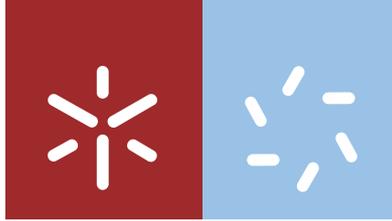


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

André Gustavo Silva de Macedo

**Desenvolvimento de esferas  
submicrométricas de base polimérica  
para aplicações biomédicas**

Janeiro de 2019



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

André Gustavo Silva de Macedo

**Desenvolvimento de esferas  
submicrométricas de base polimérica  
para aplicações biomédicas**

Tese de Mestrado  
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob orientação da  
**Professora Doutora Maria Gabriela Botelho**  
e da  
**Doutora Vanessa Fernandes Cardoso**

Janeiro de 2019



## DECLARAÇÃO

**Nome:** André Gustavo Silva de Macedo

**Endereço eletrónico:** andregsilvamacedo@gmail.com **Telefone:** +351912613440

**Cartão de Cidadão:** 12963942

**Título da dissertação:** Desenvolvimento de esferas submicrométricas de base polimérica para aplicações biomédicas

**Orientadores:**

Professora Doutora Maria Gabriela Botelho

Doutora Vanessa Fernandes Cardoso

**Ano de conclusão:** 2019

**Mestrado:** Biofísica e Bionanossistemas

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura



## **Agradecimentos**

Este trabalho sinaliza o final de uma etapa que só foi possível com o apoio de várias pessoas que direta ou indiretamente me acompanharam neste trajeto.

Em primeiro lugar, agradeço aos meus orientadores, a Professora Doutora Gabriela Botelho e a Doutora Vanessa Cardoso, pela total disponibilidade e dedicação que demonstraram, assim como pelo conhecimento que me transmitiram, que foram vitais para a realização do trabalho. Uma menção especial também ao Professor Doutor Senentxu Lanceros-Méndez, que se mostrou também totalmente disponível e forneceu ideias e indicações igualmente valiosas.

A todos os elementos do grupo *Electroactive Smart Materials* (ESM), ao qual o Professor Doutor Senentxu me abriu as portas, e em particular ao Eduardo, Pedro, Ricardo, Daniela, Margarida, Clarisse e Carlos agradeço a ajuda nos diferentes aspetos que foram integrados neste trabalho.

Agradeço ainda ao Departamento de Química e ao Departamento de Engenharia Biológica pela disponibilização dos laboratórios e equipamentos, assim como ao Jorge e à Paula.

Ao *BCMaterials* e a todos os que me ajudaram durante o estágio Erasmus+ em Bilbao, em particular à Clara e ao Ander.

A todos os meus amigos e os diferentes tipos de sorrisos que cada um proporciona, em particular ao Gil, Bruno, Luís, Susana e aos Pedros.

À Joana, por todos os dias.

Aos meus pais e aos meus tios, pela persistência e apoio incansável.



## Resumo

O desenvolvimento de estruturas micro e submicrométricas na forma de esferas é uma área de crescente interesse. Através do uso de materiais de origem natural ou sintética, seja em aplicações ligadas à indústria ou aplicações biomédicas como o transporte e liberação localizada e controlada de fármacos ou a regeneração de tecidos que apresentem novas terapêuticas, o número de estudos centrados neste tipo de estruturas continua a crescer.

O foco deste trabalho é o desenvolvimento de esferas submicrométricas a partir de poli(fluoreto de vinilideno-*c*o-trifluoretileno) (P(VDF-TrFE)), um polímero sintético e inteligente com propriedades eletroativas, com o intuito de utilizá-las em aplicações na área da biomedicina. Para este efeito foram usados dois métodos de nanoprecipitação distintos. A nanoprecipitação consiste na transferência do material que irá formar as esferas de um solvente (onde se encontra dissolvido) para um solvente fraco, o não solvente (NS), induzindo a formação destas estruturas. O primeiro método usado, aqui denominado de nanoprecipitação simples, foi realizado num tubo de Falcon onde os solventes foram colocados em camadas; no segundo método, por agitação magnética, o polímero dissolvido foi transferido gota a gota para o NS sob agitação. No decorrer do trabalho foi avaliado o efeito de um conjunto de variáveis na síntese das esferas: concentração de polímero, solvente, constituição do NS, surfactante e respetiva concentração. Foi ainda realizada uma prova de conceito do revestimento de nanopartículas magnéticas (NPMs) de óxido de ferro com P(VDF-TrFE) para a formação de esferas compósitas multifuncionais através de nanoprecipitação com agitação mecânica.

As amostras obtidas foram submetidas a caracterização morfológica e físico-química. Os resultados mostraram sucesso na formação de esferas submicrométricas de P(VDF-TrFE) com boa esfericidade para ambos os métodos de nanoprecipitação, controlando adequadamente os parâmetros de síntese. Diâmetros médios com valores compreendidos entre  $413 \pm 194$  nm e  $239 \pm 73$  nm foram obtidos pelo método de nanoprecipitação simples e pelo método de nanoprecipitação por agitação magnética, respetivamente. Relativamente ao revestimento de NPMs de óxido de ferro com P(VDF-TrFE), esferas de diâmetros entre  $148 \pm 107$  nm foram obtidas. Verificou-se, igualmente, que a variação dos parâmetros estudados não afeta as propriedades térmicas e fase cristalina das esferas produzidas, que se mantêm na fase eletroativa  $\beta$ . Estes resultados são bastante promissores e auspiciam um alto potencial para aplicações biomédicas.



## Abstract

The development of structures at the micro and submicrometric scale in the form of spheres is an area of increasing interest. Based on different types of materials of natural or synthetic origin, for industry or biomedical oriented applications such as drug delivery or tissue regeneration, there is an increasing number of studies concerning the development of such structures.

This dissertation focuses on the development of poly(vinylidene fluoride-co-trifluoroethylene) (P(VDF-TrFE)) submicrometric spheres for biomedical purposes. P(VDF-TrFE) is a synthetic and smart polymer with electroactive properties. Two distinct nanoprecipitation methods were used for the development of the spheres. Nanoprecipitation consists on the transference of the component that will develop into spheres from a solvent (as solute) into a weaker solvent, the non-solvent (NS), inducing sphere formation. The first method used is called simple nanoprecipitation and was carried on a Falcon tube where both solvents were placed into layers; in the second method, magnetic stirring was used to stir the NS while the polymer was pipetted dropwise into the solution. Throughout the study, the effect of several parameters on the formation of the spheres were evaluated: polymer concentration, solvents, NS constitution, surfactants and their concentration. Furthermore, proof of concept for coating ferrous oxide magnetic nanoparticles (MNPs) with P(VDF-TrFE) was developed employing mechanical stirring.

All samples produced were submitted to morphological and physicochemical characterization. Spherical submicrometric P(VDF-TrFE) structures were obtained using both nanoprecipitation methods, by adequately controlling synthesis conditions. These spheres feature average diameters of  $413 \pm 194$  nm and  $239 \pm 73$  nm, using simple and magnetic stirring nanoprecipitation respectively. Regarding the coating of ferrous oxide MNPs with P(VDF-TrFE), spheres with an average diameter ranging from  $148 \pm 107$  nm were synthesized. Thermal properties and crystalline phase were not affected by any of the parameters evaluated, as all samples remained in the electroactive  $\beta$  phase. Overall, these results are very promising and show potential for biomedical applications.



## Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>v</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>vii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ix</b>
<b>Índice</b> .....	<b>xi</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>xv</b>
<b>Índice de tabelas</b> .....	<b>xxi</b>
<b>Lista de abreviaturas, símbolos e siglas</b> .....	<b>xxiii</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>3</b>
1.1 Enquadramento .....	3
1.2 Objetivos e metodologia .....	6
1.3 Estrutura da dissertação .....	6
<b>2 Enquadramento teórico</b> .....	<b>11</b>
2.1 Esferas poliméricas .....	12
2.1.1 Introdução .....	12
2.1.2 Síntese de esferas poliméricas .....	13
2.1.3 Aplicações .....	17
2.2 Poli(fluoreto de vinilideno) .....	20
2.2.1 Introdução .....	21
2.2.2 Fases cristalinas .....	22
2.2.3 Propriedades eletroativas .....	23
2.2.4 Copolimerização .....	25
2.2.5 Esferas baseadas em poli(fluoreto de vinilideno) e copolímeros .....	26
2.3 Nanopartículas magnéticas .....	26
2.3.1 Introdução .....	27

2.3.2	Síntese de nanopartículas magnéticas.....	27
2.3.3	Funcionalização de nanopartículas magnéticas .....	28
2.3.4	Aplicações .....	31
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos .....</b>	<b>39</b>
3.1	Reagentes e solventes .....	39
3.2	Síntese de esferas de poli(fluoreto de vinilideno- <i>co</i> -trifluoretileno) .....	40
3.2.1	Método de nanoprecipitação simples .....	40
3.2.2	Método de nanoprecipitação por agitação magnética.....	42
3.3	Síntese de nanopartículas magnéticas e revestimento com poli(fluoreto de vinilideno- <i>co</i> -trifluoretileno).....	43
3.3.1	Síntese de nanopartículas de óxido de ferro.....	43
3.3.2	Revestimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com poli(fluoreto de vinilideno- <i>co</i> -trifluoretileno) .....	44
3.4	Resumo das amostras processadas.....	45
3.5	Técnicas de caracterização.....	46
3.5.1	Microscopia eletrónica de varrimento .....	47
3.5.2	Microscopia eletrónica de transmissão .....	48
3.5.3	Dispersão dinâmica de luz .....	48
3.5.4	Potencial Zeta.....	50
3.5.5	Espetroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier .....	51
3.5.6	Calorimetria diferencial de varrimento .....	52
3.5.7	Magnetometria de amostra vibrante .....	53
<b>4</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>57</b>
4.1	Síntese de esferas de P(VDF-TrFE) pelo método de nanoprecipitação simples.....	57
4.1.1	Variação da concentração de copolímero .....	57
4.1.2	Variação do solvente.....	61
4.1.3	Variação da constituição de não solvente .....	66

4.1.4	Variação do surfactante .....	69
4.1.5	Variação da concentração de surfactante .....	72
4.2	Síntese de esferas de P(VDF-TrFE) pelo método de nanoprecipitação por agitação magnética.....	77
4.3	Síntese de nanopartículas magnéticas e revestimento com poli(fluoreto de vinilideno- <i>co</i> -trifluoretileno).....	78
4.3.1	Síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro .....	78
4.3.2	Revestimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com poli(fluoreto de vinilideno- <i>co</i> -trifluoretileno) .....	79
<b>5</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>87</b>
5.1	Perspetivas futuras.....	89
	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>91</b>



## Índice de figuras

<b>Figura 2.1.</b> Representação esquemática do método de nanoprecipitação por agitação magnética. Adaptado de [50].	15
<b>Figura 2.2.</b> Representação esquemática do método de nanoprecipitação simples. Adaptado de [54].	15
<b>Figura 2.3.</b> Representação esquemática da organização dos componentes de uma esfera desenvolvida para o tratamento de doenças coronárias a lecitina e o péptido distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) conjugado com PEG permitem a funcionalização da esfera, enquanto que o fármaco paclitaxel se encontra embebido na matriz polimérica de PLGA. Adaptado de [63].	19
<b>Figura 2.4.</b> Representação esquemática da unidade repetitiva do PVDF.	21
<b>Figura 2.5.</b> Representação esquemática da conformação de cadeia para as fases $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ do PVDF. Adaptado de [72].	22
<b>Figura 2.6.</b> Modelo molecular representativo do efeito piezoelétrico: <b>a)</b> uma molécula sem polarização piezoelétrica <b>b)</b> a molécula é sujeita a uma força mecânica ( $F_k$ ) externa resultando na polarização indicada ( $P_k$ ) <b>c)</b> o efeito de polarização à superfície do material piezoelétrico quando sujeito a uma força externa. Adaptado de [78].	23
<b>Figura 2.7.</b> Representação esquemática das unidades repetitivas do copolímero P(VDF-TrFE).	25
<b>Figura 2.8.</b> Representação esquemática da estabilização de NPMs por revestimento com materiais <b>(a)</b> inorgânicos, <b>(b)</b> orgânicos, <b>(c)</b> encapsulação em nanoesferas ou <b>(d)</b> nanocápsulas. Adaptado de [26].	29
<b>Figura 2.9.</b> Representação esquemática de uma abordagem de técnica de hipertermia usando NPMs. <b>a)</b> As NPMs funcionalizadas com um ligando com afinidade às células tumorais (a verde e vermelho) atravessam os vasos sanguíneos na zona tumoral e ligam-se a estas células. <b>b)</b> Um campo magnético é então aplicado o que provoca a vibração das NPMs e consequente aquecimento localizado da zona tumoral, induzindo a morte celular. Adaptado de [110].	32
<b>Figura 2.10.</b> NPMs de óxido de ferro conjugadas com ácido ricinoleico e inseridas numa matriz polimérica de PLGA, formando uma esfera. Adaptado de [105].	35

<b>Figura 3.1.</b> Imagens ilustrativas do <b>a)</b> procedimento experimental da síntese de esferas de P(VDF-TrFE) através do método de nanoprecipitação simples e da <b>b)</b> formação de esferas de P(VDF-TrFE) verificado pela diferença de opacidade entre o solvente e NS no decorrer da nanoprecipitação. ....	41
<b>Figura 3.2.</b> Imagem ilustrativa do procedimento experimental da síntese de esferas de P(VDF-TrFE) através do método de nanoprecipitação por agitação magnética.....	43
<b>Figura 3.3.</b> Imagem ilustrativa do procedimento experimental do revestimento de NPMs de óxido de ferro com P(VDF-TrFE) através do método de nanoprecipitação por agitação mecânica. ....	44
<b>Figura 3.4.</b> Representação esquemática da dupla camada elétrica (EDL) de uma nanopartícula fosfolipídica de carga negativa em meio aquoso, composta pela camada de Stern, de carga oposta à partícula (por isso aqui positiva), e pelo <i>slipping plane</i> com iões e moléculas positiva e negativamente carregados, de onde é medido o potencial $\zeta$ . Adaptado de [130]......	50
<b>Figura 4.1.</b> Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração de copolímero: <b>a)</b> 2,5, <b>b)</b> 5 e <b>c)</b> 10 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	58
<b>Figura 4.2.</b> Diâmetros de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração de copolímero: 2,5, 5 e 10 mg.mL <sup>-1</sup> . Dados obtidos através das imagens SEM e pela técnica de DLS. ....	58
<b>Figura 4.3. a)</b> Curvas de DSC e <b>b)</b> espetros de FTIR-ATR das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração de copolímero: 5 e 10 mg.mL <sup>-1</sup> . ....	60
<b>Figura 4.4.</b> Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando o solvente: <b>a)</b> acetona, <b>b)</b> DMF, <b>c)</b> THF e <b>d)</b> dioxalano. ....	62
<b>Figura 4.5.</b> Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero e uma solução não solvente constituída por 100 % de metanol, variando o solvente: <b>a)</b> acetona, <b>b)</b> DMF, <b>c)</b> THF e <b>d)</b> dioxalano. ....	63

<b>Figura 4.6.</b> Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero e uma solução não solvente constituída por 100 % de água, variando o solvente: <b>a)</b> acetona, <b>b)</b> DMF, <b>c)</b> THF e <b>d)</b> dioxalano. ....	64
<b>Figura 4.7.</b> Diâmetros de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de concentração de copolímero e uma solução não solvente constituída por 100 % de água, variando o solvente: acetona e DMF. Dados obtidos através das imagens SEM e pela técnica de DLS. ....	64
<b>Figura 4.8. a)</b> Curvas de DSC e <b>b)</b> espectros de FTIR-ATR das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero e uma solução não solvente constituída por 100 % de água, variando o solvente: acetona e DMF. ....	65
<b>Figura 4.9.</b> Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero e acetona como solvente, variando a constituição da solução não solvente: <b>a)</b> 0, <b>b)</b> 25, <b>c)</b> 50, <b>d)</b> 75, <b>e)</b> 90 e <b>f)</b> 100 % de metanol em água. ....	66
<b>Figura 4.10.</b> Diâmetros das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero e acetona como solvente, variando a constituição da solução não solvente: 0, 25, 50, 75, 90 e 100 % de metanol em água. Dados obtidos através das imagens SEM e pela técnica de DLS. ....	66
<b>Figura 4.11. a)</b> Curvas de DSC e <b>b)</b> espectros FTIR-ATR das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero e acetona como solvente, variando a constituição da solução não solvente: 0, 50, 90 e 100 % (este último apenas no espectro FTIR-ATR) de metanol em água. ....	68
<b>Figura 4.12.</b> Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando o surfactante: <b>a)</b> sem surfactante; a uma concentração de 0,25 % m/v dos surfactantes <b>b)</b> Pluronic F-127, <b>c)</b> CTAB e <b>d)</b> SDS. ....	70
<b>Figura 4.13.</b> Diâmetros das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando o surfactante: sem surfactante; a uma concentração de 0,25 % m/v dos surfactantes Pluronic F-127, CTAB e SDS. ....	70

<b>Figura 4.14. a)</b> Curvas de DSC e <b>b)</b> espectros FTIR-ATR das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando o surfactante: sem surfactante; a uma concentração de 0,25 % m/v dos surfactantes Pluronic F-127, CTAB e SDS.....	72
<b>Figura 4.15.</b> Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração do surfactante Pluronic F-127: <b>a)</b> 0, <b>b)</b> 0,05, <b>c)</b> 0,15, <b>d)</b> 0,25, <b>e)</b> 0,50, <b>f)</b> 0,75 e <b>g)</b> 1 % m/v. ....	73
<b>Figura 4.16.</b> Diâmetros das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração do surfactante Pluronic F-127: 0, 0,05, 0,15, 0,25, 0,50, 0,75 e 1 % m/v.....	73
<b>Figura 4.17. a)</b> Curvas de DSC e <b>b)</b> espectros FTIR-ATR das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração do surfactante Pluronic F-127: 0, 0,25 e 1 % m/v.....	75
<b>Figura 4.18.</b> Potencial zeta ( $\zeta$ ) das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, sem surfactante e com uma concentração do surfactante Pluronic F-127 de 0,25 % m/v.....	76
<b>Figura 4.19.</b> Esferas de P(VDF-TrFE) sintetizadas pelo método de nanoprecipitação por agitação magnética, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água: <b>a)</b> imagem de SEM e <b>b)</b> respectivos diâmetros obtidos por análise SEM e DLS. ....	77
<b>Figura 4.20.</b> Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro sintetizadas pelo método de coprecipitação: <b>a)</b> imagem de TEM e <b>b)</b> curva de magnetização. ....	79
<b>Figura 4.21.</b> NPMs de óxido de ferro revestidas com P(VDF-TrFE) com uma concentração de copolímero de 5 mg.mL <sup>-1</sup> dissolvido no solvente (acetona) e as NPMs suspensas na solução não solvente (constituída por 90 % de metanol em água) numa concentração de 0,25 mg.mL <sup>-1</sup> : <b>a)</b> imagem de SEM e <b>b)</b> curva de magnetização.....	80

**Figura 4.22.** NPMs de óxido de ferro revestidas com P(VDF-TrFE) com uma concentração de copolímero de 5 mg.mL<sup>-1</sup> e NPMs numa concentração de 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>, respetivamente dissolvido e suspensas no solvente (acetona). Solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água: **a)** imagem de SEM e **b)** curva de magnetização..... 81

**Figura 4.23.** NPMs de óxido de ferro revestidas com P(VDF-TrFE) com uma concentração de copolímero de 10 mg.mL<sup>-1</sup> e NPMs numa concentração de 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>, respetivamente dissolvido e suspensas no solvente (acetona). Solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água: **a)** imagem de SEM e **b)** curva de magnetização..... 82

**Figura 4.24. a)** Curvas de DSC e **b)** espetros FTIR-ATR dos testes de revestimento de NPMs de óxido de ferro com P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação por agitação mecânica, com solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água. Amostra 1: 5 mg.mL<sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) dissolvido no solvente e 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> suspensas no não solvente; Amostra 2: 5 mg.mL<sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) e 0,6 mg.mL<sup>-1</sup> respetivamente dissolvido e suspensas no solvente; Amostra 3: 10 mg.mL<sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) e 0,6 mg.mL<sup>-1</sup> respetivamente dissolvido e suspensas no solvente. .... 83



## Índice de tabelas

<b>Tabela 2.1.</b> Tamanho das esferas e correspondentes aplicações e excreção do organismo humano. Adaptado de [39]. .....	18
<b>Tabela 3.1.</b> Reagentes usados no decorrer da atividade experimental, fórmulas estruturais correspondentes e número de registo Chemical Abstracts Service (CAS).....	40
<b>Tabela 3.2.</b> Solventes usados no decorrer da atividade experimental, fórmulas estruturais correspondentes e número de registo Chemical Abstracts Service (CAS).....	40
<b>Tabela 3.3.</b> Resumo das esferas de P(VDF-TrFE) sintetizadas pelo método de nanoprecipitação simples. ....	45
<b>Tabela 3.4.</b> Resumo das esferas de P(VDF-TrFE) sintetizadas pelo método de nanoprecipitação por agitação magnética.....	45
<b>Tabela 3.5.</b> Resumo das esferas de P(VDF-TrFE) com núcleo magnético de óxido de ferro sintetizadas pelo método de nanoprecipitação por agitação mecânica. ....	46
<b>Tabela 4.1.</b> Índices de polidispersão obtidos por DLS das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração de copolímero: 2,5, 5 e 10 mg.mL <sup>-1</sup> .....	59
<b>Tabela 4.2.</b> Índices de polidispersão obtidos por DLS das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero e acetona como solvente, variando a constituição da solução não solvente: 0, 25, 50, 75, 90 e 100 % de metanol em água.....	68
<b>Tabela 4.3.</b> Índices de polidispersão obtidos por DLS das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando o surfactante: sem surfactante; a uma concentração de 0,25 % m/v dos surfactantes Pluronic F-127, CTAB e SDS.....	71
<b>Tabela 4.4.</b> Índices de polidispersão obtidos por DLS das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL <sup>-1</sup> de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração do surfactante Pluronic F-127: 0, 0,05, 0,15, 0,25, 0,5, 0,75 e 1% m/v. ....	74



## Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

$\epsilon_r$  – Constante dielétrica

**ADME** – absorção, distribuição, metabolismo e excreção

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**BSA** – do inglês *Bovine Serum Albumine*, albumina bovina sérica

**CLRP** – do inglês *Controlled Living Radical Polymerization*, polimerização controlada de radicais

**C<sub>p</sub>** – Capacidade térmica

**CTAB** – do inglês *Cetyl Trimethylammonium Bromide*, brometo de cetiltrimetilânionio

**DLS** – do inglês *Dynamic Light Scattering*, dispersão de luz dinâmica

**DMF** – Dimetilformamida

**DSC** – do inglês *Differential Scanning Calorimetry*, calorimetria diferencial de varrimento

**DSPE** – Distearoilfosfatidiletanolamina

**EAP** – do inglês *Electroactive Polymer*, polímero eletroativo

**EDL** – do inglês *Electric Double Layer*, dupla camada elétrica

**EPR** – do inglês *Enhanced Permeability and Retention*, permeabilidade e retenção aumentada

**FTIR-ATR** – do inglês *Fourier Transformed Infrared – Attenuated Total Reflection spectroscopy*, espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier – refletância total atenuada

**NP** – Nanopartícula

**NPM** – Nanopartícula magnética

**NS** – Não solvente

**PAA** – Poli(ácido acrílico)

**PAM** – Poli(alilamina)

**PANI** – Polianilina

**PbAE** – Poli( $\beta$ -amino éster)

**PEI** – Polietilenoimina

**PCL** – Poli( $\epsilon$ -caprolactona)

**PCS** – do inglês *Photon Correlation Spectroscopy*, espectroscopia de correlação de fótons

**PDI** – do inglês *Polydispersity Index*, índice de polidispersão

**PEG** – Polietilenoglicol

**PEO** – do inglês *Poly(ethylene oxide)*, poli(óxido de etileno)

**PLA** – do inglês *Poly(lactic acid)*, poli(ácido láctico)

**PLGA** – do inglês *Poly(lactic-co-glycolic acid)*, poli(ácido láctico-*co*-glicólico)

**PLL** – Poli-*L*-lisina

**PLLA** – do inglês *Poly(L-lactic acid)*, poli(*L*-ácido láctico)

**PMMA** – Polimetil-metacrilato

**PNIPAm** – Poli(N-isopropilacrilamida)

**Potencial  $\zeta$**  – Potencial zeta

**PVA** – do inglês *Poly(vinyl alcohol)*, álcool polivinílico

**PVDF** – do inglês *Poly(vinylidene fluoride)*, poli(fluoreto de vinilideno)

**P(VDF-CTFE)** – do inglês *Poly(vinylidene fluoride-co-chlorotrifluoroethylene)*, poli(fluoreto de vinilideno-*co*-clorotrifluoretileno)

**P(VDF-HFP)** – do inglês *Poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene)*, poli(fluoreto de vinilideno-*co*-hexafluoropropileno)

**P(VDF-TrFE)** – do inglês *Poly(vinylidene fluoride-co-trifluorethylene)*, poli(fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno)

**QLS** – do inglês *Quasi-elastic Light Scattering*, dispersão de luz *quasi*-elástica

**SEM** – do inglês *Scanning Electron Microscopy*, microscopia eletrônica de varrimento

**SDS** – do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*, Dodecil sulfato de sódio

**SPION** – do inglês *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle*, nanopartícula superparamagnética de óxido de ferro

**T<sub>b</sub>** – Temperatura de bloqueio

**T<sub>c</sub>** – Temperatura de Curie

**T<sub>g</sub>** – do inglês *glass transition temperature*, temperatura de transição vítrea

**T<sub>m</sub>** – do inglês *melting temperature*, Temperatura de fusão

**TEM** – do inglês *Transmission Electron Microscopy*, microscopia eletrônica de transmissão

**THF** - Tetrahidrofurano

**UP** – Ultrapura

**VSM** – do inglês *Vibrating sample magnetometry*, magnetometria de amostra vibrante



# 1 | Introdução

---



# 1 Introdução

## 1.1 Enquadramento

A nanotecnologia é um dos pilares da tecnologia do século XXI. Teve como grande impulsionador Richard Feynman, prémio Nobel da Física em 1965 e que em 1959 propôs o conceito da manipulação de matéria ao nível atómico com a sua famosa palestra “*There’s Plenty of Room at the Bottom*” [1]. As nanopartículas (NPs) ocupam um lugar fulcral nesta área. A sua história recua há vários séculos atrás: a taça de Licurgo, uma taça romana datada do século IV que aparenta ser verde quando luz é incidida de fora para dentro e vermelha no sentido inverso, deve as suas propriedades óticas a partículas de ouro e prata contidas no vidro [2]. Já nas décadas de 1950 e 1960, as NPs começaram a ser estudadas como veículo de transporte e libertação de fármacos, assim como de vacinação [3], não sendo de todo surpreendente que este aspeto continue a ser estudado atualmente. Um dos maiores focos encontra-se no tratamento de doenças ubíquas e prevalentes, como é o caso do cancro, cuja ocorrência tem aumentado não só devido a hábitos alimentares e sedentarismo (entres outros fatores culturais e ambientais), mas também pela elevada taxa de crescimento populacional. Ainda que entre 1991 e 2015 tenha havido nos Estados Unidos da América uma redução de 26 % na taxa de mortalidade em indivíduos afetados por esta doença [4], 18,1 milhões de novos casos foram estimados para 2018 [5]. Muita da investigação que decorre hoje em dia nesta área diz respeito não só aos agentes terapêuticos em si, mas também ao seu modo de aplicação. Na quimioterapia convencional os agentes terapêuticos atuam a nível sistémico, não havendo qualquer discernimento entre células saudáveis e cancerígenas, provocando efeitos secundários como a queda do cabelo e náuseas [6]. Por estas razões é de grande utilidade o desenvolvimento de terapias controladas onde as concentrações de fármaco sejam menores, mas dirigidas com uma maior eficácia e precisão às células-alvo. As NPs poderão desempenhar um papel fulcral no desenvolvimento destas terapias alternativas. O seu tamanho reduzido (até aos 100 nm quando falamos estritamente da nanoescala) revela-se preponderante quando comparado com o de uma célula eucariótica (cujas dimensões estão geralmente entre os 10 e os 100  $\mu\text{m}$  [7]) se forem consideradas como transportadores de fármacos para o meio intracelular. A elevada área de superfície relativamente ao volume é vantajosa por poder aumentar a interação com o meio ou outros compostos desejados, e é uma propriedade de alto interesse no fabrico de novos materiais [8]. Igualmente, o tamanho e sua distribuição estão diretamente relacionados com outras propriedades que poderão ser relevantes,

dependendo da aplicação pretendida, como a densidade de empacotamento, compacidade da estrutura, viscosidade e definição da sua forma [9]. No entanto, o uso de NPs na área biomédica vai muito além da terapia do cancro, dado existir uma multitude de doenças que carecem de novas terapêuticas, podendo ser utilizadas em técnicas de imagiologia ou de terapia genética [10]. Contudo, a utilidade das NPs não se limita à área biomédica, sendo hoje em dia empregues em áreas distintas, como a incorporação de NPs de dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) como agente de enchimento que colmata os poros do betão, reforçando-o [11], ou adição de NPs de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) a vidro dando-lhe propriedades fotocatalíticas. Estas permitem a decomposição de biofilmes e de sujidade proveniente do pó [12], que é também eliminado pelo aumento da hidrofiliabilidade do vidro causado pela inclusão deste elemento [13].

Na busca de novas terapias no universo à micro e nanoescala, a síntese de NPs a partir de diferentes materiais permite que estas estruturas adquiram propriedades específicas, abrindo um elevado número de possibilidades. Um tipo de material que pode ser utilizado para este efeito são os polímeros, que podem ter origem natural, sendo geralmente biodegradáveis e biocompatíveis. Exemplos deste tipo de polímeros são o alginato e o quitosano (usados isoladamente ou até em combinação), a partir dos quais se conseguem produzir partículas de tamanho reduzido, com alto rendimento de síntese e capacidade de bioadesão [14], ou o dextrano, que tem uma boa solubilidade aquosa [15]. Os polímeros sintéticos, em contrapartida, têm boas propriedades mecânicas, assim como maior estabilidade térmica [16], e possuem normalmente um maior grau de pureza (em comparação com os naturais), o que pode levar a uma maior reprodutibilidade dos resultados [9]. Podem ser criadas NPs a partir de polímeros sintéticos como o poli(ácido láctico) (*poly(lactic acid)*, PLA) e o seu copolímero poli(ácido láctico-co-glicólico) (*poly(lactic-co-glycolic acid)*, PLGA), e ser também combinados na forma de misturas [17]. O PLGA é um dos polímeros utilizados com mais sucesso devido em parte à sua excelente biodegradabilidade. A hidrólise deste polímero resulta em ácido láctico e ácido glicólico, monómeros endógenos e metabolizáveis pelo organismo via ciclo de Krebs. A sua toxicidade sistémica é por isso extremamente reduzida [18]. Outras opções passam pelas misturas de polímeros como poli(ácido acrílico) (PAA) e poli(alilamina) (PAM), onde variando o rácio entre as suas quantidades na síntese de NPs se consegue afinar a carga de superfície. Este ajustamento de cargas permite fazer com que as NPs penetrem barreiras fisiológicas como a camada mucosa, que reveste várias cavidades corporais e a superfície dos órgãos internos [19].

