato de vinila) magnético contendo Fe_3O_4 modificado com ácido acrílico (AA20NP20), e; (E) poli(pivalato de vinila) magnético contendo Fe_3O_4 modificado com ácido metacrílico (AM25NP20).

*A linha pontilhada se refere à temperatura de 5 K e a contínua à 300 K.





Fonte: autoria própria.

Os valores de magnetização observados para as nanopartículas puras são menores que os da magnetita agregada (“bulk”). Este fato deve-se, provavelmente, a fatores como a oxidação da magnetita a maguemitita, na etapa de síntese, principalmente na superfície da partícula e efeitos de tamanho, que causam a redução da saturação magnética.

De acordo com a primeira explicação, a presença do polímero parece reduzir o processo oxidativo e é melhor no caso da amostra Fe₃O₄/AM.⁹⁹

A coercividade próxima a zero obtida a partir da curva *M versus H* nas temperaturas de 5 K e 300 K sugerem que as partículas estão em um estado superparamagnético.¹⁵⁴⁻¹⁵⁵

Para a verificação da ocorrência de superparamagnetismo, é preciso ter elevados valores de *M_s*, baixos de *M_r* e *H_c*, bem como a relação *M_r/M_s* tendendo a zero.¹⁵⁶

À temperatura de 5 K, um leve aumento nos valores de *H_c* é observado devido à temperatura de bloqueio das nanopartículas de magnetita que pode ocorrer acima desta temperatura.¹²⁷ Resultados semelhantes foram obtidos para as nanopartículas funcionalizadas com ácido acrílico e metacrílico e podem ser observados na Figura 23 e tabela 7.

Os dados apresentados na tabela 7 incluem os valores da magnetização de saturação (*M_s*), da remanência de magnetização (*M_r*) da força coerciva (*H_c*) e a relação *M_r/M_s*.

Tabela 7. Propriedades magnéticas das nanopartículas de Fe₃O₄ puras, modificadas e dos magnetopolímeros.

Amostra	<i>M_s</i> (emu/g)		<i>H_c</i> (kOe)		<i>M_r</i> (emu/g)		<i>T_B</i> (K)
	5 K	300 K	5 K	300 K	5 K	300 K	
Fe ₃ O ₄	75.51	67.85	0.4266	0.0042	22.41	3.50	192
Fe ₃ O ₄ /AA	78.43	68.30	0.2882	0.0053	17.86	3.33	206
Fe ₃ O ₄ /MA	80.81	71.70	0.2829	0.0047	19.09	3.66	229
AA20NP20	50.68	36.92	0.2214	0.0054	10.22	2.23	144
AM25NP20	30.68	20.59	0.1515	0.0048	4.35	1.29	146

Como mencionado anteriormente, há um acréscimo nos valores de M_s para as nanopartículas funcionalizadas em relação às não funcionalizadas (Tabela 7). Este efeito está ligado ao fato que a redução no tamanho de partícula e a formação de uma camada superficial com magnetização nula (“camada morta”) nas nanopartículas de magnetita pura.

Em relação aos nanocompósitos, uma redução nos valores de magnetização foi observada quando o ácido metacrílico (amostra AM25NP20) é usado no lugar de ácido acrílico (amostra AA20NP20) para a proteção superficial das nanopartículas antes da polimerização.

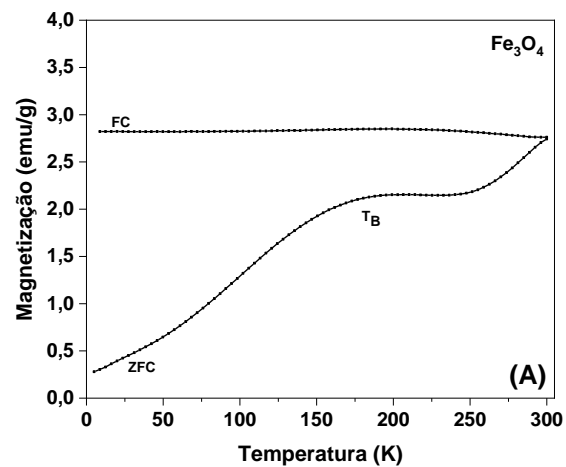
A presença da cobertura orgânica, durante a funcionalização das nanopartículas, ajuda a organizar as interações superficiais no cristal, o que gera um aumento na saturação magnética. Esta observação pode ser explicada por mudanças superficiais no cristal durante o processo de funcionalização pela cobertura orgânica.^{157,158}

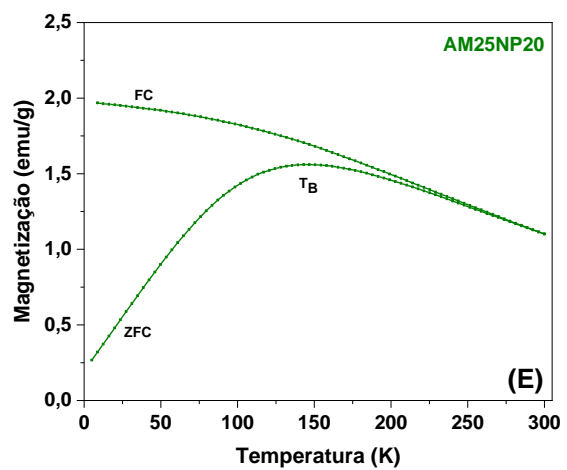
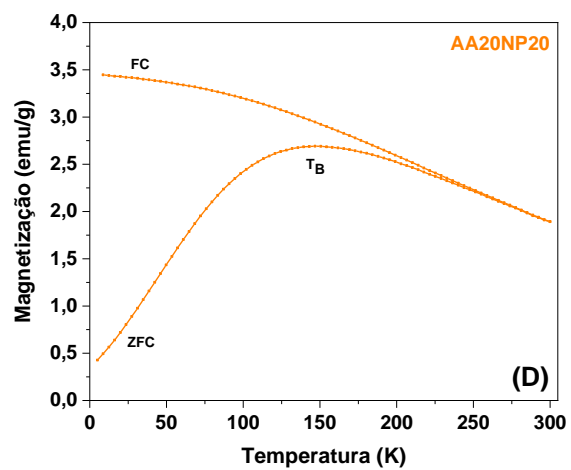
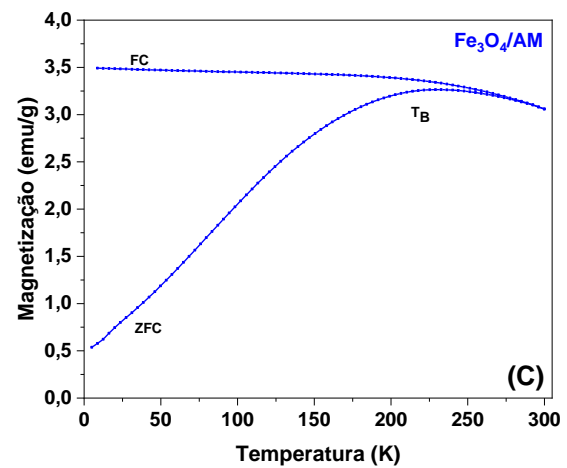
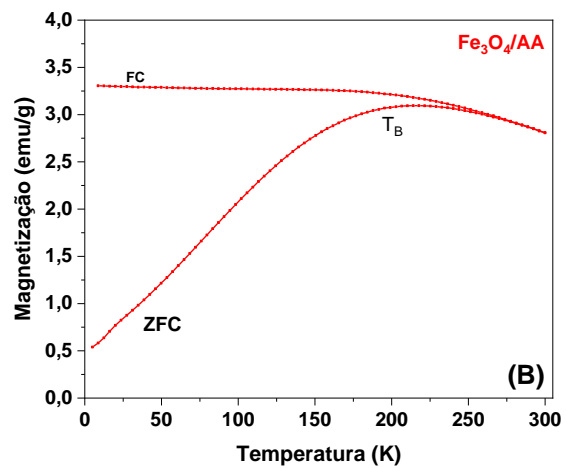
Como os ácidos carboxílicos usados na funcionalização se ligam à superfície das nanopartículas via oxigênio do grupo carboxila, isto gera um ambiente químico semelhante ao da magnetita cristalina macroscópica, uma vez que a modificação causada por estas interações modifica a estrutura superficial dos spins,^{7, 159}

As consequências disto são devidas ao papel dos grupos ligantes na capacidade de doarem elétrons, fortalecendo a ligação e a densidade da camada de funcionalização. Isto também auxilia no ajuste da M_s , no controle das interações entre as partículas e as propriedades estruturais e morfológicas.¹⁵⁸⁻¹⁵⁹

Outras informações importantes são obtidas das curvas de FC/ZFC, que são usadas para estudar o relaxamento térmico das nanopartículas magnéticas. Como observado, as curvas de FC (*field cooling*) e o ZFC (*zero field cooling*) mostram outros aspectos irreversíveis, que dependem das amostras estudadas.

Figura 23 – Curvas FC/ZFC de (A) Fe_3O_4 não modificado; (B) Fe_3O_4 modificado com ácido acrílico, (C) Fe_3O_4 modificado com ácido metacrílico (D) poli (pivalato de vinila) magnético contendo Fe_3O_4 modificado com ácido acrílico (AA20NP20), e; (E) poli (pivalato de vinila) magnético contendo Fe_3O_4 modificado com ácido metacrílico.





Fonte: autoria própria.

A curva ZFC mostra uma tendência de crescimento à medida que a temperatura se eleva, até alcançar um máximo, que é associado à temperatura de bloqueio (T_B). Após este ponto, a curva ZFC mostra uma tendência de queda, como mostrado na Figura 23.

É bem estabelecido que a temperatura de bloqueio, T_B , separa os estados bloqueados, em baixas temperaturas, dos estados relaxados, em temperaturas mais elevadas. Em temperaturas elevadas, acima de T_B , a energia térmica é maior que a magnética e o sistema apresenta um comportamento superparamagnético.

Como observado na Figura 23, a curva ZFC para a magnetita pura mostra uma largura máxima e se mantém crescente com a temperatura. Estes achados sugerem a presença de distribuição bimodal das temperaturas de bloqueio.

A banda centrada em torno de 192 K parece corresponder a interações fracas de nanopartículas enquanto a tendência de aumento sugere a presença de interações fortes.

