



NANOPARTÍCULAS DE PMMA OBTIDAS POR POLIMERIZAÇÃO EM
MINIEMULSÃO VIA EMULSÃO DUPLA PARA ENCAPSULAMENTO DE
BIOMOLÉCULAS

Natali Altoé da Cunha

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto
Helen Conceição Ferraz

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2018

NANOPARTÍCULAS DE PMMA OBTIDAS POR POLIMERIZAÇÃO EM
MINIEMULSÃO VIA EMULSÃO DUPLA PARA ENCAPSULAMENTO DE
BIOMOLÉCULAS

Natali Altoé da Cunha

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof.º José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.

Prof.ª Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Prof.ª Evelin Andrade Manoel, D.Sc.

Dra. Ariane de Jesus Sousa Batista, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

FEVEREIRO DE 2018

Cunha, Natali Altoé da

Nanopartículas de PMMA obtidas por polimerização em miniemulsão via emulsão dupla para encapsulamento de biomoléculas / Natali Altoé da Cunha. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2018.

XXIII, 147 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Helen Conceição Ferraz

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 129-139.

1. Nanopartículas Poliméricas. 2. Dupla Emulsão. 3. Polimerização em Miniemulsão. 4. Encapsulamento. 5. Biomoléculas Hidrofílicas. I. José Carlos Costa da Silva Pinto *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que com toda sua benevolência me guiou até aqui e a Maria Santíssima e todos anjos e santos, que intercederam por mim diante de todos os desafios enfrentados nesta etapa.

A meus pais, Gelson e Lucinda, pelo amor, apoio e confiança que depositaram em mim. Por todas as orações e carinhos. Pela paciência e compreensão nos meus momentos de estresse e quando tempo ou a distância me impediam de estar com vocês. Por abdicarem muitas vezes de suas prioridades, colocando-me em primeiro lugar. Obrigada por me educaram a ser uma mulher de caráter e batalhadora.

A minhas irmãs, Lara e Jamili por todo amor e amizade. A Lara, por ser minha irmã mais velha, muitas vezes assumiu o papel de irmã coruja, despejando todo amor, confiança e orgulho em mim. A Jamili, por ser minha parceira e confidente para todas as horas e muitas vezes minha válvula de escape, inclusive durante todo nosso mestrado.

Ao meu noivo, Rodrigo, pois sempre estive do meu lado me apoiando e me motivando. Por seu companheirismo, amor, confiança e preocupação. Pela paciência e compreensão nos meus momentos de estresse e quando tempo ou a distância me impediam de estar com você. E por sonhar e planejar um futuro ao meu lado.

Aos meus familiares, que sempre torceram por mim e pelo meu sucesso.

Aos meus amigos de Cachoeiro e de Alegre, pela amizade e descontração que passo ao lado de vocês.

As novas amizades que criei no Rio de Janeiro, em especial aos meus amigos do mestrado, por compartilhar os momentos de alegrias e frustrações. Certamente sem vocês nada seria tão incrível.

A meus companheiros de laboratório do I-140 e Engepol, pelas trocas de experiências, ensinamentos e risadas. Obrigada aos "dinossauros" do lab como o Zé costuma falar, pela paciência e atenção em me ensinar, em especial a Débora Vaz e Thamiris. A Lys, Jéssica e Diulia por crescerem nessa área junto comigo, compartilhando dúvidas, frustrações de experimentos, alegrias e amizade. Ao Marcel por toda amizade, generosidade e disposição em me ajudar nas discussões do tema do trabalho e nas dúvidas durante os experimentos e escrita, tenho certeza que ainda vamos escrever vários artigos juntos! E a Ariane, amiga que me acompanha desde do pré-vestibular e que me deu todo apoio e carinho para enfrentar o mestrado no PEQ.

A meus companheiros de laboratório do Grifit, pela ajuda, ensinamentos e brincadeiras, em especial ao João, que eu sempre recorria caso eu tivesse alguma dúvida, mesmo sabendo do seu jeito sarcástico de ser.

A Fernanda do IMA, por emprestar e revezar o ultra-turrax quando o meu quebrou, salvando o andamento do meu trabalho.

A Larissa, Nathalie, Natasha, Jorge, Alessandro, Manoel, Luis e Beth, pelo auxílio dado nas análises realizadas durante todo o trabalho.

Aos membros dos laboratórios I-140, Engepol, Grifit, Engecol, Nucat, PAM, Núcleo Multiusuário de Microscopia e Laboratório de Neuroquímica, que me ajudaram e disponibilizaram seus equipamentos para que os objetivos da minha pesquisa fossem atingidos.

Ao meu orientador José Carlos, por todo apoio, por ter compartilhado todo seu conhecimento e sua experiência comigo.

A minha orientadora Helen, pelo carinho, pela paciência, por ter sido uma mãezona e por toda contribuição dada ao longo do trabalho.

As agências de fomento, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação de mestrado.

"Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores para fazer melhor ainda."

Mário Sérgio Cortella

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

NANOPARTÍCULAS DE PMMA OBTIDAS POR POLIMERIZAÇÃO EM
MINIEMULSÃO VIA EMULSÃO DUPLA PARA ENCAPSULAMENTO DE
BIOMOLÉCULAS

Natali Altoé da Cunha

Fevereiro/2018

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Helen Conceição Ferraz

Programa: Engenharia Química

A polimerização em miniemulsão *in situ* garante a formação de nanopartículas poliméricas bastante atrativas para o mercado farmacêutico, pois o processo é capaz de encapsular diversos ativos terapêuticos. Quando esses fármacos são hidrofílicos, a técnica de dupla emulsão desponta como a mais adequada. Portanto, este trabalho objetiva a aquisição de um sistema de emulsão dupla água-óleo-água (A/O/A) estável, apropriado à polimerização do monômero metacrilato de metila para o encapsulamento e liberação de fármacos hidrossolúveis. O trabalho teve também o objetivo de escalonar o processo usando o homogeneizador de alta pressão. As emulsões foram caracterizadas quanto à estabilidade e morfologia e as nanopartículas produzidas quanto à morfologia, tamanho, massa molar, comportamento cinético e térmico, eficiência de encapsulamento e liberação da proteína BSA, usada como biomolécula-modelo. Os resultados mostraram que o procedimento alcançou emulsões estáveis e nanopartículas promissoras. As propriedades obtidas com o uso do homogeneizador e ultra-turrax foram semelhantes. A incorporação da BSA não afetou significativamente as características das nanopartículas e resultou em considerável eficiência de encapsulamento, de 64% e 90% usando turrax e homogeneizador, respectivamente. Assim, os resultados indicaram que a metodologia proposta tem grande potencial para desenvolvimento em aplicações farmacêuticas.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

PMMA NANOPARTICLES OBTAINED THROUGH DOUBLE MINIEMULSION
POLYMERIZATION FOR ENCAPSULATION OF BIOMOLECULES

Natali Altoé da Cunha

February/2018

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto

Helen Conceição Ferraz

Department: Chemical Engineering

In situ miniemulsion polymerizations allows for formation of polymer nanoparticles very attractive to the pharmaceutical market, because the technique is capable of encapsulating various therapeutic actives. When these drugs are hydrophilic, double miniemulsion polymerization seems to be the most appropriate technique. Therefore, this work aimed to prepare stable water-oil-water (W/O/W) double emulsions, suitable for polymerization of methyl methacrylate monomer for the encapsulation and release of water-soluble drugs. Process scaling up was also pursued by high pressure homogenizer. Emulsions were characterized in terms of stability and morphology and the produced nanoparticles by morphology, size, molar mass, kinetic behavior and thermal stability, encapsulation efficiency and release of BSA protein, used as a model drug. The obtained results showed that the proposed procedure provided stable emulsions and promising nanoparticles. The properties obtained with the homogenizer and ultra-turrax were similar. The incorporation of BSA did not affect the characteristics of the nanoparticles significantly and led to considerable encapsulation efficiencies, close to 64% and 90% using turrax and homogenizer, respectively. Thus, the obtained results indicated that the proposed methodology has great potential for development in pharmaceutical applications.

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO I</i>	<i>1</i>
INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Iniciais	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo Geral.....	3
1.2.2 Objetivos Específicos.....	3
<i>CAPÍTULO II</i>	<i>4</i>
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Polímeros	4
2.1.1 Técnicas de Polimerização Radicalar	5
2.1.1.1 Polimerização em Massa	6
2.1.1.2 Polimerização em Solução.....	6
2.1.1.3 Polimerização em Suspensão	7
2.1.1.4 Polimerização em Emulsão.....	7
2.1.2 Polimerização em Miniemulsão	8
2.1.3 Poli(metacrilato de metila) (PMMA)	10
2.2 Emulsão	11
2.2.1 Processo de Emulsificação	13
2.2.2 Estabilidade das Emulsões	17
2.3 Emulsões Duplas	20
2.4 Nanopartículas Poliméricas	23
2.2.1 Aplicações das Nanopartículas Poliméricas.....	27
2.5 Comentários Finais	31
<i>CAPÍTULO III</i>	<i>33</i>

MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Reagentes e Equipamentos	33
3.1.1 Reagentes	33
3.1.2 Equipamentos	35
3.2 Métodos	37
3.2.1 Teste Preliminar de Estabilidade da 1ª Emulsão (1E)	37
3.2.1.1 Planejamento Experimental	38
3.2.1.2 Procedimento Experimental	40
3.2.2 Mudanças na Formulação da 1ª Emulsão (1E)	45
3.2.3 Formulação da Emulsão Dupla (2E)	46
3.2.4 Polimerização em Miniemulsão	48
3.2.5 Ensaio com o Homogeneizador de Alta Pressão	49
3.2.5.1 Estudo da 1ª Emulsão (1E)	50
3.2.5.2 Emulsão Dupla (2E) e Polimerização em Miniemulsão	51
3.2.6 Encapsulamento da BSA <i>in situ</i>	52
3.2.6.1 Preparação usando o Ultra-Turrax	52
3.2.6.2 Preparação usando o Homogeneizador de Alta Pressão	52
3.2.6.3 Teste de Eficiência de Encapsulamento	53
3.2.6.4 Ensaio de Liberação Controlada	56
3.3 Caracterizações	57
3.3.1 Tensão Superficial e Interfacial dos Óleos (Diesel, Heptano e MMA).....	57
3.3.2 Análises Morfológicas	58
3.3.2.1 Microscopia Óptica	58
3.3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	58
3.3.3 Análise de Conversão	59
3.3.4 Diâmetro Médio e Distribuição de Tamanho das Partículas	60
3.3.5 Distribuição de Massas Molares	60
3.3.6 Estabilidade Térmica.....	61
3.3.6.1 Análise Termogravimétrica (TGA)	61
3.3.6.2 Calorímetro de Varredura Diferencial (DSC)	61

<i>CAPÍTULO IV</i>	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1 Teste Preliminar de Estabilidade da 1ª Emulsão (1E).....	62
4.1.1 Caracterização dos Óleos (Diesel, Heptano e MMA).....	62
4.1.2 Efeito da Formulação sobre a Estabilidade das Emulsões	65
4.1.2.1 Análise das Amostras e das Variáveis de Saída	66
4.1.2.2 Análise Estatística	79
4.2 Nova Formulação da 1ª Emulsão (1E)	86
4.2.1 Aumento na Carga de Surfactante	86
4.2.2 Adição do Polímero PMMA	87
4.3 Formulação da Dupla Emulsão (2E)	90
4.4 Polimerização em Miniemulsão	93
4.4.1 Morfologia e Tamanho de Partícula	94
4.4.2 Análise de Conversão	101
4.4.3 Massa Molar.....	102
4.4.4 Estabilidade Térmica	103
4.5 Ensaio com o Homogeneizador de Alta Pressão	105
4.5.1 Estudo da 1ª Emulsão (1E).....	106
4.5.2 Formação das nanopartículas poliméricas (NPPs)	108
4.6 Síntese das NPPs com Agente Encapsulado	113
4.6.1 Aparência das Emulsões e dos Látex com BSA	114
4.6.2 Diâmetro Médio e Distribuição de Tamanho das Partículas	115
4.6.3 Análise de Conversão	117
4.6.4 Massa Molar das NPPs produzidos com BSA	118
4.6.5 Estabilidade Térmica	119
4.6.6 Eficiência de Encapsulamento e Liberação da BSA	120
4.6.7 Encapsulamento do Corante Azul nas NPPs	123
<i>CAPÍTULO V</i>	125
CONCLUSÃO E SUGESTÕES	125
5.1 Conclusão.....	125

5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros.....	127
<i>CAPÍTULO VI</i>	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
APÊNDICE A	140
APÊNDICE B	145

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Mecanismo ilustrativo de uma polimerização radicalar heterogênea iniciada no meio contínuo (adaptado de ASUA, 2004)	6
FIGURA 2 - Mecanismo característico de polimerização em miniemulsão (adaptado de LANDFESTER, 2006)	9
FIGURA 3 - Representação esquemática da reação de polimerização do MMA	10
FIGURA 4 - Representação esquemática das emulsões simples a) O/A e b) A/O; e emulsões duplas c) A/O/A e d) O/A/O (PEREIRA e GARCIA-ROJAS, 2015)	12
FIGURA 5 - Esquema ilustrativo da válvula de um homogeneizador de alta pressão, do tipo Manton-Gaulin. (OLIVEIRA, 2010)	14
FIGURA 6 - Esquema dos fenômenos de desestabilização de emulsões. Processos diferentes podem ocorrer simultaneamente (DE ALMEIDA, 2014).....	18
FIGURA 7 - Representação de mecanismos de degradação em miniemulsões (OLIVEIRA, 2010)	19
FIGURA 8 - Tipos de gotas de dupla emulsão (Adaptado de FLORENCE e WHITEHILL, 1981)	21
FIGURA 9 - Número de publicações citadas no Scopus® sobre nanopartículas poliméricas entre 1996 e 2010 (RAO e GECKELER, 2011)	24
FIGURA 10 - Esquema de técnicas usadas para a preparação de nanopartículas poliméricas. FSC: Fluido Supercrítico; R C/V: Radical Controlado/Vivo (Adaptado de RAO e GECKELER, 2011)	26
FIGURA 11 - Representação de sistemas de liberação de fármacos no corpo humano (PEIXOTO, 2013)	29
FIGURA 12 - Turbiscan LAB usado para análise de estabilidade de emulsões	43
FIGURA 13 - Possíveis fenômenos de desestabilidade identificados no Turbiscan LAB. Adaptado de FORMULATIONS (2013)	44

FIGURA 14 - Ultra-turrax (IKA, modelo T-10 basic) usado para homogeneização da 1E e 2E	47
FIGURA 15 - Minirreator usado para a polimerização em miniemulsão	48
FIGURA 16 - Representação esquemática do princípio básico da síntese de nanopartículas poliméricas por polimerização em miniemulsão via dupla emulsão	49
FIGURA 17 - Homogeneizador de Alta Pressão (Artepeças, APLAB-10) usado para homogeneizar a 1E e 2E	50
FIGURA 18 - Estrutura química do Span 80	66
FIGURA 19 - Aparência da emulsão de água em óleo diesel a) antes de homogeneizar no ultra-turrax; b) 20min após passagem no ultra-turrax; e c) 2h após passagem no ultra-turrax	67
FIGURA 20 - Perfil qualitativo de estabilidade para emulsão de água em óleo diesel para três amostras do planejamento: a) amostra N_04; b) amostra N_06; e c) amostra sem surfactante	68
FIGURA 21 - Perfil do TSI em função do tempo para emulsão de água em óleo diesel do planejamento experimental. Erro = $\pm 0,64$	71
FIGURA 22 - Aparência da emulsão de água em heptano a) 1min; b) 20min; e c) 2h após passagem no ultra-turrax	72
FIGURA 23 - Perfil qualitativo de estabilidade para emulsão de água em heptano para duas amostras do planejamento: a) amostra N_02; b) amostra N_05	72
FIGURA 24 - Perfil do TSI em função do tempo para emulsão de água em heptano do planejamento experimental. Erro = $\pm 0,93$	74
FIGURA 25 - Aparência da emulsão de água em MMA a), b), c) 1min; d), e), f) 20min; g), h), i) 2h após passagem no ultra-turrax	75

FIGURA 26 - Perfil qualitativo de estabilidade para emulsão de água em MMA para amostras do planejamento: a) amostra N_03; b) amostra N_02; e c) amostra N_08	77
FIGURA 27 - Perfil do TSI em função do tempo para emulsão de água em MMA do planejamento experimental. Erro = $\pm 2,36$	78
FIGURA 28 - Aparência da emulsão primária com aumento de surfactante. a) instabilidade da emulsão; b) formação de grumos	87
FIGURA 29 - Aparência da emulsão primária a) sem e b) com 1 %m/m PMMA após 40 min	88
FIGURA 30 - Estabilidade medida pelo do Turbiscan da emulsão primária a) sem e b) com 1 %m/m PMMA após 40 min	89
FIGURA 31 - Micrografias óptica da emulsão primária a) sem e b) com 1 %m/m PMMA	89
FIGURA 32 - Estrutura química dos surfactantes hidrofílicos a) Tween 80, b) PVA e c) LSS	91
FIGURA 33 - Emulsão dupla após 30 min das amostras a) 2E1, contendo Tween 80; b) 2E2, contendo PVA; c) 2E3, contendo LSS; e d) 2E4, contendo PVA e LSS	91
FIGURA 34 - Micrografias óptica da emulsão dupla após 1 min do término da emulsificação das amostras contendo a) Tween 80 (2E1); b) PVA (2E2); c) LSS (2E3); e d) PVA + LSS (2E4).	92
FIGURA 35 - Látex formado das amostras a), d) NP_2E2; b), e) NP_2E3; c), f) NP_2E4. A linha de cima são as amostras obtidas logo após a reação. A linha de baixo são os respectivos látices depois da secagem em estufa. O látex das Figuras 35.a) e d) possuem duas regiões: I) camada menos densa e II) camada mais densa.....	94
FIGURA 36 - Micrografias ópticas das amostras cotendo PVA (NP_2E2) do a) topo e b) fundo; LSS (NP_2E3) aumentada c) 20x e d) 50x; PVA + LSS (NP_2E4) aumentada e) 20x e f) 50x	97

FIGURA 37 - Micrografias por MEV das NPPs contendo PVA (NP_2E2) aumentada a) 15kx e b) 60kx; LSS (NP_2E3) aumentada c) 15kx e d) 60kx; PVA + LSS (NP_2E4) aumentada e) 15kx e f) 60kx	98
FIGURA 38 - Micrografias por MEV da crioseção das NPPs mostrando possível a) desprendimento das NPPs e b) adesão das NPPs na resina	99
FIGURA 39 - Distribuição do tamanho de partícula das amostras a) NP_2E4, b) NP_2E3 e c) NP_2E2 nos tempos de 0 e 2h da reação	100
FIGURA 40 - Conversão de monômero no ensaio da amostra NP_2E3	101
FIGURA 41 - Distribuição da massa molar normalizada por GPC das NPPs contendo PVA (NP_2E2), LSS (NP_2E3) ou PVA + LSS (NP_2E4)	103
FIGURA 42 - Perfil de perda de massa por TGA das das NPPs contendo PVA (NP_2E2), LSS (NP_2E3) ou PVA + LSS (NP_2E4), em comparação com a literatura (MARTNS, 2017)	104
FIGURA 43 - Aparência das amostras a) H_1E1, b) H_1E2 e c) H_1E3 nos tempo de 1min (linha acima) e 30 min (linha abaixo) após a emulsificação	107
FIGURA 44 - Estabilidade medida com auxílio do Turbiscan das emulsões primárias a) H_1E1, b) H_1E2 e c) H_1E3	107
FIGURA 45 - Micrografias ópticas das emulsões primárias a) H_1E1, b) H_1E2 e c) H_1E3	108
FIGURA 46 - Aspectos visuais da a) dupla emulsão (A/O/A); e das nanopartículas poliméricas b) H_NP_1a e c) H_NP_1b	109
FIGURA 47 - Micrografias óptica das amostras de nanopartículas a) H_NP_1a e b) H_NP_1b	110
FIGURA 48 - Micrografias por MEV das amostras de nanopartículas a) H_NP_1a e b) H_NP_1b	110
FIGURA 49 - Distribuição do tamanho de partícula das amostras a) H_NP_1a; b) H_NP_1b no tempo de 2h	111

FIGURA 50 - Conversão de monômero no ensaio das amostras a) H_NP_1a e b) H_NP_1b	112
FIGURA 51 - Distribuição da massa molar normalizada por GPC das NPPs usando o homogeneizador H_NP_1a e H_NP_1b; e a NP_2E3 (produzida com o uso do Turrax, como comparação)	113
FIGURA 52 - Aparência da primeira emulsão (coluna à esquerda) e da dupla emulsão (coluna à direita) das amostras preparadas com BSA usando o a) e b) ultraturrax ou c) e d) homogeneizador de alta pressão	115
FIGURA 53 - Aparência do látex das amostras preparadas com BSA a) NP_2E3_BSA (usando o Turrax), b) H_NP_1a_BSA (usando o Homogeneizador) e c) H_NP_1b_BSA (usando o Homogeneizador)	115
FIGURA 54 - Distribuição de tamanho de partícula das amostras a) H_NP_1b_BSA, b) H_NP_1a_BSA e c) NP_2E3_BSA no tempo de 2h	117
FIGURA 55 - Conversão de monômero das amostras produzidas com BSA e sem BSA para comparação	118
FIGURA 56 - Distribuição da massa molar normalizada por GPC das amostras produzidas com e sem BSA	119
FIGURA 57 - TGA das amostras produzidas com e sem BSA	120
FIGURA 58 - Exemplo de umas das curvas de calibração da BSA por Bradford feita durante o ensaio de eficiência de encapsulamento e liberação	121
FIGURA 59 - Látex formado com corante azul encapsulado (amostra NP_2E3_CorA)	124
FIGURA 60 - Micrografias óptica das NPPs preparadas a) e b) sem e c) e d) com corante azul encapsulado. A diferença entre as colunas da direita e esquerda é decorrente das condições de luz transmitida e dos efeitos de edição	124
FIGURA A.1 - Perfil qualitativo de estabilidade para emulsão de água em diesel para amostras do planejamento experimental: a) N_01; b) N_02; c) N_03; d) N_05; e) N_07; f) N_08	140

FIGURA A.2 - Perfil qualitativo de estabilidade para emulsão de água em diesel para ponto central do planejamento experimental: a) N_09; b) N_10; c) N_11	141
FIGURA A.3 - Perfil qualitativo de estabilidade para emulsão de água em heptano para ponto central do planejamento experimental: a) N_09; b) N_10; c) N_11	141
FIGURA A.4 - Perfil qualitativo de estabilidade para emulsão de água em heptano para amostras do planejamento experimental: a) N_01; b) N_03; c) N_04; d) N_06; e) N_07; f) N_08	142
FIGURA A.5 - Perfil qualitativo de estabilidade para emulsão de água em MMA para amostras do planejamento experimental: a) N_01; b) N_04; c) N_05; d) N_06	143
FIGURA A.6 - Perfil qualitativo de estabilidade para emulsão de água em MMA para amostras do planejamento experimental: a) N_07; b) N_09; c) N_10; d) N_11	144
FIGURA B.1 - Análise de a) TGA e b) DSC do PVA	145
FIGURA B.2 - DSC da amostra NP_2E2	146
FIGURA B.3 - DSC da amostra NP_2E3	146
FIGURA B.4 - DSC da amostra NP_2E4	147
FIGURA B.5 - DSC da amostra NP_2E3_BSA	147

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Faixa de aplicações de surfactantes como função do HLB (GRIFFIN, 1949)	17
TABELA 2 - Resumo das principais vantagens das formas farmacêuticas de liberação prolongada sobre as formas convencionais (Adaptado de FAHNING e LOBÃO, 2011; JOÃO, 2013; KOKAI et al., 2010)	30
TABELA 3 - Intervalos das variáveis de entrada usados no planejamento experimental	38
TABELA 4 - Variáveis de entrada normalizadas do plano experimental fatorial completo a dois níveis	39
TABELA 5 - Valores correspondentes em massa de cada componente [g] para o planejamento experimental conduzidos com o óleo diesel	41
TABELA 6 - Valores correspondentes em massa de cada componente [g] para o planejamento experimental conduzido com o heptano e MMA	42
TABELA 7 - Composição da 1E, em massa [g], com aumento da carga de surfactante	45
TABELA 8 - Composição da 1E, em massa [g], com adição de PMMA na fase orgânica	46
TABELA 9 - Composição da 2E, em massa [g], usando o turrax	47
TABELA 10 - Composição da 1E, em massa [g], usando o homogeneizador de alta pressão	50
TABELA 11 - Tensão Superficial realizada no goniômetro para o heptano e MMA e no tensiômetro para o óleo diesel	63
TABELA 12 - Tensão Interfacial realizada no goniômetro para o heptano e MMA e no tensiômetro para o óleo diesel	64

TABELA 13 - Valores das variáveis de saída, porcentagem de sedimentação e índice de estabilidade do Turbiscan, para o planejamento experimental com o diesel	70
TABELA 14 - Valores das variáveis de saída, porcentagem de sedimentação e índice de estabilidade do Turbiscan, para planejamento experimental com o heptano	73
TABELA 15 - Valores das variáveis de saída, porcentagem de sedimentação e índice de estabilidade do Turbiscan, para o planejamento experimental com o MMA	78
TABELA 16 - Média, variância e desvio padrão do TSI no ponto central para os ensaios de estabilidade de emulsões de água em diesel, heptano e MMA	79
TABELA 17 - Limites de distribuições de probabilidades para 95% de confiança	80
TABELA 18 - Intervalo de confiança da média e da variância para os TSI no ponto central	80
TABELA 19 - Resultados obtidos do planejamento experimental para a variável TSI	81
TABELA 20 - Matriz de correlação entre variáveis normalizadas do plano experimental	81
TABELA 21 - Parâmetros estimados para o TSI do diesel, tentativa n° 1	82
TABELA 22 - Parâmetros estimados para o TSI do heptano, tentativa n° 1	83
TABELA 23 - Parâmetros estimados para o TSI do heptano, tentativa n° 2	83
TABELA 24 - Parâmetros estimados para o TSI do heptano, tentativa n° 3	83
TABELA 25 - Parâmetros estimados para o TSI do heptano, tentativa n° 4	84
TABELA 26 - Parâmetros estimados para o TSI do MMA, tentativa n° 1	84
TABELA 27 - Parâmetros estimados para o TSI do MMA, tentativa n° 2	85
TABELA 28 - Parâmetros estimados para o TSI do MMA, tentativa n° 3	85

TABELA 29 - Parâmetros estimados para o TSI do MMA, tentativa n° 4	85
TABELA 30 - TSI da emulsão de água em MMA preparada com aumento na carga de Span 80	86
TABELA 31 - TSI da emulsão de água em MMA preparada com adição de PMMA ..	88
TABELA 32 - Diâmetro médio das partículas com diferentes surfactantes	99
TABELA 33 - Massas molares médias das partículas com diferentes surfactantes	103
TABELA 34 - Temperatura de transição vítrea dos polímeros produzidos	104
TABELA 35 - Diâmetro médio das partículas usando o homogeneizador de alta pressão	111
TABELA 36 - Massas molares médias das partículas usando o homogeneizador de alta pressão e turrax para emulsificação	113
TABELA 37 - Diâmetro médio das NPPs produzidas com BSA	116
TABELA 38 - Massas molares médias de NPPs produzidas com e sem BSA	118
TABELA 39 - Temperatura de transição vítrea das NPPs produzidas com e sem BSA	120
TABELA 40 - Porcentagem de Eficiência de Encapsulamento da BSA nas NPPs	121
TABELA 41 - Porcentagem de Liberação do BSA	122

NOMENCLATURA

A/O	Emulsão simples de água em óleo
A/O/A	Emulsão dupla de água em óleo em água
BSA	Albumina de soro bovino
CMC	Concentração micelar crítica
CorA	Corante azul
d	Diâmetro médio
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
F.D.	Fase Dispersa
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HLB	Balanço hidrofílico-lipofílico (<i>hydrophilic-lipophilic balance</i>)
KPS	Persulfato de potássio
LSS	Lauril sulfato de sódio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMA	Metacrilato de metila
Mn	Massa molar numérica média
Mw	Massa molar ponderal média
NPP	Nanopartículas poliméricas
PBS	Solução tampão fosfato salino
PDI	Índice de polidispersão
PLA	poli(ácido láctico)
PLGA	poli(ácido láctico-co-glicólico)
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
POE	Poli(ortoéster)
PVA	Poli(álcool vinílico)
Span 80	Monoleato de sorbitano
Tween 80	Polissorbato 80
TGA	Análise termogravimétrica
THF	Tetrahidrofurano
TSI	Índice de estabilidade do Turbiscan (<i>Turbiscan stability index</i>)
1E	Primeira emulsão ou emulsão primária
2E	Segunda emulsão ou dupla emulsão

%BS	Porcentagem de luz refletida (<i>backscattering</i>) do Turbiscan
%EE	Porcentagem de eficiência de encapsulamento
%Lib	Porcentagem de liberação
%S	Porcentagem de sedimentação
%T	Porcentagem de transmissão do Turbican
%X	Conversão
λ	Comprimento de onda

Capítulo I

Introdução

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Como resultado dos avanços na biotecnologia, uma grande variedade de fármacos proteicos, e hidrofílicos em geral, está disponível para o combate de diversas enfermidades, apresentando elevada eficiência e potência, ou seja, atuam especificamente e em baixas concentrações (SILVA *et al.*, 2002; YE, KIM e PARK, 2010). Além disso, o desenvolvimento na biotecnologia tornou possível a produção em larga escala, sendo hoje comercializadas, centenas de proteínas com ação terapêutica, incluindo anticorpos monoclonais, enzimas, agentes antimicrobianos, inibidores enzimáticos, vacinas, agentes imunomoduladores, fatores de crescimento e hormônios derivados de origem proteica (SILVA *et al.*, 2002). A proteína insulina, por exemplo, demanda alta produção decorrente dos inúmeros casos de diabetes. A saber, dados de 2012 mostraram que existem cerca de 371 milhões de pessoas com diabetes em todo o mundo, sendo que só no Brasil o número chega a 13,4 milhões de doentes, ficando entre as 10 principais causas de mortes no país (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2012).

Apesar das vantagens terapêuticas, as proteínas e peptídeos são em geral moléculas complexas e normalmente frágeis mediante temperatura e pH. Em vista disso, o encapsulamento desses compostos constitui uma alternativa para superar esses problemas, ao oferecer uma farmacocinética mais favorável e proteção ao fármaco (SILVA *et al.*, 2002; YE, KIM e PARK, 2010). Além disso, o encapsulamento promove um sistema de liberação controlada e sustentada, o que reduz a flutuação dos níveis plasmáticos do fármaco e a frequência de administração, entre outras vantagens (KOKAI *et al.*, 2010). Para o encapsulamento do fármaco e liberação mais eficiente, algumas estratégias têm sido exploradas. O uso de emulsões simples de óleo em água (O/A) não é viável para encapsular compostos hidrossolúveis; já emulsões de água em óleo (A/O) são insolúveis em água e apresentam alta viscosidade, dificultando o transporte pelas artérias ou capilares (LIU *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2017).

Em vista disso, o método da dupla emulsão tem sido apontado como um dos mais adequados para o encapsulamento de fármacos hidrofílicos (GEZE *et al.*, 1999; MEDEIROS, 2013; YE, KIM e PARK, 2010). Entre os tipos de dupla emulsão existentes, a emulsão água-óleo-água (A/O/A) é a mais comumente empregada, a qual consiste na emulsão da fase aquosa, contendo o fármaco, dispersa em uma fase orgânica, e esta emulsão primária do tipo A/O é então dispersa em uma segunda fase aquosa, formando a emulsão secundária do tipo A/O/A.

Por sua vez, polímeros têm sido amplamente usados em aplicações biomédicas devido à boa biocompatibilidade e versatilidade estrutural, dentre outras vantagens. Dessa forma, podem ser empregados para formulação de sistemas de encapsulamento e liberação controlada de fármacos, como por exemplo os que utilizam nanopartículas poliméricas (MENDES *et al.*, 2012; TAMNAK *et al.*, 2016).

De fato, cerca de 40% das moléculas farmacologicamente ativas descobertas são rejeitadas, devido principalmente à reduzida solubilidade e biodisponibilidade (ORÉFICE e CUNHA, 2010). Para contornar tais problemas, carreadores micrométricos e nanométricos, capazes de modularem a liberação com alto grau de reprodutibilidade, podem constituir alternativas eficazes (ORÉFICE e CUNHA, 2010). Por isso, atualmente o estudo e o uso das nanopartículas poliméricas para encapsulamento apresentam uma alta tendência de crescimento, explicada pelas suas propriedades únicas, como a elevada área específica, tamanho atrativo e versatilidade da administração por diferentes vias, atendendo uma vasta gama de aplicações e necessidades do mercado (RAO e GECKELER, 2011).

As nanopartículas podem ser preparadas por dispersão do polímero previamente formado ou pela polimerização *in situ* dos monômeros (CONNIOT, 2011). A polimerização *in situ* se destaca por constituir um método muito rápido, simples e facilmente escalável (KREUTER, 1994; SILVA *et al.*, 2003). Quando a polimerização em miniemulsão é empregada, é necessário inicialmente obter uma emulsão estável, em que a fase orgânica dá origem à matriz polimérica que compõe as partículas. Entende-se aqui como emulsão estável aquela dispersão que permite a manipulação e operação do processo em tempo hábil, sem a formação de coágulos ou de uma segunda fase.

Baseando no que foi discutido, o presente trabalho pretende investigar as condições necessárias para formar tanto a emulsão primária quanto a secundária de forma estável, utilizando monômero como fase orgânica, de forma a posteriormente

conduzir uma polimerização *in situ* para o encapsulamento e liberação controlada de compostos hidrofílicos. Esta pesquisa foi conduzida nos laboratórios de Engenharia de Colóides (Engecol), Engenharia de Polimerização (Engepol) e no Grupo Interdisciplinar de Fenômenos Interfaciais (GRIFIT). Testes complementares foram realizados no Laboratório de Modelagem, Simulação e Controle de Processos (LMSCP), no Núcleo de Catálise (NUCAT) e no Laboratório de Processos com Membranas (PAM), todos no Programa de Engenharia Química da COPPE, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), além do Núcleo Multiusuário de Microscopia (Metalmat/COPPE/UFRJ) e do Laboratório de Neuroquímica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (CCS/UFRJ).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O principal objetivo do presente trabalho foi preparar nanocápsulas do polímero poli(metacrilato de metila) pelo método de polimerização em miniemulsão dupla do tipo A/O/A, visando ao encapsulamento de fármacos hidrossolúveis.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Propor um planejamento experimental para análise da estabilidade do sistema após a primeira emulsão usando três diferentes óleos;
- Preparar emulsões do tipo A/O/A com estabilidade adequada para conduzir o processo de polimerização em miniemulsão;
- Comparar os desempenhos obtidos com o uso do ultra-turrax e do homogeneizador de alta pressão na etapa de emulsificação, em termos das propriedades das emulsões e nanopartículas produzidas;
- Identificar as condições de emulsificação e polimerização *in situ* adequadas para a obtenção de nanopartículas do tipo nanocápsulas;
- Avaliar o encapsulamento e a liberação de uma biomolécula hidrofílica;
- Usar a Albumina de soro bovino (BSA) como biomolécula-modelo.

Capítulo II

Revisão Bibliográfica

Inicialmente, é apresentada uma revisão da literatura com a finalidade de explicar os conceitos fundamentais que serão aplicados no decorrer do trabalho. Dessa forma, o capítulo aborda diferentes técnicas usadas para a formação das nanopartículas poliméricas por meio da polimerização. Também, são discutidos os processos de emulsificação, com enfoque no estudo da estabilidade e dos métodos de formação de duplas emulsões. São evidenciadas ainda, as propriedades e aplicações das nanopartículas poliméricas, em especial, no campo farmacêutico.

2.1 POLÍMEROS

Os polímeros sempre fizeram parte do cotidiano humano. Desde os tempos mais remotos, o homem tem usado polímeros naturais como amido, celulose, borracha e seda, entre outros, para várias finalidades distintas. Entretanto, apenas partir da primeira metade do século XX, polímeros deixaram de ter apenas origem natural, passando a serem também obtidos por meio de síntese química (HAGE, 1998). Desde então, o estudo dos polímeros naturais e dos sintéticos desenvolveu-se mais rapidamente. Atualmente, a indústria de polímeros constitui um dos pilares do estilo de vida contemporâneo, uma vez que está presente nas mais diversas aplicações que nos cercam, além de serem empregados em quase todas as áreas das atividades humanas, incluindo desde confecção de embalagens e revestimentos até a preparação de sistemas nanométricos para o tratamento de doenças (OLIVEIRA, NELE e PINTO, 2013).

