



Adriana Maria Louro Gonçalves

Mestrado Integrado em Engenharia de Materiais

Produção e Caracterização de Membranas Magnéticas Termoresponsivas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia de Materiais

Orientador: Doutora Paula Isabel Pereira Soares, PhD, DCM FCT-UNL

Co-orientador: Prof. Doutor João Paulo Borges, PhD, DCM FCT-UNL

Outubro, 2019



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Produção e Caracterização de Membranas Magnéticas Termoresponsivas

Copyright © Adriana Maria Louro Gonçalves, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Para o avô Fernando...

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, Doutora Paula Soares pela confiança depositada em mim, por todo o apoio, disponibilidade e palavras de incentivo que me nunca me fizeram desistir, mesmo quando tudo parecia estar errado.

Agradeço também ao meu co-orientador, Prof. Dr. João Paulo Borges, não só pelo apoio dado ao longo do desenvolvimento do meu trabalho mas por toda a atenção e disponibilidade demonstrada durante estes 5 anos.

Aos meus colegas de laboratório, Bárbara, Margarida, João, JP, David, Cezar, Sofia, Beatriz e Miguel, por partilharem comigo não só os momentos em que nada corria certo, mas também os momentos de vitória em que uma síntese bem sucedida era motivo suficiente para celebração!

Aos Ricardos, Chagas e Matos, por toda a disposição e paciência para me tirarem todas as dúvidas sempre com um sorriso na cara, e por me fazerem ver que um mau resultado não é o fim do mundo.

Agradeço aos meus amigos e colegas, Sara, Beatriz, Joana, Rita, João, Parada e Oliveira. As melhores pessoas que podia ter conhecido, que não só me acompanharam incansavelmente ao longo destes cinco anos como nunca deixaram de acreditar em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava. Um agradecimento muito especial ao Tomás, por estar sempre ao meu lado e por todas as palavras de apoio que me motivaram todos os dias a fazer sempre melhor.

Um enorme obrigado ao “Núcleo” por toda a ajuda ao longo do curso e por todos os bons e tensos momentos que me proporcionaram. Não seria o mesmo sem vocês.

Por último lugar e o mais importante, um obrigada enorme à minha família por toda a dedicação e apoio. Obrigada aos meus pais por me proporcionarem todas as oportunidades para que pudesse ser quem sou e estar onde estou agora. Agradeço-vos todo o amor e carinho incansável especialmente nos dias menos fáceis.

Este trabalho foi financiado utilizando fundos concedidos pela FEDER através do Programa COMPETE 2020 e Fundos Nacionais, através da FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, ao abrigo do projeto POCI – 01-0145-FEDER-007688 (Referencia UID/CTM/50025) e PTDC/CTM-CTM/30623/2017 (DREaMM).

Atualmente, o cancro é uma das doenças com maior incidência e mortes relacionadas. Os tratamentos convencionais como a radioterapia e a quimioterapia não são direcionados para as células cancerígenas, levando à sua ineficiência terapêutica e graves efeitos secundários. O desenvolvimento de novas opções terapêuticas é um dos tópicos mais estudados atualmente, particularmente o desenvolvimento de sistemas multifuncionais com múltipla capacidade de resposta. A incorporação de nanopartículas (NPs) magnéticas em microgéis termossensíveis permite o desenvolvimento de dispositivos multifuncionais com dupla capacidade de resposta com potencial aplicação tanto no diagnóstico como na terapia de cancro. O presente trabalho centra-se no desenvolvimento de dispositivos multifuncionais com microgéis híbridos incorporados em fibras poliméricas eletrofiadas para aplicação em hipertermia magnética.

Os microgéis (MG) híbridos sintetizados por polimerização por emulsão sem tensioativo são constituídos por poli(N-isopropilacrilamida), quitosano (40% m/m) e nanopartículas de óxido de ferro (5% m/m) como componente inorgânica. Foram sintetizados MGs de PNIPAAm com um diâmetro hidrodinâmico de cerca de 1 μ m sendo que a incorporação do quitosano e das nanopartículas nos MGs provocou uma diminuição deste valor. Esta incorporação não altera a sua termossensibilidade, mas altera a sua capacidade de inchamento.

A incorporação dos microgéis em membranas poliméricas eletrofiadas foi realizada por eletrofiação coloidal usando a poli(vinil pirrolidona) como matriz. A incorporação de NPs nos MG diminui a capacidade de inchamento das membranas de 10 para valores entre 6 e 7, provocando também um aumento da rigidez do material, aumentando o seu módulo de Young de 9 para 35 MPa. Foi possível alcançar uma variação de temperatura de cerca de 1,3 °C para 20 mg de membrana incorporada com microgéis com nanopartículas sem revestimento.

O presente trabalho demonstrou o potencial de utilizar membranas coloidais multifuncionais para hipertermia magnética, podendo futuramente ser utilizado como tratamento alternativo para o cancro.

Palavras-chave: Microgéis termossensíveis, PNIPAAm, nanopartículas magnéticas, sistemas multifuncionais, hipertermia magnética

Currently, cancer is one of the most prevalent diseases with related deaths. Conventional treatments such as radiotherapy and chemotherapy are not targeted at cancer cells, leading to their therapeutic inefficiency and serious side effects. The development of new therapeutic options is one of the most studied themes today, particularly the development of multifunctional systems with multiple responsiveness. The incorporation of magnetic nanoparticles (NPs) in thermosensitive microgels enables the development of dual responsive multifunctional devices with potential application in both cancer diagnosis and therapy. The present work focuses on the development of multifunctional devices with hybrid microgels embedded in electrospun polymeric fibers for application in magnetic hyperthermia.

Hybrid microgels (MG) synthesized by surfactant-free emulsion polymerization consist of poly (N-isopropylacrylamide), chitosan (40 % w/w) and iron oxide nanoparticles (5 % w/w) as an inorganic component. PNIPAAm MGs with a hydrodynamic diameter of about 1 μm were synthesized and the incorporation of chitosan and nanoparticles in the MGs caused a decrease in this diameter. This incorporation does not alter its thermosensitivity but changes its swelling capacity.

The incorporation of microgels in electrospun polymeric membranes was performed by colloidal electrospinning using poly(vinyl pyrrolidone) as the matrix. The incorporation of NPs in MG decreases the membrane swelling capacity from 10 to values between 6 and 7, and increases the material stiffness, rising its Young modulus from 9 to 35 MPa. A temperature variation of about 1.3 °C was achieved in 20 mg of membrane incorporated with uncoated nanoparticle microgels.

The present work demonstrated the potential of using multifunctional colloidal membranes for magnetic hyperthermia and may in future be used as an alternative treatment for cancer.

Keywords: Thermosensitive microgels, PNIPAAm, magnetic nanoparticles, multifunctional systems, magnetic hyperthermia

Índice

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Índice	xiii
Índice de Figuras	xv
Índice de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas	xix
1. Contextualização	1
2. Enquadramento Teórico	3
2.1 Polímeros Termossensíveis	3
2.2 Nanopartículas magnéticas	4
2.2.1 Nanopartículas de Óxido de Ferro	4
2.3 Hipertermia Magnética baseada em mNPs	5
2.4 Eletrofiação Coloidal	5
2.5 Estado da Arte	6
3. Materiais e Métodos	9
3.1 Nanopartículas de Óxido de Ferro	9
3.2 Despolimerização do Quitosano	9
3.3 Microgéis de PNIPAAm	9
3.4 Eletrofiação	9
3.5 Técnicas de Caracterização	10
4. Análise e Discussão de Resultados	11
4.1 Materiais precursores	11
4.1.1 Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro	11
4.1.2 Despolimerização do Quitosano	14
4.1.3 Microgéis Termossensíveis	15
4.2 Membranas coloidais com dupla capacidade de resposta	22
4.2.1 Determinação dos Parâmetros de Eletrofiação	22
4.2.2 Caracterização das Membranas	24
4.2.3 Ensaio de Inchamento	26
4.2.4 Ensaio de Tração	28

4.2.5	Hipertermia Magnética	29
4.2.6	Ensaio de Citotoxicidade.....	31
5.	Considerações Finais	33
	Referências	35
6.	Anexos	39
6.1	Condições da Síntese dos Microgéis de PNIPAAm	39
6.2	Procedimento dos Ensaio de Citotoxicidade.....	39
6.3	Cálculo do Peso Molecular do Quitosano.....	40
6.4	Estudo dos Parâmetros de Eletrofiação	41

Índice de Figuras

FIGURA 2.1 - ESTRUTURA QUÍMICA DO POLÍMERO POLI(N-ISOPROPILACRILAMIDA). ADAPTADO DE [13]	3
FIGURA 2.2 - ILUSTRAÇÃO DA TRANSIÇÃO DE FASE DO PNIPAAm COM A VARIAÇÃO DA TEMPERATURA. ADAPTADO DE [15].	4
FIGURA 2.3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO COLOIDAL. ADAPTADO DE [26].	6
FIGURA 4.1 - DIFRATOGRAMA DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO SEM REVESTIMENTO (A), FUNCIONALIZADAS COM AO (B) E COM DMSA (C).	11
FIGURA 4.2 - ESPETRO FTIR DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO SEM REVESTIMENTO (A), ESTABILIZADAS COM AO (B) E COM DMSA (C)	12
FIGURA 4.3 – IMAGEM DE SEM DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO SEM REVESTIMENTO (A), ESTABILIZADAS COM DMSA (B), ESTABILIZADAS COM AO (C) E RESPECTIVAS DISTRIBUIÇÕES DE DIÂMETRO.	14
FIGURA 4.4 - A) ESPETRO FTIR DOS MICROGÉIS DE PNIPAAm (A) E DO NIPAAm (B); B) ESPETRO FTIR DOS MICROGÉIS DE PNIPAAm-CS (A) E DO QUITOSANO DESPOLIMERIZADO, UTILIZADO NA SÍNTESE DOS MICROGÉIS (C)	16
FIGURA 4.5 - ESPETRO FTIR DOS MICROGÉIS DE PNIPAAm INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS SEM REVESTIMENTO (A), ESTABILIZADAS COM AO (B) E ESTABILIZADAS COM DMSA.....	17
FIGURA 4.6 – TERMOGRAMAS DO QUITOSANO, DOS MICROGÉIS DE PNIPAAm, E DOS MICROGÉIS DE PNIPAAm-CS (A). TERMOGRAMAS DOS MICROGÉIS DE PNIPAAm-CS E DOS MICROGÉIS HÍBRIDOS DE PNIPAAm-CS-NP, PNIPAAm-CS-NP (AO) E PNIPAAm-CS-NP (DMSA) (B).	17
FIGURA 4.7 – CURVAS DTG DO QUITOSANO, DOS MICROGÉIS DE PNIPAAm, E DOS MICROGÉIS DE PNIPAAm-CS (C). CURVAS DTG DOS MICROGÉIS DE PNIPAAm-CS E DOS MICROGÉIS HÍBRIDOS DE PNIPAAm-CS-NP, PNIPAAm-CS-NP (AO) E PNIPAAm-CS-NP (DMSA) (B).	18
FIGURA 4.8 - IMAGENS TEM DOS MICROGÉIS DE PNIPAAm (A), PNIPAAm-CS-NP (B), PNIPAAm-CS-NP (AO) (C) E PNIPAAm-CS-NP (DMSA) (D).....	19
FIGURA 4.9 - FIGURA ESQUEMÁTICA DA FORMAÇÃO DE UM POLIELETRÓLITO ENTRE O DMSA E O QUITOSANO. ADAPTADO DE [44].	20
FIGURA 4.10 – A) DIÂMETRO HIDRODINÂMICO; B) CAPACIDADE DE INCHAMENTO DOS MICROGÉIS DE PNIPAAm (PRETO), PNIPAAm-CS (VERMELHO), PNIPAAm-CS-NP (AZUL), PNIPAAm-CS-NP-AO (ROSA) E PNIPAAm-CS-NP-DMSA (VERDE)	21
FIGURA 4.11 - IMAGEM SEM DAS FIBRAS DE PVP PRODUZIDAS COM AS CONDIÇÕES DA AMOSTRA A8, POTENCIAL DE 20 KV, DISTÂNCIA DE 20 CM, CAUDAL DE 0.3 ML.H-1 E RESPECTIVA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETROS.	24
FIGURA 4.12 - IMAGEM SEM DAS FIBRAS DE PVP/PNIPAAm PRODUZIDAS COM AS CONDIÇÕES DA AMOSTRA A8, POTENCIAL DE 20 KV, DISTÂNCIA DE 20 CM, CAUDAL DE 0.3 ML.H-1 E RESPECTIVA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETROS.	24

FIGURA 4.13 - A) ESPETRO FTIR DO PVP (A), DOS MICROGÉIS DE PNIPAAAM (B) E DA MEMBRANA DE PVP/PNIPAAAM (C); B) ESPETRO FTIR DAS MEMBRANAS DE PVP/PNIPAAAM (A), PVP/PNIPAAAM-CS (B), PVP/PNIPAAAM-CS-NP (C), PVP/PNIPAAAM-CS-NP (DMSA) (D) E PVP/PNIPAAAM-CS-NP (AO) (E).	25
FIGURA 4.14 - IMAGENS TEM DAS FIBRAS DE PVP/PNIPAAAM (A), PVP/PNIPAAAM-CS-NP (B), PVP/PNIPAAAM-CS-NP (AO) (C) E PVP/PNIPAAAM-CS-NP (DMSA) (D).	26
FIGURA 4.15 – A) CURVAS DE INCHAMENTO PARA AS MEMBRANAS DE PVP/PNIPAAAM (PRETO), PVP/PNIPAAAM-CS (VERMELHO), PVP/PNIPAAAM-CS-NP (AZUL), PVP/PNIPAAAM-CS-NP-AO (ROSA) E PVP/PNIPAAAM-NP-DMSA (VERDE); B) VALORES DE INCHAMENTO PARA 4 H DE IMERSÃO.	27
FIGURA 4.16 - PARÂMETROS MECÂNICOS DAS MEMBRANAS PRODUZIDAS: MÓDULO DE YOUNG (QUADRADOS PRETOS), TENSÃO DE LIMITE DE ELASTICIDADE (BOLAS AZUIS) E TENSÃO DE CEDÊNCIA (TRIÂNGULOS VERMELHOS).	29
FIGURA 4.17 - VARIAÇÃO DA TEMPERATURA PARA CONCENTRAÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE 0.05 E 0.1 MG.ML-1 (A), CONCENTRAÇÕES DE MICROGÉIS (B) DE 1 E 2 MG.ML-1 E PARA AS MEMBRANAS COM UMA MASSA DE 10 E 20 MG (C)	30
FIGURA 4.18 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS APÓS 24 H DE EXPOSIÇÃO AOS EXTRATOS DAS MEMBRANAS: PVP/PNIPAAAM, PVP/PNIPAAAM-CS, PVP/PNIPAAAM-CS-NP, PVP/PNIPAAAM-CS-NP-AO E PVP/PNIPAAAM-CS-NP-DMSA ASSIM COMO O CONTROLO NEGATIVO E CONTROLO POSITIVO. CI – CONCENTRAÇÃO INICIAL, D1 – PRIMEIRA DILUIÇÃO; D2 – SEGUNDA DILUIÇÃO; D3 – TERCEIRA DILUIÇÃO.	32
FIGURA 6.1 - CURVAS DE E HSPC E DE C-1LNHREL, AUXILIARES AO CÁLCULO DA VISCOSIDADE INTRÍNSECA	40
FIGURA 6.2 - IMAGEM SEM DAS AMOSTRAS A1, A2, A3, A4, A5 E A6 DAS MEMBRANAS DE PVP	41
FIGURA 6.3 - IMAGEM SEM DAS AMOSTRAS A7 E A8 DAS MEMBRANAS DE PVP	42
FIGURA 6.4 - IMAGEM SEM DAS AMOSTRAS A1, A2, A3 E A4 DAS FIBRAS DE PVP/PNIPAAAM	42
FIGURA 6.5 - IMAGEM SEM DAS AMOSTRAS A4, A6, A7 E A8 DAS FIBRAS DE PVP/PNIPAAAM	43

Índice de Tabelas

TABELA 4.1 - FATORES EM ESTUDO PARA A OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO COM OS CORRESPONDENTES DIÂMETROS MÉDIOS OBTIDOS DAS FIBRAS DAS AMOSTRAS DE MEMBRANAS DE PVP E DE MEMBRANAS DE PVP COM MICROGÉIS DE PNIPAAm INCORPORADOS	23
TABELA 6.1 - REAGENTES E RESPECTIVAS QUANTIDADES UTILIZADAS PARA A SÍNTESE DOS MICROGÉIS DE PNIPAAm	39

Lista de Abreviaturas

AO	Ácido Oleico
APS	Persulfato de amónia
Cs	Quitosano
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmica
DMSA	Ácido dimercaptosuccínico
DRX	Difração de Raios-X
FTIR	Espetroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
LCST	<i>Lower Critical Solution Temperature</i>
MBA	N,N'-Metilene bisacrilamida
MG	Microgéis
NIPAAm	N-isopropilacrilamida
NP	Nanopartículas
PBS	Solução Tampão fosfato-salino ou <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PNIPAAm	Poli (N-isopropilacrilamida)
PNIPAAm-CS	Poli (N-isopropilacrilamida) com 40% em peso de quitosano
PNIPAAm-CS-NP	Poli (N-isopropilacrilamida) com 40% em peso de quitosano e 10% de nanopartículas sem revestimento
PNIPAAm-CS-NP-AO	Poli (N-isopropilacrilamida) com 40% em peso de quitosano e 10% de nanopartículas estabilizadas com ácido oleico
PNIPAAm-CS-NP-DMSA	Poli (N-isopropilacrilamida) com 40% em peso de quitosano e 10% de nanopartículas estabilizadas com ácido dimercaptosuccínico
PVP	Poli(vinil pirrolidona)
SBS	Bissulfito de Sódio
SEM	Microscopia Eletrónica de Varrimento
TEM	Microscopia Eletrónica de Transmissão
TGA	Análise Termogravimétrica
UTS	<i>Ultimate Tensile Strenght</i>
VPTT	<i>Volume Phase Transition Temperature</i>

1. Contextualização

O cancro é uma doença caracterizada pela divisão descontrolada de um grupo de células anormais do organismo. Ao contrário das células saudáveis, as células cancerígenas desenvolvem um grau de autonomia em relação aos sinais que regem as regras normais de divisão celular, resultando desta forma no seu crescimento e proliferação descontrolados. Em alguns casos, estas células cancerígenas são capazes de invadir outros tecidos do organismo através dos sistemas circulatório e linfático, dando origem a metástases [1].

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo. A ocorrência desta doença tem vindo a aumentar ao longo dos anos não só devido ao crescimento e envelhecimento da população mundial, mas também devido à adoção de comportamentos de risco tais como o tabagismo, o excesso de peso, a inatividade física e alterações nos padrões reprodutivos associados à urbanização e desenvolvimento económico [2]. Segundo as estimativas do GLOBOCAN, apenas no ano de 2018 surgiram cerca de 18,1 milhões de novos casos de cancro e ocorreram cerca de 9,6 milhões de mortes devido a esta doença, em todo o mundo. [3].

A quimioterapia e a radioterapia são os tratamentos convencionais do cancro que consistem, respetivamente, na administração de medicamentos anticancerígenos via corrente sanguínea e na incidência de radiação ionizante para destruir o tecido tumoral [4], [5]. Porém, os efeitos colaterais nocivos nos tecidos saudáveis circundantes, provenientes da falta de direcionamento destes tratamentos são as principais causas da sua ineficiência terapêutica. O principal desafio passa por evitar que o tratamento atinja os tecidos saudáveis que circundam o tumor, contudo estes tratamentos são realizados à escala do tecido ou órgão e não à escala celular, sendo inevitável que a delimitação do volume que contém o tecido tumoral, contenha também tecido saudável [4].

Segundo o *National Cancer Institute* dos Estados Unidos, a hipertermia é definida como um tipo de tratamento no qual o tecido corporal é exposto a elevadas temperaturas (entre 42 a 44 °C) de maneira a causar a apoptose das células cancerígenas ou de forma a torná-las mais sensíveis aos efeitos da radiação. Isto acontece porque as células cancerígenas são bastante mais sensíveis à temperatura do que as células saudáveis, resultando desta forma em menores efeitos colaterais quando a hipertermia é comparada com tratamentos como a quimioterapia e a radioterapia, tornando-a assim num tratamento bastante promissor. O principal desafio deste tratamento passa pela dificuldade da aplicação de um aumento de temperatura localizado na região do tumor [4], [6].