Esta situação parece ser modificada nas amostras de nanopartículas funcionalizadas (Fe_3O_4/AA e Fe_3O_4/AM). Como observado, há um máximo apenas para ambas as amostras nas curvas ZFC, com as temperaturas de bloqueio por volta de 206 K para a amostra modificada com ácido acrílico e 229 K para a modificada com ácido metacrílico, o que pode ser relacionado com o fortalecimento da interação interarticular.

Contudo, após o processo de polimerização, a T_B sofre um deslocamento para temperaturas menores, na faixa de 140-150 K para ambas as amostras.

Este deslocamento sugere que a interação interarticular sofre um enfraquecimento após a polimerização, que pode ter com causa a preencha de grupos poliméricos entre as partículas magnéticas gerando um afastamento entre elas e, assim, enfraquecendo as interações magnéticas.

Em termos de aplicação ao organismo, o tempo elevado de retenção no alvo reduz a limpeza feita pelo sistema retículoendotelial. Deste modo deve-se buscar meios de otimização da quantidade de nanopartículas magnéticas.

Para que essa otimização ocorra, algumas estratégias podem ser adotadas: *i)* as partículas devem ter tamanho suficiente para serem levadas ao local do tumor ou regiões próximas; *ii)* as nanopartículas devem ter um tamanho que possibilite a interação com o campo magnético aplicado; *iii)* o campo magnético deve ser elevado de modo a concentrar as nanopartícula na área desejada; *iv)* o método de injeção deve ter acesso à região tumoral e evitar a retirada pelo sistema retículo endotelial.¹⁶⁰

4.4. Viabilidade celular

Uma vez que é importante conhecer o modo como as nanopartículas interagem com organismos vivos, em termos de viabilidade e toxicidade celulares, saber qual é o nível aceitável de material em nível celular auxilia durante a aplicação destes materiais no organismo.

Os testes *in vitro* são importantes pois ajudam na determinação do nível de toxicidade de materiais em organismos. No caso de nanopartículas, isto se torna importante uma vez que algumas das características destes materiais podem causar intoxicações inesperadas.

Entre as características potenciais para a efeitos citotóxicos podem ser usados como exemplos o tamanho reduzido, que possibilita uma permeabilidade maior nas membranas celulares, a reatividade elevada, devido à elevada área superficial, entre outros fatores.

Um parâmetro utilizado para verificar a baixa toxicidade é a viabilidade celular. Valores elevados de viabilidade celular indicam baixas toxicidades. Alguns testes biológicos foram feitos para relacionar e comparar as propriedades desses materiais e sua eficiência, bem como a toxicidade em células de diferentes tipos.

O objetivo destes testes visa a determinar as possíveis aplicações médicas que as nanopartículas magnéticas podem ter (biocompatibilidade), indicando a viabilidade celular, entre outros resultados.

A toxicidade de nanopartículas magnéticas deve-se à grande área superficial e reatividade química, que gera espécies reativas de oxigênio (EROs), capazes de penetrar em células e tecidos.¹⁶¹

O tamanho, a hidrofiliabilidade e a carga superficial da nanopartículas magnéticas, bem como a massa e da carga das moléculas da cobertura são fatores essenciais para entender a biocompatibilidade.^{162-163, 164}

A partir dos dados obtidos, é possível prever a aplicabilidade dessas nanopartículas bem como verificar os parâmetros que podem ser otimizados em trabalhos futuros.

Foi feita a determinação da viabilidade celular para linhagens fibroblasto e queratinócitos humanos (FIBRO, HaCat e A431) para as amostras 1 a 3 (amostra 1 = PPVi; amostra 2 = AA20NP20; amostra 3 = AM25NP20b).

As concentrações utilizadas nos ensaios de citotoxicidade são aquelas encontradas na literatura e aceita nos estudos deste tipo.¹⁶⁵

Foram testados tempos de tratamento 24, 48 e 72 h para as linhagens citadas anteriormente e as concentrações de 0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL em triplicatas, bem como triplicata do experimento independente, uma vez que o controle utilizado para comparação dos resultados foi com água ultrapura, representando 100% de viabilidade celular para cada linhagem.

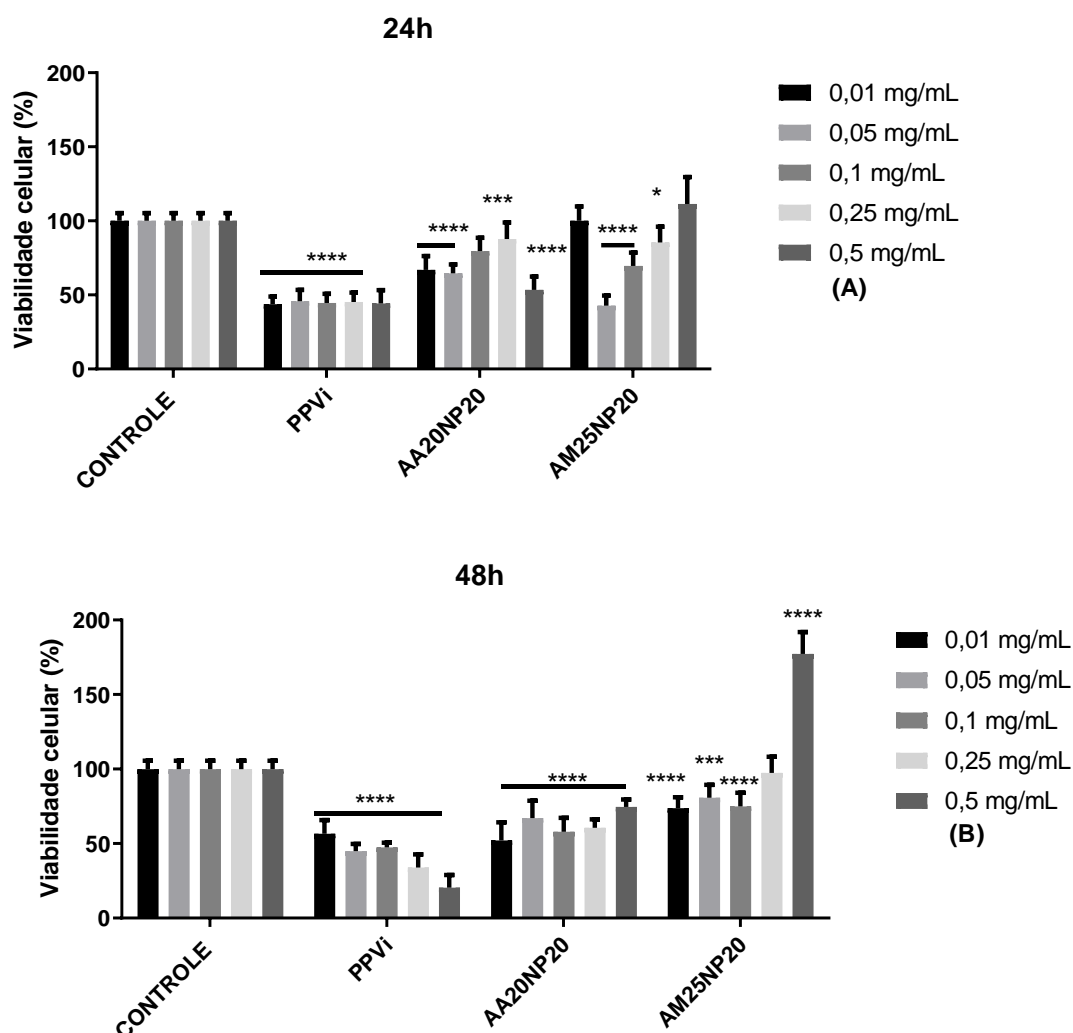
No caso dos testes realizados, o controle é do tipo positivo, isto é, aquele no qual o material utilizado seja capaz de provocar danos celulares de diversos tipos, a fim de realizar a avaliação da citotoxicidade do material.

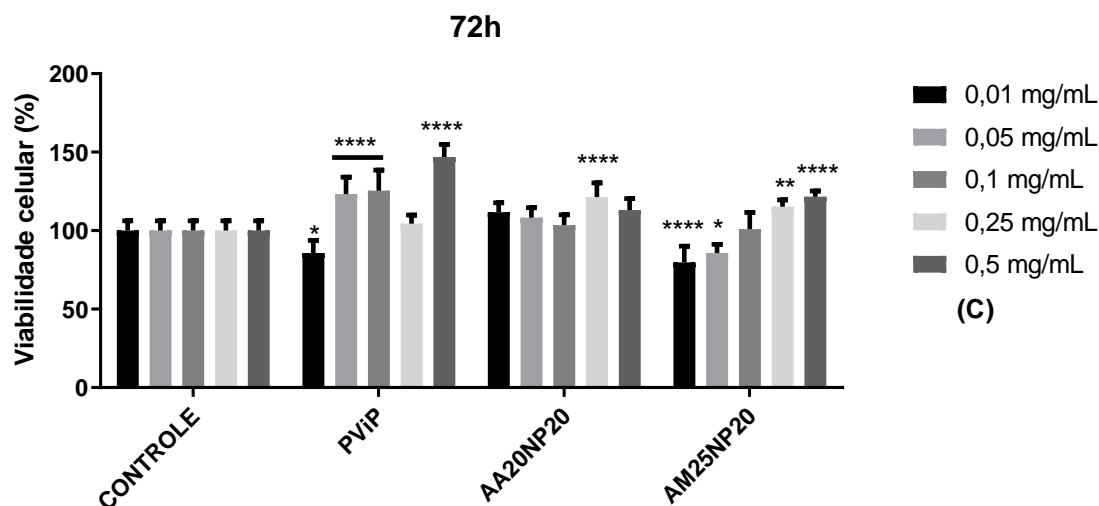
4.4.1. Viabilidade celular da linhagem FIBRO

Com base nos dados obtidos, observou-se que para a linhagem de fibroblasto (FIBRO) no tempo de 24 h ocorreu uma diminuição de 60% da viabilidade na amostra 1 (PPVi) em todas as concentrações; na amostra 2 (AA20NP20) a diminuição foi de 30% nas concentrações iniciais e 50% na maior concentração (1,0 mg/mL); para a amostra 3 (AM25NP20) apenas na concentração de 0,05 mg/mL é que a redução foi significativa com mais de 60% (Figura 24).