Polímeros são macromoléculas formadas por meio de reação de polimerização a partir de unidades estruturais menores, denominadas monômeros. Tais unidades são combinadas entre si e as unidade que se repetem ao longo da cadeia polimérica são conhecidas como meros (AKCELRUD, 2007; MAGRINI, 2012). Dentre as muitas vantagens competitivas dos polímeros destacam-se a facilidade de fabricação, alta resistência à corrosão, bom isolamento térmico e elétrico, bem como a versatilidade

estrutural. Ademais, as propriedades físicas dos polímeros provêm da resistência das ligações covalente, das forças intermoleculares entre as moléculas e da rigidez dos segmentos das cadeias poliméricas (MANO e MENDES, 2004). Ainda, polímeros sintéticos podem ser facilmente modificados quimicamente para manipulação de suas propriedades finais contendo melhor reprodutibilidade com desempenho mais previsível e homogêneo (TIAN *et al.*, 2012).

Existem diversas maneiras de classificar os polímeros, como quanto à origem natural ou sintética, ao número de monômeros que constituem as cadeias e ao mecanismo de polimerização. A depender do mecanismo envolvido na reação, Flory (1953) classificou as polimerizações em dois grandes grupos: polimerizações em etapas e polimerizações em cadeias. As polimerizações em etapas se caracterizam por sucessivas reações entre grupos funcionais reativos presentes nos monômeros e usualmente requerem longos períodos de tempo para se completar, porém não necessitam de iniciadores para promover a reação e caracterizam-se pela ocorrência do aumento da massa molar com o tempo de reação e de conversão. Em contrapartida, as polimerizações em cadeia requerem a presença de um iniciador para formar um centro ativo que inicia e propaga a polimerização rapidamente, comumente por aquecimento, formando cadeias longas logo no início do processo. Neste mecanismo, observa-se a adição sequencial de monômeros às cadeias poliméricas, que leva ao desaparecimento de um centro ativo e origina um novo, promovendo o crescimento da cadeia até que ocorra a terminação do centro ativo. A polimerização via radicais livres é o método mais amplamente empregado para promover a polimerização em cadeia (MANO e MENDES, 2004; ODIAN, 2004). As principais técnicas de polimerização radicalar serão discutidas brevemente nas próximas seções.

2.1.1 Técnicas de Polimerização Radicalar

Na polimerização radicalar, as espécies reativas são radicais livres gerados a partir da decomposição de iniciadores adicionados ao meio (MANO e MENDES, 2004), como ilustrado na Figura 1. Os principais processos utilizados nas polimerizações radicalares podem ser divididos em dois grandes grupos: sistemas homogêneos e sistemas heterogêneos, conduzidas em uma ou duas fases, respectivamente. Dentre os sistemas homogêneos de polimerização, citam-se os processos de polimerização em

massa e em solução. Já os processos heterogêneos incluem principalmente a polimerização em suspensão e em emulsão (MANO e MENDES, 2004; ODIAN, 2004).

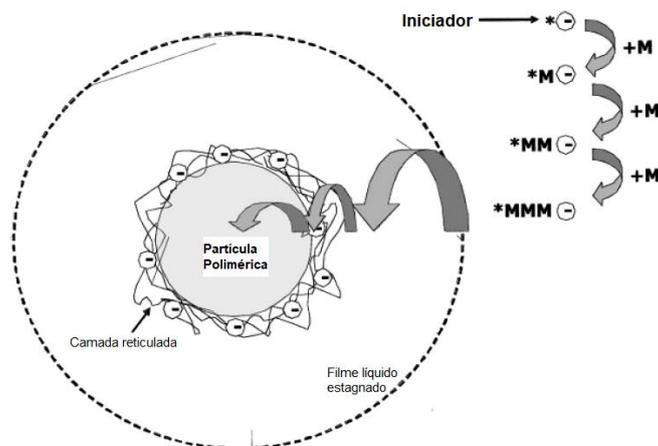


Figura 1 - Mecanismo ilustrativo de uma polimerização radicalar heterogênea iniciada no meio contínuo (adaptado de ASUA, 2004).

2.1.1.1 - Polimerização em Massa

O processo de polimerização em massa é o mais simples, uma vez que a reação requer apenas a presença do monômero e um iniciador de radicais livres. Conseqüentemente, o produto final apresenta alto grau de pureza. Todavia, há grande dificuldade para controlar a temperatura do meio, porque a reação é altamente exotérmica. Além disso, a alta viscosidade atingida pode comprometer a operação e a obtenção do produto final. Vale ressaltar que o processo demanda que o iniciador seja solúvel no monômero obrigatoriamente (CANEVAROLO JR., 2006; ODIAN, 2004).

2.1.1.2 - Polimerização em Solução

Esta outra técnica de polimerização homogênea permite controlar as melhores condições de reação por meio da adição de um solvente, que possibilita melhor homogeneização da temperatura reacional e transferência de calor mais efetiva para o processo de refrigeração. Todos os reagentes (monômero, iniciador e solvente) devem ser miscíveis entre si. Entretanto, a introdução de solventes aumenta a periculosidade, por serem algumas vezes tóxicos e ambientalmente incorretos, além de causar perda de produtividade e maiores custos para purificação e recirculação do solvente (CANEVAROLO JR., 2006; ODIAN, 2004).

2.1.1.3 - Polimerização em Suspensão

A técnica de polimerização em suspensão é caracterizada pela presença de duas fases imiscíveis, com intuito de manter algumas propriedades do polímero produzido em massa e facilitar o controle da reação. Normalmente, a fase orgânica composta pelo(s) monômero(s) e o iniciador, é disperso em uma fase contínua aquosa. Além disso, é adicionado um agente de suspensão com a finalidade de estabilizar a dispersão. A dispersão ocorre por meio da agitação do sistema, que promove a formação e dispersão de pequenas gotas de monômeros (entre 10 μm e 1 mm), que atuam como pequenos reatores em massa. A maior desvantagem deste processo é a possível formação de incrustações, que dificulta o uso em sistemas contínuos de reação (CANEVAROLO JR., 2006; ODIAN, 2004).

2.1.1.4 - Polimerização em Emulsão

Assim como na polimerização em suspensão, o controle da temperatura é facilitado pela presença de uma fase contínua na polimerização em emulsão. Entretanto, o iniciador usualmente é solúvel na fase contínua, ao invés de solubilizado no monômero. Além disso, a polimerização em emulsão se destaca pelos mecanismos de transferência de massa que envolvem as diferentes espécies do meio reacional (ODIAN, 2004). O complexo mecanismo de transferência de massa resulta da adição de emulsificantes na fase contínua, que causam a formação de micelas, que ficam inchadas com o monômero disperso na fase contínua. A polimerização se inicia com a degradação do iniciador no meio contínuo e formação dos radicais livres, que são capturados pelas micelas geradas pelo emulsificante e inchadas com monômero, ocorrendo a formação das partículas poliméricas. As micelas não nucleadas fornecem surfactante para as partículas em crescimento, promovendo a estabilização das gotas de monômero e das partículas poliméricas formadas. O produto final da reação, na forma de um látex, é constituído por partículas com diâmetros entre 50 nm a 1 μm dispersas no meio contínuo e pode ser empregado diretamente como produto final. O polímero também pode ser separado da fase aquosa (coagulação) e purificado (CANEVAROLO JR., 2006; MELO, 2015).

Os métodos de polimerização descritos nesta seção são utilizados com frequência em processos industriais. No entanto, para aplicações farmacêuticas, que consiste na proposta principal deste trabalho, um tipo particular de polimerização em emulsão denominado polimerização em miniemulsão é a mais indicada, principalmente por permitir o encapsulamento de ativos de forma mais simples e *in situ*, durante o processo de formação do polímero (PEIXOTO *et al.*, 2016).

2.1.2 Polimerização em Miniemulsão

As emulsões poliméricas são os sistemas dispersos mais empregados e estudados na área de polímeros (ROMIO, 2011). Todavia, tanto a degradação difusional quanto a coalescência das moléculas podem conduzir à instabilidade e subsequente quebrar a emulsão, levando à formação e separação de fases. Dessa forma, diferentes técnicas são usadas para minimizar o risco de desestabilização, incluindo o processo em miniemulsão (ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002; CAPEK, 2010; LANDFESTER, 2006). Ao contrário da emulsão convencional, na miniemulsão todas ou quase todas gotas monoméricas dispersas são nucleadas, permitindo a simplificação do processo de transporte de massa do monômero através da fase aquosa. Assim, a reação de polimerização ocorre principalmente nas gotas monoméricas originais, que funcionam como "nanorreatores" estáveis e independente umas das outras, enquanto em uma polimerização em emulsão convencional, isso acontece primeiramente na fase aquosa ou nas micelas preenchidas com monômeros e só então nas partículas monoméricas (LANDFESTER, 2006; MILLER, 1994; ROMIO, 2011).

O primeiro relato sobre a polimerização em miniemulsão foi feito por Ugelstad, El-aasser e Vandeerhoff (1973). Nesse estudo, os autores estudaram a polimerização em miniemulsão do estireno e mostraram que a formação de pequenas gotas estáveis (< 1 µm) do monômero por meio da dispersão no meio reacional, acarretava um aumento significativo da área específica. Por isso, as gotas monoméricas podiam competir de modo efetivo para a captura de radicais livres. Dessa forma, os autores concluíram que as gotas nucleadas eram os locais predominantes para a ocorrência da nucleação das partículas (OLIVEIRA, 2010).

As miniemulsões geram gotas poliméricas na faixa de 50-500 nm e com uma distribuição de tamanho de partículas relativamente homogênea. Nesse processo não

deve ocorrer formação de micelas, para evitar a nucleação micelar, de forma que a concentração de surfactantes deve estar idealmente abaixo da concentração micelar crítica (CMC) (OLIVEIRA, NELE e PINTO, 2013).

O processo de emulsificação e polimerização inicia-se com uma mistura prévia das fases líquidas, que contém agentes surfactantes e aditivos, como os iniciadores (geradores de radicais livres) e estabilizantes. O mecanismo típico inclui duas etapas características, como está esquematizado na Figura 2. Na primeira etapa, são formadas gotículas de monômero de diâmetro inferior à 500 nm por intermédio de intensa agitação, que dispersa uma fase em outra. A agitação ocorre com auxílio de homogeneizadores de alta eficiência (sonicador, ultra-turrax ou homogeneizador de alta pressão), que geram elevadas forças de cisalhamento, gerando emulsões de pequenas partículas com estreitas distribuições de tamanhos. Na segunda etapa, ocorre a reação de polimerização, que é promovida por um iniciador. O iniciador reage com a ligação dupla do monômero, provocando o crescimento da cadeia polimérica sem que se modifique idealmente as suas características morfológicas (PAIVA, MELO E PINTO, 2016; CAPEK, 2010; LANDFESTER, 2006; ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002).

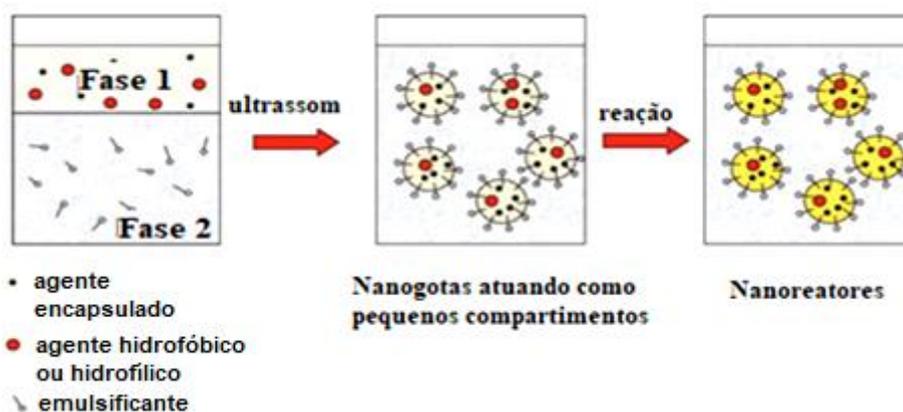


Figura 2 - Mecanismo característico de polimerização em miniemulsão (adaptado de LANDFESTER, 2006).

Em princípio, o processo de miniemulsão permite que qualquer tipo de monômero possa ser utilizado para formação de nanopartículas poliméricas não miscíveis na fase contínua. Dessa forma, o processo pode ser usado para conduzir uma gama de variedade de reações de polimerização e de produtos (ANTONIETTI & LANDFESTER, 2002). Ademais, na polimerização em miniemulsão pode ocorrer a incorporação de ativos a sistemas poliméricos *in situ*. Esse processo permite que os ativos sejam misturados diretamente nas gotas monoméricas e encapsulados em uma

única etapa de reação, sendo possível trabalhar com alta carga de ativos (PAIVA, MELO E PINTO, 2016; PEIXOTO *et al.*, 2016). Tatar, Sumnu e Sahin (2017) enfatizaram ainda que as miniemulsões permitem a obtenção de produtos com elevada transparência mesmo com altas frações de fase dispersa, resistem melhor ao transporte difusivo e apresentam maior vida útil quando comparadas com emulsões convencionais.

2.1.3 Poli(metacrilato de metila) (PMMA)

A escolha do monômero a ser utilizado na polimerização em miniemulsão representa uma etapa muito importante, devido ao potencial de toxicidade e custo de desenvolvimento e aplicação. O metacrilato de metila, ou metil metacrilato (MMA) é o monômero precursor do poli(metacrilato de metila) (PMMA), conforme esquematizado na Figura 3. Ademais, por se tratar de um monômero de cadeia curta, sua cinética de polimerização é rápida e de conversão alta, resultando em rápido e eficiente aprisionamento da droga com baixíssimo percentual de monômero residual (VRIGNAUD, BENOIT e SAULNIER, 2011b). A presença do grupo éster na cadeia do MMA torna o polímero mais polar. O PMMA apresenta baixa toxicidade e alta biocompatibilidade, fatores que tornam factível o emprego desse composto em aplicações farmacêuticas e cosméticas (MENDES *et al.*, 2012).

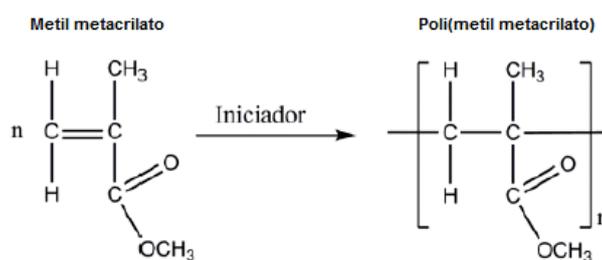


Figura 3 - Representação esquemática da reação de polimerização do MMA.

O PMMA é um polímero termoplástico, barato, biocompatível e bioestável, com grande versatilidade estrutural. O PMMA foi o primeiro polímero acrílico empregado como biomaterial, inclusive em processos de revestimento farmacêutico; por isso é bastante conhecido e estudado como modelo para o desenvolvimento de encapsulamento de ativos e liberação controlada de fármacos, inclusive para conjugação com proteínas e biomoléculas (MENDES *et al.*, 2012; UCHEGBU e SCHATZLEIN, 2006). Pode-se citar, por exemplo, a eficácia do uso de micropartículas de PMMA em

liberação de drogas anti-microbianas e antibióticas para tratamento de infecções ortopédicas (ANGUITA-ALONSO *et al.*, 2007; CONNIOT, 2011) e de liberação de fármacos para tratar problemas gastrointestinais (TAO, LUBELEY e DESAI, 2003; YUKSEL *et al.*, 2011). Estudos *in vivo* também já mostraram a eficácia das nanopartículas de PMMA e sua não-toxicidade (BETTENCOURT e ALMEIDA, 2012; DHANA LEKSHMI *et al.*, 2010; FONSECA, 2012). No trabalho de Dhana Lekshmi e colaboradores (2010), o ensaio de toxicidade *in vivo* em ratos não mostrou alterações significativas nos exames bioquímicos e patológicos ao introduzir por via oral, nanopartículas de PMMA contendo o medicamento antidiabético Repaglinida.

Vários trabalhos do grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Polimerização (EngePol) têm usado o PMMA para o encapsulamento de fármacos. Por exemplo, Fonseca e colaboradores (2013b) prepararam nanopartículas de PMMA carregadas com Praziquantel, fármaco usado para o tratamento da esquistossomose, por meio de polimerizações em miniemulsão *in situ*, com a finalidade de mascarar o sabor amargo do fármaco. Além disso, os autores comprovaram a baixíssima ou inexistência de monômero residual nas nanopartículas após o processo de secagem por liofilização, mesmo quando as conversões de monômeros foram em torno de 50%. Já no trabalho de Peixoto (2013) foram produzidas partículas de PMMA funcionalizadas por copolimerização em miniemulsão, para interagir com biomoléculas e promover liberação de medicamentos sítio-dirigida.

O número de aplicações do PMMA nas áreas médica e farmacêutica ainda está aumentando, devido às suas propriedades físicas e químicas rentáveis, como por exemplo alta resistência ao calor e à luz, à fácil modificação química, à boa transparência, às propriedades de superfícies facilmente manipuláveis, boa estabilidade biológica, além da facilidade de processamento e formação do produto (GAŁKA KOWALONEK e KACZMAREK, 2014).

2.2 EMULSÃO

Assim como anunciada brevemente no item 2.1.1.4, emulsões são dispersões coloidais em que um líquido é disperso em uma fase contínua, formando portanto uma mistura heterogênea (MYERS, 1999; SCHRAMM, 2005). Emulsões são sistemas

termodinamicamente instáveis, pois acumulam elevada energia livre na interface das fases (PEREIRA e GARCIA-ROJAS, 2015). No entanto, a cinética de desestabilização pode ser muito lenta, ao passo que na prática as emulsões podem ser consideradas estáveis em muitas aplicações.

Segundo Myers (1999), é sempre necessário especificar a função de cada uma das fases que constituem as emulsões. Conforme o autor, em quase todos os casos ao menos um líquido é a água ou uma solução aquosa, sendo o outro um composto apolar (usualmente chamado de fase oleosa). Desse modo, é comum a descrição da emulsão como sendo do tipo óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O), na qual a primeira letra representa a fase dispersa e a segunda letra representa a fase contínua. Esses dois tipos de emulsões são chamadas de emulsões simples; no entanto, ainda existe outro grupo conhecido como emulsões duplas ou múltiplas, cujos os tipos mais habituais são de água-em-óleo-em-água (A/O/A) e de óleo-em-água-em-óleo (O/A/O). As emulsões duplas consistem na dispersão da fase dispersa interna em uma fase contínua para formar a emulsão primária. Esta emulsão primária é então dispersa em uma segunda fase contínua, formando a emulsão secundária. O estudo das emulsões do tipo A/O/A constitui o tema do presente trabalho, e será melhor retratado no tópico 2.3. A representação esquemática dos tipos de emulsão mencionados estão esquematizados na Figura 4.

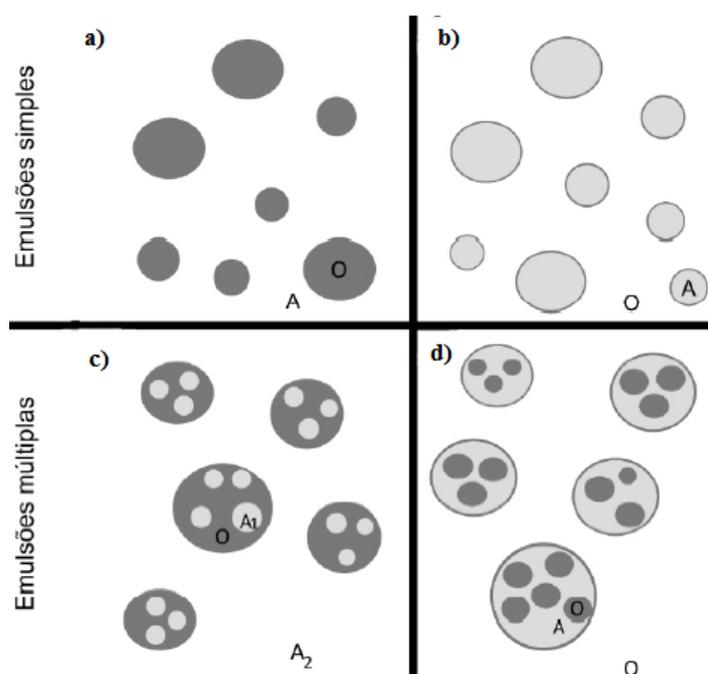


Figura 4 - Representação esquemática das emulsões simples a) O/A e b) A/O; e emulsões duplas c) A/O/A e d) O/A/O (PEREIRA e GARCIA-ROJAS, 2015).

2.2.1 Processo de Emulsificação

O processo de emulsificação resume-se basicamente em duas etapas. Primeiramente, ocorre a deformação e a ruptura das gotas por meio da homogeneização do sistema, aumentando a área interfacial específico. Em seguida, a estabilização da nova interface, promovida por um agente emulsificante, caso contrário as gotas voltarão a se agregar até a separação completa de fases (MYERS, 1999).

Uma gama de equipamentos de homogeneização está disponível comercialmente, principalmente para preparação de miniemulsões, dentre eles podem ser citados os sonicadores, os rotores e os homogeneizadores de alta pressão.

Os sonicadores usam o fenômeno de cavitação como principal mecanismo de emulsificação. A produção de ondas de ultrassom causa oscilação das moléculas e das fases situadas ao redor do sonicador (MELO, 2015; SAMER e SCHORK, 1999). Asua (2002) sustenta que as ondas de choques produzidas e o colapso das bolhas produzidas pelas oscilações de pressão causam a quebra das gotículas de monômero. Durante a sonificação, as gotas mudam de tamanho rapidamente ao longo do tempo, até atingirem um pseudo-estado estacionário. No entanto, uma limitação intrínseca associada ao sonicador consiste na pequena região de fluido afetada pelas ondas de ultrassom, que encontra-se próxima ao equipamento. Assim, é necessário que o fluido passe por essa região para que ocorra a quebra das gotas. Conseqüentemente, as características da emulsão dependerão do tempo de sonicação, da potência aplicada e do mecanismo de bombeamento do fluido através da sonda de ultrassom. Por isso, apesar de ser comum e eficientemente aplicado em escala laboratorial, o escalonamento industrial do processo pode ser complexo e dispendioso, devido à complexidade dos sistemas mecânicos móveis e da área de exposição requerida (MELO, 2015).

Alguns sistemas utilizam rotores de alta eficiência para promover a homogeneização, sendo o ultra-turrax o mais conhecido. Esse aparelho apresenta uma cabeça de agitação que opera com rotação mínima de 3000 rpm. O processo de emulsificação inicia-se por meio da agitação das pás, que geram um vácuo relativo, puxando o líquido para dentro da cabeça de agitação. Em seguida, devido à força centrífuga, o líquido é deslocado para a periferia da cabeça de rotação, onde é submetido à ação de altas taxas de cisalhamento na região entre as extremidades da lâminas e as aberturas do estator, que promove a quebra das gotas e a formação da emulsão. Portanto, o tamanho da gota final depende da velocidade de rotação do rotor,

assim como da geometria do sistema. Assim como no caso anterior, o escalonamento industrial pode ser complexo por conta do excessivo consumo de energia e da complexidade dos sistemas mecânicos móveis (ASUA, 2002; LOPEZ *et al.*, 2008; MELO, 2015). Porém, o uso do rotor em escala de bancada é de fácil manuseio e transporte e é bastante popular, inclusive para preparação de miniemulsões (FONSECA *et al.*, 2013b; PEIXOTO *et al.*, 2016) e duplas emulsões em geral (MUN *et al.*, 2010; WISCHKE e BORCHERT, 2006). Por esses motivos, o ultra-turrax foi usado para as análises iniciais conduzidas no presente trabalho, bem como para comparação da eficiência e das características resultantes do produto final.

Os homogeneizadores de alta pressão, da mesma forma que os outros acima citados, são equipamentos de alta eficiência e têm a finalidade de diminuir o tamanho característico das gotas para domínios micro, sub-micro e nanométrico, o que o torna essencial para a qualidade, uniformidade e padronização do produto. É um processo puramente mecânico que provoca cisalhamento através da velocidade, pressão e impacto das partículas que atravessam uma fenda. O mecanismo de funcionamento está baseado em uma bomba de pistões de deslocamento positivo, com pressão do sistema controlada por uma válvula que restringe a passagem do líquido (pré-emulsão) à altas velocidades através de um estreito orifício. A combinação do fluxo forçado e da turbulência gerada levam à formação das pequenas gotas (MELO, 2015; OLIVEIRA, 2010). A Figura 5 ilustra o funcionamento de um homogeneizador do tipo Manton-Gaulin, utilizado para reduzir o tamanho de gotas de uma suspensão pré-formada. As variáveis que afetam a uniformidade e diâmetro das gotas são principalmente a pressão, o tempo de operação, o número de ciclos (passagem do produto pela bomba) e a concentração de surfactante. As principais limitações estão associadas aos riscos operacionais, devido à altas pressões, e a problemas de entupimento das aberturas internas (MELO, 2015; OLIVEIRA, 2010).

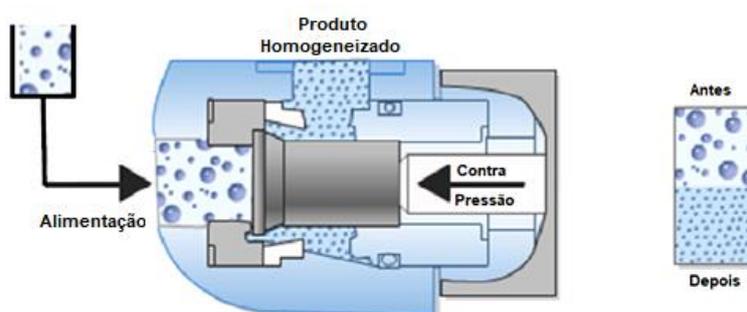


Figura 5 - Esquema ilustrativo da válvula de um homogeneizador de alta pressão, do tipo Manton-Gaulin. (OLIVEIRA, 2010).

A técnica de homogeneização é muito simples e, por isso, é muito usada em ambientes industriais há mais de um século para o preparo de dispersões (MELO, 2015). Decorrente disto, indústrias de alimentos em geral utilizam amplamente os homogeneizadores de alta pressão, pois promovem ao produto final uma textura homogênea mais atrativa para os consumidores. A redução do tamanho de partículas e a homogeneização também favorecem o uso em indústrias de cosméticos em vista da aplicação de nanopartículas capazes de serem absorvidas pela pele. Da mesma forma para as indústrias farmacêuticas, na qual as nanopartículas formadas são capazes de atuar de forma mais eficientes, além de possibilitar o rompimentos de células e na preparação de novos medicamentos e vacinas (ARTEPEÇAS, 2017). Com base nesses fatos, o presente trabalho pretende investigar a eficiência do homogeneizador de alta pressão para formação de miniemulsões duplas para posterior polimerização *in situ*, caracterizando a viabilidade do processo em escala industrial.

Muitos trabalhos vêm investigando o comportamento de emulsões quando empregados diferentes tipos de homogeneizadores em miniemulsões. Lopez *et al.* (2008), por exemplo, compararam o uso dos três equipamentos supracitados em termos da estabilidade e propriedades das emulsões obtidas. Os autores concluíram que o homogeneizador de alta pressão foi o equipamento que apresentou melhor eficiência dentre os três, embora o sonificador também tenha permitido obter bons resultados, porém é ineficiente para o escalonamento. Tais resultados foram também observados por Fonseca *et al.* (2013b), para os quais o melhor desempenho de emulsões de PMMA foi obtido com o uso do homogeneizador de alta pressão, uma vez que proporcionou maior estabilidade e elevadas eficiências de encapsulamento do fármaco praziquantel. É relevante informar que poucos trabalhos estudaram o desempenho desses equipamentos para o preparo e uso de emulsões duplas, em que foi verificado a performance do processo de emulsificação quanto a velocidade de rotação do ultra-turrax (GLASSER *et al.*, 2016), quanto o tempo de emulsificação do homogeneizador de alta pressão (LAMPRECHT *et al.*, 2000), ou quanto a pressão aplicada no homogeneizador de alta pressão (MUN *et al.*, 2010), por isso existe a necessidade de conduzir mais estudos nessa área.

A respeito dos emulsificantes existentes, quatro tipos de materiais podem atuar, impondo uma barreira estérica ou eletrostática na interface, a saber: compostos iônicos, sólidos coloidais, polímeros polares e surfactantes. O último é a maior e mais

empregada classe de emulsificantes. Surfactantes ou tensoativos são substâncias anfifílicas, ou seja, apresentam na estrutura molecular um seguimento com afinidade pela fase aquosa (hidrofílico) por possuir polaridade e outro com maior afinidade pela fase orgânica (hidrofóbico). Tal estrutura promove a redução da tensão interfacial, uma vez que cada parte da molécula fica em contato com a fase de maior afinidade, isto é, a fração apolar se dispersa na fase oleosa, enquanto a fração polar se mistura com a fase aquosa, de maneira que a orientação energeticamente mais favorável para essas moléculas é a localização nas interfaces (SCHRAMM, 2005; MYERS, 1999).

Devido à alta efetividade, os surfactantes apresentam importância vital para a maioria dos sistemas de emulsificação, facilitando a formação de gotas pequenas de fase dispersa com menor adição de energia (MYERS, 1999). Para tanto, o surfactante deve reduzir a tensão interfacial entre os líquidos de tal forma que as novas interfaces das gotas sejam formadas rapidamente e que sejam rapidamente recobertas por ao menos uma monocamada de surfactante, a fim de evitar a agregação entre as gotas (LINDMAN et al., 2000). A escolha do surfactante deve atender aos requisitos de disponibilidade para adsorção na superfície da gota, para formar um filme que minimize os efeitos do choque entre as partículas, de eficiência mesmo em baixas concentrações, sendo o uso barato, seguro e não tóxico, principalmente para fins medicinais (ASUA, 2002).

De acordo com o tipo de emulsão que se deseja produzir, a escolha do tensoativo é de suma importância, uma vez que cada classe de surfactantes se adequa melhor a um determinado tipo de emulsão. Neste sentido, uma regra qualitativa, conhecida como regra de Bancroft sustenta que surfactantes mais solúveis na fase aquosa geram emulsões O/A, enquanto surfactantes lipofílicos produzem emulsões A/O (LINDMAN et al., 2000). Por outro lado, Griffin (1949) propôs um conceito quantitativo, definido como balanço hidrofílico-lipofílico (*hydrophilic-lipophilic balance* - HLB), que impõe uma faixa referente a cada tipo de sistema emulsionado. Este conceito é uma aproximação baseada numa escala empírica adimensional de 0 a 20, determinada a partir do balanço entre tamanho e força dos grupamentos hidrofílicos e lipofílicos de uma molécula emulsificante, e, conseqüentemente da solubilidade deste surfactante nas fases. Baixos valores de HLB são atribuídos a tensoativos lipofílicos, enquanto altos valores de HLB são conferidos para surfactantes hidrofílicos. Portanto, segundo a escala, emulsões O/A precisam de emulsificantes com HLB entre 8-18, enquanto HLBs entre 4-6 são recomendados para emulsões do tipo A/O (Tabela 1). O HLB é usado para

surfactantes não-iônicos e é bastante útil para iniciar a seleção de um surfactante quando se deseja produzir uma emulsão (GRIFFIN, 1949; LINDMAN *et al.*, 2000; SCHMIDTS *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Faixa de aplicações de surfactantes como função do HLB (Griffin, 1949).

Faixa de HLB	Aplicação
4 -6	Emulsões A/O
7 - 9	Agentes de molhabilidade
8 - 18	Emulsões O/A
13 -15	Detergentes
15 - 18	Solubilizantes

2.2.2 Estabilidade da Emulsão

Como já mencionada anteriormente, a preparação de uma emulsão requer a formação de grande área interfacial entre os líquidos imiscíveis, o que exige um trabalho proporcional à tensão interfacial do sistema. Assim, as emulsões são caracterizadas naturalmente como sistemas termodinamicamente instáveis. Para atingir um estado de menor energia livre, deve ocorrer a redução da área interfacial, o que é alcançado quando há o aumento do tamanho das partículas e a subsequente separação de fases (MYERS, 1999).

Dessa forma, o preparo de um sistema emulsionado estável (quase sempre definido em termos cinéticos) é de extrema relevância e torna-se um grande desafio para a formulação e definição das condições de trabalho. Ademais, deve ser ressaltado que a estabilidade das gotas apresenta papel fundamental na preparação e condução da polimerização em miniemulsão (MELO, 2015) e na produção de pigmentos, cosméticos e fármacos, por exemplo (WISNIEWSKA, 2010). A estabilidade de emulsões depende de diversos fatores, tais como: a diferença de densidade entre as fases aquosas e oleosas; a agitação; o tamanho das gotas da fase dispersa; a viscosidade da fase contínua; a razão mássica entre as fases; a tensão interfacial do sistema; e a presença e concentração de emulsificantes (STEWART e ARNOLD, 2009).

A instabilidade termodinâmica de uma emulsão é caracterizada na prática pela variação do tamanho das gotas e pela agregação e migração das gotas, envolvendo mecanismos de desestabilização, como a coalescência, floculação, sedimentação e

cremação, assim como ilustrados na Figura 6 (DE ALMEIDA, 2014; FORMULACTION, 2013; GOODWIN, 2004).

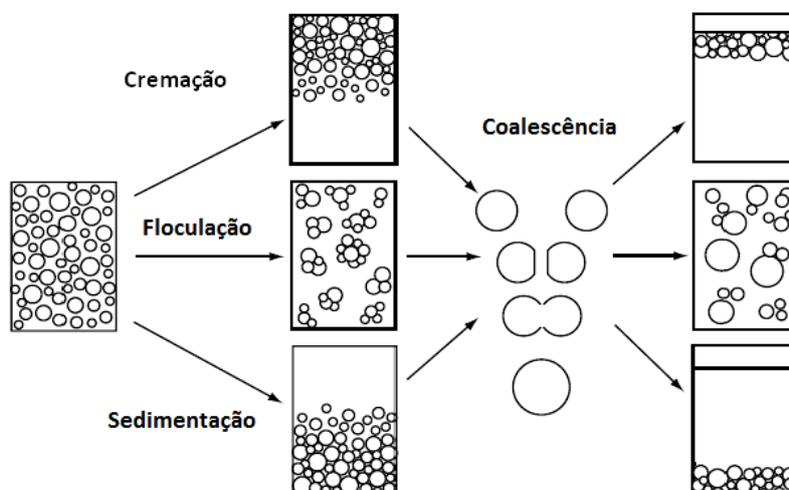


Figura 6 - Esquema ilustrativo dos fenômenos de desestabilização de emulsões. Processos diferentes podem ocorrer simultaneamente (DE ALMEIDA, 2014).

Os fenômenos de cremação e sedimentação são reversíveis, de forma que o estado original pode ser restabelecido com uso de forças de cisalhamento. Além disso, estão relacionados com a migração da partícula devido a diferença de densidade entre os líquidos. A cremação ocorre quando a fase dispersa tem menor densidade que a fase contínua, e por isso a fração volumétrica da fase dispersiva cresce no topo da célula e diminui no fundo. Já para a sedimentação esse processo acontece na direção oposta (FORMULACTION, 2013; GOODWIN, 2004; MENGUAL *et al.*, 1999).

Por outro lado, a floculação e a coalescência constituem fenômenos físico-quimicamente diferentes, embora ambos conduzam ao incremento do tamanho global das partículas. A floculação é caracterizada pela agregação das partículas, embora elas mantenham a individualidade. É um fenômeno usualmente reversível, porém em algumas situações pode ser irreversível, sendo chamado de coagulação. Em contrapartida, a coalescência é mais severa, e irreversível. Por meio da colisão entre as gotas, a coalescência conduz à fusão de duas ou mais gotas, rompendo a interface e por conseguinte gera uma única gota maior ao final (FORMULACTION, 2009; GOODWIN, 2004).

Outro mecanismo de desestabilização (não descrito na Figura 6), mas que pode ser encontrado em miniemulsões (ANTON, BENOIT e SAULNIER, 2008; MELO 2015) e em emulsões duplas (SCHMIDTS *et al.*, 2010), é chamado de degradação

difusional (maturação de Ostwald, ou ainda *Ostwald ripening*). Assim como na coalescência, o fenômeno é irreversível e pode causar variação no tamanho da partícula. Esse fenômeno é resultado da diferença de atividade nas gotas pequenas e grandes, dada pela diferença de pressão de Laplace, quando o sistema possui distribuição larga do tamanho de partículas. As gotas menores, por apresentarem maior área específica, possuem maior atividade, e por consequência, gera um mecanismo de difusão contínua das partículas menores para as maiores através do meio contínuo, promovendo o desaparecimento das gotas menores (ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002; GOODWIN, 2004). A Figura 7 ilustra a diferença dos fenômenos de coalescência e degradação difusional. Para combater a degradação difusional, é comum adicionar espécies de alta massa molar à fase dispersa, para reduzir a tendência de migração das espécies de menor massa molar para as gotas maiores, preservando a distribuição de tamanhos (MELO 2015). Esses compostos são chamados de co-estabilizantes.