O poli(fluoreto de vinilideno) (*poly(vinylidene fluoride)*, PVDF) e os seus copolímeros, entre os quais o poli(fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno) (*poly(vinylidene fluoride-co-trifluoroethylene)*, P(VDF-TrFE)), possuem propriedades eletroativas (em particular a sua piezoelectricidade) que os tornam igualmente atrativos para o uso na síntese de NPs. Um material piezoelétrico tem a capacidade de converter energia mecânica em energia elétrica (e vice-versa). Outros polímeros como o PLA possuem essa mesma propriedade, mas o seu coeficiente piezoelétrico é consideravelmente menor que o do PVDF e P(VDF-TrFE) [20]. O PVDF pode apresentar-se sob a forma de 5 fases cristalinas, sendo a fase  $\beta$  a que revela melhores propriedades eletroativas. É este aspeto que torna o uso do P(VDF-TrFE) extremamente atrativo, dado cristalizar diretamente na fase  $\beta$  independentemente da técnica de processamento (desde que o conteúdo em termos do monómero VDF se situe entre 50 e 80 %), e assim possuir um alto coeficiente piezoelétrico [20-22]. O uso destes polímeros piezoelétricos na forma de nano e micropartículas pode assim ser muito interessante para aplicações biomédicas como a engenharia de tecidos [23].

As nanopartículas magnéticas (NPMs) possuem também propriedades com grande potencial para aplicações biomédicas, especialmente o superparamagnetismo, que faz com que estas respondam a um campo magnético externo e dessa forma possam ser direcionadas para diferentes zonas do corpo humano. Após remoção do campo aplicado, não resta qualquer vestígio de magnetismo [24]. Isto permite que sejam usadas em técnicas como a hipertermia e a imagiologia [25]. O revestimento de NPMs com diferentes elementos pode ter vários objetivos, como impedir que sejam detetadas e removidas por parte do organismo recorrendo a polímeros como o polietilenoglicol (PEG) [26, 27] ou a estimulação do crescimento e diferenciação celulares utilizando PVDF [28].

Com estes aspetos em consideração, este trabalho teve em vista o desenvolvimento de esferas submicrométricas de P(VDF-TrFE), bem como a utilização deste polímero no revestimento de NPMs, de forma a conjugar as excelentes propriedades inerentes a estes materiais e estruturas para o seu uso em aplicações biomédicas.

## **1.2 Objetivos e metodologia**

O objetivo primordial deste trabalho passa pelo desenvolvimento de esferas submicrométricas de P(VDF-TrFE) recorrendo ao método denominado de nanoprecipitação.

De forma genérica, este método envolve o uso de um solvente, onde o polímero é inicialmente dissolvido, e um não solvente (NS), no qual o polímero é menos solúvel e para onde é transferido. Dependendo da forma como ocorre esta transferência, vários métodos adjacentes podem ser empregues. Na primeira, denominada de nanoprecipitação simples, o solvente e NS são colocados num tubo em camadas, com o solvente contendo o polímero na camada superior, e a transferência do polímero para o NS dá-se no sentido descendente. No segundo método recorreu-se à agitação magnética de forma a manter o NS em agitação constante, e a este é adicionado o polímero dissolvido gota a gota. Desta transferência resultam as esferas poliméricas, que são afetadas pelas condições sobre as quais é realizada a síntese.

Foi estudada a influência de vários parâmetros de síntese nas propriedades físico-químicas das esferas obtidas: a concentração do copolímero, o tipo de solvente, a constituição do NS e o efeito da presença e concentração de diferentes surfactantes. O revestimento de NPMs de óxido de ferro com P(VDF-TrFE) foi também investigado de forma a aumentar o possível leque de aplicações pelo desenvolvimento de compósitos multifuncionais. As esferas desenvolvidas foram caracterizadas extensivamente em relação ao seu tamanho, morfologia e propriedades físico-químicas.

## **1.3 Estrutura da dissertação**

No presente capítulo é realizado um enquadramento teórico e exposição da motivação do trabalho, seguido dos objetivos e metodologia usados, e, por fim, apresentada a estrutura do documento.

O capítulo 2 trata do enquadramento teórico do trabalho executado, encontrando-se dividido em subcapítulos que abordam, respetivamente, as propriedades e trabalhos desenvolvidos até à data em áreas relevantes para o mesmo: NPs poliméricas, o polímero PVDF e seu copolímero P(VDF-TrFE) e NPMs. Para além dessas propriedades e trabalhos desenvolvidos, são ainda explorados os seus métodos de síntese e aplicações práticas com ênfase na área biomédica.

No capítulo 3 são descritos todos os materiais, técnicas e procedimentos utilizados no decorrer da atividade experimental, desde a síntese das esferas poliméricas de P(VDF-TrFE), a síntese de NPMs de óxido de ferro, e o revestimento das mesmas com P(VDF-TrFE). São igualmente descritas de forma sucinta todas as técnicas de caracterização efetuadas.

O capítulo 4 contém os resultados obtidos, incluindo a análise e discussão dos mesmos ao longo da sua exposição.

Por último, no capítulo 5 são tecidas as conclusões, assim como as considerações finais e algumas sugestões de trabalho futuro.



## 2 | Enquadramento teórico

---



## 2 Enquadramento teórico

As NPs podem ser preparadas a partir de materiais orgânicos, inorgânicos, ou híbridos, e apresentam propriedades interessantes precisamente devido ao seu tamanho, dado que à escala nanométrica tomam rédea os efeitos quânticos e o rácio da área de superfície em relação ao volume aumenta consideravelmente. Estes fatores fazem com que as suas propriedades sejam diferentes dos mesmos materiais à grande escala, o que permite o seu estudo e aplicação em diferentes áreas como a medicina, farmacêutica, e como agentes de análise, catalíticos ou de revestimento [8, 29]. Mesmo à escala submicrométrica o rácio entre superfície e volume permanece uma propriedade relevante, e o seu tamanho permite a passagem por locais de dimensões muito reduzidas como membranas biológicas ou canais de dispositivos microfluídicos [19]. A distinção entre o termo NP e esfera advém também daí: as NPs têm tamanhos no intervalo de 1 a 100 nm (a gama de valores que reúne mais consenso em relação ao que se refere a escala nanométrica, embora não seja unânime), enquanto que o termo esfera não implica uma escala específica, podendo ter tamanhos tanto nano como micrométricos desde que proporcionais à mesma escala em todas as direções ortogonais [30]. Tendo em conta esta definição, ao longo deste documento será usado o termo esfera sempre que forem referidas as estruturas desenvolvidas neste trabalho, sendo o mais apropriado dada a variabilidade de tamanhos naturalmente resultante dos diferentes parâmetros testados. Aquando da citação de estudos, o uso dos termos esfera e NP, semelhantes ou derivados será feito adequadamente consoante o caso. No caso das NPMs em específico, uma das propriedades de realce que estas podem apresentar é o superparamagnetismo, que lhes permite serem direcionadas através da aplicação de um campo magnético externo. Também a ausência de magnetização remanescente, associada a esta propriedade, garante que não haja aglomeração severa das partículas por não se atraírem mutuamente uma vez removido o campo, evitando o bloqueio de vasos sanguíneos em aplicações *in vivo* [31].

Neste âmbito, serão exploradas neste capítulo as propriedades de dois tipos de esferas de particular interesse para este trabalho, as de base polimérica e as magnéticas, assim como o PVDF e o seu copolímero P(VDF-TrFE).

## **2.1 Esferas poliméricas**

### **2.1.1 Introdução**

Os polímeros são, de uma forma geral, materiais leves, flexíveis e com baixo custo de produção. Naturais ou sintéticos, na sua forma pura homopolimerizada, copolímeros ou misturas, e sendo usados isoladamente ou em compósitos, as suas características são muito variadas [8]. Este amplo leque de propriedades, cruzado com as do universo das nano e micropartículas mencionadas no preâmbulo deste capítulo, abrem caminho a inúmeras possibilidades noutras tantas aplicações, sejam elas na área da eletrónica, por exemplo no desenvolvimento de sensores e dispositivos optoeletrónicos [32], a biorremediação, onde podem aprisionar poluentes [33] ou na biomédica, em particular na libertação controlada e direcionada de fármacos [34]. Neste último caso as NPs podem trazer vantagens a vários níveis, como o aumento da biodisponibilidade oral dos fármacos devido a diferentes mecanismos de absorção, maior capacidade de penetração em tecidos e melhoramento do desempenho dos fármacos [35].

Os polímeros usados na síntese de esferas poliméricas podem ser naturais, como o alginato e o quitosano, provenientes de algas [36] e do exoesqueleto de crustáceos [35], respetivamente. Podem ser usados isoladamente ou em combinação para a formação de partículas de tamanho reduzido, alto rendimento de síntese e capacidade de bioadesão, e capazes de armazenar não só fármacos como também péptidos e proteínas. Por outro lado, é comum existir alguma dificuldade na retenção destes elementos nas esferas, podendo ocorrer lixiviação dos mesmos durante a formulação [14]. O dextrano, um análogo natural do PEG, é também usado na síntese de NPs e aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade e boa solubilidade aquosa [15]. No que diz respeito aos polímeros sintéticos, existem esferas desenvolvidas a partir do polímero PLA e o seu copolímero PLGA, usados também na forma de misturas, de forma análoga ao exemplo anterior [17]. O PLGA é um dos componentes utilizados com mais sucesso na síntese de esferas poliméricas para a encapsulação de fármacos devido em parte à sua excelente biodegradabilidade e biocompatibilidade. A hidrólise deste resulta em ácido láctico e ácido glicólico, monómeros endógenos e metabolizáveis pelo organismo. A sua toxicidade sistémica é por isso extremamente reduzida [18]. Outro exemplo de uma mistura de polímeros é a de PAA com PAM, onde variando o rácio entre os dois polímeros na síntese de esferas se consegue afinar a sua carga de superfície. Esta regulação de cargas permite fazer com que tais esferas penetrem barreiras fisiológicas como a camada mucosa, que reveste várias cavidades corporais e a

superfície dos órgãos internos, e que tem como função a manutenção da hidratação dos tecidos ou de absorver e processar nutrientes, dependendo da sua localização [19].

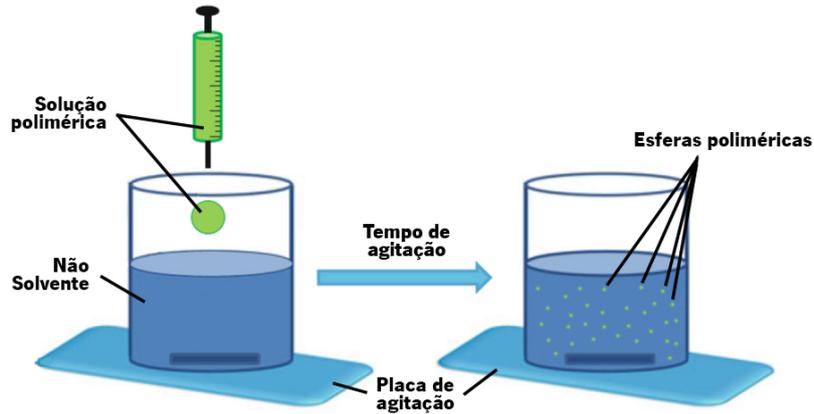
O PVDF e o seu copolímero P(VDF-TrFE) possuem propriedades eletroativas de grande relevância, sendo um caso especial o da sua piezoelectricidade. Embora esta seja uma propriedade comum a outros polímeros, o coeficiente piezoelétrico destes é consideravelmente maior que o de outros como o PLGA [20]. Isto traduz-se numa capacidade de converter energia mecânica em energia elétrica (e vice-versa), o que aliada à biocompatibilidade destes polímeros [37] faz com que tenham aplicações promissoras na forma de esferas em engenharia de tecidos, como a diferenciação e crescimento celular, regeneração de tecidos (as células respondem a estímulos elétricos) e libertação controlada de fármacos [23]. Um aspeto importante a ter em conta no desenvolvimento destas estruturas é a estabilidade das dispersões de esferas em solução, que pode ser avaliado pelo potencial zeta das mesmas [38].

### **2.1.2 Síntese de esferas poliméricas**

Existem vários métodos de síntese de esferas poliméricas. O método de evaporação de solvente envolve a dissolução do polímero num solvente orgânico seguido de emulsificação com ajuda de um surfactante em água sob agitação contínua. A emulsão requer geralmente um sistema contendo água, óleo e um surfactante. A sua mistura suscita o aparecimento de gotas (de água ou óleo dependendo de qual elemento se encontra em maior quantidade, e cujo tamanho depende igualmente dos rácios e agentes usados) nas quais se formam as esferas. O solvente orgânico é depois evaporado e as esferas recolhidas [9, 39]. É muito comum a utilização deste método na síntese de esferas de PLGA [40], mas é igualmente usada na síntese de esferas a partir de polímeros como o PLA [41] ou poliestireno [42]. Alternativamente o polímero pode ser dissolvido num solvente orgânico que é depois emulsionado num gel aquoso que contém um agente (que pode ser por exemplo um eletrólito) que impulsiona esse emulsão. Esta é depois diluída com solução aquosa adicional, o que a par da ação deste agente promove a difusão do solvente orgânico para a fase aquosa e induz a formação de esferas [43]. No entanto é um processo que requer substanciais etapas de purificação [39]. Este método foi já empregue na síntese de esferas a partir de polímeros como o PLGA [44], PLA e o copolímero poli(*D,L*-ácido láctico-co-óxido de etileno) (*poly(D,L-lactic acid-co-ethylene oxide)*, PLA-PEO) [45]. Por sua vez a diálise dá-se por

deslocação do polímero entre solventes, sendo necessária uma membrana semipermeável através da qual ocorre difusão do solvente. Desta forma é possível obter esferas pequenas e monodispersas [39] a partir de polímeros como o polimetil-metacrilato (PMMA) [46]. A técnica de fluido supercrítico (onde este tem papel de NS) é habitualmente usada para polimerização industrial e é eficaz na produção de esferas altamente puras, monodispersas e sem resíduos de solventes orgânicos. No entanto, verifica-se alguma dificuldade em manter as suspensões estáveis [39], e a baixa ou até nula solubilidade dos polímeros nos fluidos supercríticos é também um entrave [9]. A nanoprecipitação pode ainda ser realizada recorrendo a um dispositivo microfluídico que permita a mistura das soluções através dos seus canais. Alterando a arquitetura do dispositivo, para além dos parâmetros físico-químicos já mencionados, é possível controlar o tamanho das esferas resultantes [47]. Existem outros métodos como os de polimerização interfacial ou polimerização controlada de radicais (*controlled living radical polymerization*, CLRP), mais complexos por envolverem numerosos passos e elementos experimentais [48].

O método de nanoprecipitação foi inicialmente desenvolvido por Fessi *et al.* [49] para a preparação de esferas de PLA contendo um fármaco, com base nos princípios da deposição interfacial de polímeros após o deslocamento do polímero de um solvente semipolar miscível com água para uma solução lipofílica. Esta é uma técnica com várias vantagens relativamente a outras formas de síntese de esferas e encapsulação, dada a sua simplicidade, facilidade de escalamento e reprodutibilidade [50], sendo que aproximadamente 50 % da investigação realizada no desenvolvimento de esferas se foca neste método, em comparação com outras técnicas [51]. Um dos processos mais comuns passa pela dissolução do polímero num solvente orgânico, sendo este depois adicionado a uma fase dispersante (o NS) que se encontra sob agitação. Esta adição é feita através de uma seringa com a agulha mergulhada no NS, sendo assim lentamente adicionado o polímero à fase dispersante. A isto segue-se um período de agitação, ocorrendo a formação das esferas [52]. Outras abordagens deste método podem ser encontradas na literatura, como é o caso da usada no presente trabalho, denominada de nanoprecipitação por agitação magnética, onde a adição da solução polimérica foi realizada gota a gota a uma pequena distância do NS [53]. A figura 2.1 retrata este mesmo método.



**Figura 2.1.** Representação esquemática do método de nanoprecipitação por agitação magnética. Adaptado de [50].

Alternativamente, o polímero pode ser dissolvido num solvente e depois estratificado em camadas num tubo de ensaio, encontrando-se o polímero dissolvido na camada superior, uma fase intermédia estabilizadora do mesmo solvente mas sem qualquer polímero dissolvido que assume papel de tampão, e a fase inferior, que consiste num NS (figura 2.2) [54]. Apesar de apoiados no mesmo princípio, este processo, denominado de nanoprecipitação simples neste trabalho, é notoriamente diferente do anterior, pelo que é expectável que se obtenham resultados diferentes. Importa salientar que o uso do termo NS neste documento é de certa forma generalizado e não literal: na maioria dos casos encontrados na literatura o polímero é apenas menos solúvel na solução inferior relativamente ao solvente usado na camada superior, e não totalmente insolúvel.



**Figura 2.2.** Representação esquemática do método de nanoprecipitação simples. Adaptado de [54].

Contudo, para além dos princípios explicitados por Fessi *et al.*, foram já conjecturadas teorias alternativas sobre os mecanismos específicos que provocam a formação de esferas através deste método de síntese. Alguns autores especulam que esferas produzidas por nanoprecipitação resultarão do efeito de Marangoni, fenómeno resultante das interações entre o solvente e o NS, sejam elas a nível de variações de fluxo, difusão ou tensões superficiais [55]. Um líquido (fase aquosa) com alta tensão superficial exerce uma força maior no líquido envolvente do que um de baixa tensão (solvente de fase orgânica). Será esta diferença entre tensões de superfície que induz turbulência e desigualdades térmicas e que levam à difusão do solvente orgânico a partir de regiões de baixa tensão superficial, induzindo a formação de esferas. É de notar a variabilidade de termos para os solventes usados por este ser um método que abrange várias possibilidades em relação a estes elementos: o solvente é geralmente orgânico e o não solvente maioritariamente água, mas é possível empregar duas fases orgânicas ou aquosas em simultâneo, desde que sejam satisfeitas as condições de solubilidade, insolubilidade e miscibilidade [51]. Outros estudos atribuem a formação das partículas ao denominado efeito Ouzo [56], o nome de uma bebida grega que contém um óleo proveniente da semente de anis, a qual é insolúvel em água. O elevado teor alcoólico da bebida provoca a total dissolução do anis, tornando a solução incolor. Porém, ao aumentar a diluição com água, a bebida ganha um aspeto leitoso devido à formação de gotículas oleicas relativamente estáveis e que dispersam a luz visível. O fenómeno é assim muito semelhante a uma emulsão, mas não requer o fornecimento de energia ao sistema para que esta ocorra. Assim, à semelhança do que acontece nesta bebida, pequenas moléculas orgânicas e hidrofóbicas, lípidos e polímeros poderão reagir de forma análoga às gotículas oleicas supra mencionadas, organizando-se na forma de esferas [57].

Pelo exposto, e tendo em conta os resultados obtidos na literatura na síntese de esferas, optou-se pela utilização do método de nanoprecipitação pela sua relativa simplicidade em termos de execução, bem como por requerer materiais geralmente comuns a qualquer laboratório. O facto de ser um método versátil no que diz respeito ao uso e combinação de diferentes solventes e polímeros permite prever uma boa margem de experimentação e inovação. Deste modo, foi feito um estudo sistemático do efeito de vários parâmetros de processamento utilizando o método de nanoprecipitação simples, com o intuito de otimizar o método e os resultados (particularmente em relação ao tamanho e morfologia das esferas). O método de nanoprecipitação por agitação magnética foi também brevemente estudado de forma a avaliar a viabilidade da agitação para o estudo final. Neste foi avaliado o revestimento de NPMs com P(VDF-TrFE) pelo método de

nanoprecipitação por agitação mecânica, isto porque é absolutamente essencial que o NS seja mantido em agitação de forma às NPMs se manterem suspensas no mesmo, e assim poder ocorrer o revestimento com o copolímero.

### **2.1.3 Aplicações**

Como já exposto anteriormente, o estudo e aplicação de esferas poliméricas abrange múltiplos domínios científicos, como a eletrônica e biorremediação. Neste subcapítulo serão abordados alguns exemplos no campo da biomedicina.

#### **Encapsulação e libertação controlada de fármacos**

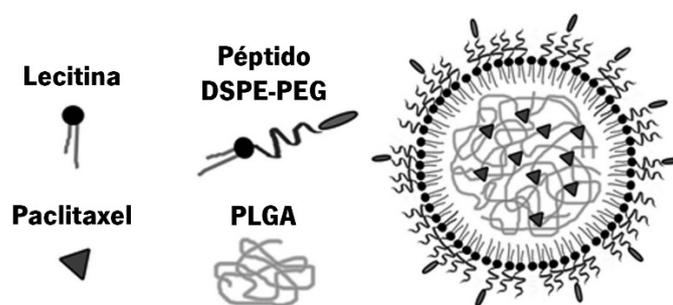
As aplicações biomédicas de esferas poliméricas visam em grande parte a encapsulação e libertação controlada de fármacos. Esta pode apresentar inúmeras vantagens, como a proteção do fármaco de fatores externos como a luz ou o ataque enzimático ao longo do trânsito pelo tubo digestivo ou uma maior eficiência terapêutica através do aumento da sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção [51], designado perfil ADME na farmacocinética e farmacologia. Para o delineamento da aplicação, é importante ter em consideração o alvo a atingir e as condições e fenómenos aos quais as esferas serão sujeitas no organismo humano consoante o seu tamanho, como se pode observar na tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Tamanho das esferas e correspondentes aplicações e excreção do organismo humano. Adaptado de [39].

<b>Diâmetro da esfera</b>	<b>Aplicações e excreção do organismo</b>
<b>&lt; 10 nm</b>	Rapidamente excretada por extravasão ou através dos rins
<b>10 - 20 nm</b>	Deteção, imagiologia, potencial para atravessar a barreira hematoencefálica
<b>20 - 100 nm</b>	Entrega de fármacos, terapia genética ou cancerígena. Podem atravessar diferentes barreiras fisiológicas, filtragem por parte do fígado e baço reduzida
<b>100 - 200 nm</b>	Entrega de fármacos e terapia genética. Período de circulação no sistema poderá ser elevado
<b>200 nm - 1 µm</b>	Geralmente expelidas pelo baço
<b>&gt; 1 µm</b>	Geralmente opsonizadas e acumuladas no fígado e baço, sendo removidas da circulação quase de imediato

Várias combinações de polímeros e fármacos permitem o tratamento de doenças como o cancro, beneficiando de propriedades como a responsividade a diferentes estímulos. A sensibilidade de um material ou composto ao pH é exemplo de um parâmetro que pode ser utilizado para a libertação de um fármaco com maior precisão, dado o meio extracelular tumoral ser geralmente mais ácido devido à secreção de prótons e lactato [58], e onde existe também uma maior capacidade de solubilizar o fármaco e um aumento da toxicidade celular do mesmo [59]. Estudos como o do desenvolvimento de esferas de tamanho médio de 110 nm a partir de polímeros como poli( $\beta$ -amino éster) (PbAE) modificado com poli(óxido de etileno) (*poly(ethylene oxide)*, PEO) tiram partido desta propriedade: o PbAE é mais solúvel a um pH abaixo de 6,5 o que promove a libertação de fármacos nele encapsulados nessas condições, sendo que o PEO tem como função evitar a opsonização. Em comparação com esferas em tudo semelhantes mas sintetizadas a partir de outro polímero, a poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), houve uma maior eficiência na libertação correta do fármaco devido ao facto de a PCL não ser sensível ao pH [60]. Outro aspeto também abordado neste último estudo, e sobre o qual incide uma grande parte da investigação no âmbito da utilização de esferas para o tratamento do cancro, é o efeito de permeabilidade e retenção aumentada (*enhanced permeability and retention*, EPR), respeitante à maior retenção de fármacos macromoleculares e esferas por parte de tecidos cancerígenos em comparação com os tecidos saudáveis. Este efeito deve-se à angiogénese que ocorre em torno das células tumorais devido à sua necessidade de vascularização associada ao rápido crescimento que lhes é característico [61]. Diferentes polímeros e a sua conjugação com fármacos ou outros

compostos podem então tirar partido destes factos para direccionar o ataque tumoral e aumentar a sua especificidade. As esferas poliméricas podem apresentar também vantagens no tratamento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer. Esferas de PEG-PLA que rondam os 100 nm foram desenvolvidas com esse intuito, tendo sido conjugadas com um par de péptidos: um com afinidade à barreira hematoencefálica que torna a estrutura capaz de a atravessar, e o outro o agente terapêutico propriamente dito [62]. As doenças cardiovasculares têm igualmente a beneficiar do uso deste tipo de estruturas, sendo capazes de promover a regeneração de vasos sanguíneos mecanicamente danificados por procedimentos que visam o tratamento do afunilamento de artérias coronárias. A sua regeneração é conseguida pela libertação de um fármaco capaz de prevenir a proliferação de tipos de tecidos que se podem tornar problemáticos, contido em esferas de PLGA-lectina-PEG entre os 60 e 70 nm e obtidas por nanoprecipitação [63, 64]. As formulações das esferas podem envolver vários elementos com diferentes funções, e a figura 2.3 permite observar a organização dos componentes na estrutura deste exemplo.



**Figura 2.3.** Representação esquemática da organização dos componentes de uma esfera desenvolvida para o tratamento de doenças coronárias a lecitina e o péptido distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) conjugado com PEG permitem a funcionalização da esfera, enquanto que o fármaco paclitaxel se encontra embestado na matriz polimérica de PLGA. Adaptado de [63].

Para além dos aqui mencionados, outros agentes terapêuticos (como diferentes proteínas ou ácidos nucleicos) podem ser encapsulados para diversos efeitos com a ajuda de polímeros alternativos, como o alginato de sódio ou o quitosano [51].

## Engenharia de tecidos

Combinando a engenharia de tecidos com técnicas de encapsulação, esferas de PLGA podem ser usadas para encapsular fatores de crescimento que promovem a diferenciação e proliferação celular, sendo dessa forma utilizadas na regeneração do tecido ósseo [65]. Para além

da encapsulação deste tipo de agentes, as esferas poliméricas podem alternativamente fazê-lo através das propriedades do próprio polímero. É o que se verifica com o PVDF e os seus copolímeros quando aplicados ao tecido ósseo. Este tipo de tecido é também inerentemente piezoelétrico, com o seu funcionamento a envolver processos eletromecânicos e mecanismos de *feedback* complexos. Os estímulos mecânicos produzem sinais elétricos que por sua vez estimulam o crescimento ósseo [20]. Esferas na forma de PVDF podem ser conjugadas com *scaffolds*, estruturas que essencialmente proporcionam suporte para a regeneração celular, tendo já sido testada a viabilidade de linhas celulares precursoras de osteoblastos na presença dessas esferas [23]. Os polímeros são inclusivamente usados na produção dos próprios *scaffolds*, onde podem ser integradas esferas de outros tipos de compostos que não poliméricos, gerando diferentes compósitos. Exemplo disso é a integração de esferas de hidroxiapatite, um mineral ósseo que pode ser também usado na regeneração deste tipo de tecido, numa matriz de PCL [66]. No entanto o tecido ósseo não é o único a apresentar propriedades piezoelétricas, podendo estas ser observadas em diferentes tipos de tecidos como a pele, cartilagem, tendões e ligamentos, aparentando esta propriedade estar relacionada com a presença de proteínas fibrosas como o colagénio, elastina ou a fibrina [20].

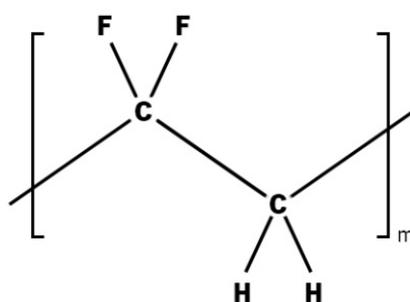
Outras possibilidades de aplicações no campo da biomédica existem, nomeadamente na hipertermia e imagiologia, que coincidem com outros aspetos a serem abordados nas aplicações do subcapítulo que trata das NPMs, um pouco mais à frente, as quais são frequentemente usadas em conjugação com polímeros na forma de revestimentos. Por este motivo estes casos serão explorados um pouco mais à frente.

## **2.2 Poli(fluoreto de vinilideno)**

Dado o objetivo principal abranger o uso de P(VDF-TrFE) para a síntese de esferas submicrométricas, é importante a contextualização deste copolímero. Isto implica o estudo do PVDF, o assunto a ser abordado nos subcapítulos seguintes, que expõem as propriedades deste polímero e alguns dos seus copolímeros (em particular o P(VDF-TrFE)), de que modo diferem e as suas aplicações.

## 2.2.1 Introdução

O PVDF é um polímero semicristalino composto por unidades repetitivas do monómero VDF, sendo representado pela fórmula química  $-(\text{CH}_2\text{CF}_2)_n-$  (figura 2.4). A sua síntese é frequentemente feita por métodos de emulsão, suspensão ou solução, os mais usados para produção à escala comercial [67, 68]. A polimerização através do uso de radicais pode também ser induzida por radiação, plasma ou micro-ondas, ou ainda ser efetuada pelo uso de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) como fluido supercrítico, por vezes usados à escala laboratorial [69]. O PVDF é ainda inerte a vários solventes, óleos e ácidos: é considerado um polímero puro por gerar um número reduzido de detritos e por isso um bom candidato a aplicações biomédicas. Apresenta também uma baixa permeabilidade a gases e líquidos [70]. A sua temperatura de transição vítrea (*glass transition*,  $T_g$ ) e de fusão (*melting temperature*,  $T_m$ ) das suas formas amorfa e cristalina situam-se aproximada e respetivamente de  $-40$  a  $-30$  °C e de  $155$  a  $192$  °C, dependendo da amostra em si (existe sempre alguma variabilidade dentro dos métodos de síntese) e do método de análise [68].