O aumento da viabilidade que ocorre em algumas concentrações podem ser explicados pelo papel essencial do ferro no organismo, uma vez que determinadas concentrações podem estimular o crescimento celular ou iniciar processos de apoptose em células.^{166,167}

Figura 24 - Avaliação da atividade citotóxica das amostras poliméricas (amostra 1 = PPVi; amostra 2 = AA20NP20; amostra 3 = AM25NP20b) em células de fibroblasto (FIBRO) após (A) 24 h (B) 48 h, (C) 72 h de exposição nas concentrações de 0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL. Os asteriscos estão relacionados aos diferentes intervalos de confiança associados à significância estatística: *para 95% com $p \leq 0,05$, **99% com $p \leq 0,01$, ***99,9% com $p \leq 0,001$ e ****99,99% com $p \leq 0,0001$.





No tempo igual a 48 h para a exposição, os resultados foram significativos para a amostra 1, onde a citotoxicidade foi superior a 80% com redução da viabilidade para a concentração de 0,5 mg/mL. Para as outras concentrações, a redução percentual variou entre 50% e 70%.

Para a amostra 2, houve uma variação de 30% a 50% da viabilidade para todas as concentrações analisadas. A amostra 3 sofreu uma redução de 20-30% para todas as concentrações, exceto a de 0,5 mg/mL, onde foi observado um aumento na viabilidade.

Após 72 h de exposição, as amostras 1 e 2 (PPVi e AA20NP20) não mostram uma redução para quaisquer concentrações. A amostra 3 apresentou uma redução de 20%, considerada não significativa biologicamente de acordo com a literatura referente a esta linhagem.

4.4.2. Viabilidade celular para linhagem HaCaT

Para os resultados da linhagem de HaCaT obteve-se os resultados apresentados na figura 26, e esta linhagem celular foi inserida no contexto deste estudo com o intuito comparativo com a linhagem anterior para avaliar toxicidade.

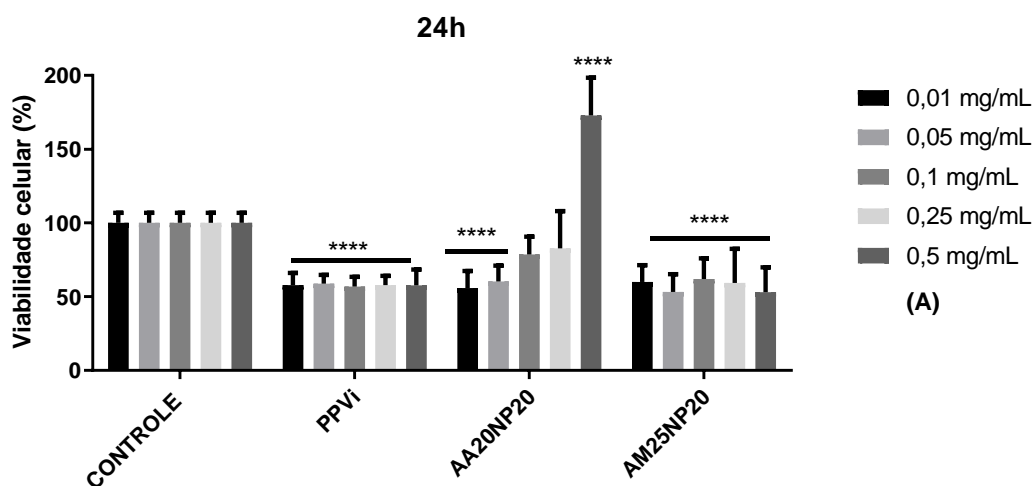
Com base nestes resultados o material a ser analisado poderá ser inserido em cosméticos ou fármacos, visto que se tratam de linhagens celulares de humanos como FIBRO (um fibroblasto) e HaCaT (um queratinócito normal).

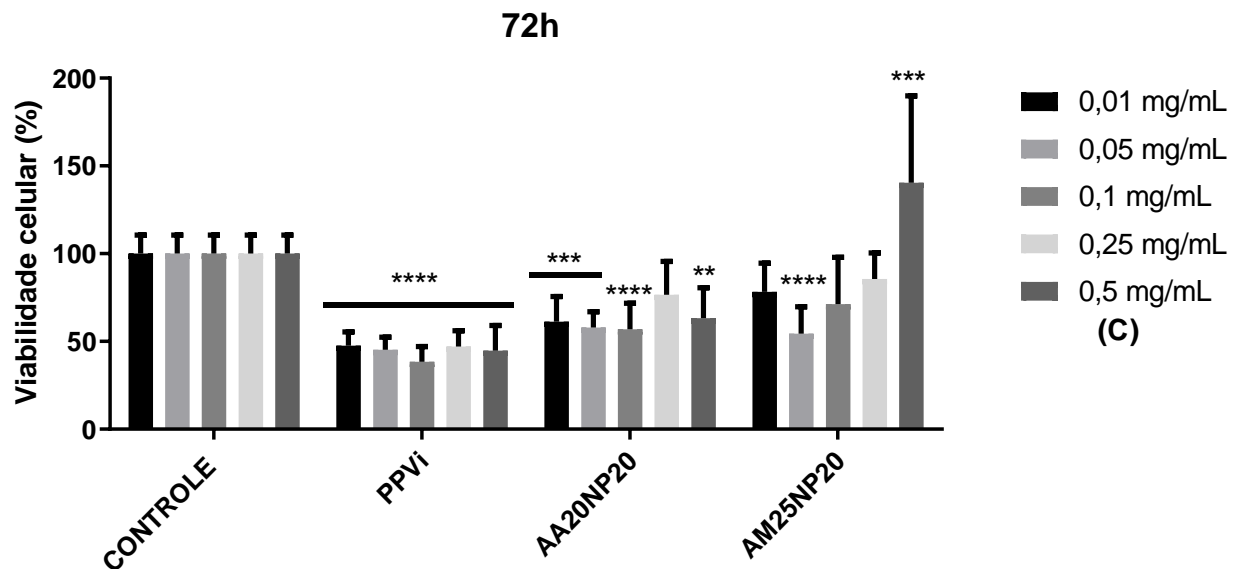
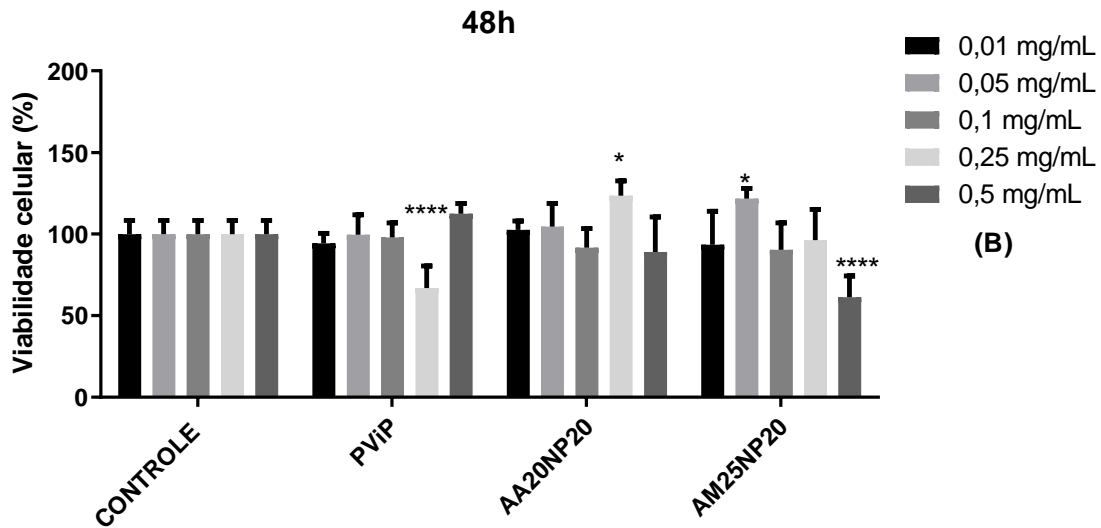
Os resultados dos testes de ambas as linhagens, quando associados, corroboram a avaliação mais detalhada de citotoxicidade em ensaio *in vitro*, bem como um comparativo com a linhagem tumoral de câncer de pele não melanoma, também utilizada neste estudo (A431).

Após 24 horas de exposição dos tratamentos, foi possível observar que na amostra 1 (PPVi) ocorreu uma diminuição de 40% para todas as concentrações, a amostra 2 (AA20NP20) diminuiu 40 % nas concentrações iniciais, 20% na intermediária e um aumento celular, ou seja, proliferação na maior concentração.

Para a amostra 3 (AM25NP20), a diminuição da viabilidade celular foi de quase 40% para todas as concentrações.

Figura 25 - Avaliação da atividade citotóxica das amostras poliméricas (amostra 1 = PpVi; amostra 2 = AA20NP20; amostra 3 = AM25NP20b) em células de queratinócitos humano (HaCat) após (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72h de exposição nas concentrações de 0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL. Os asteriscos estão relacionados aos diferentes intervalos de confiança associados à significância estatística: * para 95% com $p \leq 0,05$, ** 99% com $p \leq 0,01$, ***99,9% com $p \leq 0,001$ e ****99,99% com $p \leq 0,0001$.





No tempo de 48 h foi possível avaliar que na amostra 1 só ocorreu uma redução de 35% na concentração 0,25 mg/mL, para a amostra 2 não ocorreu nenhuma redução significativa, amostras 3 nas concentrações iniciais não ocorreu redução significativa, apresentando apenas na maior concentração uma redução da viabilidade celular de 40%.

Para o tratamento de 72 h da linhagem de HaCat, observou-se que ocorreu uma toxicidade de 30 a 55% na amostra 1 nas concentrações analisadas, para a amostra 2 a redução foi de apenas 40%, e na amostra 3, apenas a concentração 0,05 mg/mL apresentou uma redução de 50%.