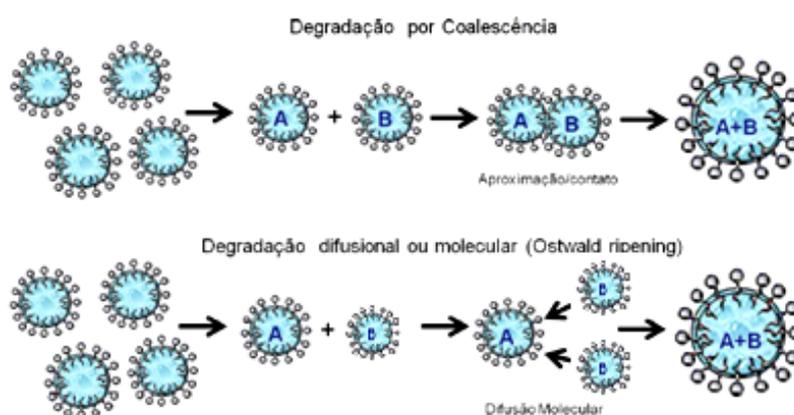


Figura 7 - Representação de mecanismos de degradação em miniemulsões (OLIVEIRA, 2010).

Os fenômenos de desestabilização podem ser retardados ou minimizados pela presença dos estabilizantes, como também com a adição de outros aditivos que permitam aumentar a viscosidade da fase contínua do sistema (para dificultar a migração e colisão de partículas); diminuir a pressão osmótica (em contraposição à elevada pressão de Laplace nas gotas menores); e minimizar a tensão interfacial (para diminuir a energia livre da interface).

2.3 EMULSÕES DUPLAS

O primeiro artigo sobre dupla emulsão foi publicado em 1924 (SEIFRIZ, 1924 apud IQBAL *et al.*, 2015), porém investigações mais profundas sobre dupla emulsão só foram iniciadas efetivamente no final da década de 1970. Desde então, o assunto tem sido reportado para a produção de diversos fármacos, alimentos, cosméticos e outros produtos de alto valor.

Duplas ou múltiplas emulsões são sistemas compostos por três diferentes fases fluidas, em que a fase mais interna é encapsulada por uma segunda fase imiscível, que por sua vez, está dispersa em uma terceira fase. Em outras palavras, é uma emulsão simples dispersa em uma fase não-miscível, gerando uma emulsão secundária. Por isso, esse arranjo complexo também é conhecido por "emulsão de emulsão" (IQBAL *et al.*, 2015; PAL, 2011; YILDIRIM, SUMNU e SAHIN, 2017). Pavel (2004) ainda define essa técnica como de emulsão bicontínua, pois as gotas internas poderiam estar dispersas em duas fases contínuas.

Da mesma forma que emulsões simples, as emulsões duplas são sistemas termodinamicamente instáveis que requerem o uso de agentes tensoativos para estabilizar e delimitar as interfaces. Porém, como este caso possui duas interfaces instáveis, é preciso que pelo menos dois surfactantes sejam usados para evitar a agregação entre as gotas, um para cada interface presente. A escolha dos surfactantes também segue a regra de Bancroft, descrita no item 2.2.1, e portanto, a estabilização da interface interna, água em óleo por exemplo, é garantida pela presença de um surfactante lipofílico na fase oleosa, e conseqüentemente a interface externa (A/O)/A pode ser estabilizada por um surfactante hidrofílico contido na fase aquosa externa (KIM *et al.*, 2003; YILDIRIM, SUMNU e SAHIN, 2017). A influência de vários emulsificantes sobre a estabilidade da dupla emulsão foi estudada em vários trabalhos publicados (BAI *et al.*, 2015; FICHEUX *et al.*, 1998; SCHMIDTS *et al.*, 2009; SCHUCH; LEAL; SCHUCHMANN, 2013; ZHU *et al.*, 2005)

Os tipos de emulsão dupla mais comuns encontrados na literatura são de água-em-óleo-em-água (A/O/A) (gotas de óleo dispersas, contendo gotículas aquosas menores) e óleo-em-água-em-óleo (O/A/O) (glóbulos aquosos dispersos, contendo pequenas gotículas oleosas) (FICHEUX *et al.*, 1998; IQBAL *et al.*, 2015). Porém, existem trabalhos que utilizaram outras combinações, como gás-em-óleo-em-água

(G/O/A) (WANG *et al.*, 2014), óleo-em-óleo-em-água (O/O/A) (XIAO, SHEN e TAO, 2013), sólido-em-óleo-em-água (S/O/A), sólido-em-óleo-em-óleo (S/O/O) (YE, KIM e PARK, 2010), entre outros.

Cada gota de óleo dispersa em uma emulsão A/O/A forma uma estrutura vesicular com compartimentos aquosos simples ou múltiplos, separados da fase aquosa externa por uma camada de componentes de fase oleosa (HUNTER *et al.*, 1997). Por exibir diferentes tipos de compartimentos, Florence e Whitehill (1981) identificaram e classificaram as gotas de dupla emulsão em três tipos, A, B e C, os quais não existem exclusivamente em um sistema, embora geralmente um deles é predominante. Na Figura 8 é possível observar a diferença entre eles com relação ao tamanho e quantidade de gotas. O tipo A é o mais simples e consiste em uma única gota da fase aquosa interna para cada gota oleosa (Figura 8.a). O tamanho de gota no sistema de emulsão do tipo B é maior e é composto por várias pequenas gotículas (menos que 50) da fase aquosa interna (Figura 8.b). O sistema torna-se mais complexo (tipo C), quando são encapsuladas numerosas gotículas de fase aquosa interna (Figura 8.c).

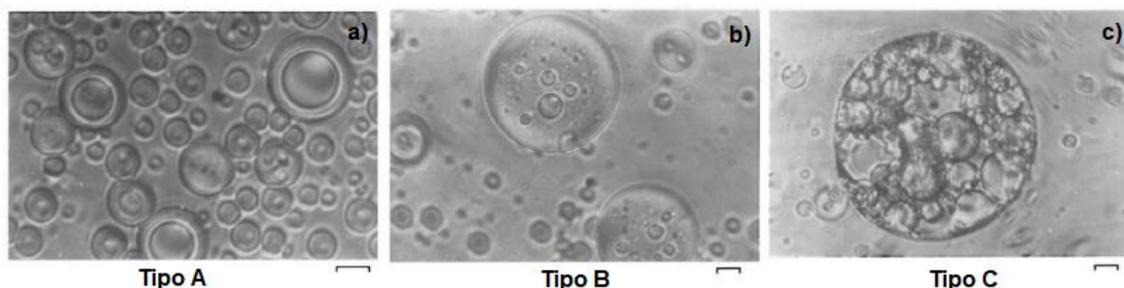


Figura 8 - Tipos de gotas de dupla emulsão (Adaptado de FLORENCE e WHITEHILL, 1981).

Emulsões de óleo em água (O/A) são geralmente adotadas para o encapsulamento de agentes insolúveis ou pouco solúveis em água; dessa forma, podem ser administrados compostos hidrofóbicos com maior eficiência farmacêutica. Emulsões de água em óleo (A/O) são insolúveis em água e usualmente apresentam alta viscosidade, dificultando o transporte pelas artérias ou capilares (IQBAL *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2011). Diante disso, o uso de emulsões duplas apresenta vantagens em relação às emulsões convencionais, principalmente, no que se refere ao encapsulamento, proteção e liberação controlada de bioativos. Tal fato se deve à presença de duas fases imiscíveis que limitam a difusão do ativo da fase interna para a externa. Assim, a fase interna funciona como um reservatório confinado, protegendo compostos sensíveis à luz, à degradação enzimática, à oxidação e a outros fatores externos (PEREIRA;

GARCIA-ROJAS, 2015; TATAR; SUMNU; SAHIN, 2017; VRIGNAUD; BENOIT; SAULNIER, 2011a). Por isso, a técnica de emulsão dupla pode ser o método mais adequado para incorporar e administrar compostos hidrofílicos, presentes predominantemente na fase aquosa interna (GEZE *et al.*, 1999; MEDEIROS, 2013; YE, KIM e PARK, 2010).

Deve-se enfatizar que a técnica de dupla emulsão também apresenta potencial para encapsular ambos compostos hidrofílicos e lipofílicos simultaneamente, porém em regiões distintas das partículas (IQBAL *et al.*, 2015). Nessa perspectiva, Shi *et al.* (2003) encapsularam, por emulsão A/O/A, a proteína hidrofílica Albumina de soro (BSA) bovino e o peptídeo hidrofóbico Ciclosporina A (CyA) em microesferas poliméricas de POE/PLGA com parede dupla. Devido à diferença de hidrofilicidade, cada uma ficou retida nas diferentes regiões da partícula (casca e núcleo). Durante os primeiros 5 dias, a maior parte da BSA foi liberada da casca, mas apenas 14% de CyA saíram do núcleo. Posteriormente, mais de 80% de CyA foram liberados das partículas nos 25 dias seguintes, promovendo assim uma liberação mais controlada.

A presença de um reservatório interno separado da fase contínua por uma camada imiscível intermediária possibilita o uso das duplas emulsões em diversas aplicações (HATTREM *et al.*, 2014). Ademais, são variados os setores industriais que mostram um interesse para o desenvolvimento tecnológico de tais sistemas complexos. No campo cosmético, oferece a possibilidade de combinar ingredientes incompatíveis na mesma formulação para aumentar a eficácia. Na indústria alimentar, promove melhoria das propriedades organolépticas dos alimentos, atua no mascaramento do sabor e no encapsulamento e liberação controlada de aromatizantes e ingredientes funcionais, reduzindo o teor de sal e gordura de alimentos, por exemplo. Os produtos formulados como emulsões múltiplas também podem ser muito apreciados em outros setores, como agricultura, limpeza e controle ambiental (FICHEUX *et al.*, 1998; IQBAL *et al.*, 2015; SAHIN, SAWALHA e SCHROËN, 2014; YILDIRIM, SUMNU e SAHIN, 2017). Contudo, a maior parte das aplicações está relacionada à área farmacêutica, principalmente como potencial veículo para transporte e liberação de vários medicamentos hidrofílicos (vacinas, vitaminas, enzimas, hormônios, proteínas), que podem ser liberados progressivamente. O impacto das emulsões duplas concebidas como sistemas de administração de fármacos pode ter importância significativa no

campo de liberação controlada, para administrações orais, tópicas ou parenterais (FICHEUX *et al.*, 1998; TAMNAK *et al.*, 2016).

Quanto às desvantagens da emulsão dupla, pode-se relatar maior complexidade e estabilidade relativamente mais baixa, vista em termos da interação (i) entre pequenas gotículas internas, (ii) entre grandes glóbulos, e (iii) entre o glóbulo e as pequenas gotículas dispersas. A instabilidade pode facilitar a difusão indesejada de agentes da fase aquosa interna para a externa, e vice-versa. Além disso, partículas produzidas por esta técnica são comparativamente heterogêneas e o tamanho de partícula é sensível a vários parâmetros do processo, como as cargas de surfactantes e as frações de água e óleo. Assim sendo, os mecanismos de estabilidade e liberação devem ser claramente compreendidos e monitorados (FICHEUX *et al.*, 1998; IQBAL *et al.*, 2015; TAMNAK *et al.*, 2016).

Apesar das vantagens comparativas da polimerização em miniemulsão e da técnica de dupla emulsão, poucos estudos comparam as duas técnicas para a produção de nanopartículas poliméricas, o que seria interessante, pois a técnica de miniemulsão tende a reduzir e estreitar a distribuição de tamanho das partículas. Kim e colaboradores nos anos de (1999, 2000 e 2003) estudaram a produção de partículas ocas de PMMA por meio emulsificação dupla, seguida da polimerização para uso em filtros solares, uma vez que partículas ocas tem a capacidade de proteger a pele contra a radiação ultravioleta e controlar a diferença no índice de refração entre o polímero e o ar, dispersando melhor a luz. Contudo, as pesquisas tiveram enfoque na produção de partículas em escala micrométrica e não comentaram o uso do sistema para o desenvolvimento de aplicações farmacêuticas. Por essas razões, o presente trabalho pretende estudar as condições necessárias para formar miniemulsões múltiplas e promover uma polimerização do óleo intermediário, com o objetivo de gerar nanopartículas com características satisfatórias para encapsulamento de ativos e atender necessidades do mercado farmacêutico.

2.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

A área relacionada à produção e uso das nanopartículas poliméricas (NPP) vem se expandindo consideravelmente, exercendo um papel essencial em diversas áreas de

aplicações, que incluem materiais eletrônicos e fotônicos, materiais condutores e sensores, biotecnologia e nanomedicina, tecnologia de alimentos, controle de poluição, entre outros. Prova disso é o crescente número de publicações que podem ser encontradas no Scopus® (Figura 9) e em veículos de publicações científicas. Essa tendência é explicada pela propriedades únicas desses materiais, os quais atendem a vasta gama de aplicações e necessidades do mercado (RAO e GECKELER, 2011).

O processo de obtenção das NPPs é normalmente prático, fácil e reproduzível, com baixo custo, com boa capacidade de controle das propriedades finais, possibilitando a produção de ampla gama de polímeros (VRIGNAUD, BENOIT e SAULNIER, 2011a). Ademais, Schaffazick *et al.* (2003) definem as nanopartículas como sistemas coloidais ou carregadores sólidos de ativos, que apresentam tamanho suficientemente pequeno para injeção direta no sistema circulatório, garantindo obtenção de um produto biocompatível e biodisponível, toxicologicamente seguro e que pode ser eliminado pelas vias metabólicas normais.

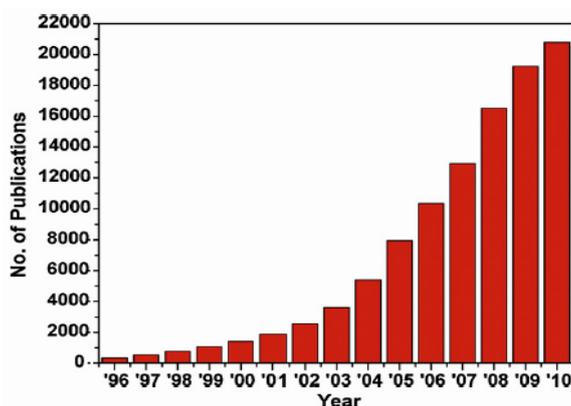


Figura 9 - Número de publicações citadas no Scopus® sobre nanopartículas poliméricas entre 1996 e 2010 (RAO e GECKELER, 2011).

De maneira geral, são consideradas nanopartículas as partículas que possuem alguma dimensão característica entre 10 nm a 1µm (ANTON, BENOIT e SAULNIER, 2008). Para muitas aplicações, especialmente em medicina, cosméticos, alimentos e marcadores eletrônicos de alta resolução, as NPPs entre 50 e 300 nm são de particular interesse (TIARKS, LANDFESTER e ANTONIETTI, 2001). Para tratamento de tumores, por exemplo, partículas com tamanho menores que 200 nm oferecem muitas vantagens, pois são capazes de permear e se acumular nas cavidades tumorais mais facilmente, tornando a atuação do fármaco mais dirigida e rápida e o tratamento mais eficiente (MORRAL-RUÍZ *et al.*, 2013). As NPPs normalmente são caracterizadas por

apresentarem alta superfície de contato e grande número de partículas por unidade de massa. Quando as nanopartículas são formadas, a área superficial específica por unidade de massa pode aumentar muitas ordens de grandeza à medida que a partícula é reduzida. Esse fato pode alterar profundamente as propriedades originais do material bruto, como a temperatura de fusão e a solubilidade; conseqüentemente, as funcionalidades podem ser muito afetadas, quando comparadas às funcionalidades do mesmo produto na forma macrométrica (DAUDT *et al.*, 2013).

Sistemas nanoestruturados podem ser comumente formados como nanoesferas ou nanocápsulas, que diferem em termos de organização estrutural. As nanoesferas são constituídas por uma matriz polimérica compacta e homogênea, na qual o ativo fica frequentemente disperso e aprisionado nas redes poliméricas ou adsorvido à superfície. Por outro lado, as nanocápsulas consistem de uma estrutura casca-núcleo heterogênea, ou de um núcleo interno fluido envolvido por uma parede polimérica, funcionando como um reservatório, em que o agente se encontra imerso no núcleo e cercado pela camada polimérica (CAYLA e SALAÛN, 2012; VRIGNAUD, BENOIT e SAULNIER, 2011a). As nanocápsulas apresentam algumas vantagens frente as nanoesferas, tais como a alta eficiência de encapsulamento (devido à otimização da solubilidade da droga no núcleo das nanocápsulas); a menor quantidade de polímero usado na produção; a maior carga de ativo que pode ser aprisionada; e uma vez que o fármaco fica "protegido" no interior da NPP, irritações comuns durante a administração e a liberação elevada nos momentos iniciais podem ser diminuídas (ANTON, BENOIT e SAULNIER, 2008).

As NPPs podem ser preparadas por dispersão do polímero previamente formado ou por meio da polimerização *in situ* dos monômeros (CONNIOT, 2011; RAO e GECKELER, 2011), conforme mostrado na Figura 10. Para a escolha do método de preparação mais apropriado, alguns parâmetros devem ser previamente considerados e adaptados para os objetivos terapêuticos em questão: a quantidade de energia aplicada; o uso de solvente orgânico na formulação; a escolha do polímero, de acordo com a biocompatibilidade ou biodegradabilidade e performance; morfologia desejada das NPPs; entre outros (ANTON, BENOIT e SAULNIER, 2008).

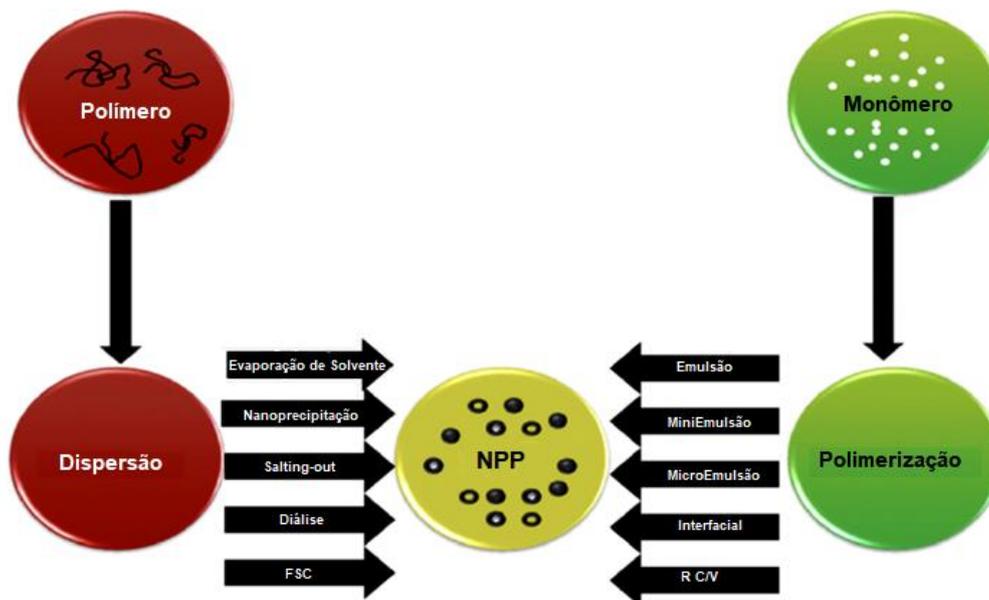


Figura 10 - Esquema de técnicas usadas para a preparação de nanopartículas poliméricas. FSC: Fluido Supercrítico; R C/V: Radical Controlado/Vivo (Adaptado de RAO e GECKELER, 2011).

A evaporação do solvente é a técnica mais amplamente encontrada na literatura para preparação de nanopartículas, por dispersão do polímero pré-formado. Esse método consiste primeiramente na solubilização do polímero em um solvente orgânico volátil e na emulsificação da solução em uma fase aquosa simples ou dupla. Como segundo passo, o solvente deve ser evaporado, induzindo a precipitação das nanopartículas na forma esférica, que então são coletadas e purificadas. A primeira etapa determina o tamanho das partículas, enquanto a segunda etapa tem relevância na especificação da morfologia e do desempenho no encapsulamento (CONNIOT, 2011; RAO e GECKELER, 2011; ROSCA, WATARI e UO, 2004). Apesar da vasta utilização e fácil procedimento, essa técnica possui algumas desvantagens que dificultam o uso em escala industrial. Primeiramente, devido ao uso de solventes orgânicos, que podem ficar retidos no produto final e que requerem várias etapas de lavagem para sua remoção, os custos ambientais e econômicos podem ser elevados. Além disso, as múltiplas etapas de processo podem liberar precipitadamente o material encapsulado e até mesmo degradar o princípio ativo. Quando são incorporados agentes hidrofílicos, deve ocorrer grande perda de material para a fase aquosa, diminuindo a eficiência de encapsulamento (KOKAI *et al.*, 2010; MEDEIROS, 2013; YE, KIM e PARK, 2010).

Em contrapartida, quando se deseja atingir propriedades para uma aplicação específica, na qual as características do polímero podem ser manipuladas, é interessante fazer uso da polimerização *in situ* do monômero precursor (RAO e GECKELER, 2011).

Neste caso, embora o agente seja mais comumente adicionado antes ou durante a polimerização, ele também pode ser acrescentado após a polimerização para ser adsorvido à superfície polimérica. A técnica é muito rápida e facilmente transportável para escala a industrial (KREUTER, 1994; SILVA *et al.*, 2003). No entanto, segundo Anton, Benoit e Saulnier (2008), deve-se ter muito cuidado com a escolha do polímero a ser formado e do sistema de geração da NPP, a fim de evitar possíveis interações com o ativo encapsulado. Outros inconvenientes estão relacionados ao uso de temperaturas altas durante a reação e verificação de que não há resquícios de monômero residual no produto final (SILVA *et al.*, 2003).

Os estudos relacionados a nanopartículas empregam majoritariamente polímeros sintéticos, podendo ser biodegradáveis ou não. Para o uso em sistemas de liberação controlada, os polímeros biodegradáveis, como poliésteres poli(caprolactona), poli(ácido láctico) (PLA) e poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), são mais utilizados, em especial para fins farmacêuticos e alimentícios. Tal fato se baseia na degradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e facilidade de excreção pelo corpo, uma vez que estes polímeros são degradados a produtos normalmente metabolizados pelo corpo humano (FONSECA *et al.*, 2013a; JOÃO, 2013). Entretanto, uma extensiva discussão ainda vem sendo realizada nos dias atuais sobre a real necessidade de um polímero ser biodegradável para ser empregado na biomedicina. Holzapfel e colaboradores (2005) mencionam que a não-biodegradabilidade pode consistir em um ponto positivo quando se deseja que as nanopartículas circulem por longos períodos de tempo no sangue. Além disso, a excreção de partículas pequenas pelos rins pode evitar o acúmulo no corpo é uma alternativa viável. Em adição, a massa molar do polímero deve estar abaixo do nível usual de filtração pelos rins, que corresponde de 40 a 50×10^3 g/gmol (PASUT e VERONESE, 2007) (embora ainda existe muita controvérsia sobre este valor). Em vista disso, uma série de polímeros biocompatíveis é usada para aplicações biomédicas, como a família dos poliacrilatos.

2.4.1 Aplicações das Nanopartículas Poliméricas

Com base nas diversas vantagens e propriedades peculiares apresentadas no item anterior, nanopartículas poliméricas vêm sendo muito estudadas, em especial, como sistemas de encapsulamento e liberação de ativos. O primeiro relato de uso comercial de

ativos encapsulados em micropartículas relacionados ao uso de papel de cópia sem carbono, por volta da década de 1950. Desde então, diversos segmentos industriais tem feito uso de sistemas encapsulados, como têxtil para proteção e preservação das propriedades de corantes (SALAÛN, VROMAN e AUBRY, 2009), agrícola na liberação de pesticidas (THIES, 2005), alimentício para mascarar odor e sabor (SHLOMO e ALEXANDER, 2007), cosmético na liberação de fragrâncias (THIES, 2005), processos de micro/nanorreatores (LENSEN, VRIEZEMA e HEST, 2008), revestimentos, para auto-cura e liberação de anti-incrustante (NORDSTIERNA *et al.*, 2010), entre muitos outros (TROJER *et al.*, 2013). Embora atualmente existam mais de 200 métodos para encapsulamento descrito na literatura científica e patentes, a maioria deles incluem três etapas básicas: confinamento do componente; formação das partículas; e o endurecimento das partículas, para posteriormente o ativo ser liberado por erosão, degradação ou difusão (CAYLA e SALAÛN, 2012; JOÃO, 2013).

Relevância maior tem sido dada a aplicações na área de nanomedicina e ao uso em encapsulamento e liberação de fármacos. Hermosilla e Carles (2007) citam que "*A nanomedicina é um dos ramos mais promissores da medicina contemporânea, restando boa parte dos esforços científicos na busca de novos tratamentos para doenças*". Como consequência, a incorporação de agentes terapêuticos torna-se um marco muito importante para a nanotecnologia.

Terapias tradicionais vêm sendo progressivamente suplementadas por tecnologias que envolvem o encapsulamento e a liberação controlada, uma vez que métodos convencionais possuem algumas restrições e limitações associadas à baixa biodisponibilidade e estabilidade de ativos, odor e sabor desagradável de certos produtos, potenciais efeitos tóxicos e baixo alcance no tecido doente, além de prematura degradação do princípio de interesse (IQBAL *et al.*, 2015; JOÃO, 2013; VRIGNAUD, BENOIT e SAULNIER, 2011a). Frente a isso, o encapsulamento em NPPs tem vital importância para ajudar a superar esses obstáculos, tendo como papel principal proteger o fármaco contra os meios adversos e controlar e dirigir sua liberação.

Tendo como base o objetivo de proteção, o encapsulamento ajuda na preservação de substâncias sensíveis à variações do meio, como as proteínas e peptídeos, aumentando e prolongando a disponibilidade no corpo devido à lenta difusão do composto para fora das partículas. Apesar da alta potência farmacológica de muitas

drogas, elas são frágeis e possuem curto período de meia-vida e fraca penetração através das barreiras fisiológicas (BANGA e CHIEN, 1988; GLASSER *et al.*, 2016; IQBAL *et al.*, 2015). Nesse sentido, Telles (2013) estudou o encapsulamento da insulina em nanopartículas de PLA por dupla emulsão para administração oral e assim favorecer a disponibilidade no intestino e proteção contra a ação dos macrófagos. Semelhantemente, Zhu e colaboradores (2001) encapsularam uma glicoproteína hormonal, a Gonadotrofina coriônica humana, em microesferas de PLA e PLGA. Seus resultados demonstraram a preservação das propriedades proteicas e a maior eficiência dos ativos quando encapsulados, ao passo que uma única administração das microesferas produziu uma resposta de anticorpo equivalente a quatro inoculações da proteína livre.

Quanto à atuação em sistemas de liberação de fármacos, cientistas têm citado esses sistemas como chaves para futuros avanços da eficácia e segurança dos procedimentos terapêuticos (PEIXOTO, 2013). Tal eficácia não está relacionada apenas ao controle da taxa de liberação, mas também à manutenção dos níveis de droga no corpo dentro da faixa terapêutica, como mostra a Figura 11 (FONSECA *et al.*, 2013a; PEIXOTO, 2013). A Tabela 2 resume as principais vantagens do método de liberação controlada em relação aos métodos tradicionais de administração.

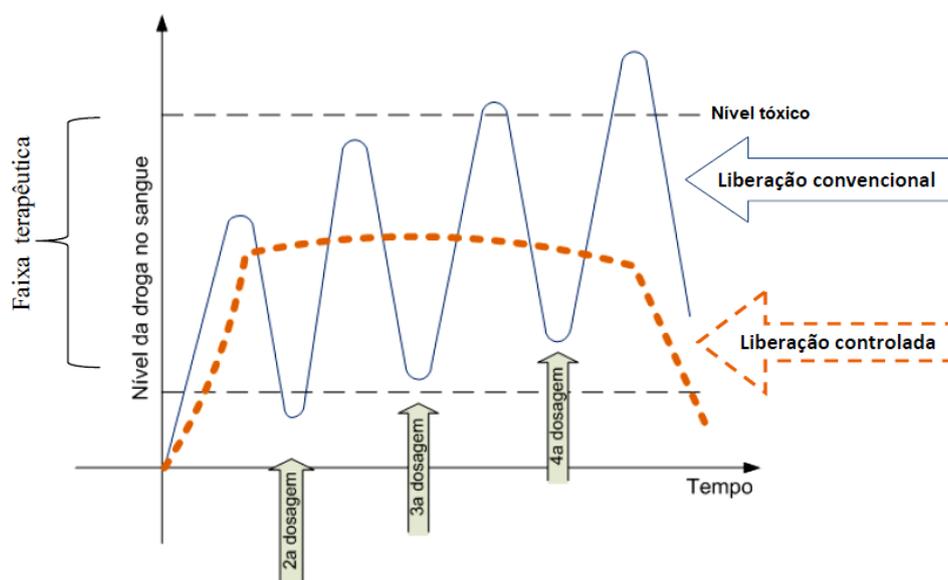


Figura 11 - Representação de sistemas de liberação de fármacos no corpo (PEIXOTO, 2013).

Tabela 2 - Resumo das principais vantagens das formas farmacêuticas de liberação prolongada sobre as formas convencionais (Adaptado de FAHNING e LOBÃO, 2011; JOÃO, 2013; KOKAI *et al.*, 2010).

Vantagem	Explicação
Menor flutuação dos níveis plasmáticos do fármaco	A velocidade de liberação controlada pode eliminar os picos dos níveis sanguíneos tornando o tratamento menos agressivo.
Redução da frequência de administração	Produtos de liberação controlada frequentemente liberam mais ativos por um tempo prolongado, portanto, resultando menos doses que nas formas convencionais.
Maior conveniência e adesão	Com menor frequência de administração, o paciente está menos suscetível a esquecer uma dose; também há maior conveniência em relação à administração diurna e noturna.
Redução nos efeitos colaterais	Devido à redução do aparecimento de picos de concentração sanguínea na região de níveis tóxicos, os efeitos colaterais são menos frequentes.
Maior fração da dose atinge o tecido alvo	As partículas responsáveis pela liberação controlada podem estar funcionalizadas ao ponto de serem dirigidas especificamente para o tecido doente.
Redução nos custos globais com a saúde Redução da necessidade de cirurgia	Embora o custo inicial das formas farmacêuticas de liberação controlada possa ser maior do que o das formas tradicionais, o custo global do tratamento pode ser menor devido a melhoria da eficácia terapêutica, redução dos efeitos colaterais e redução do tempo requerido pelos profissionais de saúde para dispensar e administrar o medicamento e monitorar o paciente. Além de poder evitar procedimentos mais severos e caros como cirurgias.

Com base nessas vantagens, Arias, Reddy e Couvreur (2009) recorreram ao encapsulamento em NPP e liberação controlada do fármaco anticâncer Cloridrato de gencitabina, uma vez que esse fármaco precisa ser administrado em doses elevadas para provocar a resposta terapêutica necessária, podendo levar a efeitos adversos graves. Os estudos de citotoxicidade revelaram similar atividade do anticâncer quando comparado ao fármaco livre, e em ensaios intravenosos em macacos doentes a atividade dos antitumores foi ainda maior. Pandey e Khuller (2006) avaliaram a administração de NPPs de PLG contendo drogas antituberculose para liberação cerebral em roedores. Os

autores confirmaram que uma única dose oral poderia se sustentar durante 5 a 8 dias no plasma e 9 dias no cérebro. Além disso, a metodologia proposta melhorou os parâmetros farmacocinéticos, como o tempo de residência e a biodisponibilidade. Olejnik, Schroeder e Nowak (2015), no qual estudaram a liberação e propriedades físico-químicas do tetrapeptídeo N-acetil-Pro-Pro-Tyr-Leu em formulações encapsuladas para cuidados com a pele. Morral-Ruíz *et al.* (2013), encapsularam a proteína Estreptavidina em nanopartículas de poliuretano-uréia multifuncionais, para detectar, direcionar e matar efetivamente células cancerígenas.

As formulações de nanopartículas podem ser facilmente adaptadas para diferentes administrações, sejam elas intravenosa, parenteral, oral, nasal ou pulmonar. Vrignaud e colaboradores (2011a) utilizaram NPPs para administrações orais, bem como Silva *et al.* (2003) e Telles (2013). Em contrapartida, Silva, Tavares e Aguiar (2014) e Fadista (2011) concordaram que a via pulmonar também constitui uma ótima estratégia terapêutica baseada em NPPs, que traz novos e excitantes avanços para o diagnóstico e terapia de vários tipos de doenças pulmonares e sistêmicas. Sintov, Levy e Botner (2010) asseguraram que a via intranasal é eficiente para liberação de fármacos, devido principalmente à mucosa nasal ser altamente vascularizada e à grande área superficial epitelial (em torno de 150 cm²), que garantem absorção rápida das NPPs. Em suma, esses estudos revelam a grande adaptabilidade e versatilidade diferentes rotas administrativas de medicamentos baseados em NPPs.

2.5 COMENTÁRIOS FINAIS

Com base nessa breve revisão, pode-se dizer que, apesar da inerente instabilidade das emulsões duplas, estas têm grande potencial para aplicações farmacológicas e produção de nanopartículas poliméricas, promovendo melhores perfis farmacocinéticos e adequada biodisponibilidade para encapsulamento de agentes terapêuticos, em especial os hidrofílicos. Da mesma forma, a técnica de polimerização em miniemulsão garante a formação de nanopartículas atrativas para o mercado farmacêutico. Entretanto, há poucos estudos que tenham combinado as utilidades de ambas técnicas, ou mesmo que estivessem voltados para o desenvolvimento em um âmbito industrial e comercial.

Diante disso, este trabalho visa ao desenvolvimento de uma nova metodologia para produção de nanopartículas poliméricas e encapsulamento de fármacos hidrofílicos baseado na produção de emulsões duplas, capaz de ser aplicada em escala industrial de forma ambiental e economicamente viável, com possível emprego futuro na produção de medicamentos e encapsulamento de agentes hidrossolúveis em geral.

Capítulo III

Materiais e Métodos

Neste capítulo são descritos os materiais, equipamentos e métodos necessários para a caracterização e o desenvolvimento dos produtos obtidos nesta pesquisa. Exceto informações ao contrário, todos os reagentes foram utilizados como recebidos, sem uso de qualquer etapa adicional de purificação.

3.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

3.1.1 Reagentes

Reagentes para Execução da Síntese das Nanopartículas Poliméricas (NPPs)

1. Metacrilato de metila (MMA), fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza mínima de 99,5%, utilizado como monômero na etapa de emulsão e polimerização em miniemulsão;
2. Água ultrapura (Milli-Q[®]) para preparo de soluções;
3. Monoleato de sorbitano (Span[®] 80), fornecido pela Fluka Analytical (St. Louis, Estados Unidos), utilizado como surfactante lipofílico para a 1^a emulsão (A/O);
4. Poli(álcool vinílico) (PVA), fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), grau de hidrólise 86,5 - 89,5%, utilizado como surfactante hidrofílico para 2^a emulsão (A/O/A);
5. Polissorbato 80 (Tween[®] 80), fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), utilizado como surfactante hidrofílico para 2^a emulsão (A/O/A);
6. Lauril sulfato de sódio (LSS), fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), com teor máximo de água de 10%, usado como surfactante hidrofílico para 2^a emulsão (A/O/A);

7. Persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) (KPS), fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), com pureza mínima de 99%, utilizado como iniciador das reações de polimerização em miniemulsão;
8. Hidroquinona, fornecida pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), teor: 91%, usada como inibidor da reação de polimerização para teste de conversão;
9. Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), fornecido pela Proquimios com pureza mínima de 99,7 %, utilizado como tampão na polimerização em miniemulsão direta do PMMA;
10. Hexadecano, fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), com grau PA e pureza mínima de 99%, usado como co-estabilizante na polimerização em miniemulsão direta do PMMA;
11. Poli(metacrilato de metila) (PMMA), preparado previamente por polimerização em miniemulsão direta, usado para aumentar a viscosidade da fase orgânica de MMA da primeira emulsão;
12. Albumina de soro bovino (BSA), fornecida pela Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil) da forma de pó liofilizado com pureza mínima de 98%, usada como agente hidrofílico encapsulado;
13. Corante líquido de coloração azul, da marca Xadrez, utilizado como marcador encapsulado para observação da estrutura interna das NPPs.

Reagentes para Caracterizações

1. Água deionizada usada para os testes preliminares;
2. n-Heptano, fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), com pureza mínima de 99,5%, usado para fins comparativos nos testes preliminares de estabilidade de emulsão;
3. Óleo diesel, comprado em posto de gasolina, com a finalidade comparativa nos testes preliminares de estabilidade de emulsão;
4. Água ultrapura (Milli-Q[®]) para preparo de soluções;
5. Tetrahidrofurano (THF) grau HPLC/Spectro, fornecido pela Tedia Company (Fairfield, Estados Unidos), utilizado nas análises de GPC, como fase móvel e na solubilização das amostras;
6. Resina Epóxi, usado para molde na crioseção das nanopartículas;

7. Endurecedor jef, usado no molde como solidificador na crioseção das nanopartículas;
8. Reagente de Bradford, fornecido pela Sigma Aldrich (St Louis, Estados Unidos), usado para quantificação da BSA no UV-visível;
9. Fosfato monossódico (NaH_2PO_4), fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), pureza mínima de 99%, MM 119,98 g/mol, usado como o sal ácido para preparação da solução tampão fostato e tampão fosfato salino;
10. Fosfato dissódico (Na_2HPO_4), fornecido pela Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), pureza mínima de 99%, MM 141,96 g/mol, usado como a base conjugada para preparação da solução tampão fostato e tampão fosfato salino;
11. Solução tampão fosfato 0,1M pH 7, preparado previamente a partir de fosfato monossódico, fosfato dissódico e água, usado como a fase aquosa interna na amostra com BSA encapsulado;
12. Solução tampão fosfato salino (PBS), pH 7,2, preparado previamente a partir de fosfato monossódico, fosfato dissódico, cloreto de sódio e água, usado para os ensaios de liberação controlada.