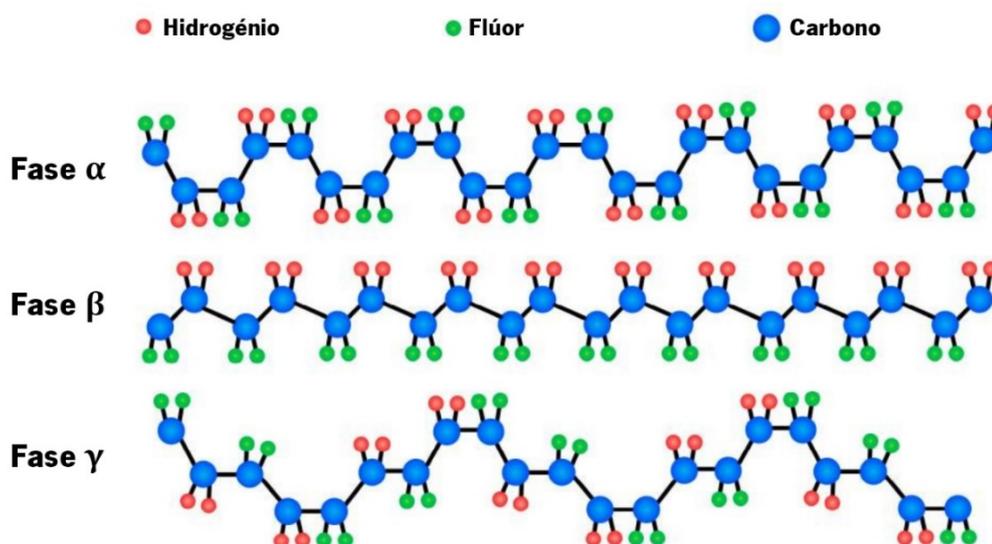
**Figura 2.4.** Representação esquemática da unidade repetitiva do PVDF.

É também caracterizado por possuir alta força mecânica, boa resistência química, estabilidade térmica e alta hidrofobicidade em comparação com outros materiais poliméricos comercializados. A estabilidade térmica está também relacionada com a sua compatibilidade termodinâmica com outros polímeros como o PMMA o que permite o desenvolvimento de misturas adequadas a diferentes aplicações [70]. Para além disso, é um polímero com propriedades eletroativas úteis, entre elas a piroeletricidade e especialmente a sua piezoeletricidade, e que se pode apresentar em diferentes fases cristalinas. Destas, a fase  $\beta$  apresenta uma maior piezoeletricidade [71]. À semelhança de outros copolímeros referidos ao longo do documento,

como o PEG-PLGA, também o PVDF pode ser conjugado com outros elementos formando diferentes copolímeros. Exemplo disso é o seu copolímero P(VDF-TrFE), biocompatível, à semelhança do PVDF [37]. Neste subcapítulo irão ser aprofundados cada um destes aspetos.

## 2.2.2 Fases cristalinas

Adicionalmente, o PVDF é também conhecido pelo seu polimorfismo, podendo ser encontrado em cinco fases cristalinas com diferentes conformações, sendo elas: fase  $\beta$ , *all trans planar zigzag* (TTT); fases  $\alpha$  e  $\delta$  *trans-gauche-trans-gauche* (TGTG') e as fases  $\gamma$  e  $\epsilon$  (T<sub>3</sub>GT<sub>3</sub>G'). Daqui resulta um momento elétrico relativamente forte no monómero do PVDF derivado da eletronegatividade dos átomos de flúor em comparação com os átomos de hidrogénio e carbono [71], o que faz com que cada cadeia polimérica possua um dipolo permanente perpendicular a ela mesma. Caso as cadeias estejam ordenadas na forma de cristal, e se os dipolos se encontrarem ordenados de forma paralela o momento dipolar resultante constitui uma fase polar, o que acontece nas fases  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . Ordenando-se de forma antiparalela, o momento anula-se, como o que se observa nas fases  $\alpha$  e  $\epsilon$ . Dentro das polares, a que apresenta maior polarização por célula unitária é a fase  $\beta$ , devido ao maior empacotamento das cadeias poliméricas por cada uma das células [72]. A figura 2.5 ilustra as fases  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .



**Figura 2.5.** Representação esquemática da conformação de cadeia para as fases  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do PVDF. Adaptado de [72].

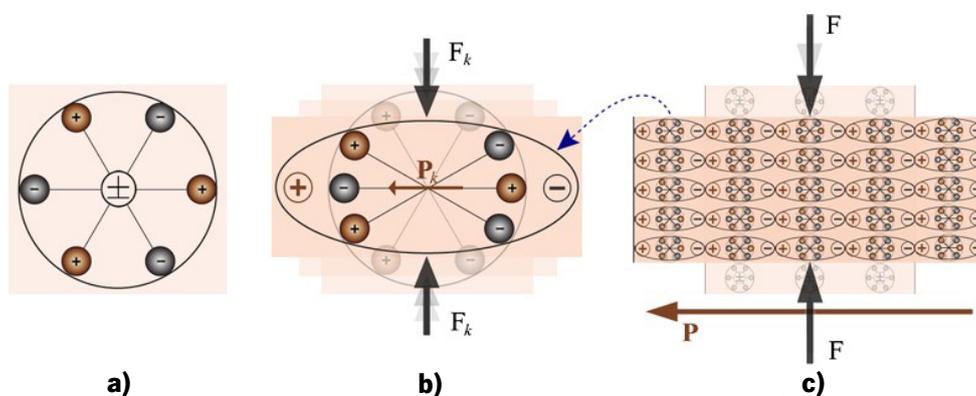
A fase em que o PVDF se encontra é de particular relevância por influenciar propriedades eletroativas de grande interesse (especialmente a piezoelectricidade) que este pode apresentar, exploradas de seguida.

### 2.2.3 Propriedades eletroativas

Os polímeros eletroativos (*electroactive polymers*, EAPs) são polímeros que sofrem alterações da sua forma ou dimensão quando sujeitos a um estímulo elétrico. Existem dois tipos principais de EAPs, os iónicos e os eletrónicos [73]. Por estarem diretamente relacionadas com o PVDF é nas propriedades destes últimos que se foca esta subsecção.

#### Piezoelectricidade

A piezoelectricidade é uma propriedade de certos materiais cristalinos que possuem a capacidade de conversão de uma polarização elétrica numa deformação mecânica e vice-versa [74]. O seu nome advém do grego *piezein*, que se refere à ação de exercer pressão [75]. Foi descoberta nalguns minerais em 1880 por Jacques e Pierre Curie aquando da sua compressão e conseqüente geração de corrente elétrica [76], e no PVDF em particular em 1969 por Heiji Kawai [77]. O efeito piezoelectrico pode ser explicado pelo modelo molecular da figura 2.6. Ao exercer uma força externa sobre um material piezoelectrico este sofre uma deformação, causando uma separação do centro positivo e negativo da molécula (figura 3.3(b)) e gerando um dipolo, quando previamente as suas cargas se encontravam homogeneamente distribuídas e por isso de carga total neutra (figura 3.3(a)).



**Figura 2.6.** Modelo molecular representativo do efeito piezoelectrico: **a)** uma molécula sem polarização piezoelectrica **b)** a molécula é sujeita a uma força mecânica ( $F_k$ ) externa resultando na polarização indicada ( $P$ ) **c)** o efeito de polarização à superfície do material piezoelectrico quando sujeito a uma força externa. Adaptado de [78].

No interior do material estes pólos de cargas opostas anulam-se e surgem à superfície cargas fixas, gerando um campo elétrico, e o material encontra-se polarizado. Este fenómeno é habitualmente chamado de efeito piezoelétrico direto, sendo o efeito piezoelétrico inverso o aparecimento de uma deformação mecânica provocada pela aplicação de um campo elétrico [78]. A fase  $\beta$  é a que apresenta melhores propriedades eletroativas, com um coeficiente piezoelétrico  $d_{33}$  de -24 a -34 pC.N<sup>-1</sup> [22].

## **Piroeletricidade**

Os materiais piroelétricos exibem uma polarização espontânea mesmo na ausência de um campo elétrico aplicado. Quando este tipo de material sofre um aquecimento, dá-se uma crescente desordenação dos dipolos, que começam a assumir orientações diferentes uns dos outros devido à agitação térmica, o que resulta na diminuição da polarização espontânea do material e consequente decréscimo do número de cargas livres na superfície do mesmo. Se o material se encontrar em circuito aberto, as cargas livres permanecem à superfície e um potencial elétrico é gerado. Se se encontrar em curto circuito, a corrente elétrica flui entre as duas superfícies polares do material. De forma semelhante, se a temperatura baixar os dipolos realinham-se e a polarização espontânea volta a aumentar, invertendo o sentido da corrente elétrica [79]. Este fenómeno é análogo para outros tipos de propriedades eletroativas, independentemente do modo de geração da corrente. Filmes de PVDF tiram proveito desta propriedade de forma a agir como sensores de temperatura em *chips* de silício [80].

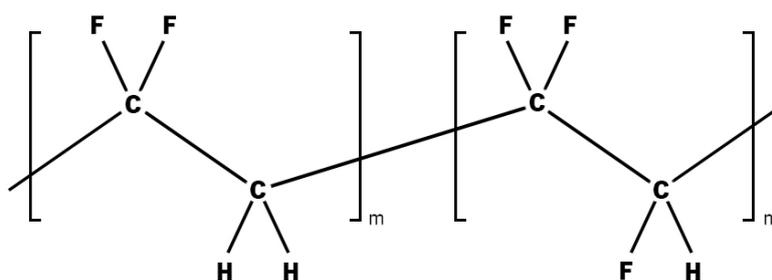
## **Ferroeletricidade**

A ferroeletricidade é a existência de uma polarização elétrica que pode ser invertida através da aplicação de um campo elétrico externo [81]. A polarização elétrica varia também com a temperatura, logo um material ferroelétrico é também necessariamente um piroelétrico. O uso de materiais ferroelétricos assenta-se em duas propriedades fundamentais: a mobilidade da polarização espontânea e a alta constante dielétrica (ou permitividade elétrica,  $\epsilon$ ), esta última que no caso do PVDF advém da forte polimerização das ligações C-F e da orientação espontânea dos dipolos nas fases cristalinas [68]. É importante ver também que acima da sua  $T_c$  estes materiais perdem a sua polarização, à semelhança do que acontece com o superparamagnetismo nas NPMs [82]. Pode ser tirado proveito da ferroeletricidade do PVDF no desenvolvimento de guias de ondas

eletromagnéticas [83] e a do P(VDF-TrFE), acoplada às suas propriedades dielétricas, no desenho de memórias não voláteis [84].

## 2.2.4 Copolimerização

A copolimerização é um método eficiente de induzir alterações sistemáticas e efetivas nas propriedades dos polímeros. Para este efeito, o processo modifica normalmente a simetria da cadeia polimérica, alterando as forças tanto intramoleculares como intermoleculares e consequentemente variando propriedades como temperaturas de transição, cristalinidade, estabilidade, elasticidade, permeabilidade ou reatividade química. A copolimerização serve também como estratégia alternativa para a obtenção de polímeros na fase  $\beta$  sem qualquer processamento elétrico ou mecânico. A incorporação de certas moléculas na cadeia polimérica, como o trifluoretileno (TrFE), pode induzir este efeito. Ao introduzir esta molécula, algumas unidades  $VF_2$  ( $-CH_2-CF_2-$ ) do PVDF são substituídas por  $VF_3$  ( $-CHF-CF_2-$ ) (figura 2.7). O tamanho superior do átomo de flúor faz com que o polímero cristalize diretamente na fase  $\beta$  caso o TrFE se encontre acima de 20 % mol, numa conformação *all trans* com até 90 % de cristalinidade [21]. O P(VDF-TrFE) possui também uma  $T_c$  inferior à  $T_m$ , que pode variar entre os 55 e os 128 °C dependendo da quantidade de TrFE [85]. Este copolímero possui ainda um elevado coeficiente elétrico  $d_{33}$  de -38 pC.N<sup>-1</sup> (o do PVDF situa-se entre -24 e -34 pC.N<sup>-1</sup>, como já antes visto) [22].



**Figura 2.7.** Representação esquemática das unidades repetitivas do copolímero P(VDF-TrFE).

Outros compostos podem ser integrados com o PVDF, formando diferentes copolímeros de maneira a afinar parâmetros como o grau de cristalinidade ou porosidade tridimensional, como a adição de hexafluoropropileno (HFP) ao homopolímero PVDF, criando o P(VDF-HFP) [86] que é utilizado em filmes capazes de converter e armazenar energia [87] ou separadores de baterias

[88]. O clorotrifluoretileno (CTFE) é criado pela adição de um átomo de cloro ao monómero de TrFE, surgindo o polímero P(VDF-CTFE). Apresenta também propriedades piezoelétricas e possui uma maior constante dielétrica do que o PVDF [89]. O PVDF pode também ser conjugado com outros polímeros como o PMMA, na forma de filmes [81] ou em membranas com poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm) [90].

Estes materiais têm diversas aplicações, surgindo em diferentes formas, como nanofibras que compõe um nanogerador polimérico e piezoelétrico [91], sensores táteis na forma de uma cúpula flexível [92], sensores de pressão a partir de filmes [93] ou a conversão e armazenamento de energia a partir da alça de uma mala [94].

### **2.2.5 Esferas baseadas em poli(fluoreto de vinilideno) e copolímeros**

Tanto quanto foi possível apurar, a literatura relativa à síntese de esferas a partir de PVDF e seus copolímeros é extremamente escassa, independentemente do método utilizado. Foram já desenvolvidas micropartículas de PVDF recorrendo à técnica de *electrospray*, na qual através da aplicação regulada de um campo elétrico a uma fase líquida provoca a formação das micropartículas [95]. Estas encontraram-se sensivelmente entre os 800 nm e os 5,5  $\mu$ m de diâmetro dependendo dos parâmetros de síntese, com um conteúdo de fase  $\beta$  a rondar os 70 %, e mostraram também ser biocompatíveis [23]. Esferas de P(VDF-TrFE) foram produzidas por nanoprecipitação com tamanhos entre os 60 e os 500 nm. No entanto o processo em si envolve etapas adicionais, nomeadamente um processo de refluxo a 90 °C após a precipitação [54].

Esta escassez de estudos, aliada às potencialidades que as propriedades do PVDF e seu copolímero P(VDF-TrFE) possuem, mostram como é de grande interesse o desenvolvimento de mais estudos que incidam na produção de esferas a partir destes materiais.

## **2.3 Nanopartículas magnéticas**

Como já referido, um dos objetivos deste trabalho é o revestimento de NPMs com P(VDF-TrFE), com o propósito de produzir compostos multifuncionais de elevado potencial para aplicações biomédicas. Nos subcapítulos seguintes serão explorados diferentes tipos de NPMs, métodos de síntese, revestimento e algumas das suas aplicações.

### 2.3.1 Introdução

As NPMs podem ter variadíssimas composições, entre elas metais puros (como Fe ou Co) e até nobres (Au) [24], óxidos de ferro ou diferentes ligas (FeCo, Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) [96]. Uma alta magnetização de saturação é muitas vezes desejável para aplicações biomédicas, que pode ser encontrada em metais de transição como o Fe, Co e Ni, ou óxidos de ferro. Embora os metais puros possuam geralmente uma maior saturação de magnetização, são altamente tóxicos e muito suscetíveis a oxidação, sendo por isso inviáveis para aplicações biomédicas na forma de NPMs sem tratamento prévio da sua superfície. A biocompatibilidade dos óxidos de ferro pode ser aumentada a partir do revestimento com polímeros como PEG e álcool polivinílico (*polyvinyl alcohol*, PVA), ou materiais como a sílica que previnam a agregação típica deste tipo de NPMs, derivada da sua superfície hidrofóbica e elevado rácio entre área de superfície e volume [97]. Entre as propriedades magnéticas que as NPMs podem exibir, o superparamagnetismo mostra-se especialmente interessante para aplicações biomédicas. Este consiste na capacidade de uma NPM dentro de um intervalo de tamanhos (geralmente entre os 10 e os 20 nm) apresentar domínio magnético único, e assim ser capaz de responder a um campo magnético externo que lhe seja aplicado de forma a poder ser direcionada no meio em que se encontra. Esta propriedade ocorre acima de uma determinada temperatura, denominada de bloqueio ( $T_B$ , que varia com a composição da partícula em si), e desaparece acima da sua temperatura de Curie ( $T_C$ ). Uma vez removido o campo magnético, o magnetismo residual é nulo ou quase nulo, sendo também interessante em termos de coercividade: não há necessidade de aplicar um campo magnético oposto para remover a magnetização [24], ou seja, não apresenta histerese. É importante ter em consideração que a presença de superparamagnetismo, pela teoria de relaxação de Néel, depende também do tamanho da nanopartícula. Este limite de tamanho, por sua vez, varia com a sua composição, ocorrendo por exemplo abaixo dos 20 nm de diâmetro em partículas de óxidos de ferro, à temperatura ambiente [27]. Esta propriedade tem já sido estudada para diversos fins em áreas como a biorremediação [98] e, de particular importância para este projeto, as aplicações biomédicas [97].

### 2.3.2 Síntese de nanopartículas magnéticas

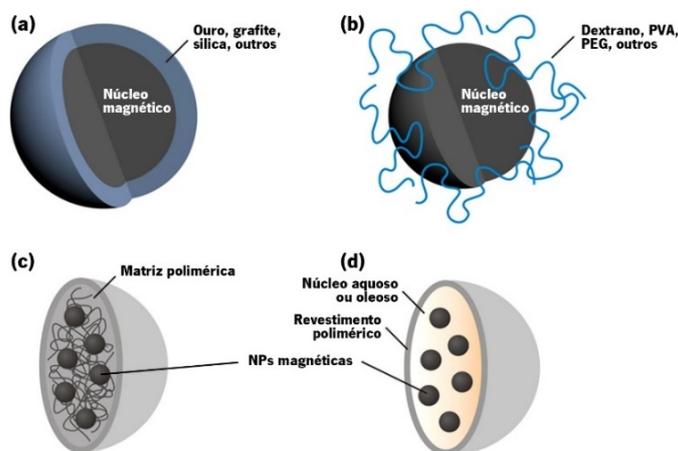
Existem vários métodos de preparação de NPMs que oferecem resultados um pouco divergentes entre eles. Podem ser agrupados geralmente em três tipos: físicos, químicos (a

química diga-se mais tradicional, com o uso de reagentes na fase líquida, normalmente referido em inglês como *wet chemistry*) e microbianos (através do uso das vias metabólicas de microrganismos) [26]. Um dos métodos que pode ser usado para preparação de NPMs é o método sol-gel, que envolve a passagem de uma fase aquosa (contendo o material desejado para a composição das NPMs) a uma fase gel, processo que se dá por exposição a uma determinada temperatura. A isto segue-se um arrefecimento, sendo o solvente restante removido por secagem, e o gel é depois exposto a nova subida de temperatura de maneira a formar as NPMs [99]. Um outro método alternativo é o da coprecipitação, um processo químico através do qual a precipitação de uma substância normalmente solúvel em determinado meio é induzida pela precipitação de outra. As condições em que este processo se dá, nomeadamente de concentração e rácio de iões, a temperatura da reação, força iónica do meio, pH e a taxa de adição da solução base (que induz a precipitação) influenciam a forma, tamanho e composição das NPMs que daí resultam [100]. A decomposição térmica permite obter partículas altamente monodispersas e um bom controlo sobre o seu tamanho a partir de precursores como o pentacarbonilo de ferro ( $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ), com a ajuda de solventes e surfactantes. Esta técnica consiste num número (que depende do tipo de NPM a preparar) de exposições do precursor a elevadas temperaturas e subsequentes arrefecimentos entre os quais são efetuadas reações químicas com a ajuda dos reagentes [24]. Diferentes tipos de emulsões (como água em óleo, óleo em água, duplas e micro ou nano) podem ser também usadas na formação de NPMs. Para além destes existem outros métodos de preparação de NPMs, entre eles (e apenas a título de exemplo) a síntese por injeção de fluxo, métodos eletroquímicos e por vapor/aerossol [101], hidrotérmicos, por oxidação, fluido supercrítico ou litografia por feixe de eletrões [26].

### **2.3.3 Funcionalização de nanopartículas magnéticas**

É importante mencionar que a funcionalização de NPMs pode permitir não só a estabilização e proteção das suas propriedades, como podem também adicionar novas propriedades por meio da sua conjugação com diferentes ligandos [24]. Um objetivo comum deste tipo de interações é o de evitar a opsonização: ao ser introduzido na corrente sanguínea, habitualmente qualquer agente que seja estranho ao organismo sofrerá uma marcação por parte de componentes do plasma sanguíneo, especialmente proteínas como a albumina e a globulina [27], atuando como sinalizadores para o ataque de fagócitos como os macrófagos. Foram já

exploradas várias abordagens com o intuito de evitar a opsonização, assim como outros efeitos. Na figura 2.8 é possível observar uma representação esquemática de algumas destas abordagens.



**Figura 2.8.** Representação esquemática da estabilização de NPMs por revestimento com materiais **(a)** inorgânicos, **(b)** orgânicos, **(c)** encapsulação em nanoesferas ou **(d)** nanocápsulas. Adaptado de [26].

O revestimento das superfícies com PEG (cujo uso é muito comum) ou outros polímeros, sejam eles sintéticos, como o PVA, que previne a aglomeração e que tem também a particularidade de poder ser transformado em gel [26], tendo já sido desenvolvido um gel magnético quando conjugado com glutaraldeído [102]; ou naturais como o dextrano, que estabelece ligações por pontes de hidrogénio com as superfícies de óxidos de ferro. Isoladamente estas ligações são relativamente fracas mas devido ao elevado número destas estabelecidas ao longo do polissacarídeo, a energia total de ligação consegue ser bastante elevada [101]. Também a adição de algumas proteínas como a lactoferrina visam evitar a opsonização, tornando as partículas furtivas (capazes de atravessar o organismo sem serem detetadas). Outra alternativa é o isolamento das partículas do meio envolvente, seja através de uma matriz polimérica formando uma nanoesfera ou através de um revestimento polimérico, formando uma nanocápsula onde as partículas se encontram em meio aquoso ou oleoso no seu interior. Esta encapsulação aumenta a sua capacidade de dispersão em água e melhora a estabilidade física e química do coloide. Para além disso, também o revestimento pode proporcionar grupos funcionais como terminais amina ou carboxilo para conjugação com ligandos e/ou moléculas bioativas. Existe uma vastidão de opções de revestimentos, para além dos mencionados, consoante o fim desejado. Dentro dos materiais inorgânicos, existe por exemplo o silício, cujo grupo silanol permite ligações covalentes a outras moléculas, ou o alginato e o quitosano nos orgânicos [101]. Por último existe ainda a

encapsulação em lipossomas, onde as partículas magnéticas são encapsuladas numa bicamada lipídica que oferece igualmente maior biocompatibilidade (designados de magnetolipossomas) [103]. O uso de óxidos de manganésio é outra alternativa, sendo estes também possuidores de propriedades magnéticas. O mais estável destes óxidos,  $Mn_3O_4$ , foi revestido com poli(*L*-ácido láctico) (*poly(L-lactic acid*, PLLA) a partir da polimerização de *L*-lactideo na própria superfície das NPMs com tamanhos distribuídos entre os 70 e os 150 nm [104]. É interessante ver que neste caso as NPMs isoladas tinham diâmetros muito pequenos, de 1 a 3 nm, mas o processo de revestimento acontece na forma de agregados de partículas e não individualmente. O PLGA é outro dos polímeros usados na síntese deste tipo de compósitos, tendo sido já executada a incorporação de NPMs de óxidos de ferro superparamagnéticas (*superparamagnetic iron oxide nanoparticles*, SPIONs) conjugadas com ácido ricinoleico (e de tamanho médio de 11 nm), composto que aumenta a afinidade com o polímero e conseqüentemente a sua incorporação na matriz polimérica através de um método de emulsão e evaporação de solvente. O diâmetro médio dos compósitos obtidos foi de 190 nm [105]. O revestimento de NPMs com polímeros inteligentes como o PVDF permite combinar o efeito piezoelétrico do polímero com outras propriedades que as NPMs podem apresentar, como o efeito magnetoestritivo. Este último consiste numa deformação mecânica induzida pela aplicação de um campo magnético, o que quando presente num compósito que apresente estes dois tipos de materiais pode induzir a polarização dielétrica procedente do efeito piezoelétrico. Esta junção de efeitos designa-se de efeito magnetoelétrico, a variação da polarização elétrica em função de um campo magnético aplicado ou vice-versa. Compósitos deste tipo na forma de NPMs de ferrite de cobalto ( $CoFe_2O_4$ ) com revestimento de PVDF foram já conseguidos através da técnica de *electrospray*, com tamanhos entre os 3 e 7  $\mu m$ , cerca de 60 % de conteúdo em fase  $\beta$  e 40 % de cristalinidade [28].

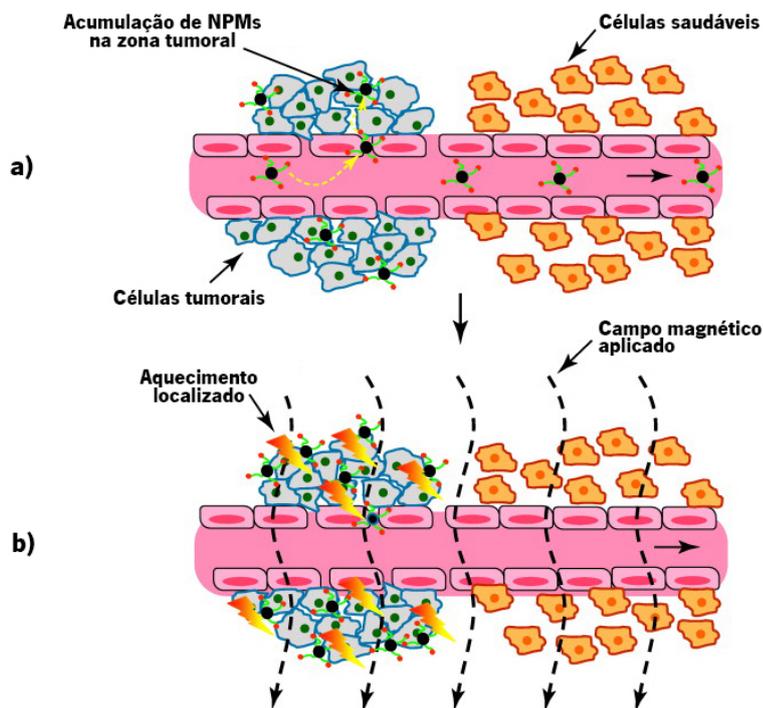
Estas integrações de NPMs em nanocompósitos orgânicos-inorgânicos permitem desenhar diferentes combinações de elementos para diferentes fins, como a deteção de agentes patogénicos em produtos alimentares através do uso de anticorpos combinado com revestimento de albumina bovina sérica (*bovine serum albumine*, BSA) e NPs de ouro [106], o desenvolvimento de um hidrogel a partir de xilano e NPMs de magnetite (óxido de ferro II,III ou  $Fe_3O_4$ ) com capacidade adsorvente [107], ou a conjugação da proteína ferritina com óxidos de ferro para uso do seu núcleo magnético como agente de contraste em ressonância magnética [25].

### **2.3.4 Aplicações**

O revestimento polimérico de NPMs permite a conjugação das diversas propriedades dos polímeros com a capacidade de guiar as NPMs dentro do organismo por efeito de um campo magnético. Assim surgem várias possibilidades na área biomédica, tanto no diagnóstico como no tratamento de doenças, ou a combinação de ambos num só processo: a teragnóstica.

#### **Hipertermia**

As aplicações das NPMs poderão ter variados fins, mas um dos mais investigados será com certeza o seu uso no tratamento do cancro. A técnica de hipertermia consiste na exposição de tecidos celulares a temperaturas superiores à que lhes é ideal, induzindo a morte celular. A utilização de NPMs nesta técnica vem usufruir das propriedades magnéticas destas de maneira a poderem ser guiadas até ao alvo terapêutico. No entanto, os primeiros avanços nesta técnica pecaram um pouco no que toca à sua especificidade. Um dos obstáculos no tratamento do cancro tem sido a dificuldade em encontrar um verdadeiro alvo nas células tumorais que as atinja isoladamente. O uso de ultrassons [108] ou a irradiação por micro-ondas [109] para induzir a hipertermia tiveram resultados longe do ideal, causando o aumento da temperatura a nível sistémico, que tem de ser acompanhado com extremo cuidado por acarretar vários riscos. A hipertermia através do uso de NPMs converte a energia dum campo magnético alternado em calor através de uma série de processos físicos, causando um aumento da temperatura na zona tumoral elevando-a aos 41-46 °C. Uma abordagem possível da utilização de NPMs nesta terapêutica pode ser vista na figura 2.9.



**Figura 2.9.** Representação esquemática de uma abordagem de técnica de hipertermia usando NPMs. **a)** As NPMs funcionalizadas com um ligando com afinidade às células tumorais (a verde e vermelho) atravessam os vasos sanguíneos na zona tumoral e ligam-se a estas células. **b)** Um campo magnético é então aplicado o que provoca a vibração das NPMs e consequente aquecimento localizado da zona tumoral, induzindo a morte celular. Adaptado de [110].

Esta abordagem foi tida em mente no desenvolvimento de compósitos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com polianilina (PANI), que reveste as NPMs de forma a prevenir a sua agregação, com tamanhos situados entre os 30 e os 50 nm [111]. Existem outras abordagens em termos de composição que podem ser feitas, como ligas de cobre e níquel (Cu-Ni) revestidas com PEG e diâmetros entre os 200 e 500 nm dependendo do tamanho das partículas compostas pela liga [112]. No entanto a maioria tem foco em partículas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ou maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) [113].

## Terapia genética

A terapia genética consiste na transferência de material genético para o interior de células ou tecidos, alterando a expressão endógena de um gene com o intuito de tratar doenças tanto hereditárias como adquiridas. As NPMs podem também ser usadas neste campo como vetores para a entrega de genes (magnetofecção), em alternativa ao uso de vetores virais já muito testados, mas que correm o risco de ser atacados pelo sistema imunitário [114], ou lípidos, polímeros e as suas potenciais conjunções com outras substâncias inorgânicas [115], entre outros métodos de

entrega. McBain *et al.*, num artigo de revisão [116], exploram quais as necessidades das NPMs para este propósito, debruçando-se sobre o uso de campos magnéticos dinâmicos que, especulam, fornecerão uma maior quantidade de energia ao sistema que resulta numa maior taxa de entrada das partículas para o meio intracelular. Afirmam também que o movimento não linear das partículas, consequência desse campo magnético oscilante, facilita a penetração em barreiras extracelulares como a camada mucosa, o que poderá ser particularmente útil para casos como o da fibrose cística, uma doença hereditária onde a mucosa tem uma espessura acima do normal que pode afetar órgãos como o pulmão e o pâncreas.

Exemplo desta aplicação é o desenvolvimento um agente de transfeção multimodal baseado em NPMs de óxido de ferro, que possuindo um polímero catiónico, a polietilenoimina (PEI), é capaz de se ligar ao ADN (de carga negativa), tendo-se mostrado capaz de efetuar a transfeção em células estaminais com boa eficiência e biocompatibilidade [117].

## **Imagiologia**

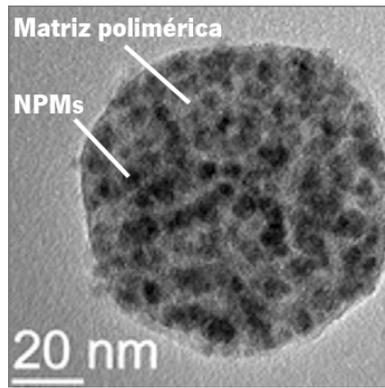
No último exemplo de transfeção da secção anterior, o polímero foi conjugado com rodamina, um marcador fluorescente. Isto permite o acompanhamento das NPMs ao longo da experiência *in vivo* com a ajuda de uma câmara especializada que se encontra equipada com uma lente que permite visualizar a emissão de fluorescência da rodamina.