Neste seguimento surge o uso de nanopartículas magnéticas para a hipertermia magnética. Estas nanopartículas são capazes de gerar calor através da aplicação de um campo magnético alternado, levando assim à apoptose das células cancerígenas, como referido anteriormente. A hipertermia magnética permite a acumulação de nanopartículas no local no tumor de maneira a possibilitar um aumento de temperatura localizado [7].

Uma nova abordagem ao tratamento de cancro passa pelo desenvolvimento de dispositivos multifuncionais com uma dupla capacidade de resposta. A incorporação de nanopartículas magnéticas em microgéis termosensíveis dá origem a sistemas híbridos que combinam a termosensibilidade da matriz polimérica com as propriedades das nanopartículas magnéticas para a sua aplicação em

hipertermia magnética e libertação controlada de fármacos [8]. Ainda assim, a aplicação de nanopartículas magnéticas livres tem várias limitações devido à baixa solubilidade, à dispersão das nanopartículas do local do tumor e à fraca biomarcação das células cancerígenas. Uma possível solução para estas limitações passa pela incorporação dos sistemas híbridos em nanofibras produzidas pela técnica de eletrofiação que podem ser colocadas na região do tumor, de maneira a localizar o tratamento de hipertermia magnética [9].

Este projeto de dissertação encontra-se inserido no projeto DREaMM (Ref. PTDC/CTMCTM/30623/2017) que pretende desenvolver um sistema nanofibrilado com dupla capacidade de resposta. Este sistema tem por base as nanopartículas magnéticas incorporadas em microgéis termossensíveis produzidos a partir de um novo polímero termossensível que por sua vez são incorporados em fibras poliméricas eletrofiadas. Desta forma, o principal objetivo desta dissertação de mestrado é o desenvolvimento de microgéis híbridos termossensíveis com dupla capacidade de resposta e a sua incorporação em membranas eletrofiadas. O polímero termossensível escolhido para produzir os microgéis é a poli(N-isopropilacrilamida) devido à sua ampla utilização em sistemas compósitos para aplicações biomédicas. Por fim, será testada a *performance* das membranas e a sua aplicação em hipertermia magnética. Para atingir este objetivo principal, os seguintes objetivos parciais devem ser atingidos:

- Síntese de microgéis termossensíveis monodispersos;
- Síntese e estabilização de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas;
- Incorporação das nanopartículas magnéticas com diferentes revestimentos nos microgéis termossensíveis, produzindo assim microgéis com dupla capacidade de resposta (temperatura e campo magnético);
- Produção e otimização de membranas coloidais utilizando a poli(vinil pirrolidona) como polímero auxiliar através da técnica de eletrofiação coloidal;
- Avaliação do desempenho do dispositivo produzido em hipertermia magnética.

2. Enquadramento Teórico

2.1 Polímeros Termossensíveis

Os polímeros termossensíveis fazem parte de um grupo de materiais “inteligentes”, sensíveis à aplicação de um estímulo externo. Neste caso, estes polímeros possuem uma capacidade de resposta a uma variação de temperatura, alterando a sua estrutura conformacional quando na presença de um solvente adequado [10]. Esta característica confere a este tipo de materiais, o elevado potencial em aplicações biomédicas tais como libertação de fármacos e engenharia de tecidos [11].

Um dos polímeros termossensíveis que tem recebido mais atenção por parte da comunidade científica é o poli (*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAAm, Figura 2.1), primeiramente sintetizado por Pelton e Chibante em 1986 [12]. O PNIPAAm apresenta uma resposta negativa com a temperatura, com uma transição LCST (*Lower Critical Solution Temperature*) por volta dos 30-32 °C em solução aquosa. Esta temperatura é bastante útil para aplicações biomédicas, uma vez que se encontra próxima da temperatura corporal, 37 °C [11]. Este polímero pode ser reticulado, de forma a dar origem a hidrogéis ou microgéis que possuem a capacidade de inchar quando na presença de um solvente adequado, dando origem a dispersões coloidais [10].

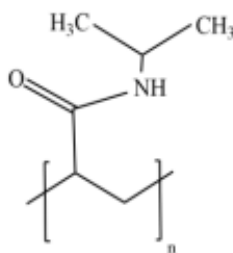


Figura 2.1 - Estrutura química do polímero poli(*N*-isopropilacrilamida). Adaptado de [13]

A capacidade de resposta à variação da temperatura demonstrada pelo polímero provém das interações por parte dos seus grupos hidrofílicos e hidrofóbicos – acrilamida e isopropilo, respetivamente. Abaixo da LCST, os grupos funcionais hidrofílicos do polímero estabelecem ligações por pontes de hidrogénio intermoleculares com a água, levando a que os microgéis se encontrem no seu estado inchado e hidratado, promovendo uma maior dissolução do mesmo. Quando a temperatura ultrapassa a LCST, estas ligações intermoleculares entre os grupos hidrofílicos e o solvente enfraquecem, dando lugar a ligações intramoleculares. Desta forma, o polímero colapsa, reduzindo o seu volume e passando ao seu estado desinchado (Figura 2.2). À temperatura a que se dá esta alteração de volume dá-se o nome de *Volume Phase Transition Temperature* (VPTT) e poderá, ou não, ser a mesma que a LCST [13], [14].

O futuro dos microgéis de PNIPAAm poderá passar pelo desenvolvimento de sistemas multifuncionais com capacidade de resposta a mais do que um estímulo de forma a conseguir ampliar a gama de aplicações destes materiais. A incorporação de nanopartículas magnéticas, nomeadamente de óxido de ferro, permite o desenvolvimento de sistemas híbridos que possuem especial interesse

em aplicações como a obtenção de imagens médicas, liberação controlada de fármacos, hipertermia magnética e engenharia de tecidos [8].

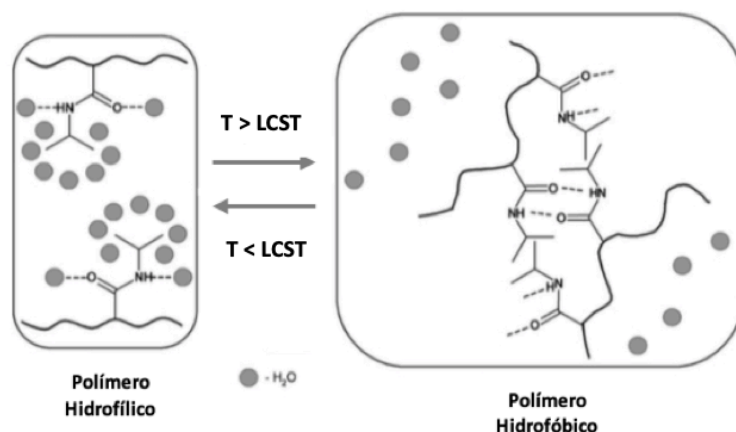


Figura 2.2 - Ilustração da transição de fase do PNIPAAm com a variação da temperatura. Adaptado de [15].

2.2 Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas (mNPs) são um tipo de material caracterizado pelas suas pequenas dimensões, possuindo diâmetros entre 1 a 100 nm, com capacidade de resposta a um campo magnético. São um material com um interesse especial em aplicações biomédicas uma vez que podem ser utilizadas em áreas como contraste de imagens de ressonância magnética para diagnóstico, hipertermia magnética para tratamento de cancro, engenharia de tecidos e liberação de fármacos [16]. As nanopartículas magnéticas podem ser classificadas quanto à sua composição, podendo ser compostas por metais puros, ligas metálicas ou óxidos metálicos. Podem também ser classificadas de acordo com o seu comportamento magnético em: ferromagnéticas, paramagnéticas, diamagnéticas, entre outras, dependendo da sua resposta à aplicação de um campo magnético alternado [6].

2.2.1 Nanopartículas de Óxido de Ferro

As nanopartículas de óxido de ferro são das mais utilizadas em aplicações biomédicas devido à sua não toxicidade, biocompatibilidade, grande área superficial, fácil síntese e presença de propriedades superparamagnéticas à temperatura ambiente, para dimensões inferiores a 20 nm [17]. Têm interesse como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética, na área de liberação controlada de fármacos e de hipertermia magnética [18], [19]. Podem ser sintetizadas por vários métodos, entre eles a co-precipitação química, decomposição térmica, método de microemulsão e método sol-gel [20], [21].

A grandes dimensões, as nanopartículas de óxido de ferro possuem um comportamento ferromagnético, no entanto, para dimensões inferiores a 20 nm passam a ter um comportamento superparamagnético, à temperatura ambiente. Devido a este comportamento, estas nanopartículas são facilmente magnetizadas sob a aplicação de um campo magnético externo e desmagnetizadas uma vez

que esse campo é removido, não apresentando quaisquer vestígios de magnetização, permitindo assim que as partículas se mantenham estáveis e não se agreguem [5], [22].

Uma vez que estas nanopartículas são instáveis em solução e possuem tendência a agregar-se, são adicionados tensioativos como o ácido oleico (AO) ou o ácido dimercaptosuccínico (DMSA) de maneira a evitar a agregação e prevenir que percam as suas propriedades superparamagnéticas [16], [23].

2.3 Hipertermia Magnética baseada em mNPs

A hipertermia é uma modalidade de tratamento de cancro que consiste na morte das células cancerígenas recorrendo ao calor como agente terapêutico. Tem o potencial de alcançar o aquecimento do tumor, a cerca de 42,5° C, o que resulta em menores efeitos colaterais nos tecidos saudáveis circundantes quando em comparação com os tratamentos convencionais do cancro, nomeadamente a quimioterapia e radioterapia, uma vez que as células cancerígenas possuem uma maior sensibilidade à temperatura que as células saudáveis. [7].

Recentemente tem sido estudado o tratamento de hipertermia aplicando o uso de nanopartículas magnéticas, como as nanopartículas de óxido de ferro. Estas nanopartículas são capazes de, através da aplicação de um campo magnético alternado, converter energia eletromagnética em calor e provocar a apoptose das células cancerígenas, como referido anteriormente. Este campo magnético alternado fornece às nanopartículas a energia necessária para que os momentos magnéticos das mesmas superem a barreira da energia de reorientação. Quando os momentos magnéticos regressam ao seu estado de equilíbrio, energia é dissipada, resultando no aquecimento das nanopartículas pela rotação browniana e pelo relaxamento de Neél. A rotação browniana é o resultado da rotação das nanopartículas e a relaxação de Neél é caracterizada pela rotação dos momentos magnéticos das nanopartículas [6].

A vantagem da hipertermia magnética sob a hipertermia convencional jaz no facto de ser possível a acumulação de nanopartículas no local do tumor de maneira a provocar um aumento de temperatura mais localizado [7]. A administração das nanopartículas magnéticas pode ser feita através da sua injeção na corrente sanguínea, de injeção direta no local do tumor, implantação *in situ* ou direcionamento ativo [6].

2.4 Eletrofiação Coloidal

A eletrofiação tem sido o método mais utilizado na preparação e produção de fibras com diâmetros à escala micro e nanométrica com uma área superficial, flexibilidade e porosidade elevadas. É uma técnica simples, de baixo custo, versátil e com alta reprodutibilidade, com potencial em aplicações biomédicas tais como na área dos sensores, libertação de fármacos e engenharia de tecidos. [24].

Na técnica de eletrofiação, uma fibra é gerada a partir de soluções poliméricas viscosas com o auxílio de forças electrostáticas. O processo envolve a aplicação de um campo elétrico entre a solução e um coletor. A solução, que se encontra dentro de uma seringa, é expelida pela agulha recorrendo

a uma bomba de infusão que estabelece uma força constante no êmbolo da seringa. Ao aplicar-se uma tensão elétrica, dá-se a polarização das moléculas da solução. Quando a diferença de potencial elétrico é suficientemente grande, de modo a que a força eletrostática seja maior do que a tensão superficial da gota de solução na ponta da agulha, forma-se o cone de Taylor. A partir desse momento forma-se um jato que é atraído na direção do coletor, sendo este continuamente alongado devido a repulsões electroestáticas entre as cargas superficiais.

Embora a eletrofiação seja um processo simples, a topografia, morfologia e orientação das fibras dependem dos parâmetros de solução, processo e das condições ambientais. A concentração, viscosidade, condutividade, tensão superficial, e volatilidade do solvente são alguns dos parâmetros da solução que têm influência na formação de nanofibras. Em relação aos parâmetros do processo, entre estes temos o potencial aplicado, a distância entre a ponta da agulha e o coletor, o caudal e o diâmetro da agulha. Por fim, parâmetros ambientais tais como a temperatura, a humidade e a pressão também têm influência no processo de eletrofiação [24].

A eletrofiação coloidal (Figura 2.3) é uma técnica semelhante à eletrofiação tradicional, mas que usa duas ou mais fases imiscíveis como precursor em vez de uma solução homogênea. Esta técnica permite também a formação de estruturas *core-shell* a partir de uma única agulha, oferecendo assim uma configuração muito mais simples que a eletrofiação coaxial que requer duas ou mais agulhas [25].

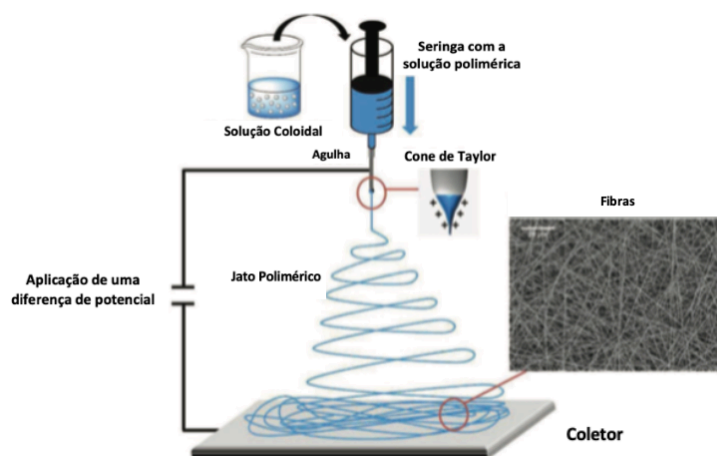


Figura 2.3 - Representação esquemática do processo de eletrofiação coloidal. Adaptado de [25].

A incorporação de microgéis termossensíveis em fibras poliméricas através da técnica de eletrofiação não só confere um suporte aos microgéis, como permite a fabricação de redes poliméricas que possuem a capacidade de resposta a estímulos externos dos microgéis e as características das fibras produzidas por esta técnica tais como uma área superficial e porosidade elevada que aumenta a sensibilidade do sistema [25].

2.5 Estado da Arte

O estudo de microgéis termossensíveis iniciou-se no grupo de Biomateriais com trabalho de Echeverria *et al.* [26] que consistiu na síntese do sistema híbrido de microgéis de PNIPAAm-CS-NP

através da técnica de polimerização por emulsão sem tensioativo para fins de hipertermia magnética. Os microgéis foram sintetizados com sucesso e é possível a confirmação da incorporação da nanopartículas nos mesmos através das imagens de HRSEM. Verificou-se uma diminuição no seu diâmetro hidrodinâmico com o aumento da percentagem de quitosano e da quantidade de nanopartículas incorporadas nos mesmos. O sistema híbrido mostrou ter potencial em hipertermia magnética, tendo atingido um aumento de temperatura de 3,1 °C para os microgéis de PNIPAAm com 20% em peso de quitosano e 10% em peso de nanopartículas. O trabalho de Li *et al.* [27] consiste também no estudo de sistemas multi-responsivos de microgéis de PNIPAAm-CS-NP. As nanopartículas em estudo foram estabilizadas com ácido oleico de maneira a prevenir a sua agregação. Mais uma vez, concluiu-se que o aumento da percentagem de quitosano diminui o diâmetro hidrodinâmico dos microgéis. Os ensaios de análise termogravimétrica mostraram ser possível a incorporação de 25% em peso de nanopartículas nos microgéis.

Numa abordagem diferente, Marques *et al.* [28] estudou a incorporação de microgéis termosensíveis de PNIPAAm mediante o processo de eletrofiação coloidal utilizando PEO como matriz para a produção das fibras. Foram sintetizados microgéis de PNIPAAm nos quais foram incorporadas diferentes percentagens de quitosano, com diferentes pesos moleculares. Verificou-se que os microgéis de PNIPAAm-CS com uma concentração de 40%, para qualquer peso molecular, dão origem a dispersões de microgéis mais estáveis. Ainda assim, para esta concentração, os microgéis apresentaram o menor diâmetro hidrodinâmico e a menor capacidade de inchamento. As fibras de PEO obtidas possuíam um diâmetro médio entre 136 e 309 nm com um confinamento de microgéis com diâmetros entre os 100 e os 400 nm. Foi possível a observação de uma morfologia “*bead-on-a-string*” através da observação das imagens de SEM. Posteriormente, o trabalho de Faria *et al.* [29] reportou o desenvolvimento de fibras compósitas de PVP com microgéis de PNIPAAm através da técnica de eletrofiação coloidal reticuladas com radiação UV. A incorporação de microgéis de PNIPAAm nas fibras de PVP foi bem-sucedida como é possível observar nas imagens de TEM e na análise FTIR das membranas obtidas. As membranas compósitas reticuladas através de radiação UV apresentaram um módulo de Young de aproximadamente 20 MPa sendo que este valor se manteve constante independentemente do tempo de irradiação. Concluiu-se também que o aumento do tempo de irradiação provocou um decréscimo na capacidade de inchamento das membranas sendo que possuem um valor máximo de 20 (g/g) para tempos de 5 min, e de 10 (g/g) para tempos de 60 min.

Diaz *et al.* [30] estudou a capacidade de absorção de membranas compósitas de microgéis de PNIPAAm utilizando PVP como *template* através da técnica de eletrofiação. Foi estudada a produção de fibras usando até 40% em peso de microgéis. Através das imagens de SEM é perceptível verificar a obtenção de uma morfologia “*bead-on-a-string*”. Foram reportados diâmetros de aproximadamente 0.9 μm e uma capacidade de inchamento de até 17 vezes o seu peso seco para as membranas que contém 40% em peso de microgéis.

É de salientar que até ao momento não foram encontrados estudos sobre a incorporação de microgéis híbridos PNIPAAm-CS-NP em membranas poliméricas através da técnica de eletrofiação coloidal.

3. Materiais e Métodos

3.1 Nanopartículas de Óxido de Ferro

As nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas mediante a técnica de co-precipitação química, descrita por Soares *et al.* [31]. Utilizou-se cloreto de ferro (II) tetra hidratado (2,5 mmol, *Alfa-Aesar*) e cloreto de ferro (III) hexa hidratado (5 mmol, *Alfa-Aesar*). Determinou-se a concentração de ferro presente na solução de nanopartículas mediante o método colorimétrico 1,10-fenantro-lina de maneira a calcular a quantidade de ácido oleico (*Fisher Chemical*) e de ácido dimercaptosuc-cínico (*Acros Organics*, 98%) a adicionar às nanopartículas [31]. Após a adição dos estabilizadores, deixou-se reagir num banho de ultrassons, durante 3 horas. Colocou-se a solução em diálise (Specta/PorTM 4, MW 12-14 kDa) para remover os reagentes que não reagiram.

3.2 Despolimerização do Quitosano

Dissolveu-se o quitosano ($C_8H_{13}NO_5)_n$, 469 kDa, *Cognis*), em ácido acético 1% (V/V) ($C_2H_4O_2$, *Fisher Chemical*), e o nitrito de sódio ($NaNO_2$, *Sigma-Aldrich*) em água *millipore*. Adicio-nou-se a solução de nitrito de sódio à solução de quitosano, deixando reagir 1 hora sob agitação mecânica. Adicionou-se uma solução de hidróxido de sódio 1M ($NaOH$, *EKA*) de modo a precipitar o quitosano. Centrifugou-se a solução a 10 000 rpm durante 10 min e lavou-se várias vezes. Por fim, liofilizou-se o quitosano despolimerizado durante 24 h.