3.1.2 Equipamentos

Equipamentos para Execução da Síntese das NPPs

1. Balança analítica, usada para pesagem de reagentes e produtos reacionais, de 100 mg até 210 g (BEL Equipamentos Analíticos LTDA, modelo U210A);
2. Ultra-turrax, fabricado por IKA (Modelo T-25 digital), equipado com elemento de dispersão N25N - 18G), utilizado como homogeneizador da primeira emulsão de óleo diesel no teste preliminar;
3. Ultra-turrax, fabricado por IKA (Modelo T-10 basic S32), equipado com elemento de dispersão S10N - 10G), utilizado como homogeneizador da primeira emulsão para o heptano e MMA no teste preliminar e para a homogeneização da segunda emulsão;
4. Homogeneizador de alta pressão (Artepeças, modelo APLAB-10 - 1.000 Bar), usado como homogeneizador da primeira e segunda emulsão para o MMA;

5. Sonicador (Branson Digital Sonifier®, modelo 450) equipado com câmara acústica e com potência máxima de 400 W, utilizado para emulsificação da miniemulsão direta do PMMA;
6. Minirreator de vidro com capacidade de 100 mL (EasyMax™ 102 - Mettler Toledo) encamisado, equipado com termopar, agitador e condensador, utilizado para a realização das reações de polimerização;
7. Placa de agitação (IKA, modelo C-MAG HS7), utilizada para homogeneização das soluções;
8. Estufa de circulação (Quimis), usada para a secagem das amostras.

Equipamentos para Caracterizações

1. Balança analítica, usada para pesagem de reagentes e produtos reacionais, de 100 mg até 210 g (BEL Equipamentos Analíticos LTDA, modelo U210A);
2. Turbiscan® LAB instrument, fabricado por Formulacion SAS (França), usado para a análise de estabilidade das emulsões nos testes preliminares;
3. Goniômetro automático, Dataphysics (Modelo OCA15EC), utilizado para medida da tensão superficial do heptano e MMA e interfacial do heptano/água e MMA/água, com ou sem surfactante;
4. Tensiômetro, KVS Instruments Ltd (Modelo Sigma 70), foi usado para medir a tensão superficial do óleo diesel e interfacial do óleo diesel em água, com ou sem surfactante;
5. Titulador Karl Fischer, fabricado por Metrohm (Modelo Titrando), utilizado para medição da porcentagem de água presente no óleo diesel;
6. Densímetro e Viscosímetro, Anton Paar (Modelo SVM 3000), utilizado para a caracterização da densidade e viscosidade cinemática e dinâmica do óleo diesel;
7. Analisador de tamanho de partícula (Malvern Instruments ZetaSizer, modelo Nano-ZS), usado para a determinação da distribuição de tamanhos de partícula por espalhamento dinâmico de luz;
8. Cromatógrafo de permeação em gel (Viscotek, modelo GPC Max VE 2001), utilizado para determinação das massas molares dos polímeros;
9. Análise Termogravimétrica (Perkin-Elmer, modelo TGA Pyris 1), para análises de perdas de massa sob aquecimento dos polímeros;

10. Calorímetro de varredura diferencial (Perkin-Elmer, modelo DSC-7 Diamond) para determinação da temperatura de transição vítrea das partículas poliméricas;
11. Estufa de circulação à vácuo (Solan, modelo SL 104/27)), usado para secagem das amostras para análise de conversão;
12. Placa de agitação e aquecimento multiponto (IPAS), usada para liberação *in vitro* da BSA;
13. Centrífuga (Eppendorf, modelo Centrifuge 5810R), usada para separação do sobrenadante para teste de eficiência de encapsulamento no UV-visível;
14. Centrífuga (Thermo Scientific, modelo Heraeus Megafuge 16R), usada para separação do filtrado para teste de liberação controlada;
15. Espectroscópio de absorção UV-visível (Bel, Photonics, UV-vis spectrophotometer UV-M51), foi usado para quantificar o BSA para teste de eficiência de encapsulamento e liberação controlada;
16. Membrana de PES com *cut-off* de 300.000 Da (Sartorius, modelo VS2041 Vivaspin 20), para amostras de 20mL, usada para separar o filtrado para teste de liberação controlada;
17. Microscópio eletrônico de varredura (Tescan, MEV Vega 3LMU), empregado para microscopia das nanopartículas poliméricas submetidas à crioseção;
18. Microscópio eletrônico de varredura (FEI Company, modelo Quanta 400 FEG), empregado para análise de morfologia das nanopartículas poliméricas;
19. Microscópio óptico invertido (Carl Zeiss, modelo Axiovert 40 MAT) utilizado para microscopia das emulsões e das nanopartículas poliméricas;
20. Microscópio óptico (Zeiss, modelo Imager.M2, AxioCam HRC) utilizado para observação da estrutura interna das nanopartículas poliméricas com auxílio do contraste da pigmentação do corante azul.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Teste Preliminar de Estabilidade da 1ª Emulsão (1E)

O teste preliminar consistiu em um planejamento experimental para averiguar a estabilidade da primeira emulsão (A/O) com auxílio do Turbiscan LAB, versão 2.0. O

planejamento foi executado três vezes, um para cada óleo testado (diesel, heptano e MMA), utilizando esses óleos como a fração majoritária da fase contínua. Também foi realizado um tratamento estatístico a partir dos resultados obtidos. Apesar do tipo de homogeneizador proposto neste trabalho ser o homogeneizador de alta pressão, nesta etapa utilizou-se o ultra-turrax, com o intuito de gastar menor quantidade de reagentes.

3.2.1.1 Planejamento Experimental

O planejamento experimental foi executado de forma aleatória a fim de descorrelacionar os dados de outras variáveis externas não controladas. O plano fatorial prevê a varredura de um intervalo experimental uniforme e simétrico, de modo a manter a ortogonalidade, possibilitando a execução de um menor número de experimentos com um erro paramétrico mínimo (SCHWAAB e PINTO, 2007).

As variáveis de entrada escolhidas para o ensaio preliminar de estabilidade da 1ª emulsão foram: a carga de surfactante presente na fase orgânica; a carga de fase dispersa e a velocidade de rotação do ultra-turrax. As variáveis de saída monitoradas foram a porcentagem de sedimentação (%S) e o índice de estabilidade do turbiscan (*Turbiscan Stability Index* - TSI). Os intervalos de variação destas variáveis estão dispostos na Tabela 3, em que são apresentados também o limite inferior (-1), o limite superior (+1) e o ponto central (0). A metodologia adotada no presente trabalho foi baseada no planejamento experimental fatorial completo a dois níveis (2³), como apresentado na Tabela 4. Desta forma, foram realizados 8 experimentos somados com 3 réplicas no ponto central, totalizando um montante de 11 experimentos. Ainda, admita-se que os erros no ponto central são também representativos dos erros nas demais condições experimentais.

Tabela 3 - Intervalos das variáveis de entrada usados no planejamento experimental.

Variável	Descrição	-1	0	+1	
I	Carga de surfactante [%m/m]	1	3	5	
II	Carga de F.D. * [%m/m]	10	20	30	
III	Velocidade do turrax [10 ³ rpm]	Diesel	5	9	13
		Heptano e MMA	11,5	14,5	20,5

*F.D. fase dispersa

Os resultados obtidos após os experimentos foram tratados com auxílio dos softwares Excel e Statistica (versão 7.0, desenvolvido pela Stat Soft Inc).

Tabela 4 - Variáveis de entrada normalizadas do plano experimental fatorial completo a dois níveis.

Experimento	Variável I	Variável II	Variável III
1	+1	+1	+1
2	+1	+1	-1
3	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1
5	-1	+1	+1
6	-1	+1	-1
7	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

A análise estatística dos dados experimentais foi efetuada admitindo-se distribuição normal de probabilidades e um intervalo de confiança de 95%. A análise foi iniciada com o cálculo da média, da variância e do desvio padrão amostrais nos pontos centrais (experimentos 9, 10 e 11). Para a avaliação das flutuações, utilizaram-se os testes estatísticos t de *Student* e Chi-Quadrado no ponto central, sendo os intervalos de confiança calculados com auxílio das Equações 1 e 2, respectivamente:

$$\bar{x} + \frac{t_1 S_x}{\sqrt{N}} < \mu < \bar{x} + \frac{t_2 S_x}{\sqrt{N}} \quad (1)$$

sendo \bar{x} e S_x a média e o desvio padrão amostrais, respectivamente; μ , a média verdadeira desconhecida; N, o número de amostra; e t_1 e t_2 , os limites inferior e superior do teste t, respectivamente.

$$(N - 1) \frac{S_x^2}{\chi_2^2} < \sigma^2 < (N - 1) \frac{S_x^2}{\chi_1^2} \quad (2)$$

em que σ^2 é a variância verdadeira desconhecida; S_x^2 , a variância amostral; e χ_1^2 e χ_2^2 , os limites inferior e superior do teste χ^2 , respectivamente.

Para investigar se houve relação entre as variáveis de entrada e saída, e conseqüentemente, se as variáveis resposta foram afetadas estatisticamente de forma

positiva ou negativa, foi calculada a matriz de correlações e proposto um problema de estimação de parâmetros, por meio da comparação estabelecida entre dados experimentais e um modelo disponível para o processo. De acordo com Schwaab e Pinto (2007), o processo de estimação de parâmetros inicia-se com a definição de um modelo para aproximação dos dados experimentais e, em seguida, define-se uma função objetivo para comparação dos valores calculados pelo modelo empírico e os valores obtidos experimentalmente. A definição de um modelo empírico normalmente acontece a partir de tentativas, partindo-se de uma expressão mais completa, que leva em consideração os efeitos principais e efeitos de sinergia entre as variáveis, como mostrado na Equação 13.

$$y^c = a_0 + \sum_{i=1}^{NX} a_i z_i + \sum_{i=1}^{NX-1} \sum_{j=i+1}^{NX} b_{ij} z_i z_j \quad (3)$$

sendo a_i os parâmetros do modelo referentes aos efeitos principais, b_{ij} os parâmetros do modelo referentes aos efeitos secundários, z_i e z_j as variáveis independentes do sistema e y a variável dependente analisada.

A função objetivo empregada para realização da modelagem empírica e da predição dos parâmetros foi a de mínimos quadrados, admitindo as hipóteses de modelo perfeito e experimento bem feito (SCHWAAB e PINTO, 2007). Portanto, foi considerado um modelo capaz de descrever exatamente as relações existentes entre as variáveis do problema e que os erros de medição são normalmente distribuídos. O método usado para estimação foi o de Hooke-Jeeves e Quasi-Newton com erro de aproximação de 10^{-13} , número máximo de iterações de 100 e o critério de convergência de 10^{-7} .

3.2.1.2 Procedimento Experimental

As emulsões para os três óleos testados (diesel, heptano e metacrilato de metila) em todos os experimentos do plano experimental foram preparadas com base nas Tabelas 3 e 4, sendo que a fase contínua era composta pelo respectivo óleo e o surfactante e a fase dispersa era composta por água destilada. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia de Colóides (Engecol), UFRJ.

Inicialmente, pesou-se o óleo em uma balança analítica, totalizando 95% em massa da fase contínua. Depois adicionou-se o surfactante Span 80 (5% restante), mexeu-se a solução com auxílio de um bastão de vidro por 1min e deixou-se o sistema em repouso até completar 10 min. Em um béquer separado foi pesada a água destilada. A fase dispersa foi então vertida na fase contínua e a mistura foi submetida à homogeneização no ultra-turrax durante quatro minutos. Imediatamente após a emulsificação, a amostra foi despejada na cubeta específica do Turbiscan e levada ao aparelho, sendo possível medir as variáveis de saída: porcentagem de sedimentação (%S) e índice de estabilidade do turbiscan (TSI). Foram obtidas curvas de resposta de dois em dois minutos durante 40min e uma última medida após 2 h.

Para os ensaios feitos com o óleo diesel, utilizou-se 150 g de meio emulsificante, de acordo com a composição detalhada na Tabela 5. A homogeneização foi produzida no ultra-turrax Modelo T-25 digital com velocidade de rotação conforme o respectivo valor da variável III (Tabela 3). Além das amostras do planejamento experimental, foram analisadas amostras sem o surfactante, nas condições de 10, 20 e 30% de fase dispersa e misturadas a 9000 rpm.

Tabela 5 - Valores correspondentes em massa de cada componente [g] para os experimentos do planejamento experimental conduzidos com o óleo diesel.

Experimento	Amostra	FASE CONTÍNUA		FASE DISPERSA
		Diesel	Span 80	H₂O
1	N_01	99,75	5,25	45
2	N_02	99,75	5,25	45
3	N_03	128,25	6,75	15
4	N_04	128,25	6,75	15
5	N_05	103,95	1,05	45
6	N_06	103,95	1,05	45
7	N_07	133,65	1,35	15
8	N_08	133,65	1,35	15
9	N_09	116,40	3,60	30
10	N_10	116,40	3,60	30
11	N_11	116,40	3,60	30

Para o heptano e MMA, os 11 experimentos seguiram o mesmo procedimento como descrito para o diesel, mas as emulsões foram preparadas com base em 30 g de meio emulsificante, com a finalidade de diminuir a quantidade de reagentes usados.

Entretanto, foi necessária a substituição do ultra-turrax Modelo T-25 digital pelo Modelo T-10 basic, pois o Modelo T-25 digital não é recomendado para pequenas quantidades. Devido a esta troca, o intervalo de variação da velocidade de rotação também teve que ser alterado, assim como mostrado na Tabela 3. Na Tabela 6, são apresentados os valores correspondentes em massa dos compostos de cada experimento.

Tabela 6 - Valores correspondentes em massa de cada componente [g] para os experimentos do planejamento experimental conduzidos com o heptano e MMA.

Experimento	Amostra	FASE CONTÍNUA		FASE DISPERSA
		Óleo	Span 80	H₂O
1	N_01	19,95	1,05	9
2	N_02	19,95	1,05	9
3	N_03	25,65	1,35	3
4	N_04	25,65	1,35	3
5	N_05	20,79	0,21	9
6	N_06	20,79	0,21	9
7	N_07	26,73	0,27	3
8	N_08	26,73	0,27	3
9	N_09	23,28	0,72	6
10	N_10	23,28	0,72	6
11	N_11	23,28	0,72	6

Como mencionado anteriormente, as variáveis resposta foram extraídas a partir do equipamento Turbiscan LAB (Figura 12). Este equipamento mede a luz transmitida (para emulsões translúcidas) e refletida (para sistemas opacos) como função da altura da proveta, parâmetros que dependem da concentração e tamanho das partículas presentes na amostra em análise. A medida é feita ao longo de uma cubeta cilíndrica de vidro, em função do tempo e da altura da cubeta. Desse modo, é possível detectar mudanças no tamanho das partículas (coalescência e floculação) e separação de fases (sedimentação e cremação) (CELIA *et al.*, 2015; FORMULATIONS, 2013; OLEJNIK, SCHROEDER e NOWAK, 2015).

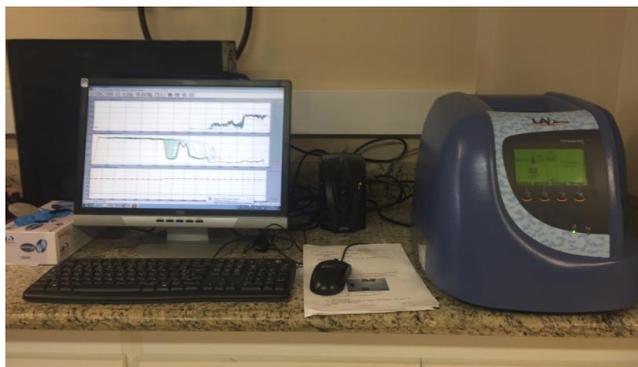


Figura 12 - Turbiscan LAB usado para análise de estabilidade de emulsões.

Dentre as diversas vantagens frente as demais técnicas de detecção de estabilidade, o turbiscan se destaca pelo seu tempo rápido de análise e resposta; fácil manuseio; não ser invasivo; possuir alta precisão na captura dos fenômenos de desestabilização; e preservar as amostras da degradação, uma vez que não há diluição, manipulação ou ruptura da amostra, permitindo realizar várias análise por um longo período de tempo (CELIA *et al.*, 2015; MENGUAL *et al.*, 1999; OLEJNIK, SCHROEDER e NOWAK, 2015).

O Turbiscan LAB possui uma fonte que emite um feixe de luz infravermelha ($\lambda=880 \text{ nm}$) sobre a cubeta. Dois detectores de leitura óptica sincronizados são responsáveis pela medida da radiação transmitida e refletida pela amostra. A resposta do aparelho é apresentada em termos de curvas de percentual de fluxo de luz transmitida (transmissão - %T) e refletida (*backscattering* - %BS) em função da altura da amostra e/ou do tempo. A partir do comportamento dessas curvas é então possível identificar os fenômenos de desestabilização (Figura 13) (FORMULACTION, 2013; KOWALSKA, 2015). É possível também obter curvas com relação à variação da transmissão (ΔT) e do *backscattering* (ΔBS), na qual a curva no tempo inicial é dada como a referência para as demais. O manual do equipamento descreve detalhadamente como deve ser interpretada e feita a leitura corretamente dos perfis de estabilidade (FORMULACTION, 2013).

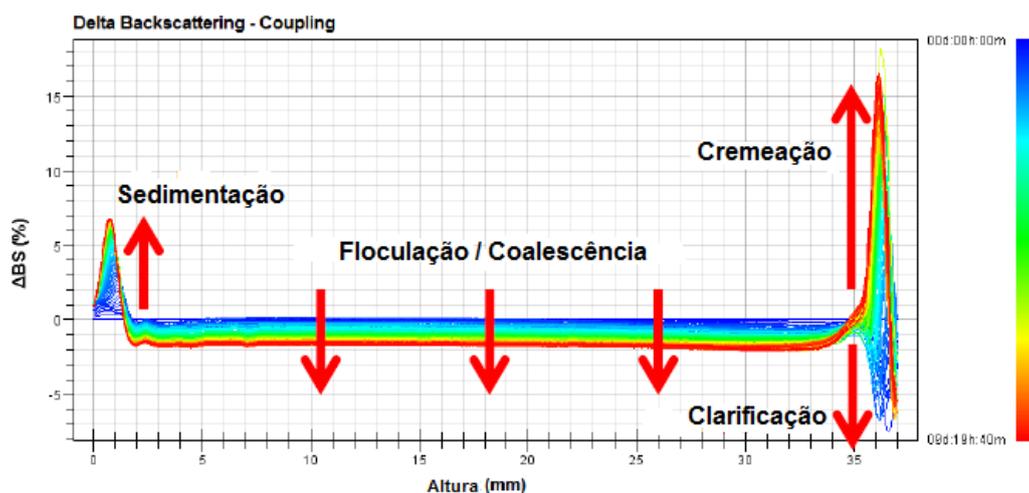


Figura 13 - Possíveis fenômenos de desestabilização identificados no Turbiscan LAB. Adaptado de FORMULATIONS (2013).

Apesar de obter uma resposta qualitativa da estabilidade da emulsão, é possível extrair também dados quantitativos a partir dos perfis resultantes, os quais podem fornecer diversos indicativos numéricos da estabilidade, melhorando sua emprego principalmente em análises de ranqueamento e comparação. A título de exemplo, tem-se as variáveis de saída consideradas no presente trabalho, que foram a porcentagem de sedimentação e o índice de estabilidade do Turbiscan.

O método proposto para o cálculo da variável de saída porcentagem de sedimentação (%S) foi baseado nos estudos de Marquez e colaboradores (2007). A %S foi obtida a partir dos valores médios de *backscattering* (%BS) da região central dos perfis de estabilidade, associados à zona situada entre 15 e 35 mm da cubeta. Essa variável é definida pela Equação 4 e indica que quanto maior é esse valor, menor será a estabilidade da emulsão (FRANÇA *et al.*, 2014).

$$\% S = \frac{BS_{in,15-35} - BS_{f,15-35}}{BS_{in,15-35}} \quad (4)$$

onde $BS_{in,15-35}$ é a média *backscattering* (% BS) inicial ($t=0$ minutos) na região entre 15 a 35 mm e $BS_{f,15-35}$ é a média final do *backscattering* (% BS) ($t=40$ minutos) na região entre 15 a 35 mm.

A variável de saída índice de estabilidade do Turbiscan (*turbiscan stability index* - TSI) é um parâmetro estatístico usado para estimação da cinética de desestabilização de emulsões. O parâmetro resume as variações observadas na amostra e é obtido como a soma de todos os processos de desestabilização (coalescência, floculação, sedimentação e cremação) presentes na amostra em questão. Quanto maior é o TSI, mais instável é a

amostra (OLEJNIK, SCHROEDER e NOWAK, 2015; WIŚNIEWSKA, 2010). O cálculo é baseado diretamente nos dados brutos de espalhamento e transmissão e computado automaticamente após cada medida, podendo ser calculado tanto a partir da região total da amostra na cubeta quanto de uma zona selecionada. A estimativa ocorre por meio da Equação 5, comparando cada varredura de uma medição ($scan_i(h)$) com a anterior ($scan_{i-1}(h)$), na altura selecionada (h), e dividindo o resultado pela altura total da amostra na cubeta (H) para obter um resultado que não dependa da quantidade de produto na célula de medição (FORMULACTION, 2013). Valores altos de TSI indicam mudanças pronunciadas das medidas nos intervalos de tempo considerados. Em um processo ideal e estável, %S e TSI devem ser iguais a zero.

$$TSI = \sum_i \frac{\sum_h |scan_i(h) - scan_{i-1}(h)|}{H} \quad (5)$$

3.2.2 Mudanças na formulação da 1ª Emulsão (1E)

Além da metodologia aplicada no plano fatorial para análise de emulsões de MMA, foram propostas duas rotas alternativas para formulação da fase contínua (fase orgânica) da primeira emulsão.

A primeira alternativa consistiu na realização de cinco experimentos adicionais com o aumento da carga de surfactante na fase contínua, nas proporções de 5, 7,5, 10, 12,5 e 15%, fixando em 20% m/m da carga de fase dispersa e rotação de 20500 rpm por 4 min. Os valores correspondentes em massa dos compostos de cada experimento estão expostos na Tabela 7 e são referentes à base de 30g de meio emulsificante.

Tabela 7 - Composição da 1E, em massa [g], com aumento da carga de surfactante.

Amostra	Carga de Surfactante [%m/m]	FASE CONTÍNUA (80% m/m)		FASE DISPERSA (20% m/m)
		MMA	Span 80	H ₂ O
N_5%	5	22,8	1,2	6
N_7,5%	7,5	22,2	1,8	6
N_10%	10	21,6	2,4	6
N_12,5%	12,5	21	3	6
N_15%	15	20,4	3,6	6

Já na segunda rota, optou-se por repetir a condição da amostra N_5% da Tabela 7, porém com um acréscimo de PMMA em pó, o qual ficou dissolvido em MMA com agitação magnética por aproximadamente 1 h e 30 min. Tal procedimento foi executado com as proporções de 1, 3 e 5% m/m de PMMA da fração de MMA (Tabela 8), sendo que o polímero foi primeiramente dissolvido no MMA sob agitação magnética para então ser aplicada a metodologia de medição como nos demais experimentos.

Tabela 8 - Composição da 1E, em massa [g], com adição de PMMA na fase orgânica.

Amostra	Carga de PMMA [%m/mMMA]	FASE CONTÍNUA (80% m/m)			FASE DISPERSA (20% m/m)
		MMA	Span 80	PMMA	H ₂ O
N_5%_1%PMMA	1	22,572	1,2	0,228	6
N_5%_3%PMMA	3	22,116	1,2	0,684	6
N_5%_5%PMMA	5	21,660	1,2	1,140	6

A preparação do PMMA para este fim ocorreu por meio da polimerização em miniemulsão direta do MMA e executada no Laboratório de Engenharia de Polímeros (Engepol/UFRJ). A fase dispersa (20% m/m), neste caso, foi a solução orgânica composta pelo MMA (16 g) e o hexadecano (0,064 g) como co-estabilizante. A fase contínua (80% m/m) foi composta por água Milli-Q (64 g), lauril sulfato de sódio (LSS) (0,8 g) como surfactante, bicarbonato de sódio (0,064 g) como tampão e persulfato de potássio (KPS) (0,08 g) como iniciador da reação. Para promover a emulsificação, a mistura foi submetida à sonificação no sonicador (Branson Digital Sonifier®, modelo 450) a 30% de potência durante 5 min. A polimerização ocorreu no minirreator (EasyMax™ 102 - Mettler Toledo) por 2 h à 80 °C sob agitação de 500 rpm. O látex formado foi seco em estufa e macerado para uso.

3.2.3 Formulação da Emulsão Dupla (2E)

Uma vez definida a amostra N_5%_1%PMMA como adequada para formulação da emulsão primária de água em óleo (1E), pois proporcionou aumento de viscosidade e estabilidade, - conforme explicação descrita no item 4.2.2 - , foram propostas diferentes formulações para a emulsão secundária água em óleo em água (2E) de acordo com o respectivo surfactante escolhido (Tabela 9), equivalente a 1% m/m da fase aquosa

externa. Sendo assim, a emulsão N_5%_1%PMMA formou a fase dispersa da emulsão secundária e a mistura de água com o surfactante hidrofílico compuseram a fase contínua, correspondendo a 20 e 80% m/m da 2E, respectivamente. Os surfactantes foram o polissorbato 80 (Tween 80), o poli(álcool vinílico) (PVA) e o lauril sulfato de sódio (LSS). O Tween 80 e o LSS ficaram por 20 min sob agitação magnética para sua dissolução completa na água externa, antes de levá-los para o experimento. O PVA ficou 22 h em dissolução devido à menor solubilidade em água. A quantidade total de meio emulsificante foi de 40 g.

Tabela 9 - Composição da 2E, em massa [g], usando o turrax.

Amostra	Surfactante	FASE CONTÍNUA (80% m/m)		FASE DISPERSA (20% m/m)
		Água	Surfactante	1E
2E1	Tween 80	31,68	0,32	8
2E2	PVA	31,68	0,32	8
2E3	LSS	31,68	0,32	8
2E4	PVA + LSS	31,36	0,32 PVA + 0,32 LSS	8

Os ensaios foram executados no Laboratório Engepol e ocorridos logo após a preparação da primeira emulsão. O Ultra-turrax (IKA, T-10 basic S32) (Figura 14) foi o equipamento usado para emulsificação, sendo que a velocidade de rotação foi estabelecida em 9500 rpm e o processo transcorreu por 4 min. Assim como para as emulsões primárias, as secundárias também foram caracterizadas quanto à morfologia por microscopia óptica.



Figura 14 - Ultra-turrax (IKA, modelo T-10 basic) usado para homogeneização da 1E e 2E.

3.2.4 Polimerização em Miniemulsão

Imediatamente após a preparação da primeira e segunda emulsões, o meio emulsificado foi levado ao minirreator de vidro (EasyMax™ 102, Mettler Toledo) (Figura 15) para polimerização em miniemulsão e formação das nanopartículas poliméricas. As condições de operação do minirreator foram: temperatura de 70 °C; agitação de 400 rpm; e tempo de 2 h.



Figura 15 - Minirreator usado para as polimerizações em miniemulsão.

Com base nas amostras 2E2, 2E3 e 2E4 da Tabela 9, foram feitos três experimentos para formação das NPPs. A única mudança na formulação do meio foi a adição do iniciador persulfato de potássio (KPS) em uma quantidade referente a 1% m/m da fração de MMA final. O KPS foi previamente dissolvido em uma parcela da água da fase aquosa externa e então a solução foi vertida no reator no momento em que a temperatura se estabilizasse a 70°C. As NPPs foram denominadas NP_2E2, NP_2E3 e NP_2E4, respectivamente.

A Figura 16 esquematiza as etapas realizadas, a qual ilustra o princípio básico da síntese de nanopartículas poliméricas por polimerização em miniemulsão via dupla emulsão. A Figura 16 também exemplifica a incorporação do fármaco hidrofílico na fase aquosa interna; porém sabe-se que é possível também a inserção simultânea de agente lipofílico na fase orgânica (SHI *et al.*, 2003), como também a adição de aditivos, como co-estabilizantes (MELO, 2015), espessantes (SCHMIDTS *et al.*, 2010), NaCl (atuando como controlador de pressão osmótica) (FICHEUX *et al.*, 1998; SCHMIDTS *et al.*, 2009), além de misturas de surfactantes (GRIFFIN, 1949), entre outros.

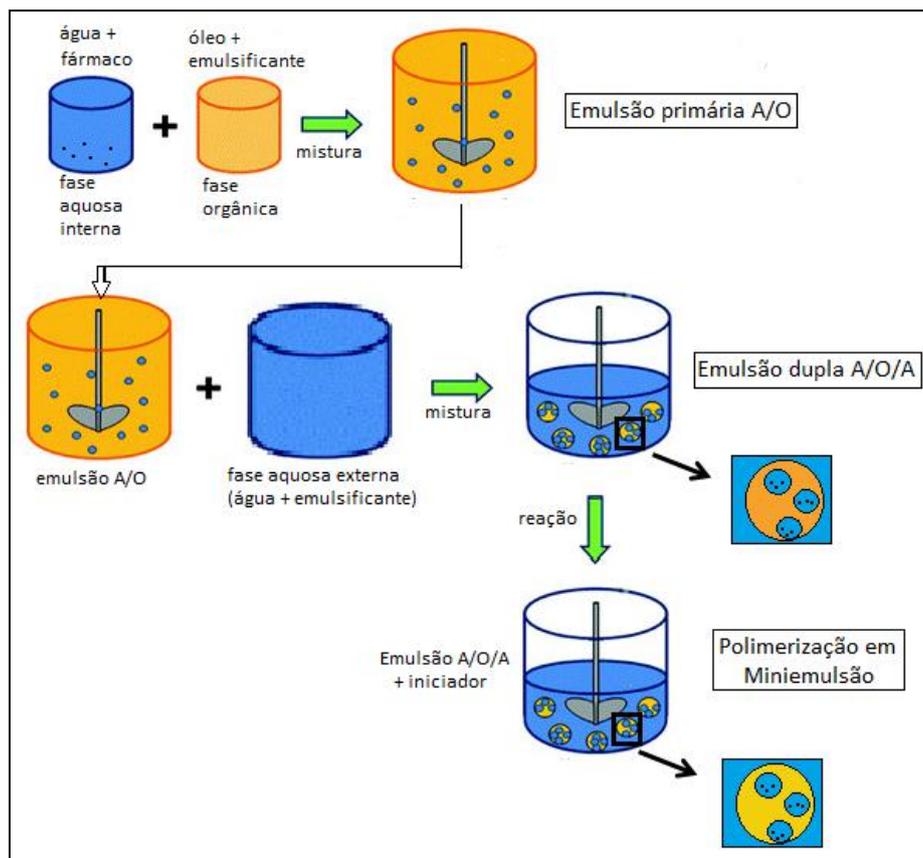


Figura 16 - Representação esquemática do princípio básico da síntese de nanopartículas poliméricas por polimerização em miniemulsão via dupla emulsão.

As NPPs formadas foram caracterizadas quanto ao tamanho e distribuição do tamanho das partículas pelo Zetasizer, morfologia por microscopia óptica e eletrônica de varredura, análise de conversão, distribuição de massas molares por GPC e estabilidade térmica por TGA e DSC.

3.2.5 Ensaio com o Homogeneizador de Alta Pressão

Como já mencionado anteriormente, a preparação das NPPs também foi avaliada em relação à possibilidade de escalonamento do processo. Para isso, fez-se uso do homogeneizador de alta pressão (Artepeças, modelo APLAB-10), como mostrado na Figura 17. Os testes foram feitos no Laboratório Engepol.



Figura 17 - Homogeneizador de alta pressão (Artepeças, APLAB-10) usado para homogeneizar 1E e 2E.

3.2.5.1 Estudo da 1ª Emulsão (1E)

A composição usada para formular a primeira emulsão no homogeneizador de alta pressão se baseou na formulação da emulsão primária estudada no turrax; porém, como se trata de um equipamento para escalonamento industrial, a carga mínima de produto inicial era de 300 g, o qual foi adotado como o total da 1E. As proporções das fases dispersa e contínua permaneceram as mesmas, isto é, 20 e 80% m/m, respectivamente. Foram realizados testes com três composições diferentes: o primeiro similar ao N_5% e os outros dois similares ao N_5%_1%PMMA, conforme mostrado na Tabela 10.

Para as amostras H_1E1 e H_1E2 utilizou-se uma pressão de 200 bar no homogeneizador, mas se diferem pela adição do PMMA na fase oleosa. Já o teste H_1E3 usou a mesma formulação da H_1E2, porém utilizou-se pressão de 350 bar. Todas as amostras foram pré-emulsificadas em agitador magnético por 2 min antes de serem vertidas no homogeneizador.

Tabela 10 - Composição da 1E, em massa [g], usando o homogeneizador de alta pressão.

Amostra	Pressão (bar)	FASE CONTÍNUA (80% m/m)			FASE DISPERSA (20% m/m)
		MMA	Span 80	PMMA	H ₂ O
H_1E1	200	228	12	-	60
H_1E2	200	225,72	12	2,28	60
H_1E3	350	225,72	12	2,28	60

As emulsões foram caracterizadas quanto à estabilidade no Turbiscan e morfologia por microscopia óptica.

3.2.5.2 Emulsão Dupla (2E) e Polimerização em Miniemulsão

Para formação da dupla emulsão, a condição da primeira emulsão utilizada foi a da amostra H_1E2 (Tabela 10). As proporções e as composições da emulsão dupla seguiram as mesmas condições da amostra 2E3 (Tabela 9), ou seja, 20% m/m de fase dispersa e 80% de fase contínua e o surfactante hidrofílico foi o lauril sulfato de sódio (LSS), a 1% m/m da fase contínua. Foram feitas duas amostras da emulsão dupla, sendo que a primeira (H_NP_1a) foi levada ao homogeneizador de alta pressão para geração da emulsão dupla antes de ser vertida no reator. A segunda amostra (H_NP_1b) foi formada somente no reator.

A quantidade total da dupla emulsão para a amostra H_NP_1a foi de 300 g, uma vez que foi formada no homogeneizador. No entanto, como o minireator suporta apenas 100 g de mistura, 80 g de emulsão foram vertidas no minireator como margem de segurança. A amostra foi pré-emulsificada no agitador magnético por 2 min e só depois foi levada à homogeneização a 100 bar durante 10 min, antes de ser transferida para o reator. A dupla emulsão H_NP_1b foi feita no próprio reator, com carga total de 80 g. Primeiramente, adicionou-se ao reator a fase aquosa externa, composta por água e LSS. Em seguida verteu a emulsão primária no reator para formar a emulsão dupla.

A reação de polimerização em miniemulsão ocorreu a 70°C sob agitação de 500 rpm e durante 2 h. Para ambas as amostras, apenas quando a temperatura do reator foi estabilizada a 70 °C, o KPS, previamente dissolvido em uma parcela da água da fase aquosa externa, foi vertido no reator.

As NPPs formadas foram caracterizadas quanto ao tamanho e distribuição do tamanho das partículas, morfologia por microscopia óptica e eletrônica de varredura, análise de conversão e distribuição de massas molares por GPC.

3.2.6 Encapsulamento da BSA *in situ*

Esta etapa compreendeu o encapsulamento da proteína Albumina de soro bovino (BSA) em nanopartículas poliméricas de PMMA. A BSA já é bastante usada na literatura como proteína modelo para ensaio de bioconjugação e encapsulamento (GLASSER *et al.*, 2016; LAMPRECHT *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2011; TELLES, 2013; YE, KIM e PARK, 2010). E por ter estrutura muito similar a HSA (*Human Serum Albumin*) (FERREIRA, 2009), a BSA foi adotada como biomolécula hidrofílica modelo neste trabalho.

O processo de preparo se baseou na metodologia descrita nas seções 3.2.2 ao 3.2.5. A carga de BSA usada foi de 5% m/m em relação à fase aquosa interna. Entretanto, para manter constante o pH do meio, garantindo a estabilidade da proteína, a água da fase aquosa interna foi substituída pela solução tampão fosfato 0,1M e pH 7.

3.2.6.1 Preparação usando o Ultra-turrax

A primeira emulsão foi definida a partir da amostra N_5%_1%PMMA (branco) da Tabela 8. As únicas alterações feitas dizem respeito à adição de 0,3 g (5% m/m) de BSA na fase dispersa e a troca da água pela solução tampão fosfato. As condições de emulsificação no ultra-turrax permaneceram as mesmas. Procedimento similar foi usado para preparação da dupla emulsão e da reação de polimerização, as quais transcorreu conforme descrita para a emulsão secundária 2E3 (branco) (Tabela 9) e do látex NP_2E3. Neste caso, a NPP formada foi denominada NP_2E3_BSA.