As NPMs podem igualmente atuar como agentes de contraste para obter imagens de ressonância magnética. Para além do seu uso tradicional como ferramenta de diagnóstico, pode também servir como ferramenta de estudo de metástases (a formação de tumores noutras partes do corpo provenientes da migração das células tumorais originais), assim como o seu crescimento através da marcação das células com NPMs, nomeadamente  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , revestidas com poli-L-lisina (PLL) para a sua biofuncionalização [118]. Desta maneira é possível um acompanhamento constante da progressão dos tumores, ao invés de amostras pontuais como biópsias. O uso de diferentes polímeros como o quitosano permite também aumentar a especificidade na ligação aos tecidos desejados, para além de aumentar a capacidade de dispersão coloidal das NPMs [119].

## **Encapsulação e libertação controlada de fármacos**

A entrega de fármacos pode fazer uso de veículos como os magnetolipossomas mencionados em 2.3.3, estruturas que apresentam funcionalidade dupla podendo ser também usadas na técnica de hipertermia. Um exemplo deste caso apresenta-se na forma de magnetolipossomas contendo doxorubicina, um agente quimioterapêutico [103]. A bicamada lipídica, que envolve as NPMs de óxido de ferro e sensível a alterações de temperatura, encontra-se revestida de folato com objetivo de focalização tumoral, assim como de PEG de forma a prevenir o ataque do sistema imunitário a estas partículas [120]. Estes magnetolipossomas, de natureza aquosa, seriam injetados por via intravenosa e depois guiados por um campo magnético até ao alvo, com o intuito de redobrar a especificidade do ataque através do uso dos recetores de folato das células cancerígenas. Uma vez atingido o local desejado, a aplicação de um campo magnético de corrente alternada provocaria hipertermia local, causando uma alteração na fase da bicamada lipídica que se degradará e consequentemente libertará a doxorubicina. Consequentemente os efeitos tóxicos e secundários dos agentes quimioterapêuticos serão reduzidos por se conseguir evitar que as células saudáveis sejam afetadas. Apesar de promissora, a técnica tem vários obstáculos que têm de ser ultrapassados, como a dificuldade na penetração dos campos magnéticos em tecidos para o tratamento de tumores que se encontrem alojados em zonas mais internas do corpo.

Outro exemplo é o revestimento de NPMs de óxidos de ferro revestidos com amido (um carboidrato polimérico natural) fosfatado, o que lhe permite a conjugação com mitoxantrona, um agente quimioterapêutico capaz de inibir a replicação do ADN [121]. O uso de polímeros como o PLGA para revestimento de NPMs pode ter utilidade no desenvolvimento de procedimentos teragnósticos. Compósitos deste tipo [105], como o ilustrado na figura 2.10, podem combinar as propriedades das NPMs que permitem executar técnicas de hipertermia ou imagiologia com a libertação de fármacos que possam também ser inseridos na matriz polimérica e sejam libertados através da própria degradação do polímero.



**Figura 2.10.** NPMs de óxido de ferro conjugadas com ácido ricinoleico e inseridas numa matriz polimérica de PLGA, formando uma esfera. Adaptado de [105].

### **Potencial do revestimento de NPMs com poli(fluoreto de vinilideno)**

Tanto quanto foi possível apurar a literatura é extremamente parca em NPMs revestidas com este polímero na forma de compósitos esféricos, para além das NPMs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  antes mencionadas [28]. Neste trabalho os autores exploram como esferas sintetizadas a partir de materiais piezoelétricos podem ter aplicações como coletores e armazenadores de energia com maior eficiência, assim como sensores ou atuadores à escala nanométrica. A união deste tipo de materiais com NPMs magnetoestrictivas permite a criação de compósitos magnetoelétricos, como já antes mencionado, e a integração destes nos mesmos sensores/atuadores permitiria tirar proveito também das suas propriedades magnéticas. Esferas com propriedades magnetoelétricas usando NPMs tipicamente mais biocompatíveis como  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  permitiriam o desenvolvimento de novas abordagens em diversas aplicações biomédicas como o crescimento, diferenciação e estimulação de células e tecidos e a libertação controlada de fármacos.



## 3 | Materiais e Métodos

---



### 3 Materiais e Métodos

A atividade experimental consistiu, numa primeira fase, num estudo sistemático do efeito de diferentes variáveis na morfologia e no tamanho das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas a partir do método de nanoprecipitação com duas abordagens distintas, denominadas de nanoprecipitação simples, onde a precipitação é feita num tubo Falcon e com a ajuda de um tubo flexível para adição das soluções e a nanoprecipitação por agitação magnética, onde uma solução se encontra sob agitação e a esta é adicionado o polímero dissolvido gota a gota. As variáveis testadas envolveram a utilização de diferentes concentrações de polímero, diferentes solventes, a variação da constituição da solução NS (de metanol em relação a água), o uso de diferentes surfactantes e a variação da concentração do surfactante depois selecionado. Numa segunda fase avaliou-se a viabilidade do método de nanoprecipitação no revestimento de NPMs de óxido de ferro (previamente sintetizadas pelo método de coprecipitação) com P(VDF-TrFE).

Neste capítulo serão detalhados todos os reagentes, solventes e outros tipos de material utilizados, assim como os procedimentos tomados para as diferentes sínteses e as técnicas de caracterização utilizadas.

#### 3.1 Reagentes e solventes

Nas tabelas 3.1 e 3.2 encontram-se todos os reagentes e solventes envolvidos na atividade experimental. Todos eles foram adquiridos à *Sigma-Aldrich* e usados como recebidos, com exceção do polímero P(VDF-TrFE) 70/30 % mol que foi adquirido à *Piezotech*. A água UP foi obtida a partir do dispositivo de purificação *Integral 5* da *Milli-Q*.

**Tabela 3.1.** Reagentes usados no decorrer da atividade experimental, fórmulas estruturais correspondentes e número de registo Chemical Abstracts Service (CAS).

Reagente	Fórmula Estrutural	CAS
<b>Piezotech FC 30 (P(VDF-TrFE) 30 % TrFE)</b>	$(C_2H_2F_2)_n(C_2HF_3)_m$	28960-88-5
<b>Cloreto de ferro (III) hexahidratado</b>	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	10025-77-1
<b>Cloreto de ferro (II) tetra hidratado</b>	$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	13478-10-9
<b>Pluronic F-127 (Poloaxâmero 407)</b>	$HO((CH_2)_2O)_a(CHCH_3CH_2O)_b(CH_2)_2O)_cH$	9003-11-6
<b>Dodecil sulfato de sódio (SDS)</b>	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	151-21-3
<b>Brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB)</b>	$CH_3(CH_2)_{15}N(Br)(CH_3)_3$	57-09-0

**Tabela 3.2.** Solventes usados no decorrer da atividade experimental, fórmulas estruturais correspondentes e número de registo Chemical Abstracts Service (CAS).

Solvente	Fórmula Estrutural	CAS
<b>Acetona</b>	$CH_3COCH_3$	67-64-1
<b>Metanol</b>	$CH_3OH$	67-56-1
<b>Etanol</b>	$CH_3CH_2OH$	64-17-5
<b>Dimetilformamida (DMF)</b>	$HCON(CH_3)_2$	68-12-2
<b>Tetrahidrofurano (THF)</b>	$(CH_2)_3CH_2O$	109-99-9
<b>Dioxalano</b>	$(CH_2)_2O_2CH_2$	646-06-0
<b>Hidróxido de amónio (28-30 % <math>NH_3</math>)</b>	$NH_4OH$	1336-21-6
<b>Ácido clorídrico</b>	$HCl$	7647-01-0
<b>Hidróxido de sódio</b>	$NaOH$	1310-73-2

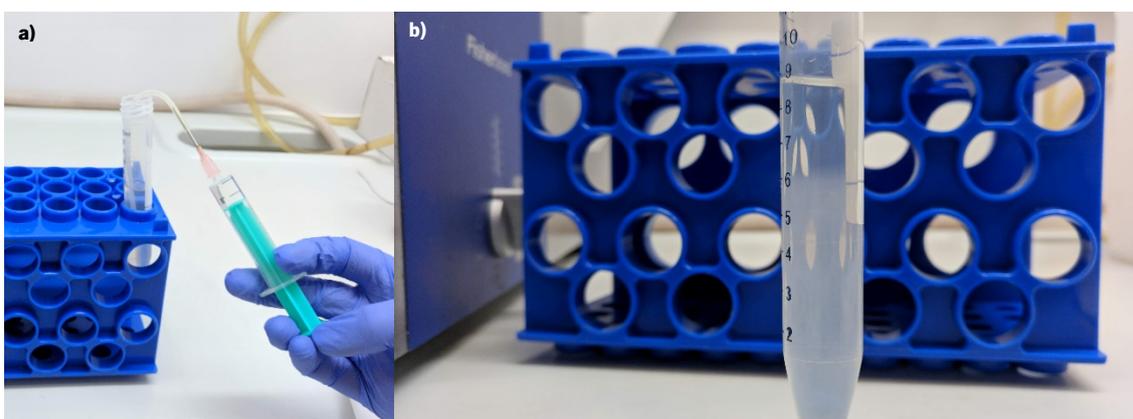
### 3.2 Síntese de esferas de poli(fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno)

A síntese das esferas poliméricas foi efetuada com base em dois métodos diferentes de nanoprecipitação.

#### 3.2.1 Método de nanoprecipitação simples

O primeiro método serve-se de um tubo Falcon de 15 mL como plataforma para se dar a nanoprecipitação. Em primeiro lugar, dissolveu-se a massa adequada de P(VDF-TrFE) (numa concentração de 2,5, 5 ou 10 mg.mL<sup>-1</sup>) em 2 mL do solvente a ser testado (acetona, DMF, THF ou dioxalano) com a ajuda de um banho de ultrassons (*Fisherbrand FB15056*) durante aproximadamente 3 min. Com a ajuda de um tubo flexível com 0,5 mm de diâmetro interno e

uma seringa foram adicionados ao fundo do tubo 2 mL desta solução polimérica. De seguida, foi cuidadosamente injetado no fundo do tubo 0,5 mL do mesmo solvente usado na solução polimérica (puro, sem qualquer polímero). O procedimento experimental encontra-se na figura 3.1a. O pequeno volume de solvente tem como papel estabelecer uma camada que age como uma barreira entre a solução polimérica e o NS. Desta forma é o polímero que se desloca de uma solução para a outra, ao invés de ocorrer mistura de soluções. Dar-se-á uma mistura marginal, mas a fronteira entre as soluções é clara, como se pode ver na figura 3.1b. A última solução a ser injetada é a solução NS (que pode ser de água UP ou com 25 %, 50 %, 75 %, 90 % ou 100 % de metanol), num volume de 6 mL e na qual se encontra dissolvido o surfactante, no caso de ser usado (Pluronic F-127, CTAB ou SDS e em concentrações de 0,05 %, 0,15 %, 0,25 %, 0,5 %, 0,75 % ou 1 % m/v).



**Figura 3.1.** Imagens ilustrativas do **a)** procedimento experimental da síntese de esferas de P(VDF-TrFE) através do método de nanoprecipitação simples e da **b)** formação de esferas de P(VDF-TrFE) verificado pela diferença de opacidade entre o solvente e NS no decorrer da nanoprecipitação.

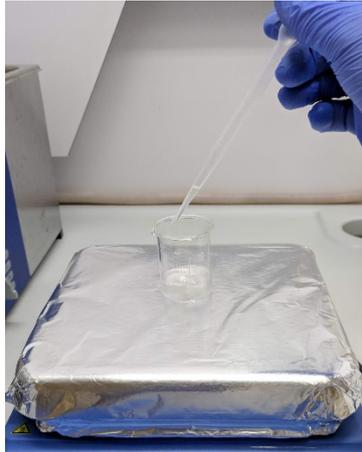
O princípio de formação das esferas advém do facto do polímero, sendo muito menos solúvel no NS, precipita da camada superficial para a mais abaixo, agregando-se na forma de esferas. A precipitação foi deixada a ocorrer invariavelmente durante 40 min (previamente otimizado a partir de testes de tempos de precipitação diferentes) após a injeção desta última camada. Findo esse intervalo de tempo o volume de 2,5 mL de solução polimérica e tampão foi removido de forma a terminar a precipitação e impedir que ocorra nova solubilização do polímero no passo seguinte. Uma vez terminado esse período efetuou-se a lavagem das partículas de forma a remover o NS, o que implicou a centrifugação (*Hettich EBA 21*) a 6000 rpm durante 15 min seguida de cuidadosa remoção dos solventes com uma pipeta automática de forma a não perturbar o precipitado. Foi depois adicionado 6 mL de água ultrapura (UP) e a solução levada a

um banho de ultrassons durante aproximadamente 10 min até que ocorresse a completa desagregação e ressuspensão das esferas. Este processo foi então repetido uma vez de modo a garantir que os solventes fossem totalmente removidos. Por último, foi realizada uma última centrifugação a menor velocidade, de 1000 rpm durante 1 min, de forma a precipitar os agregados e transferir as esferas que se encontram mais bem suspensas para um tubo Falcon novo, descartando o *pellet* e seguindo para a caracterização.

### **3.2.2 Método de nanoprecipitação por agitação magnética**

Um dos objetivos proposto para este trabalho passou pelo desenvolvimento de esferas multifuncionais através do revestimento de NPMs com o copolímero P(VDF-TrFE). Tendo-se verificado que o método de nanoprecipitação simples não era adequado para o efeito uma vez que as NPMs precipitavam precocemente relativamente ao copolímero, procedeu-se à alteração do método acrescentando um sistema de agitação. Consequentemente, em primeiro lugar realizou-se um estudo da viabilidade do método de nanoprecipitação por agitação magnética na formação de esferas de P(VDF-TrFE) puras (sem núcleo magnético). Para o efeito, fixou-se os parâmetros de síntese de acordo com os resultados obtidos no método de nanoprecipitação simples.

Consequentemente, para este método foi usada uma concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) dissolvido em acetona. Adicionou-se um volume de 6 mL de NS (90 % de metanol em água) a um gobelé com um agitador. Este foi colocado sobre uma placa de agitação (*IKA C-MAG HS 7*), à temperatura ambiente e a 200 rpm. A este NS em agitação contínua foram depois adicionados 2 mL da solução contendo o copolímero dissolvido, lentamente e gota a gota com a ajuda de uma pipeta de Pasteur. A solução é depois deixada a agitar durante quatro horas, sendo o gobelé tapado com parafilme de forma a evitar a evaporação do NS no decorrer da agitação. Findo este período, foi efetuada a lavagem das partículas de forma análoga ao método anterior. O procedimento experimental deste método é apresentado na figura 3.2.



**Figura 3.2.** Imagem ilustrativa do procedimento experimental da síntese de esferas de P(VDF-TrFE) através do método de nanoprecipitação por agitação magnética.

### **3.3 Síntese de nanopartículas magnéticas e revestimento com poli(fluoreto de vinilideno-*co*-trifluoretileno)**

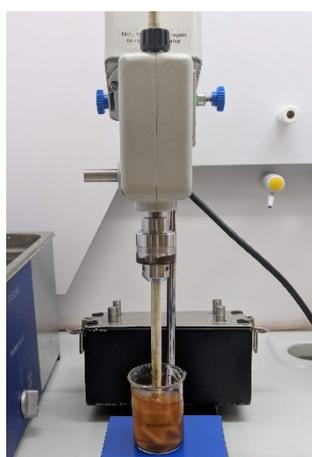
Para o desenvolvimento de esferas de P(VDF-TrFE) com núcleo magnético, NPMs de óxido de ferro foram sintetizadas e revestidas com o copolímero adaptando o método de nanoprecipitação por agitação magnética. Neste caso, a agitação magnética foi substituída por agitação mecânica, dada a natureza magnéticas nas NPMs de óxido de ferro. Deste modo garante-se que estas se mantêm suspensas na solução, evitando a atração das partículas por parte da placa de agitação e agitador magnético, o que impediria o revestimento correto e homogêneo das mesmas.

#### **3.3.1 Síntese de nanopartículas de óxido de ferro**

As NPMs de óxido de ferro foram sintetizadas pelo método de coprecipitação [122]. Para este efeito foram dissolvidos 7,8 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 4,1 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em 20 mL de água destilada com a ajuda de um banho de ultrassons. Separadamente, 0,06 g de CTAB foram dissolvidos em 3 mL de água destilada e misturado com 20 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Esta solução foi depois adicionada gota a gota à primeira solução sob agitação mecânica a 1500 rpm. Após 30 min sob agitação, as NPMs foram magneticamente separadas e lavadas com água destilada várias vezes de forma a remover os solventes utilizados e posteriormente secadas numa estufa a 60 °C.

### 3.3.2 Revestimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com poli(fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno)

Neste trabalho propõe-se adicionalmente a avaliação da viabilidade do revestimento de NPMs de óxido de ferro com P(VDF-TrFE) recorrendo ao método de nanoprecipitação por agitação mecânica. Os volumes, em relação aos expostos na secção 4.2.2, foram escalados de forma a ser possível mergulhar a hélice do agitador mecânico completamente na solução e permitir a manutenção das NPMs em suspensão. Para este efeito foram realizados três testes distintos. Inicialmente, 9 mg de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foram suspensas em 36 mL de NS (constituído por 90 % de metanol em água) com a ajuda de um banho de ultrassons, durante cerca de 30 min até se encontrarem bem dispersas. A solução foi depois rapidamente transferida para agitação mecânica (modelo *RZR 1* da *Heidolph*) a 500 rpm, à qual foram adicionados 12 mL de P(VDF-TrFE) dissolvido em acetona numa concentração de  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , gota a gota com uma pipeta de Pasteur. Foi também testado um método alternativo que envolveu exatamente as mesmas quantidades e volumes, mas neste caso as NPMs foram suspensas no solvente com a ajuda do ultrassom durante cerca de 30 min. Findo este período de tempo foi adicionado o polímero ao solvente até total dissolução do mesmo. A solução foi depois de forma análoga adicionada gota a gota ao NS sob agitação mecânica constante. O último teste realizado foi em tudo semelhante ao anterior, exceto a concentração de P(VDF-TrFE) que foi duplicada para um valor de  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O procedimento experimental encontra-se ilustrado na figura 3.3.



**Figura 3.3.** Imagem ilustrativa do procedimento experimental do revestimento de NPMs de óxido de ferro com P(VDF-TrFE) através do método de nanoprecipitação por agitação mecânica.

Para todas as amostras, após 4 h sob agitação as esferas magnéticas formadas foram separadas magneticamente, o NS descartado e as esferas lavadas com água UP, sendo ressuspensas em banho de ultrassons. Este procedimento foi repetido três vezes em cada amostra de forma a garantir a remoção de esferas de P(VDF-TrFE) sem núcleo magnético e dos solventes utilizados.

### 3.4 Resumo das amostras processadas

Enumeram-se de seguida, nas tabelas 3.3, 3.4 e 3.5, as amostras processadas através dos métodos utilizados.

**Tabela 3.3.** Resumo das esferas de P(VDF-TrFE) sintetizadas pelo método de nanoprecipitação simples.

<b>Nanoprecipitação simples</b>						
<b>Varição da concentração de copolímero (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>						
(Acetona como solvente e NS constituído por 90 % de metanol em água)						
2,5		5		10		
<b>Solventes</b>						
(5 mg.mL <sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) e diferentes NS constituídos por 90 % de metanol em água, 100 % de metanol e 100 % de água UP )						
Acetona		DMF		THF		Dioxalano
<b>Varição da constituição de NS (% de metanol em H<sub>2</sub>O)</b>						
(5 mg.mL <sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) e acetona como solvente)						
0	25	50	75	90	100	
<b>Surfactantes (0,25 % m/v)</b>						
(5 mg.mL <sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE), acetona como solvente e NS constituído por 90 % de metanol em água)						
Sem surfactante		Pluronic F-127		CTAB		SDS
<b>Varição da concentração de Pluronic F-127 (% m/v)</b>						
(5 mg.mL <sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE), acetona como solvente e NS composto por 90 % de metanol em água)						
0	0,05	0,15	0,25	0,5	0,75	1

**Tabela 3.4.** Resumo das esferas de P(VDF-TrFE) sintetizadas pelo método de nanoprecipitação por agitação magnética.

<b>Nanoprecipitação por agitação magnética</b>
5 mg.mL <sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE), acetona como solvente e NS constituído por 90 % de metanol em água

**Tabela 3.5.** Resumo das esferas de P(VDF-TrFE) com núcleo magnético de óxido de ferro sintetizadas pelo método de nanoprecipitação por agitação mecânica.

<b>Revestimento de NPMs de óxido de ferro com P(VDF-TrFE) por agitação mecânica</b> (Acetona como solvente, NS composto por 90 % de metanol em água)		
5 mg.mL <sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) no solvente 0,25 mg.mL <sup>-1</sup> de NPMs suspensas no NS	5 mg.mL <sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) no solvente 0,6 mg.mL <sup>-1</sup> de NPMs suspensas no solvente	10 mg.mL <sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) no solvente 0,6 mg.mL <sup>-1</sup> de NPMs suspensas no solvente

### 3.5 Técnicas de caracterização

Nesta secção será feito um resumo dos princípios por detrás das técnicas de caracterização utilizadas durante o trabalho experimental, assim como os parâmetros e procedimentos de preparação das amostras para os mesmos. No decorrer da síntese das esferas, os parâmetros analisados de forma a fazer o estudo sistemático de todas as variáveis e a otimizar os resultados foram essencialmente estruturais: o tamanho, polidispersão, a superfície e a morfologia das esferas. A microscopia eletrónica de varrimento (*scanning electron microscopy*, SEM) permite a avaliação do tamanho, superfície e morfologia, e a distribuição de tamanhos pode ser feita com a ajuda do programa de processamento de imagem *ImageJ*, e foi usada para avaliar as esferas de P(VDF-TrFE) sem e com núcleo magnético. O tamanho e morfologia das NPMs de óxido de ferro foi avaliado a partir da microscopia eletrónica de transmissão (*transmission electron microscopy*, TEM). Já a dispersão dinâmica de luz (*dynamic light scattering*, DLS) providencia dados relativos apenas ao tamanho e polidispersão. O potencial zeta das esferas poliméricas foi medido de forma a avaliar a estabilidade das amostras em solução. A sua composição e fases cristalinas foram avaliadas através da espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (*Fourier transformed infrared spectroscopy*, FTIR) e as suas propriedades térmicas via calorimetria diferencial de varrimento (*differential scanning calorimetry*, DSC). No caso do revestimento das NPMs, foi ainda utilizada a técnica de magnetometria de amostra vibrante (*vibrating sample magnetometry*, VSM) para avaliar o comportamento magnético das amostras.

### 3.5.1 Microscopia eletrônica de varrimento

A SEM é uma técnica de caracterização que permite a obtenção de uma impressão tridimensional de uma amostra. Isto é possível através da aceleração de elétrons entre um cátodo e um ânodo. Este feixe de incidência de elétrons pode ser concentrado em diâmetros muito pequenos, na ordem dos 1-3 nm [123, 124]. A amostra encontra-se numa câmara de vácuo onde os átomos residuais da atmosfera são tão poucos que a probabilidade de os elétrons desse feixe encontrarem um deles são extremamente baixas. Uma vez que os elétrons atingem a amostra, a densidade atômica aumenta abruptamente, ocorrendo dispersão dos elétrons e havendo transferência de energia dos mesmos para os átomos da amostra. Estas interações geram diferentes tipos de informação consoante os modos de operação do equipamento na forma de elétrons retrodifundidos e secundários, entre outros como os raios X e a catodoluminescência [125], que são recolhidos por um detetor e traduzidos em detalhes sobre a topografia (e consequentemente morfologia e tamanho), composição, estrutura cristalina e campos magnéticos e elétricos locais, dependendo do equipamento em si [124].

Os componentes gerais de um SEM consistem no canhão de elétrons, equipado com um filamento (geralmente de tungsténio) de onde o feixe de elétrons é ejetado. Este feixe de elétrons é de seguida condensado por um conjunto de lentes condensadoras e só depois passa pela lente objetiva que direciona o feixe para a amostra. Ao atingir a amostra, os elétrons do feixe são então refletidos ou absorvidos. Se a amostra tiver uma espessura muito reduzida pode ocorrer transmissão, que é o que acontece na TEM. Os elétrons refletidos são registados por detetores em diferentes posições consoante o seu tipo (retrodifundidos ou secundários, como já antes visto), sendo depois o sinal amplificado e convertido para o sistema de visualização de imagem, fornecendo o resultado final [126].

Esta técnica de caracterização foi utilizada para a avaliação do tamanho e morfologia das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas por ambos os métodos de síntese, sem e com núcleo magnético, tendo sido as amostras ressuspensas em água UP após as lavagens, e deixadas a secar num substrato próprio para SEM. Posteriormente foram cobertas por uma camada de 20 nm de ouro. O equipamento usado para este efeito foi um *Polaron SC502*. Os microscópios usados foram o modelo *S-4800* da *Hitachi* e o modelo *JSM-7000F* da *JEOL*, com uma voltagem de aceleração de 10 kV. A avaliação dos tamanhos e correspondentes médias e desvios-padrão foi posteriormente

efetuada com a ajuda do programa *ImageJ* versão 1.52e, onde foram medidas aproximadamente 50 esferas por amostra.

### **3.5.2 Microscopia eletrônica de transmissão**

Na TEM uma amostra extremamente fina é bombardeada com elétrons e uma imagem é formada através dos elétrons que a atravessam. Tem tipicamente uma capacidade de ampliação entre as  $10^3$  e  $10^6$  ordens de grandeza, possuindo uma maior resolução do que o SEM e assim sendo capaz de caracterizar amostras de tamanhos mais reduzidos, como é o caso dos óxidos de ferro. Ao avaliar os elétrons que atravessam a amostra, permite também ter uma ideia da composição da amostra a ser observada. De forma breve, é composto por um sistema de iluminação, do qual faz parte o canhão de elétrons; o sistema de imagiologia, composto por um conjunto de lentes que produzem a imagem ampliada; e a câmara de amostragem que permite a manipulação da amostra consoante o desejado [127].

Esta caracterização foi efetuada com a ajuda do modelo *Tecnai T20* da *FEI*. As amostras de NPMs de óxido de ferro sintetizadas por coprecipitação foram preparadas fazendo a sua dispersão em etanol e depois secas numa grelha de cobre revestida com carbono. A voltagem usada foi de 120 kV.

### **3.5.3 Dispersão dinâmica de luz**

Este método de caracterização, por vezes também referido como espectroscopia de correlação de fótons (*Photon Correlation Spectroscopy*, PCS) ou dispersão *quasielástica* (*Quasi-elastic Light Scattering*, QLS), assenta no princípio de que ao incidir uma fonte de luz numa partícula em suspensão esta é dispersa de diferentes formas consoante o seu tamanho. Quando as partículas têm um tamanho superior a  $1/10$  do comprimento de onda ( $\lambda$ ) da luz incidente, a luz dispersa possui uma quantidade de energia diferente da incidente, deixando portanto de ser uma dispersão elástica (particularmente dispersão de Rayleigh, quando falamos de incidência de radiação eletromagnética em partículas menores que o  $\lambda$ ) e passando a ser uma dispersão inelástica [128]. Para além disto, as partículas em suspensão encontram-se em contínuo movimento, dito Browniano, que advém das colisões com as moléculas do solvente, o que também

afeta a intensidade da dispersão de luz. Com a incidência de uma fonte de luz monocromática numa suspensão coloidal, a dispersão age como uma fonte secundária de luz. Com o movimento Browniano (inerentemente aleatório), a distância da luz dispersa do analito ao detetor varia com o tempo, sendo registadas zonas variavelmente escuras ou claras [129]. Esta variação possibilita a determinação do raio hidrodinâmico ( $R_h$ , medido em m) de partículas esféricas (ou, se não o forem, o raio hidrodinâmico aparente ou equivalente), através da relação de Stokes-Einstein (equação 4.1):

$$D = \frac{kT}{(6\pi\eta R_h)} \quad \text{Equação 3.1}$$

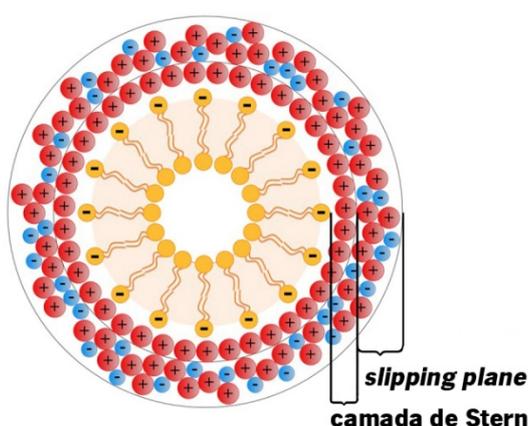
Onde  $D$  é o coeficiente de difusão translacional (medido em  $s^{-1}$ ),  $k$  a constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ),  $T$  a temperatura absoluta (K), e  $\eta$  a viscosidade do meio ( $\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ). No entanto, é importante ter em atenção que o valor de  $R_h$  devolvido pelo DLS é expresso de diferentes formas, tendo base na intensidade da luz dispersa (a partir do qual é também obtido o valor *Z-Average*, o tamanho médio das partículas), número e volume de partículas, valores que apesar de provenientes da mesma amostra, frequentemente diferem uns dos outros. No entanto, como já antes mencionado, a medida diretamente registada pelo DLS é a intensidade da luz dispersa, pelo que deve ser esse o valor tomado como mais representativo. Outro parâmetro importante dado pelo equipamento é o índice de polidispersão (*polydispersity index*, PDI), um valor adimensional que representa a distribuição de tamanhos da amostra obtida a partir da intensidade da luz dispersa por várias frações de partículas de diferentes tamanhos, e que é obtido pelo quadrado da divisão da largura pela média de cada pico obtido.

Este método de caracterização foi usado como complemento ao SEM para a avaliação dos tamanhos das esferas de P(VDF-TrFE) sintetizadas por ambos os métodos usados, e foi realizada com a ajuda do equipamento *Zetasizer NANO ZS-ZEN3600* da *Malvern Instruments Limited*, com versão de *software Zetasizer 7.13*, da mesma empresa. A sua fonte de luz é um laser He-Ne com comprimento de onda de 633 nm e o ângulo de deteção usado foi de 173° (deteção retrodifundida). Após a centrifugação e lavagem das amostras, estas foram colocadas em banho de ultrassons até à altura de análise de forma a manterem-se suspensas e desagregadas, tendo depois sido transferidas para uma *cuvette* de poliestireno aquando da análise. Esta foi feita a uma temperatura de 20 °C, sem tempo de estabilização, com um mínimo de 6 medições efetuadas

para cada uma delas. As amostras foram diluídas em água UP de forma a evitar dispersão múltipla da luz e polidispersões elevadas e errôneas devido a agregação (a ausência de tempo de estabilização no equipamento foi igualmente escolhida de maneira a evitar ao máximo este fenómeno).