3.3 Microgéis de PNIPAAm

Os microgéis de PNIPAAm foram sintetizados mediante a técnica de polimerização por emul-são sem tensioativo, ou polimerização por precipitação como descrito por Echeverria *et al* [26]. O monómero utilizado foi o *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm, *Aldrich Chemistry*, 97 %), utilizou-se *N,N'*-Metilenebisacrilamida (MBA, *Sigma-Aldrich*) como agente reticulante e persulfato de amónia (APS, *Sigma-Aldrich*) como iniciador iónico. Como catalisador da reação foi utilizado o bissulfito de sódio (SBS, *Acrös Organics*) e água ultrapura (*millipore*) como fase contínua. Também foram sintetizados microgéis de PNIPAAm com 40 % em peso de quitosano e 5 % em peso de nanopartí-culas. Nestas sínteses o quitosano e as nanopartículas foram adicionados no início da reação, sendo que o resto da síntese segue como explicado anteriormente. Na , no anexo 6.1, encontram-se as quan-tidades de reagentes utilizados para cada tipo de microgéis sintetizados.

3.4 Eletrofiação

Foram preparadas as soluções utilizando o polímero poli(vinil pirrolidona) (PVP, *Sigma-Al-drich*, Mw = 1 300 000) como *template*. Dissolveu-se 14% em peso de PVP numa solução de 10% em peso de microgéis redispersos em água e etanol (*Honeywell*, 99%) numa proporção de 35:65, de forma a assegurar a sua co-não solvência [32] e a sua incorporação na solução no seu estado hidra-tado. Deixou-se a solução em agitação magnética durante 3 h de forma a assegurar uma

homogeneização completa. A montagem experimental utilizada no processo de eletrofiação inclui uma fonte de alta tensão (*Glassman High Voltage, EL, USA*), uma bomba infusora (*KD Scientific, KDS100*) e um coletor fixo revestido por uma folha de papel de alumínio. As soluções foram introduzidas numa seringa de 2 ml com uma agulha de calibre de 23 G. Foi efetuado o estudo os parâmetros ótimos de eletrofiação de modo a obter fibras com o menor diâmetro médio possível, descrito na secção 4. O processo de eletrofiação foi realizado numa cabine climatizada com uma humidade relativa entre 30 – 40 % de forma a garantir uma temperatura controlada. Após a produção das membranas estas foram reticuladas numa estufa a 165 °C durante 24 h.

3.5 Técnicas de Caracterização

A técnica da microscopia eletrónica de varrimento (SEM) foi utilizada para a observação da morfologia e diâmetro das amostras realizada no equipamento Carl Zeiss Auriga SEM. As amostras foram revestidas com uma camada fina de ouro e paládio. Foram obtidas imagens através da técnica de microscopia eletrónica de transmissão (TEM) através do equipamento Hitachi H-8100 II com emissão termiônica LaB6. Os padrões de difração foram adquiridos através difratómetro de raios-X X'Pert PRO PANALytical, com um passo em 2θ de 0,033, desde os 15° até aos 80°, utilizando radiação Cu-K α . Os espectros de FTIR foram obtidos com o espectrofotómetro FTIR Thermo Nicolet 6700, num intervalo de comprimento de onda de 500 a 4500 cm⁻¹. As propriedades térmicas das amostras foram analisadas utilizando a técnica de análise termogravimétrica com o equipamento NETZSCH STA 449F3, num intervalo de temperaturas entre 25 e 900 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, sob um fluxo de azoto gasoso. Foi utilizada a técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) para medir o diâmetro hidrodinâmico e a capacidade de inchamento dos microgéis. O equipamento utilizado foi o Horiba SZ-100 nanopartica series com um laser de 532 nm. Foram preparadas dispersões dos microgéis com uma concentração de 0,12 mg/ml em água filtrada num filtro de 0,1 µm. Foi testada uma gama de temperatura entre 25 e 40 °C. O equipamento utilizado para conduzir os ensaios de viscosimetria diluída foi o viscosímetro RheoSense, Inc. microVISC. Para os ensaios de tração das membranas foram recortadas amostras com dimensões de 20 x 10 mm. Os ensaios foram realizados num equipamento de ensaios de tração uniaxial, *Rheometric Scientific*, com uma célula de carga de 20 N e com o software “*Minimat*” (Minimat Control Software Version 1.60 February 1994 (c) P.L. Thermal Science 1984-94 Reometric Scientific Ltd.). Foi aplicada uma velocidade de 1 mm.min⁻¹. Foram também realizados ensaios de inchamento às membranas. Estas foram recortadas com dimensões de 10 x 10 mm e imersas em PBS em ambiente de estufa, a uma temperatura de 36 °C. As medições da capacidade de inchamento foram efetuadas para tempos de 5 min, 10 min, 30 min, 1, 2, 3 e 4 h de imersão. As medidas de hipertermia magnética foram obtidas com o equipamento *NanoScale Biomagnetics, DMI00 Series*. As medidas foram efetuadas durante 10 minutos, com uma densidade de fluxo magnético de 300 Gauss e uma frequência de 418,5 kHz. Para avaliar a citotoxicidade das membranas realizaram-se ensaios de acordo com a norma ISO 10993 “*Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*”. Os ensaios foram realizados em células Vero e o procedimento encontra-se descrito no anexo 6.2.

4. Análise e Discussão de Resultados

4.1 Materiais precursores

O principal objetivo desta dissertação é a produção de membranas coloidais com capacidade de resposta a dois estímulos externos, temperatura e campo magnético. Para atingir este objetivo foi necessário proceder à síntese e caracterização de cada componente individual: nanopartículas magnéticas, microgéis termossensíveis, e fibras poliméricas eletrofiadas.

4.1.1 Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro

As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro foram produzidas através da técnica de co-precipitação química como previamente descrito [31]. Apesar de ter sido utilizado um protocolo otimizado, a caracterização das nanopartículas foi efetuada para confirmar as suas propriedades físico-químicas previamente à sua incorporação nos microgéis termossensíveis.

A análise por difração de raios-X permite avaliar a estrutura cristalina das nanopartículas de óxido de ferro. A Figura 4.1 representa o difratograma DRX das nanopartículas sem revestimento (a) assim como os difratogramas das nanopartículas funcionalizadas com ácido oleico (AO) (b) e com ácido dimercaptosuccínico (DMSA) (c).

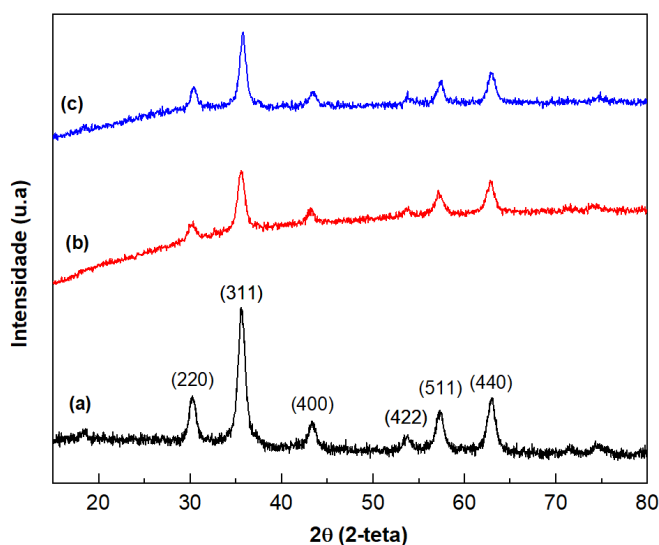


Figura 4.1 - Difratograma das nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento (a), funcionalizadas com AO (b) e com DMSA (c).

No difratograma das nanopartículas sem revestimento (Figura 4.1 (a)) é possível a identificação de seis picos característicos situados em 2θ igual a 30,2; 35,6; 43,3; 53,8; 57,4 e 62,9. Estes picos correspondem, respetivamente, aos planos de difração (220), (311), (400), (422), (511) e (440) que são indicador de que as nanopartículas possuem uma fase cúbica cristalina, correspondente à da magnetite (JCPDS 00-019-0629) [16]. O tamanho médio da cristalite, τ , é obtido para o pico mais intenso

do difratogramas das nanopartículas que corresponde ao plano (311) e é calculado através da fórmula de Scherrer (eq.1):

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad (\text{eq. 1})$$

Onde K é uma constante que depende da forma das nanopartículas ($K = 0,94$), λ é o comprimento de onda da radiação incidente ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), β corresponde à largura a meia altura do pico mais intenso e θ representa o respetivo ângulo em radianos. O valor do tamanho médio da cristalite, relativo às nanopartículas sem revestimento, obtido a partir da fórmula de Scherrer é de aproximadamente 8,1 nm. Os picos dos difratogramas de ambas as nanopartículas funcionalizadas não sofrem qualquer alteração quando em comparação com os picos nas nanopartículas não revestidas, o que nos indica que a estrutura cristalina das NPs se mantém após a estabilização das mesmas. Relativamente ao tamanho médio da cristalite das nanopartículas estabilizadas com DMSA e AO, este valor não sofre grandes alterações, sendo igual a 9,7 e 9,4 nm, respetivamente. Desta forma, pode-se concluir que a estabilização das NPs com ambos os tensoativos não afeta a sua estrutura cristalina nem o tamanho médio de cristalite.

Posteriormente as NPs foram analisadas por FTIR para confirmar a presença dos tensoativos. A Figura 4.2 representa o espectro FTIR das nanopartículas sem revestimento (a) das nanopartículas estabilizadas com ácido oleico (b) e com DMSA (c). No espectro das nanopartículas sem revestimento (a) possível observar bandas aproximadamente a 560 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} . A banda que se verifica a 560 cm^{-1} é característica da ligação Fe-O, o que confirma a presença de um óxido de ferro na amostra [33]. As bandas de absorção a cerca de 1650 cm^{-1} e a 3400 cm^{-1} correspondem, respetivamente à vibração angular do grupo hidroxilo (H-O-H) e à vibração axial do mesmo grupo à superfície das nanopartículas ou à água presente na amostra [31].

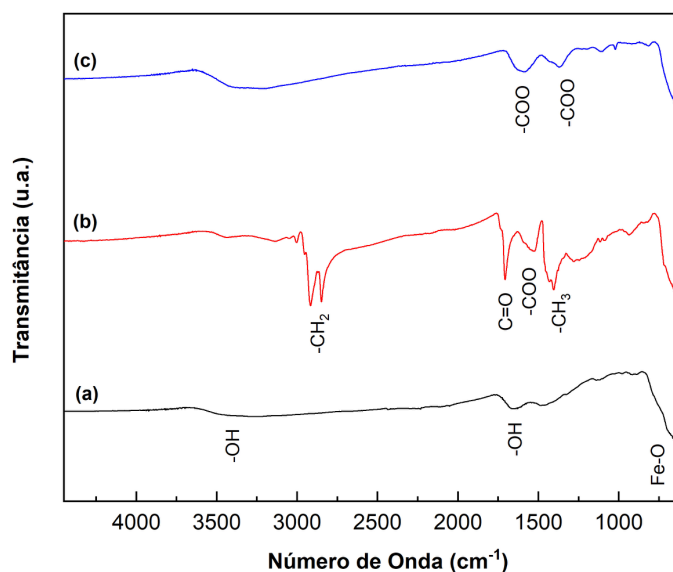


Figura 4.2 - Espectro FTIR das nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento (a), estabilizadas com AO (b) e com DMSA (c)

Relativamente ao espectro das nanopartículas estabilizadas com ácido oleico é também possível observar bandas a aproximadamente 2900 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} que representam, respetivamente, a elongação assimétrica e simétrica da ligação CH_2 do ácido oleico. A banda que surge a cerca de 1700 cm^{-1} corresponde à vibração dupla da ligação C=O do grupo carboxilo, que representa a formação de uma bicamada de AO que envolve as nanopartículas [34]. As bandas que se encontram a 1520 cm^{-1} e 1430 cm^{-1} correspondem à elongação simétrica e assimétrica da ligação $-\text{COO}$, respetivamente. Por fim, a banda a 1400 cm^{-1} corresponde à ligação CH_3 , que se encontra presente na molécula de ácido oleico [31], [35]. Em relação ao espectro das nanopartículas estabilizadas com DMSA, a presença deste ácido é identificada pelas bandas a 1580 cm^{-1} e a 1370 cm^{-1} que correspondem à elongação simétrica e assimétrica do grupo carboxilato ($-\text{COO}$), respetivamente [23]. Em todos os espectros é possível observar a presença da banda a 560 cm^{-1} , característica da presença de óxido de ferro.

Por último, a morfologia das nanopartículas magnéticas foi analisada utilizando o TEM. Na Figura 4.3 apresentam-se as imagens TEM e os respetivos gráficos de distribuição de diâmetros das nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento (A), estabilizadas com DMSA (B) e com AO (C). Os diâmetros das nanopartículas foram obtidos com o auxílio ao programa *ImageJ*. A Figura 4.3 A mostra a imagem TEM das NPs de óxido de ferro sem revestimento com um diâmetro médio de 7,6 nm e uma distribuição de tamanho estreita. No entanto, estas nanopartículas mostram um elevado estado de agregação devido à ausência de tensioativos. As Figura 4.3 B e C mostram imagens de TEM e seus respetivos gráficos de distribuição de tamanho das nanopartículas estabilizadas com DMSA e AO, respetivamente. Observa-se uma menor agregação das nanopartículas devido à presença dos tensioativos, e os diâmetros obtidos para estas nanopartículas foram de 9,6 e 8,8 nm, por esta ordem. É possível concluir que a presença de tensioativos não altera a morfologia das nanopartículas sendo que estas apresentam uma forma quase esférica, com diâmetros muito semelhantes entre si. Relembra-se que as nanopartículas de óxido de ferro apresentam propriedades superparamagnéticas para dimensões inferiores a 20 nm e por isso é possível concluir que as nanopartículas sintetizadas possuem as condições ideais para aplicações de hipertermia magnética [5].

É também de destacar que os diâmetros obtidos pelas imagens TEM apresentam valores bastante semelhantes ao tamanho médio da cristalite calculado anteriormente, 8,1; 9,7 e 9,4 nm para as nanopartículas sem revestimento, estabilizadas com DMSA e com AO, respetivamente. Desta forma, pode-se concluir que cada nanopartícula é constituída por apenas um domínio magnético.

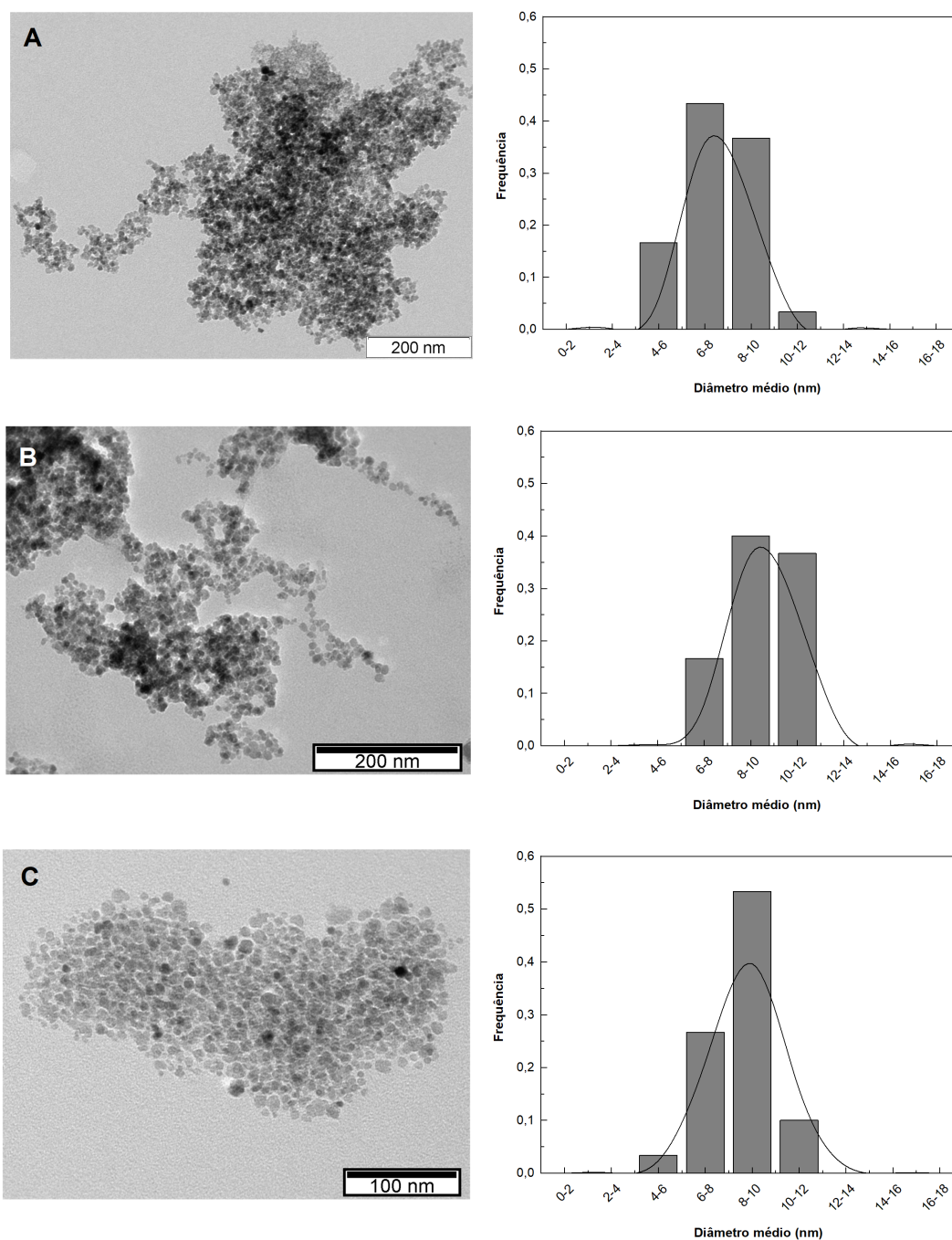


Figura 4.3 – Imagem de SEM das nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento (A), estabilizadas com DMSA (B), estabilizadas com AO (C) e respectivas distribuições de diâmetro.

4.1.2 Despolimerização do Quitosano

Foi efetuada a despolimerização do quitosano de modo a diminuir o seu peso molecular e facilitar a sua reação com o NIPAAm aquando da síntese dos microgéis. A despolimerização do quitosano (peso molecular inicial de aproximadamente 469 kDa) foi feita através de reação química com o nitrito de sódio (NaNO_2). Esta técnica é bastante utilizada por ser simples, rápida e permitir a obtenção de diferentes pesos moleculares dependendo da quantidade de nitrito de sódio utilizada [5].

A determinação do peso molecular foi feita através da técnica de viscosimetria diluída. A viscosidade intrínseca do quitosano foi calculada através da equação 2 [36].

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{C} \equiv \lim_{C \rightarrow 0} C^{-1} \ln \eta_{rel} \quad (\text{eq. 2})$$

Onde η representa a viscosidade intrínseca, η_{rel} a viscosidade relativa, η_{sp} a viscosidade específica e C a concentração. No anexo 6.3 encontram-se os gráficos de η_{sp}/C e de $C^{-1} \ln \eta_{rel}$, auxiliares ao cálculo da viscosidade intrínseca.

A equação de Mark-Houwink Sakurada (eq.2) relaciona a viscosidade intrínseca com o peso molecular do polímero [36].

$$[\eta] = KM_v^a \quad (\text{eq. 3})$$

Onde η representa a viscosidade intrínseca e M_v representa o peso molecular do polímero. K e a são constantes com valores de $2,05 \times 10^{-5}$ e $0,97$, respetivamente quando se utiliza como solvente ácido acético $0,2$ M/acetato de sódio $0,1$ M a 30 °C a partir das equações 4 e 5 [36].

$$a = 0,6202 + \frac{0,699x}{0,4806 + x} \quad (\text{eq. 4})$$

$$\log K \times 10^{-5} = -5,7676a + 59232 \quad (\text{eq. 5})$$

Sendo que $x = \frac{DA}{pH \mu}$, onde estão representados o grau de desacetilação do quitosano ($DA = 0,245$ %) , o pH do solvente utilizado e sua força iónica, μ .

Obteve-se uma viscosidade intrínseca de $0,3150$ dl/g, que corresponde a um peso molecular de $20,76$ kDa. O estudo da influência da quantidade de nitrato de sódio (NaNO_3) utilizada na despolimerização do quitosano com a viscosidade intrínseca do quitosano obtido foi efetuado por Soares *et al.* [5]. Analisando os resultados obtidos nesse estudo, podemos concluir que o peso molecular do quitosano obtido se encontra de acordo com que seria esperado.