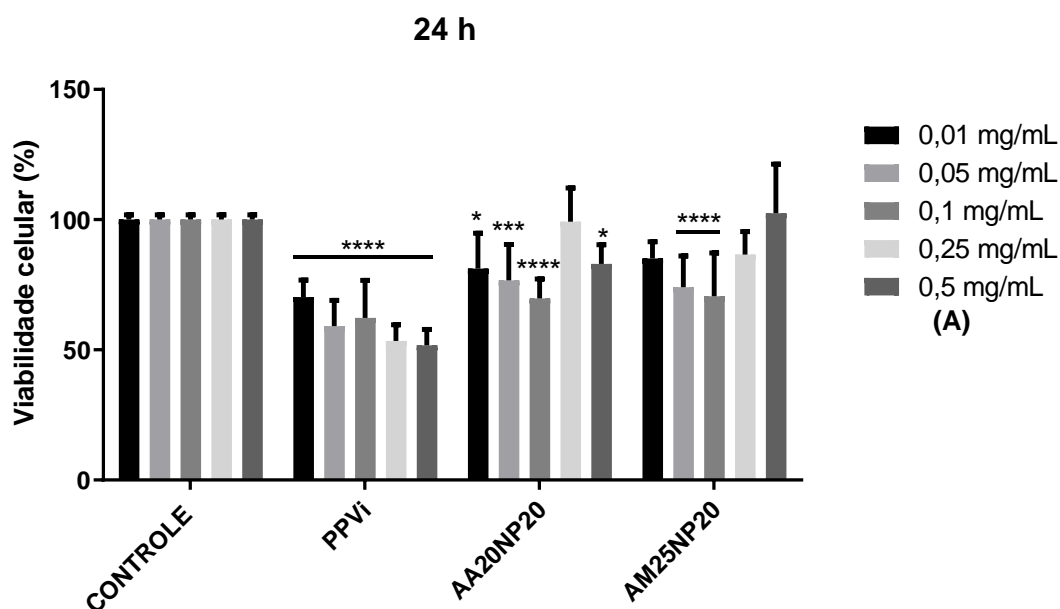
4.4.3. Viabilidade celular na linhagem A431

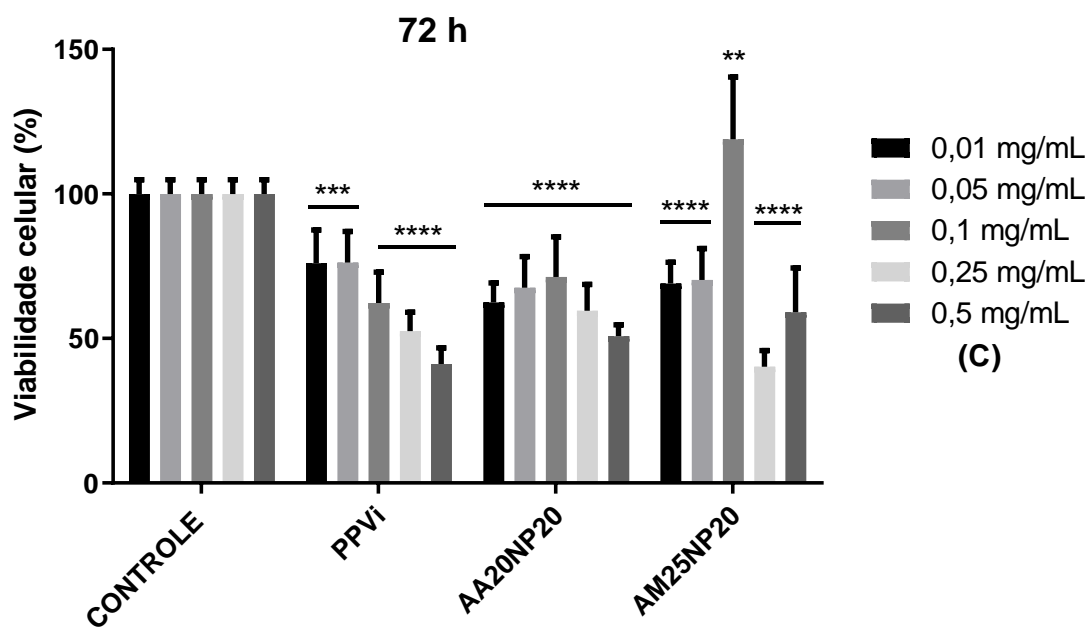
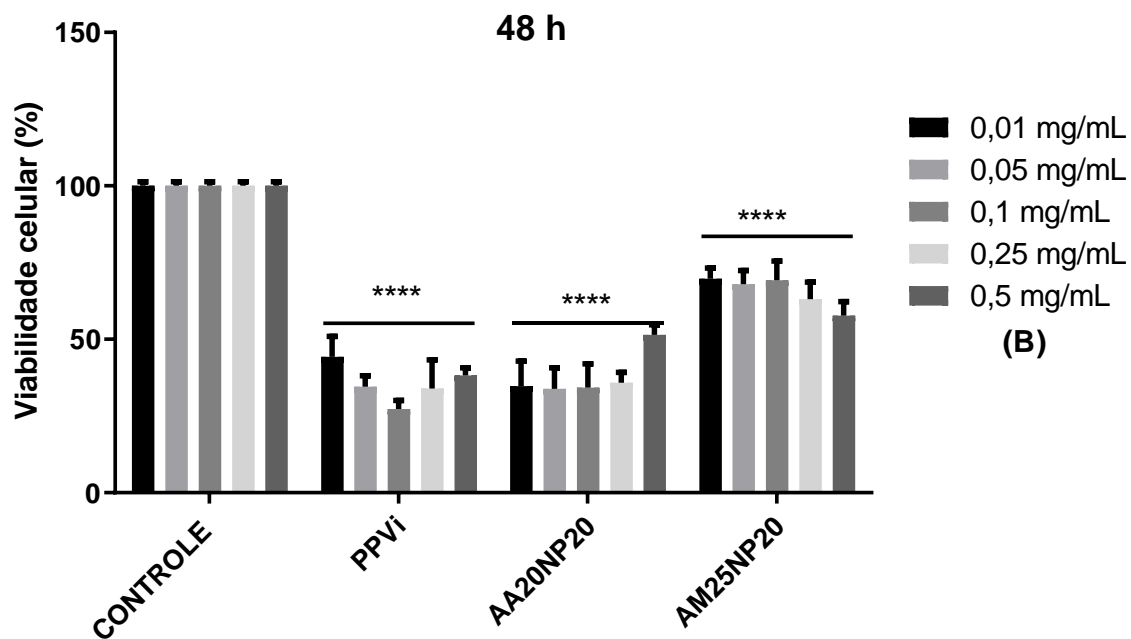
Uma terceira linhagem, com características tumorais, foi utilizada neste estudo foi a de câncer de pele não melanoma (A431), também foi testada nas mesmas condições das duas linhagens não tumorais citadas anteriormente.

No tempo de 24 h houve uma redução de 30 a 50% para todas as concentrações na amostra 1 (PPVi), enquanto na amostra 2 (AA20NP20) apenas na concentração de 0,1 mg/mL foi significativa com aproximadamente 30%, e as outras não apresentaram alterações.

Para a amostra 3 (AM25NP20) apenas as concentrações 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, apresentaram redução de aproximadamente 30% ambas (Figura 26).

Figura 26 - Avaliação da atividade citotóxica das amostras de poliméricas (amostra 1 = PpVi; amostra 2 = AA20NP20; amostra 3 = AM25NP20b) em células de câncer de pele não melanoma (CPNM, A431) humano após (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72h de exposição nas concentrações de 0,01 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL. Os asteriscos estão relacionados aos diferentes intervalos de confiança associados à significância estatística: * para 95% com $p \leq 0,05$, ** 99% com $p \leq 0,01$, ***99,9% com $p \leq 0,001$ e ****99,99% com $p \leq 0,0001$.





Para o tratamento de 48 h, desta linhagem, obteve-se uma toxicidade para todas as amostras variando de 20 a 50% nas concentrações analisadas, onde na amostra 1 o resultado mais significativo se apresentou na concentração 0,1 mg/mL com 70%.

Na amostra 2, a viabilidade foi de 70% para as quatro primeiras concentrações, e na amostra 3, a maior concentração foi de aproximadamente 40% .

Com base nos dados do tratamento de 72 h, foi possível observar que a viabilidade variou de 25 a 60% na amostra 1, sendo, na maior concentração, a maior toxicidade apresentada, para a amostra 2, não ocorreu uma redução significativa para as concentrações iniciais, apenas nas duas últimas que a toxicidade foi de aproximadamente 50% e, na amostra 3, apenas na concentração 0,25 mg/mL foi significativa a diminuição de 60%.

O encapsulamento das nanopartículas mostra uma melhoria na estabilidade térmica e na biocompatibilidade das nanopartículas. Sob este ponto de vista, os ensaios *in vitro* feitos com diferentes linhagens celulares e não mostraram toxicidade representativa para células não tumorais.

A partir destes resultados, que podem ser usados para outros estudos biológicos como testes *in vivo*, podem ser traçados objetivos mais específicos para a determinação do dano celular em concentrações onde a redução celular foi significativa, e nas outras concentrações utilizadas que não mostraram qualquer dano podem ser consideradas para usos em aplicações biomédicas que dependem fortemente da sua capacidade citotóxica.

Estudos mostram que partículas de magnetita abaixo de 50 µg/ml mostram uma viabilidade celular aumentada, provavelmente devido ao papel do ferro como essencial para o ciclo de vida celular.¹⁶⁶

Em concentrações elevadas esse processo pode ser revertido e agir como iniciador para reações de Fenton, gerando alterações no ciclo de vida e crescimento celulares.

Diversos autores mostram que a concentração celular de nanopartículas é importante para a citotoxicidade. Em baixas concentrações, o organismo lida com nanopartículas por fagocitose, mas em concentrações mais elevadas os mecanismos de limpeza celulares começam a ser prejudicados.¹⁶⁷

De acordo com a Organização Internacional para Padronização (ISO 10993-5:2009), materiais que exibam uma viabilidade celular igual ou superior a 70% em relação ao grupo de controle (100% de viabilidade), podem ser considerados não citotóxicos.¹⁶⁸

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1. Considerações Finais

A técnica de polimerização empregada com neste trabalho mostrou-se capaz de realizar o encapsulamento individual das nanopartículas magnéticas usando poli(pivalato de vinila) como matriz polimérica.

Os resultados experimentais indicaram a formação de uma fase espinélica nas nanopartículas de magnetita, com distribuição uniforme de tamanho, entre 6 e 8 nm, boas propriedades magnéticas, saturação magnética elevadas (aproximadamente 30-81 emu/g, dependendo da fração de magnética na amostra) e comportamento superparamagnético à temperatura ambiente.

Além disso, as propriedades superparamagnéticas, que são importantes para aplicações como emboloterapia e hipertermia, não se alteram após o processo de polimerização em emulsão.

Foi demonstrado que as nanopartículas de magnetita foram encapsuladas corretamente e individualmente usando ácidos carboxílicos polimerizáveis como o acrílico e metacrílico como agentes de cobertura, o que pode melhorar a resposta magnética dos materiais magnetopoliméricos e adicionalmente reduzir a lixiviação da magnetita durante a síntese dos nanocompósitos.