### 3.5.4 Potencial Zeta

O potencial zeta ( $\zeta$ ) é um parâmetro importante que está diretamente relacionado com as interações eletrostáticas e assim permite avaliar a estabilidade de dispersões coloidais através da determinação da carga superficial do analito. É por isso um parâmetro importante na síntese de esferas em suspensão [38]. É definido como o potencial medido numa camada adjacente a partículas e que reflete a diferença de potencial entre a dupla camada elétrica (*electric double layer*, EDL) de partículas móveis eletroforéticas e a camada de dispersante circundante, cuja representação pode ser vista na figura 3.4. Esta dupla camada é composta por uma mais interior, a camada de Stern, com partículas de carga oposta associadas ao núcleo da partícula central. A camada mais externa é difusa e composta por iões e moléculas tanto com a mesma carga da partícula em si como de carga oposta. Ao aplicar um campo elétrico à amostra, as partículas movem-se em direção ao eletrodo de carga oposta à sua carga total. Na camada há uma zona hipotética denominada *slipping plane*, que age como interface entre as partículas em movimento e a camada de dispersante em seu redor. É nesta interface que é medido o potencial zeta [130].



**Figura 3.4.** Representação esquemática da dupla camada elétrica (EDL) de uma nanopartícula fosfolipídica de carga negativa em meio aquoso, composta pela camada de Stern, de carga oposta à partícula (por isso aqui positiva), e pelo *slipping plane* com iões e moléculas positiva e negativamente carregados, de onde é medido o potencial  $\zeta$ . Adaptado de [130].

O potencial  $\zeta$  é então medido através da mobilidade eletroforética ( $\mu_e$ ). Na prática é obtida através da medição da velocidade do analito na deslocação provocada pela eletroforese, onde o campo elétrico é aplicado à amostra e provoca tal deslocação de um pólo para o outro. Teoricamente é dada pela equação de Henry (equação 4.2),

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta f(K_a)}{3\eta} \quad \text{Equação 3.2.}$$

onde  $\varepsilon_r$  é a constante dielétrica ou permitividade relativa,  $\varepsilon_0$  a permitividade no vácuo,  $f(K_a)$  a função de Henry ou de Helmholtz-Smoluchowski (de valor 1 ou 1,5 consoante o meio seja orgânico ou aquoso, respetivamente, logo o valor utilizado foi de 1,5 por a suspensão ser em água UP) e  $\eta$  a viscosidade ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) à temperatura experimental [38].

Este método de caracterização foi usado para a avaliação da estabilidade da dispersão das esferas de P(VDF-TrFE) e foi realizada com a ajuda do equipamento *Zetasizer NANO ZS-ZEN3600* da *Malvern Instruments Limited*, com versão de *software Zetasizer 7.13*, da mesma empresa. As amostras foram sintetizadas normalmente e posteriormente o pH da suspensão foi ajustado apropriadamente com soluções de ácido clorídrico (HCl) 1 % e hidróxido de sódio (NaOH) 1 M para os valores de pH adequados. A determinação do potencial  $\zeta$  foi efetuada com um laser He-Ne de comprimento de onda 633 nm e a um ângulo de deteção de 173° (deteção retrodifundida). Foram realizadas 6 medições por amostra numa *cuvette* da *Malvern (folded capilar cell)*, própria para o efeito, de referência *DTS1070*.

### 3.5.5 Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier

A espectroscopia de infravermelho (IV) é uma técnica de caracterização com base nas vibrações atômicas de uma molécula. Estas vibrações acontecem quando há uma variação do momento dipolar, consequência da variação do comprimento das ligações químicas e rotação dos átomos em relação aos quais estabelecem essas ligações. A técnica de FTIR permite a obtenção de um espectro de IV através da irradiação de uma amostra com um intervalo de números de onda na região IV (entre os 4000 e os 400  $\text{cm}^{-1}$  [131]) e avaliando a que comprimentos de onda dessa radiação ocorre absorção. O número de onda ao qual é registado um pico de absorção corresponde assim a uma vibração atômica de uma parte da amostra [132]. Então, sabendo a

variação de energia que ocorre ao incidir um determinado comprimento de onda de luz, é possível descobrir a composição química da amostra a partir da comparação destes valores com os valores característicos de cada ligação molecular (conhecidos e tabelados). No caso de copolímeros baseados no PVDF em particular, permite saber se houve alguma alteração da sua fase cristalina durante o processo de síntese [21].

De particular interesse para este trabalho por permitir a análise de amostras no estado sólido sem exigir qualquer preparação especial é a refletância total atenuada (*attenuated total reflection*, ATR), uma técnica particular do FTIR (frequentemente até denominada FTIR-ATR) [131]. Os equipamentos usados são deste tipo, o modelo *Spectrum Two* da *PerkinElmer* e o modelo *FT/IR-6100* da *JASCO*, tendo sido os espectros obtidos num intervalo de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 64 varrimentos por amostra. Após síntese, centrifugação e lavagem as amostras foram deixadas a secar num forno durante 3 dias a uma temperatura baixa (35 °C) de forma a promover a evaporação controlada da água sem afetar as propriedades das amostras.

### 3.5.6 Calorimetria diferencial de varrimento

A técnica de DSC avalia o fluxo de calor (na forma de energia) simultaneamente através de uma amostra e um material de referência. Isto permite medir as propriedades térmicas da amostra. A comparação com o material de referência é feita geralmente em cápsulas metálicas (estando a de referência vazia), em função da temperatura (na forma de um gráfico) à medida que estes são aquecidos, arrefecidos ou mantidos a uma temperatura constante. Esta relação denomina-se capacidade térmica ( $C_p$ ). Consegue-se assim detetar tanto reações exotérmicas como endotérmicas, e a partir dos gráficos resultantes calcular a área dos picos (entalpias das transições ou reações), determinar temperaturas que caracterizam os picos e medir capacidades caloríficas específicas [133]. São três os tipos de transição de fase avaliados pela técnica de DSC [134]:

- A transição vítrea é endotérmica e observa-se em materiais amorfos, que ao serem aquecidos através da  $T_g$  ganham alguma mobilidade molecular e a  $C_p$  aumenta. A mudança é, no entanto, muitas vezes subtil e pode ser muitas vezes difícil de identificar.
- A cristalização é exotérmica e pode ocorrer durante o arrefecimento, manutenção isotérmica da temperatura ou por vezes até o aquecimento de um material se este for

parcial ou totalmente amorfo, e caracteriza-se pela sua ordenação molecular. A temperatura à qual ocorre é a temperatura de cristalização,  $T_c$ .

- A transição de fusão dá-se ao atingir o ponto de fusão  $T_m$ , um processo endotérmico que se dá aquando da passagem do estado sólido ao líquido. Pode aparecer como picos de perfil alto e estreito ou mais baixo e largo, dependendo do grau e uniformidade da cristalização do material, sendo que quanto mais uniforme e cristalino mais alto e estreito será o pico.

Para esta caracterização foram utilizados aproximadamente 5 mg de amostra de esferas de P(VDF-TrFE), tendo-lhes sido aplicado um fluxo de calor de 10 °C/min dos 25 °C a 200 °C. Os equipamentos utilizados foram os modelos *Pyris Diamond* e *6000*, ambos da *PerkinElmer*. Após síntese, centrifugação e lavagem, de forma análoga à executada para FTIR-ATR, as amostras foram deixadas a secar num forno durante 3 dias a uma temperatura baixa (35 °C) de forma a simultaneamente remover o NS restante e evitar que a amostras sofressem qualquer alteração.

A percentagem de cristalinidade  $X_c(\%)$  destas amostras foi posteriormente calculada com a ajuda da equação 4.3:

$$X_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_{100}} \times 100 \quad \text{Equação 4.3.}$$

onde  $\Delta H_f$  corresponde à entalpia de fusão experimental e  $\Delta H_{100}$  à entalpia de fusão quando o material em questão é 100 % cristalino [85].

### **3.5.7 Magnetometria de amostra vibrante**

O comportamento magnético de materiais magnéticos pode ser avaliado através da VSM. Esta técnica apoia-se na lei de Faraday, onde é posto que uma força eletromagnética pode ser gerada a partir da alteração de fluxo de uma bobina. No equipamento a amostra é fixada numa haste que vibra com uma dada frequência e amplitude, encontrando-se em movimento na proximidade de duas bobinas que geram um campo magnético de elevada homogeneidade, e um oscilador produz um sinal que é traduzido por transdutores. Os detetores encontram-se adjacentes aos polos destas bobinas, nelas centrados [135]. Deste modo é possível medir as propriedades

magnéticas do material em questão, em função do campo magnético aplicado, temperatura e tempo, e é possível avaliar amostras tanto no estado sólido como líquido [136].

As medições das curvas de histerese das NPMs sintetizadas assim como as revestidas com P(VDF-TrFE) foram efetuadas usando o equipamento *MicroSens EZ7*, com um campo aplicado de  $|18,5|$  kOe.

## 4 | Resultados e Discussão

---



## **4 Resultados e discussão**

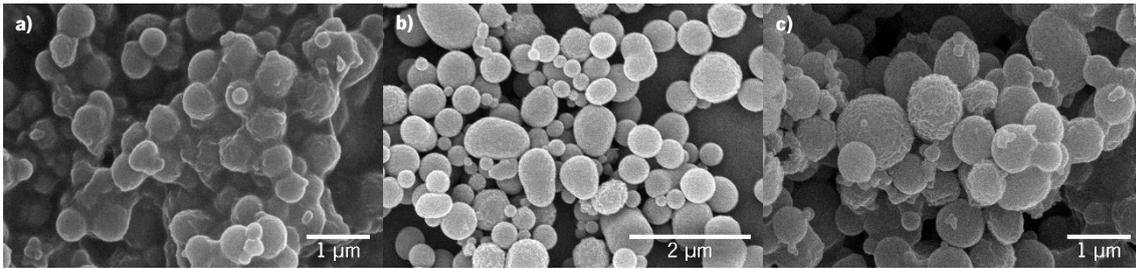
Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos em termos da morfologia e propriedades físico-químicas das esferas de P(VDF-TrFE) produzidas após variação dos parâmetros considerados mais relevantes dos métodos de síntese abordados no âmbito deste trabalho. Desde modo, em primeiro lugar realizou-se um estudo mais exaustivo do efeito da variação da concentração do copolímero, do solvente, da constituição do NS, do surfactante e da concentração do surfactante na formação de esferas de P(VDF-TrFE) através do método de nanoprecipitação simples. De seguida, avaliou-se a viabilidade do método de nanoprecipitação por agitação magnética, de acordo com a otimização realizada no método anterior, para a produção de esferas de P(VDF-TrFE). Com base nestes resultados, procedeu-se ao revestimento de NPMs de óxido de ferro com P(VDF-TrFE) adaptando o método de nanoprecipitação por agitação magnética para a utilização de agitação mecânica.

### **4.1 Síntese de esferas de P(VDF-TrFE) pelo método de nanoprecipitação simples**

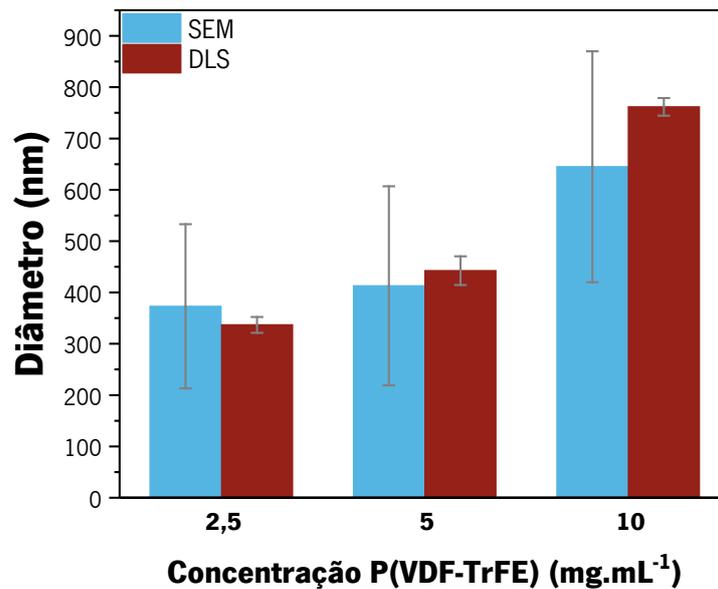
Nesta secção serão expostos os resultados das caracterizações realizadas relativamente às esferas poliméricas obtidas pelo método de nanoprecipitação simples. Para cada um dos parâmetros em questão serão em primeiro lugar avaliados os dados relativos à morfologia e tamanho, seguidos das propriedades físico-químicas. No último subcapítulo é ainda apresentado um estudo adicional da estabilidade coloidal das amostras a partir do potencial  $\zeta$  das esferas.

#### **4.1.1 Variação da concentração de copolímero**

A figura 4.1 ilustra imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas por nanoprecipitação simples com a variação da concentração de copolímero em acetona e com uma composição de NS constituído por 90 % de metanol e 10 % de água. Por sua vez na figura 4.2 são apresentados os diâmetros das esferas, calculadas a partir de imagens SEM recorrendo ao programa *ImageJ* e obtidas pela técnica DLS. É importante salientar que quando é mencionado o diâmetro obtido a partir de DLS, trata-se do diâmetro hidrodinâmico.



**Figura 4.1.** Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração de copolímero: **a)** 2,5, **b)** 5 e **c)** 10 mg.mL<sup>-1</sup>.



**Figura 4.2.** Diâmetros de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração de copolímero: 2,5, 5 e 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Dados obtidos através das imagens SEM e pela técnica de DLS.

Pelas imagens SEM é possível aferir que as esferas de P(VDF-TrFE) apresentam de uma forma geral uma morfologia esférica em todas as amostras. É possível visualizar ainda a presença de algumas esferas de maior tamanho e mais alongadas para concentrações de copolímero de 5 e 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Relativamente a amostra de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>, as esferas aparentem estar ligadas entre si, o que se acredita ter ocorrido por sobreaquecimento e conseqüentemente fusão das esferas possivelmente durante a deposição da camada condutora de ouro para posterior visualização por SEM, uma vez que os valores dos tamanhos obtido pela técnica DLS não demonstram presença de esferas ou agregados de tamanhos superiores às medições efetuadas nas imagens SEM. Os PDI das amostras obtidos por DLS podem ser encontrados na tabela 4.1.

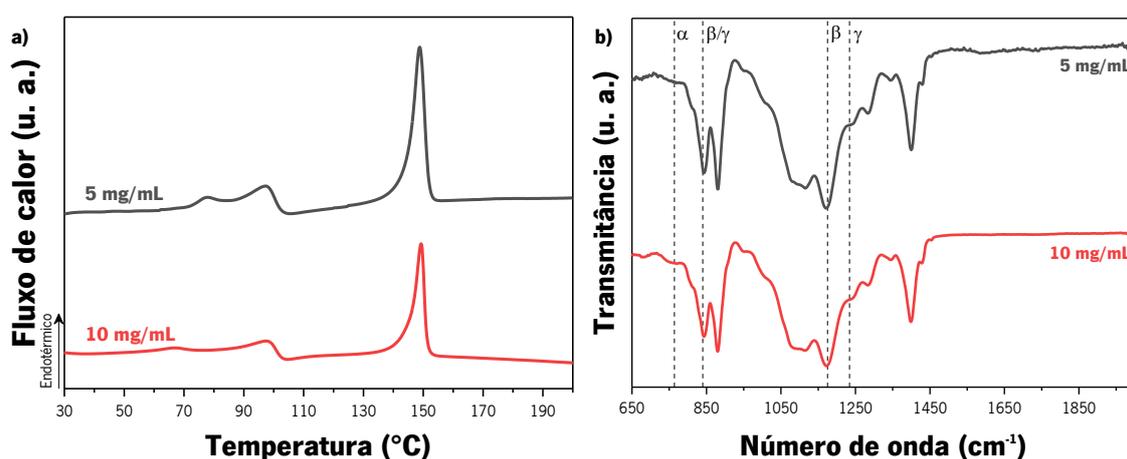
**Tabela 4.1.** Índices de polidispersão obtidos por DLS das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração de copolímero: 2,5, 5 e 10 mg.mL<sup>-1</sup>.

<b>Concentração de P(VDF-TrFE) (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>PDI</b>
<b>2,5</b>	0,23 ± 0,03
<b>5</b>	0,62 ± 0,06
<b>10</b>	0,29 ± 0,03

O valor de PDI da amostra com 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) é relativamente baixo, o que parece suportar a ideia de que a agregação que se observada nas imagens SEM tenha ocorrido após a síntese. No que diz respeito ao diâmetro das esferas, é possível verificar que os valores medidos através das imagens SEM são muito similares aos valores obtidos por DLS, com uma diferença visível, no entanto, nos desvios padrão apresentados. Durante a realização da técnica DLS, apesar das esferas em solução serem previamente dispersas em ultrassom é possível que ocorra alguma precipitação das esferas de maior tamanho durante a medição levando, conseqüentemente, à diminuição da dispersão de tamanhos. É também possível que durante a recuperação das partículas na etapa final do processo de lavagem tenha ocorrido pipetagem de uma pequena quantidade de agregados, provocando um PDI mais elevado. Além disso, os resultados, tanto de SEM como DLS, demonstram uma tendência de aumento do tamanho médio das esferas com o aumento da concentração do copolímero. Diâmetros médios de 373 ± 160, 413 ± 194 e 645 ± 225 nm, para concentrações de P(VDF-TrFE) de 2,5, 5 e 10 mg.mL<sup>-1</sup>, respetivamente, foram obtidos pelas imagens de SEM. No caso particular da concentração de P(VDF-TrFE) de 10 mg.mL<sup>-1</sup>, verificou-se durante a síntese a formação de grandes quantidades de agregados, que acabaram por ser descartadas durante o processo de lavagem por centrifugação. O mesmo sucedeu de forma mais significativa para concentrações de copolímero superiores a 10 mg.mL<sup>-1</sup> (dados não apresentados), onde uma visível e rápida precipitação do copolímero ocorreu da camada superior para o fundo do tubo. O NS apresentou uma elevada turbidez, indicando a rápida saturação do mesmo e impedindo a formação apropriada de mais esferas. O aumento do tamanho das esferas com a concentração do copolímero pode dever-se a uma hipótese do princípio de formação das mesmas que consiste em interações hidrofóbicas entre a água presente no NS e os átomos de F do P(VDF-TrFE) causada pela quebra de pontes de H entre as moléculas de água por parte do copolímero. Como este é incapaz de estabelecer ligações com as moléculas de água, tem tendência a agregar na forma de esferas de maneira a reduzir a área

exposta à água e assim minimizar a energia do sistema [54, 137]. Com concentrações elevadas, tanto o fluxo de copolímero a partir do solvente para o NS como a própria presença deste no NS é demasiada para ocorrerem estas interações hidrofóbicas a uma escala adequada para a formação de esferas, saturando o NS e unindo-se em agregados macroscópicos. Consequentemente, pelos resultados obtidos acredita-se que para este método de síntese de esferas de P(VDF-TrFE) pelo método de nanoprecipitação simples, concentrações de copolímero inferiores a  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  devem ser utilizadas, considerando as condições experimentais apresentadas. No âmbito deste trabalho e para a variação dos parâmetros de síntese apresentados nos subcapítulos seguintes, uma concentração de P(VDF-TrFE) de  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi escolhida como padrão por permitir a obtenção de um maior peso seco de esferas, sem aumento significativo do tamanho das mesmas, comparativamente a amostra de  $2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Nas figuras 4.3a e 4.3b são apresentadas as curvas de DSC e espectros de FTIR-ATR, respetivamente. Apenas as amostras com concentrações de 5 e  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  foram analisadas, devido ao escasso peso seco obtido na síntese de esferas com uma concentração de  $2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , como antes referido, sendo insuficiente para proceder a estas análises, mesmo com o escalonamento do processo de síntese. No entanto, não são expetáveis alterações significativas dos resultados obtidos tendo em conta a natureza do copolímero e da variação das condições experimentais, como será discutido de seguida.



**Figura 4.3. a)** Curvas de DSC e **b)** espectros de FTIR-ATR das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração de copolímero: 5 e  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Os picos presentes nas curvas de DSC são característicos do P(VDF-TrFE) e encontram-se a aproximadamente  $98 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para o primeiro pico (tanto para os  $5$  e  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), que corresponde

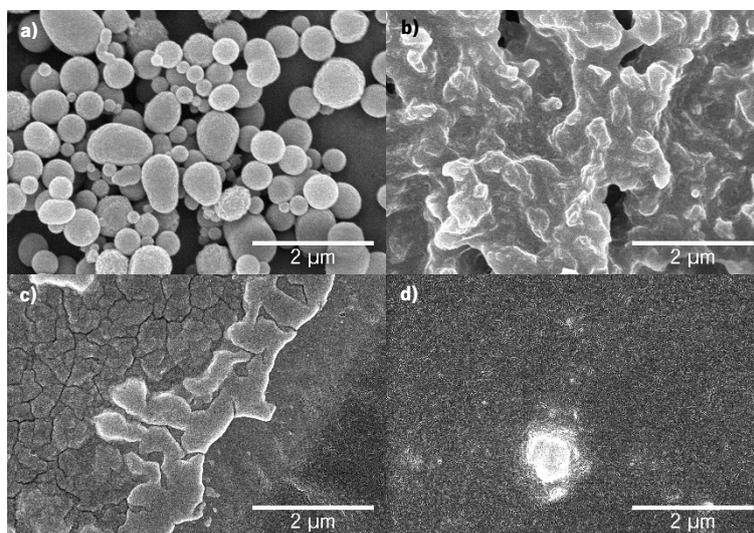
à transição de Curie, e aos 149 °C para o segundo pico (novamente para ambas as amostras), que corresponde à  $T_m$ . Estes resultados são assim congruentes com a literatura que indica valores para este copolímero de 96 e 148 °C, respetivamente [85]. As entalpias de fusão foram calculadas pelo próprio programa de aquisição através da integração da curva correspondente à  $T_m$ , sendo apenas manualmente introduzidas as bases de cada uma delas. Os valores obtidos foram de 26,86 e 21,98 J.g<sup>-1</sup>, para 5 e 10 mg.mL<sup>-1</sup>, respetivamente, estando próximos do encontrado na literatura [85], não tendo portanto ocorrido alterações das propriedades do copolímero no decorrer da síntese nestas condições. A partir das entalpias de fusão registadas foi calculada também a cristalinidade das esferas de cada amostra, de acordo com a equação mencionada em 4.5.6. Os valores de cristalinidade obtidos foram de 29 e 24 % para 5 e 10 mg.mL<sup>-1</sup> de copolímero, respetivamente. Pela observação destes resultados pode concluir-se que não há alteração significativa da cristalização das esferas de P(VDF-TrFE) nas amostras avaliadas. Consequentemente, é relativamente seguro assumir que a cristalinidade das esferas sintetizadas com 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> de copolímero esteja dentro destes valores.

Relativamente à análise de FTIR-ATR, não há indicação da presença de fase  $\alpha$  em nenhuma das amostras, dada a inexistência do pico característico desta fase aos 764 cm<sup>-1</sup>. Os picos a 840 cm<sup>-1</sup> e 1175 cm<sup>-1</sup> são tipicamente associados à fase  $\beta$ ; no entanto a banda de absorção a 840 cm<sup>-1</sup> é igualmente indicativa da fase  $\gamma$ . Por esta razão é assinalado também o número de onda 1234 cm<sup>-1</sup>, distintivo da fase  $\gamma$ , e onde não é registado um pico. Pela presença e ausência dos modos vibracionais referidos conclui-se que as esferas em ambas as amostras se encontram exclusivamente na fase  $\beta$ , que é o esperado dado o copolímero cristalizar diretamente neste fase cristalina quando o conteúdo em TrFE ultrapassa 20 % mol [85]. Deste modo, é possível afirmar que as esferas sintetizadas com concentração de P(VDF-TrFE) de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> se encontrem igualmente exclusivamente na fase  $\beta$ .

#### **4.1.2 Variação do solvente**

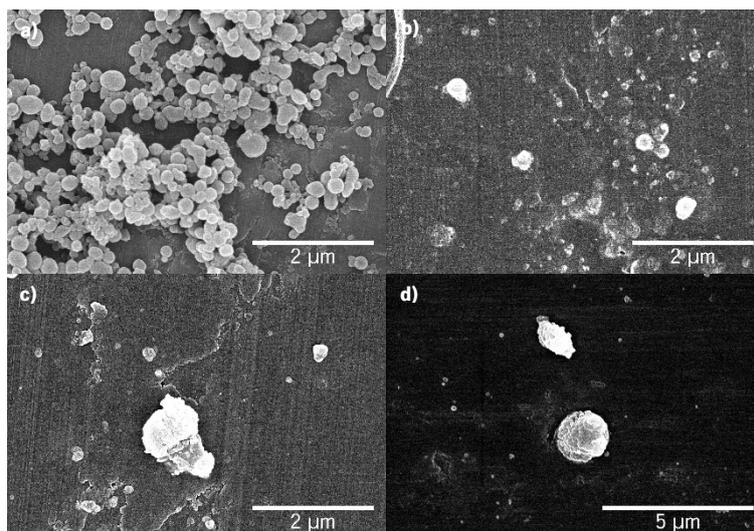
Na figura 4.4 são apresentadas as imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples com a variação do solvente e para condições de 5 mg.mL<sup>-1</sup> de copolímero e NS constituído por 90 % de metanol e 10 % de água. O estudo da variação do solvente foi efetuado de forma a verificar se seria possível obter esferas com

tamanhos distintos. É também de realçar que se escolheu o dioxalano por este ser um solvente verde. Apresenta-se novamente a amostra com acetona para efeitos de comparação.



**Figura 4.4.** Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de copolímero e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando o solvente: **a)** acetona, **b)** DMF, **c)** THF e **d)** dioxalano.

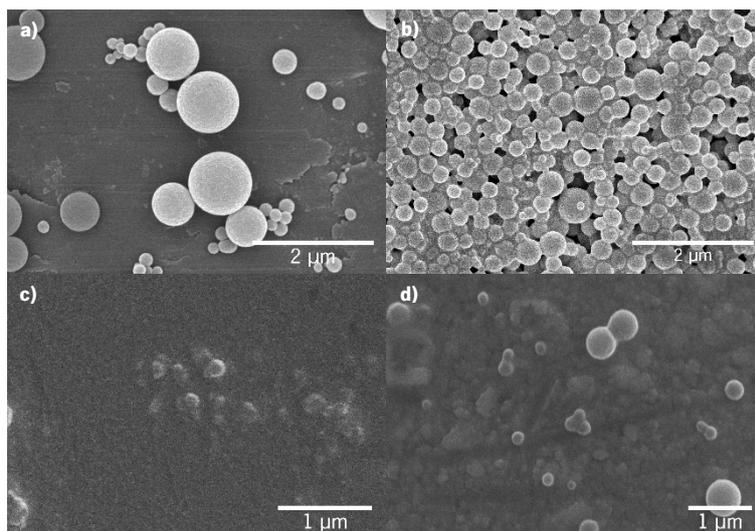
As imagens de SEM demonstram que os novos solventes testados, nomeadamente DMF, THF e dioxalano, mostram-se inadequados para a formação de esferas nas condições experimentais de NS definidas. Durante a primeira centrifugação e consequente ressuspensão, formaram-se agregados e filmes compactos (de transparência variável dependendo do solvente utilizado) aquando da entrada em contacto do copolímero com a água UP. Tendo em conta os resultados obtidos, optou-se por variar a composição do NS para 100 % de metanol. Os resultados estão apresentados na figura 4.5.



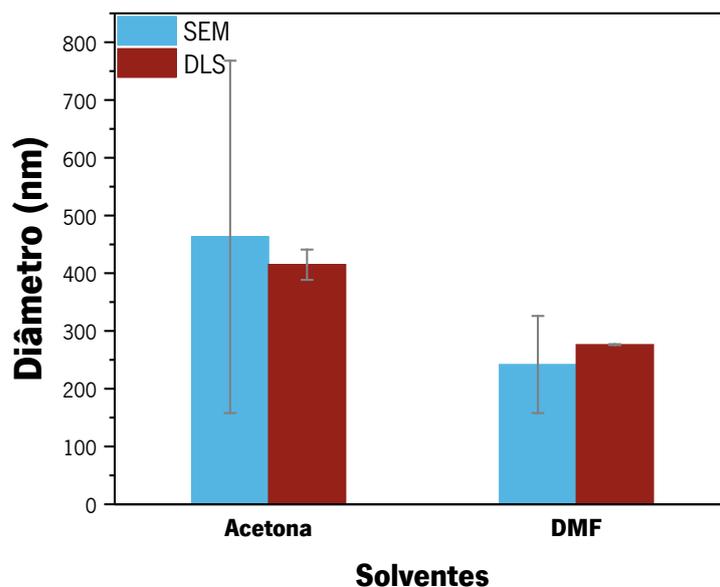
**Figura 4.5.** Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de copolímero e uma solução não solvente constituída por 100 % de metanol, variando o solvente: **a)** acetona, **b)** DMF, **c)** THF e **d)** dioxalano.

A formação de esferas com os solventes DMF, THF e dioxalano é, mais uma vez e na melhor das hipóteses, vestigial. No caso do uso de acetona como solvente, esferas com diâmetro médio de  $219 \pm 73 \text{ nm}$  foram obtidas com sucesso. Estes resultados podem advir do facto de cada solvente apresentar uma miscibilidade diferente com o NS utilizado [51]. É possível que no caso do uso de elevadas quantidades de metanol no NS e para os solventes de DMF, THF e dioxalano em particular, o tempo de precipitação definido para a formação de esferas de P(VDF-TrFE) (de 40 min, invariavelmente) não tenha sido suficiente para que o copolímero se associe em esferas devidamente antes da realização da centrifugação e lavagem com água UP. A formação de agregados e filmes durante a lavagem poderá dever-se à diferença de carga eletrostática criada pelo NS entre as esferas e a água UP das lavagens.

Por este motivo, o mesmo procedimento foi realizado, mas utilizando uma composição de NS constituído por 100 % de água, numa tentativa de obter esferas com os outros solventes testados. Imagens de SEM representativas destas amostras estão apresentadas na figura 4.6. Os dados relativos ao diâmetro das amostras onde a síntese de esferas foi bem sucedida encontram-se na figura 4.7.