4.1.3 Microgéis Termossensíveis

Os microgéis termossensíveis foram sintetizados utilizando a técnica de polimerização por emulsão sem tensioativo, ou polimerização por precipitação como descrito por Echeverria *et al* [26]. A síntese dos microgéis de PNIPAAm e de PNIPAAm-CS foi bem sucedida. Relativamente aos microgéis incorporados com nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento, começou-se por tentar incorporar 10 % (m/m) de NP nos microgéis de PNIPAAm-CS como conseguido no trabalho de Robalo *et al.* [37]. Aquando a síntese dos microgéis verificou-se que grande parte das NP não eram incorporadas no interior dos microgéis sendo que precipitavam no fundo do balão, sugerindo que se encontravam em excesso. Diminui-se a concentração de NP para 5 % (m/m) e desta forma foi possível uma síntese de microgéis híbridos bem sucedida. A incorporação das NPs sem revestimento, revestidas com AO e com DMSA foi efetuada utilizando os 5 % (m/m) de NPs em relação à massa de monómero utilizada.

Os microgéis termossensíveis foram analisados através da técnica de FTIR. Na Figura 4.4 (A) encontra-se representado o espectro FTIR dos microgéis de PNIPAAm sintetizados (a) e do monômero utilizado na sua síntese, o NIPAAm (b). No espectro dos microgéis de PNIPAAm (a) é possível a identificação da banda a 3290 cm^{-1} que corresponde à elongação da ligação -NH. A região entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} corresponde à elongação da ligação C-H e é caracterizada pelos seus três picos a 2970 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , e 2870 cm^{-1} . A cerca de 1630 cm^{-1} e 1520 cm^{-1} surgem as bandas características da elongação das ligações C=O (amida I) e -NH (amida II). A ocorrência de polimerização é nos indicada pela ausência da banda a cerca de 1620 cm^{-1} no espectro do PNIPAAm. Esta banda é correspondente à ligação C=C, presente no espectro do NIPAAm [38], [39]. A ausência desta banda no espectro de PNIPAAm indica que a reação de polimerização foi completa.

Na Figura 4.4 (B) está representado o espectro FTIR do microgéis sintetizados com quitosano, PNIPAAm-CS (a) e dos microgéis de PNIPAAm (b) e do quitosano despolimerizado utilizado na síntese (c). No espectro referente ao quitosano despolimerizado (c) é possível observar as bandas características da amostra analisada. A cerca de 3330 cm^{-1} surge a banda característica da elongação das ligações -OH e -NH. As bandas que aparecem a cerca de 2920 cm^{-1} e 2860 cm^{-1} correspondem à vibração assimétrica dos grupos -CH₃ e -CH₂. Por fim, a cerca de 1660 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} surgem as bandas correspondentes às vibrações das ligações -NH, -CN e C-O-C [40]. É possível observar que o espectro dos microgéis de PNIPAAm-CS (a) não só possui as bandas referentes aos microgéis de PNIPAAm (b), como também apresenta as bandas características do quitosano, referidas anteriormente, o que nos indica que a incorporação do quitosano nos microgéis foi bem sucedida.

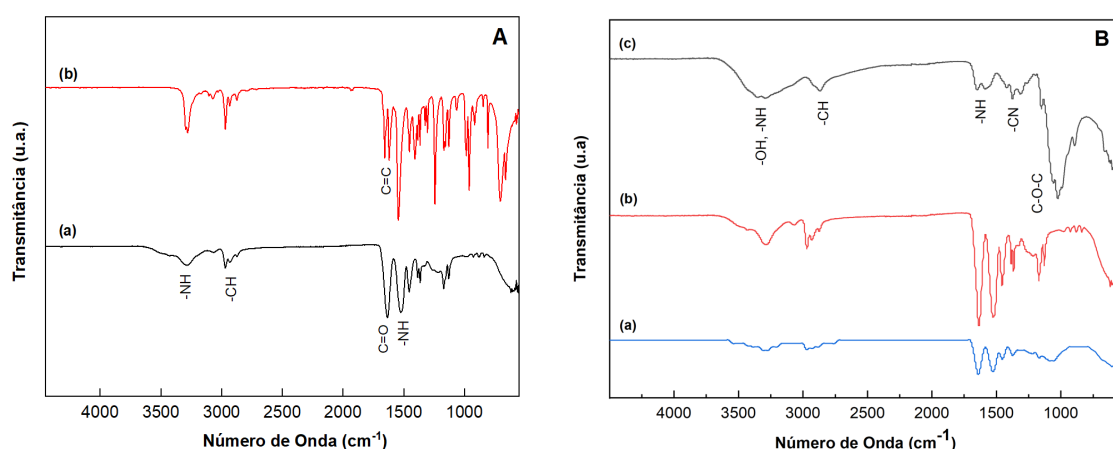


Figura 4.4 - A) Espectro FTIR dos microgéis de PNIPAAm (a) e do NIPAAm (b); B) Espectro FTIR dos microgéis de PNIPAAm-CS (a) e do quitosano despolimerizado, utilizado na síntese dos microgéis (c)

O espectro dos microgéis de PNIPAAm incorporado com nanopartículas sem revestimento (a), estabilizadas com AO (b) e estabilizadas com DMSA (c) encontra-se representado na Figura 4.5. Apesar de não ser perceptível a presença das bandas características dos tensoativos utilizados para estabilizar as nanopartículas incorporadas nos microgéis, em todos os espectros é possível a observação da banda característica da presença de óxido de ferro, a 560 cm^{-1} . Isto poderá ser indicação de uma boa incorporação das nanopartículas nos microgéis de PNIPAAm.

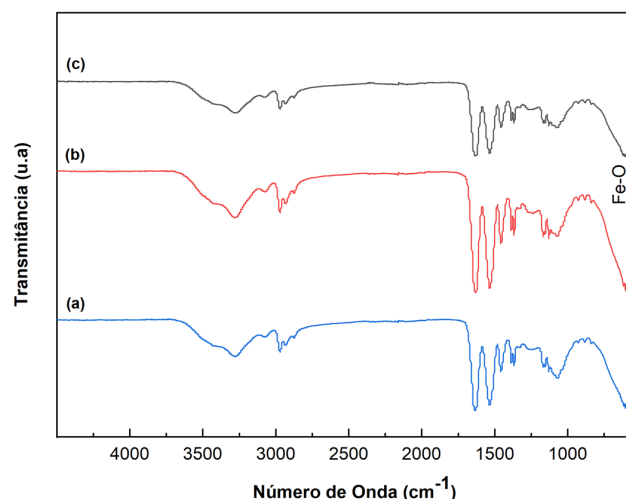


Figura 4.5 - Espectro FTIR dos microgéis de PNIPAAm incorporados com nanopartículas sem revestimento (a), estabilizadas com AO (b) e estabilizadas com DMSA

A análise termogravimétrica permite, de forma indireta, quantificar a quantidade de nanopartículas que ficaram encapsuladas no interior dos microgéis de PNIPAAm. Também permite avaliar a estabilidade térmica das amostras estudadas. Na Figura 4.6 (A) e (B) encontram-se representados os termogramas relativos ao quitosano, aos microgéis de PNIPAAm, PNIPAAm-CS e aos microgéis híbridos e na Figura 4.7 (C) e (D) as respectivas curvas DTG.

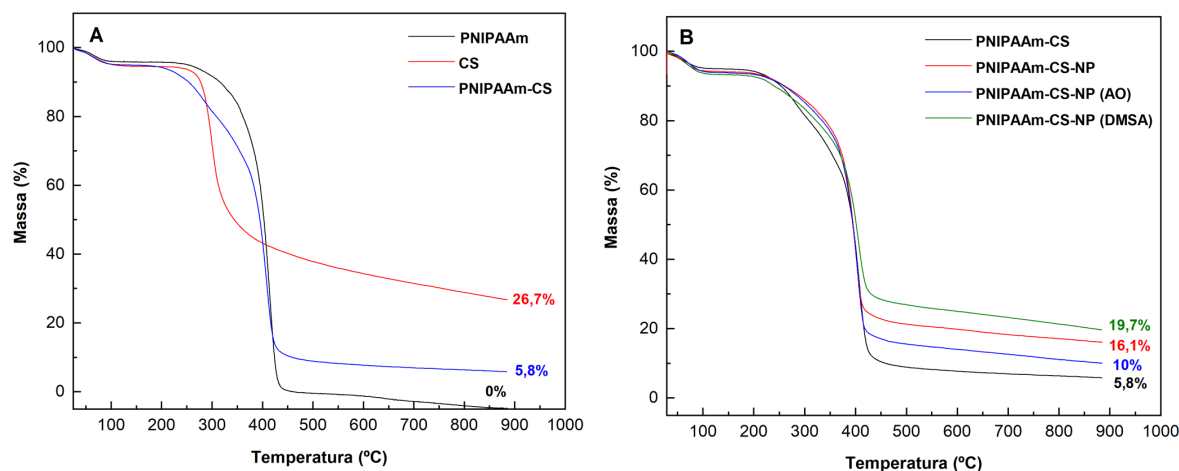


Figura 4.6 – Termogramas do quitosano, dos microgéis de PNIPAAm, e dos microgéis de PNIPAAm-CS (A). Termogramas dos microgéis de PNIPAAm-CS e dos microgéis híbridos de PNIPAAm-CS-NP, PNIPAAm-CS-NP (AO) e PNIPAAm-CS-NP (DMSA) (B).

Relativamente ao quitosano despolimerizado (Figura 4.6 (A)), no seu termograma podem ser observados dois estágios de distintos de degradação térmica. O primeiro, que ocorre a cerca de 70 °C (aproximadamente 5 % de perda) é atribuído à perda de água da amostra enquanto que o segundo estágio ocorre a cerca de 300 °C, com uma perda de massa de cerca de 65 % e corresponde à decomposição térmica e oxidativa do quitosano, vaporização e eliminação de produtos voláteis [41]. Após atingir os 900 °C, o quitosano apresenta uma percentagem de resíduo final de cerca de 26,7 %.

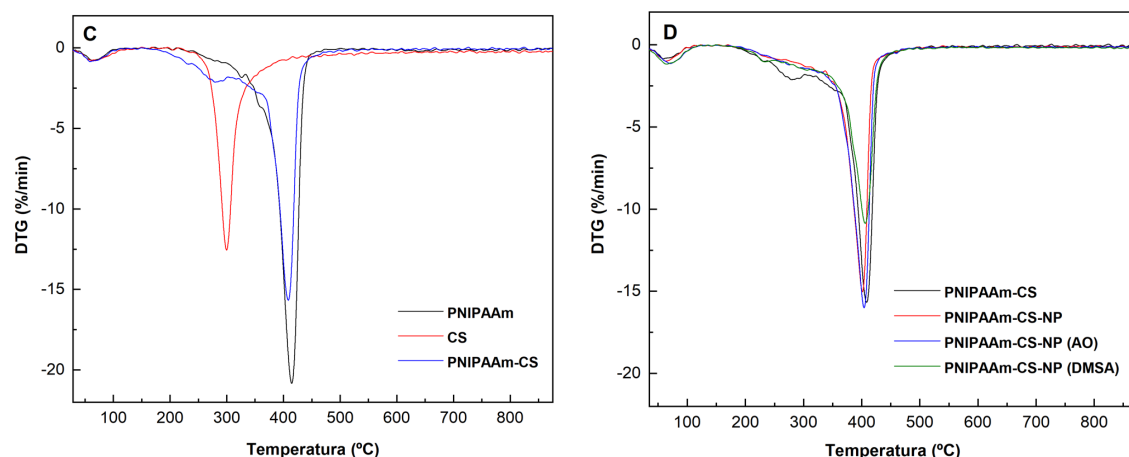


Figura 4.7 – Curvas DTG do quitosano, dos microgéis de PNIPAAm, e dos microgéis de PNIPAAm-CS (C). Curvas DTG dos microgéis de PNIPAAm-CS e dos microgéis híbridos de PNIPAAm-CS-NP, PNIPAAm-CS-NP (AO) e PNIPAAm-CS-NP (DMSA) (B).

Ambos os termogramas dos microgéis de PNIPAAm como de PNIPAAm-CS (Figura 4.6 (A)) apresentam uma primeira perda de massa entre os 25 e 100 °C que se deve à perda de água da amostra. A segunda perda de massa ocorre a cerca de 400 °C e corresponde à degradação do grupo funcional da cadeia lateral [42]. Enquanto os microgéis de PNIPAAm não apresentam qualquer resíduo final, os microgéis de PNIPAAm-CS apresentam uma percentagem de 5,8 % de massa final o que é indicativo de uma boa incorporação de quitosano nos mesmos.

Na Figura 4.6 (B) é possível observar que os termogramas dos microgéis híbridos, tal como os microgéis de PNIPAAm, apresentam as mesmas duas perdas de massa descritas anteriormente. Contudo, as diferenças com maior relevância nestes termogramas estão na percentagem de resíduo final. Uma vez que as nanopartículas são inorgânicas, estas não se decompõem com a temperatura e por isso a percentagem de resíduo final corresponde à percentagem de nanopartículas presentes na amostra e à percentagem residual de quitosano. Para os microgéis de PNIPAAm-CS-NP (AO), PNIPAAm-CS-NP e PNIPAAm-CS-NP (DMSA) esta percentagem de resíduo final foi cerca de 10; 16,1 e 19,7 %, respetivamente. Isto poderá ser indicador de uma melhor incorporação de nanopartículas revestidas com DMSA e sem revestimento nos microgéis de PNIPAAm do que daquelas revestidas com AO. Conclui-se também que a adição de quitosano e de nanopartículas aos microgéis não afeta significativamente a estabilidade térmica do PNIPAAm.

A morfologia dos microgéis termossensíveis de PNIPAAm sintetizados foi analisada por TEM. Apesar de esta técnica de microscopia não ser a ideal para analisar a morfologia deste tipo de material, foi a única técnica disponível no decorrer desta dissertação. Na Figura 4.8 apresentam-se as imagens TEM dos microgéis de PNIPAAm (a), PNIPAAm-CS-NP (b), PNIPAAm-CS-NP (AO) (c) e PNIPAAm-CS-NP (DMSA) (d). Apesar do baixo contraste da Figura 4.8 (a) devido à ausência de elementos inorgânicos, é possível observar que a síntese dos microgéis foi bem sucedida e que estes apresentam uma forma esférica como seria de esperar, com um diâmetro médio que ronda 1 μm .

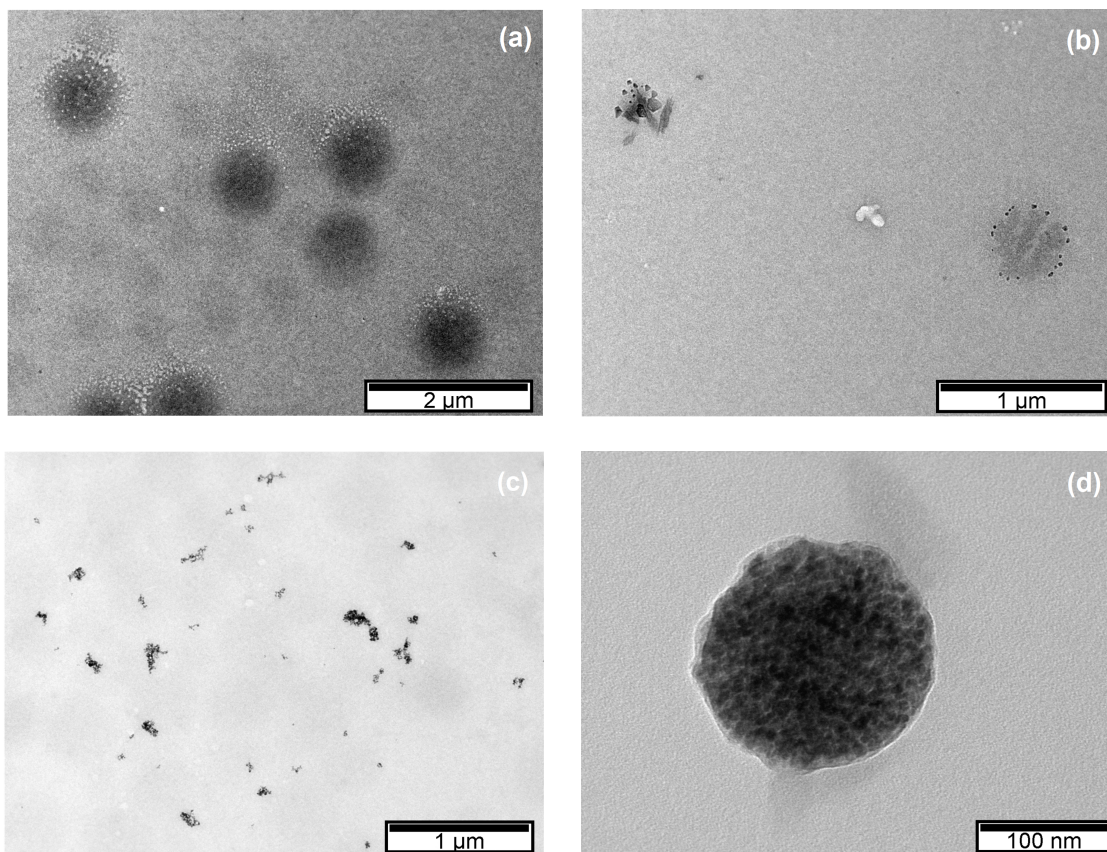


Figura 4.8 - Imagens TEM dos microgéis de PNIPAAm (a), PNIPAAm-CS-NP (b), PNIPAAm-CS-NP (AO) (c) e PNIPAAm-CS-NP (DMSA) (d).

Nos microgéis híbridos de PNIPAAm-CS-NP, a incorporação das nanopartículas é confirmada por meio da observação da Figura 4.8 (b). Contudo, verifica-se que esta incorporação ocorreu para uma pequena quantidade de nanopartículas sendo que estas se encontram na superfície dos microgéis à semelhança do que aconteceu no trabalho de Echeverria *et. al* [26]. Este fenómeno acontece uma vez que o quitosano atua como tensioativo tanto das nanopartículas como do PNIPAAm e como tal, as NP encontram-se localizadas à superfície dos microgéis.

Relativamente às nanopartículas estabilizadas com AO, Figura 4.8 (c), apesar do baixo contraste, observa-se a formação de microgéis esféricos, contudo verifica-se que as nanopartículas não foram bem incorporadas no interior dos mesmos sendo possível observação de agregados dispersos na solução. Por outro lado, as nanopartículas estabilizadas com DMSA, Figura 4.8 (d), encontram-se bem encapsuladas no interior do microgel.

Apesar de ambos os tensioativos, AO e DMSA, serem detentores de grupos carboxilo que possuem uma boa interação com os grupos amina do quitosano, é o pKa de cada um deles que dita esta mesma interação. Uma vez que a síntese dos microgéis ocorre a um pH de cerca de 5,5 e o pKa do quitosano se encontra entre 6,2 e 7, o grupo amina presente no polímero encontra-se no seu estado ionizado, NH_3^+ . Por outro lado o pKa do DMSA é de cerca de 3,37, valor inferior ao pH da reação, o que significa que pelo menos mais de metade dos grupos carboxílicos do tensioativo vão, por sua vez, encontrar-se também no seu estado ionizado, COO^- [43]. Ora, uma vez que o quitosano e o DMSA se encontram ambos no seu estado ionizado e possuem cargas opostas, poderá ocorrer a

formação de um polieletrólito através da interação dos grupos ionizados por forças electrostáticas (Figura 4.9) [43].

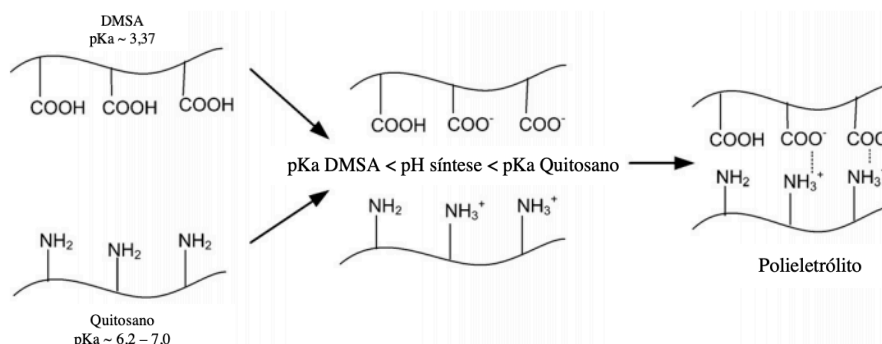


Figura 4.9 - Figura esquemática da formação de um polieletrólito entre o DMSA e o quitosano. Adaptado de [43].