De acordo com os ensaios de citotoxicidade, a viabilidade celular elevada indica que as possibilidades de aplicação biomédicas são promissoras, uma vez que o desempenho dos materiais poliméricos sintetizados age de maneira satisfatória em relação às linhagens usadas no estudo, como a fibroblasto (FIBRO), o queratinócito humano (HaCaT) e o câncer de pele não melanoma (A431), exibindo viabilidades celulares superiores a 70% frente a estas linhagens.

Aplicações de materiais poliméricos em áreas biomédicas tem mostrado um aumento crescente ao longo das últimas décadas. Uma classe recente, a de materiais magnetopoliméricos tem encontrado um nicho específico dentro das terapias médicas dos mais diversos tipos, entre elas, terapias contra o câncer.

Para algumas destas terapias, como a emboloterapia, a morfologia apresenta um desafio importante pois o produto deve possuir forma esférica a fim de ser empregada com sucesso em procedimentos cirúrgicos. Para outras aplicações, o magnetismo é o aspecto predominante, como no caso da hipertermia.

Neste trabalho foram feitos diversos estudos experimentais sobre rotas sintéticas e caracterização das partículas magnéticas de magnetita, de homopolímeros de pivalato de vinila, bem como os nanocompósitos com propriedades magnéticas resultante das reações em emulsão à base de poli(pivalato de vinila) e a magnetita.

Nanopartículas magnéticas de magnetita apresentando uma estrutura espinélica, foram sintetizadas e verificou-se que apresentavam caráter superparamagnético, devido ao tamanho da partícula, determinado por DRX, e pelo magnetismo, determinado por estudo de magnetometria. Estas nanopartículas recobertas com ácido metacrílico foram encapsuladas em matrizes de poli(pivalato de vinila).

Os materiais magnetopoliméricos exibem elevada estabilidade térmica e, em relação ao controle da morfologia, é necessário considerar um efeito secundário de oxidação do iniciador persulfato de potássio sobre as nanopartículas de magnetita, o que provoca uma menor disponibilidade de radicais para promover a polimerização do pivalato. Para contornar esse efeito, usou-se uma quantidade maior de iniciador no meio reacional.

5.2. Perspectivas de Trabalhos Futuros

A síntese de materiais magnetopoliméricos com características magnéticas apropriadas para uso em terapias biomédicas apresentou sucesso. Apesar disto, mais estudos devem ser realizados a fim de entender alguns dos efeitos do iniciador sobre as nanopartículas e do efeito dos materiais magnéticos em mecanismos de polimerização envolvendo partículas funcionalizadas com ácidos carboxílicos.

É necessário, ainda, caracterizar os materiais poliméricos com partículas funcionalizadas com ácido acrílico e entender, de modo, análogo ao que foi feito neste trabalho, os fatores que influenciaram nos diversos sistemas reacionais envolvidos na síntese de materiais em emulsão.

Os testes *in vitro* se mostraram exitosos, uma vez que foram capazes de afetar células tumorais de modo rápido, o que indica a possibilidade de um tratamento inicial onde seja necessário uma intervenção inicial rápida. Por conta de tais características pode-se supor que o uso como agente de hipertermia pode ser eficiente, necessitando de testes *in vivo*, a fim de confirmar essa possibilidade e testes avaliativos de biodistribuição deste material.

Referências bibliográficas

1. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L. V., Muller, R. N., Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (6), 2064–2110.
2. Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., Sen, T., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, *63* (1-2), 24–46.
3. Ma, Z., Liu, H., Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine *China Particuology* **2007**, *05* (1-2), 1–10.
4. Bohara, R. A., Thorat, N. B., Pawar, S. H., Role of functionalization: strategies to explore potential nano-bio applications of magnetic nanoparticles. *RSC Advances* **2016**, *6*, 43989–44012.
5. Kayal, S., Ramanujan, R.V., Anti-Cancer Drug Loaded Iron–Gold Core–Shell Nanoparticles (Fe@Au) for Magnetic Drug Targeting. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2010**, *10* (9), 5527–5539.
6. Audonnet, V., Malaquin, L., Viovy, J.-L., Polymeric coatings on micro- and nanometric particles for bioapplications. *Bioanalytical Reviews* **2011**, *3* (2-4), 41–66.
7. Andrzejewski, B., Bednarski, W., Kazmierczak, M., Pogorzelec-Glas, K., Hilczer, B., Jurga, S., Matczak, M., Łeska, B., Pankiewicz, R., Kepinski, L., Magnetization Enhancement in Magnetite Nanoparticles capped with Alginic Acid. *Composites: Part B* **2014**, *147*, 20.
8. Basu, S., Chatterjee, S., Bandyopadhyay, A., Sarkar, K., Potential application of superparamagnetic nanoparticles for extraction of bacterial genomic DNA from contaminated food and environmental samples. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2012**, *93* (4), 6.
9. Toma, H. E., Magnetic nanohydrometallurgy: a nanotechnological approach to elemental sustainability. *Green Chemistry* **2015**, *17* (4), 2027–2041.
10. Narkhede, A. A., Sherwood, J.A., Antone, A., Coogan, K.R., Bolding, M.S., Deb, S., Bao, Y., Rao, S.S., Role of Surface Chemistry in Mediating the Uptake of Ultrasmall Iron Oxide Nanoparticles by Cancer Cells. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2019**, *11* (19), 17157–17166.
11. Togashi, T., Naka, T., Asahina, S., Sato, K., Takami, S., Adschiri, T., Surfactant-assisted one-pot synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticle clusters with tunable cluster size and magnetic field sensitivity. *Dalton Transactions* **2011**, *40* (5), 1073–1078.
12. Wang, Y., Ju, Z., Cao, B., Gao, X., Zhu, Y., Qiu, P., Xu, H., Pan, P., Bao, H., Wang, L., Mao, C., Ultrasensitive Rapid Detection of Human Serum Antibody Biomarkers by Biomarker-Capturing Viral Nanofibers. *ACS Nano* **2015** *9*(4), 4475–4483.
13. Castellanos-Rubio, I., Rodrigo, I., Olazagoitia-Garmendia, A., Arriortua, O., Gil de Muro, I., Garitaonandia, J. S., Insausti, M., Highly Reproducible Hyperthermia Response in Water, Agar and Cellular Environment by Discretely PEGylated Magnetite Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2020**, *12* (25), 27917–27929.
14. Kaur, P., Aliru, M. L., Chadha, A. S., Asea, A., Krishnan, S., Hyperthermia Using Nanoparticles – Promises and Pitfalls. *International Journal of Hyperthermia* **2016** *32* (1), 76–88.
15. Allen, T. M., Cullis, P. R., Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. *Science* **2004**, *303* (5665), 1818–1822.
16. Hu, A., Yee, G.T., Lin, W., Magnetically Recoverable Chiral Catalysts Immobilized on Magnetite Nanoparticles for Asymmetric Hydrogenation of Aromatic Ketones. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (36), 12486–12487.
17. Souza, W. F.; Pereira, M. C.; Oliveira, L. C. A., Amphiphilic catalysts based on onion-like carbon over magnetic iron oxide for petrochemical industry use. *Fuel* **2012**, *96*, 604–607.
18. Dhakshinamoorthy, A., Navalon, S., Alvaro, M., Garcia, H., Metal Nanoparticles as Heterogeneous Fenton Catalysts. *ChemSusChem* **2012**, *5* (1), 46–64.

19. Wang, Y.; Davis, B. H., Fischer-Tropsch synthesis. Conversion of alcohols over iron oxide and iron carbide catalysts. *Applied Catalysis A: General* **1999**, *180* (1-2), 277-285.
20. Moodley, P., Scheijen, F.J.E., Niemantsverdriet, J.W., Thüne, P.C. , Iron oxide nanoparticles on flat oxidic surfaces—Introducing a new model catalyst for Fischer–Tropsch catalysis. *Catalysis Today* **2010**, *154* (1-2), 142-148.
21. Goode, J. A., Matson, M. B., Embolisation of cancer: what is the evidence? *Cancer Imaging* **2004**, *4* (2), 133-141.
22. Lookstein, R. A., Guller, J., Embolization of complex vascular lesions. *The Mount Sinai Journal of Medicine* **2004**, *71* (1), 17-28.
23. Tam, K. Y.; Leung, K. C.; Wang, Y. J., Chemoembolization agents for cancer treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, *44* (1-2), 1.
24. Derdeyn, C. P., Graves, V. B., Salamat, M. S., Rappe, A., Collagen-Coated Acrylic Microspheres for Embolotherapy: In Vivo and In Vitro Characteristics. *American Journal of Neuroradiology* **1997**, *18*, 647-653.
25. Chen, X., Lv, H., Ye, M., Wang, S., Ni, E., Zeng, F., Cao, C., Luo, F., Yan, J., Novel superparamagnetic iron oxide nanoparticles for tumor embolization application: Preparation, characterization and double targeting. *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, *426*, 248–255.
26. Rafieepour, A., Azari, M.R., Peirovi, H., Khodaghohi, F., Jaktaji, J.P., Mehrabi, Y., Naserzadeh, P., Mohammadian, Y., Investigation of the effect of magnetite iron oxide particles size on cytotoxicity in A549 cell line. *Toxicology and Industrial Health* **2019**, *35* (11-12), 703-713
27. Yarjanli, Z., Ghaedi, K., Esmaili, A., Rahgozar, S., Zarrabi, A., Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. *BMC Neuroscience* **2017**, *18* (51), 12.
28. Resende, G., Dutra, G. V. S., Neta, M. S. B., Araújo, O.A., Chaves, S.B., Machado, F., Well Defined Poly(Methyl Methacrylate)-Fe₃O₄/Poly(Vinyl Pivalate) Core–Shell Superparamagnetic Nanoparticles: Design and Evaluation of In Vitro Cytotoxicity Activity against Cancer Cells *Polymers* **2020**, *12*.
29. Rehana, D., Haleel, A.K, Rahiman, .K., Hydroxy, carboxylic and amino acid functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and *in vitro* anti-cancer studies. *The Journal of Chemical Sciences* **2015**, *127* (7), 1155–1166.
30. Sahu, D., Kannan,G.M., Tailang, M., Vijayaraghavan, R., In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles: A Comparison between Particle Size and Cell Type. *Journal of Nanoscience* **2016**, *9*.
31. Ma, Z., Bai, J., Jiang, X., Monitoring of the Enzymatic Degradation of Protein Corona and Evaluating the Accompanying Cytotoxicity of Nanoparticles. *ACS Applied Materials and Interfaces* **2015**, *7* (32,), 17614–17622.
32. Vazquez-Muñoz. R., B., B., Juárez-Moreno, K., García-García, M., Morales, J.D.M., Bogdanchikova, N., Huerta-Saquero, A., Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter? *Toxicology Letters* **2017**, *276*, 11-20.
33. Mackay, M. E., Tuteja, A., Duxbury, P. M., Hawker, C. J., Horn, B. V., Guan, Z., Chen, G., Krishnan, R. S. , General Strategies for Nanoparticle Dispersion. *Science* **2006**, *311* (5768), 1740-1743.
34. Abdalla, M. A., Jaafar, M. H., Al-Othman, Z. A, Alfadul, S. M., Khan, M. A., New route for preparation and characterization of magnetite nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry* **2011**, *4* (2), 235-237.
35. Lassalle, V. L., Zysler, R. D., Ferreira, M. L., Novel and facile synthesis of magnetic composites by a modified co-precipitation method. *Materials Chemistry and Physics* **2011**, *130* (1-2), 624–634.
36. Daou, T. J., Pourroy, G., Bégin-Colin, S., Grenèche, J. M., Ulhaq-Bouillet, C., Legare, P., Bernhardt, P., Leuvrey, C., Rogez, G., Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles. *Chemistry of Materials* **2006** *18* (18), 4399–4404.