A NP_2E3_BSA foi caracterizada quanto ao tamanho e distribuição dos tamanhos da partícula, morfologia, conversão, distribuição de massas molares e estabilidade térmica, além da quantificação da eficiência de encapsulamento e de liberação controlada da BSA, como discutidos adiante.

3.2.6.2 Preparação usando o Homogeneizador de Alta Pressão

A primeira emulsão foi preparada como descrito para a amostra H_1E2 (branco) da Tabela 10. As únicas alterações feitas dizem respeito à adição de 3 g (5% m/m) de BSA na fase dispersa e a troca da água pela solução tampão fosfato. As condições de

emulsificação no homogeneizador de alta pressão permaneceram as mesmas. Procedimento similar foi adotado para a preparação da dupla emulsão e da reação de polimerização, que transcorreram conforme as amostras H_NP_1a e H_NP_1b (brancos) - descritas no tópico 3.2.5.2 - . Neste caso, as NPPs formadas foram denominadas H_NP_1a_BSA e H_NP_1b_BSA.

A NPPs foram caracterizadas quanto ao tamanho e distribuição do tamanho da partícula, conversão, distribuição de massas molares, além da quantificação da eficiência de encapsulamento e liberação controlada do BSA, que serão elucidadas nos tópicos a seguir.

3.2.6.3 Teste de Eficiência de Encapsulamento

As proteínas absorvem fortemente na região ultravioleta devido aos resíduos de aminoácidos, mas existem diversas técnicas colorimétricas que podem ser utilizadas para determinação da quantidade de proteína no espectro visível, como os Métodos de Bradford, de Lowry e de Biureto. Por esse motivo, foi utilizado o espectrômetro de absorção UV-visível (Bel, Photonics, UV-vis spectrophotometer UV-M51) para quantificar a massa de BSA presente nas NPPs. Foi escolhido o Método de Bradford (BRADFORD, 1976) como teste de dosagem da proteína. As análises foram feitas no Laboratório do Grupo Interdisciplinar de Fenômenos Interfaciais (GRIFIT).

A técnica de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível é uma análise muito empregada na determinação da concentração de uma substância que absorve radiação na região do ultravioleta ou do visível. Seu princípio é fundamentado pela Lei de Beer-Lambert, a qual relaciona diretamente e linearmente a concentração da substância em uma solução com sua absorbância de luz. Entretanto, a linearidade da Lei de Beer-Lambert não é válida para concentrações muito elevadas. Por isso, de forma prática, as soluções mensuradas devem apresentar valor de absorbância igual ou inferior à 1; caso contrário, deve-se diluir a solução antes da aferição da absorbância.

O Método de Bradford é um procedimento rápido de dosagem para detecção e determinação da quantidade de proteína presente em determinada solução. O método é baseado na interação entre o principal componente do reagente de Bradford, o corante azul de coomassie brilhante, e macromoléculas de proteínas que contêm resíduos de

aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A interação entre a proteína de alta e média massa molar e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve fortemente no comprimento de onda de 595 nm. Esta interação estabiliza a forma aniônica do corante, causando uma visível mudança de coloração inicialmente castanho para tons de azul, de acordo com a concentração da proteína. A absorbância normalmente é medida com um espectrofotômetro, utilizando como referência o comprimento de onda de 595 nm. A comparação dos resultados com uma curva padrão, com valores de concentrações conhecidos, permite a determinação da concentração da proteína (BRADFORD, 1976).

Dessa forma, o procedimento usado para quantificação e cálculo da eficiência de encapsulamento da BSA estão descritas a seguir.

- Preparo do Reagente de Bradford

Utilizou-se o reagente de Bradford fornecido pela Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). Porém, a solução foi filtrada em papel filtro simples para eliminar possíveis impurezas. O reagente deve ter coloração marrom clara.

- Preparo da Curva de Calibração

Preparou-se 50 mL de solução de BSA em água Milli-Q na concentração de 0,1g/L. A partir dessa solução-mãe, prepararam-se os outros padrões, nas concentrações finais de 0,02; 0,04; 0,06 e 0,08 g/L. Essas cinco concentrações formaram os pontos para construção da curva de calibração de concentração *versus* absorbância, e mensuradas no espectrofotômetro UV-visível em 595 nm.

A partir da regressão linear da curva, foi possível determinar a relação numérica entre concentração e absorbância através da equação da reta e o coeficiente angular, os quais foram utilizados posteriormente como base de cálculo para aferir a concentração final das amostras. O coeficiente de correlação da curva (R^2) deve estar acima de 0,96 para validação da curva (TELLES, 2013). Vale ressaltar que a curva foi refeita a cada uso devido a filtração e possível instabilidade do reagente que se degrada muito rapidamente.

- Procedimento para Dosagem

Tanto para os pontos da curva quanto para as amostras, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e adicionados 1 mL do reagente de Bradford, deixando-os

interagindo dentro de tubos *Eppendorf* por 10 min. Em seguida, com o comprimento de onda já padronizado a 595 nm, zerou-se a absorvância do equipamento, fazendo a leitura no espectrofotômetro com uma alíquota contendo apenas água e o reagente. Depois procedeu-se com a leitura da absorvância das alíquotas com os padrões ou com as amostras. Com as absorvâncias aferidas, determinou-se a equação da reta através dos resultados para os padrões, e assim calculou-se a concentração final de BSA nas amostras. Foi utilizada cubeta de quartzo para deposição da alíquota no espectrofotômetro.

- Amostras utilizadas

As amostras testadas foram os sobrenadantes dos látices providos do turrax (NP_2E3) ou do homogeneizador de alta pressão (H_NP_1a e H_NP_1b), que serviram como branco para determinação da eficiência de encapsulamento e liberação; além dos látices contendo a proteína (NP_2E3_BSA, H_NP_1a_BSA e H_NP_1b_BSA), para dosagem da carga de BSA. As amostras precisaram ser diluídas 100 vezes antes de medir no UV-visível. Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

A quantificação da BSA presente nas NPPs foi feita de maneira indireta, ou seja, foi determinada a concentração no meio dispersante das NPPs ao invés de extraí-las das NPPs. Para isso, o látex foi centrifugado a 4000 rpm por 20 min e a 10000 rpm por mais 20 min. Uma parte do sobrenadante foi então retirada para análise de eficiência de encapsulamento.

- Cálculo da Eficiência de Encapsulamento (%EE)

A eficiência de encapsulamento pode ser calculada pelo balanço de massa, de acordo com a Equação 6.

$$\%EE = 100 \cdot \frac{C_{i\text{ BSA}} - C_{f\text{ BSA}}}{C_{i\text{ BSA}}} \quad (6)$$

sendo que o $C_{i\text{ BSA}}$ é a concentração inicial de BSA a ser encapsulada, de valor igual a 2 g/L, e $C_{f\text{ BSA}}$ é a concentração final de BSA no sobrenadante. O $C_{f\text{ BSA}}$ foi calculado pela diferença de concentração final nas leituras conduzidas com as amostras com BSA e sem BSA (branco).

3.2.6.4 Ensaio de Liberação Controlada

As amostras utilizadas para o ensaio de liberação controlada foram as N_2E3_BSA, H_NP_1a_BSA e H_NP_1b_BSA, além das amostras N_2E3, H_NP_1a e H_NP_1b, que foram empregadas como branco. O teste foi feito no Laboratório de Engenharia de Polímeros (Engepol) e a quantificação por Bradford foi aferida no Grupo Interdisciplinar de Fenômenos Interficiais (GRIFIT). Os experimentos foram realizados em duplicata.

O procedimento iniciou-se com a montagem de um banho térmico que continha a placa multiponto mantida sob agitação magnética e na temperatura de 37°C. Em seguida, foram preparados dois béqueres para cada amostra: um para retirada da amostra no tempo de 24 h e o outro para o tempo de 48 h. Ambos os béqueres continham no meio de liberação 10 mL de solução tampão PBS, pH 7,4, e 1 mL da amostra. Vale ressaltar que esse teste foi assegurado o estabelecimento da condição *sink*, isto é, uma condição em que o meio de dissolução não esteja saturado pelo composto de interesse. Dessa forma, garante-se que durante o ensaio, a liberação não é prejudicada por fatores termodinâmicos.

Após o término do tempo estipulado de 24 ou 48 h, 7 mL do meio de liberação foram vertidas na membrana de 300 kDa e submetidas à centrifugação a 4000 rpm por 20 min. As amostras recolhidas do filtrado foram analisadas pelo Método de Bradford. O cálculo da quantidade liberada de BSA no meio de liberação é dada pela Equação 7:

$$\%Lib = 100 \cdot \frac{\%EE \cdot M_{fBSA}}{M_{iBSA}} \quad (7)$$

sendo que a %EE é a eficiência de encapsulamento da respectiva amostra e calculada através da Equação (6); M_{iBSA} é a massa inicial de BSA para ser liberada, de valor igual a 0,002g; e a M_{fBSA} é a massa final de BSA detectada no filtrado. A M_{fBSA} foi calculada com a diferença de massas entre as leituras da amostra com BSA e sem BSA (branco).

3.3 CARACTERIZAÇÕES

3.3.1 Tensão Superficial e Interfacial dos Óleos (Diesel, Heptano e MMA)

As tensões superficiais do heptano e MMA foram determinadas pelo goniômetro por meio do método da gota pendente. Neste equipamento, a amostra é colocada em uma agulha automática que despeja volumes fixos do líquido suspenso por meio de uma bomba de injeção. A tensão superficial é então medida por meio da captura da curvatura da gota momentos antes da gota se desprender da ponta da agulha. O experimento foi feito em triplicata.

As tensões interfaciais do heptano e MMA com a água também foram calculadas com auxílio do goniômetro, empregando a metodologia similar à usada para caracterizar a tensão superficial, exceto pelo fato da fase leve (líquido suspenso) ser injetada diretamente na fase pesada presente em uma cubeta de quartzo. Foram feitos brancos para cada óleo (amostras de água e óleo sem surfactante), em triplicata, nas quais a fase leve foi o óleo e a fase pesada a água Milli-Q. Para as amostras com adição de surfactante Span 80 à fase oleosa, nas proporções de 1, 3 e 5% m/m, a fase leve e pesada foram invertidas, isto é, a água ficou na agulha e a fase oleosa na cubeta.

A tensão superficial do óleo diesel e a tensão interfacial do diesel com a água foram medidas no aparelho tensiômetro pelo método do anel de Du Noüy. Este equipamento permite obter uma leitura direta da máxima força aplicada para remover um anel de platina sobre um líquido, sendo medida um pouco antes da ruptura do filme de líquido, permitindo o cálculo da tensão superficial e interfacial (ADAMSON e GAST, 1997). No caso da tensão interfacial, a fase oleosa continha apenas o diesel para os brancos e diesel mais surfactante (proporções de 1, 3 e 5% m/m) para as demais amostras. Para fins de validação, foi realizada também a medida da tensão interfacial da amostra sem surfactante do diesel usando o goniômetro.

É importante mencionar que para as amostras com surfactantes, a troca das fases leve e pesada no teste de tensão interfacial no goniômetro foi necessária devido à grande aglomeração de surfactantes em uma pequena área superficial ao entrar em contato com a água, desestabilizando a gota e impossibilitando a captura de sua circunferência. Além disso, para o diesel, mesmo fazendo a alteração das fases, o sistema ainda formava gotas

muito instáveis que se desprendiam rapidamente, sendo preciso a mudança do ensaio no goniômetro para o tensiômetro.

Todas as análises de tensão superficial e interfacial foram efetuadas no GRIFIT.

3.3.2 Análises Morfológicas

3.3.2.1 Microscopia Óptica

As emulsões primárias e secundárias e as nanopartículas sem BSA foram analisadas por microscopia óptica para observação da formação das gotas, utilizando o Microscópio Óptico Invertido (Carl Zeiss, modelo Axiovert 40 MAT) do Laboratório Engacol, em condições de luz transmitida e campo claro. As alíquotas foram gotejadas em lâminas e levadas ao microscópio.

Na tentativa de observar a estrutura interna das nanopartículas poliméricas, a amostra NP_2E3 foi replicada, porém agora encapsulando um corante comercial azul da marca Xadrez (5% m/m com relação a fase aquosa interna), para verificar o contraste de pigmentação entre a nanopartícula e o corante azul. Dessa forma, a amostra NP_2E3 (branco) e a amostra com corante, denominada NP_2E3_CorA, foram submetidas a análises de microscopia no Microscópio Óptico da marca Zeiss (modelo Imager.M2, AxioCam HRC) do Laboratório de Neuroquímica, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ. A análise foi feita em campo claro usando contraste de interferência.

3.3.2.2 Microscopia Eletrônico de Varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para visualização da superfície das nanopartículas poliméricas obtidas. Antes da análise, as NPPs foram secas em estufa e maceradas e depois sofreram um tratamento de metalização por recobrimento com ouro. As condições de operação para a aquisição das imagens, como tamanhos de “spot”, distância de trabalho (WD) e as ampliações das regiões fotografadas, podem ser observadas nas legendas das micrografias que serão apresentadas no Capítulo 4.

As amostras testadas foram as partículas NP_2E2, NP_2E3, NP_2E4, H_NP_1a e H_NP_1b e as análises foram obtidas pelo MEV da marca FEI Company (modelo Quanta 400 FEG) do Núcleo de Catálise (NUCAT). Essas amostras também foram submetidas ao MEV no equipamento da marca Tescan (modelo MEV Vega 3LMU) do Núcleo Multiusuário de Microscopia. Além da análise dessas amostras em pó, as partículas também foram tratadas por um processo de crioseção para posterior teste de morfologia, no qual foi utilizado com o intuito de observar a estrutura interna das NPPs, de modo a confirmar a formação da dupla emulsão. A crioseção se baseou nas etapas seguintes: (i) imersão das NPPs em um molde formado por uma mistura de resina Epóxi e endurecedor jef, (ii) descanso ao ar livre das amostras por aproximadamente 17 h, (iii) desinformação e corte de lascas bem finas com auxílio de uma lâmina metálica, (iv) metalização das amostras, e (v) análise no MEV.

3.3.3 Análise de Conversão

Para a análise e cálculo da conversão, foram retiradas diretamente do reator 6 alíquotas de 2 mL de solução reacional durante o período de 2 horas. Os tempos de retirada das alíquotas foram de 1, 5, 15, 30, 60 e 120 min após a adição do iniciador KPS na solução reacional. Para cessar a reação de cada medição, foram utilizadas 5 gotas de solução de hidroquinona 1% m/m em 2 mL da fase reacional. Todas as amostras foram pesadas em balança analítica imediatamente após a retirada. Em seguida, as alíquotas foram postas em estufa a vácuo a 50 °C para secagem até peso constante. O cálculo de conversão (%X) foi dada pela Equação 8.

$$\%X = 100 \cdot \frac{M_f}{\frac{M_a \cdot M_m}{M_T}} \quad (8)$$

em que, M_f é a massa final do polímero; M_a é a massa inicial da alíquota; M_m é a massa inicial do monômero e M_T a massa inicial total da solução reacional.

A curva normalizada de conversão contra o tempo foi feita para as corridas NP_2E3; H_NP_1a; H_NP_1b; NP_2E3_BSA; H_NP_1a_BSA e H_NP_1b_BSA.

3.3.4 Diâmetro Médio e Distribuição de Tamanho das Partículas

A determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanhos de partículas foi feita por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz, utilizando um analisador de tamanhos de partícula da marca Malvern Instruments ZetaSizer, modelo Nano-ZS. Esta análise se baseia no espalhamento dinâmico da luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*), associado ao movimento das partículas em um meio sujeito ao movimento browniano.

Para a realização da análise, foram utilizadas cubetas de quartzo. Uma gota da amostra a ser analisada era depositada na cubeta e o restante do volume era preenchido com água destilada. Com o auxílio da pipeta *pasteur*, a dispersão era homogeneizada e levada ao equipamento. Foram feitas análises com alíquotas de todas as amostras polimerizadas nos tempos de 10 e 120 min de reação, utilizando a distribuição de intensidades para fins de cálculo das distribuições de tamanho.

3.3.5 Distribuição de Massas Molares

A distribuição das massas molares das NPPs formadas foram aferidas pela técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC), conhecida também por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Foi utilizado para análise o cromatógrafo Viscotek, modelo GPC Max VE2001, do Laboratório de Engenharia de Polímeros (Engepol), com coluna linear KF-804L e KF-805L, fornecidas pela Shodex, com tamanho máximo de poro de $1,5 \cdot 10^3 \text{ \AA}$ e $5 \cdot 10^3 \text{ \AA}$, e com detector refratométrico Viscotek, modelo VE3580, operando a 40 °C.

Nessa técnica, uma solução com o polímero é bombeada através de uma coluna recheada com um gel poroso heterogêneo. As cadeias menores penetram os poros dos gel e, por isso, percorrem um caminho maior que as cadeias maiores, ao passo que as cadeias maiores são eluídas primeiro, havendo uma separação gradual e contínua de massas molares da amostra polimérica (CANEVAROLO JR., 2006).

Para realização da análise, pesaram-se 6 mg das NPPs secas e maceradas, dissolvendo as amostras em 3 mL da fase móvel composta pelo solvente tetrahidrofurano (THF) e foi feita a medida no cromatógrafo.

3.3.6 Estabilidade Térmica

3.3.6.1 Análise Termogravimétrica (TGA)

Para quantificação de perdas de massa sob aquecimento dos polímeros, a análise termogravimétrica (TGA) (Perkin-Elmer, modelo TGA Pyris 1) foram realizadas. As amostras submetidas ao teste de estabilidade térmica foram as partículas NP_2E2, NP_2E3, NP_2E4 e NP_2E3_BSA, além do surfactante PVA. Utilizaram-se 10 mg de cada amostra em pó para o ensaio. O intervalo de temperatura usado foi de 40 a 700 °C, com rampa de aquecimento de 10 °C/min. As análises foram conduzidas em atmosfera inerte com fluxo constante de nitrogênio a 20 mL/min e feitas no Laboratório de Processos com Membranas (PAM).

3.3.6.2 Calorímetro de Varredura Diferencial (DSC)

Quando uma substância sofre alguma transformação física ou química, ocorre liberação ou absorção de uma determinada quantidade de calor. A técnica de DSC mede, por meio de uma programação controlada de temperatura (aquecimento ou resfriamento), a energia envolvida nessa transformação (ODIAN, 2004).

A determinação de temperaturas características das transições térmicas das partículas poliméricas foram feitas no equipamento Calorímetro de Varredura Diferencial (Perkin-Elmer, modelo DSC-7 Diamond) do laboratório PAM. Foram pesados aproximadamente 10 mg da amostra em cadinhos de alumínio fechados. Os termogramas foram obtidos no segundo ciclo de aquecimento/resfriamento, empregando taxa de aquecimento/resfriamento constante de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio e em um intervalo de temperatura de 0 a 250 °C. O primeiro ciclo teve como objetivo a padronização da história térmica das amostras.

As amostras submetidas ao teste de estabilidade térmica foram as NP_2E2, NP_2E3, NP_2E4 e NP_2E3_BSA, além do surfactante PVA.

Capítulo IV

Resultados e Discussão

4.1 TESTE PRELIMINAR DE ESTABILIDADE DA 1ª EMULSÃO (1E)

Como o projeto proposto é inovador tanto nos grupos de pesquisas em que o trabalho foi desenvolvido quanto na literatura, fez-se necessário conduzir ensaios preliminares de estabilidade, a fim de encontrar uma condição apropriada para o processo, bem como investigar o comportamento com diferentes óleos. Assim, em primeira instância, foram realizadas análises de caracterização dos óleos e um planejamento experimental de estabilidade da primeira emulsão (A/O), utilizando, além do monômero MMA, os óleos diesel e heptano como frações majoritárias da fase contínua. Foram escolhidas a carga de fase dispersa, a carga de surfactante e a velocidade de rotação do turrax como variáveis de entrada. Foi possível selecionar formulações que permitiram a obtenção de emulsões com estabilidade adequada. As etapas seguintes envolveram a produção de emulsões no homogeneizador de alta pressão utilizando o monômero MMA como fase contínua e a obtenção das emulsões duplas para posterior polimerização. Por fim, foi investigado o encapsulamento da BSA como biomolécula-modelo nas nanopartículas produzidas por polimerização em miniemulsão dupla.

4.1.1 Caracterização dos Óleos (Diesel, Heptano e MMA)

A caracterização dos óleos teve por finalidade analisar e comparar as propriedades de tais óleos e entender os comportamentos em relação à adição de surfactantes e à formação da emulsão A/O.

Com relação ao óleo diesel, tendo em vista que não estava disponível qualquer especificação detalhada do material, foram medidas a porcentagem de água, as viscosidade cinemática e dinâmica e a densidade do óleo a fim de melhor caracterizá-lo. A quantidade presente de água foi determinada pela titulação de Karl Fischer em triplicata, na qual se constatou o percentual de 0% de água no diesel nas três tentativas.

Esse resultado indica que não haverá água presente na fase orgânica nos ensaios de emulsão, não alterando portanto a proporção de fases presentes. A densidade e viscosidades cinemática e dinâmica foram feitas em triplicata no viscosímetro (Anton Paar, Modelo SVM 3000), obtendo valores iguais à $0,8499 \text{ g/cm}^3$; $5,9593 \pm 0,0012 \text{ mm}^2/\text{s}$ e $5,0651 \pm 0,0011 \text{ mPa.s}$, respectivamente.

Como a estabilidade das emulsões obtidas influencia a morfologia final das partículas após a polimerização, é importante avaliar as características dos sistemas bifásicos selecionados. Desta forma, uma das propriedades mais relevantes é a energia de superfície das fases, que foi caracterizada pela medida da tensão superficial e interfacial. Os valores encontrados estão contidos nas Tabelas 11 e 12. Os óleos puros são as amostras representadas com 0% e as demais com a referente fração m/m de surfactante presente na fase oleosa, em porcentagem.

Tabela 11 - Tensão Superficial realizada no goniômetro para o heptano e MMA e no tensiômetro para o óleo diesel.

Amostra	Tensão Superficial [mN/m]	Erro do aparelho [mN/m]	
Heptano_0%_1	20,44	0,73	
Heptano_0%_2	20,49	0,66	
Heptano_0%_3	20,44	0,75	
Média	20,457	Desvio Padrão	0,029
MMA_0%_1	26,68	0,79	
MMA_0%_2	26,82	0,84	
MMA_0%_3	26,82	0,84	
Média	26,773	Desvio Padrão	0,081
Diesel_0%	27,261	0,017	

A tensão superficial do heptano resultou em média de $20,457 \pm 0,029 \text{ mN/m}$, valor condizente com o encontrado na literatura, de $20,53 \text{ mN/m}$ (ROLO *et al.*, 2002). Da mesma forma, o monômero MMA teve tensão superficial média de $26,773 \pm 0,081 \text{ mN/m}$, parecido com o valor encontrado na literatura de 28 mN/m (CAMEO Chemicals, 1999). Por fim, embora o diesel apresente uma composição complexa e variável, a tensão superficial de $27,261 \text{ mN/m}$ foi similar à retratada por Chen e Chen (2006), $28,25 \text{ mN/m}$, e Wang *et al.* (2006), de $28,75 \text{ mN/m}$. Portanto, as medidas são

confiáveis. Observa-se que as tensões superficiais das fases oleosas são parecidas, a despeito das significativas diferenças moleculares entre as espécies.

Tabela 12 - Tensão Interfacial realizada no goniômetro para o heptano e MMA e no tensiômetro para o óleo diesel.

Amostra	Tensão Interfacial [mN/m]	Erro do aparelho [mN/m]	
Branco			
Heptano_0%_1	50,77	0,31	
Heptano_0%_2	50,9	0,21	
Heptano_0%_3	50,39	0,18	
Média	50,687	Desvio Padrão	0,265
MMA_0%_1	14,96	1,4	
MMA_0%_2	15,03	1,18	
MMA_0%_3	15,06	1,23	
Média	15,017	Desvio Padrão	0,051
Diesel_0%_1*	14,20	0,57	
Diesel_0%_2*	14,76	0,45	
Diesel_0%_3*	14,45	0,68	
Média	14,470	Desvio Padrão	0,281
Diesel_0%_4**	14,086		
Amostras com surfactante			
Heptano_1%	6,99	0,16	
Heptano_3%	5,93	6,5	
Heptano_5%	3,69	6,21	
MMA_1%	2,29	5	
MMA_3%	0,54	0,61	
MMA_5%	Não detectável		
Diesel_1%	2,135		
Diesel_3%	Não detectável		
Diesel_5%	Não detectável		

* Triplicata do experimento da tensão interfacial do diesel feito no goniômetro. ** Medida foi feita no tensiômetro de anel.

Observa-se em particular que o heptano é muito mais hidrofóbico que o MMA e o óleo diesel, como indicado pela maior tensão interfacial em água. É surpreendente o menor valor de tensão interfacial do óleo diesel em relação ao MMA e ao heptano, o que provavelmente é devido à presença de aditivos no óleo.

Com relação às amostras que continham surfactante na fase orgânica, a tensão interfacial diminuiu consideravelmente quando comparadas à tensão interfacial dos óleos puros, ao ponto que não foi possível detectar sua medida. Ademais, com o aumento da concentração de surfactante, o decaimento da tensão foi ainda mais significativo. Tal fenômeno ocorre devido ao caráter anfifílico do surfactante, que possibilita a diminuição da tensão na interface entre as fases aquosa e oleosa (MYERS, 1999). Vale ressaltar que o decaimento da tensão interfacial é indicativo da maior facilidade para formar uma emulsão, porém não necessariamente garante que a estabilidade das grandes áreas interfaciais associadas a emulsões será prolongada. De qualquer forma, os dados mostram que o surfactante proposto (Span 80) é ativo nos três sistemas analisados, justificando a execução da próxima etapa, que consiste em estudar a cinética da desestabilização da emulsão água em óleo na presença de diferentes quantidades de surfactantes.

4.1.2 Efeito da Formulação sobre a Estabilidade das Emulsões

Com o intuito de extrair o máximo de informações a respeito da estabilidade do sistema de emulsão A/O, usando menor número de experimentos possível, foi empregado um plano experimental fatorial completo a dois níveis (2^3) e análise estatística, admitindo-se distribuição normal de probabilidades, com um intervalo de confiança de 95% (SCHWAAB e PINTO, 2007).

A proposta do planejamento também visou a determinação de uma condição ótima para a estabilidade da emulsão primária A/O para posterior uso na formação da dupla emulsão, polimerização por miniemulsão e encapsulamento de fármacos. Dessa forma, todos os intervalos propostos tiveram embasamento e coerência com os dados do grupo de pesquisa, bem como da literatura.

A escolha do surfactante baseou-se nos estudos de Griffin (1949), que descrevem sobre a faixa de HLB do surfactante para cada tipo de emulsão; no caso de emulsão do tipo água em óleo, o HLB deve estar entre 4 a 6, logo como o Span 80 tem HLB igual a 4,3, pode ser utilizado como o estabilizante lipofílico. Além desse argumento, o Span 80 não é uma substância ou mistura perigosa de acordo com o Regulamento (CE) nº 1272/2008 (ACOFARMA, 2010), sendo permitido como

adjuvante farmacotécnico pela ANVISA (ANVISA, 2006). Por isso, o Span 80 é usado com alta frequência em trabalhos científicos, em especial aqueles relacionados a fármacos e inclusive para dupla emulsões (BAI *et al.*, 2015; FICHEUX *et al.*, 1998; PAYS *et al.*, 2002; SCHMIDTS *et al.*, 2009, 2010; ZHU *et al.*, 2005), sendo usado com sucesso como surfactante na primeira etapa de emulsificação água-em-óleo (HUNTER, BENNETT, 1997). Ademais, Zhu *et al.* (2005) relatou que o fato do Span 80 apresentar uma ligação dupla na parte da cauda apolar (Figura 18), resulta em uma cadeia mais flexível, de maneira que a interface estaria mais propensa a se curvar, gerando menores tamanhos médios de partícula. O Span 80 é um surfactante não-iônico, de forma que o mecanismo de estabilização é devido principalmente ao impedimento estérico (AMERICAS, 1980).

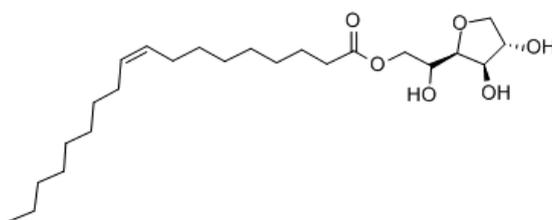


Figura 18 - Estrutura química do Span 80

4.1.2.1 Análise das Amostras e das Variáveis de Saída

O aspecto geral das amostras geradas nos ensaios do planejamento e os valores das variáveis de saída, porcentagem de sedimentação (%S) e índice de estabilidade do turbiscan (TSI), obtidos nos ensaios de estabilidade estão dispostos a seguir. Tais resultados foram primeiramente analisados separadamente para cada fase oleosa utilizada para então ser feita a comparação dos mesmos.

Diesel

O diesel foi escolhido nessa etapa inicial, pois possui características distintas do MMA, e portanto foi possível observar comparativamente, os diferentes comportamentos desses óleos por meio do planejamento experimental, além disso, o mesmo é de fácil aquisição. Na Figura 19 é mostrada a aparência da emulsão de óleo diesel com span 80 e água destilada. A Figura 19.a) representa as emulsões antes de serem submetidas ao processo de homogeneização, na qual é possível observar a

imiscibilidade dos líquidos em questão e na interface a presença do surfactante, devido a sua característica anfifílica. A Figura 19.b) retrata o sistema já emulsionado após 20min, em que sua coloração apresenta tom rosado leitoso, porém começando a surgir regiões mais claras (próximas ao fundo e portanto, ricas em água) e regiões mais rosadas (próximas ao topo, evidenciando a maior presença da fase oleosa). Por conseguinte, observa-se a ocorrência dos fenômenos de clarificação e sedimentação. Por fim, a Figura 19.c) expõe a emulsão após 2 h do término da homogeneização, onde é visto mais nitidamente o aparecimento de três camadas, e conseqüentemente a prevalência dos fenômenos de desestabilização. As demais amostras do experimento obtiveram aspecto visual similar ao da Figura 19, apresentando apenas algumas variações de cor e espessura das camadas, a depender da condição imposta pelo planejamento experimental.

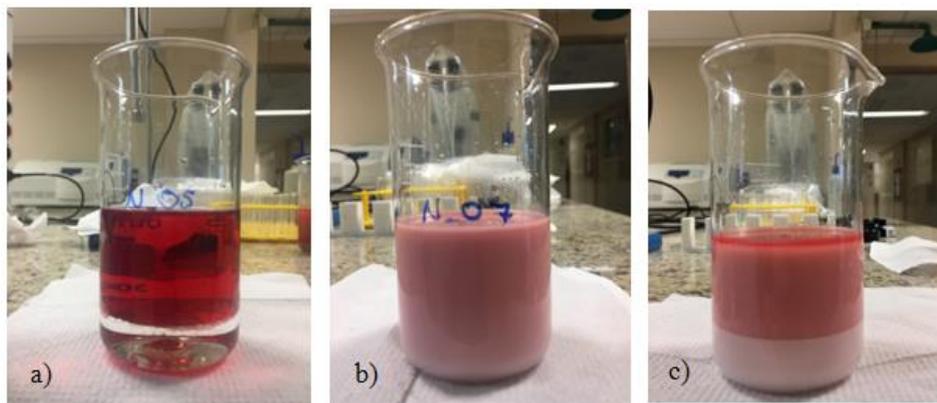


Figura 19 - Aparência da emulsão de água em óleo diesel a) antes da homogeneização no ultra-turrax; b) 20 min após passagem no ultra-turrax; e c) 2 h após passagem no ultra-turrax.

A Figura 20 mostra o perfil cinético do processo de desestabilização das emulsões por meio do Turbiscan. Na abscissa encontra-se a altura da cubeta do fundo até o topo, enquanto na ordenada encontra-se o valor da variação de *backscattering* ($\% \Delta BS$). A partir desta figura é possível detectar mais fenômenos de desestabilidade e com maior eficácia do que a olho nu. Por exemplo, se a região do topo (lado direito do gráfico) estiver decaindo com o tempo, implica-se que houve clarificação nessa região, devido ao decréscimo da concentração de partículas nessa área, isto é, migração das partículas do topo para as regiões centrais e inferiores. Vale relatar que utilizou-se de três amostras como modelo, os perfis associados as demais amostras encontram-se presentes no Apêndice A.

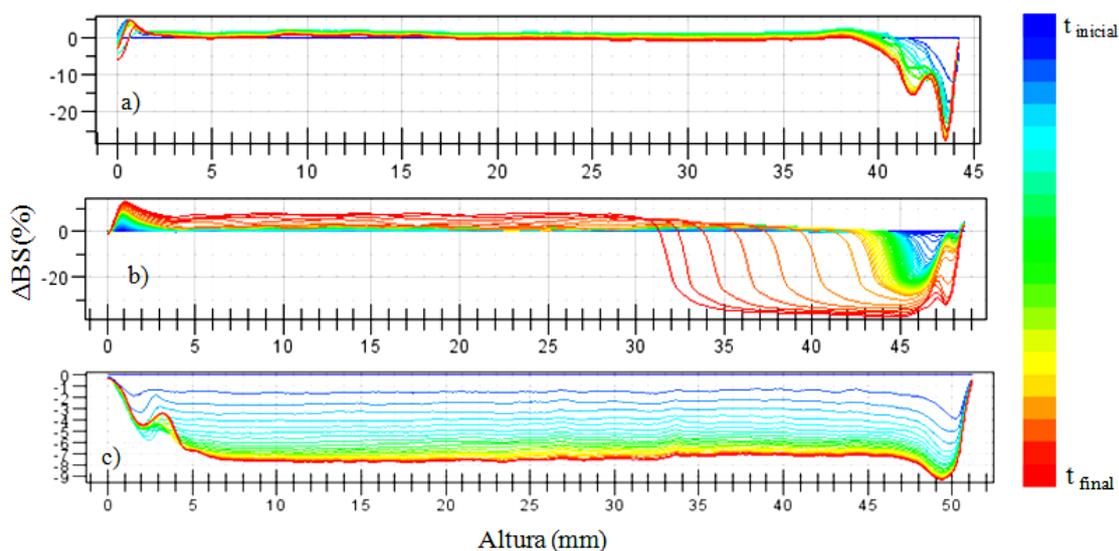


Figura 20 - Perfis qualitativos de estabilidade para emulsão de água em óleo diesel para três amostras do planejamento: a) amostra N_04; b) amostra N_06; e c) amostra sem surfactante.

Na Figura 20.a) observa-se que as curvas ao longo do tempo estão quase se sobrepondo na maior parte dos pontos da cubeta. Isso significa que não houve grande variação de *backscattering*, e conseqüentemente a emulsão não se alterou com o decorrer do tempo, não havendo migração ou aglomeração de partículas. Portanto, tal comportamento representa uma emulsão mais estável. Deve-se mencionar que geralmente não são observadas mudanças no tamanho de partícula quando o BS se encontra no intervalo de até 2% e que amostras estáveis possuem ΔBS menores que 10% (MENGUAL *et al.*, 1999; OLEJNIK, SCHROEDER e NOWAK, 2015), como ocorreu no caso da Figura 20.a). Entretanto, o equipamento conseguiu captar pequenas alterações no BS, sugerindo que houve um pouco de sedimentação (pico na área esquerda do gráfico) e clarificação (região entre 40 e 45mm).

Um comportamento mais instável pode ser constatado na Figura 20.b). Primeiramente é observada uma mudança no *backscattering* ao longo de toda altura da cubeta, em especial na região mediana, a qual está relacionada com o aumento do tamanho das partículas, correspondente aos fenômenos de floculação e coalescência, assim como reportado por Olejnik, Schroeder e Nowak (2015). Além disso, o decaimento da porcentagem de BS no topo (parte da direita do gráfico) está relacionada à redução da concentração de partículas no topo e portanto ocorreu clarificação. Por outro lado, o pico no fundo da cubeta foi devido ao aumento da concentração de partículas nessa área, com a ocorrência de sedimentação (FORMULATION, 2009).

Por fim, a Figura 20.c) retrata outro exemplo de emulsão instável, uma vez que as curvas não estão sobrepostas por toda a altura da cubeta todo o tempo. Isso é uma característica típica de floculação e/ou coalescência, assim como mostrado na Figura 20.b); porém o tempo de análise foi menor, 20 min contra 1 h e meia da Figura 20.b), de forma que a agregação ocorreu muito mais rapidamente na ausência do surfactante. Essa acelerada aglomeração já era esperada, pois a amostra não continha Span 80 e, portanto, não continha estabilizante para diminuir a tensão interfacial, promover a formação e a estabilidade da emulsão (MYERS, 1999), evitando a desestabilização irreversível.