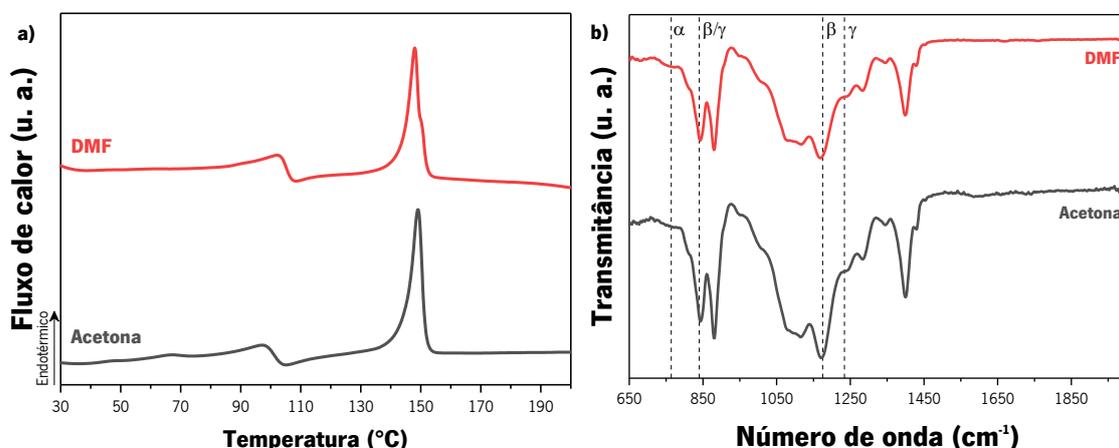
**Figura 4.6.** Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de copolímero e uma solução não solvente constituída por 100 % de água, variando o solvente: **a)** acetona, **b)** DMF, **c)** THF e **d)** dioxalano.



**Figura 4.7.** Diâmetros de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de concentração de copolímero e uma solução não solvente constituída por 100 % de água, variando o solvente: acetona e DMF. Dados obtidos através das imagens SEM e pela técnica de DLS.

Nestas condições já não ocorreu a formação de grandes agregados e filmes, tendo sido possível a correta lavagem e ressuspensão das amostras em água UP. Esferas de P(VDF-TrFE) foram obtidas com sucesso utilizando DMF e acetona como solventes. Já nas amostras de THF e dioxalano a presença de esferas é vestigial, tendo sido necessário percorrer exaustivamente a amostra para encontrar indícios de esferas.

Apesar de o diâmetro médio das esferas de DMF ( $242 \pm 84$  nm, a partir das imagens de SEM), assim como o seu PDI ( $0,204 \pm 0,003$ ) ser bastante inferior ao das sintetizadas com acetona ( $463 \pm 305$  nm a partir das imagens SEM e PDI de  $0,52 \pm 0,05$ ), devido à toxicidade do DMF e o insucesso na síntese de esferas com este solvente com a presença de metanol no NS, manteve-se a acetona como solvente nos próximos estudos da variação de parâmetro de síntese de esferas de P(VDF-TrFE) pelo método de nanoprecipitação simples. Nas figuras 4.8a e 4.8b podem ser encontrados os resultados provenientes das análises por DSC e FTIR-ATR, respetivamente.



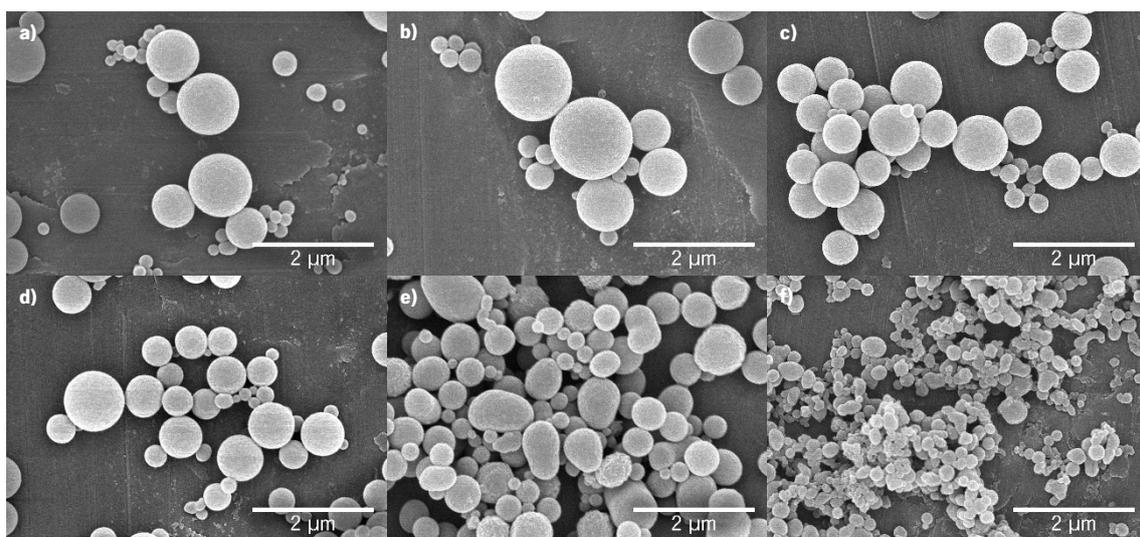
**Figura 4.8. a)** Curvas de DSC e **b)** espectros de FTIR-ATR das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de copolímero e uma solução não solvente constituída por 100 % de água, variando o solvente: acetona e DMF.

A amostra sintetizada na presença de DMF não apresenta uma diferença considerável em relação à amostra com acetona, possuindo uma cristalinidade de 26 % (contra os 29 % da acetona), estando esses valores novamente dentro do esperado. O uso de DMF como solvente alternativo não afeta então a cristalinidade das esferas obtidas.

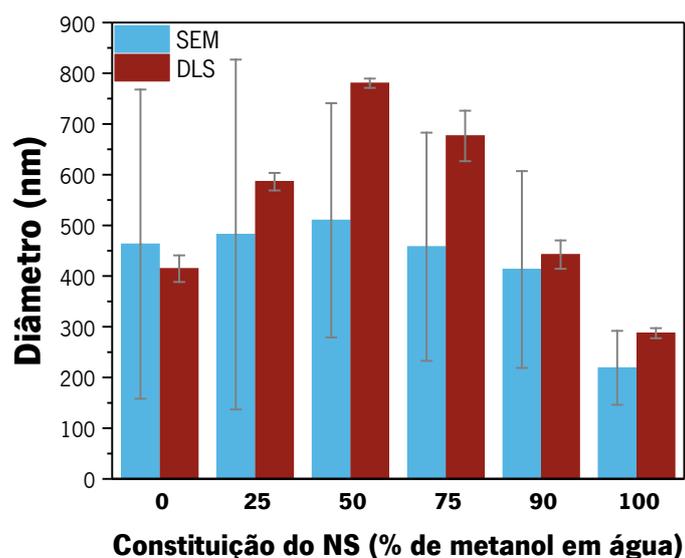
Nos espectros de FTIR-ATR encontramos de novo a ausência de um pico aos  $764 \text{ cm}^{-1}$ , o que indica que a fase  $\alpha$  não se encontra nas esferas sintetizadas na presença de DMF. A simultânea presença dos picos a  $840 \text{ cm}^{-1}$  e  $1175 \text{ cm}^{-1}$ , associados à fase  $\beta$ , e ausência dos picos a  $764$  e  $1234 \text{ cm}^{-1}$ , característicos da fase  $\alpha$  e  $\gamma$  (respetivamente), confirmam que a amostra sintetizada com DMF se encontra unicamente na fase  $\beta$ , à semelhança da amostra sintetizada com acetona, como é característico do copolímero.

### 4.1.3 Variação da constituição de não solvente

Tendo já sido definida uma concentração de P(VDF-TrFE) de  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e acetona como solvente, procedeu-se ao estudo do efeito da variação da constituição do NS. Na figura 4.9 encontram-se imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples variando a razão entre metanol e água no NS, enquanto que na figura 4.10 estão apresentados os diâmetros respetivos obtidos por imagens SEM e pela técnica DLS.



**Figura 4.9.** Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de copolímero e acetona como solvente, variando a constituição da solução não solvente: **a)** 0, **b)** 25, **c)** 50, **d)** 75, **e)** 90 e **f)** 100 % de metanol em água.



**Figura 4.10.** Diâmetros das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de copolímero e acetona como solvente, variando a constituição da solução não solvente: 0, 25, 50, 75, 90 e 100 % de metanol em água. Dados obtidos através das imagens SEM e pela técnica de DLS.

As imagens de SEM mostram que as esferas de P(VDF-TrFE) apresentam uma elevada esfericidade, sendo este efeito superior para as sínteses nas quais água faz parte da constituição do NS. De facto, a amostra de P(VDF-TrFE) obtida a partir de NS constituído por 100 % de metanol apresenta esferas mais disformes, embora de tamanhos inferiores. Com a presença de água no NS e analisando as imagens de SEM, o tamanho médio das esferas de P(VDF-TrFE) teve uma variação relativamente pequena, encontrando-se com médias aproximadamente entre os 410 e os 510 nm. Com de 100 % de metanol como NS, foram obtidos diâmetros médios de  $219 \pm 72$  e  $287 \pm 10$  nm por SEM e pela técnica de DLS, respetivamente. O desaparecimento das interações hidrofóbicas na ausência de água poderão explicar esta redução mais acentuada de tamanho, havendo menor repulsão que fará o copolímero associar-se em esferas menores [54]. Mesmo empiricamente, na preparação da amostra, foi possível especular esta hipótese dada a dificuldade em visualizar a olho nu a precipitação do copolímero e consequente formação de esferas no NS constituído por 100 % de metanol. Em amostras onde água fazia parte da composição do NS foi possível notar uma turbidez crescente a acompanhar a precipitação (à semelhança do que foi ilustrado na figura 3.1b). Na síntese com 100 % de metanol, a turbidez do NS foi, de facto, muito menos notória. Apesar destes diâmetros inferiores, o facto de as esferas serem mais disformes pode indicar uma maior instabilidade das mesmas durante a sua formação, o que poderá ser consequência de uma diferente taxa de difusão do solvente para o NS nestas condições (um dos parâmetros que pode ter influência na nanoprecipitação) [137].

Outra observação clara nas imagens SEM é a elevada variação de tamanhos apresentada pelas amostras obtidas recorrendo a NS com água, dando origem a desvios padrão mais elevados. Uma otimização do processo de centrifugação deverá ser efetuada num trabalho futuro de forma a reduzir a distribuição de tamanhos. A diferença entre os diâmetros obtidos por SEM e por DLS, principalmente nas amostras sintetizadas em NS com 50 e 75 % de metanol (de uma média de 510 nm por SEM contra 780 nm por DLS para 50 % e 458 nm por SEM contra 676 nm por DLS para 75 %), poderá dever-se às condições de medição, como já referido, ou ao raio hidrodinâmico tornar-se superior sob estas condições de síntese. Com o aumento da percentagem de metanol no NS há ainda uma tendência de diminuição do desvio padrão do tamanho das esferas, evidente nos resultados de SEM. Os índices de polidispersão das amostras obtidos pela técnica DLS apresentam-se na tabela 4.2.

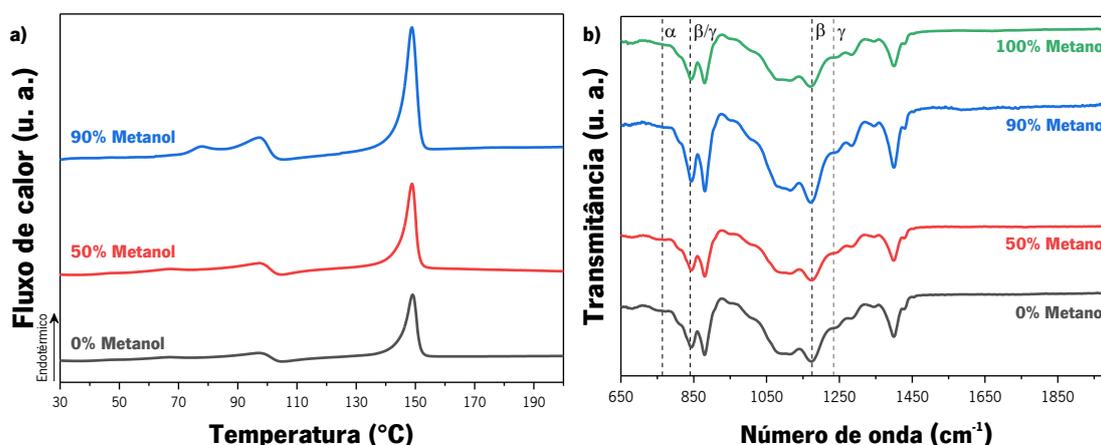
**Tabela 4.2.** Índices de polidispersão obtidos por DLS das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL<sup>-1</sup> de copolímero e acetona como solvente, variando a constituição da solução não solvente: 0, 25, 50, 75, 90 e 100 % de metanol em água.

Constituição do NS (% de metanol em água)	PDI
0	0,52 ± 0,05
25	0,38 ± 0,07
50	0,57 ± 0,09
75	0,50 ± 0,03
90	0,62 ± 0,06
100	0,26 ± 0,04

A polidispersão manteve-se praticamente inalterada para sínteses que contêm água na constituição do NS, sendo os valores obtidos superiores a amostra produzida em 100 % de metanol. Esta última apresenta uma polidispersão relativamente baixa, o que corrobora o desvio padrão dos diâmetros obtidos por SEM ser também consideravelmente inferior comparativamente às outras amostras.

Embora seja evidente que uma otimização do processo de centrifugação se mostre uma necessidade num trabalho futuro, optou-se por manter o NS constituído por 90 % de metanol e 10 % de água nos próximos estudos, por permitir obter uma síntese de estruturas aparentemente mais estável e de maior esfericidade.

Nas figuras 4.11a e 4.11b são apresentados resultados de DSC e de FTIR-ATR resultantes da variação da constituição de NS para 0, 50, 90 e 100 % de metanol em água.



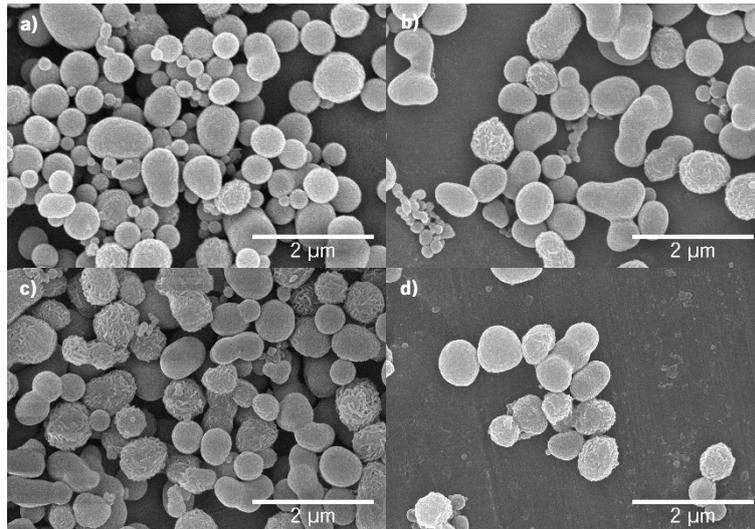
**Figura 4.11. a)** Curvas de DSC e **b)** espectros FTIR-ATR das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL<sup>-1</sup> de copolímero e acetona como solvente, variando a constituição da solução não solvente: 0, 50, 90 e 100 % (este último apenas no espectro FTIR-ATR) de metanol em água.

À semelhança do que aconteceu anteriormente, o peso seco de esferas sintetizadas a partir de NS composto por 100 % de metanol não foi suficiente para posterior análise por DSC, mesmo com escalonamento do processo. No entanto a amostra obtida foi suficiente para a análise de FTIR-ATR, que requer uma menor quantidade para ser efetuada. Para as restantes amostras, não existem variações significativas das curvas de DSC. Os picos apresentam valores semelhantes aos estudos anteriores. Relativamente à cristalinidade das mesmas, valores de 26, 27 e 29 % foram obtidas para as amostras sintetizadas em NS com 0, 50 e 90 % de metanol. Embora a cristalinidade aparente estar a aumentar, os valores obtidos estão dentro do erro experimental e similares aos apresentados nos estudos anteriores. Acredita-se assim que a variação da constituição do NS com água e metanol não altera de forma significativa a cristalinidade de esferas de P(VDF-TrFE), como comprovado em estudos anteriores [138].

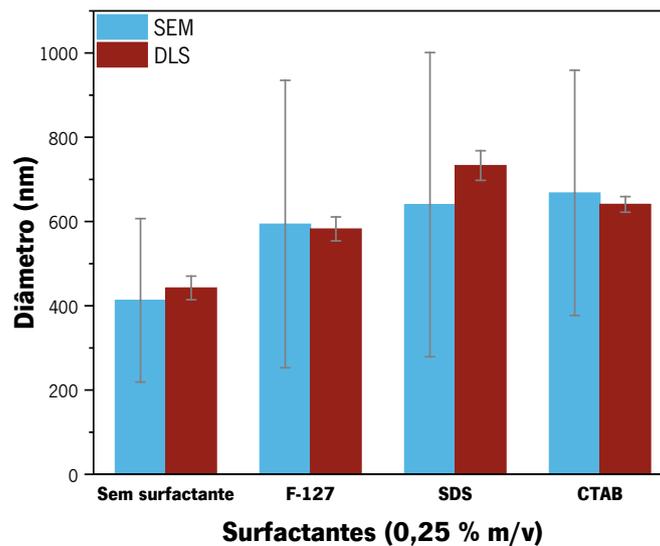
No que diz respeito aos espetros de FTIR-ATR, os resultados demonstram que as esferas de P(VDF-TrFE) cristalizaram exclusivamente na fase  $\beta$ , não sendo assim afetadas pela constituição do NS usada durante a síntese.

#### **4.1.4 Variação do surfactante**

Com o objetivo de aumentar a estabilidade das esferas de P(VDF-TrFE) em solução, realizou-se um estudo de forma verificar se a adição de surfactante durante a síntese por nanoprecipitação simples seria benéfica. Este primeiro estudo visou verificar o efeito do surfactante na morfologia e diâmetro das esferas. Num segundo estudo, um dos surfactante foi selecionado e o efeito da sua concentração na morfologia, diâmetro e estabilidade em solução avaliado. Na figura 4.12 apresentam-se imagens SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples variando o surfactante, em condições de 5 mg.mL<sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) em acetona e NS constituído por 90 % de metanol e 10 % de água. Na figura 4.13 estão apresentados os diâmetros respetivos, provenientes da análise de SEM e DLS.



**Figura 4.12.** Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando o surfactante: **a)** sem surfactante; a uma concentração de 0,25 % m/v dos surfactantes **b)** Pluronic F-127, **c)** CTAB e **d)** SDS.



**Figura 4.13.** Diâmetros das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando o surfactante: sem surfactante; a uma concentração de 0,25 % m/v dos surfactantes Pluronic F-127, CTAB e SDS.

Os resultados obtidos demonstram uma diferença ligeira de diâmetros entre as esferas sem surfactante e as sintetizadas na presença de surfactantes. De facto, com a introdução de surfactantes, o diâmetro das esferas aumentou aproximadamente de 200 nm em relação às sintetizadas sem surfactante ( $413 \pm 194 \text{ nm}$  por SEM), embora o desvio padrão se mantenha significativo. As esferas sintetizadas com surfactante possuem diâmetros superiores e aparentam

ter uma maior disformidade e rugosidade do que as esferas na ausência de surfactante, o que indica que o surfactante tem efetivamente um papel relevante no processo de formação das esferas, alterando a dinâmica da mesma. Os PDIs obtidos pela técnica de DLS para estas amostras encontram-se na tabela 4.3.

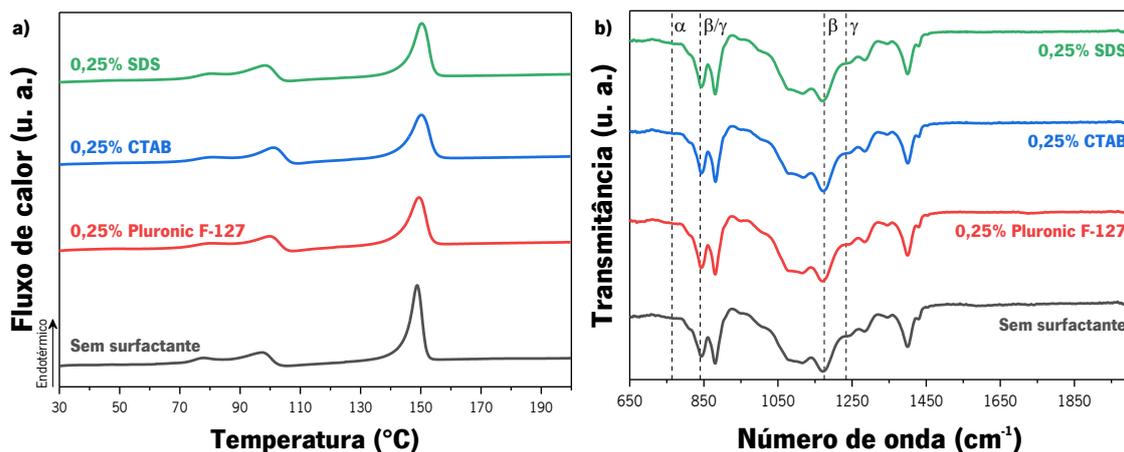
**Tabela 4.3.** Índices de polidispersão obtidos por DLS das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL<sup>-1</sup> de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando o surfactante: sem surfactante; a uma concentração de 0,25 % m/v dos surfactantes Pluronic F-127, CTAB e SDS.

<b>Surfactante (0,25 % m/v)</b>	<b>PDI</b>
<b>Sem surfactante</b>	0,62 ± 0,06
<b>Pluronic F-127</b>	0,55 ± 0,09
<b>CTAB</b>	0,55 ± 0,05
<b>SDS</b>	0,56 ± 0,02

Os PDIs obtidos nas esferas sintetizadas na presença de surfactantes encontram-se na gama de valores vista até agora, não parecendo haver qualquer alteração induzida pela presença dos mesmos.

Relativamente à carga dos surfactantes, não parece existir qualquer diferença resultante desta propriedade. O surfactante Pluronic F-127 é não iónico, o SDS aniónico, e o CTAB é catiónico. Não tendo havido variação aparente na morfologia das amostras com a variação do surfactante, escolheu-se o Pluronic F-127 para o estudo posterior. Este não gera uma quantidade de espuma (típica do uso de surfactantes) tão significativa quanto o CTAB e o SDS durante a síntese e posterior lavagem das esferas de P(VDF-TrFE), facilitando assim todo o processo em si.

Seguem-se nas figuras 4.14a e 4.14b os resultados provenientes das análises de DSC e FTIR-ATR das amostras de P(VDF-TrFE) sintetizadas com os diferentes surfactantes.



**Figura 4.14. a)** Curvas de DSC e **b)** espectros FTIR-ATR das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando o surfactante: sem surfactante; a uma concentração de 0,25 % m/v dos surfactantes Pluronic F-127, CTAB e SDS.

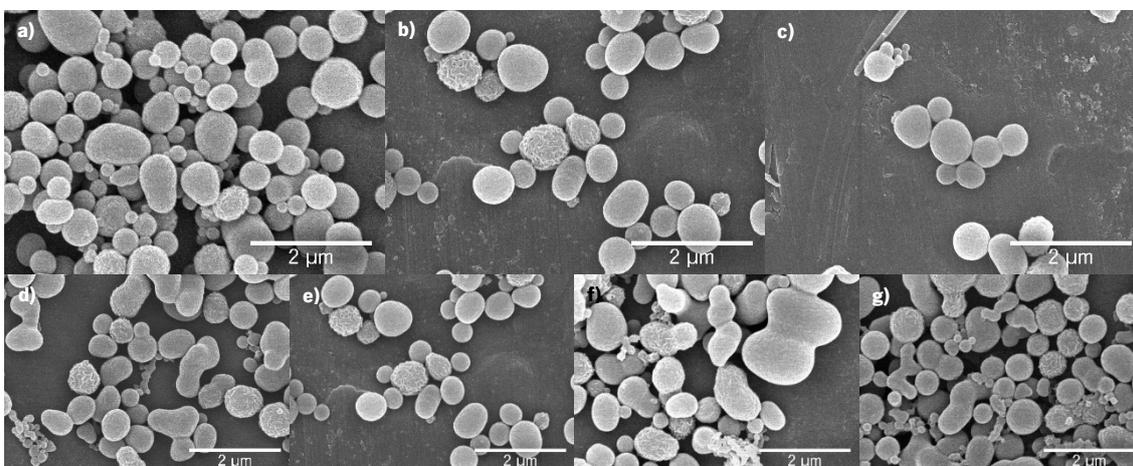
Relativamente à análise de DSC e de forma semelhante aos estudos anteriores, não se observam grandes alterações relativamente às curvas de fluxo de calor das esferas de P(VDF-TrFE) sintetizadas sem e com diferentes surfactantes. As amostras apresentadas possuem cristalinidades de 29, 27, 26 e 27 % para as esferas sintetizadas sem surfactante, com Pluronic F-127, com CTAB e com SDS, respetivamente. Consequentemente, é possível concluir que a adição de surfactante durante a síntese não afeta de forma notória a cristalinidade das esferas.

Nos espectros de FTIR-ATR, os picos a  $840$  e  $1175 \text{ cm}^{-1}$ , em combinação com a ausência de picos a  $764$  e  $1234 \text{ cm}^{-1}$ , comprovam novamente que todas as amostras se encontram na fase  $\beta$ , não havendo alterações da fase cristalina relacionadas com o uso dos surfactantes. A ausência de alterações relevantes é natural dado que as concentrações usadas são muito reduzidas. O surfactante Pluronic F-127 induziria um pico aos  $1100 \text{ cm}^{-1}$  [139], o CTAB aos  $2900 \text{ cm}^{-1}$  [140] (este número de onda não foi avaliado, mas os picos referentes às fases cristalinas não sofreram alteração) e o SDS aos  $1200 \text{ cm}^{-1}$  [141], não tendo sido, contudo, registados devido à baixa concentração utilizada e processos de lavagem efetuados, como exposto anteriormente.

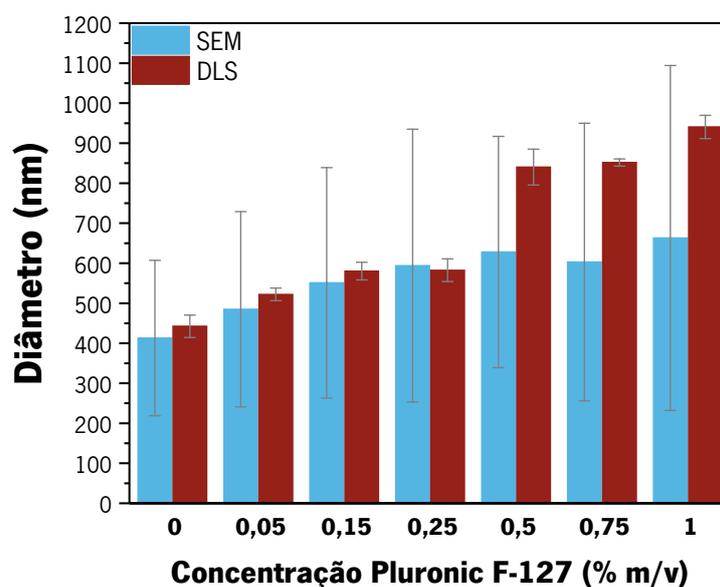
#### 4.1.5 Variação da concentração de surfactante

Para finalizar este estudo, variou-se a concentração do surfactante Pluronic F-127 mantendo as condições de  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de P(VDF-TrFE) em acetona e NS constituído por 90 % de metanol e 10 % de água. Imagens SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas sob

estas condições estão apresentadas na figura 4.15, enquanto que os diâmetros respectivos obtidos por SEM e DLS estão presentes na figura 4.16.



**Figura 4.15.** Imagens de SEM representativas de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração do surfactante Pluronic F-127: **a)** 0, **b)** 0,05, **c)** 0,15, **d)** 0,25, **e)** 0,50, **f)** 0,75 e **g)** 1 % m/v.



**Figura 4.16.** Diâmetros das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração do surfactante Pluronic F-127: 0, 0,05, 0,15, 0,25, 0,50, 0,75 e 1 % m/v.

As imagens SEM, assim como os diâmetros obtidos, aparentam demonstrar um aumento tendencial do tamanho das esferas com o aumento da concentração do surfactante, com as esferas sem surfactante, de diâmetro médio de  $413 \pm 194 \text{ nm}$ , a contrastar com os  $663 \pm 431 \text{ nm}$

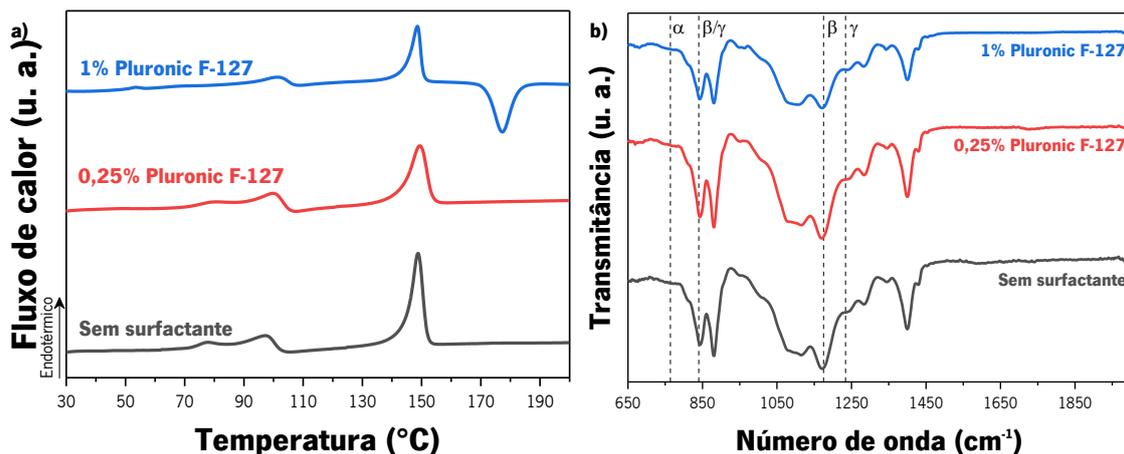
das esferas sintetizadas na presença de 1 % de Pluronic F-127. Além disso, é possível verificar que com esse aumento de tamanho, existe uma crescente disformidade e rugosidade das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas. Deste modo, foi possível verificar que a adição de surfactante tem um efeito prejudicial na formação de partículas com morfologia esférica e homogênea. Além disso, às maiores concentrações foi observada a formação de uma maior quantidade de espuma, mais difícil de eliminar durante as lavagens. Esse excesso de surfactante poderá ter tido um papel nos tamanhos mais elevados obtidos na análise por DLS às concentrações de surfactante a partir dos 0,5 % por raio hidrodinâmico superior. Na tabela 4.4 encontram-se os valores de PDI correspondentes a este parâmetro.

**Tabela 4.4.** Índices de polidispersão obtidos por DLS das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL<sup>-1</sup> de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração do surfactante Pluronic F-127: 0, 0,05, 0,15, 0,25, 0,5, 0,75 e 1% m/v.