37. Yang, X., Jiang, W., Liu, L., Chen, B., Wu, S., Sun, D., Li, F., One-step hydrothermal synthesis of highly water-soluble secondary structural Fe₃O₄ nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2012**, 324 (14), 2249-2257.
38. Abu-Much, R., Gedanken, A., Sonochemical Synthesis under a Magnetic Field: Structuring Magnetite Nanoparticles and the Destabilization of a Colloidal Magnetic Aqueous Solution under a Magnetic Field. *Journal of Physical Chemistry C* **2008**, 112 (1), 35-42.
39. Shafi, K. V. P. M.; Wizek, S.; Prozorov, T.; Gedanken, A., The use of ultrasound radiation for the preparation of magnetic fluids. *Thin Solid Films* **1998**, 318 (1-2), 38-41.
40. Livage, J., Henry, M., Sanche, C., Sol-gel chemistry of transition metal oxides. *Progress in Solid State Chemistry* **1988**, 18 (4), 259-342.
41. Raja, K.; Verma, S.; Karmakar, S.; Kar, S.; Das, S. J.; Bartwal, K. S., Synthesis and characterization of magnetite nanocrystals. *Crystal Research and Technology* **2011** 46 (5), 497-500.
42. Salado, J.; Insausti, M.; de Muro, I. G.; Lezama, L.; Rojo, T., Synthesis and magnetic properties of monodisperse Fe₃O₄ nanoparticles with controlled sizes. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2008**, 354 (47-51), 5207-5209.
43. Cheng, Z., Chu, X., Zhong, H., Yin, J., Zhang, Yu., Xu, J. , Synthesis of Fe₃O₄ nanoflowers by a simple and novel solvothermal process. *Materials Letters* **2012**, 76, 90-92.
44. Jean, M., Nachbaur, V., Le Breton, J. M. , Synthesis and characterization of magnetite powders obtained by the solvothermal method: Influence of the Fe³⁺ concentration. *Journal of Alloys and Compounds* **2012**, 513 425-429.
45. Costo, R., Bello, V., Robic, C., Port, M., Marco, J. F., Morales, M. P., Veintemillas-Verdaguer, S., Ultrasmall Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: Improving the Colloidal and Magnetic Properties. *Langmuir* **2012**, 28 (1), 178-185.
46. Banerjee, S., John, V. T., McPherson, G. L., O'Connor, C. J., Buisson, Y. S. L., Akkara, J. A., Kap, D. L., Polymer microsphere and polymer ferrite nanocomposite preparation by precipitation from water-in-oil microemulsions. *Colloid and Polymer Science* **1997**, 275 (10), 930-937.
47. Ferreira, G. R., Segura, T., Júnior, F. G. S., Umpierre, A. P., Machado, F., Synthesis of Poly(vinyl acetate)-Based Magnetic Polymer Microparticles. *European Polymer Journal* **2012**, 48 (12), 2050-2069.
48. Ferreira, G. R., Umpierre, A. P., Machado, F., Synthesis of Tailored Core-Shell Magnetic Microparticles for Intravascular Embolization. In *Supplemental Proceedings: Materials Processing and Interfaces, Volume 1 (ed TMS)*, John Wiley & Sons, Inc.: 2012; pp 345-352.
49. Neves, J. S., de Souza Jr., F.G., Suarez, P. A. Z., Umpierre, A. P., Machado, F., In situ Production of Polystyrene Magnetic Nanocomposites through a Batch Suspension Polymerization Process. *Macromolecular Materials and Engineering* **2011**, 296 (12), 1107-1118.
50. Figuerola, A., Di Corato, R., Manna, L., Pellegrino, T., From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacological Research* **2010**, 62 (02), 126-143.
51. Karaagac, O., Kockar, H., Effect of Synthesis Parameters on the Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism* **2012**, 25 (8), 2777-2781.
52. Prousek, J., Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure and Applied Chemistry* **2007**, 79, 12.
53. Betancourt-Galindo, R., Saldivar, R., Rodriguez-Fernandez, O.S., Ramos-de Valle, L.F., Preparation and Characterization of magnetic latexes using Styrene monomer. *Polymer Bulletin* **2004**, 51, 395-402.
54. Rosei, F., Nanostructured surfaces: challenges and frontiers in nanotechnology. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2004**, 16 (17), S1373-S1436.
55. Buzea, C., Pacheco, I. I., Robbie, K., Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* **2007**, 2 (4), MR17 - MR71.

56. Babick, F., Mielke, J., Wohlleben, W., Weigel, S., Hodoroaba, V.-D., How reliably can a material be classified as a nanomaterial? Available particle-sizing techniques at work. *Journal of Nanoparticle Research* **2016**, *18*.
57. Chrissafis, K., Bikiaris, D., Can nanoparticles really enhance thermal stability of polymers? Part I: An overview on thermal decomposition of addition polymers. *Thermochimica Acta* **2011**, *523* (1-2), 1-24.
58. Tiwari, J. N., Tiwari, R. N., Kim, K. S., Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science* **2012**, *57* 724–803.
59. Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., Danquah, M. K., Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol* **2018**, *9*, 1050–1074.
60. Dehsari, H. S., Ksenofontov, V., Möller, A., Jakob, G., Asadi, K., Determining Magnetite/Maghemite Composition and Core–Shell Nanostructure from Magnetization Curve for Iron Oxide Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* **2018**, *122*, 28292–28301.
61. Saxena, N., Singh, M., Efficient Synthesis of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles under Air for Biomedical Applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2017**, *429*, 166-176.
62. Chen, J. P., Sorensen, C. M., Klabunde, K. J., Hadjipanayis, G. C., Devlin, E., Kostikas, A., Size-dependent magnetic properties of MnFe₂O₄ fine particles synthesized by coprecipitation. *Physical Review B* **1996**, *54* (13), 9288–9296.
63. Cotton, F. A., Wilkinson, G., Gaus, P. L., *Basic Inorganic Chemistry*. 3rd ed.; Wiley: 1995.
64. Huheey, J. E., Keiter, E. A., Keiter, R. L., *Inorganic Chemistry - Principles of Structure and Reactivity*. 4th ed.; Harper Collins College Publisher: 1993.
65. Sharifi, I., Shokrollahi, H., Doroodmand, M. M., Safi, R., Magnetic and structural studies on CoFe₂O₄ nanoparticles synthesized by co-precipitation, normal micelles and reverse micelles methods. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2012**, *324* (10), 1854–1861.
66. Carter, C. B., Norton, M. G., *Ceramic Materials - Science and Engineering*. Springer Science+Business Media, LLC.: 2007.
67. Joy, P. A., Kumar, P. S. A., Date, S. K., The relationship between field-cooled and zero-field-cooled susceptibilities of some ordered magnetic systems. *Journal of Physics: Condensed Matter* **1998** *10*, 11049–11054.
68. Mørup, S., Hansen, M.K., Frandsen, C., Magnetic interactions between nanoparticles. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2010**, *1*, 182–190.
69. Odian, G., *Principles of Polymerization*. 4th ed.; John Wiley & Sons, INC.: Hoboken, New Jersey, 2004.
70. IUPAC, Compendium of Chemical Terminology In *the "Gold Book"* [Online] 2nd ed.; McNaught, A. D., Wilkinson, A., Ed. Blackwell Scientific Publications: Oxford 2019. (accessed 24/05/2021).
71. Braun, D., Cherdrón, H., Rehahn, M., Ritter, H., Voit, B., *Polymer Synthesis: Theory and Practice Fundamentals, Methods, Experiments*. 4th ed.; Springer: 2005.
72. Canevarolo Jr., S. V., *Polymer Science - A Textbook for Engineers and Technologists*. Hanser Publications: 2020.
73. Canevarolo, S. V., *Ciência dos Polímeros. Um Texto Básico Para Tecnólogos e Engenheiros*. 2006.
74. Rudin, A., Choi, P., *The elements of polymer science and engineering*. 3rd ed.; 2013.
75. Ravve, A., *Principles of Polymer Chemistry*. 3rd ed.; Springer Science+Business Media, LLC: 2012.
76. Machado, F., Lima, E. L., Pinto, J. C., Uma Revisão Sobre os Processos de Polimerização em Suspensão. *Polímeros* **2007**, *17* (2), 166-179.
77. Tadros, T. F., *Emulsion Science and Technology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim - Germany, 2009