A formação deste polieletrólito permite então que o quitosano atue como tensioativo e facilite a incorporação das nanopartículas no interior dos microgéis [26]. Por outro lado, uma vez que o pKa do AO é cerca de 5,0, o que se encontra muito perto do pH a que ocorre a síntese dos microgéis, a presença de grupos carboxílicos ionizados é muito menor quando em comparação com o DMSA. Isto pode ser o suficiente para que não ocorra interação com o quitosano e consequentemente não ocorra a incorporação dos mesmos nos microgéis como se observa na Figura 4.8 (c).

As conclusões retiradas através da observação das imagens TEM correspondem àquelas retiradas da análise termogravimétrica em que a melhor incorporação de nanopartículas ocorre naquelas revestidas com DMSA e de seguida para aquelas sem revestimento. A percentagem de resíduo de nanopartículas revestidas com AO nos microgéis provém dos aglomerados de NP presentes na amostra.

Através da técnica de espalhamento de luz dinâmica foi possível estudar a termosensibilidade dos microgéis, assim como a sua capacidade de inchamento em meio aquoso. Nas Figura 4.10 (A) e (B) estão representadas a evolução dos diâmetros hidrodinâmicos dos microgéis e a sua capacidade de inchamento, respetivamente, numa gama de temperaturas entre os 25 e os 40 °C. Os microgéis de PNIPAAm apresentam um diâmetro hidrodinâmico de cerca de 1 μ m e com a incorporação de 40% em peso de quitosano, verifica-se uma diminuição deste diâmetro para cerca de 250 nm, valores semelhantes àqueles reportados em outros trabalhos [26], [28]. Esta diminuição de diâmetro provém da atuação do quitosano como tensioativo, o que impede o crescimento dos microgéis durante a sua síntese [38]. Por outro lado, é possível observar que a incorporação de nanopartículas nos microgéis com quitosano provoca o aumento do seu diâmetro hidrodinâmico, como reportado no trabalho de Echeverria *et al.* [26]. É de notar que estes valores de diâmetro poderão não ser autênticos, uma vez que a medição dos mesmos poderá ter sido influenciada pela presença de aglomerados de nanopartículas devido à sua má incorporação.

Através da observação da Figura 4.10 (A) verifica-se que todas as curvas apresentam um comportamento semelhante do diâmetro hidrodinâmico com o aumento da temperatura. À temperatura ambiente os microgéis encontram-se no seu estado hidratado, no entanto, acima de uma temperatura

crítica (VPTT) o seu diâmetro diminui acentuadamente, ocorrendo o colapso dos microgéis para um diâmetro mínimo que por sua vez se mantém constante. Este fenómeno confirma a termossensibilidade dos microgéis sintetizados, mantendo-se com a incorporação de quitosano e de nanopartículas. É de notar que para valores de temperatura mais elevados, os microgéis de PNIPAAm-CS mostram um aumento de diâmetro, que poderá provir da contribuição de “partículas” maiores aquando a sua medição. Echeverria *et al.* [26] reporta o mesmo fenómeno, justificando-o como uma possível separação de fases proveniente das alterações conformacionais dos microgéis induzidas pela temperatura. Estas alterações provocam a “libertação” das cadeias de quitosano dos microgéis de PNIPAAm-CS e consequentemente dão origem a diâmetros superiores quando medidos pela técnica de DLS.

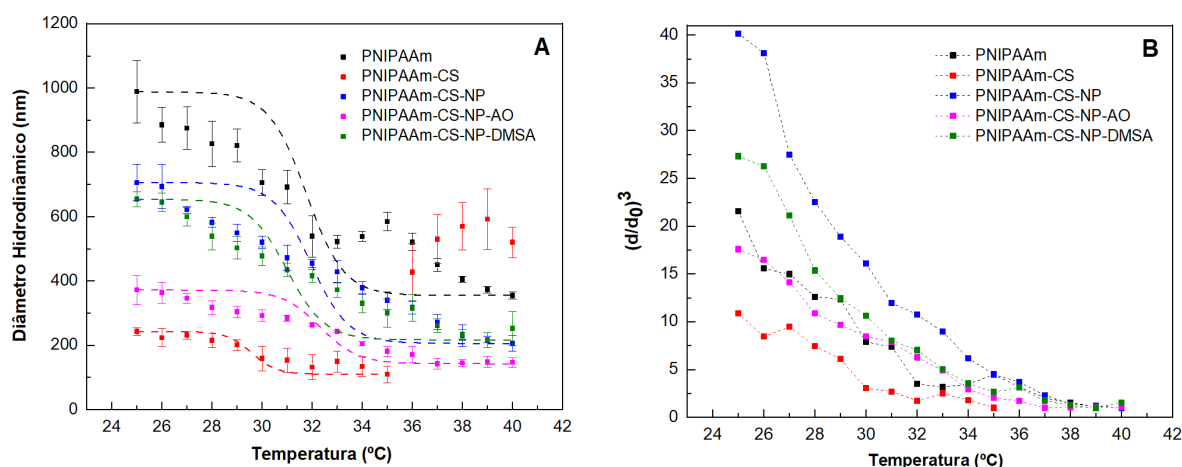


Figura 4.10 – A) Diâmetro hidrodinâmico; B) Capacidade de inchamento dos microgéis de PNIPAAm (preto), PNIPAAm-CS (vermelho), PNIPAAm-CS-NP (azul), PNIPAAm-CS-NP-AO (rosa) e PNIPAAm-CS-NP-DMSA (verde)

Conforme observado na Figura 4.10 (A) e assim como é reportado na literatura [44], os microgéis de PNIPAAm apresentam uma VPTT em solução aquosa por volta dos 30 - 32 °C. Wuang *et al.* [45] reportam o aumento da VPTT com a incorporação de quitosano em hidrogéis de PNIPAAm atribuindo-o às possíveis modificações hidrofílicas do polímero termossensível por parte da combinação química da rede de quitosano. Através da observação da curva correspondente aos microgéis de PNIPAAm-CS na verifica-se uma ligeira diminuição da VPTT, ao contrário do que seria de esperar. Ainda assim, não podemos comprovar a veracidade deste resultado uma vez que os últimos pontos da curva dos microgéis de PNIPAAm-CS não foram considerados devido à verificação do aumento de diâmetro, o que provocou um desvio da mesma para valores inferiores. Desta forma, não é possível inferir a influência da presença de quitosano na temperatura de transição dos microgéis. De maneira a obter valores de VPTT mais corretos, dever-se-ia efetuar ensaios viscosimétricos ou de espectrofotometria (UV/VIS) às soluções de microgéis [46].

O efeito da adição de quitosano e de nanopartículas aos microgéis também é claro na capacidade de inchamento dos mesmos (Figura 4.10 (B)). A incorporação de quitosano nos microgéis de PNIPAAm provoca a limitação da capacidade de inchamento em 50 % [26], [28]. Por outro lado, a adição de nanopartículas aos microgéis de PNIPAAm provoca um aumento deste parâmetro, ao contrário do que seria esperado, uma vez que tanto o quitosano como as nanopartículas podem atuar

como reticulantes, diminuindo a mobilidade das cadeias de PNIPAAm [26], [47]. Como este parâmetro de inchamento depende do diâmetro dos microgéis, mais uma vez não podemos afirmar a veracidade dos resultados obtidos uma vez que as medições dos diâmetros podem ter sido influenciadas pela presença de agregados de nanopartículas.

4.2 Membranas coloidais com dupla capacidade de resposta

4.2.1 Determinação dos Parâmetros de Eletrofiação

Previamente à incorporação dos microgéis em fibras poliméricas por eletrofiação coloidal, foi realizado o estudo dos parâmetros de eletrofiação de modo a conseguir obter membranas de PVP com o mínimo diâmetro médio de fibras e uma distribuição monodispersa dos diâmetros. Entre os parâmetros estudados encontram-se os valores de potencial de 15 e 20 kV, os valores de distância entre a agulha e o coletor de 15 e 20 cm e os valores de caudais de 0,1 e 0,3 ml.h⁻¹. O estudo foi realizado em soluções precursoras de 14 % em peso de PVP dissolvido em água etanol (36:65) e de 14 % em peso de PVP com 10 % em peso de microgéis de PNIPAAm, redispersos em água e etanol (35:65) com recurso a banho de ultrassons, durante 3 h.

Inicialmente, aquando a realização deste estudo, não foi feito qualquer controlo de humidade, sendo que esta se encontrava entre os 40 – 45%, humidade natural do laboratório onde foi efetuado o estudo. Consequentemente, não foi possível a boa formação de fibras contínuas uma vez que humidades tão elevadas não permitem a boa evaporação do solvente [48]. Desta forma reiniciou-se o estudo dos parâmetros ótimos, com controlo de temperatura e humidade sendo que estas foram mantidas entre os 20 – 25 °C e 30 – 40%, respetivamente, uma vez que estes valores são aqueles que asseguram a formação de fibras de PVP [48]. As membranas obtidas foram observadas através da técnica de microscopia eletrónica de varrimento – SEM – e posteriormente foram medidos os diâmetros das fibras através do software *Image J*. Os resultados dos diâmetros médios das fibras das membranas de PVP e das membranas de PVP com microgéis de PNIPAAm incorporados encontram-se reunidos na Tabela 4.1 e as respetivas imagens de onde se retiraram os valores de diâmetro encontram-se no anexo 6.4 (Figura 6.2, Figura 6.3, Figura 6.4 e Figura 6.5).

Através da observação da imagens que se encontram no anexo 6.4 verificamos que as fibras de PVP e PVP/PNIPAAm não apresentam qualquer tipo de defeitos. Contudo, nas imagens das fibras de PVP/PNIPAAm observam-se grandes aglomerados de microgéis, o que é indicativo de que a utilização de banho de ultrassons não é o método mais adequado para a redispersão dos mesmos. Optou-se por redispersar os microgéis recorrendo à ponta de ultrassons na preparação das soluções seguintes.

Pela leitura da Tabela 4.1, é clara a influência dos parâmetros em estudo no diâmetro das fibras obtidas. Verifica-se que o aumento do potencial aplicado proporciona a formação de fibras com um menor diâmetro médio, como seria de esperar. Quando tensões mais elevadas são aplicadas, o jato de polímero que sai da agulha sofre um maior alongamento, o que leva à formação de fibras com um menor diâmetro [49]. Também se observa que o aumento da distância da ponta da agulha provoca o decréscimo dos valores de diâmetro obtidos uma vez que aumenta o tempo de estiramento das fibras e o tempo de evaporação do solvente [49]. Por sua vez, o aumento do valor do caudal provoca um

aumento no diâmetro médio das fibras uma vez que este parâmetro determina a quantidade de solução disponível na ponta da agulha para a formação de fibras [50].

Tabela 4.1 - Fatores em estudo para a otimização do processo de eletrofiação com os correspondentes diâmetros médios obtidos das fibras das amostras de membranas de PVP e de membranas de PVP com microgéis de PNIPAAm incorporados

Amostra	Potencial (kV)	Distância (cm)	Caudal (ml/h)	Diâmetro Médio (nm)	
				PVP	PVP/PNIPAAm
A1	15	15	0,1	557 ± 67	537 ± 168
A2			0,3	536 ± 50	584 ± 96
A3		20	0,1	464 ± 91	510 ± 209
A4			0,3	481 ± 83	596 ± 111
A5	20	15	0,1	388 ± 65	425 ± 73
A6			0,3	475 ± 56	554 ± 118
A7		20	0,1	370 ± 44	421 ± 64
A8			0,3	420 ± 53	456 ± 78

Assim sendo, verifica-se que tanto o menor valor de diâmetro médio de fibra como o menor valor de desvio padrão para as fibras de PVP ocorrem para valores de potencial, distância e caudal de 20 kV, 20 cm e 0,1 ml.h⁻¹, respetivamente. É de notar que estes parâmetros ótimos se transpõem para as amostras de PVP/PNIPAAm uma vez que também deram origem às fibras com menor diâmetro médio. Embora o valor de caudal ótimo tenha sido de 0,1 ml.h⁻¹, optou-se por escolher o valor de caudal de 0,3 ml.h⁻¹, aumentando o diâmetro médio das fibras, mas encurtando o seu tempo de deposição. Na Figura 4.11 e Figura 4.12 encontram-se as membranas de PVP e PVP/PNIPAAm obtidas com os parâmetros ótimos escolhidos, e a respetiva distribuição de diâmetros.

Depois de determinados os parâmetros ótimos para o processo de eletrofiação, foram produzidas as membranas de PVP com os microgéis incorporados através de eletrofiação coloidal. Uma vez que o PVP é solúvel em água, as membranas produzidas não possuíam as condições necessárias para serem empregues em aplicações biomédicas. De maneira a resolver este problema, as membranas foram reticuladas na estufa, a uma temperatura de 165 °C durante 24 h de maneira a prevenir a sua dissolução quando em contacto com água. Os valores ótimos de temperatura e duração da reticulação das membranas foram otimizados no Departamento de Ciências dos Materiais por um aluno de doutoramento (Ricardo Matos) em paralelo com a realização deste trabalho de dissertação, baseados no estudo de Newsome *et al.* [50].

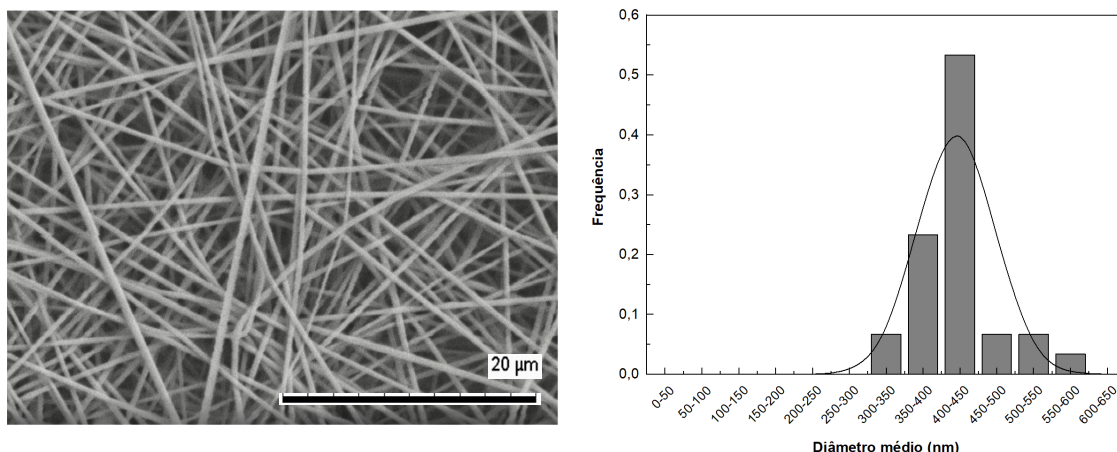


Figura 4.11 - Imagem SEM das fibras de PVP produzidas com as condições da amostra A8, potencial de 20 kV, distância de 20 cm, caudal de 0,3 ml.h⁻¹ e respetiva distribuição de diâmetros.

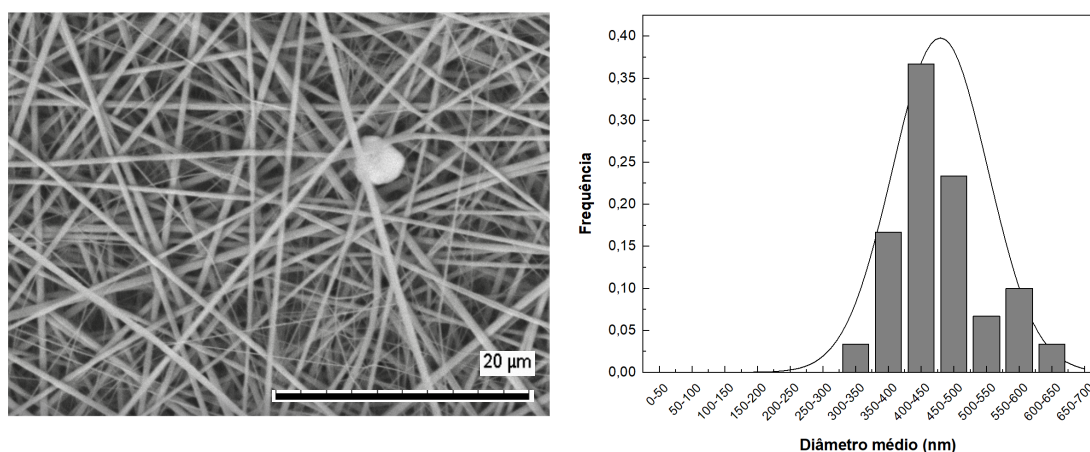


Figura 4.12 - Imagem SEM das fibras de PVP/PNIPAAm produzidas com as condições da amostra A8, potencial de 20 kV, distância de 20 cm, caudal de 0,3 ml.h⁻¹ e respetiva distribuição de diâmetros.

É de notar que aquando o processo de eletrofiação das soluções de PVP/PNIPAAm observou-se uma separação de fases da solução precursora, no interior da seringa, indicador de uma solução coloidal instável. Uma vez que os microgéis foram dispersos numa solução de água e etanol (numa proporção de 35:65) para garantir a sua co-não solvência, estes poderão ter assentado no fundo da agulha devido às suas dimensões separando-se da solução de PVP. f

4.2.2 Caracterização das Membranas

Na Figura 4.13 (A) encontra-se representado o espectro FTIR do polímero PVP (a), dos microgéis de PNIPAAm (b) e da membrana de PVP/PNIPAAm (c). No espectro do PVP (a) é possível identificar as bandas características do polímero. A cerca de 3460 cm⁻¹ surge a banda correspondente à elongação da ligação -OH proveniente da água adsorvida à superfície da amostra. As bandas a 2950

cm^{-1} e 1650 cm^{-1} correspondem à vibração assimétrica da ligação -CH e à vibração do grupo carbonilo (C=O), respetivamente. Por último surgem as bandas a cerca de 1420 cm^{-1} e 1270 cm^{-1} características da elongação das ligações -CH e -CN [51]. No espectro das membranas compósitas (c), a cerca de 1650 cm^{-1} , surge uma banda resultante da combinação da contribuição das vibrações do grupo C=O e -NH [52]. As bandas a 1430 cm^{-1} e 1280 cm^{-1} são as correspondentes às vibrações dos grupos -CH e -CN , respetivamente, apresentados no espectro do PVP. A presença destas bandas assegura-nos uma boa incorporação dos microgéis nas membranas de PVP eletrofiadas. Na Figura 4.13 (B) encontram-se os espectros FTIR das membranas de PVP/PNIPAAm (a), PVP/PNIPAAm-CS (b), PVP/PNIPAAm-CS-NP (c), PVP/PNIPAAm-CS-NP (DMSA) (d) e PVP/PNIPAAm-CS-NP (AO) (e).

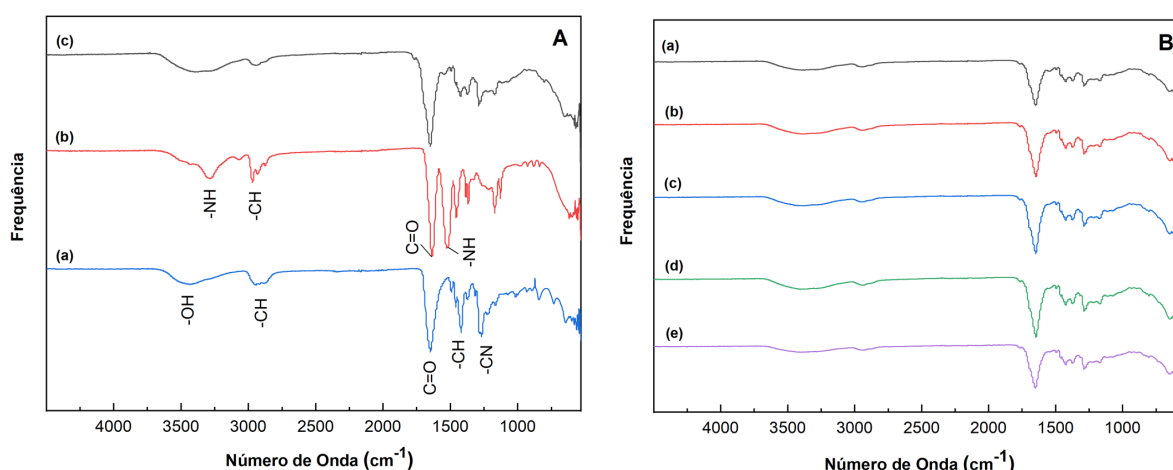


Figura 4.13 - A) Espectro FTIR do PVP (a), dos microgéis de PNIPAAm (b) e da membrana de PVP/PNIPAAm (c); B) Espectro FTIR das membranas de PVP/PNIPAAm (a), PVP/PNIPAAm-CS (b), PVP/PNIPAAm-CS-NP (c), PVP/PNIPAAm-CS-NP (DMSA) (d) e PVP/PNIPAAm-CS-NP (AO) (e).