No entanto, para fins comparativos, apenas a análise qualitativa dos gráficos de cada experimento não é suficiente para afirmar qual ou quais sistemas emulsionados do planejamento foram os mais estáveis. Portanto, foram calculadas as variáveis de saída, porcentagem de sedimentação (%S) e o índice de estabilidade do Turbiscan (TSI), de forma a atender aos quesitos comparativos. A Tabela 13 resume os valores encontrados das variáveis resposta após o procedimento estatístico experimental para o tempo de 40 min, exceto para os brancos (sem surfactante), cujos experimentos foram conduzidos por 20 min.

Sabe-se primeiramente que ambas variáveis respostas são inversamente proporcionais à estabilidade da emulsão, ou seja, quanto menores os seus valores, mais estável é a emulsão. Assim, de forma geral, os resultados foram pequenos para quase todos os experimentos do plano fatorial, indicando boa estabilidade. As principais justificativas podem estar atreladas ao fato do diesel ter composição complexa, contendo outros aditivos que podem favorecer a estabilidade. Além disso, o diesel possui uma viscosidade elevada, que dificulta a movimentação das partículas, evitando a migração e a agregação das mesmas (ADAMSON e GAST, 1997), e por ser majoritariamente constituído por hidrocarbonetos com 15 a 18 átomos de carbono, é bastante apolar, e por conseguinte tem boa afinidade com o surfactante lipofílico em questão (ADAMSON e GAST, 1997; SCHMIDTS *et al.*, 2010).

Analisando ambas variáveis de saída para cada experimento, observa-se que para ambos os casos, a melhor condição ocorreu no intervalo de maior carga de surfactante e de menores carga de fase dispersa e velocidade, correspondente ao experimento 4. Já a pior situação aconteceu exatamente na condição contrária a esta. Entretanto, observa-se que o experimento 6, também obteve TSI baixo, o que indica que o efeito da velocidade

de rotação deve ser o mais determinante para região experimental estudada. Ademais, reprodutibilidade também pode ser observada neste planejamento, pois os valores para o ponto central (experimentos 9 ao 11) foram parecidos para as duas variáveis de saída.

Tabela 13 - Valores das variáveis de saída, porcentagem de sedimentação e índice de estabilidade do Turbiscan, para o planejamento experimental com o diesel.

Experimento	Variável I Carga Surfactante na F.O. [%m/m]	Variável II Carga fase dispersa [%m/m]	Variável III Velocidade do ultra- turax [rpmx10 ³]	%S	TSI
1	5	30	13	14,984	14,675
2	5	30	5	-2,355	5,558
3	5	10	13	8,953	6,537
4	5	10	5	0,637	4,745
5	1	30	13	41,580	25,392
6	1	30	5	-2,286	4,485
7	1	10	13	14,868	10,387
8	1	10	5	1,418	5,053
9	3	20	9	7,107	8,718
10	3	20	9	7,469	9,971
11	3	20	9	7,844	9,609
Branco 1	0	10	9	71,941	7,139
Branco 2	0	20	9	64,949	7,250
Branco 3	0	30	9	67,461	8,016

Além disso, a análise qualitativa feita para as amostras sem surfactante (Figura 20.c)) foi comprovada pelo alto valor obtido da porcentagem de sedimentação, mesmo ocorrendo com a metade do tempo total do planejamento. O aumento do TSI dos brancos não foi muito perceptível quanto para a %S, porém foram maiores que o TSI das amostras tratadas com surfactante para o mesmo tempo final de 20 min (dados não mostrados).

Por meio das ferramentas de análise do Turbiscan, foi possível traçar o perfil dinâmico do TSI para cada amostra (Figura 21). De maneira geral, todas as amostras apresentaram comportamento linear ao longo do tempo, com exceção da amostra N_05, que mostrou variação acentuada nos primeiros instantes e posteriormente linear. Isso

mostra que o processo de desestabilização é contínuo em todos os casos, definindo em termos da velocidade com que ocorre. Portanto, existe um espaço de tempo finito que permite a manipulação das emulsões preparadas.

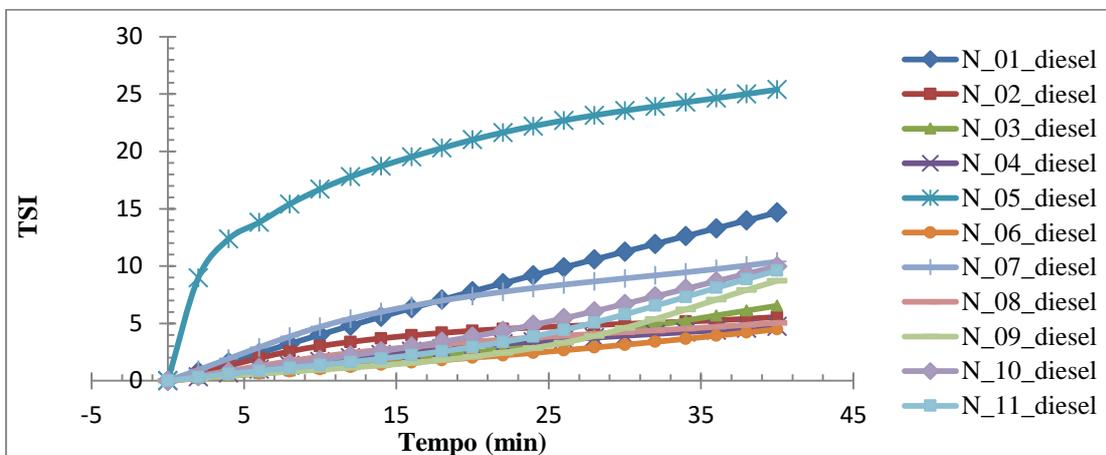


Figura 21 - Perfil do TSI em função do tempo para emulsão de água em óleo diesel do planejamento experimental. Erro = $\pm 0,64$.

Heptano

O heptano também foi escolhido nessa etapa inicial, por possuir, da mesma forma que o diesel, características distintas do MMA. Além disso, o heptano foi o óleo mais hidrofóbico, visto o valor da tensão interfacial com a água (Tabela 12), e assim foi de interesse entender tal comportamento através do planejamento experimental.

O comportamento das amostras das emulsões compostas por heptano, Span 80 e água é exemplificado com a amostra N_10 na Figura 22. Na Figura 22.a) é possível observar uma emulsão visualmente homogênea após 1 min do término da homogeneização, ficando com uma coloração branca leitosa. A Figura 22.b) retrata o sistema já emulsionado após 20min, com coloração ainda branco leitosa, porém já inicia-se uma diferenciação de cores nas regiões do topo e fundo, ficando um pouco mais transparente e branco acinzentado, respectivamente. O topo provavelmente ficou mais rico em heptano, pois o hidrocarboneto apresenta aparência transparente e tem densidade menor que da água, de valor em torno de $0,680\text{g/cm}^3$ (DYMOND *et al.*, 1988). Em contrapartida, a região do fundo ficou mais rica em água. A região central com uma aparência similar à vista nos momentos iniciais. Após 2 h, a aparência descrita para a Figura 22.b) é mais realçada (Figura 22.c)), do mesmo modo que ocorreu com a

amostra de diesel (Figura 19.c)), sendo possível observar a presença de três camadas, enfatizando a ocorrência dos fenômenos de desestabilização.

Como a água e o heptano são transparentes e a emulsão formada era branca, as mudanças de coloração no decorrer do tempo foram mais difíceis e lentas de serem identificadas, assim como os mecanismos de desestabilização. Em contrapartida, as análises com o Turbiscan evitam esse problema, de forma a reconhecer mais fácil e rapidamente o comportamento da emulsão (Figura 23).

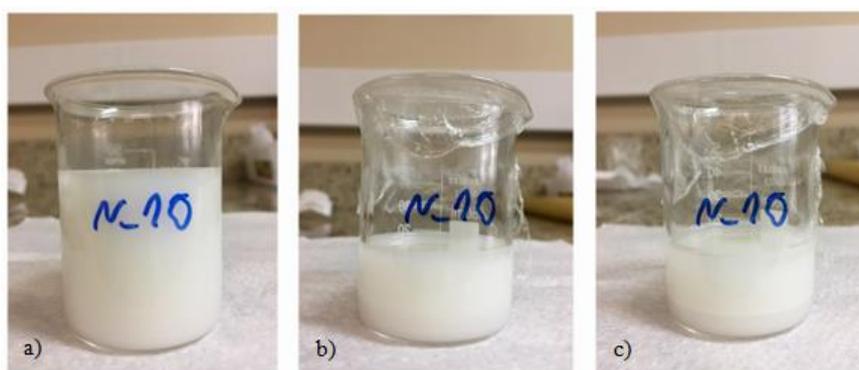


Figura 22 - Aparência da emulsão de água em heptano a) 1min; b) 20min; e c) 2h após passagem no ultra-turrax.

A Figura 23.a) ilustra o comportamento de grande maioria das amostras do plano de experimentos, na qual foi constatada a floculação e coalescência (curvas na região central não sobrepostas), além da clarificação no fundo e no topo da cubeta, devido à presença de bandas. A única exceção observada foi a amostra 5 (Figura 23.b)), na qual além da ocorrência da floculação e coalescência, observou-se larga área de sedimentação (intervalo entre 0 e 18 mm).

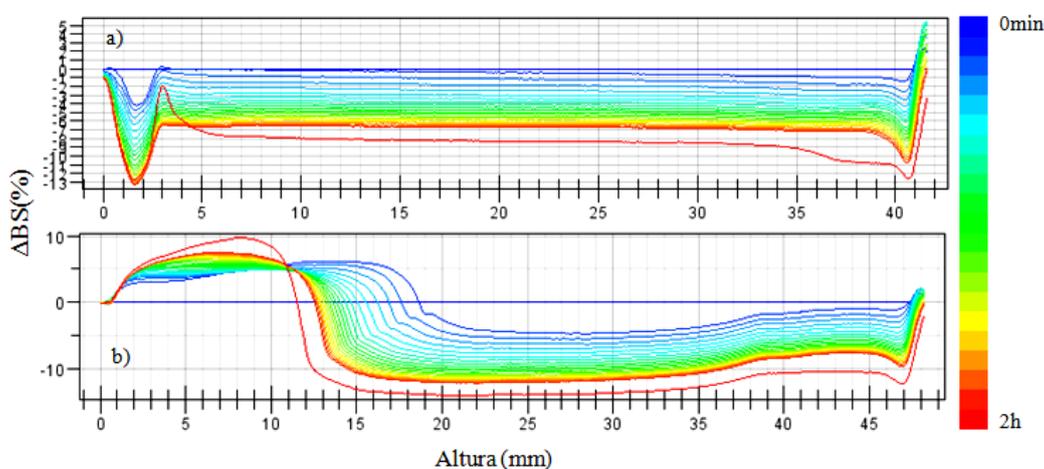


Figura 23 - Perfil qualitativo de estabilidade para emulsão de água em heptano para duas amostras do planejamento: a) amostra N_02; b) amostra N_05.

A Tabela 14 resume os valores encontrados das variáveis resposta após o procedimento experimental para o tempo de 40 min.

Tabela 14 - Valores das variáveis de saída, porcentagem de sedimentação e índice de estabilidade do Turbiscan, para o planejamento experimental com o heptano.

Experimento	Variável I	Variável II	Variável III	%S	TSI
	Carga Surfactante na F.O. [%m/m]	Carga fase dispersa [%m/m]	Velocidade do ultraturrax [rpmx10 ³]		
1	5	30	20,5	19,581	9,245
2	5	30	11,5	15,733	6,545
3	5	10	20,5	19,207	5,632
4	5	10	11,5	12,404	2,230
5	1	30	20,5	48,072	8,961
6	1	30	11,5	30,678	5,235
7	1	10	20,5	25,195	3,540
8	1	10	11,5	20,687	1,985
9	3	20	14,5	21,821	6,222
10	3	20	14,5	17,036	4,760
11	3	20	14,5	20,202	6,493

Em relação à porcentagem de sedimentação, os valores foram sempre mais altos que os alcançados com o diesel, provavelmente em virtude de vários fatores: (i) do mais baixo valor de viscosidade, 0,389 mPa.s (DYMOND e O/YE, 1994), que facilita a movimentação e interação das partículas umas com as outras, com consequente promoção de floculação e coalescência; (ii) da mais baixa densidade, 0,680g/cm³, que promove a separação mais rápida da água; (iii) da maior tensão interfacial, com a água, que torna menos eficiente o uso do surfactante. No entanto, as condições de preparo das amostras do heptano mais e menos estáveis, N_04 e N_05 respectivamente, foram também a melhor e a pior condições encontradas no caso do diesel. Portanto, os efeitos observados podem ser explicados de forma similar.

Os valores de TSI foram baixos quando comparados aos de %S, talvez pelo fato do TSI levar em consideração a soma de todas as mudanças ocorridas na região total da cubeta durante período considerado de tempo, enquanto a %S é calculada com os dados da região central do gráfico apenas. Porém os melhores e piores resultados também

foram a N_04 e N_05, juntamente com a N_08 e N_01, respectivamente. Os baixos valores de TSI podem ser devidos à variação lenta e contínua do % Δ BS.

A Figura 24 mostra os perfis do TSI de todos os experimentos em relação ao tempo. As curvas seguem padrões similares, em que observa um aumento mais acentuado nos 20 minutos iniciais e menos acentuado após isso. Com exceção das amostras N_04 e N_08, que resultaram em perfis mais lineares ao longo do tempo. De forma geral, a Figura 24 é muito semelhante à Figura 21, indicando a similaridade entre os processos de instabilidade das emulsões preparadas com o diesel e heptano, a despeito das diferenças já relatadas.

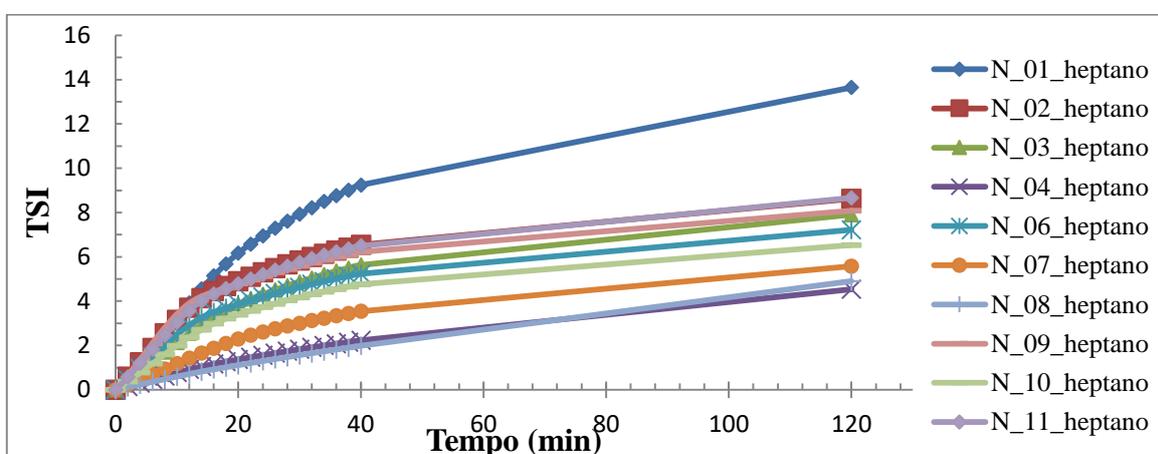


Figura 24 - Perfil do TSI em função do tempo para emulsão de água em heptano do planejamento experimental. Erro = $\pm 0,93$.

Metacrilato de metila

Dentre os três óleos analisados, o MMA foi aquele que apresentou comportamentos mais variados, como ilustrado na Figura 25. As Figuras 25. a), b) e c) são amostras obtidas 1min após a emulsificação, no qual observam-se duas camadas após pouco tempo do término em algumas amostras (Figura 25.a)), com aspecto branco leitoso no centro e fundo e líquido turvo no topo; outras amostras com coloração amarelada (Figura 25.b)); e acinzentada (Figura 25.c)) com topo um pouco mais transparente. Com o decorrer do tempo, foram surgindo camadas com colorações diferenciadas (Figuras 25.d) - i)), em que as regiões superiores eram constituídas principalmente por MMA, devido à menor densidade em relação à água, e mais ricas em água no fundo. Na Figura 25.d) aparentemente ocorreu a decantação da emulsão A/O, ficando no topo o excesso de MMA, onde é mais evidenciado em 2h após a

emulsificação (Figura 25.g)). Nas amostras compostas por três camadas (Figuras 25.e e h)), viu-se o aparecimento de uma camada inferior, provavelmente composta majoritariamente por água, e apenas na região intermediária onde existiria o sistema emulsionado e similar ao preparado durante a homogeneização. Por fim, os experimentos com carga de 1% de Span 80 na fase orgânica são representados na coluna da direita, em que presumivelmente não tiveram composição adequadamente suficiente para formar uma emulsão, uma vez que coloração não alterou muito depois da homogeneização e houve aparentemente separação completa de fases após 2 h (Figura 25.i)). Esses resultados são surpreendentes, dada a polaridade do MMA e a maior compatibilidade com a água (quando comparado com o diesel e heptano) e provavelmente indica a atuação menos eficiente do emulsificante. Esse exemplo mostra a importância de compatibilizar o meio disperso com o emulsificante usado.

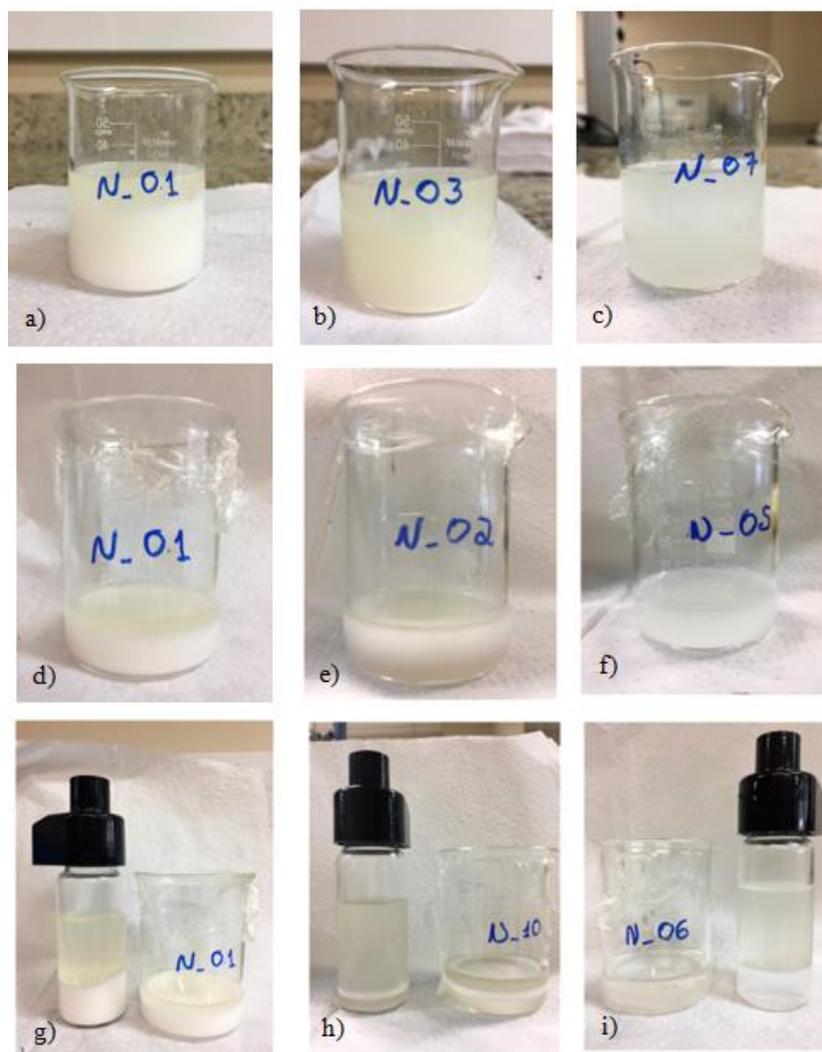


Figura 25 - Aparência da emulsão de água em MMA a), b), c) 1min; d), e), f) 20min; g), h), i) 2h após passagem no ultra-turrax.

Da mesma forma, os estudos qualitativos feitos no Turbiscan demonstraram diferentes aspectos (Figura 26) para os experimentos do planejamento, além de mostrar maior instabilidade, quando comparada com os ensaios conduzidos com óleo diesel e heptano. Vale ressaltar que a apresentação do gráfico de transmissão (ΔT) também foi necessária, porque as amostras apresentaram regiões translúcidas e parte da luz foi transmitida.

A Figura 26.a) mostrou maior estabilidade comparando-se com as Figuras 26.b) e c). Nota-se uma pequena banda de clarificação em 1mm, indicando uma fina camada rica em água, porém ainda na região inferior observou-se um pico largo, sugerindo a existência de uma camada mais espessa de sedimentação da emulsão A/O. O pico de transmissão provavelmente foi devido à clarificação, resultante da sedimentação.

O perfil da estabilidade da Figura 26.b) representa as amostras que apresentaram três camadas, com decaimento expressivo no intervalo de 0 a 7 mm, seguido por um largo pico, referente à sedimentação da emulsão, seguida da clarificação (FORMULACTION, 2009). O súbito aumento na transmissão (altura de 11 mm) é indicativo da clarificação. Além disso, ocorreu um pequeno aumento no ΔBS , caracterizando a ocorrência de floculação e coalescência.

Na Figura 26.c) também é notável o aparecimento da floculação e coalescência, devido ao acréscimo do ΔT e ΔBS ao longo de toda a altura da cubeta. Huck-Iriart, Candal e Herrera (2011) alegam que um pronunciado aumento no BS ou ΔBS no topo da cubeta sugere a migração de aglomerados.

A fim de melhor retratar as diferenças observadas entre os experimentos, a Tabela 15 apresenta os valores quantitativos referentes aos parâmetros de resposta.

Primeiramente, percebe-se que os valores de %S e TSI são muito maiores que os do diesel e heptano, corroborando os resultados qualitativos (Figura 26) e as fotos (Figura 25). Isso permite concluir que, as emulsões com MMA foram mais complexas e instáveis para o intervalo de variáveis de entrada adotado neste planejamento experimental. Tal comportamento pode ser explicado pela baixa viscosidade do MMA, 0,63 mPa.s, e pela menor afinidade do MMA com o surfactante lipofílico, já que o monômero é um éster e logo possui certa polaridade. Ademais, Adamson e Gast (1997) afirmam que a maior estabilidade de compostos do petróleo está associada à formação

de um rígido filme interfacial entre a gota da água e a fase contínua, formando um forte complexo de ligações com as espécies presentes na fase oleosa. Além dessas justificativas, o processo de instabilidade, conhecido como maturação de Ostwald, é mais propenso que ocorra com o MMA, pois este fenômeno consiste na difusão das gotas menores da fase dispersa na fase contínua sem que haja contato entre elas, ocorrendo mais rapidamente em emulsões com óleos mais polares (PEREIRA e GARCIA-ROJAS, 2015).

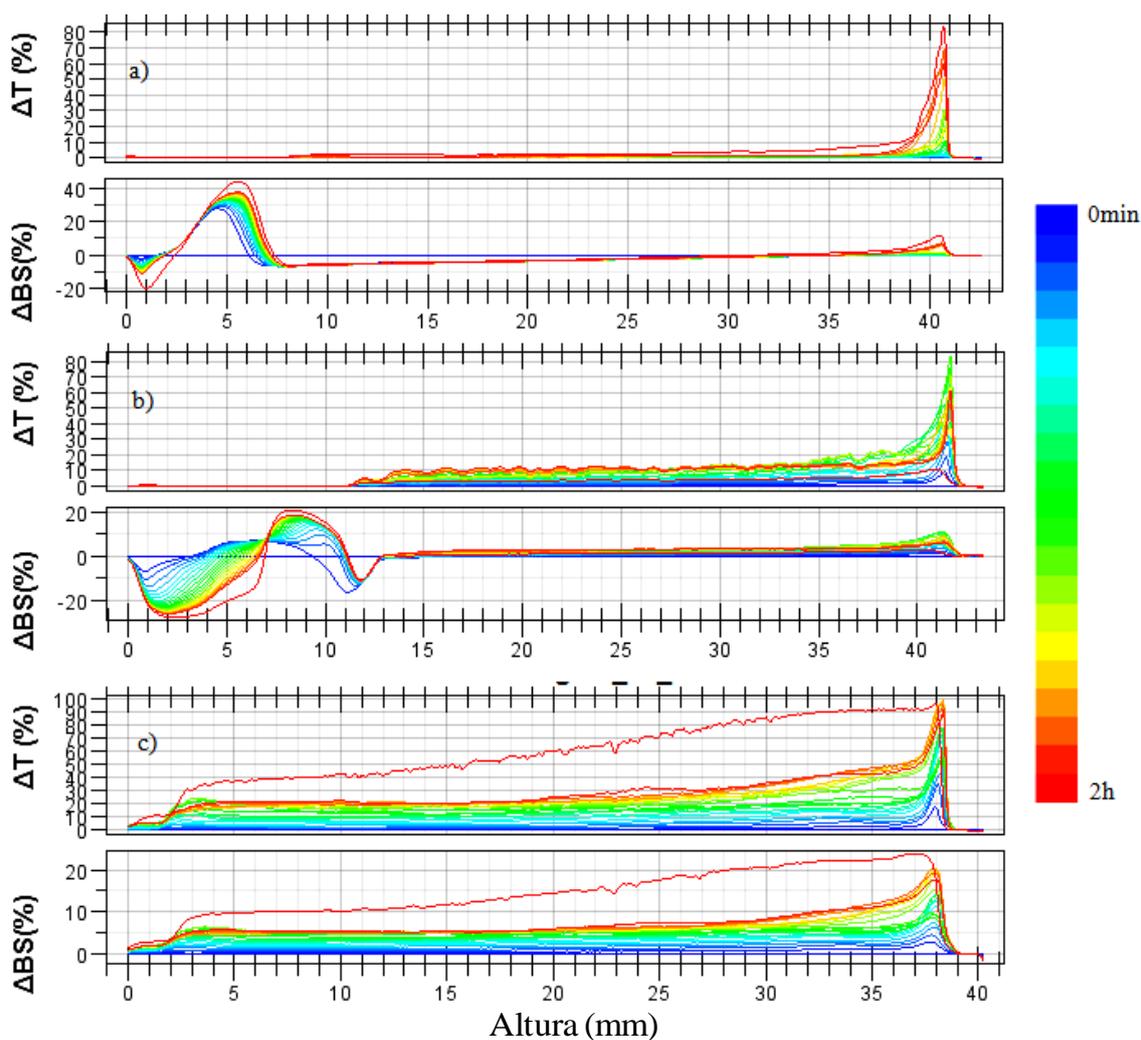


Figura 26 - Perfil qualitativo de estabilidade para emulsão de água em MMA para três amostras do planejamento: a) amostra N_03; b) amostra N_02; e c) amostra N_08.

Com relação à %S, os resultados não foram adequadas para análises quantitativas, dada a clara separação das fases e os cálculos limitados à região central da cubeta. Já em relação aos valores de TSI, as amostras com maior carga de surfactante e menor de água (N_03 e N_04) foram as mais estáveis, confirmando as avaliações anteriores, a despeito das relevantes diferenças observadas.

Tabela 15 - Valores das variáveis de saída, porcentagem de sedimentação e índice de estabilidade do Turbiscan, para o planejamento experimental com o MMA.

Experimento	Variável I Carga Surfactante na F.O. [%m/m]	Variável II Carga fase dispersa [%m/m]	Variável III Velocidade do ultraturrax [rpmx10 ³]	%S	TSI
1	5	30	20,5	34,577	23,405
2	5	30	11,5	169,349	15,611
3	5	10	20,5	57,412	9,213
4	5	10	11,5	67,976	3,846
5	1	30	20,5	316,466	20,621
6	1	30	11,5	675,584	49,711
7	1	10	20,5	231,887	17,053
8	1	10	11,5	481,139	27,347
9	3	20	14,5	159,335	6,882
10	3	20	14,5	174,335	9,631
11	3	20	14,5	202,025	11,588

Por fim, os perfis do TSI em relação ao tempo são apresentados na Figura 27. Observa-se mais uma vez o aumento contínuo, sendo mais acentuado nos 40 minutos iniciais para a N_06, N_07 e N_08 (amostras com menor carga de surfactante) e menos acentuado após isso. Para as demais amostras, o comportamento foi essencialmente linear até 20 min e depois teve uma tendência a um valor constante, resultante da separação.

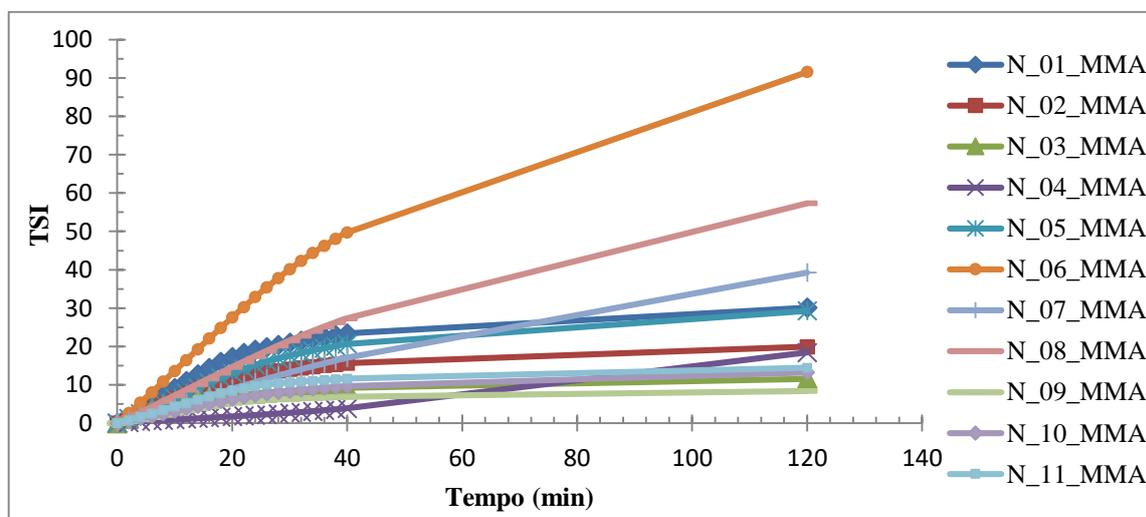


Figura 27 - Perfil do TSI em função do tempo para emulsão de água em MMA do planejamento experimental. Erro = $\pm 2,36$.

Com base no que foi descrito, observa-se que o preparo de emulsões A/O é mais difícil na presença de óleos polares, quando surfactantes de baixo HLB são usados. É conveniente, portanto, avaliar as estratégias para aumentar a estabilidade dessas emulsões, para viabilizar o uso prático.

4.1.2.2 Análise Estatística

A análise estatística dos dados experimentais foi efetuada admitindo distribuição normal de probabilidades e um intervalo de confiança de 95%. Para a avaliação das flutuações, utilizaram-se os testes estatísticos t de *Student* e Chi-Quadrado no ponto central, no qual foi realizado a réplica (experimentos 9, 10 e 11).

Optou-se por fazer a análise estatística apenas para a variável de saída TSI, uma vez que os resultados de %S não foram adequados para as faixas de variáveis adotadas para o MMA. Possivelmente o intervalo de cálculo descrito por (FRANÇA *et al.*, 2014) não se adequou aos resultados obtidos para o MMA por não englobar todas as regiões de instabilidade aparentes.

A média, a variância e o desvio padrão amostrais são referentes à variável de saída TSI para os três óleos nos pontos centrais do problema em estudo para o tempo de 40 min. Os valores estão presentes na Tabela 16. Percebe-se, pelo desvio padrão, a dispersão dos valores em relação à média foi relativamente alto, sendo maiores que 10%, mesmo assim, os desvios em relação às faixas de variação permitem a avaliação quantitativamente segura dos efeitos. Ademais, o diesel mesmo possuindo média maior, (possivelmente por causa do uso do turrax de menor rotação), ele se mostrou o mais estável, visto também pelo sua constância comprovada pelo menor desvio padrão.

Tabela 16 - Média, variância e desvio padrão do TSI no ponto central para os ensaios de estabilidade de emulsões de água em diesel, heptano e MMA.

	TSI_{Diesel}	TSI_{Heptano}	TSI_{MMA}
Ponto Central 1	8,718	6,222	6,882
Ponto Central 2	9,971	4,760	9,631
Ponto Central 3	9,609	6,493	11,588
Média	9,433	5,825	9,367
Variância	0,416	0,869	5,589
Desvio Padrão	0,645	0,932	2,364

Foram encontrados os valores das variáveis t e χ^2 a partir das curvas de distribuição t de Student e Chi-quadrado. Foi considerado 95% de grau de confiança e grau de liberdade igual a 2 em todos os casos, uma vez que a réplica do ponto central foi realizada em triplicata. Os resultados estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Limites de distribuições de probabilidades para 95% de confiança.

t-Student	t_1	-4,302653
	t_2	4,302653
Chi-quadrado	χ^2_1	0,050636
	χ^2_2	7,377759

Desse modo, fazendo as substituições de valores nas Equações 1 e 2, encontrou-se o intervalo de confiança da média e da variância para os TSI (Tabela 18). Por meio dos intervalos de confiança calculados, percebe-se que a média verdadeira encontra-se em um intervalo relativamente estreito, principalmente para o diesel, o que confirma a capacidade de executar as análises quantitativas de forma apropriada. O intervalo da variância verdadeira é bem mais extenso quando comparado ao da média, o que já podia ser esperado, uma vez que as incertezas existentes podem ser muito grandes quando N é pequeno, como no caso estudado neste trabalho. Em especial para o MMA, devido à sua maior instabilidade e comportamentos mais variados.

Tabela 18 - Intervalo de confiança da média e da variância verdadeira para os TSI no ponto central.

Óleo	Intervalo de Média	Intervalo de Variância
Diesel	$7,831 < \mu < 11,034$	$0,113 < \sigma^2 < 16,424$
Heptano	$3,509 < \mu < 8,141$	$0,236 < \sigma^2 < 34,324$
MMA	$3,494 < \mu < 15,240$	$1,515 < \sigma^2 < 220,747$

O processo usado para determinar a relação existente entre as variáveis iniciou-se com a definição de um modelo para aproximação dos dados experimentais, utilizando o *software* Statistica 7. Os dados experimentais estão apresentados na Tabela 19, sendo que os z_i representam as variáveis independentes normalizadas. O modelo empírico foi desenvolvido baseado na Equação 3, e teve por objetivo avaliar os efeitos principais das variáveis de entrada, independentemente, e possíveis efeitos de sinergia, considerando as variáveis em pares, sem ocorrer fusão de efeitos (SCHWAAB e PINTO, 2007).

Tabela 19 - Resultados obtidos do planejamento experimental para a variável TSI.

Experimento	Carga de Span 80 (z ₁)	Carga de F.D. (z ₂)	Velocidade Turrax (z ₃)	TSI _{Diesel}	TSI _{Heptano}	TSI _{MMA}
1	+1	+1	+1	14,675	9,245	23,405
2	+1	+1	-1	5,558	6,545	15,611
3	+1	-1	+1	6,537	5,632	9,213
4	+1	-1	-1	4,745	2,230	3,846
5	-1	+1	+1	25,392	8,961	20,621
6	-1	+1	-1	4,485	5,235	49,711
7	-1	-1	+1	10,387	3,540	17,053
8	-1	-1	-1	5,053	1,985	27,347
9	0	0	0	8,718	6,222	6,882
10	0	0	0	9,971	4,760	9,631
11	0	0	0	9,609	6,493	11,588

Inicialmente, foi calculada a matriz de correlações entre as variáveis do modelo (Tabela 20). Por meio dela, é possível confirmar que as variáveis independentes (z₁, z₂ e z₃) encontram-se descorrelacionadas, uma vez que foi empregado um planejamento fatorial que é ortogonal. A matriz de correlações também pode indicar qual(is) variável(is) de entrada devem ser significativas no modelo. A correlação das variáveis independentes com as variáveis dependentes em geral é baixa, sendo estatisticamente significativa apenas para os pares z₃-TSI_{Diesel} (valor em negrito/itálico) e z₂-TSI_{Heptano}. Isso sugere que o TSI do diesel é afetado principalmente pela velocidade do turrax (z₃), com correlação positiva, indicando que o aumento da velocidade prejudica a estabilidade da emulsão. O TSI do heptano é influenciado principalmente pela carga de fase dispersa, indicando que o aumento de carga prejudica a estabilidade de emulsão. Ambos efeitos já foram discutidos nas seções anteriores.

Tabela 20 - Matriz de correlação entre variáveis normalizadas do plano experimental.

Correlations (Spreadsheet1) Marked correlations are significant at p < .05000 N=10 (Casewise deletion of missing data)						
Variável	z ₁	z ₂	z ₃	TSI _{Diesel}	TSI _{Heptano}	TSI _{MMA}
z ₁	1,00	0,00	0,00	-0,25	0,19	-0,55
z ₂	0,00	1,00	0,00	0,43	0,78	0,45
z ₃	0,00	0,00	1,00	0,68	0,54	-0,23

Para a estimação dos parâmetros da modelagem empírica, levou em consideração primeiramente o efeito principal de todas as variáveis independentes e

todas as combinações possíveis das variáveis em pares (efeito de sinergia) (Equação 3). Caso fosse notada a existência de parâmetros não significativos no modelo ajustado, conforme valor de p-level > 0,05 (95% de nível de confiança requerido), foi necessário proceder com a retirada gradativa dos parâmetros não significativos, já que podem mascarar a significância de outra variável. No entanto, de forma a não comprometer a qualidade do modelo, isto é, sem diminuir muito o coeficiente de correlação R.