78. Urban, D.; Takamura, K., *Polymer Dispersions and Their Industrial Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, 2002.
79. Myers, D., *Surfaces, Interfaces and Colloids: Principles and Applications*. 2nd ed.; John Wiley & Sons: New York, 1999.
80. El-Hoshoudy, A. N. M. B., Emulsion Polymerization Mechanism. In *Recent Research in Polymerization*, Intechopen: 2018.
81. K. Holmberg, B. J., B. Kronberg, B. Lindman, *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. 2 ed.; John Wiley & Sons: New York, 2002.
82. Malmsten, M., *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*. Marcel Dekker, Inc.: New York, 2002.
83. Arora, S., Gesthuisen, R., Engell, S., Model based operation of emulsion polymerization reactors with evaporative cooling: Application to vinyl acetate homopolymerization. *Computers and Chemical Engineering* **2007**, *31* 552–564.
84. Sihler, S., Lindén, M., Ziener, U., Highly Transparent w/o Pickering Emulsions without Adjusting the Refractive Index of the Stabilizing Particles. *Langmuir* **2017**, *33*, 10302–10310.
85. Chern, C. S., Emulsion polymerization mechanisms and kinetics. *Progress in Polymer Science* **2006**, *31* (5), 443–486.
86. Kumar, A., Gupta, R. K., *Fundamentals of Polymer Engineering*. 2nd Ed. Revised and Expanded ed.; MARCEL DEKKER, INC.: 2003.
87. Chern, C.-S., *Principles and applications of emulsion polymerization* John Wiley & Sons, Inc: New Jersey, 2008.
88. McClements, D. J., Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter* **2011**, *7*, 2297–2316.
89. Tadros, T. F., *Emulsion Formation and Stability*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: 2013
90. Khan, U. S., Amanullah, Manan, A., Khan, N., Mahmood, A., Rahim, A., Transformation mechanism of magnetite nanoparticles. *Materials Science-Poland* **2015**, *33* (2), 278-285.
91. Ribeiro, G. A. P., As Propriedades Magnéticas da Matéria: um Primeiro Contato. *Revista Brasileira de Ensino de Física* **2000**, *22* (03), 299-305.
92. Ali, A., Zafar, H., Zia, M., Haq, I. U., Phull, A. R., Ali, J. S., Hussain, A., , Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. . *Nanotechnology, Science and Applications* **2016**, *9*, 49–67.
93. Aisida, S. O., Akpae, P. ., Ahmad, I., Zhao, T-k., Maaza, M., Ezema, F. I., Bio-inspired encapsulation and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *European Polymer Journal* **2020**, *122*
94. Casbeer, E., Sharma, V. K., Li, Z.-X., Synthesis and photocatalytic activity of ferrites under visible light: A review. *Separation and Purification Technology* **2012**, *87* 1–14.
95. Petcharoen, K.; Sirivat, A., Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. *Materials Science and Engineering B*. **2012** *177* (5), 421-427.
96. Kahani. S. A., Y., Z., A Comparison between Chemical Synthesis Magnetite Nanoparticles and Biosynthesis Magnetite. *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2014**.
97. Ghazanfari, M. R., Kashefi, M., Shams, S. F., Jaafari, M. R., Perspective of Fe₃O₄ Nanoparticles Role in Biomedical Applications. *Biochemistry Research International* **2016**, *2016*, 32
98. Gnanaprakash, G., Philip, J., Jayakumar, T., Raj, B., Effect of Digestion Time and Alkali Addition Rate on Physical Properties of Magnetite Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111* (28), 7978-7986.
99. Agrawal, D. C., Maity, D., Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2007**, *308* (1), 46-55.

100. Ali, A., Zafar, H., Zia, M., Haq, I. U., Phull, A. R., Ali, J. S., Hussain, A., Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications* **2016**, *9*, 49–67.
101. Bonvin, D., Hofmann, H., Ebersold, M. M., Optimisation of aqueous synthesis of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Nanoparticle Research* **2016**, *18*, 376.
102. El-Boubbou, K., Al-Kaysi, R. O., Al-Muhanna, M. K., Bahhari, H. M., Al-Romaeh, A. I., Darwish, N., Al-Saad, K. O., Al-Suwaidan, S. D., Ultra-Small Fatty Acid-Stabilized Magnetite Nanocolloids Synthesized by In Situ Hydrolytic Precipitation. *Journal of Nanomaterials* **2015**, *2015*, 11.
103. Burguera, J. L., Burguera, M., Analytical applications of emulsions and microemulsions. *Talanta* **2012**, *96* 11– 20.
104. Mahdavian, A. R., Mirrahimi, M. A., Efficient separation of heavy metal cations by anchoring polyacrylic acid on superparamagnetic magnetite nanoparticles through surface modification. *Chemical Engineering Journal* **2010**, *159* (1-3), 264-271.
105. Shen, Y. F.; Tang, J.; Nie, Z. H.; Wang, Y. D.; Ren, Y.; Zuo, L., Preparation and application of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles for wastewater purification. *Separation and Purification Technology* **2009**, *68* (3), 312-319.
106. Zhang, F., Zhu, Z., Dong, Z., Cui, Z., Wang, H., Hu, W., Zhao, P., Wang, P., Wei, S., Li, R., Ma, J., Magnetically recoverable facile nanomaterials: Synthesis, characterization and application in remediation of heavy metals. *Microchemical Journal* **2011**, *98* (2), 328-333.
107. Li, W., Liang, S., Zhang, W., Zhao, X., Zhang, H., Lv, X. , Liquid embolic agent Fe₃O₄-EVOH for endovascular arteriovenous malformation embolisation: Preliminary evaluation in an in vivo swine rete mirabile model. *The Neuroradiology Journal* **2020**, *33* (4), 306-310.
108. Wei, H., Brunsa, O.T., Kaulb,M.G., Hansen, E.C., Barch, M., Wisniowska, A., Chen, O., Chen, Y., Li, N., Okada, S., Cordero, J.M., Heine, M., Farrar, C.T., Montana, D.M., Adam, G., Ittrich, H., Jasanoff, A., Nielsen, P., Bawendi, M.G., Exceedingly small iron oxide nanoparticles as positive MRI contrast agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2017** *114* (9), 2325–2330.
109. Weissleder, R., Stark, D.S., Engelstad, B.L., Bacon, B.A., Compton, C.C., White, D.L., Jacobs, P., Lewis, J., Superparamagnetic Iron Oxide: Pharmacokinetics and Toxicity. *American Roentgen Ray Society* ;, *January* **1989** *152*, 167-173.
110. Kudr, J., Haddad, Y., Richtera, L., Heger, Z., Cernak, M., Adam, V., Zitka, O., Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications. *Nanomaterials* **2017**, *7* (243), 29.
111. Schwaminger, S. P., Bauer, D. , Fraga-García, P. , Wagner, F. E. , Berensmeier, S., Oxidation of magnetite nanoparticles: impact on surface and crystal properties. *CrystEngComm* **2016**, (2).
112. Letti, C. J., Paterno, L.G. , Pereira-da-Silva, M.A. , Morais, P.C. , Soler, M.A.G. , The Role of Polymer Films on the Oxidation of Magnetite Nanoparticles. *Journal of Solid State Chemistry* **2017**, *246*, 57-64.
113. Aguilar-Arteaga, K., Rodriguez, J.A., Barrado, E., Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta* **2010**, (674), 157–165.
114. Ali, L. M., Marzola, P., Nicolato, E., Fiorini, S., Heras Guillamón, M. de las, Piñol, R., Palacio, F. , Polymer-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as T₂ contrast agent for MRI and their uptake in liver. *Future Science OA* **2017**, *FS0235*.
115. Altan, C. L., Gurten, B., Sadza, R., Yenigul, E., Sommerdijk, N.A.J.M., Bucak, S., Poly(acrylic acid)-directed synthesis of colloidally stable single domain magnetite nanoparticles via partial oxidation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2016**, *16*, 366.
116. Wen, C., *Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials*. Woodhead Publishing: 2015.
117. Chen, H., Yuan, L., Song, W., Wu, Z., Li, D., Biocompatible polymer materials: Role of protein–surface interactions. *Progress in Polymer Science* **2008**, *33* 1059–1087.

118. Pu, H.-T.; Jiang, F.-J.; Yang, Z.-L., Preparation and properties of soft magnetic particles based on Fe₃O₄ and hollow polystyrene microsphere composite. *Materials Chemistry and Physics* **2006**, *100* (1), 10-14.
119. Neto, W. S., Dutra, G. V. S., Jensen, A. T., Araújo, O.A., Garg, V., de Oliveira, A. C., Valadares, L. F., de Souza Jr., F.G., Machado, F., Superparamagnetic nanoparticles stabilized with free-radical polymerizable oleic acid-based coating. *Journal of Alloys and Compounds* **2018**, *739*, 1025-1036.
120. Karaagac, O., Kockar, H., Beyaz, S., Tanrisever, T. , A Simple Way to Synthesize Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Air Atmosphere: Iron Ion Concentration Effect *IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS* **2010**, *46* (12).
121. Pich, A.; Bhattacharya, S.; Ghosh, A.; Adler, H. J. P., Composite magnetic particles: 2. Encapsulation of iron oxide by surfactant-free emulsion polymerization. *Polymer* **2005**, *46* (13), 4596-4603.
122. Huang, J., Pen, H., Xu, Z., Yi, C., Magnetic Fe₃O₄/poly(styrene-co-acrylamide) composite nanoparticles prepared by microwave-assisted emulsion polymerization. *Reactive and Functional Polymers* **2008**, *68* (1), 332-339.
123. Patterson, A. L., The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination. *Physical Review* **1939**, *56* (10), 978-982.
124. Langford, J. I., Wilson, A. J. C., Scherrer after Sixty Years: A Survey and Some New Results in the Determination of Crystallite Size.
125. Araújo-Neto, R. P. S.-F., E.L.; Carvalho, J.F.; Pontes, T.R.F.; Silva, K.L.; Damasceno, I.H.M.; Egito, E.S.T.; Dantas, A.L.; Morales, M.A.; Carriço, A.S., Monodisperse sodium oleate coated magnetite high susceptibility nanoparticles for hyperthermia applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Material* **2014**, *364*, 72–79.
126. Lobato, N. C. C., Mansur, M.B., Ferreira, A.M., Characterization and Chemical Stability of Hydrophilic and Hydrophobic Magnetic Nanoparticles. *Materials Research* **2017**, *20* (3), 736-746.
127. Mahmed, N. H., O.; Lancok, A.; Hannula, S.P. , The magnetic and oxidation behavior of bare and silica-coated iron oxide nanoparticles synthesized by reverse co-precipitation of ferrous ion (Fe²⁺) in ambient atmosphere. . *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2014**, *353*, 15-22.
128. Vereda, F. d. V., J.; Morales, M.D.P.; Rull, F.; Hidalgo-Álvarez, R. , Synthesis and Characterization of Single-Domain Monocrystalline Magnetite Particles by Oxidative Aging of Fe(OH)₂. . *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 5843-5849.
129. Carvalho, M. D. H., F.; Ferreira, L.P.; Godinho, M.; Cruz, M.M. , Iron oxide nanoparticles: the Influence of synthesis method and size on composition and magnetic properties. . *Journal of Solid State Chemistry* **2013**, *201*, 144-152.
130. Gorski Christopher, A. S. M., M. , Determination of nanoparticulate magnetite stoichiometry by Mössbauer spectroscopy, acidic dissolution, and powder X-ray diffraction: A critical review. . *American Mineralogist* **2010**, *95*.
131. Liu, J., Scanning transmission electron microscopy and its application to the study of nanoparticles and nanoparticle systems. *Journal of Electron Microscopy* **2005**, *54* (3), 251-278.
132. Schüth, F.; Lu, A.; Salabas, E. L., Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie, International Edition* **2007**, *46* (8), 1222-1244.
133. Radoña, A., Łoński, S., Kądziołka-Gaweł, M., Gębara, P., Lis, M., Łukowiec, D., Babilas, R., Influence of magnetite nanoparticles surface dissolution, stabilization and functionalization by malonic acid on the catalytic activity, magnetic and electrical properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2020**, *607*
134. Ortiz, N., Susca, C., de Oliveira, K. M. R. , Bressiani, J. C., Study of the chemical stability of the magnetite used as adsorber to remove organic compounds from solutions. *Cerâmica* **2003**, *49* 216-222.