É possível observar que os espectros das membranas obtidas são bastante semelhantes entre si, apresentando todas as bandas descritas anteriormente, em relação ao espectro da membrana de PVP/PNIPAAm (Figura 4.13 A (c)). Ainda assim, nos espectros das membranas em que se encontram incorporados os microgéis que contêm nanopartículas (c, d e e) não é perceptível a existência da banda correspondente à presença de óxido de ferro (Fe-O) na amostra. Isto não significa que as nanopartículas não estejam presentes na membrana, uma vez que a percentagem de NP presente nas membranas é significativamente pequena.

Na Figura 4.14 apresentam-se as imagens TEM das fibras de PVP/PNIPAAm (a), PVP/PNIPAAm-CS-NP (b), PVP/PNIPAAm-CS-NP (AO) (c) e PVP/PNIPAAm-CS-NP (DMSA) (d).

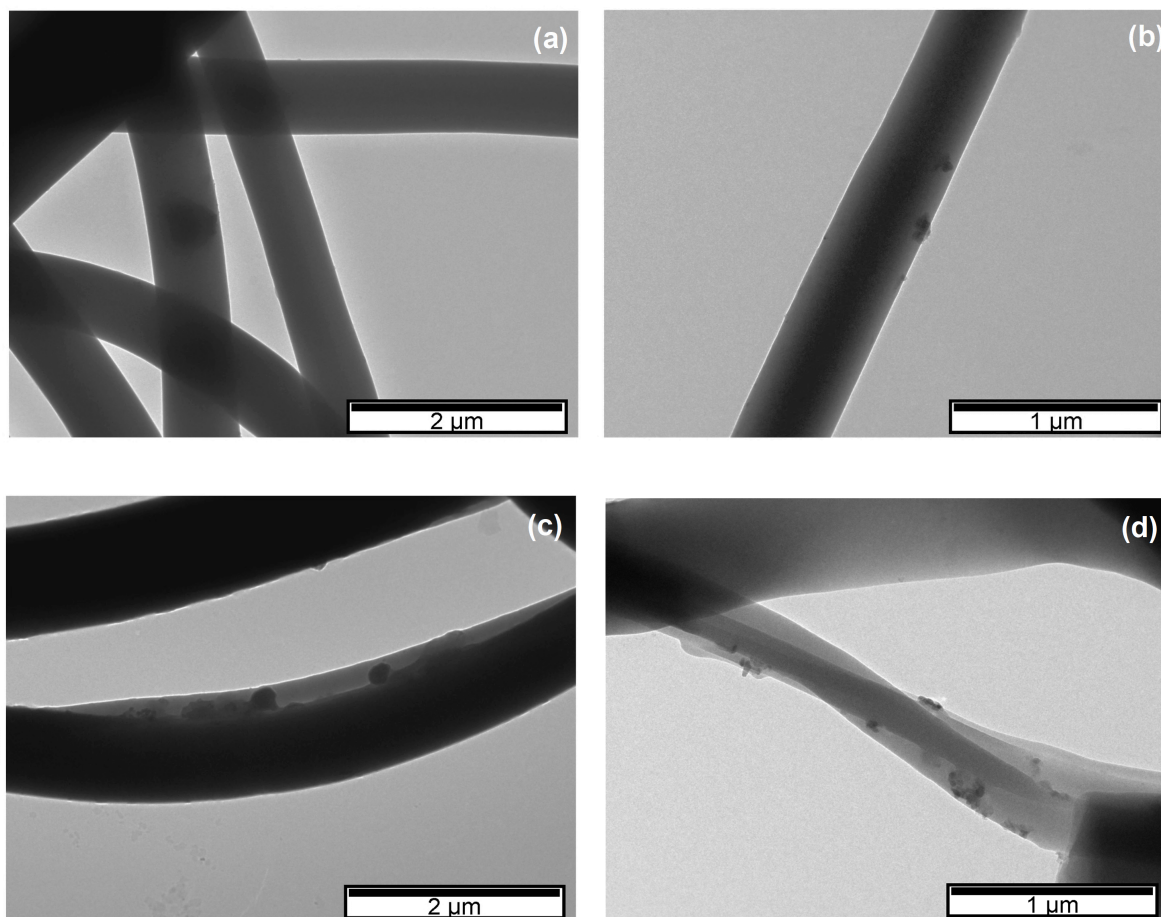


Figura 4.14 - Imagens TEM das fibras de PVP/PNIPAAm (a), PVP/PNIPAAm-CS-NP (b), PVP/PNIPAAm-CS-NP (AO) (c) e PVP/PNIPAAm-CS-NP (DMSA) (d).

Em todas as imagens é possível a verificação da incorporação de microgéis nas fibras de PVP produzidas pelo processo de eletrofiação coloidal. No entanto, devido ao facto de o diâmetro das fibras ser tão superior àquele dos microgéis secos, não foi possível a obtenção de uma estrutura “*bead-on-a-string*”. O interesse desta estrutura passa pela maior área superficial em contacto com o meio, aumentando a eficiência do sistema. No trabalho de Faria *et al.* [29] em que foram produzidas membranas compósitas de PVP/PNIPAAm-AAc também não foi possível a obtenção de uma estrutura “*bead-on-a-string*” sendo que as fibras produzidas possuíam diâmetros de cerca de 497 nm. Podemos inferir que o PVP não é o melhor candidato para a obtenção deste tipo de morfologia uma vez que dá origem a fibras com diâmetros muito superiores àqueles dos microgéis incorporados.

Por outro lado, esta morfologia foi observada no trabalho de Marques *et al.* [28] que utilizou o PEO como matriz polimérica das membranas compósitas uma vez que as fibras obtidas possuíam diâmetros muito menores, cerca de 63 nm, que os microgéis incorporados.

4.2.3 Ensaios de Inchamento

Foram realizados ensaios de inchamento às membranas produzidas de maneira a compreender se a incorporação dos diferentes tipos de microgéis teria efeito na capacidade de inchamento das

mesmas. Para a realização destes ensaios, recortaram-se as diferentes membranas em dimensões de 10 x 10 cm e imergiram-se as mesmas numa solução tampão fosfato-salino (PBS) a tempos de 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, e 4 h. Para cada tempo de imersão foram efetuadas 3 réplicas. Foram medidas as massas das membranas antes e após o tempo de imersão, e foi calculada a razão de inchamento através da equação 6.

$$I = \frac{mf - mi}{mi} \quad (\text{eq. 6})$$

Em que mi e mf correspondem à massa da membrana, antes e depois da sua imersão, respetivamente.

Na Figura 4.15 encontram-se traçadas as curvas de razão de inchamento dos diferentes tipos de membranas (A) e os valores de inchamento a 4 h de imersão (B). É possível verificar na Figura 4.15 (A) que todas as curvas apresentam um comportamento exponencial e que esta razão de inchamento estabiliza por volta da 1 h de imersão.

Não foram efetuados ensaios de inchamento a membranas de PVP, no entanto o trabalho de Faria *et al.* [29] mostra que em membranas de PVP reticuladas com radiação UV a incorporação de microgéis de PNIPAAm-AAc nas mesmas provoca uma diminuição na capacidade de inchamento das membranas de 30 (g/g) para cerca de 12 (g/g). Este fenómeno é justificado com o facto de as membranas com microgéis possuírem um menor coeficiente de difusão e, portanto, incham menos que as membranas sem microgéis confinados.

Através da observação da Figura 4.15 (B), é possível inferir que as membranas de PVP/PNI-PAAm atingem a maior razão de inchamento, de aproximadamente 10 (g/g), valor ligeiramente inferior àquele referido anteriormente [29] o que nos indica que o tipo de reticulação utilizado poderá ter influência na capacidade de inchamento das membranas.

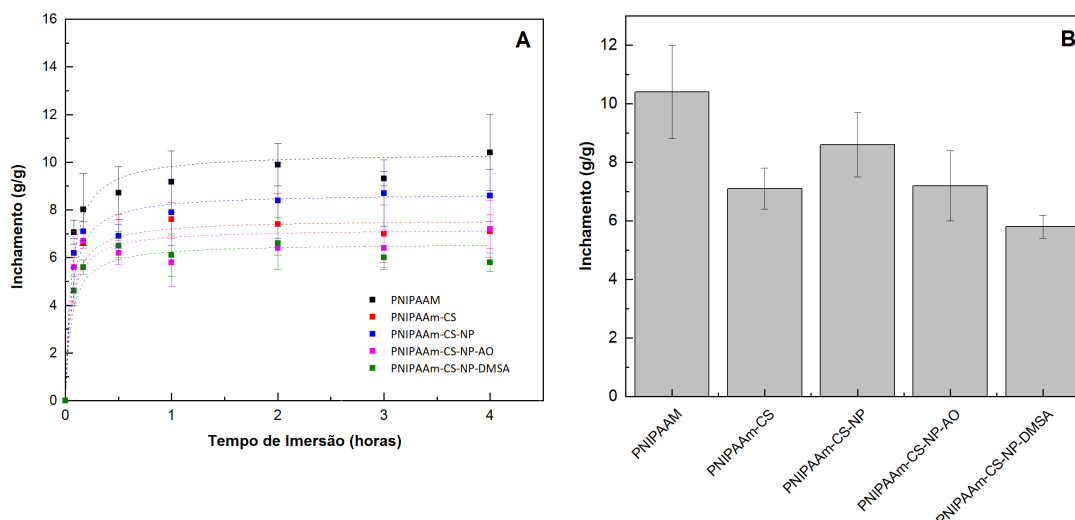


Figura 4.15 – A) Curvas de Inchamento para as membranas de PVP/PNIPAAm (preto), PVP/PNI-PAAm-CS (vermelho), PVP/PNIPAAm-CS-NP (azul), PVP/PNIPAAm-CS-NP-AO (rosa) e PVP/PNI-PAAm-NP-DMSA (verde); B) Valores de inchamento para 4 h de imersão.

Por sua vez, a presença de quitosano nos microgéis (PVP/PNIPAAm-CS) incorporados nas membranas provoca o decréscimo desta razão de inchamento para valores de cerca de 7 (g/g). Esta diminuição da capacidade de inchamento na presença de quitosano foi reportada por Oliveira *et al.* [53] no seu estudo em membranas de PVP/CS. Ainda que no presente trabalho o quitosano se encontre incorporado nos microgéis, podemos deduzir que a presença do mesmo poderá ter a mesma influência quando comparado com o trabalho de Oliveira *et al.* Assim como descrito nos ensaios de espalhamento de luz dinâmica, o quitosano poderá atuar como agente reticulante diminuindo a capacidade dos microgéis e consequentemente, a capacidade de inchamento das membranas.

A adição de nanopartículas nos microgéis presentes nas membranas eletrofiadas não possui grande influência na capacidade de inchamento das mesmas uma vez que, tendo em consideração o erro associado, este valor de inchamento não varia muito daquele das membranas de PNIPAAm-CS. O tipo de tensioativo utilizado na síntese das nanopartículas também não aparenta ter influência nos valores de inchamento obtidos.

4.2.4 Ensaios de Tração

Foram realizados ensaios de tração para avaliar as propriedades mecânicas das membranas produzidas e a influência que a incorporação dos microgéis tem nas mesmas. A partir das curvas de tração foram retirados os parâmetros de módulo de Young (E), que caracteriza a rigidez do material; a tensão cedência (σ_C), que é o valor de tensão que distingue o regime elástico do regime plástico; e o valor de resistência à tração (UTS) que corresponde ao valor tensão máxima que o material consegue suportar sem fraturar. Estes parâmetros encontram-se representados na Figura 4.16.

Não foram efetuados ensaios de tração a membranas de PVP, contudo o estudo Faria *et al.* [29] reporta que membranas de PVP reticuladas com radiação UV durante 30 min. apresentam um módulo de Young de cerca de 25 MPa e uma resistência à tração de 3 MPa. Com a adição de microgéis de PNIPAAm-AAc na membrana, para o mesmo tempo de reticulação estes valores decrescem para cerca de 21 MPa e 2,5 MPa para o módulo de Young e a resistência à tração, respetivamente. A presença de microgéis nas membranas de PVP provoca uma diminuição da rigidez das membranas e na sua resistência à tração.

As membranas de PVP/PNIPAAm produzidas apresentam um módulo de Young de cerca de 10 MPa e uma resistência à tração de 1,5 MPa, que quando comparados com os valores obtidos por Faria *et al.* [29] nos permitem inferir que o tipo de reticulação tem bastante influência nas propriedades mecânicas da membrana, sendo que estas apresentam maiores valores quando reticuladas através de radiação UV do que quando reticuladas recorrendo a temperatura.

A adição de quitosano aos microgéis incorporados na solução de PVP eletrofiada aumenta a rigidez do material uma vez que se verifica o aumento do valor do módulo de Young para valores de cerca de 18 MPa e uma diminuição da resistência à tração e da tensão de cedência para valores de 0,4 e 0,25 MPa, respetivamente. Koosha *et al.* [54] estudou as propriedades mecânicas de fibras eletrofiadas de PVA/CS e verificou que a presença de quitosano provoca uma diminuição no módulo de Young e tensão de cedência das membranas. Apesar de no presente trabalho o quitosano se encontrar incorporado nos microgéis, podemos inferir que a presença deste poderá ter a mesma

influência quando comparado com o trabalho de Koosha *et. al.* O facto de isto não se verificar no presente trabalho, poderá ser explicado pela heterogeneidade das membranas obtidas, referido no ponto 4.4.1.

É também possível verificar que a presença de nanopartículas nas membranas também provoca o aumento do valor do módulo de Young mas que a resposta mecânica das membranas é independente do tipo de revestimento das nanopartículas uma vez que o módulo de Young atinge um valor semelhante de cerca de 35 MPa para estas membranas. O trabalho de Matos *et al.* [55] consistiu no desenvolvimento de membranas de acetato de celulose incorporadas com nanopartículas de óxido de ferro e reporta o aumento da rigidez em membranas com nanopartículas presentes independentemente do tensioativo utilizado na sua estabilização. Novamente, no presente trabalho as nanopartículas encontram-se incorporados no interior dos microgéis mas podemos inferir que terão a mesma influência nos resultados dos ensaios mecânicos. Também se verifica que os valores de resistência à tração e tensão de cedência não variam muito com a adição de nanopartículas aos microgéis ao contrário do verificado no trabalho referido anteriormente [55]. Esta diferença de resultados poderá ser proveniente, mais uma vez, da heterogeneidade das membranas produzidas.

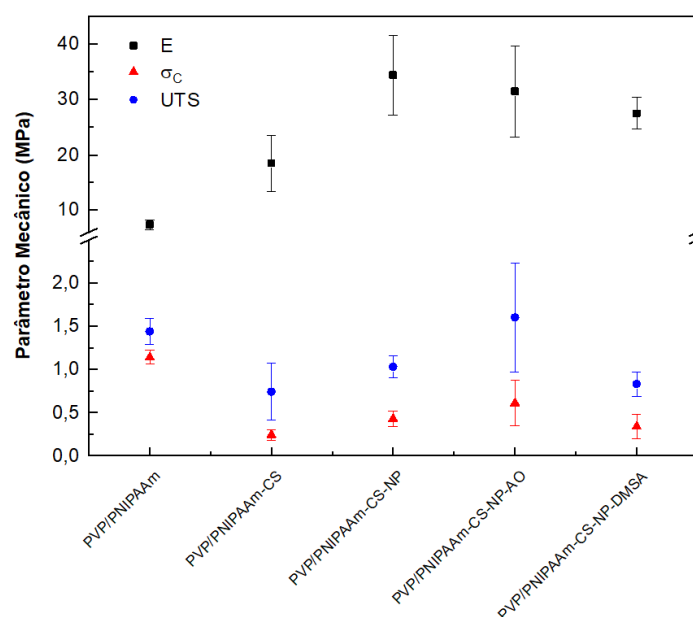


Figura 4.16 - Parâmetros mecânicos das membranas produzidas: módulo de Young (quadrados pretos), tensão de limite de elasticidade (bolas azuis) e tensão de cedência (triângulos vermelhos)

4.2.5 Hipertermia Magnética

Os ensaios de hipertermia magnética foram realizados de maneira a avaliar a capacidade de aquecimento das nanopartículas incorporadas nas membranas de PVP. Estes ensaios foram realizados com uma densidade de fluxo de 300 Gauss, uma frequência de 418,5 kHz e uma duração de 10 minutos. Foram efetuados ensaios a 10 e 20 mg de cada tipo de membrana produzida. Uma vez que foram incorporados 10 % em peso de microgéis na solução eletrofiada, também se realizaram ensaios a concentrações de microgéis de 1 e 2 mg.ml⁻¹. Por sua vez, como foram incorporados 5 % em peso de nanopartículas aos microgéis sintetizados também se avaliou a capacidade de aquecimento de

concentrações de nanopartículas de 0,05 e 0,1 mg.ml⁻¹. Desta forma é possível fazer a comparação da capacidade de aquecimento uma vez que todos os componentes possuem a mesma concentração teórica de nanopartículas magnéticas.

Na Figura 4.17 encontram-se representadas as variações de temperatura para concentrações de nanopartículas de 0,05 e 0,1 mg.ml⁻¹ (A), para concentrações de microgéis de 1 e 2 mg.ml⁻¹ (B) e para massa de membrana de 10 e 20 mg (C). Para todos os casos é perceptível o maior aumento de temperatura para as nanopartículas nuas do que para ambas as nanopartículas estabilizadas, seja com DMSA ou com AO. Isto pode acontecer devido ao facto de o agente estabilizador formar uma camada em redor das nanopartículas, o que pode restringir o seu spin quando submetidas a um campo magnético alternado e por sua vez restringir a sua capacidade de gerar calor [56].