Diesel

A primeira tentativa de construção do modelo empírico para o TSI das emulsões de água em óleo diesel está presente na Tabela 21. Percebe-se que foi possível aferir que todos os parâmetros foram significativos, exceto b_{12} , pois atingiram o nível de confiança requerido (95%) com um ótimo valor de R, igual a 0,987. Dessa forma, pode-se concluir que o TSI do diesel foi diretamente dependente da carga de fase dispersa, da velocidade de rotação e da interação destas (valores numéricos positivos), e inversamente proporcional à carga de surfactante e sua interação com a rotação do turrax (valores numéricos negativos) para o intervalo de variáveis usado neste trabalho.

Tabela 21 - Parâmetros estimados para o TSI do diesel, tentativa n° 1.

Model: "TSI-di"= $a_0+a_1*z_1+a_2*z_2+a_3*z_3+b_{12}*z_1*z_2+ b_{13}*z_1*z_3 + b_{23}*z_2*z_3$ Final loss: 9.396238084 R= .98732 Variance explained: 97.480%							
	a_0	a_1	a_2	a_3	b_{12}	b_{13}	b_{23}
Estimate	9.55723	-1.72528	2.923622	4.643907	-0.68567	-1.91652	2.862204
Std. Err.	0.46212	0.54188	0.541879	0.541879	0.54188	0.54188	0.541879
t(4)	20.68146	-3.18389	5.395345	8.570013	-1.26536	-3.53681	5.282003
p-level	0.00003	0.03341	0.005710	0.001018	0.27443	0.02408	0.006162

O aumento do TSI, e conseqüentemente a redução na estabilidade, com o aumento da quantidade de fase dispersa é compreensível, pois quanto maior é a quantidade de água presente na fase contínua oleosa, maior é a taxa de colisões e de coalescência entre as gotas. Como já relatado anteriormente, o surfactante proporciona o abaixamento da tensão interfacial entre as fases, garantindo um sistema mais estável e assim um menor valor de TSI. E por fim, sabe-se que em maiores rotações tem-se maior homogeneização da emulsão (YE, KIM e PARK, 2010), porém neste caso a velocidade da rotação influenciou diretamente o TSI, possivelmente por que a velocidade era muito alta e o tempo de agitação foi longo, o que aumentou muito as colisões entre as

partículas da fase dispersa, gerando agregação das mesmas e desestabilização da emulsão. Além disso, o aumento excessivo de área superficial pode prejudicar a estabilidade de emulsões. Os parâmetros de sinergia b_{13} e b_{23} mostram que o aumento da velocidade acentua os efeitos da quantidade de surfactante e de fase dispersa sobre o sistema.

Heptano

O desenvolvimento usado para estimar os parâmetros do planejamento conduzido com o heptano fez uso de quatro tentativas para eliminação dos parâmetros não significativos, conforme mostrados nas Tabelas 22 ao 25.

Tabela 22 - Parâmetros estimados para o TSI do heptano, tentativa n° 1.

Model: "TSI-hep" = $a_0 + a_1 * z_1 + a_2 * z_2 + a_3 * z_3 + b_{12} * z_1 * z_2 + b_{13} * z_1 * z_3 + b_{23} * z_2 * z_3$ Final loss: 3.125172422 R= .97175 Variance explained: 94.430%

	a_0	a_1	a_2	a_3	b_{12}	b_{13}	b_{23}
Estimate	<i>5.53167</i>	0.491206	<i>2.074714</i>	<i>1.422689</i>	-0.092830	0.102545	0.183641
Std. Err.	<i>0.26651</i>	0.312509	<i>0.312509</i>	<i>0.312509</i>	0.312507	0.312509	0.312509
t(4)	<i>20.75608</i>	1.571815	<i>6.638902</i>	<i>4.552480</i>	-0.297051	0.328134	0.587635
p-level	<i>0.00003</i>	0.191093	<i>0.002672</i>	<i>0.010398</i>	0.781215	0.759269	0.588349

Tabela 23 - Parâmetros estimados para o TSI do heptano, tentativa n° 2.

Model: "TSI-hep" = $a_0 + a_1 * z_1 + a_2 * z_2 + a_3 * z_3 + b_{13} * z_1 * z_3 + b_{23} * z_2 * z_3$ Final loss: 3.194112278 R= .97112 Variance explained: 94.307%

	a_0	a_1	a_2	a_3	b_{13}	b_{23}
Estimate	<i>5.53167</i>	0.491206	<i>2.074714</i>	<i>1.422689</i>	0.102545	0.183641
Std. Err.	<i>0.24099</i>	0.282582	<i>0.282582</i>	<i>0.282582</i>	0.282584	0.282582
t(4)	<i>22.95420</i>	1.738275	<i>7.341979</i>	<i>5.034600</i>	0.362882	0.649867
p-level	<i>0.00000</i>	0.142662	<i>0.000735</i>	<i>0.003985</i>	0.731529	0.544449

Tabela 24 - Parâmetros estimados para o TSI do heptano, tentativa n° 3.

Model: "TSI-hep" = $a_0 + a_1 * z_1 + a_2 * z_2 + a_3 * z_3 + b_{23} * z_2 * z_3$ Final loss: 3.278235373 R= .97035 Variance explained: 94.157%

	a_0	a_1	a_2	a_3	b_{23}
Estimate	<i>5.53167</i>	0.491206	<i>2.074714</i>	<i>1.422689</i>	0.183641
Std. Err.	<i>0.22287</i>	0.261336	<i>0.261336</i>	<i>0.261336</i>	0.261336
t(4)	<i>24.82035</i>	1.879594	<i>7.938872</i>	<i>5.443906</i>	0.702700
p-level	<i>0.00000</i>	0.109216	<i>0.000212</i>	<i>0.001596</i>	0.508575

Tabela 25 - Parâmetros estimados para o TSI do heptano, tentativa n° 4.

Model: "TSI-hep" = $a_0 + a_1*z_1 + a_2*z_2 + a_3*z_3$ Final loss: 3.548027689 R= .96786 Variance explained: 93.676%				
	a_0	a_1	a_2	a_3
Estimate	5.53167	0.491206	2.074714	1.422689
Std. Err.	0.21466	0.251709	0.251709	0.251709
t(4)	25.76961	1.951480	8.242497	5.652110
p-level	0.00000	0.091967	0.000075	0.000773

Mesmo com a eliminação de alguns parâmetros, os únicos efeitos significativos foram relacionados à concentração de fase dispersa e à velocidade de rotação do turrax, que revelaram comportamentos similares aos encontrados nas emulsões de diesel. Além disso, não teve efeitos sinérgicos e o coeficiente de correlação permaneceu alto mesmo após a quarta tentativa. Isso indica que os aspectos mecânicos do processo de emulsificação tendem a ser relativamente mais importantes quando a fase contínua é mais leve (menos viscosa e menos densa, como no caso do heptano em relação ao diesel).

Metacrilato de Metila

A estimação dos parâmetros para as amostras produzidas com o MMA ocorreu da mesma maneira que nos demais casos sendo necessárias quatro tentativas (Tabelas 26 a 29). Verifica-se que após a segunda tentativa não houve surgimento de novos parâmetros significativos e que o coeficiente de correlação diminuiu consideravelmente. Além disso, o coeficiente de correlação foi menor, quando comparado aos obtidos com os outros fluídos orgânicos, em vista da maior instabilidade e comportamentos mais variados observados com o MMA.

Tabela 26 - Parâmetros estimados para o TSI do MMA, tentativa n° 1.

Model: "TSI-mma" = $a_0 + a_1*z_1 + a_2*z_2 + a_3*z_3 + b_{12}*z_1*z_2 + b_{13}*z_1*z_3 + b_{23}*z_2*z_3$ Final loss: 355.21575866 R= .88563 Variance explained: 78.434%							
	a_0	a_1	a_2	a_3	b_{12}	b_{13}	b_{23}
Estimate	17.71872	-7.83217	6.486153	-3.27800	0.003190	6.568122	-2.04624
Std. Err.	2.84132	3.33174	3.331740	3.33174	3.378393	3.331740	3.33174
t(4)	6.23609	-2.35078	1.946776	-0.98387	0.000944	1.971379	-0.61416
p-level	0.00337	0.07845	0.123413	0.38088	0.999292	0.119980	0.57232

Tabela 27 - Parâmetros estimados para o TSI do MMA, tentativa n° 2.

Model: "TSI-mma"= $a_0+a_1*z_1+a_2*z_2+a_3*z_3+b_{13}*z_1*z_3+b_{23}*z_2*z_3$ Final loss: 355.21584004 R= .88563 Variance explained: 78.434%						
	a_0	a_1	a_2	a_3	b_{13}	b_{23}
Estimate	17.71872	-7.83217	6.486153	-3.27800	6.568122	-2.04624
Std. Err.	2.54135	2.98000	2.979999	2.98000	2.979999	2.98000
t(4)	6.97216	-2.62825	2.176562	-1.10000	2.204068	-0.68666
p-level	0.00093	0.04663	0.081466	0.32145	0.078690	0.52284

Tabela 28 - Parâmetros estimados para o TSI do MMA, tentativa n° 3.

Model: "TSI-mma"= $a_0+a_1*z_1+a_2*z_2+a_3*z_3+b_{13}*z_1*z_3$ Final loss: 388.71258470 R= .87407 Variance explained: 76.400%					
	a_0	a_1	a_2	a_3	b_{13}
Estimate	17.71872	-7.83217	6.486153	-3.27800	6.568122
Std. Err.	2.42685	2.84573	2.845730	2.84573	2.845730
t(4)	7.30113	-2.75225	2.279258	-1.15190	2.308062
p-level	0.00034	0.03319	0.062864	0.29318	0.060429

Tabela 29 - Parâmetros estimados para o TSI do MMA, tentativa n° 4.

Model: "TSI-mma"= $a_0+a_1*z_1+a_2*z_2+b_{13}*z_1*z_3$ Final loss: 474.67463425 R= .84369 Variance explained: 71.181%				
	a_0	a_1	a_2	b_{13}
Estimate	17.71872	-7.83217	6.486153	6.568122
Std. Err.	2.48286	2.91141	2.911414	2.911414
t(4)	7.13641	-2.69016	2.227836	2.255990
p-level	0.00019	0.03108	0.061166	0.058677

Com relação os parâmetros significativos, apenas a carga de surfactante foi significativa para o nível de confiança estatística requerida, afetando negativamente o TSI. Portanto, quanto maior foi a carga de surfactante, menor foi o TSI e maior foi a emulsão, confirmando o comportamento esperado. Morais *et al.* (2008) afirmaram que a estabilidade e a morfologia de emulsões são influenciadas não apenas pela concentração de surfactante, mas também pela razão água/óleo. Para o MMA, apesar da carga de água não ter sido significativa em termos estatísticos, tal influência já seria metade se o nível de confiança fosse reduzido para 90%.

Os resultados parecem indicar, quando olhados em conjunto, que o aumento do teor de surfactante, a redução de quantidade de fase dispersa e a redução da velocidade

do cisalhamento contribuem positivamente com a estabilidade das emulsões A/O. Os resultados parece também indicar que os aspectos mecânicos controlam a estabilidade das dispersões em meio hidrofóbico e baixa viscosidade, e que os aspectos químicos de composição afetam mais as dispersões em meio mais hidrofílico. Dessa forma, a partir dos resultados, conseguiu-se analisar e comparar as propriedades dos óleos e entender o comportamento em relação à adição de surfactante e à formação da emulsão A/O.

4.2 NOVA FORMULAÇÃO DA 1ª EMULSÃO (1E)

Tendo em vista a baixa estabilidade da primeira emulsão (1E) obtido com o MMA, foi necessário propor novas alternativas para a formulação da fase contínua (fase oleosa), dado que é importante obter uma estabilidade compatível com os tempos de manipulação requeridos para a formação da dupla emulsão.

4.2.1 Aumento na carga de surfactante

Por meio da análise estatística, apenas a carga do surfactante foi estatisticamente significativa para explicar a estabilidade da emulsão de forma que quanto maior a quantidade de Span 80, menor o TSI e portanto maior estabilidade. Por isso, como primeira alternativa de formulação, optou-se por alterar a carga de surfactante para 5, 7,5, 10, 12,5 e 15 % m/m. Fixou-se a velocidade de rotação em 20500 rpm, pois embora não significativa, a velocidade se mostrou inversamente proporcional ao TSI. A fração da fase dispersa foi mantida a 20% m/m, uma vez que os resultados no ponto central também obtiveram valores baixos de TSI (Tabela 15).

Na Tabela 30 são mostrados os valores de TSI obtidos para as emulsões primárias com aumento na quantidade de surfactante.

Tabela 30 - TSI de emulsões de água em MMA preparadas com aumento na carga de Span 80.

Amostra	Carga de Span 80 [%m/m]	TSI (40 min)
N_5%	5	7,328
N_7,5%	7,5	6,531
N_10%	10	14,311
N_12,5%	12,5	27,297
N_15%	15	17,327

Na Tabela 30 é possível observar primeiramente que a adição de maiores cargas de surfactantes não resultou necessariamente no aumento da estabilidade da emulsão, fato retratado também na Figura 28.a). Além disso, não houve muita mudança no valor absoluto TSI ao aumentar a fração da fase dispersa de 10 para 20%. O mesmo raciocínio procede ao comparar as amostras de 5 e 7,5% m/m de surfactante. Para as amostras com quantidades maiores que 10% m/m de surfactante, observou-se inclusive o acréscimo no TSI, o que pode estar atrelado à saturação da emulsão por surfactante e formação de grumos, como pode ser observado na Figura 28.b). Dessa forma, concluiu-se que a menor fração de surfactante testada (5% m/m) foi a mais adequada e portanto, foi fixado esse valor para os próximos experimentos. Portanto, parece claro que o simples aumento do teor de surfactante não permite obter emulsões de água em MMA estáveis para a manipulação.

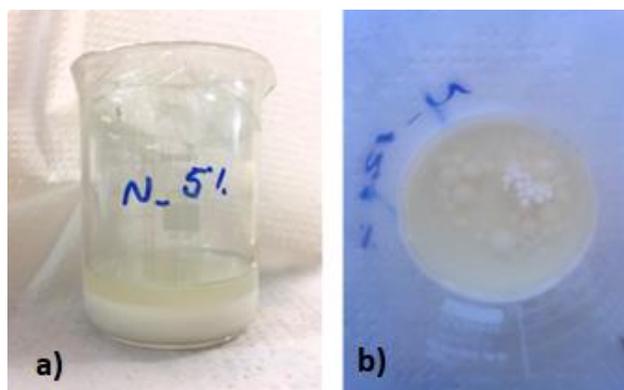


Figura 28 - Aparência da emulsão primária com o aumento de surfactante. a) instabilidade da emulsão; b) formação de grumos.

4.2.2 Adição do Polímero PMMA

Com base nos resultados observados na seção 4.2.1, buscou-se outra rota para tentar estabilizar a emulsão primária. A proposta foi adicionar ao monômero MMA uma fração do polímero PMMA, previamente polimerizado via miniemulsão direta, nas proporções de 1, 3 ou 5% m/m. O PMMA apresentava massas molares numérica e ponderal médias iguais a $5,63 \cdot 10^5$ Da e $1,47 \cdot 10^6$ Da, respectivamente, com índice de polidispersão igual a 2,61. Essa estratégia foi usada com o objetivo de tornar a fase contínua mais pesada e viscosa, como no caso do óleo diesel.

O uso PMMA teve a finalidade de simular o uso de um espessante. De fato, Hunter e Bennett (1997) e Yildirim, Sumnu e Sahin (2017) relataram que a adição de

polímeros nas emulsões aumenta a rigidez e viscosidade do sistema. Lorca (2012) expôs que a escolha do PMMA para controle e manipulação da viscosidade do meio parece ser bastante natural, por causa da facilidade de produção deste polímero pela mesma técnica de miniemulsão usada para produzir as partículas. A relação existente entre a viscosidade e estabilidade de emulsões já foi mencionada em diversos trabalhos, nos quais relatou-se que uma maior viscosidade confere maior estabilidade à emulsão, uma vez que a viscosidade da fase contínua diminui a mobilidade das moléculas e das gotas (e conseqüentemente a coalescência das mesmas), além de reduzir a difusão das moléculas de surfactante, reduzindo a tensão interfacial óleo-água (HUNTER e BENNETT, 1997; LIU, YANG e WINSTON HO, 2011; YILDIRIM, SUMNU e SAHIN, 2017).

As respostas experimentais obtidas quando se acrescentou o PMMA ao MMA corroboram essas afirmações. A Tabela 31 confirma o decréscimo do TSI com a adição de PMMA em amostras do N_5%, em que o TSI caiu de 7 para 2 ou menos. Da mesma forma, as Figuras 29 e 30 ilustram a preservação da aparência e de estabilidade iniciais da emulsão mesmo após 40 min de terminado o processo de emulsificação.

Tabela 31 - TSI das emulsões de água em MMA com adição de PMMA.

Amostra	Carga de PMMA [%m/m]	TSI (40 min)
N_5%_1%PMMA	1	2
N_5%_3%PMMA	3	1,7
N_5%_5%PMMA	5	1,4

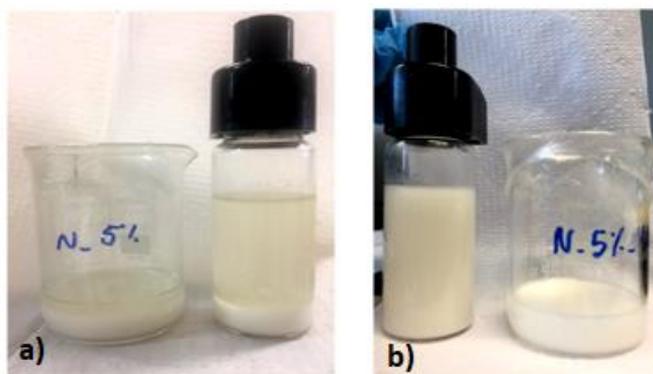


Figura 29 - Aparência da emulsão primária a) sem e b) com 1% m/m PMMA após 40 min.

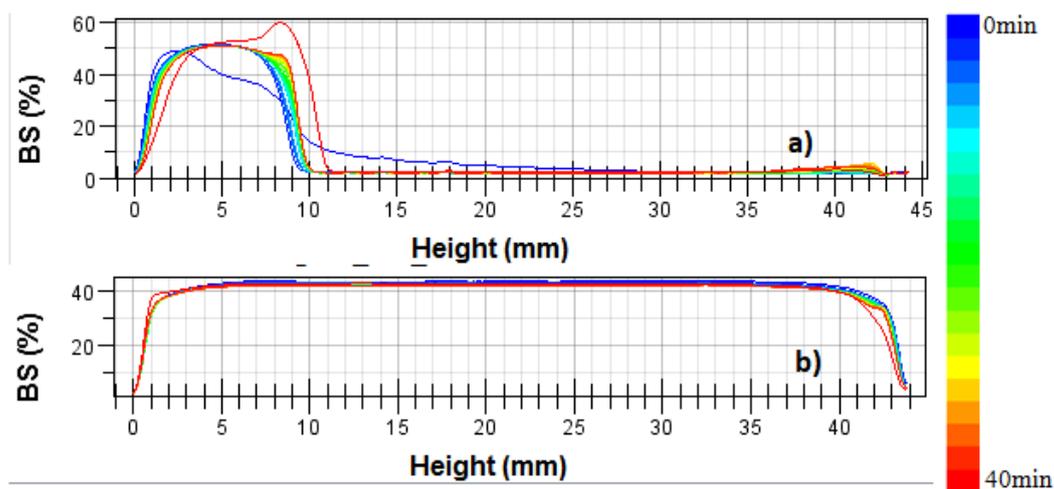


Figura 30 - Estabilidade medida pelo Turbiscan da emulsão primária a) sem e b) com 1% m/m PMMA após 40 min.

Com relação às três frações de PMMA usadas, concluiu-se que todas levaram a resultados de aparência e de perfil de estabilidade bastante similares. Entretanto, a amostra que continha apenas 1% m/m de polímero (N_5%_1%PMMA) mostrou-se a mais adequada. Tal fato se deve primeiramente pelo almejo de uma satisfatória formulação utilizando menor quantidade do polímero. Além disso, as amostras com 3 e 5% m/m de PMMA apresentaram uma viscosidade muito alta, dificultando a mistura das fases, observou-se em particular que partes da emulsão ficaram incrustadas na haste do turrax, o que pode gerar problemas operacionais, principalmente em escala industrial.

Outro efeito decorrente do incremento da viscosidade foi o aumento no tamanho das gotas e a provável larga distribuição de tamanhos, em razão da viscosidade dificultar o fluxo das fases e a quebra das gotas em partículas menores. É possível visualizar esse efeito nas imagens de microscopia óptica (Figura 31). Esses aspectos serão considerados nas próximas seções do trabalho.

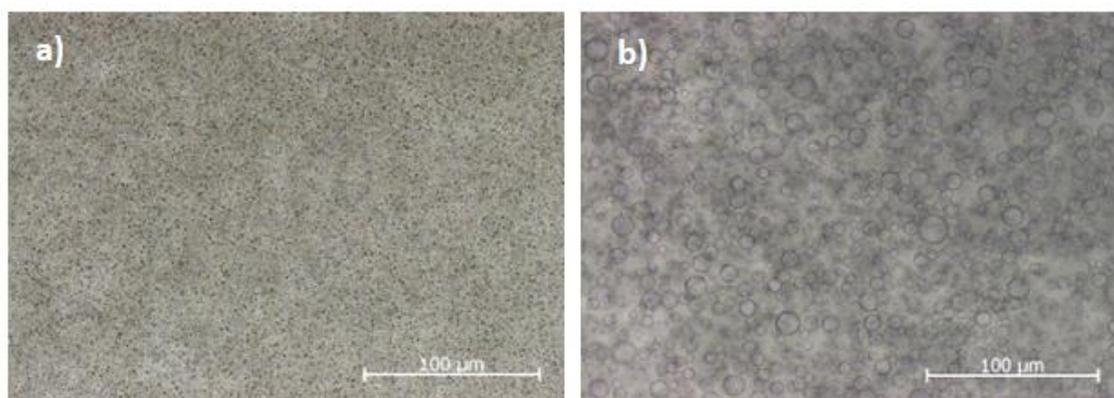


Figura 31 - Micrografia óptica da emulsão primária a) sem e b) com 1% m/m PMMA.

4.3 FORMULAÇÃO DA EMULSÃO DUPLA (2E)

Nesta etapa estudou-se a composição das fases para formação da emulsão dupla. A fase dispersa escolhida, neste caso, foi a emulsão primária N_5%_1%_PMMA, tal como discutido na seção anterior. A fase contínua (fase aquosa externa) foi testada com quatro formulações com diferentes surfactantes. A porcentagem mássica das fases dispersa (A/O) e contínua (A) foi de 20 e 80%, respectivamente. Foi mantida a velocidade de rotação no meio e tempo de emulsificação em 9500 rpm por 4 min. Foi definida a quantidade de 1% m/m de surfactante, pois estudos revelaram que a dupla emulsão é favorecida em menores concentrações do surfactante hidrofílico ou que este esteja em menor proporção que o tensoativo lipofílico (FICHEUX *et al.*, 1998). Além disso, a interface externa tende a ser mais estável, já que as gotas internas ficam confinadas e mais próximas umas das outras, havendo tendência maior para se coalescerem (KIM e CHEONG, 2016).

Os surfactantes selecionados para compor a fase aquosa externa foram o polissorbato (Tween 80), o poli(álcool vinílico) (PVA) ou o lauril sulfato de sódio (LSS), que possuem HLB respectivamente igual a 15, 18 e 40 e, portanto, são caracterizados como tensoativos hidrofílicos, com afinidade pela fase aquosa externa e por conseguinte, podem ser empregados para o preparo de emulsões de O/A. A escolha dos surfactantes hidrofílicos baseou-se na frequência que os mesmos aparecem nos estudos do próprio grupo de pesquisa e em trabalhos na literatura, incluindo ensaios de dupla emulsão e para polimerização em miniemulsão. O Tween 80 foi usado por Schmidts *et al.* (2009) para produção de emulsões duplas com parafina, que utilizou o Span 80 para a preparação de emulsão primária. Além disso, os autores concluíram que a combinação de ambos os surfactantes favorecem a emulsão, por terem estruturas parecidas. O PVA é o tensoativo majoritariamente usado para a preparação de emulsões duplas, principalmente quando é associado à técnica de evaporação de solvente. Já o LSS é bastante usado em estudos de emulsões diretas e formação de NPPs por meio da polimerização em miniemulsão. Kim e colaboradores (1999, 2000 e 2003) utilizaram o LSS como surfactante para formação de dupla emulsão, para posterior polimerização do MMA. A Figura 32 mostra as estruturas químicas desses surfactantes. O Tween 80 e o PVA, por serem não-iônicos, atuam principalmente por impedimento estérico ou eletrostático, enquanto o LSS é uma molécula menor que age diminuindo a tensão interfacial, por ser um estabilizante aniônico.

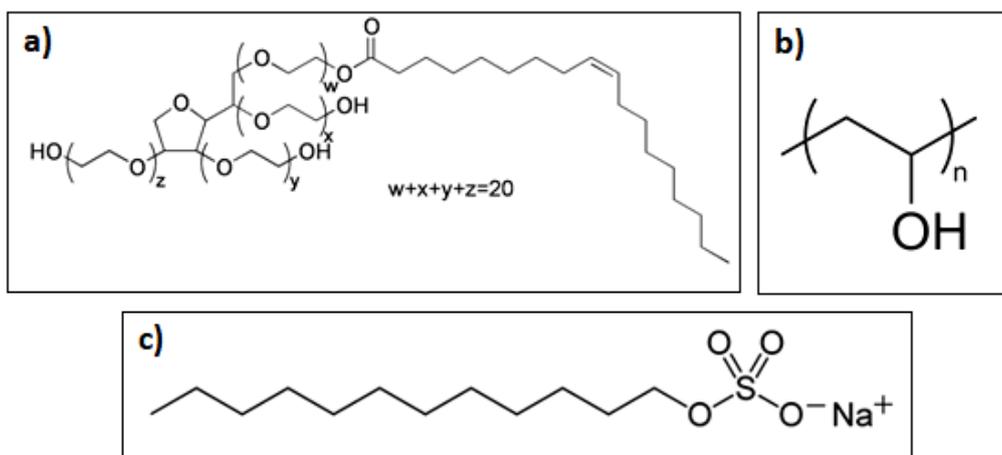


Figura 32 - Estrutura química dos surfactantes hidrofílicos a) Tween 80, b) PVA e c) LSS.

A Figura 33 apresenta os aspectos visuais das duplas emulsões preparadas com as quatro formulações testadas: usando Tween 80 (amostra 2E1), PVA (amostra 2E2), LSS (amostra 2E3) e a combinação do PVA e LSS (amostra 2E4), após 30 min do encerramento da emulsificação. Percebe-se que a emulsão 2E2 foi a mais estável. O PVA, assim como o PMMA, é um polímero e, por isso, também contribuiu para o aumento da viscosidade da fase contínua e, conseqüentemente, da estabilidade. Além disso, por ser hidrossolúvel, o PVA tem a capacidade de formar gel na região da interface, aumentando ainda mais a resistência das gotas (HUNTER e BENNETT, 1997). Nas demais amostras, observou-se a cremação da emulsão primária e a sedimentação da fase aquosa externa por densidade. No entanto, nos primeiros instantes, todas apresentaram estabilidade suficiente para dar seguimento e sustentabilidade para a próxima etapa de reação, já que esta ocorre rapidamente, de forma que a emulsão ainda encontraria-se estável.

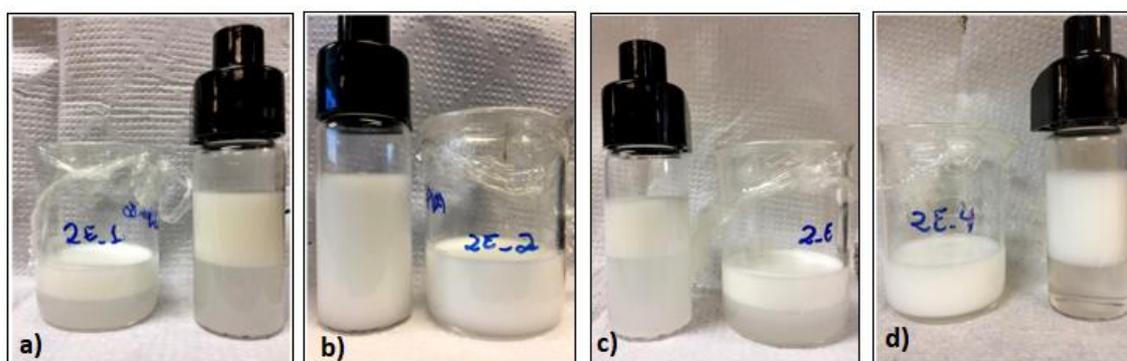


Figura 33 - Emulsão dupla após 30 min das amostras a) 2E1, contendo Tween 80; b) 2E2, contendo PVA; c) 2E3, contendo LSS; e d) 2E4, contendo PVA e LSS.

A morfologia das duplas emulsões pode ser vista na Figura 34. Primeiramente, atesta-se que as duplas emulsões são polidispersas, assim como relatado por Iqbal *et al.* (2015). É notável ainda que a mudança de surfactante hidrofílico usado afetou o comportamento das emulsões secundárias, de acordo com os diferentes tipos possíveis descritos na Figura 8. Assim, as amostras contendo Tween 80 ou PVA (Figura 34.a) e b), respectivamente) apresentaram predominância de duplas emulsões similares ao tipo C, em que são encapsuladas numerosas gotículas de fase aquosa interna na fase oleosa e normalmente resultam em maiores tamanho de gotas. Ao trocar esses surfactantes por LSS (Figura 34.c)) ou adicioná-lo ao PVA (Figura 34.d)), constata-se a prevalência das gotas do tipo A, em que uma única gota da fase aquosa interna parece estar presente em cada gota oleosa. Esse resultado é muito relevante, pois parece ser razoável admitir que o novo surfactante é parcialmente absorvido pelas outras fases, mudando a estrutura das emulsões duplas formadas.

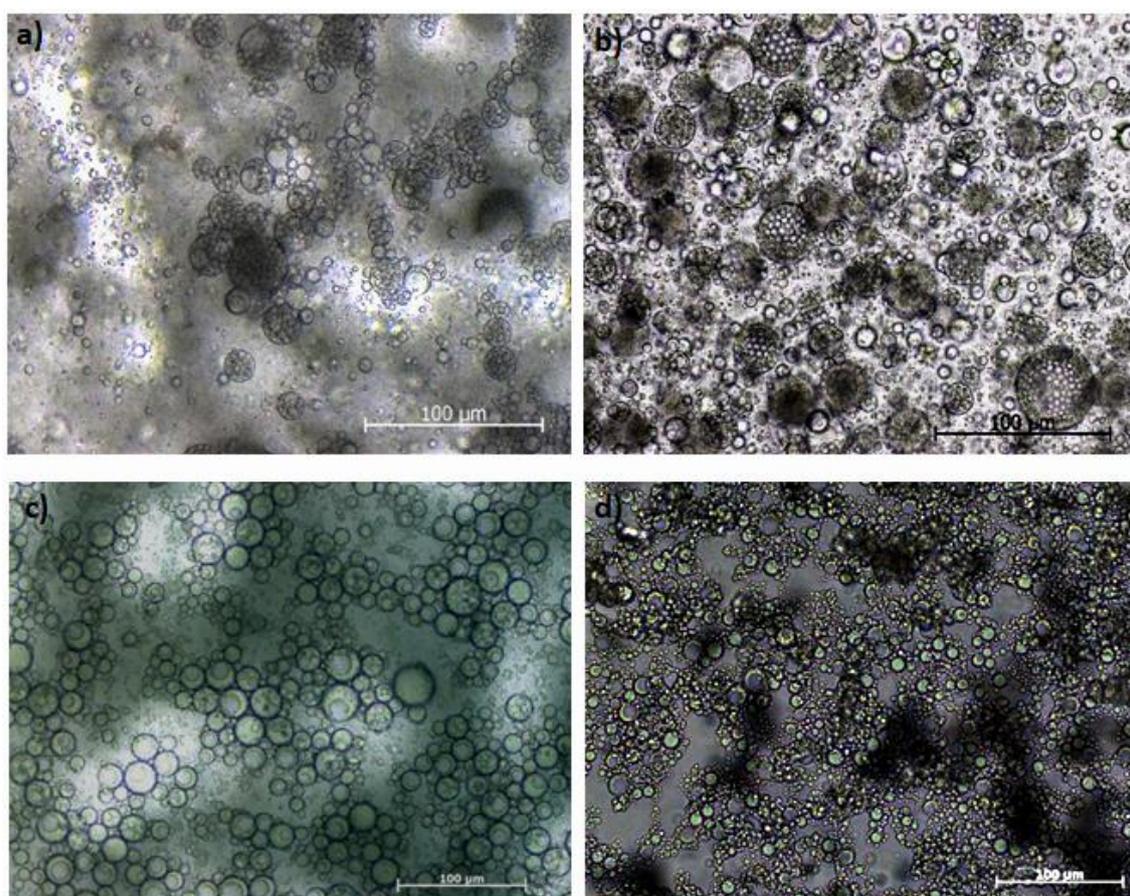


Figura 34 - Micrografias óptica da emulsão dupla após 1 min do término da emulsificação das amostras contendo a) Tween 80 (2E1); b) PVA (2E2); c) LSS (2E3); e d) PVA + LSS (2E4).

Florence e Whitehill (1981) observaram que, dependendo do tipo de surfactante hidrofílico, os três diferentes tipos de emulsão dupla já mencionados poderiam ser formados. Quando os autores utilizaram o Tween 80, o mesmo comportamento do tipo C foi constatado. Quando usaram o surfactante brij 30 (lauril éter), obtiveram emulsões duplas do tipo A, assim como com LSS. Por serem menores, esses surfactantes penetram as fases e formam gotas do tipo A. Zhang *et al.* (2014) estudaram a estrutura das emulsões duplas com diferentes íons presentes e verificaram que, com um aumento na carga negativa, mais gotas aquosas eram dispersas na gota oleosa, mudando o tipo de A para C. Por isso presume-se que os resultados do presente trabalho corroboram essas observações, pois amostras preparadas com os surfactantes Tween 80 e PVA foram do tipo C; em contrapartida, o LSS resultou em emulsões do tipo A, devido à presença do cátion Na^+ e ao menor tamanho de cadeia.

4.4 POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO

Após a preparação bem sucedida da emulsão dupla, o processo de polimerização em miniemulsão deu prosseguimento à formação das nanopartículas poliméricas, conforme descrito da Seção 3.2.4.

Os ensaios para essa etapa envolveram a comparação das amostras contendo os surfactantes PVA (amostra NP_2E2), LSS (amostra NP_2E3) e a combinação de ambos (NP_2E4), em vista do melhor resultado de estabilidade da dupla emulsão usando o PVA, como também tendo em consideração diversos relatos da eficácia do LSS em emulsões diretas e formação de NPPs por polimerização em miniemulsão. Para isso, os experimentos contaram com as caracterizações quanto à morfologia, diâmetro médio e distribuição do tamanho das partículas, conversão, distribuição das massas molares e estabilidade térmica. Adiante estão listados os resultados das análises de caracterização das nanopartículas obtidas.

4.4.1 Morfologia e Tamanho de Partícula

A aparência do látex formado após a polimerização com as diferentes formulações é observada na Figura 35. Observam-se diferentes aspectos com relação às diferentes formulações, tanto após a reação quanto depois da secagem.