135. Salmimies, R., Mannila, M., Kallas, J., Hakkinen, A., Acidic dissolution of magnetite: experimental study on the effects of acid concentration and temperature. *Clays and Clay Minerals* **2011**, *59* (2).
136. Schwaminger, S. P., Syhr, C., Berensmeier, S. , Controlled Synthesis of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Magnetite or Maghemite? . *Crystals* **2020**, *10* (3).
137. Li Q, K. C., Horie S, Ogi T, Iwaki T, Okuyama K., Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles. *Scientific REPORTS* **2017**, *7*, 9894.
138. Wang, Y. M., Cao, X., Liu, G.H., Hong, R. Y., Chen, Y. M., Chen, X. F., Li, H. Z., Xue, B., Wei, D. G., Synthesis of Fe₃O₄ magnetic fluid used for magnetic resonance imaging and hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2011**, *323* (23), 2953–2959.
139. Bonvin, D., Hofmann, H., Ebersold, M. M., , Optimisation of aqueous synthesis of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. . *Journal of Nanoparticle Research* **2016** *18*.
140. Lan, Q., Liu, C. , Yang, F., Liu, S., Xu, J. , Sun, D., Synthesis of bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles and their application in pH-responsive Pickering emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *310* (1), 260-269.
141. Lee, D. H., Condrate, R. A. , FTIR spectral characterization of thin film coatings of oleic acid on glasses: I. Coatings on glasses from ethyl alcohol. *Journal of Materials Science* **1999**, *34* (1), 139-146.
142. Silvestein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 7th ed.; John Wiley & Sons: United States, 2005.
143. Lee, S. Y., Harris, M. T. , Surface modification of magnetic nanoparticles capped by oleic acids: Characterization and colloidal stability in polar solvents. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, *293* (2), 401–408.
144. Nakamoto, K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds – Part B: Applications in Coordination, Organometallic and Bioinorganic Chemistry*. 6th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, 2009; p 416.
145. Li, D., Jiang, D., Chen, M., Xie, J., Wu, Y., Dang, S., Zhang, J., An easy fabrication of monodisperse oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Materials Letters* **2010**, *64* (22), 2462–2466.
146. Roonasi, P., Holmgren, A., A Fourier transform infrared (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA) study of oleate adsorbed on magnetite nano-particle surface. *Applied Surface Science* **2009**, *255* 5891–5895.
147. Ramos-Gonzalez, R.; Garcia-Cerda, L. A.; Quevedo-Lopez, M. A., Study of the surface modification with oleic acid of nanosized HfO₂ synthesized by the polymerized complex derived sol–gel method. *Applied Surface Science* **2012**, *258* (16), 6034-6039.
148. Wu, N.; Fu, L.; Su, M.; Aslam, M.; Wong, K. C.; Dravid, V. P., Interaction of Fatty Acid Monolayers with Cobalt Nanoparticles. *Nano Letters* **2004**, *4* (2), 383–386.
149. Menczel, J. D., Prime, R. B., *Thermal Analysis Of Polymers - Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, 2009
150. Claudy, P., Létoffé, J. M., Camberlain, Y., Pascault, J. P., Glass transition of polystyrene versus molecular weight. *Polymer Bulletin* **1983**, *9* (4-5), 208-215.
151. Imada, M., Fujimori, A., Tokura, Y., Metal-insulator transitions. *Reviews of Modern Physics* **1998**, *70*.
152. Schwertmann, U.; Cornell, R. M., *Iron Oxides in the Laboratory – Preparation and Characterization*. VCH: New York, 1991.
153. Zhang, X., Chen, L., Yuan, L., Liu, R., Li, D., Liu, X.-P., Ge, G., Conformation-Dependent Coordination of Carboxylic Acids with Fe₃O₄ Nanoparticles Studied by ATR-FTIR Spectral Deconvolution. *Langmuir* **2019**, *35*, 5770-5778.
154. Li, Q., Kartikowati, C.W., Horie, S., Ogi, T., Iwaki, T., Okuyama, K., Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles. *Scientific Reports* **2017**, *7*.

155. Daoush, W. M., Co-Precipitation and Magnetic Properties of Magnetite Nanoparticles for Potential Biomedical Applications. *Journal of Nanomedicine Research* **2017**, 5 (3).
156. Mahdieh, A., Mahdavian, A.R., Salehi-Mobarakeh, H., Chemical modification of magnetite nanoparticles and preparation of acrylic-base magnetic nanocomposite particles via miniemulsion polymerization. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2017**, 426, 230-238.
157. Yuan, Y., Rende, D., Altan, C. L., Bucak, S., Ozisik, R., Borca-Tasciuc, D-A., Effect of Surface Modification on Magnetization of Iron Oxide Nanoparticle Colloids. *Langmuir* **2012**, 28, 13051–13059.
158. Abdolrahimi, M. V., M.; Slimani, S.; Ntallis, N.; Varvaro, G.; Laureti, S.; Meneghini, C.; Trohidou, K.N.; Fiorani, D.; Peddis, D., Magnetism of Nanoparticles: Effect of the Organic Coating. *Nanomaterials*. *Nanomaterials* **2021**, 11, 1787.
159. Corrêa, B. S., Costa, M. S., Cabrera-Pasca, G. A., Sena, C., Pinto, R. H. H., Silva, A. P. S., Junior, R. N. C., Ishida, L., Ramon, J. G. A., Freitas, R. S., Saiki, M., Matos, I. T., Corrêa, E. L., Carbonari, A. W., High-saturation magnetization in small nanoparticles of Fe₃O₄ coated with natural oils. *Journal of Nanoparticle Research* **2020**, 22, 15.
160. Alexiou, C., Arnold, W., Klein, R.J., Parak, F.G., Hulin, P., Bergemann, C., Erhardt, W., Wagenpfeil, S., Lubbe, A.S., Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting. *CANCER RESEARCH* **2000**, 60 (23), 6641–6648.
161. Briley-Saebo, K., Bjørnerud, A., Grant, D., Ahlstrom, H., Berg, T., Kindberg, G. M., Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxidenanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging. *Cell and Tissue Research* **2004**, 316, 315–323.
162. Gaharwar, U. S., Meena, R., Rajamani, P., Biodistribution, Clearance And Morphological Alterations Of Intravenously Administered Iron Oxide Nanoparticles In Male Wistar Rats. *International Journal of Nanomedicine* **2019**, 14, 9677–9692.
163. Khalid, M. K., Asad, M., Henrich-Noack, P., Sokolov, M., Hintz, W., Grigartzik, L., Zhang, E., Dityatev, A., van Wachem, B., Sabel, B. A., Evaluation of Toxicity and Neural Uptake In Vitro and In Vivo of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, 19, 2613.
164. Rajan, A., Sharma, M., Sahu, N. K., Assessing magnetic and inductive thermal properties of various surfactants functionalised Fe₃O₄ nanoparticles for hyperthermia. *Scientific Reports* **2020**, 10, 15045.
165. Farcas, L., Andón, F. T., Di Cristo, L., Rotoli, B.M., Bussolati, O., Bergamaschi, E., Mech, A., Hartmann, N.B., Rasmussen, K., Riego-Sintes, J., Ponti, J., Kinsner-Ovaskainen, A., Rossi, F., Oomen, A., Bos, P., Chen, R., Bai, R., Chen, C., Rocks, L., Fulton, N., Ross, B., Hutchison, G., Tran, L., Mues, S., Ossig, R., Schneckeburger, J., Campagnolo, L., Vecchione, L., Pietroiusti, A., Fadeel, B., Comprehensive In Vitro Toxicity Testing of a Panel of Representative Oxide Nanomaterials: First Steps towards an Intelligent Testing Strategy. *PLoS ONE* **2015**, 10 (5), 34.
166. Abbaspour, N., Hurrell, R., Kelishadi, R., Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences* **2014**, 19, 164-74.
167. Jennifer, M., Maciej, W., Nanoparticle Technology as a Double-Edged Sword: Cytotoxic, Genotoxic and Epigenetic Effects on Living Cells. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* **2013**, 4 (1), 53-63.
168. Standardization, I. O. f., Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. In *ISO10993-5*, Standardization, I. O. f., Ed. Geneva, Switzerland, 2009; p 34.

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE
DOUTORADO

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifique e cite devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 20 de março de 2022.

Assinatura do/a discente: Robson T. Araújo

Programa: Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Químicas e
Biológicas (PPGTQB)

Nome completo: **Robson Teixeira Araújo**

Título do Trabalho: **NANOPARTÍCULAS DE POLI(PIVALATO DE
VINILA) MAGNÉTICO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS: SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE EM
CÉLULAS DE FIBROBLASTOS, QUERATINÓCITOS E MELANOMA
HUMANO**

Nível: () Mestrado (X) Doutorado

Orientador/a: **Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.**