<b>Concentração de Pluronic F-127 (% m/v)</b>	<b>PDI</b>
<b>Sem Surfactante</b>	0,62 ± 0,06
<b>0,05</b>	0,45 ± 0,08
<b>0,15</b>	0,45 ± 0,09
<b>0,25</b>	0,55 ± 0,09
<b>0,5</b>	0,59 ± 0,04
<b>0,75</b>	0,56 ± 0,03
<b>1</b>	0,46 ± 0,13

Os PDIs resultantes da variação da concentração de surfactante encontram-se novamente dentro dos valores até agora observados. No entanto a variação e valores de PDI elevados por vezes encontrados poderão ser foco de trabalho futuro. Este aspeto pode ser melhorado através da afinação da lavagem e recuperação das partículas, particularmente através de uma última centrifugação mais vigorosa que permita uma melhor separação destes agregados e consequentemente uma menor polidispersão de tamanhos, como já exposto.

As curvas de DSC e espectros de FTIR-ATR resultantes das esferas de P(VDF-TrFE) sintetizadas sem e com 0,25 e 1 % de surfactante Pluronic F-127, como representativas das restantes amostras, encontram-se nas figuras 4.17a e 4.17b, respetivamente.



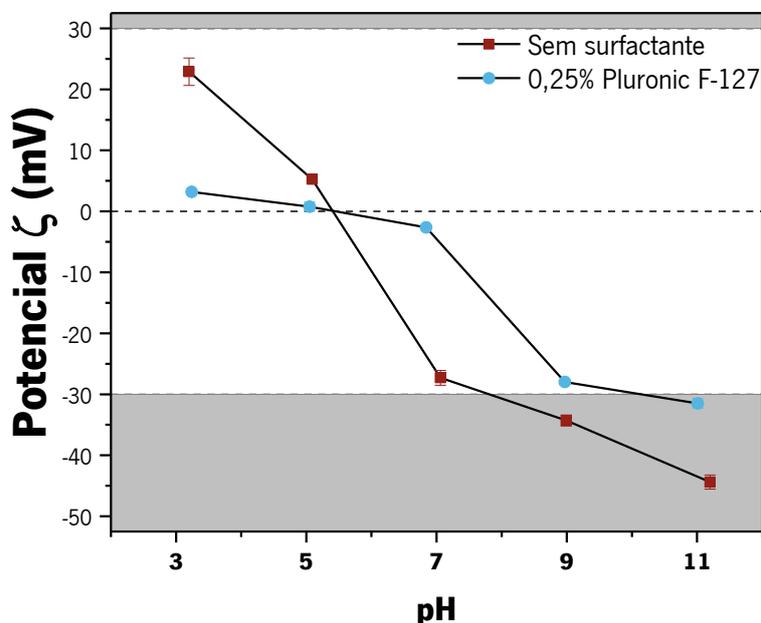
**Figura 4.17. a)** Curvas de DSC e **b)** espectros FTIR-ATR das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de 5 mg.mL<sup>-1</sup> de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, variando a concentração do surfactante Pluronic F-127: 0, 0,25 e 1 % m/v.

A curva de DSC da amostra de esferas de P(VDF-TrFE) sintetizadas com 1 % de Pluronic F-127 apresenta, além dos picos típicos aos 101 e 149 °C, um pico exotérmico aos 180 °C que não está presente nas amostras sem surfactante e com 0,25 % do mesmo surfactante. A mesma amostra foi novamente sintetizada e analisada por DSC, tendo-se obtido a mesma curva. Embora se pudesse associar este pico ao aumento da concentração do surfactante, não foi encontrada na literatura qualquer indicação que este comportamento seja consequência direta da presença do mesmo, tendo o surfactante associado um pico endotérmico a cerca de 57 °C que, uma vez mais, não é encontrado dada a concentração usada ser muito baixa [139]. Mais estudos deverão ser realizados no futuro de forma a entender e justificar o aparecimento deste pico. Relativamente aos valores de cristalinidades, estes mantêm-se praticamente inalterados com o aumento da concentração de surfactante, apresentando valores de 29, 27 e 26 % sem surfactante e com 0,25 e 1 % de surfactante Pluronic F-127, respetivamente.

Relativamente aos espectros de FTIR-ATR, os mesmos não mostram alterações da fase cristalina com o aumento da concentração de surfactante, sendo de novo mostrado pela presença de picos a 840 e 1175 cm<sup>-1</sup> e sua ausência aos 764 e 1234 cm<sup>-1</sup> que as esferas se encontram unicamente na fase β. Não foi igualmente observado um surgimento de novos modos vibracionais (na gama analisada).

Considerando os resultados obtidos neste estudo e de forma então a verificar se a adição de surfactante permite aumentar a estabilidade das esferas de P(VDF-TrFE) em solução, foi

determinado o potencial  $\zeta$  a vários pH. As amostras analisadas foram as sintetizadas sem surfactante e com uma concentração de surfactante Pluronic F-127 de 0,25 %. Os resultados encontram-se na figura 4.18.



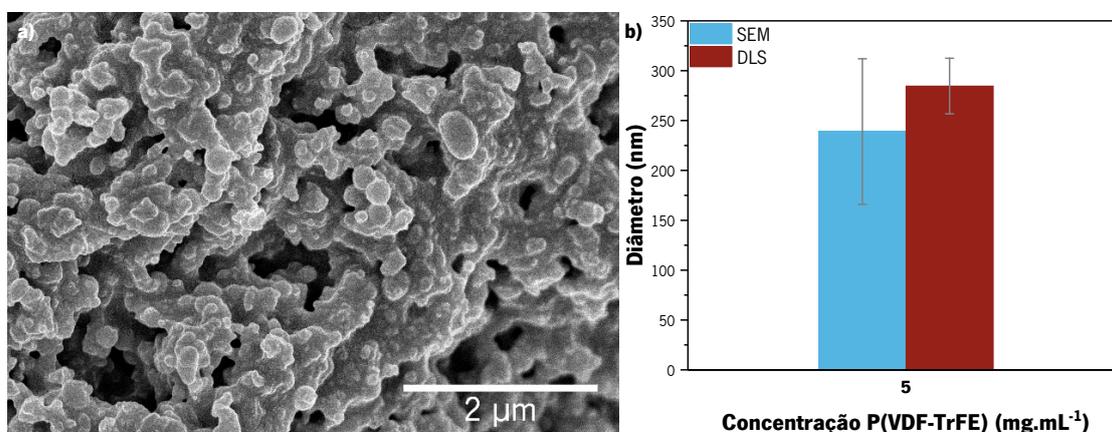
**Figura 4.18.** Potencial zeta ( $\zeta$ ) das esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação simples, em condições de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água, sem surfactante e com uma concentração do surfactante Pluronic F-127 de 0,25 % m/v.

Considera-se usualmente que as dispersões coloidais são estáveis quando o potencial  $\zeta$  atinge valores iguais ou superiores a  $|30| \text{ mV}$ . Os resultados demonstram que a adição de surfactante não tem qualquer efeito benéfico no aumento da estabilidade das esferas de P(VDF-TrFE) em solução. De facto, enquanto sem surfactante as esferas apresentam-se estáveis para pH igual ou superiores a 7,8, para a amostra com surfactante este valor aumenta para um pH de 10,1. O ponto isoelétrico encontra-se para ambas a um pH de 5,4. Tendo em conta este resultado, juntamente com a morfologia das esferas obtidas, é possível afirmar que na síntese de esferas de P(VDF-TrFE) por nanoprecipitação simples, a adição do surfactante durante o processo (considerando os utilizados no âmbito deste trabalho) não se mostrou benéfico para a obtenção de morfologias esféricas, homogéneas e estáveis em solução. Num trabalho futuro poderá ser testado a adição de surfactante após a síntese das esferas e como pós-tratamento das mesmas.

## 4.2 Síntese de esferas de P(VDF-TrFE) pelo método de nanoprecipitação por agitação magnética

Sendo o método anterior inviável para o revestimento de NPMs com P(VDF-TrFE), dado que as partículas precipitariam para o fundo do tubo rapidamente antes de ocorrer a precipitação do copolímero, foi proposta a avaliação da viabilidade de um método de nanoprecipitação por agitação magnética para a síntese de esferas de P(VDF-TrFE). O sucesso ou insucesso deste permitiu assim avaliar mais precisamente se a nanoprecipitação por agitação seria indicada para testar o revestimento das NPMs. A síntese de esferas de P(VDF-TrFE) foi realizada fixando os parâmetros de processamento nos resultados obtidos através do método de nanoprecipitação simples. Consequentemente, a síntese foi efetuada em condições de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de P(VDF-TrFE) em acetona com um NS constituído por 90 % de metanol e 10 % de água.

Na figura 4.19a pode ser observada uma imagem SEM representativa de esferas de P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação por agitação magnética. Por sua vez, na figura 4.19b estão apresentadas as medições dos tamanhos obtidos por SEM e DLS.



**Figura 4.19.** Esferas de P(VDF-TrFE) sintetizadas pelo método de nanoprecipitação por agitação magnética, em condições de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de copolímero, acetona como solvente e uma solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água: **a)** imagem de SEM e **b)** respectivos diâmetros obtidos por análise SEM e DLS.

Os resultados obtidos demonstram que o método de nanoprecipitação por agitação magnética é efetivo na formação de esferas de P(VDF-TrFE). Embora a imagem SEM aparente apresentar fusão/agregação entre esferas, os resultados de DLS (onde a amostra é submetida a banho de ultrassons) contradizem este resultado, tendo-se obtido um diâmetro médio de  $285 \pm 28 \text{ nm}$ . Este valor é ligeiramente superior aos medido por SEM ( $239 \pm 73 \text{ nm}$ ), onde neste

último caso foi medido apenas o diâmetro das esferas mais bem definidas, o que poderá dever-se à detecção do diâmetro hidrodinâmico. É de realçar que este diâmetro é consideravelmente inferior ao obtido na nanoprecipitação simples ( $413 \pm 194$  nm). O PDI desta amostra foi também relativamente baixo, com valor de  $0,26 \pm 0,03$ , contra os  $0,62 \pm 0,06$  obtidos no método de nanoprecipitação simples. Deste modo, é possível concluir que a agitação tem um efeito benéfico na produção de esferas de P(VDF-TrFE) com menores tamanhos e com menor polidispersão.

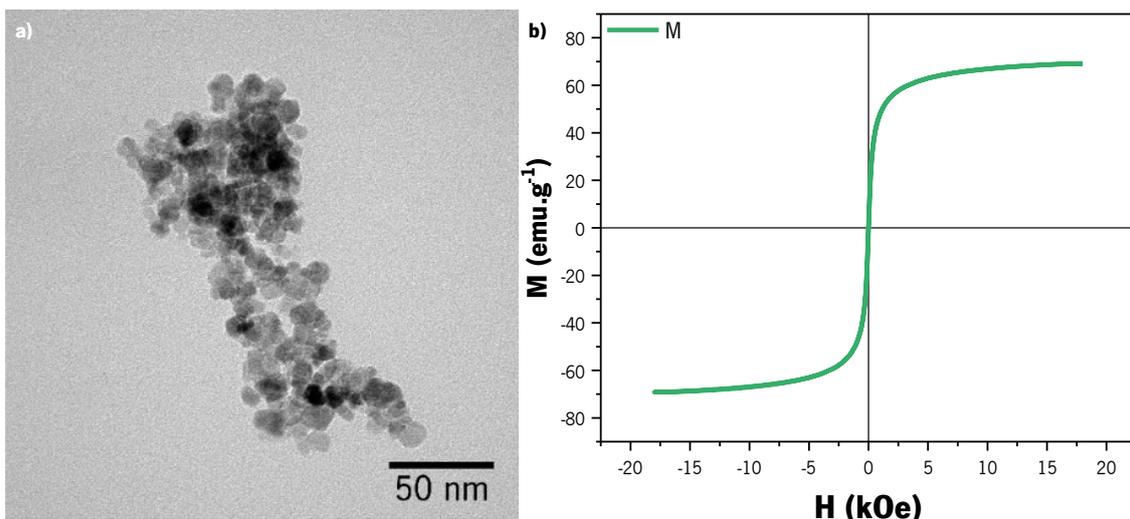
Relativamente às propriedades físico-químicas, não foram realizadas análises de DSC e FTIR-ATR por ser expectável que não hajam alterações destas propriedades em comparação com o método anterior, dado que a única alteração ocorre a nível da cinética da reação, mantendo-se todas as outras variáveis em termos de concentrações, volumes e temperatura inalteradas. Independentemente disto, o sucesso na síntese permitiu augurar alguma possibilidade de sucesso no revestimento de NPMs com o copolímero.

### **4.3 Síntese de nanopartículas magnéticas e revestimento com poli(fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno)**

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na síntese das NPMs de óxido de ferro, assim como do revestimento das mesmas com P(VDF-TrFE) por agitação mecânica. Serão avaliadas a morfologia, propriedades magnéticas e físico-químicas as mesmas.

#### **4.3.1 Síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro**

A figura 4.20a ilustra as imagens de TEM das NPMs de óxido de ferro obtidas através do método de coprecipitação. Por sua vez, a figura 4.20b apresenta a curva de magnetização obtida por VSM.



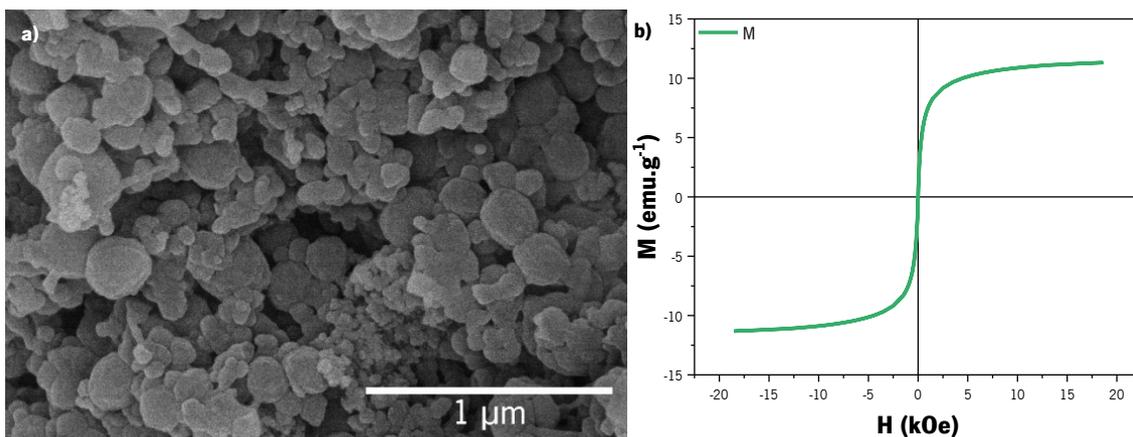
**Figura 4.20.** Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro sintetizadas pelo método de coprecipitação: **a)** imagem de TEM e **b)** curva de magnetização.

As NPMs obtidas apresentam uma boa esfericidade e um diâmetro médio de  $8 \pm 2$  nm. Estes tamanhos reduzidos, aliados à simplicidade, rapidez e reprodutibilidade do método de síntese, tornam-no ideal para este trabalho. A magnetização de saturação (*magnetization saturation*,  $M_s$ ) é elevada, de  $|69|$  emu.g<sup>-1</sup>, sendo verificando um comportamento superparamagnético. Este valor está de acordo com o encontrado na literatura [142]. A cor das NPMs obtidas (um castanho bastante escuro) indicam que as NPMs se deverão encontrar na forma de magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), o que também foi comprovado por difração de raios X (*X-ray diffraction*, XRD) num estudo previamente publicado [122].

#### **4.3.2 Revestimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com poli(fluoreto de vinilideno-co-trifluoretileno)**

Como exposto anteriormente 3 métodos distintos foram avaliados no revestimento de NPMs de óxido de ferro com P(VDF-TrFE) pelo método de nanoprecipitação por agitação mecânica.

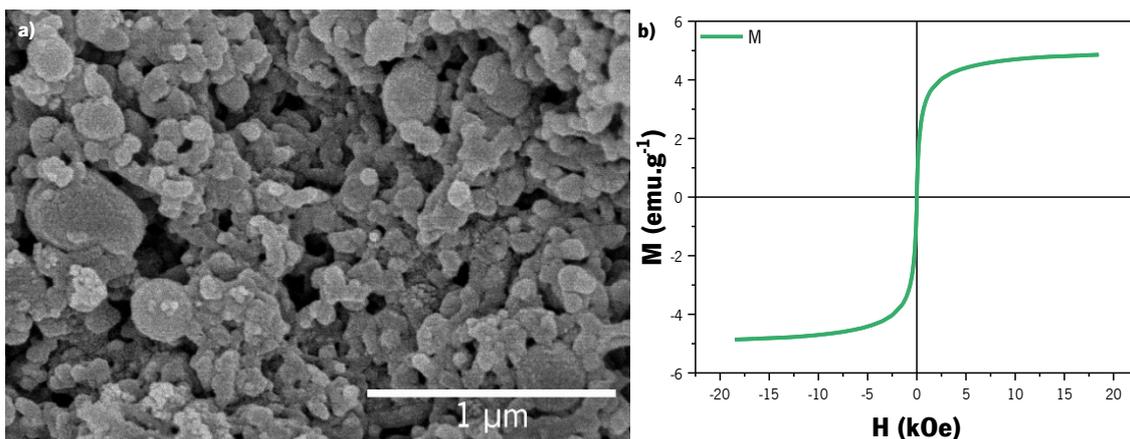
Na figura 4.21a encontra-se uma imagem de SEM representativa do revestimento de NPMs de óxido de ferro com P(VDF-TrFE), obtidas com uma concentração de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de copolímero e  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$  de NPMs suspensas no NS (90 % de metanol em água). Na figura 4.21b é apresentada a respetiva curva de magnetização.



**Figura 4.21.** NPMs de óxido de ferro revestidas com P(VDF-TrFE) com uma concentração de copolímero de 5 mg.mL<sup>-1</sup> dissolvido no solvente (acetona) e as NPMs suspensas na solução não solvente (constituída por 90 % de metanol em água) numa concentração de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>: **a)** imagem de SEM e **b)** curva de magnetização.

Na imagem de SEM é possível verificar a formação de esferas à semelhança do que já foi obtido em sínteses de P(VDF-TrFE) anteriores. É possível também ver esferas de um tamanho muito mais reduzido, que poderão ser NPMs ou pequenos agregados das mesmas que não tenham sido revestidas. A curva de magnetização mostra uma  $M_s$  de  $|11|$  emu.g<sup>-1</sup>, mantendo-se o comportamento superparamagnético. Este valor contrasta com o de  $|69|$  emu.g<sup>-1</sup> obtido nas NPMs isoladas. Esta forte redução da  $M_s$  poderá indicar que as NPMs estejam de facto pelo menos em parte revestidas, sendo esse mesmo revestimento o que provoca tal redução da  $M_s$ . É também de salientar que não houve qualquer dificuldade na separação das esferas durante a sua lavagem, apresentado uma boa resposta ao íman usado para esse efeito. As esferas de maior tamanho apresentam um diâmetro médio de  $153 \pm 64$  nm, enquanto que as menores se situam nos  $25 \pm 1$  nm.

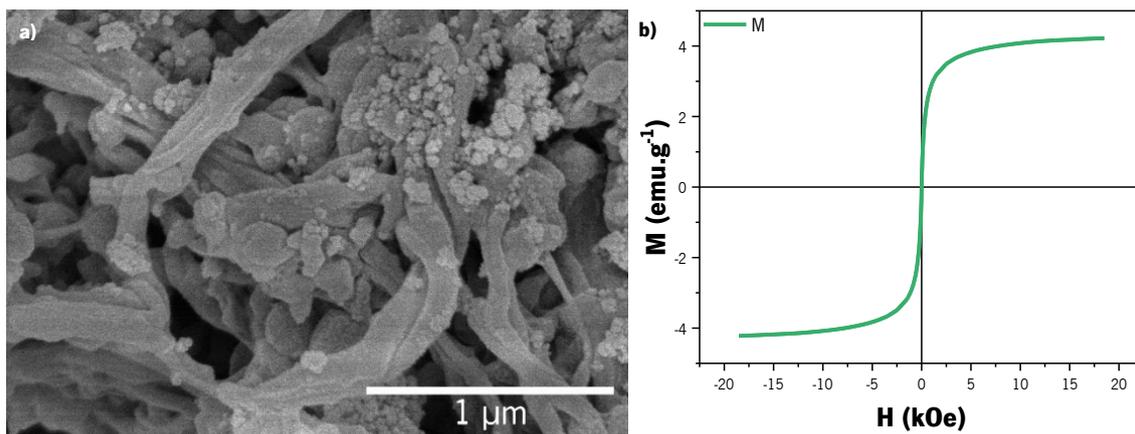
Numa segunda tentativa de revestimento, as NPMs foram suspensas no solvente, opostamente ao teste anterior onde as mesmas foram suspensas no NS. A figura 4.22a apresenta uma imagem de SEM representativa da amostra obtida enquanto a figura 4.22b representa a respetiva curva de magnetização.



**Figura 4.22.** NPMs de óxido de ferro revestidas com P(VDF-TrFE) com uma concentração de copolímero de  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e NPMs numa concentração de  $0,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respetivamente dissolvido e suspensas no solvente (acetona). Solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água: **a)** imagem de SEM e **b)** curva de magnetização.

A imagem de SEM obtida é bastante semelhante à anterior. Os diâmetros das esferas têm uma média de  $148 \pm 107 \text{ nm}$ . O desvio elevado é sobretudo causado pela presença esporádica de algumas esferas de tamanhos mais elevados. As de tamanhos inferiores rondam os  $16 \pm 1 \text{ nm}$ . No entanto aparenta haver uma menor presença dos possíveis agregados de NPMs não revestidas, o que poderá significar um melhor revestimento derivado de um aumento de eficiência na dispersão de esferas em simultâneo com a dissolução do polímero. Na amostra anterior, o período da passagem do NS (onde as NPMs estavam dispersas) do banho de ultrassons para a agitação mecânica, aliado ao facto de a solução polimérica ser adicionada gota a gota, poderá ser suficiente para ocorrer um pouco de precipitação e/ou agregação que faça com que uma menor quantidade de NPMs seja revestida. Com ambos os elementos no solvente (as NPMs e o copolímero) e ao serem adicionados ao NS em simultâneo, os processos que levam ao revestimento poderão ocorrer mais eficientemente. A curva de magnetização parece suportar esta ideia, tendo-se obtido uma  $M_s$  de  $|4,8| \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ . Esta redução, em relação à amostra anterior, pode então também indicar que haja um maior revestimento das NPMs com o copolímero. A amostra continua a apresentar um comportamento superparamagnético.

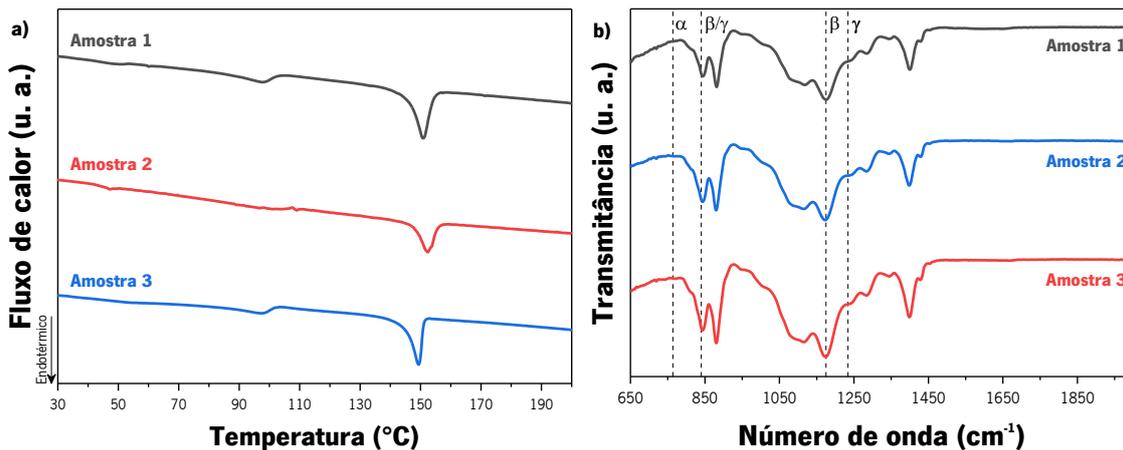
Por último, na figura 4.23a encontra-se uma imagem de SEM resultante do método de revestimento efetuado nas mesmas condições que o teste prévio, mas neste caso com uma concentração de  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de copolímero. Na figura 4.23b encontra-se a curva de magnetização respetiva.



**Figura 4.23.** NPMs de óxido de ferro revestidas com P(VDF-TrFE) com uma concentração de copolímero de 10 mg.mL<sup>-1</sup> e NPMs numa concentração de 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>, respetivamente dissolvido e suspensas no solvente (acetona). Solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água: **a)** imagem de SEM e **b)** curva de magnetização.

A diferença nesta amostra é muito mais evidente, tendo ocorrido uma formação de estruturas fibrosas que poderão ser consequência de uma concentração de copolímero demasiado elevada, algo semelhante ao já discutido no método de nanoprecipitação simples. Efetivamente foi observada experimentalmente alguma agregação do copolímero na forma de fios/fibras durante o procedimento aquando da pipetagem da solução gota a gota. Durante a agitação esta agregação foi dissipando-se, mas poderá ter-se mantido à escala microscópica. Esta concentração será então demasiada elevada tanto para a formação de esferas de P(VDF-TrFE) puras como para o revestimento das NPMs com P(VDF-TrFE) no mesmo tipo de estrutura. As estruturas mais esféricas têm um diâmetro de  $217 \pm 58$  nm, enquanto que os aglomerados mais pequenos  $30 \pm 13$  nm. Mais uma vez a curva de magnetização é congruente com esta ideia. Há uma redução pequena da  $M_s$  para os  $|4,2|$  emu.g<sup>-1</sup>, uma diferença muito pequena em relação à amostra anterior. Esta amostra apresenta igualmente comportamento superparamagnético. É aparente então que poderá estar a ocorrer revestimento das NPMs, mas que estas se encontrem no interior das fibras mostradas na imagem SEM e que a elevada concentração de copolímero seja impeditiva à correta formação de esferas com NPMs no seu interior.

Nas figuras 4.24a e 4.24b encontram-se respetivamente as curvas de DSC e os espetros de FTIR-ATR correspondentes a cada uma das 3 amostras de revestimento apresentadas.



**Figura 4.24. a)** Curvas de DSC e **b)** espectros FTIR-ATR dos testes de revestimento de NPMs de óxido de ferro com P(VDF-TrFE) obtidas pelo método de nanoprecipitação por agitação mecânica, com solução não solvente constituída por 90 % de metanol em água. Amostra 1: 5 mg.mL<sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) dissolvido no solvente e 0,25 mg.mL<sup>-1</sup> suspensas no não solvente; Amostra 2: 5 mg.mL<sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) e 0,6 mg.mL<sup>-1</sup> respetivamente dissolvido e suspensas no solvente; Amostra 3: 10 mg.mL<sup>-1</sup> de P(VDF-TrFE) e 0,6 mg.mL<sup>-1</sup> respetivamente dissolvido e suspensas no solvente.

É possível observar que não ocorre qualquer alteração relativamente à posição dos picos nas curvas de fluxo de calor das esferas de P(VDF-TrFE) sem NPMs, assim como entre as três amostras. Ambos os picos das amostras (numeradas 1, 2 e 3 de acordo com a ordem com que foram apresentadas anteriormente) surgem aproximadamente às mesmas temperaturas já antes observadas, correspondentes ao P(VDF-TrFE), e possuem cristalinidades de 28, 17 e 22 % para as amostras 1, 2 e 3, respetivamente. Na amostra dois, como antes visto, aparenta ter ocorrido um melhor revestimento, que coincide com a menor cristalinidade registada. Tendo em conta estes resultados, o processo de revestimento aparenta afetar ligeiramente a cristalinidade do copolímero.

Nos espectros de FTIR-ATR, os picos a 840 e 1175 cm<sup>-1</sup>, em combinação com a ausência de picos a 764 e 1234 cm<sup>-1</sup>, mostram que todas as amostras se encontram exclusivamente na fase β, não havendo alterações da fase cristalina.



5

Conclusões e  
Perspetivas Futuras

---



## 5 Conclusões

O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de esferas submicrométricas a partir do copolímero P(VDF-TrFE), assim como o revestimento de NPMs com o mesmo copolímero. Este copolímero apresenta uma boa biocompatibilidade e um alto coeficiente piezoelétrico, propriedades determinantes para futuras aplicações na área da biomedicina. Para este efeito foi, em primeiro lugar, utilizado um método de nanoprecipitação realizado em tubo de Falcon, denominado de nanoprecipitação simples. O desenvolvimento das esferas implicou o estudo de diversas variáveis, nomeadamente a concentração do copolímero, múltiplos solventes, constituição do NS, diferentes surfactantes e a sua concentração. Foi realizada uma avaliação sucessiva do efeito de cada parâmetro em relação à morfologia, diâmetro e propriedades físico-químicas das esferas sintetizadas. Concluiu-se que uma concentração igual ou superior a  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  é excessiva para a formação de esferas, ocorrendo forte agregação do copolímero. No extremo oposto, concentrações iguais ou inferiores a  $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  resultam numa quantidade em peso seco de esferas muito reduzida. Estas diferentes concentrações resultaram em esferas de diâmetros médios de  $373 \pm 160$ ,  $413 \pm 194$  e  $645 \pm 225 \text{ nm}$  para 2,5, 5 e  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ , respetivamente, com as concentrações maiores a mostrar algumas esferas mais alongadas a par de outras mais esféricas. No que diz respeito aos solventes, o THF e dioxalano mostraram-se inadequados na formação de esferas de P(VDF-TrFE), contrariamente ao DMF, onde foram obtidas esferas com sucesso para um NS constituído somente por água, de diâmetro médio  $242 \pm 84 \text{ nm}$ . Já a formação de esferas com acetona como solvente mostrou-se viável a diferentes constituições de NS. A variação da constituição do NS não mostrou alterações particularmente consideráveis excetuando a 100 % de metanol, sob o qual se formaram esferas de diâmetros médios bastante inferiores, de  $219 \pm 73 \text{ nm}$ , enquanto que as outras constituições de NS variaram entre os  $413 \pm 194$  e os  $510 \pm 231 \text{ nm}$ . Apesar de mais pequenas, as esferas sintetizadas a 100 % de metanol possuem uma forma mais irregular e a sua formação aparenta ser um pouco menos estável. Foi ainda testada a síntese na presença de três diferentes surfactantes: Pluronic F-127, CTAB e SDS. Os diâmetros médios das esferas sintetizadas com estes surfactantes foi ligeiramente superior (entre os  $640 \pm 361$  e os  $668 \pm 291 \text{ nm}$ ) ao das amostras obtidas na sua ausência ( $413 \pm 194 \text{ nm}$ ) e apresentam, igualmente, uma superfície mais rugosa. Devido a uma menor quantidade de espuma gerada na síntese (que torna a lavagem e recuperação das esferas mais acessível) e a diâmetros ligeiramente inferiores, concluiu-se que o uso do surfactante Pluronic F-127 seria mais indicado. Não obstante, futuros estudos e aplicações poderão servir-se de outros

surfactantes, com diferentes cargas, dado o Pluronic F-127 ser não iônico, o CTAB catiónico e o SDS aniônico. Por último, testaram-se diferentes concentrações do surfactante selecionado, onde foi observado que concentrações acima de 0,25 % m/v induzem uma disformidade e aumento tendencial dos diâmetros médios: as esferas a 0,25 % têm um diâmetro médio de  $594 \pm 341$  nm enquanto que a 1% encontram-se nos  $663 \pm 431$  nm. Foi ainda avaliada a estabilidade coloidal na presença e ausência deste surfactante, tendo-se verificado uma maior estabilidade na ausência do mesmo: um potencial  $\zeta$  abaixo dos -30 mV dá-se a pH acima de 7,8 para as esferas sem surfactante, enquanto que para as esferas com surfactante apenas acima dos 10,1. Um trabalho futuro poderá assim passar pela avaliação do potencial  $\zeta$  de diferentes surfactantes de forma a obter uma maior estabilidade coloidal ou até mesmo proceder ao revestimento com surfactante num passo posterior a síntese. Ao longo de todos os parâmetros enumerados foram avaliadas as suas propriedades físico-químicas por DSC e FTIR-ATR, que tornaram evidente que a variação dos parâmetros não induziu alterações relevantes na cristalinidade das esferas, com um valor médio aproximado de 26%, e que o copolímero se manteve exclusivamente na fase  $\beta$  ao longo de todo o estudo. Posto isto, concluiu-se que, tendo em conta os critérios e parâmetros considerados, as condições mais favoráveis para a síntese de esferas de P(VDF-TrFE) com boa esfericidade recorrendo ao método de nanoprecipitação simples são de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de concentração de P(VDF-TrFE), acetona como solvente e NS constituído por 90 % de metanol em água, proporcionando esferas com um diâmetro médio de  $413 \pm 194$  nm. Contudo, de acordo com o pretendido, estes parâmetros podem ser ajustados de forma a obter esferas de menores dimensões, onde a esfericidade das mesmas não seja um fator preponderante para o sucesso da aplicação. Foi, para além deste estudo, comprovada a viabilidade do método de nanoprecipitação por agitação magnética para a formação de esferas puras de P(VDF-TrFE) sob condições idênticas às últimas mencionadas. Estas esferas apresentaram um diâmetro médio de  $239 \pm 73$  nm.