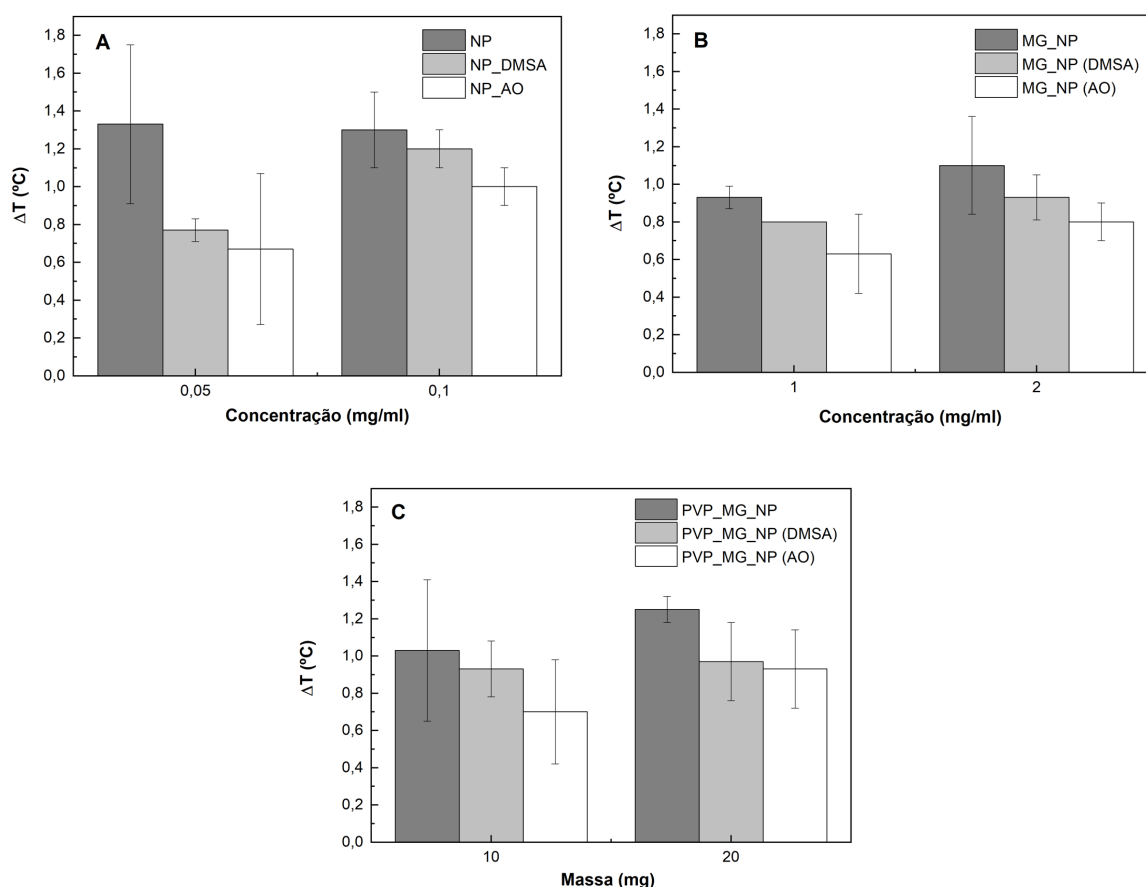


Figura 4.17 - Variação da temperatura para concentrações de nanopartículas de 0.05 e 0.1 mg.ml⁻¹ (A), concentrações de microgéis (B) de 1 e 2 mg.ml⁻¹ e para as membranas com uma massa de 10 e 20 mg (C)

É possível verificar um ligeiro aumento da capacidade de aquecimento com o aumento da concentração de nanopartículas de 0,05 para 0,1 mg.ml⁻¹, também observado nos microgéis e nas membranas o que se encontra de acordo com o esperado, uma vez que variação de temperatura aumenta com a concentração de nanopartículas [16]. Para todos os componentes a diferença de temperatura para as mesmas concentrações teóricas de nanopartículas apresenta-se semelhante o que pode ser indicador da boa incorporação das nanopartículas nos microgéis e dos microgéis nas membranas produzidas. As membranas que possuem a maior capacidade de aquecimento são aquelas cujos microgéis incorporados contém nanopartículas nuas, para uma concentração de 0,1 mg.ml⁻¹,

apresentando uma diferença de temperatura de 1,3 °C, seguidas daqueles com nanopartículas estabilizadas com DMSA com uma capacidade de aquecimento de 1 °C e de seguida com AO, com 0,9 °C. Uma vez que apenas se verificou uma boa incorporação nos microgéis de nanopartículas sem revestimento e estabilizadas com DMSA, serão apenas estas duas amostras que teremos em consideração. Assumindo que a temperatura corporal normal é cerca de 37 °C, uma variação de temperatura de 1,3 °C ou de 1 °C não é o suficiente para atingir o valor desejado em tratamentos de hipertermia magnética (cerca de 42°C). Ainda assim é possível que o aumento da percentagem de nanopartículas incorporadas nos microgéis seja o suficiente para atingir essa temperatura desejada.

4.2.6 Ensaios de Citotoxicidade

De maneira a avaliar a biocompatibilidade das membranas de PVP incorporadas com microgéis de PNIPAAm com a incorporação de nanopartículas, avaliou-se o efeito citotóxico que estas mesmas membranas têm em células Vero, através do método do extrato, de acordo com a norma ISO 10993 “*Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*”. Os ensaios foram realizados para uma concentração de extrato de 20 mg/ml em que foram efetuadas quatro diluições de fator de 2. Os resultados encontram-se na Figura 4.18, que expressa a viabilidade celular em % que é calculada através da equação 7.

$$Viabilidade\ celular = \frac{n^{\circ}\ de\ células\ em\ contacto\ com\ extrato}{n^{\circ}\ de\ células\ do\ controlo\ negativo} \times 100 \quad (eq.\ 7)$$

Dada a biocompatibilidade do polímero PVP, dos microgéis de PNIPAAm e do quitosano utilizado para a produção das membranas, qualquer citotoxicidade apresentadas por parte das amostras analisadas dependerá da quantidade de nanopartículas magnéticas incorporadas e do tensioativo presente nas mesmas.

Todos os ensaios revelam a ausência de citotoxicidade, uma vez que apresentam valores de viabilidade celular acima de 90 %. É também possível verificar que a viabilidade celular aumenta com o número de diluições, como seria de esperar. As membranas cujos microgéis incorporam nanopartículas estabilizadas com ácido oleico apresentam uma ligeira diminuição nos valores de viabilidade celular, mas ainda assim apresentam valores considerados não citotóxicos. Todas as outras membranas apresentam valores de viabilidade celular semelhantes. Podemos então concluir que membranas de PVP com microgéis de PNIPAAm incorporados com percentagens de nanopartículas de 5% não apresentam qualquer tipo de citotoxicidade podendo ser utilizadas em aplicações biomédicas.

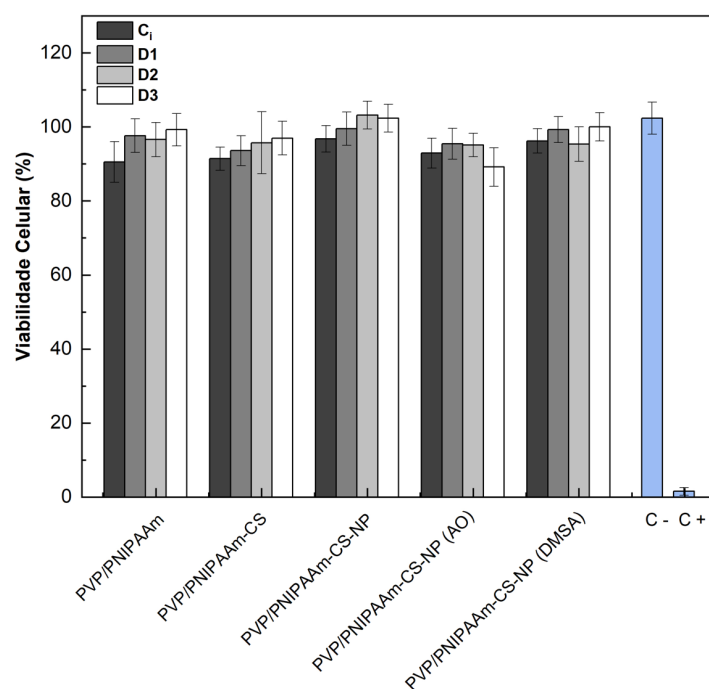


Figura 4.18 – Viabilidade das células após 24 h de exposição aos extratos das membranas: PVP/PNIPAAm, PVP/PNIPAAm-CS, PVP/PNIPAAm-CS-NP, PVP/PNIPAAm-CS-NP-AO e PVP/PNIPAAm-CS-NP-DMSA assim como o controlo negativo e controlo positivo. Ci – concentração inicial, D1 – primeira diluição; D2 – segunda diluição; D3 – terceira diluição.

5. Considerações Finais

Este trabalho teve como objetivo a produção de microgéis híbridos com dupla capacidade de resposta, incorporados em fibras poliméricas para aplicações em hipertermia magnética.

Primeiramente as nanopartículas foram sintetizadas através do método de co-precipitação química e estabilizadas com AO e DMSA de maneira a prevenir a sua agregação. Os resultados de FTIR confirmaram a ligação dos tensioativos às nanopartículas e os resultados de DRX indicaram-nos a presença de uma estrutura cristalina nas mesmas, independentemente da presença do tensioativo. Verificou-se haver concordância com o tamanho médio da cristalite calculado a partir dos resultados de DRX e o diâmetro médio das nanopartículas obtido através das imagens de TEM. Esses valores obtidos foram todos inferiores a 20 nm, o que indica que as nanopartículas sintetizadas possuem propriedades superparamagnéticas.

Os microgéis de PNIPAAm foram sintetizados com sucesso através do método de precipitação por emulsão sem tensioativo. Foram incorporados 40% em peso de quitosano de maneira a atuar como tensioativo entre o PNIPAAm e as nanopartículas, facilitando a incorporação das mesmas. Foram incorporados 5 % em peso de nanopartículas magnéticas nos microgéis. Os resultados de FTIR mostraram uma possível boa incorporação do quitosano e das nanopartículas nos microgéis uma vez que no espectro são apresentadas as bandas características de cada um. A análise termogravimétrica permitiu concluir que as amostras analisadas possuíam uma maior percentagem de nanopartículas estabilizadas com DMSA e sem revestimento. As imagens de TEM suportam esta conclusão uma vez que se observa uma boa incorporação de nanopartículas revestidas com DMSA no interior dos microgéis e de nanopartículas sem revestimento à superfície dos mesmos. Contudo o mesmo não aconteceu com as NPs estabilizadas com AO, sendo possível a observação de agregados de nanopartículas em solução.

Os microgéis sintetizados possuíam um diâmetro hidrodinâmico de cerca de 1 μm a 25 °C que com a incorporação de quitosano decrescia para cerca de 250 nm. Esta incorporação também limitou a capacidade de inchamento dos microgéis para cerca de 50 %, como seria de esperar. Ainda assim não podemos comprovar a veracidade dos resultados obtidos para os microgéis híbridos uma vez que o diâmetro medido poderá ter sido influenciado pela presença de aglomerados de nanopartículas.

O processo de eletrofiação foi otimizado utilizando uma solução de 14 % em peso de PVP dissolvido em água e etanol, numa proporção de 35:65. A mesma otimização foi efetuada para a mesma solução com microgéis redispersos. Para ambos os estudos, os parâmetros ótimos de eletrofiação foram de 20 kV de potencial aplicado, 20 cm de distância da agulha ao coletor e 0,1 ml.h⁻¹ de caudal. Ainda assim, durante a produção das membranas, foi utilizado um caudal de 0,3 ml.h⁻¹ de maneira a encurtar o tempo de deposição, dando origem a membranas de PVP e PVP/PNIPAAm com diâmetros de 420 ± 53 e 456 ± 78 nm, respetivamente. Os resultados de FTIR e as imagens TEM confirmam a existência dos microgéis nas membranas produzidas através do processo de eletrofiação coloidal.

Os ensaios de inchamento das membranas permitiram concluir que a adição de quitosano nos microgéis presentes nas membranas provoca a diminuição da sua capacidade de inchamento, mas

que a adição de nanopartículas não causa alteração significativa. Os resultados dos ensaios de tração mostraram que a adição das nanopartículas nos microgéis incorporados na matriz polimérica promove o aumento da rigidez das membranas, aumentando o seu módulo de Young. Em comparação com o trabalho de Faria *et al.* [29], concluiu-se que o tipo de reticulação utilizado tem influência tanto no inchamento como nas propriedades mecânicas das membranas, mostrando melhores resultados quando utilizada a técnica de radiação UV ao invés da reticulação com o auxílio da temperatura. Ainda assim, o facto de o valor de inchamento ser superior em membranas reticuladas com auxílio a radiação UV poderá significar uma reticulação menos eficaz uma vez que existem menos pontos de reticulação na membrana, facilitando a capacidade de inchamento da mesma.

Os ensaios de hipertermia magnética efetuados aos vários tipos de membrana, mostraram que a incorporação de nanopartículas sem revestimento provoca uma maior variação de temperatura. A capacidade de aquecimento das membranas em que ocorreu a melhor encapsulação das nanopartículas nos microgéis, aquelas sem revestimento e revestidas com DMSA, foi de cerca de 1,3 °C e 1° C. Apesar esta variação não ser suficiente para atingir a temperatura desejada em tratamentos de hipertermia magnética, o aumento da percentagem de nanopartículas incorporadas nos microgéis poderá ser suficiente para atingir essa temperatura. As membranas produzidas, através dos ensaios de citotoxicidade, revelaram ausência de citotoxicidade, mostrando serem adequadas em aplicações biomédicas.

Os resultados obtidos neste presente trabalho mostram a potencialidade do sistema produzido em aplicações de hipertermia magnética. Ainda assim é necessário aprofundar o seu estudo para que possa ter aplicações concretas. O principal foco de trabalhos futuros deverá ser o estudo da concentração de nanopartículas incorporadas nos microgéis de modo a ser possível alcançar diferenças de temperatura mais elevadas nos ensaios de hipertermia magnética e consequentemente o estudo da citotoxicidade dessas concentrações mais elevadas.

Será interessante o estudo da otimização do processo de eletrofiação utilizando um polímero capaz de produzir fibras com um diâmetro médio inferior, de modo a conseguir obter estruturas “*bead-on-a-string*” quando incorporados os microgéis.

Por fim, mas não menos importante, é pertinente o estudo destes mesmos sistemas desenvolvidos na área da libertação controlada de fármacos.

Referências

- [1] X. Chen e R. Paulmurugan, *Introduction to Cancer Biology*. 2012.
- [2] L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, e A. Jemal, “Global Cancer Statistics, 2012,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 65, no. 2, pp. 87–108, 2015.
- [3] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, e A. Jemal, “Global Cancer Statistics 2018,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 11, pp. 394–424, 2018.
- [4] A. Yadollahpour, S. A. Hosseini, e A. Yadollahpour, “Magnetic nanoparticle based hyperthermia: A review of the physiochemical properties and synthesis methods,” *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.*, vol. 5, no. 2, pp. 242–246, 2016.
- [5] P. I. P. Soares, “Chitosan-based magnetic nanoparticles for osteosarcoma theranostic,” p. 300, 2015.
- [6] K. Mcnamara, S. A. M. Tofail, K. Mcnamara, e S. A. M. Tofail, “Nanoparticles in biomedical applications,” *Adv. Phys. X*, vol. 2, no. 1, pp. 1–35, 2017.
- [7] T. Kobayashi, “Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles,” *Biotechnol. J.*, vol. 6, no. 11, pp. 1342–1347, 2011.
- [8] H. Dietsch, V. Malik, M. Reufer, C. Dagallier, A. Shalkevich, e M. Saric, “Soft nanotechnology - From colloid physics to nanostructured functional materials,” *Chimia (Aarau)*, vol. 62, no. 10, pp. 805–814, 2008.
- [9] H. Lee, S. J. Lee, S. Uthaman, R. G. Thomas, e H. Hyun, “Biomedical Applications of Magnetically Functionalized Organic / Inorganic Hybrid Nanofibers,” pp. 13661–13677, 2015.
- [10] C. E. Zabala, “Desarrollo de Microgeles Termosensibles Híbridos,” Univ. del País Vasco, 2011.
- [11] M. A. Ward e T. K. Georgiou, “Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications,” pp. 1215–1242, 2011.
- [12] R. H. Pelton e P. Chibante, “Preparation of aqueous latices with N-isopropylacrylamide,” *Colloids and Surfaces*, vol. 20, no. 3, pp. 247–256, 1986.
- [13] K. P. Yong Qiu, “Environment-sensitive hydrogels for drug delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53, vol. 52, no. 2, pp. 321–339, 2001.
- [14] R. Pelton, “Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) is never hydrophobic,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 348, no. 2, pp. 673–674, 2010.
- [15] I. Dimitrov, B. Trzebicka, A. H. E. Müller, A. Dworak, e C. B. Tsvetanov, “Thermosensitive water-soluble copolymers with doubly responsive reversibly interacting entities,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 11, pp. 1275–1343, 2007.
- [16] P. I. P. Soares, F. Lochte, C. Echeverria, L. C. J. Pereira, J. T. Coutinho, I. M. M. Ferreira, C. M. M. Novo, e J. P. M. R. Borges, “Thermal and magnetic properties of iron oxide colloids: Influence of surfactants,” *Nanotechnology*, vol. 26, no. 42, p. 425704, 2015.
- [17] F. Assa, H. Jafarizadeh-Malmir, H. Hossein, H. Vaghari, N. Anarjan, O. Ahmadi, e A. Berenjian, “Chitosan magnetic nanoparticles for drug delivery systems,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 37, no. 4, pp. 492–509, 2017.
- [18] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, e T. Sen, “Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 1–2, pp. 24–46, 2011.
- [19] K. Hervé, L. Douziech-Eyrolles, E. Munnier, S. Cohen-Jonathan, M. Soucé, H. Marchais, P.

- Limelette, F. Warmont, M. L. Saboungi, P. Dubois, e I. Chourpa, "The development of stable aqueous suspensions of PEGylated SPIONs for biomedical applications," *Nanotechnology*, vol. 19, no. 46, 2008.
- [20] W. Wu, Q. He, e C. Jiang, "Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 3, no. 11, pp. 397–415, 2008.
- [21] G. M. Da Costa, E. De Grave, P. M. A. De Bakker, e R. E. Vandenberghe, "Synthesis and characterization of some iron oxides by sol-gel method," *Journal of Solid State Chemistry*, vol. 113, no. 2, pp. 405–412, 1994.
- [22] T. C. Lin, F. H. Lin, e J. C. Lin, "In vitro feasibility study of the use of a magnetic electrospun chitosan nanofiber composite for hyperthermia treatment of tumor cells," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 7, pp. 2704–2711, 2012.
- [23] S. I. C. J. Palma, M. Marciello, A. Carvalho, S. Veintemillas-Verdaguer, M. del P. Morales, e A. C. A. Roque, "Effects of phase transfer ligands on monodisperse iron oxide magnetic nanoparticles," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 437, pp. 147–155, 2015.
- [24] D. Li e Y. Xia, "Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?," *Adv. Mater.*, vol. 16, no. 14, pp. 1151–1170, 2004.
- [25] D. Crespy, K. Friedemann, e A. M. Popa, "Colloid-electrospinning: Fabrication of multicompartiment nanofibers by the electrospinning of organic or/and inorganic dispersions and emulsions," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 33, no. 23, pp. 1978–1995, 2012.
- [26] C. Echeverria, P. Soares, A. Robalo, L. Pereira, C. M. M. Novo, I. Ferreira, e J. P. Borges, "One-pot synthesis of dual-stimuli responsive hybrid PNIPAAm-chitosan microgels," *Materials and Design*, vol. 86, pp. 745–751, 2015.
- [27] P. Li, A. M. Zhu, Q. L. Liu, e Q. G. Zhang, "Fe₃O₄ / poly (N -Isopropylacrylamide)/ Chitosan Composite Microspheres with Multiresponsive Properties," pp. 7700–7706, 2008.
- [28] S. C. S. Marques, P. I. P. Soares, C. Echeverria, M. H. Godinho, e J. P. Borges, "Confinement of thermoresponsive microgels into fibres: Via colloidal electrospinning: Experimental and statistical analysis," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 80, pp. 76370–76380, 2016.
- [29] J. M. M. Faria, "Production and optimization of hybrid fibrillary gels by colloidal electrospinning," 2016.
- [30] J. E. Díaz, A. Barrero, M. Márquez, A. Fernández-Nieves, e I. G. Loscertales, "Absorption properties of microgel-PVP composite nanofibers made by electrospinning," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 31, no. 2, pp. 183–189, 2010.
- [31] P. I. P. Soares, A. M. R. Alves, L. C. J. Pereira, J. T. Coutinho, I. M. M. Ferreira, C. M. M. Novo, e J. P. M. R. Borges, "Effects of surfactants on the magnetic properties of iron oxide colloids," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 419, pp. 46–51, 2014.
- [32] B. Vincent, "Swelling behavior of poly- N -isopropylacrylamide microgel particles in alcoholic solutions," vol. 51, pp. 46–51, 1998.
- [33] W. Zhang, S. Jiu, Q. Wu, S. Wu, J. Ran, Y. Liu, e J. Hou "Studies of the magnetic field intensity on the synthesis of chitosan-coated magnetite nanocomposites by co-precipitation method," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 32, no. 2, pp. 381–384, 2012.
- [34] K. Yang, H. Peng, Y. Wen, e N. Li, "Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 256, no. 10, pp. 3093–3097, 2010.
- [35] L. Zhang, R. He, e H. C. Gu, "Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 253, no. 5, pp. 2611–2617, 2006.
- [36] M. R. Kasaai, "Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported

- viscometric constants data,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 68, no. 3, pp. 477–488, 2007.
- [37] A. F. R. Robalo, “Desenvolvimento de microgéis híbridos para a sua aplicação em tratamentos de hipertermia magnética,” 2014.
 - [38] M. K. Jaiswal, R. Banerjee, P. Pradhan, e D. Bahadur, “Thermal behavior of magnetically modalized poly(N-isopropylacrylamide)-chitosan based nanohydrogel,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 81, no. 1, pp. 185–194, 2010.
 - [39] J. Dybal, M. Trchová, e P. Schmidt, “The role of water in structural changes of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylmethacrylamide) studied by FTIR, Raman spectroscopy and quantum chemical calculations,” *Vib. Spectrosc.*, vol. 51, no. 1, pp. 44–51, 2009.
 - [40] M. M. Abdelhady, “Preparation and Characterization of Chitosan/Zinc Oxide Nanoparticles for Imparting Antimicrobial and UV Protection to Cotton Fabric,” *Int. J. Carbohydr. Chem.*, vol. 2012, pp. 1–6, 2012.
 - [41] C. G. T. Neto, J. A. Giacometti, A. E. Job, F. C. Ferreira, J. L. C. Fonseca, e M. R. Pereira, “Thermal analysis of chitosan based networks,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 62, no. 2, pp. 97–103, 2005.
 - [42] S. Shekhar, M. Mukherjee, e A. K. Sen, “Studies on thermal and swelling properties of Poly (NIPAM-co-2-HEA) based hydrogels,” *Adv. Mater. Res.*, vol. 1, no. 4, pp. 269–284, 2012.
 - [43] P. Coimbra, P. Ferreira, H. C. de Sousa, P. Batista, M. A. Rodrigues, I. J. Correia, e M. H. Gil, “Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 48, no. 1, pp. 112–118, 2011.
 - [44] C. Dionigi, Y. Piñeiro, A. Riminucci, M. Bañobre, J. Rivas, e V. Dediu, “Regulating the thermal response of PNIPAM hydrogels by controlling the adsorption of magnetite nanoparticles,” *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, vol. 114, no. 2, pp. 585–590, 2014.
 - [45] M. Wang, Y. Fang, e D. Hu, “Preparation and properties of chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) full-IPN hydrogels,” *Science (80-.)*, vol. 48, pp. 215–221, 2001.
 - [46] M. Lemanowicz, A. Gierczycki, W. Kuźnik, R. Sancewicz, e P. Imiela, “Determination of Lower Critical Solution Temperature of thermosensitive flocculants,” *Miner. Eng.*, vol. 69, pp. 170–176, 2014.
 - [47] C. Echeverria e C. Mijangos, “UCST-like hybrid PAAm-AA/Fe₃O₄ microgels. effect of Fe₃O₄ nanoparticles on morphology, thermosensitivity and elasticity,” *Langmuir*, vol. 27, no. 13, pp. 8027–8035, 2011.
 - [48] S. De Vrieze, T. Van Camp, A. Nelvig, B. Hagström, P. Westbroek, e K. De Clerck, “The effect of temperature and humidity on electrospinning,” *J. Mater. Sci.*, vol. 44, no. 5, pp. 1357–1362, 2009.
 - [49] M. Chen, H. Qu, J. Zhu, Z. Luo, A. Khasanov, A. S. Kucknoor, N. Haldolaarachchige, D. P-Young, S. Wei, e Z. Guo, “Magnetic electrospun fluorescent polyvinylpyrrolidone nanocomposite fibers,” *Polymer (Guildf)*, vol. 53, no. 20, pp. 4501–4511, 2012.
 - [50] T. E. Newsome e S. V. Olesik, “Electrospinning silica/polyvinylpyrrolidone composite nanofibers,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 131, no. 21, pp. 1–9, 2014.
 - [51] T. Gutul, E. Rusu, N. Condur, V. Ursaki, E. Goncareenco, e P. Vlazan, “Preparation of poly(N-vinylpyrrolidone)-stabilized zno colloid nanoparticles,” *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 1, pp. 402–406, 2014.
 - [52] D. Lubasova, H. Niu, X. Zhao, e T. Lin, “Hydrogel properties of electrospun polyvinylpyrrolidone and polyvinylpyrrolidone/poly(acrylic acid) blend nanofibers,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 67, pp. 54481–54487, 2015.

- [53] M. J. A. Oliveira, V. S. Amato, A. B. Lugão, e D. F. Parra, “Drug delivery glucantime in PVP / chitosan membranes,” 2015.
- [54] M. Koosha and H. Mirzadeh, “Electrospinning, mechanical properties, and cell behavior study of chitosan/PVA nanofibers,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 103, no. 9, pp. 3081–3093, 2015.
- [55] R. J. R. Matos, “Desenvolvimento de membranas magnéticas para tratamento de cancro,” Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2017.
- [56] P. I. P. Soares, C. A. T. Laia, A. Carvalho, L. C. J. Pereira, J. T. Coutinho, I. M. M. Ferreira, C. M. M. Novo, e J. P. Borges, “Iron oxide nanoparticles stabilized with a bilayer of oleic acid for magnetic hyperthermia and MRI applications,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 383, pp. 240–247, 2016.

6. Anexos

6.1 Condições da Síntese dos Microgéis de PNIPAAm

Tabela 6.1 - Reagentes e respectivas quantidades utilizadas para a síntese dos microgéis de PNIPAAm

Reação	NI- PAAm (g)	CS		NPs		MBA		APS		SBS	
		%	g	%	ml	%	g	%	g	%	g
PNIPAAm	1	-	-		-	5	0.05	10	0.1	0.5	0.005
PNIPAAm-CS											
PNIPAAm-CS40-NP5		40	0.4	5	2.2						
PNIPAAm-CS40-NP5-OA					2.6						
PNIPAAm-CS40-NP5-DMSA					4.2						

Para a síntese dos microgéis, o NIPAAm, MBA, APS e SBS foram dissolvidos em 20 ml de água *millipore*, cada um. No final da adição de todos os reagentes acrescentou-se mais 20 ml de água de maneira a perfazer 100 ml de solução.

6.2 Procedimento dos Ensaios de Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados através do método do extrato que consiste em colocar as células em contacto com meio que esteve previamente em contacto com as membranas produzidas. Para a produção do extrato preparam-se as amostras de cada tipo de membrana, cada uma com aproximadamente 80 mg. Estas membranas foram esterilizadas na estufa a 120 °C durante 2 h. De seguida, colocou-se cada membrana em cerca de 2 ml de meio, a uma temperatura de 37° C durante 2 h. As células foram semeadas em placas de 96 poços sendo que foram feitas 5 réplicas para a concentração inicial de meio de extrato e mais 5 réplicas para cada uma das 3 diluições de fator 2 obtidas a partir da concentração inicial, pada cada tipo de membrana. Também foram feitos controlos positivos, negativos e de meio celular, de maneira a servir como referência para o cálculo da viabilidade celular. Em cada poço foram semeadas aproximadamente 6 000 (20 000 cm²) em 100 µL de meio de cultura.

As células metabolicamente vivas reduzem a resazurina (cor azul), a resorufina, que apresenta uma cor rosa e fluorescente. A alteração da cor do meio pode ser determinada por medição da variação da absorvância. Esta absorvância é proporcional ao número de células viáveis presentes no poço.

As medidas foram realizadas com o leitor de planas *Biotek ELX 800 UV*.

6.3 Cálculo do Peso Molecular do Quitosano

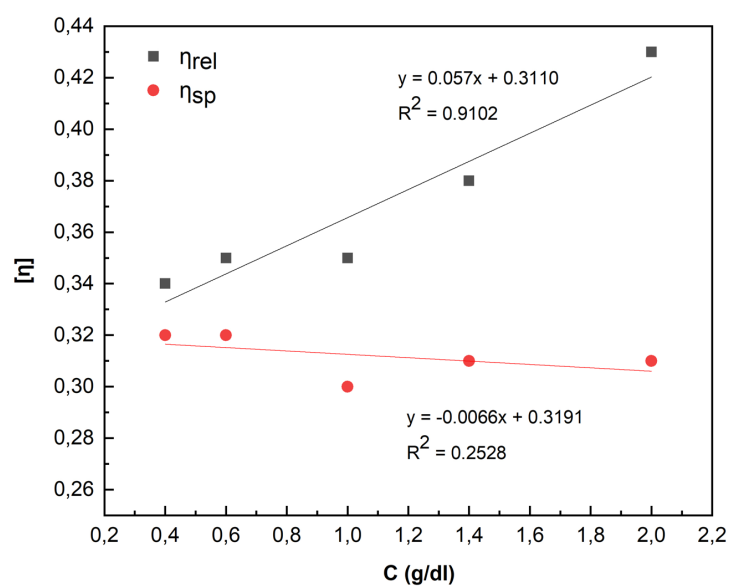


Figura 6.1 - Curvas de η_{sp}/C e de $C^{-1} \ln \eta_{rel}$, auxiliares ao cálculo da viscosidade intrínseca

6.4 Estudo dos Parâmetros de Eletrofiiação

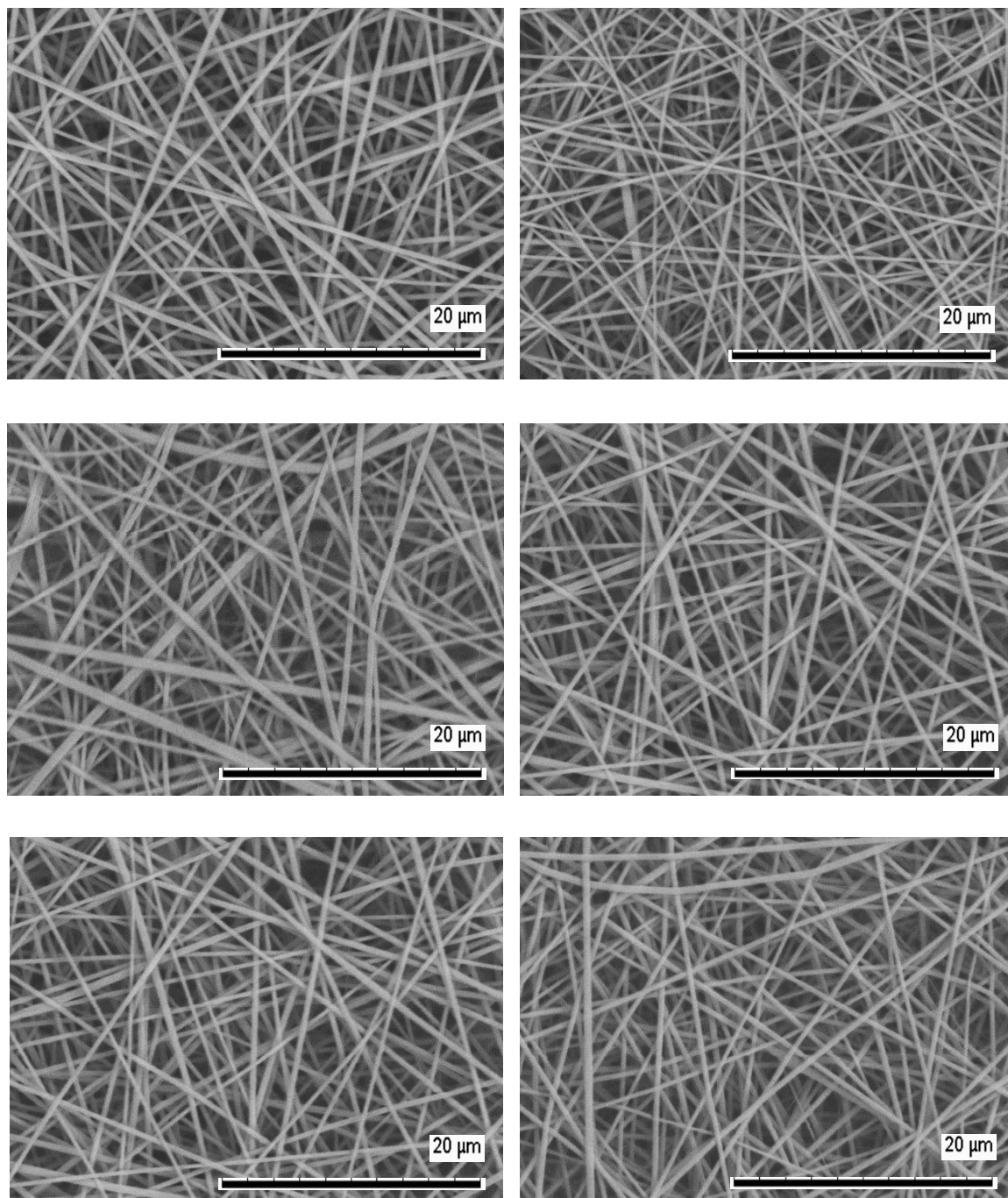


Figura 6.2 - Imagem SEM das amostras A1, A2, A3, A4, A5 e A6 das membranas de PVP

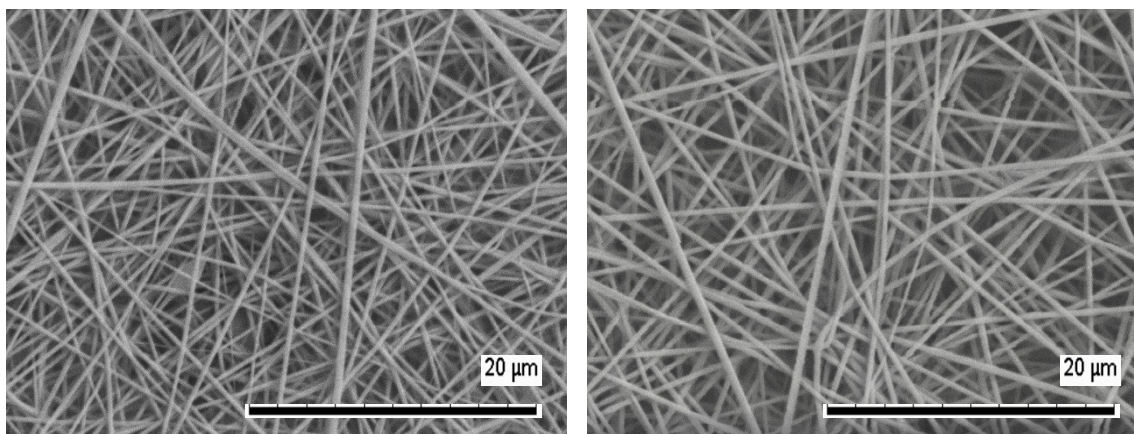


Figura 6.3 - Imagem SEM das amostras A7 e A8 das membranas de PVP

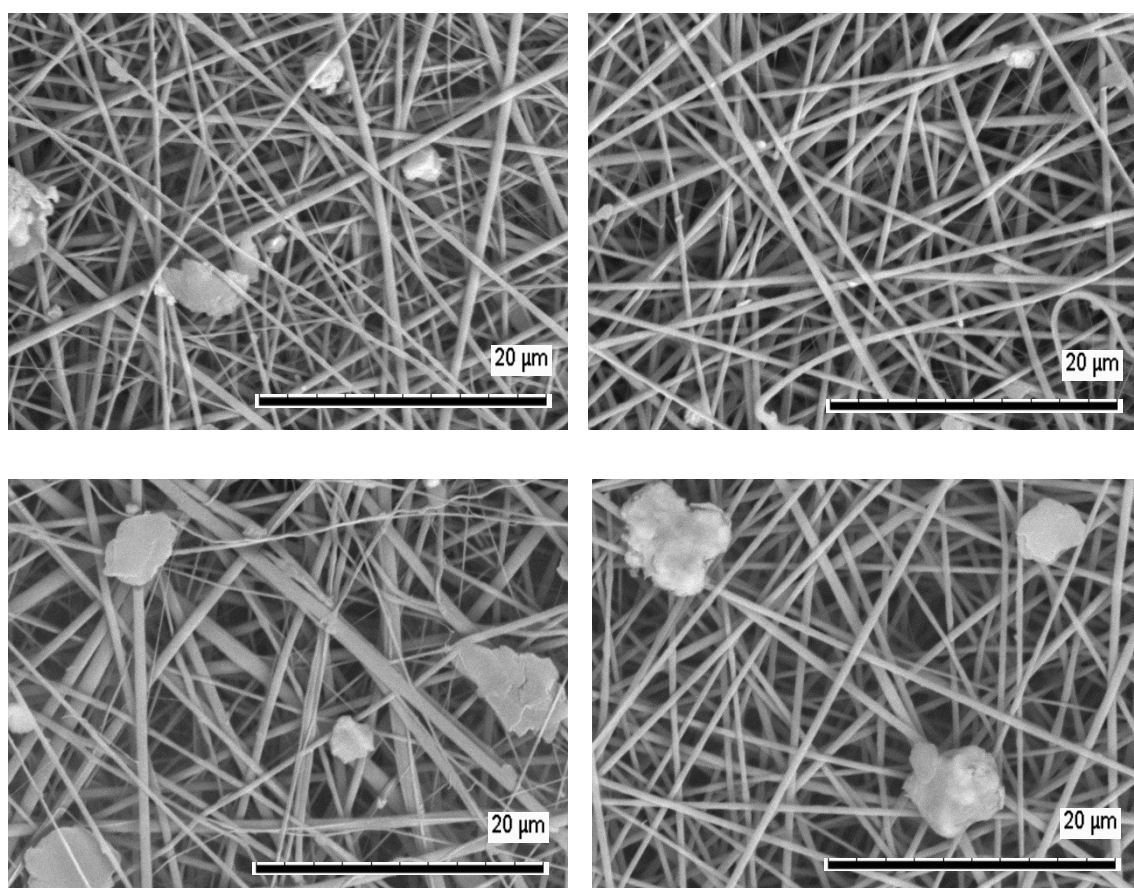


Figura 6.4 - Imagem SEM das amostras A1, A2, A3 e A4 das fibras de PVP/PNIPAAm

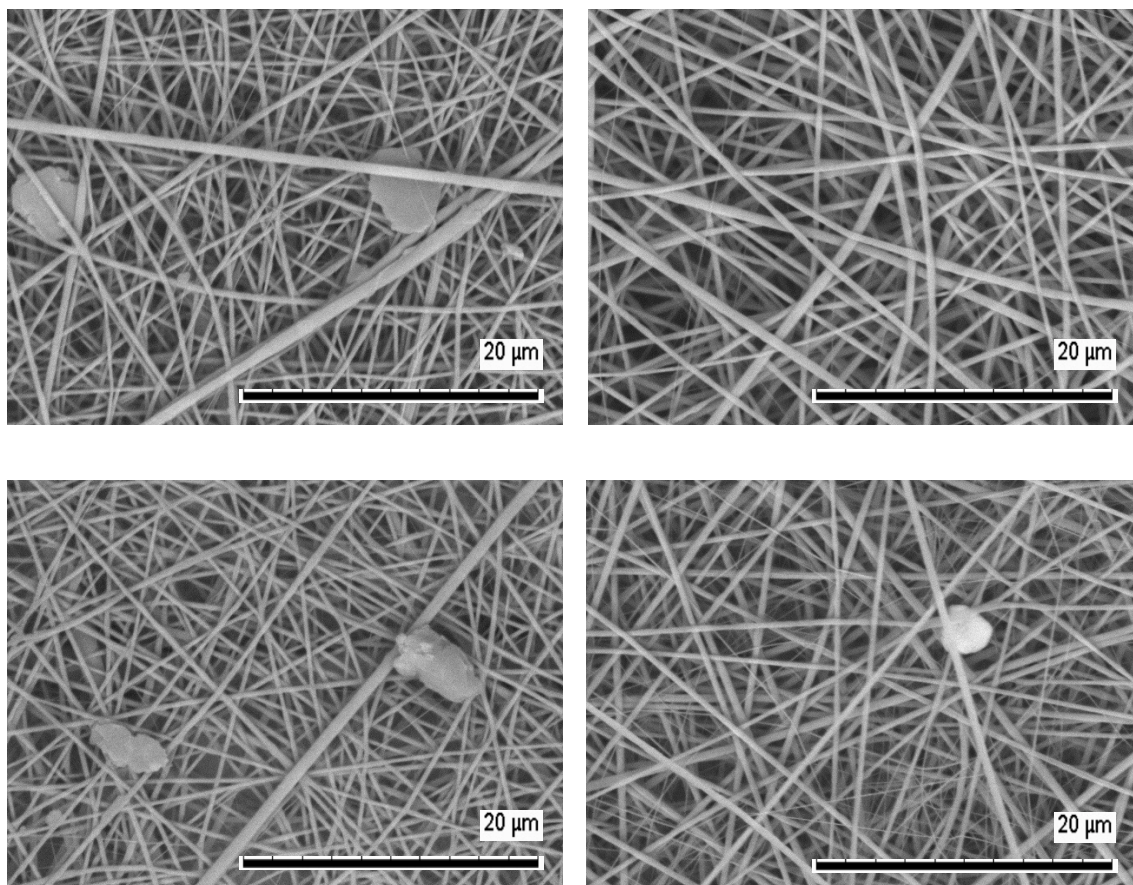


Figura 6.5 - Imagem SEM das amostras A4, A6, A7 e A8 das fibras de PVP/PNIPAAm