Os testes de revestimento de NPMs de óxido de ferro pelo método de nanoprecipitação por agitação magnética foram bem-sucedidos, como é possível verificar pelas imagens SEM e curvas de magnetização. Estas últimas mostraram uma redução da  $M_s$ , de  $|69| \text{ emu.g}^{-1}$  para as NPMs de óxido de ferro puras para valores entre  $|4|$  a  $|11| \text{ emu.g}^{-1}$  das NPMs revestidas. Estes valores mais reduzidos poderão ser consequência do revestimento; ainda assim, a manipulação magnética com um íman mostrou-se de fácil execução. Através destas análises concluiu-se que uma concentração de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de P(VDF-TrFE) e de  $0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$  de NPMs, respetivamente dissolvido e dispersadas em acetona como solvente e uma solução NS de 90 % de metanol em

água se aproximam das condições ideais para este tipo de síntese, considerando os parâmetros estudados. As esferas resultantes destas condições possuem um diâmetro médio de  $148 \pm 107$  nm.

Considerando os resultados obtidos, é possível afirmar que as estruturas desenvolvidas, que tanto quanto foi possível apurar são de pouca ocorrência na literatura (especialmente no caso do revestimento de NPMs com P(VDF-TrFE)), foram sintetizadas com bastante sucesso. Consequentemente, as esferas sintetizadas mostram-se extremamente promissoras, possuindo fortes valências para aplicação em diferentes áreas da biomedicina, tais como a regeneração de tecido ósseo e cardiovascular, a sua integração noutros meios como filmes ou hidrogéis de maneira a criar compósitos multifuncionais, assim como o uso das NPMs revestidas em terapêuticas como a hipertermia.

## 5.1 Perspetivas futuras

Esta dissertação estabelece uma boa base para trabalho de investigação e desenvolvimento futuro, tanto em termos de afinação das sínteses, das esferas obtidas, assim como da sua aplicabilidade. Propõe-se assim como trabalho futuro:

- Estudo e otimização adicional das condições de síntese, particularmente no uso de concentração de P(VDF-TrFE) entre os 2,5 e os 5 mg.mL<sup>-1</sup> e de constituições de NS entre os 90 e 100 % de metanol em água de modo a reduzir o tamanho das esferas;
- Escalonamento dos métodos de síntese de forma a produzir maior quantidade de esferas num só processo;
- Diminuição da distribuição de diâmetros através da otimização dos processos de centrifugação e lavagem;
- Melhoramento da estabilidade coloidal através da avaliação de amostras sintetizadas na presença de diferentes surfactantes, ou posteriormente num passo adicional;
- Integração de fármacos ou outros agentes nas esferas;
- Testes adicionais relativos ao revestimento de NPMs com P(VDF-TrFE) com aperfeiçoamento dos parâmetros de síntese, assim como análises mais extensivas como XRD e TEM de forma a comprovar com absoluta segurança o sucesso do revestimento;

- Avaliar a biocompatibilidade das estruturas desenvolvidas;
- Avaliar a viabilidade dos métodos estudados para a síntese de esferas baseada noutros polímeros de interesse biomédico;
- Avaliar a potencialidade das esferas desenvolvidas em áreas distintas da biomedicina.

## Referências bibliográficas

1. Hulla JE, Sahu SC, Hayes AW. *Nanotechnology: History and future*. Human & Experimental Toxicology. 2015;34(12):1318-21.
2. Krukemeyer M, Krenn V, Huebner F, Wagner W, Resch R. *History and possible uses of nanomedicine based on nanoparticles and nanotechnological progress*. Journal of Nanomedicine & Nanotechnology. 2015;6(6):1.
3. Kreuter J. *Nanoparticles—a historical perspective*. International Journal of Pharmaceutics. 2007;331(1):1-10.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2018*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2018;68(1):7-30.
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2018;0(0).
6. Skeel RT, Khleif SN. *Handbook of cancer chemotherapy*. Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
7. Campbell NA, Reece J, Taylor R, Simon E. *Biology: Concepts and Connections*. 6th ed: Benjamin Cummings; 2008. 928 p.
8. Nasir A, Kausar A, Younus A. *A Review on Preparation, Properties and Applications of Polymeric Nanoparticle-Based Materials*. Polymer-Plastics Technology and Engineering. 2015;54(4):325-41.
9. Rao JP, Geckeler KE. *Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters*. Progress in Polymer Science. 2011;36(7):887-913.
10. El-Say KM, El-Sawy HS. *Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics. 2017;528(1):675-91.
11. Sobolev K, Ferrada Gutierrez M. *How Nanotechnology Can Change the Concrete World*2014. 113-6 p.
12. Paz Y, Luo Z, Rabenberg L, Heller A. *Photooxidative self-cleaning transparent titanium dioxide films on glass*. Journal of Materials Research. 1995;10(11):2842-8.
13. Kontos AI, Kontos AG, Tsoukleris DS, Vlachos GD, Falaras P. *Superhydrophilicity and photocatalytic property of nanocrystalline titania sol-gel films*. Thin Solid Films. 2007;515(18):7370-5.
14. Ahmed TA, El-Say KM. *Development of alginate-reinforced chitosan nanoparticles utilizing W/O nanoemulsification/internal crosslinking technique for transdermal delivery of rabeprazole*. Life Sciences. 2014;110(1):35-43.
15. Li Y-L, Zhu L, Liu Z, Cheng R, Meng F, Cui J-H, et al. *Reversibly Stabilized Multifunctional Dextran Nanoparticles Efficiently Deliver Doxorubicin into the Nuclei of Cancer Cells*. Angewandte Chemie. 2009;121(52):10098-102.
16. Sionkowska A. *Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review*. Progress in Polymer Science. 2011;36(9):1254-76.
17. Musumeci T, Ventura CA, Giannone I, Ruozi B, Montenegro L, Pignatello R, et al. *PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel*. International Journal of Pharmaceutics. 2006;325(1):172-9.
18. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. *PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications*. Journal of Controlled Release. 2012;161(2):505-22.

19. Laffleur F, Hintzen F, Shahnaz G, Rahmat D, Leithner K, Bernkop-Schnürch A. *Development and in vitro evaluation of slippery nanoparticles for enhanced diffusion through native mucus*. *Nanomedicine*. 2013;9(3):387-96.
20. Ribeiro C, Sencadas V, Correia DM, Lanceros-Méndez S. *Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;136:46-55.
21. Harrison JS, Ounaies Z. *Piezoelectric Polymers*. In: Mark HF, editor. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*: John Wiley & Sons, Inc.; 2002.
22. Ribeiro C, Costa CM, Correia DM, Nunes-Pereira J, Oliveira J, Martins P, et al. *Electroactive poly(vinylidene fluoride)-based structures for advanced applications*. *Nature Protocols*. 2018;13:681.
23. Correia DM, Gonçalves R, Ribeiro C, Sencadas V, Botelho G, Ribelles JLG, et al. *Electrosprayed poly(vinylidene fluoride) microparticles for tissue engineering applications*. *RSC Advances*. 2014;4(62):33013-21.
24. Lu A-H, Salabas EL, Schüth F. *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application*. *Angewandte Chemie*. 2007;46(8):1222-44.
25. Mornet S, Vasseur S, Grasset F, Duguet E. *Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy*. *Journal of Materials Chemistry*. 2004;14(14):2161-75.
26. Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. *Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications*. *Chemical Reviews*. 2012;112(11):5818-78.
27. Berry CC, Curtis ASG. *Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine*. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2003;36(13):R198.
28. Gonçalves R, Martins P, Correia DM, Sencadas V, Vilas JL, León LM, et al. *Development of magnetoelectric CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/poly(vinylidene fluoride) microspheres*. *RSC Advances*. 2015;5(45):35852-7.
29. Schubert S, Delaney J, S. Schubert U. *Nanoprecipitation and Nanoformulation of Polymers: From History to Powerful Possibilities beyond Poly(lactic acid)* 2011. 1581-8 p.
30. Min Y, Akbulut M, Kristiansen KAI, Golan Y, Israelachvili J. *The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly*. *Nanoscience and Technology: Co-Published with Macmillan Publishers Ltd, UK*; 2009. p. 38-49.
31. Teja AS, Koh P-Y. *Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles*. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*. 2009;55(1):22-45.
32. Wang X, Summers CJ, Wang ZL. *Large-Scale Hexagonal-Patterned Growth of Aligned ZnO Nanorods for Nano-optoelectronics and Nanosensor Arrays*. *Nano Letters*. 2004;4(3):423-6.
33. Zhang Q, Chuang KT. *Adsorption of organic pollutants from effluents of a Kraft pulp mill on activated carbon and polymer resin*. *Advances in Environmental Research*. 2001;5(3):251-8.
34. Mallakpour S, Behranvand V. *Polymeric nanoparticles: Recent development in synthesis and application*. *Express Polymer Letters*. 2016;10(11):895-913.
35. Anwunobi A, Emeje M. *Recent applications of natural polymers in nanodrug delivery*. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. 2011;4(002).
36. Kovalenko I, Zdyrko B, Magasinski A, Hertzberg B, Milicev Z, Burtovyy R, et al. *A Major Constituent of Brown Algae for Use in High-Capacity Li-Ion Batteries*. *Science*. 2011.
37. Teixeira LN, Crippa GE, Trabuco AC, Gimenes R, Zaghete MA, Palioto DB, et al. *In vitro biocompatibility of poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/barium titanate composite using cultures of human periodontal ligament fibroblasts and keratinocytes*. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(3):979-89.

38. Kaszuba M, Corbett J, Watson FM, Jones A. *High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques*. Philosophical transactions Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences. 2010;368(1927):4439-51.
39. Banik BL, Fattahi P, Brown JL. *Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine*. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2016;8(2):271-99.
40. Hans ML, Lowman AM. *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. Current Opinion in Solid State and Materials Science. 2002;6(4):319-27.
41. Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, Maincent P, Dellacherie E, Alonso MJ, et al. *Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method*. Journal of Controlled Release. 1998;50(1):31-40.
42. Higuchi T, Yabu H, Shimomura M. *Simple preparation of hemispherical polystyrene particles*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2006;284-285:250-3.
43. Nagavarma B, Yadav HK, Ayaz A, Vasudha L, Shivakumar H. *Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2012;5(3):16-23.
44. Konan YN, Gurny R, Allémann E. *Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics. 2002;233(1):239-52.
45. De Jaeghere F, Allémann E, Leroux J-C, Stevels W, Feijen J, Doelker E, et al. *Formulation and Lyoprotection of Poly(Lactic Acid-Co-Ethylene Oxide) Nanoparticles: Influence on Physical Stability and In Vitro Cell Uptake*. Pharmaceutical Research. 1999;16(6):859-66.
46. Hornig S, Heinze T. *Efficient Approach To Design Stable Water-Dispersible Nanoparticles of Hydrophobic Cellulose Esters*. Biomacromolecules. 2008;9(5):1487-92.
47. Bally F, Garg DK, Serra CA, Hoarau Y, Anton N, Brochon C, et al. *Improved size-tunable preparation of polymeric nanoparticles by microfluidic nanoprecipitation*. Polymer. 2012;53(22):5045-51.
48. Matyjaszewski K, Spanswick J. *Controlled/living radical polymerization*. Materials Today. 2005;8(3):26-33.
49. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. *Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement*. International Journal of Pharmaceutics. 1989;55(1):R1-R4.
50. Miladi K, Sfar S, Fessi H, Elaissari A. *Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications*. In: Vauthier C, Ponchel G, editors. Polymer Nanoparticles for Nanomedicines: A Guide for their Design, Preparation and Development. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 17-53.
51. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. *Polymer-based nanocapsules for drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics. 2010;385(1):113-42.
52. Bilati U, Allémann E, Doelker E. *Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2005;24(1):67-75.
53. Alshamsan A. *Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles*. Saudi Pharmaceutical Journal. 2014;22(3):219-22.
54. Xiao Z, Dong Q, Sharma P, Yuan Y, Mao B, Tian W, et al. *Synthesis and Application of Ferroelectric P(VDF-TrFE) Nanoparticles in Organic Photovoltaic Devices for High Efficiency*. Advanced Energy Materials. 2013;3(12):1581-8.
55. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Fessi H, Doelker E. *Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers*. Drug Development and Industrial Pharmacy. 1998;24(12):1113-28.

56. Vitale SA, Katz JL. *Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid–Liquid Nucleation: “The Ouzo Effect”*. Langmuir. 2003;19(10):4105-10.
57. Lepeltier E, Bourgaux C, Couvreur P. *Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2014;71:86-97.
58. Danhier F, Feron O, Préat V. *To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery*. Journal of Controlled Release. 2010;148(2):135-46.
59. Zhao S, Tan S, Guo Y, Huang J, Chu M, Liu H, et al. *pH-Sensitive Docetaxel-Loaded  $d\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate–Poly( $\beta$ -amino ester) Copolymer Nanoparticles for Overcoming Multidrug Resistance*. Biomacromolecules. 2013;14(8):2636-46.
60. Shenoy D, Little S, Langer R, Amiji M. *Poly(Ethylene Oxide)-Modified Poly( $\beta$ -Amino Ester) Nanoparticles as a pH-Sensitive System for Tumor-Targeted Delivery of Hydrophobic Drugs: Part 2. In Vivo Distribution and Tumor Localization Studies*. Pharmaceutical Research. 2005;22(12):2107-14.
61. Fang J, Nakamura H, Maeda H. *The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2011;63(3):136-51.
62. Zhang C, Wan X, Zheng X, Shao X, Liu Q, Zhang Q, et al. *Dual-functional nanoparticles targeting amyloid plaques in the brains of Alzheimer's disease mice*. Biomaterials. 2014;35(1):456-65.
63. Chan JM, Rhee J-W, Drum CL, Bronson RT, Golomb G, Langer R, et al. *In vivo prevention of arterial restenosis with paclitaxel-encapsulated targeted lipid–polymeric nanoparticles*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108(48):19347-52.
64. Chan JM, Zhang L, Yuet KP, Liao G, Rhee J-W, Langer R, et al. *PLGA–lecithin–PEG core–shell nanoparticles for controlled drug delivery*. Biomaterials. 2009;30(8):1627-34.
65. Ortega-Oller I, Padiál-Molina M, Galindo-Moreno P, O'Valle F, Jódar-Reyes AB, Peula-García JM. *Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles*. BioMed Research International. 2015;2015:18.
66. Roohani-Esfahani S-I, Nouri-Khorasani S, Lu Z, Appleyard R, Zreiqat H. *The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite–PCL composites*. Biomaterials. 2010;31(21):5498-509.
67. Zhang W, Wang J, Gao P, Tan S, Zhu W, Zhang Z. *Synthesis of poly(vinylidene fluoride–trifluoroethylene) via a controlled silyl radical reduction of poly(vinylidene fluoride–chlorotrifluoroethylene)*. Journal of Materials Chemistry C. 2017;5(26):6433-41.
68. Ameduri B. *From Vinylidene Fluoride (VDF) to the Applications of VDF-Containing Polymers and Copolymers: Recent Developments and Future Trends*. Chemical Reviews. 2009;109(12):6632-86.
69. Lovinger AJ. *Poly (vinylidene fluoride)*. Developments in crystalline polymers—1: Springer; 1982. p. 195-273.
70. Liu F, Hashim NA, Liu Y, Abed MRM, Li K. *Progress in the production and modification of PVDF membranes*. Journal of Membrane Science. 2011;375(1):1-27.
71. Salimi A, Yousefi AA. *Analysis Method: FTIR studies of  $\beta$ -phase crystal formation in stretched PVDF films*. Polymer Testing. 2003;22(6):699-704.
72. Wang X, Sun F, Yin G, Wang Y, Liu B, Dong M. *Tactile-Sensing Based on Flexible PVDF Nanofibers via Electrospinning: A Review*. Sensors (Basel, Switzerland). 2018;18(2):330.
73. Wang T, Farajollahi M, Choi YS, Lin I-T, Marshall JE, Thompson NM, et al. *Electroactive polymers for sensing*. Interface Focus. 2016;6(4).
74. Ducrot P-H, Dufour I, Ayela C. *Optimization Of PVDF-TrFE Processing Conditions For The Fabrication Of Organic MEMS Resonators*. Scientific Reports. 2016;6:19426.

75. Harvey JA. *Smart Materials*. In: Kutz M, editor. *Handbook of Materials Selection* 2007.
76. Jaffe B, Cook WR, Jaffe H. *Chapter I - Historical Introduction*. In: Jaffe B, Cook WR, Jaffe H, editors. *Piezoelectric Ceramics*: Academic Press; 1971. p. 1-5.
77. Kawai H. *The Piezoelectricity of Poly (vinylidene Fluoride)*. *Japanese Journal of Applied Physics*. 1969;8(7):975.
78. Dahiya RS, Valle M. *Appendix A: Fundamentals of Piezoelectricity*. *Robotic Tactile Sensing*. 1 ed: Springer Netherlands; 2013. p. 195-245.
79. Bowen CR, Taylor J, LeBoulbar E, Zabek D, Chauhan A, Vaish R. *Pyroelectric materials and devices for energy harvesting applications*. *Energy & Environmental Science*. 2014;7(12):3836-56.
80. Bauer S, Ploss B. *A method for the measurement of the thermal, dielectric, and pyroelectric properties of thin pyroelectric films and their applications for integrated heat sensors*. *Journal of Applied Physics*. 1990;68(12):6361-7.
81. Kang SJ, Park YJ, Bae I, Kim KJ, Kim H-C, Bauer S, et al. *Printable Ferroelectric PVDF/PMMA Blend Films with Ultralow Roughness for Low Voltage Non-Volatile Polymer Memory*. *Advanced Functional Materials*. 2009;19(17):2812-8.
82. Ueberschlag P. *PVDF piezoelectric polymer*. *Sensor Review*. 2001;21(2):118-26.
83. Hidaka T, Minamide H, Ito H, Nishizawa J, Tamura K, Ichikawa S. *Ferroelectric PVDF cladding terahertz waveguide*. *Journal of Lightwave Technology*. 2005;23(8):2469-73.
84. Park YJ, Kang SJ, Lotz B, Brinkmann M, Thierry A, Kim KJ, et al. *Ordered Ferroelectric PVDF-TrFE Thin Films by High Throughput Epitaxy for Nonvolatile Polymer Memory*. *Macromolecules*. 2008;41(22):8648-54.
85. Jia N, He Q, Sun J, Xia G, Song R. *Crystallization behavior and electroactive properties of PVDF, P(VDF-TrFE) and their blend films*. *Polymer Testing*. 2017;57:302-6.
86. Seidel SM, Jeschke S, Vettikuzha P, Wiemhöfer HD. *PVDF-HFP/ether-modified polysiloxane membranes obtained via airbrush spraying as active separators for application in lithium ion batteries*. *Chemical Communications*. 2015;51(60):12048-51.
87. Ma Y, Tong W, Wang W, An Q, Zhang Y. *Montmorillonite/PVDF-HFP-based energy conversion and storage films with enhanced piezoelectric and dielectric properties*. *Composites Science and Technology*. 2018;168:397-403.
88. Barbosa JC, Dias JP, Lanceros-Méndez S, Costa CM. *Recent Advances in Poly(vinylidene fluoride) and Its Copolymers for Lithium-Ion Battery Separators*. *Membranes*. 2018;8(3):45.
89. Lee H, Alcoutlabi M, Watson JV, Zhang X. *Electrospun nanofiber-coated separator membranes for lithium-ion rechargeable batteries*. *Journal of Applied Polymer Science*. 2013;129(4):1939-51.
90. Wang W, Chen L. *"Smart" membrane materials: Preparation and characterization of PVDF-g-PNIPAAm graft copolymer*. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007;104(3):1482-6.
91. Chang C, Tran VH, Wang J, Fuh Y-K, Lin L. *Direct-Write Piezoelectric Polymeric Nanogenerator with High Energy Conversion Efficiency*. *Nano Letters*. 2010;10(2):726-31.
92. Li C, Wu P, Lee S, Gorton A, Schulz MJ, Ahn CH. *Flexible Dome and Bump Shape Piezoelectric Tactile Sensors Using PVDF-TrFE Copolymer*. *Journal of Microelectromechanical Systems*. 2008;17(2):334-41.
93. Shirinov AV, Schomburg WK. *Pressure sensor from a PVDF film*. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2008;142(1):48-55.
94. Granstrom J, Feenstra J, Sodano HA, Farinholt K. *Energy harvesting from a backpack instrumented with piezoelectric shoulder straps*. *Smart Materials and Structures*. 2007;16(5):1810.

95. Salata OV. *Tools of Nanotechnology: Electrospray*. Current Nanoscience. 2005;1(1):25-33.
96. Ho D, Sun X, Sun S. *Monodisperse Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications*. Accounts of Chemical Research. 2011;44(10):875-82.
97. Tran N, Webster TJ. *Magnetic nanoparticles: biomedical applications and challenges*. Journal of Materials Chemistry. 2010;20(40):8760-7.
98. Liu WT. *Nanoparticles and their biological and environmental applications*. Journal of bioscience and bioengineering. 2006;102(1):1-7.
99. Xu J, Yang H, Fu W, Du K, Sui Y, Chen J, et al. *Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by sol-gel method*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 2007;309(2):307-11.
100. Ayyappan S, Mahadevan S, Chandramohan P, Srinivasan MP, Philip J, Raj B. *Influence of Co<sup>2+</sup> Ion Concentration on the Size, Magnetic Properties, and Purity of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Spinel Ferrite Nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry C. 2010;114(14):6334-41.
101. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, et al. *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications*. Chemical Reviews. 2008;108(6):2064-110.
102. Albornoz C, Jacobo SE. *Preparation of a biocompatible magnetic film from an aqueous ferrofluid*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 2006;305(1):12-5.
103. Pradhan P, Giri J, Rieken F, Koch C, Mykhaylyk O, Doblinger M, et al. *Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy*. Journal of Controlled Release. 2010;142(1):108-21.
104. Rathore A, Kaur H, Luque R. *Self-catalyzed surface grafting of Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with polylactide and its magnetic properties*. Journal of Polymer Research. 2017;25(1):2.
105. Kocbek P, Kralj S, Kreft ME, Kristl J. *Targeting intracellular compartments by magnetic polymeric nanoparticles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013;50(1):130-8.
106. Sung YJ, Suk HJ, Sung HY, Li T, Poo H, Kim MG. *Novel antibody/gold nanoparticle/magnetic nanoparticle nanocomposites for immunomagnetic separation and rapid colorimetric detection of Staphylococcus aureus in milk*. Biosensors and Bioelectronics. 2013;43:432-9.
107. Sun XF, Liu B, Jing Z, Wang H. *Preparation and adsorption property of xylan/poly(acrylic acid) magnetic nanocomposite hydrogel adsorbent*. Carbohydrate polymers. 2015;118:16-23.
108. Arthur RM, Straube WL, Trobaugh JW, Moros EG. *Non-invasive estimation of hyperthermia temperatures with ultrasound*. International Journal of Hyperthermia. 2005;21(6):589-600.
109. Kumaradas JC, Sherar MD. *An edge-element based finite element model of microwave heating in hyperthermia: method and verification*. International Journal of Hyperthermia. 2002;18(5):426-40.
110. Cole AJ, Yang VC, David AE. *Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles*. Trends in biotechnology. 2011;29(7):323-32.
111. Dong-Lin Z, Hai-Long Z, Xian-Wei Z, Qi-Sheng X, Jin-Tian T. *Inductive heat property of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/polymer composite nanoparticles in an ac magnetic field for localized hyperthermia*. Biomedical Materials. 2006;1(4):198.
112. Chatterjee J, Bettge M, Haik Y, Jen Chen C. *Synthesis and characterization of polymer encapsulated Cu-Ni magnetic nanoparticles for hyperthermia applications*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 2005;293(1):303-9.
113. Rudolf H, Silvio D, Robert M, Matthias Z. *Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy*. Journal of Physics: Condensed Matter. 2006;18(38):S2919.
114. Bessis N, GarciaCozar FJ, Boissier MC. *Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms*. Gene Therapy. 2004;11:S10.

115. Lu Y. *Transcriptionally regulated, prostate-targeted gene therapy for prostate cancer*. Advanced Drug Delivery Reviews. 2009;61(7):572-88.
116. McBain SC, Yiu HHP, Dobson J. *Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery*. International Journal of Nanomedicine. 2008;3(2):169-80.
117. Park W, Yang HN, Ling D, Yim H, Kim KS, Hyeon T, et al. *Multi-modal transfection agent based on monodisperse magnetic nanoparticles for stem cell gene delivery and tracking*. Biomaterials. 2014;35(25):7239-47.
118. Weis C, Blank F, West A, Black G, Woodward RC, Carroll MRJ, et al. *Labeling of cancer cells with magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging*. Magnetic Resonance in Medicine. 2014;71(5):1896-905.
119. HyoSook L, Huiping S, Yuqiang H, Kwak B. *Synthesis of MRI contrast agent by coating superparamagnetic iron oxide with chitosan*. IEEE Transactions on Magnetics. 2005;41(10):4102-4.
120. Li S-D, Huang L. *Stealth nanoparticles: High density but sheddable PEG is a key for tumor targeting*. Journal of Controlled Release. 2010;145(3):178-81.
121. Jurgons R, Seliger C, Hilpert A, Trahms L, Odenbach S, Alexiou C. *Drug loaded magnetic nanoparticles for cancer therapy*. Journal of Physics: Condensed Matter. 2006;18(38):S2893.
122. Cardoso VF, Irusta S, Navascues N, Lanceros-Mendez S. *Comparative study of sol-gel methods for the facile synthesis of tailored magnetic silica spheres*. Materials Research Express. 2016;3(7):075402.
123. Bozzola JJ, Russell LD. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Jones & Bartlett Learning; 1999.
124. Goldstein JI, Newbury DE, Michael JR, Ritchie NW, Scott JHJ, Joy DC. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer; 2017.
125. Reimer L. *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*. Springer; 2013.
126. Abudayyeh H. *Synthesis and Analysis of ZnO Nanowires*: Birzeit University; 2012
127. Egerton RF. *The Transmission Electron Microscope*. In: Egerton RF, editor. Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 55-88.
128. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. *Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences*. Biophysical Reviews. 2016;8(4):409-27.
129. Hassan PA, Rana S, Verma G. *Making sense of Brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering*. Langmuir. 2014;31(1):3-12.
130. Carvalho PM, Felício MR, Santos NC, Gonçalves S, Domingues M. *Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development*. Frontiers in Chemistry. 2018;6:237.
131. Griffiths PR, De Haseth JA. *Fourier transform infrared spectrometry*. John Wiley & Sons; 2007.
132. Stuart B. *Infrared Spectroscopy*. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology: John Wiley & Sons; 2015. p. 1-18.
133. Fortunato A. *DSC: history, instruments and devices*. Drug-Biomembrane Interaction Studies: Elsevier; 2013. p. 169-212.
134. Gaisford S, Kett V, Haines P. *Principles of thermal analysis and calorimetry*. Royal society of chemistry; 2016.
135. Buschow KHJ, Boer FR. *Physics of magnetism and magnetic materials*. Springer; 2003.

136. Carignan L-P, Cochrane RW, Ménard D. *Design of a compensated signal rod for low magnetic moment sample measurements with a vibrating sample magnetometer*. 2008;79(3):035107.
137. de Oliveira AM, Jäger E, Jäger A, Stepánek P, Giacomelli FC. *Physicochemical aspects behind the size of biodegradable polymeric nanoparticles: A step forward*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2013;436:1092-102.
138. Cardoso VF, Botelho G, Lanceros-Méndez S. *Nonsolvent induced phase separation preparation of poly(vinylidene fluoride-co-chlorotrifluoroethylene) membranes with tailored morphology, piezoelectric phase content and mechanical properties*. Materials & Design. 2015;88:390-7.
139. Newa M, Bhandari KH, Oh DH, Kim YR, Sung JH, Kim JO, et al. *Enhanced dissolution of ibuprofen using solid dispersion with poloxamer 407*. Archives of Pharmacal Research. 2008;31(11):1497-507.
140. Campbell RA, Parker SRW, Day JPR, Bain CD. *External Reflection FTIR Spectroscopy of the Cationic Surfactant Hexadecyltrimethylammonium Bromide (CTAB) on an Overflowing Cylinder*. Langmuir. 2004;20(20):8740-53.
141. Evanson KW, Thorstenson TA, Urban MW. *Surface and interfacial FTIR spectroscopic studies of latexes. II. Surfactant-copolymer compatibility and mobility of surfactants*. Journal of Applied Polymer Science. 1991;42(8):2297-307.
142. Sun J, Zhou S, Hou P, Yang Y, Weng J, Li X, et al. *Synthesis and characterization of biocompatible Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles*. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2007;80A(2):333-41.