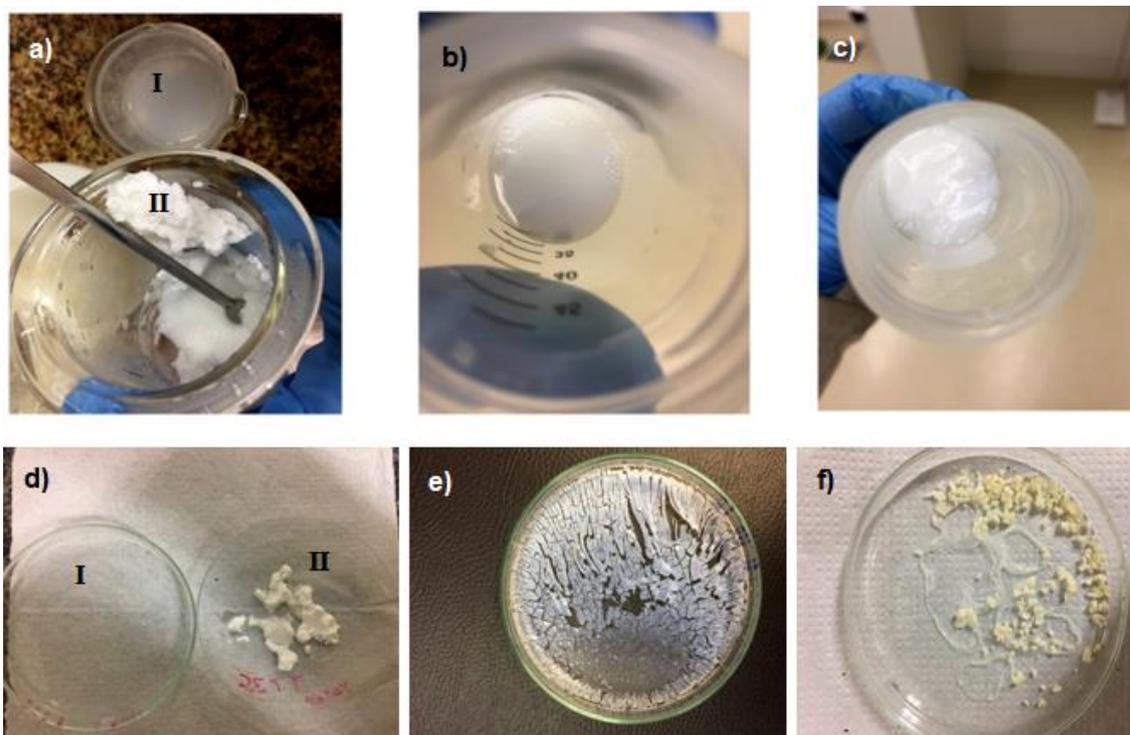


Figura 35 - Látex formado das amostras a), d) NP_2E2; b), e) NP_2E3; c), f) NP_2E4. A linha de cima são as amostras obtidas logo após a reação. A linha de baixo são os respectivos látices depois da secagem em estufa. O látex das Figuras 35.a) e d) possuem duas regiões: I) camada menos densa e II) camada mais densa.

As Figuras 35.a) e d) mostram a amostra NP_2E2 antes e após a secagem do látex. Após 30 min de reação já era possível visualizar incrustação e formação de coágulo na parede e na haste do reator (Figura 35.a)), como mostra a região II. Conseqüentemente, o processo gerou aglomerados e partículas maiores. O sobrenadante (região I) pareceu apresentar coloração e aspecto de um látex estável, que provavelmente continha partículas menores. A Figura 35.d) mostra as partículas após a secagem, tendo sido formado um filme polimérico transparente (região I) ou aglomerados de partículas (região II). Em vista do aparecimento das duas regiões, pode-se dizer que a polimerização em miniemulsão com o PVA não foi bem sucedida, uma vez que produziu um látex heterogêneo e com partículas grandes. Como já explicado, o PVA possivelmente aumentou a viscosidade do meio, assim, provocou o aumento do

tamanho das partículas. Além disso, por ser não-iônico, provavelmente atuou apenas no impedimento eletrostático e estérico, o que não foi suficiente para sustentar a formação das NPPs durante a reação.

As partículas poliméricas de PMMA obtidas com o uso de LSS (NP_2E3) apresentaram boa dispersão em água (Figura 35.b). O látex apresentou estabilidade em suspensão aquosa muito superior à observada com o uso de PVA. A Figura 35.e) ilustra o látex seco como um sólido quebradiço e fácil de ser macerado. O comportamento do sistema com o uso do lauril se deve possivelmente por ser aniônico, favorecendo também a polimerização.

Myers (1999) sugeriu que os surfactantes, além de funcionalizarem como estabilizantes na emulsificação dos monômeros, exercem funções diretamente relacionadas com a polimerização: i) na solubilização das cadeias oligoméricas de radicais livres durante seu crescimento; ii) na estabilização da formação das partículas poliméricas em si. Dessa forma, como observado na amostra, a capacidade dos surfactantes para se associarem nas cadeias de polímero também pode afetar positivamente as propriedades finais e a estabilidade do polímero resultante, especialmente quando a macromolécula exibe alguma afinidade com a água.

Ademais, os tensoativos aniônicos e catiônicos, pela própria característica de conterem cargas verdadeiras na parte hidrofílica, sempre apresentam maior retenção de moléculas de água que os tensoativos não iônicos. Isso significa que a utilização de um grupo polar maior, que penetra mais profundamente no filme líquido atraindo mais moléculas de água, reduz a velocidade de drenagem da água para dentro da gota. Essa menor drenagem diminui a velocidade de redução da espessura filme e aumenta o tempo de vida da gota, o que é ótimo para processos complexos, como uma polimerização. No caso do LSS, o efeito pode ser ainda mais acentuado, uma vez que essa molécula apresenta uma carga negativa associada à presença de quatro átomos de oxigênio (o oxigênio é muito eletronegativo), o que reforça a característica de polaridade negativa dessa parte da molécula e atrai mais fortemente as moléculas de água em sua vizinhança (DALVIN, 2011; MYERS, 1999).

Percebe-se que a combinação dos dois surfactantes proporcionou um látex homogêneo (Figura 35.c)), porém com uma viscosidade muito alta, comportando-se como um gel. Pode ser que, neste caso, o LSS tenha atuado como o principal surfactante

para a emulsão e a polimerização em miniemulsão. Em contrapartida, o PVA possivelmente agiu como um agente espessante do meio e reticulante nas moléculas de MMA e água presentes. Além disso, PVA pode ter promovido o efeito de inchamento do material quando submetido ao meio aquoso, pois é um polímero hidrossolúvel. Após a secagem (Figura 35.f)), observou-se um aglomerado amarelado e mais rígido, o que evidencia o desempenho do PVA como espessante e reticulante.

O aspecto dos látices formados (Figura 36) comprova a diferença entre as amostras, como já comentado. Por essa análise, não foi possível observar a preservação da dupla emulsão, devido à baixa resolução do equipamento. Porém, pode-se notar algumas características do látex final. Para a amostra NP_2E2, vê-se a menor quantidade de partículas na região do topo (Figura 36.a)) e os aglomerados formados na região do fundo (Figura 36.b)). Para a NP_2E3, as partículas ficaram dispersas no meio aquoso e um pouco heterogêneas ou aglomeradas (Figura 36. c) e d)). Para a amostra NP_2E4, nota-se a alta concentração das partículas no meio aquoso, a proximidade uma das outras e um pouco de heterogeneidade (Figura 36.e) e f)).

A caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (Figura 37) confirmou a aglomeração das partículas após a secagem (coluna da esquerda) e a dimensão submicrométrica das partículas (coluna da direita). Os resultados corroboraram a melhor eficiência do LSS na polimerização e na diminuição do tamanho das partículas, seguida da combinação dos surfactantes e por último pelo PVA. Aliás, Peixoto *et al.* (2016) observaram que o LSS exerceu um fator preponderante sobre a estabilidade da miniemulsão. Em geral, quanto maiores são as quantidades de surfactante, menores são as gotas formadas e mais rápida é a reação, visto que a nucleação é facilitada com maiores área e população de gotas.

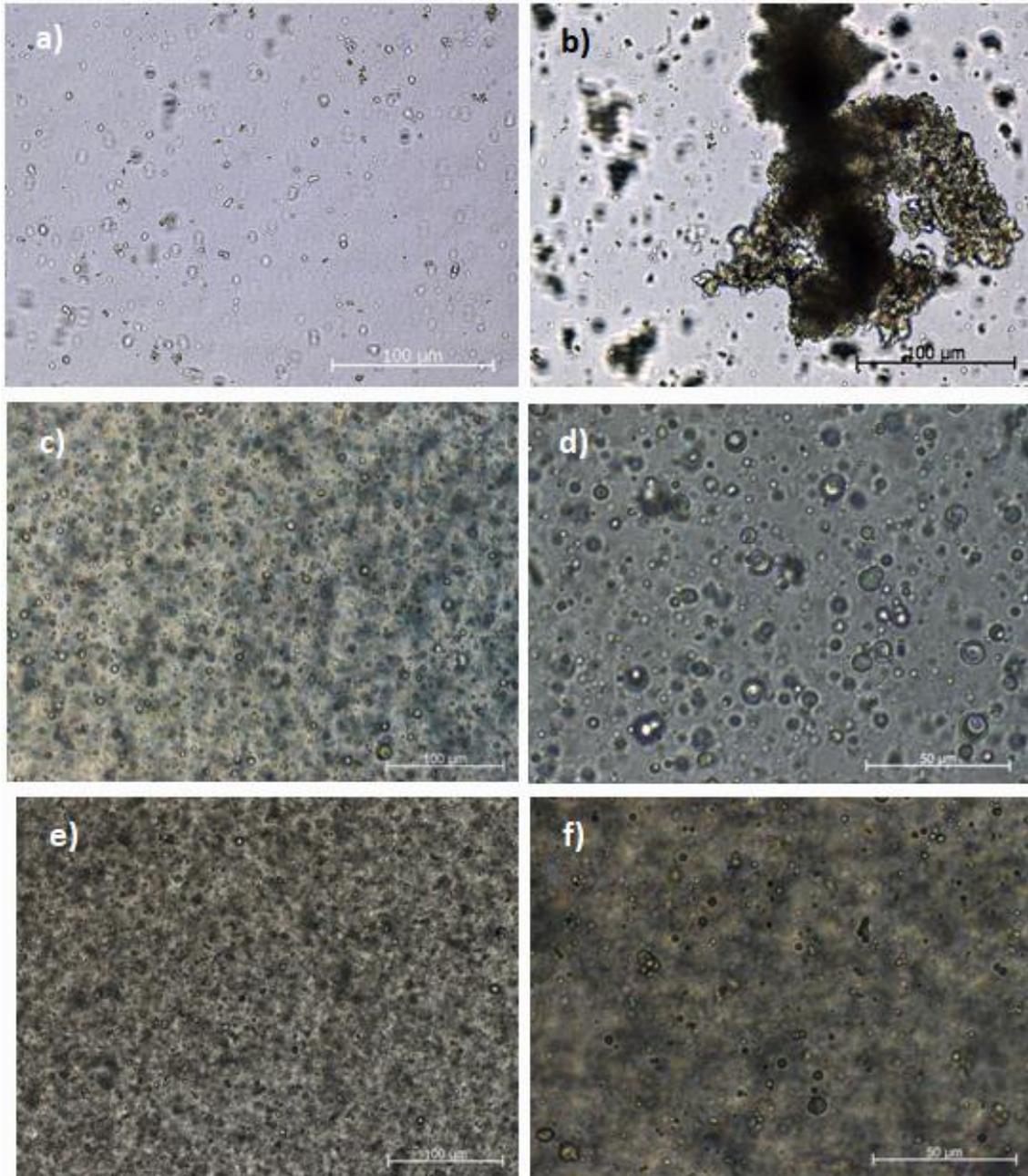


Figura 36 - Micrografias ópticas das amostras cotendo PVA (NP_2E2) do a) topo e b) fundo; LSS (NP_2E3) aumentada c) 20x e d) 50x; PVA + LSS (NP_2E4) aumentada e) 20x e f) 50x.

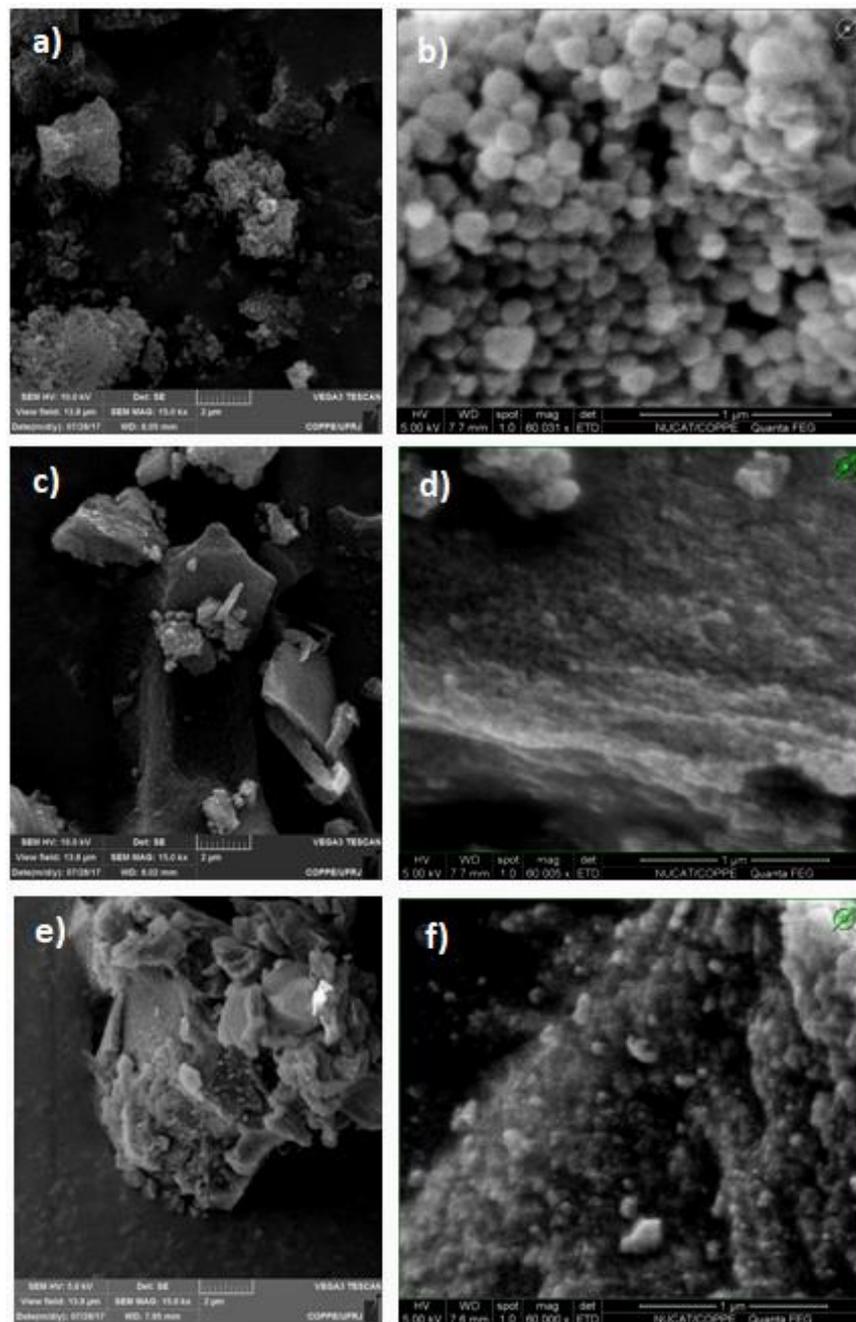


Figura 37 - Micrografias por MEV das NPPs contendo PVA (NP_2E2) aumentada a) 15kx e b) 60kx; LSS (NP_2E3) aumentada c) 15kx e d) 60kx; PVA + LSS (NP_2E4) aumentada e) 15kx e f) 60kx.

Além da análise das amostras em pó, as amostras também foram tratadas por um processo de crioseção para posterior teste de morfologia, utilizado com o intuito de observar a estrutura interna das NPPs, de modo a confirmar a permanência da dupla emulsão (Figura 38). Contudo, o processo de criofatura adotado não foi satisfatório para atingir esse objetivo, pois não se observou o corte das partículas para visualização do seu interior. As micrografias mostraram o possível desprendimento das NPPs da resina Epóxi, assim como indicam as setas da Figura 38.a). Pelo fato das partículas

possuírem dimensão nanométrica, a lâmina metálica pode não ter sido eficiente para cortar as NPPs, que ficaram apenas aderidas à resina (Figura 38.b).

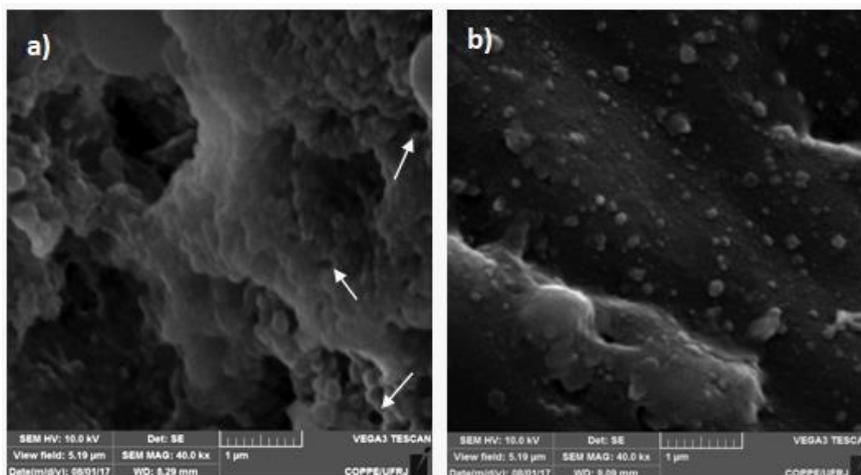


Figura 38 - Micrografias por MEV da crioseção das NPPs mostrando possível a) desprendimento das NPPs e b) adesão das NPPs na resina.

Por fim, o aspecto das partículas com os diferentes surfactantes testados foram confirmados pela determinação do diâmetro médio e pela distribuição do tamanho das partículas.

Os valores dos diâmetros médios das partículas obtidos para cada uma das reações são apresentados na Tabela 32, que estão condizentes com os testes de morfologia analisados. É importante salientar que, para aplicações farmacológicas, é de grande interesse que as nanopartículas estejam entre 50 e 300 nm (TIARKS, LANDFESTER e ANTONIETTI, 2001). Além disso, as correntes intersticiais que carregam os fluidos orgânicos entre as células fluem em estruturas porosas que têm cerca de 100 nm de diâmetro. Portanto partículas menores que esse tamanho podem ser absorvidas e circularem pelas correntes (BALOGH *et al.*, 2011). Partindo deste princípio, as amostras produzidas com LSS atenderam a essas necessidades.

Tabela 32 - Diâmetro médio das partículas com diferentes surfactantes.

Amostra	Tempo [h]	d [nm]	Desvio [nm]	PDI
NP_2E2	0	3594	1838	0,262
	2	1048	129,3	0,889
NP_2E3	0	2219	125	0,205
	2	54,72	0,344	0,387
NP_2E4	0	1220	24,04	0,447
	2	285,4	7,93	0,429

A Figura 39 ilustra as distribuições de tamanhos das partículas obtidas. Após a reação (tempo de 2h), as distribuições de tamanhos de partículas foram relativamente estreitas e monomodais, com exceção da amostra NP_2E4. Já as curvas no tempo inicial de reação apresentaram picos nas regiões micrométricas. Como nesses instantes, o processo é mais mutável e instável, principalmente por se tratar de polimerização via emulsão dupla, é provável que essas distribuições não reflitam a realidade do processo e resultem do processo de aglomeração entre o momento de amostragem e o momento de medição. Essa hipótese é reforçada pelos perfis iniciais similares em todas as reações e à redução sistemática dos tamanhos em todos os ensaios.

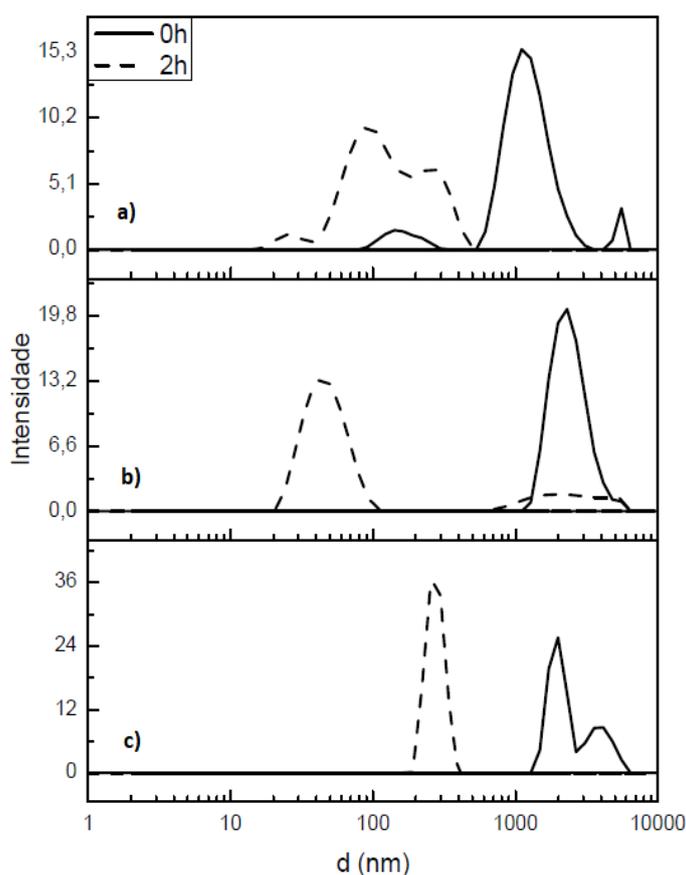


Figura 39 - Distribuições de tamanhos de partícula das amostras a) NP_2E4, b) NP_2E3 e c) NP_2E2 nos tempos de 0 e 2h da reação.

Dessa forma, é possível notar que a estrutura inicial não é preservada com a polimerização, tendo ocorrido um deslocamento da curva de distribuição para valores de diâmetros menores ao final do processo. Esse fato se baseia em alguns efeitos importantes. Primeiramente, como o PMMA é mais denso que o MMA, ocorre contração de volume das partículas. Em segundo lugar, as miniemulsões possuem interfaces flexíveis e flutuantes, que sofrem deformações fáceis, bem como o próprio

consumo dos monômeros da camada interfacial modifica a energia de curvatura da interface. Além disso, é mais difícil amostrar as miniemulsões do que o látex, quando as partículas já estão formadas e sólidas (PAVEL, 2004; SALOMÃO, 2016). Finalmente, a dupla emulsão por si só geralmente é instável e polidispersa, e por isso pode contribuir para mudanças durante a polimerização.

4.4.2 Análise de Conversão

A análise de conversão foi feita apenas para a amostra NP_2E3, que resultou em látex estável e factível para recolhimento das alíquotas durante o ensaio. No caso das amostras com PVA, não foi possível a retirada das alíquotas para análise de conversão devido à incrustação (amostra NP_2E2) ou ao alto grau de gelificação (amostra NP_2E4), que dificultaram a obtenção dos pontos em diferentes tempos de amostragem.

A Figura 40 mostra que uma elevada conversão (cerca de 90%) é atingida nos primeiros 15 min, alcançando-se os 100% de conversão em aproximadamente 20 min. As altas taxas de reação são devidas ao pequeno diâmetro das partículas, que facilitam a nucleação das gotas monoméricas e a atuação do iniciador sobre elas. Além disso, mesmo executando a etapa de dupla emulsão antes da polimerização, esse perfil é bastante característico para a polimerização do MMA, em que se atingem altas conversões em tempos curtos de reação (VRIGNAUD, BENOIT e SAULNIER, 2011b). Como também mostrado em vários trabalhos da literatura (LORCA *et al.*, 2012; PEIXOTO *et al.*, 2016).

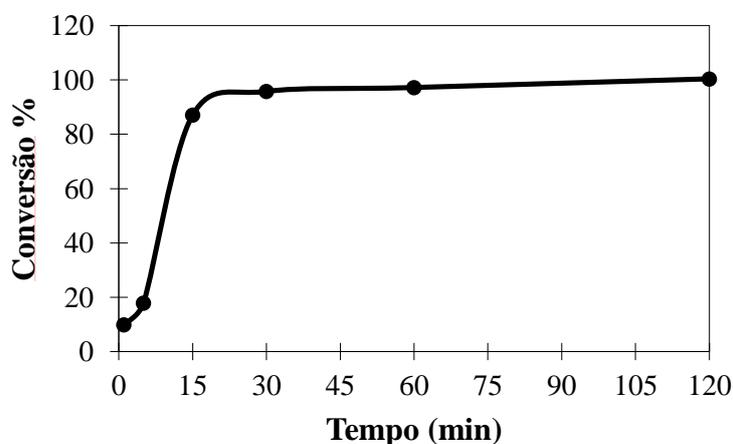


Figura 40 - Conversão de monômero no ensaio da amostra NP_2E3.

4.4.3 Massa Molar

As análises de GPC foram feitas conforme descrito no Capítulo III, usando THF como fase móvel, a fim fornecer informações sobre a estrutura molecular dos polímeros que constituem as nanopartículas.

Canevarolo jr. (2006) afirmou que muitas propriedades físicas são dependentes do comprimento da molécula. Como polímeros normalmente envolvem largas faixas de valores de massas molares, pode ocorrer grande variação das propriedades. Por isso, é de grande importância o conhecimento da distribuição de massas molares do polímero estudado. Os parâmetros principais das distribuições de massas molares são a massa molar numérica média (M_n), a massa molar ponderal média (M_w) e o índice de polidispersão (PDI). O M_n relaciona-se diretamente às propriedades osmóticas do polímero, enquanto o M_w está relacionado principalmente com as propriedades mecânicas. Já o PDI é a razão entre o M_w e M_n e está relacionado com a largura (ou variância) da distribuição. Materiais que apresentam baixo PDI apresentam moléculas com massas molares semelhantes (CANEVAROLO JR., 2006).

No campo farmacêutico, Fonseca *et al.* (2013a) ressaltaram que deve ser dada atenção ao peso molecular de polímeros sintéticos que não são biodegradáveis. Como a biodegradação nem sempre ocorre, os polímeros sintéticos devem ser eliminados por meio da excreção renal. Portanto, eles devem apresentar uma distribuição de massa molar uniforme que se encaixe no limiar de excreção.

Na Figura 41 são exibidas as distribuições de massas molares das amostras NP_2E2, NP_2E3 e NP_2E4. Primeiramente, percebe-se claramente que as distribuições de massas molares das partículas produzidas com LSS se sobrepõem (amostras NP_2E3 e NP_2E4) e que, portanto, o LSS exerceu maior influência que o PVA sobre a distribuição de comprimentos das cadeias. Por outro lado, as partículas produzidas apenas com PVA resultaram em distribuição mais larga e deslocada para menores valores de massa molar. Esse fato é condizente com o resultado do tamanho partícula (Tabela 32), que indicou o maior diâmetro encontrado para o PVA. Em geral, quanto maior é o tamanho médio de partículas, menor é a massa molar e mais larga é a curva devido ao inchamento da partícula, que neste caso foi causada pela presença do PVA. Esses resultados também parecem indicar a dispersão mais eficiente de emulsão dupla pelo LSS.

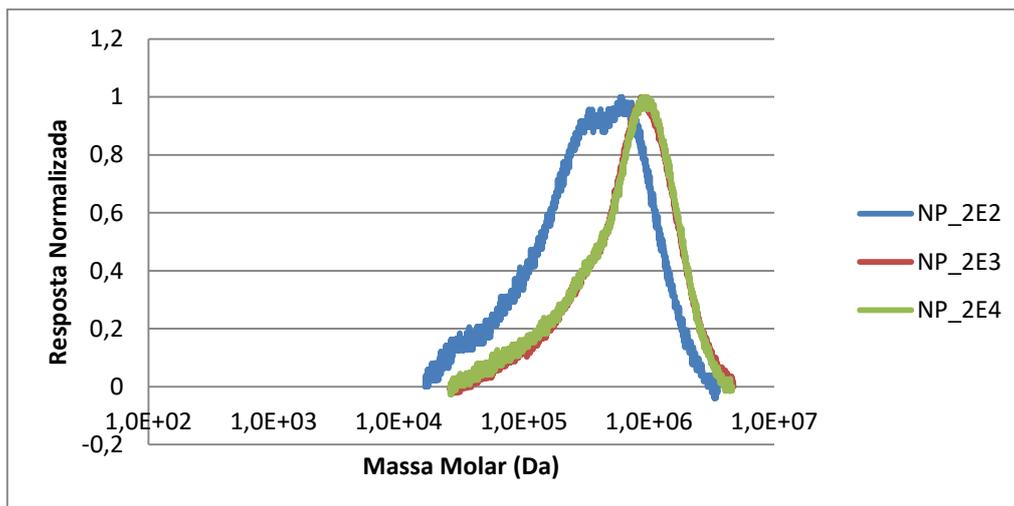


Figura 41 - Distribuição da massa molar normalizada por GPC das NPPs contendo PVA (NP_2E2), LSS (NP_2E3) ou PVA + LSS (NP_2E4).

Os valores de M_n , M_w e PDI referentes à Figura 41 estão expostos na Tabela 33. As partículas de PMMA apresentaram massa molar concordante com a distribuição de massas molares para o PMMA obtidas por miniemulsão (LORCA *et al.*, 2012; PAIVA, MELO E PINTO, 2016; PEIXOTO *et al.*, 2016). Ademais, como esperado, todos os polímeros apresentaram altas massas molares, em especial aqueles produzidos com LSS, uma vez que polimerizações em emulsão e miniemulsão geralmente proporcionam taxas de propagação elevadas e taxas de terminação reduzidas por conta do efeito da compartimentalização associado aos pequenos tamanhos (CANEVAROLO JR., 2006).

Tabela 33 - Massas molares médias das partículas produzidas com diferentes surfactantes..

Amostra	M_n (Da)	M_w (Da)	PDI (M_w/M_n)
NP_2E2	1,38E+05	4,49E+05	3,253
NP_2E3	2,67E+05	7,88E+05	2,955
NP_2E4	2,47E+05	7,66E+05	3,096

4.4.4 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica dos polímeros foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA), que quantificou as perdas de massa sob aquecimento (Figura 42). De maneira geral, todas as amostras resultaram em curvas semelhantes, de maneira que a presença do surfactante não foi crucial para a estabilidade térmica do polímero. Constata-se ainda que os perfis foram similares ao encontrado por Martins (2017), que produziu

partículas de PMMA via polimerização em miniemulsão direta. Tal fato ressalta que a dupla emulsão não afetou a estabilidade térmica do PMMA quando comparado com métodos mais convencionais de preparação. Isto se deve à manutenção de estrutura molecular de PMMA produzido.

Pode-se notar o surgimento de três etapas de perda de massa, o que foi de fato confirmada por Kashiwagi *et al.* (1986), que mostrou que a degradação térmica do PMMA oriundo de uma reação de polimerização radicalar ocorre em três etapas principais. O primeiro estágio, por volta de 165 °C, está relacionado à ruptura das ligações H-H. Já a segunda etapa ocorre por volta de 270 °C devido à quebra de terminações insaturadas (provenientes da etapa de terminação por desproporcionamento) e cisão homolítica do grupo vinílico. Por fim, a última etapa decorre da cisão aleatória das cadeias poliméricas, nas temperaturas entre 370 a 400 °C (GAŁKA KOWALONEK e KACZMAREK, 2014).

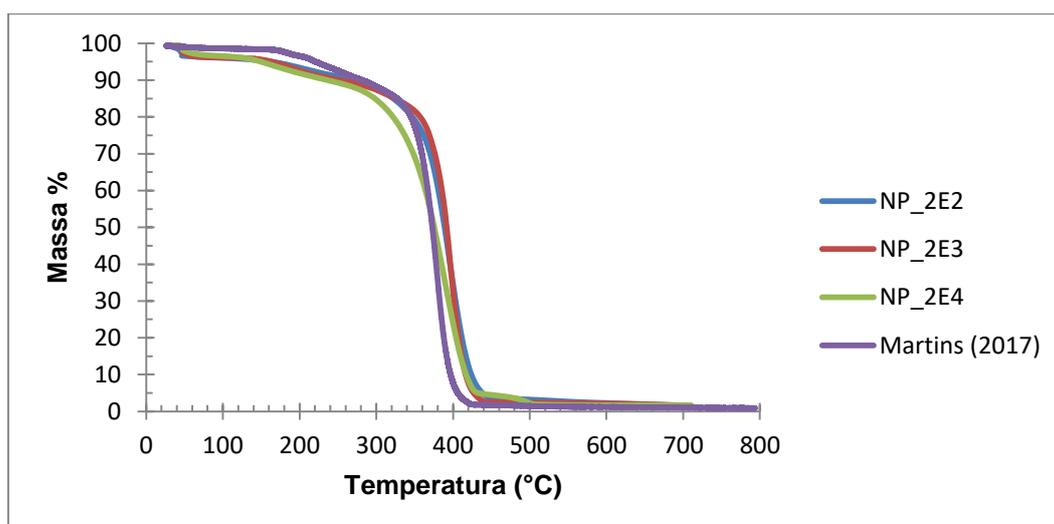


Figura 42 - Perfil de perda de massa por TGA das das NPPs contendo PVA (NP_2E2), LSS (NP_2E3) ou PVA + LSS (NP_2E4), em comparação com a literatura (MARTNS, 2017).

Os ensaios de estabilidade térmica foram complementados com análises de calorimetria de varredura diferencial (DSC), em que se determinaram a curva de DSC e a temperatura de transição vítrea das amostras.

A técnica de DSC avalia a energia envolvida em uma transformação física ou química de um material por meio do controle de aquecimento e resfriamento. Em uma curva de DSC típica de materiais poliméricos, três tipos básicos de transformações podem ser detectados: transformações endotérmicas (como a fusão), transformações

exotérmicas (como a cristalização) e transições de segunda ordem (como a transição vítrea) (ODIAN, 2004). A temperatura de transição vítrea (T_g) é detectada quando as cadeias poliméricas adquirem certa mobilidade e é associada às regiões amorfas do polímero. A temperatura de fusão (T_m) é associada à fusão de regiões cristalinas do polímero (PINTO, 2013).

As curvas de DSC referentes às amostras do PVA puro, NP_2E2, NP_2E3 e NP_2E4 encontram-se no Apêndice B. Por meio delas, foi possível calcular os valores da temperatura de transição vítrea das partículas, como mostrado na Tabela 34. As T_g dos polímeros formados foram similares uma com as outras, indicando que os diferentes surfactantes não afetaram a transição térmica, como constatado na análise do TGA. Além disso, a T_g foi coerente ao valor disponível na literatura de 105 °C (MANO e MENDES, 2004), o que sugere que a metodologia de dupla emulsão aplicada antes da polimerização não modificou as propriedades térmicas do polímero formado, por conta de manutenção de estrutura molecular original do polímero.

Fez-se a análise de DSC do PVA puro a título de comparação e para investigar se a presença do PVA poderia alterar a T_g dos polímeros finais, pois possui T_g bem inferior ao do PMMA. No entanto, como mencionado, não foram observadas mudanças significativas, possivelmente em virtude da pequena quantidade de PVA utilizada no processo.

Tabela 34 - Temperatura de transição vítrea dos polímeros produzidos.

Amostra	T_g (°C)
PVA puro	70,88
NP_2E2	108,55
NP_2E3	107,92
NP_2E4	105,81

4.5 ENSAIOS COM O HOMOGENEIZADOR DE ALTA PRESSÃO

Os experimentos feitos até essa etapa da pesquisa envolveram o estudo de diferentes formulações, para adequar a técnica de dupla emulsão e de polimerização formação das nanopartículas de PMMA com características desejáveis. Por isso foram

executados com auxílio do ultra-turrax, que requer pouca quantidade de reagentes para o preparo. Esta seção aborda alguns testes conduzidos como o homogeneizador de alta pressão (Artepeças, APLAB-10) na emulsificação, para compará-lo com o turrax, avaliando a viabilidade de escalonar o processo para escala industrial. Dessa forma, serão descritos ensaios de formulação de primeira e segunda emulsão, da reação de polimerização, bem como a caracterização quanto à estabilidade de emulsão, morfologia, cinética de reação, tamanho de partícula e massa molar de produtos obtidos com auxílio do homogeneizador de alta pressão.

4.5.1 Estudo da 1ª Emulsão (1E)

Com base nas respostas experimentais obtidas nos ensaios usando o ultra-turrax, decidiu-se manter as proporções de 20 e 80% m/m das fases aquosa interna e oleosa, respectivamente, utilizando o Span 80 (5% m/m) como surfactante. Ademais, optou-se em estudar as formulações da primeira emulsão com e sem PMMA presente na fase oleosa, uma vez que o homogeneizador de alta pressão geralmente promove emulsões mais estáveis e gotas menores (LAMPRECHT *et al.*, 2000), além de testar duas pressões de operação diferentes, de 200 e 350 bar.

A aparência (Figura 43) e a análise por Turbiscan (Figura 44) das emulsões mostraram que apenas com a adição de PMMA a emulsão ficou estável, da mesma forma como verificado usando o turrax. Assim, a emulsão sem PMMA (H_1E1, Figuras 43 e 44 a)) sedimentou nos primeiros instantes após o processo de emulsificação, ao contrário das amostras H_1E2 e H_1E3 (Figuras 43 e 44 b) e c)).

Ao confrontar as emulsões com PMMA nas pressões de 200 e 350 bar, H_1E2 e H_1E3, respectivamente, percebeu-se que uma melhor estabilidade prevaleceu na amostra H_1E2. A pressão de 350 bar pode ter sido alta o bastante para quebrar as gotas formadas e aumentar excessivamente a taxa de colisão entre elas e a área específica, aumentando a probabilidade de coalescência e de ocorrência de outros fenômenos de instabilidade, tal como observado na Figura 44.c) e relatado nas seções anteriores. Esses resultados corroboram os dados obtidos anteriormente e impõem a otimização do processo de emulsificação da emulsão primária.

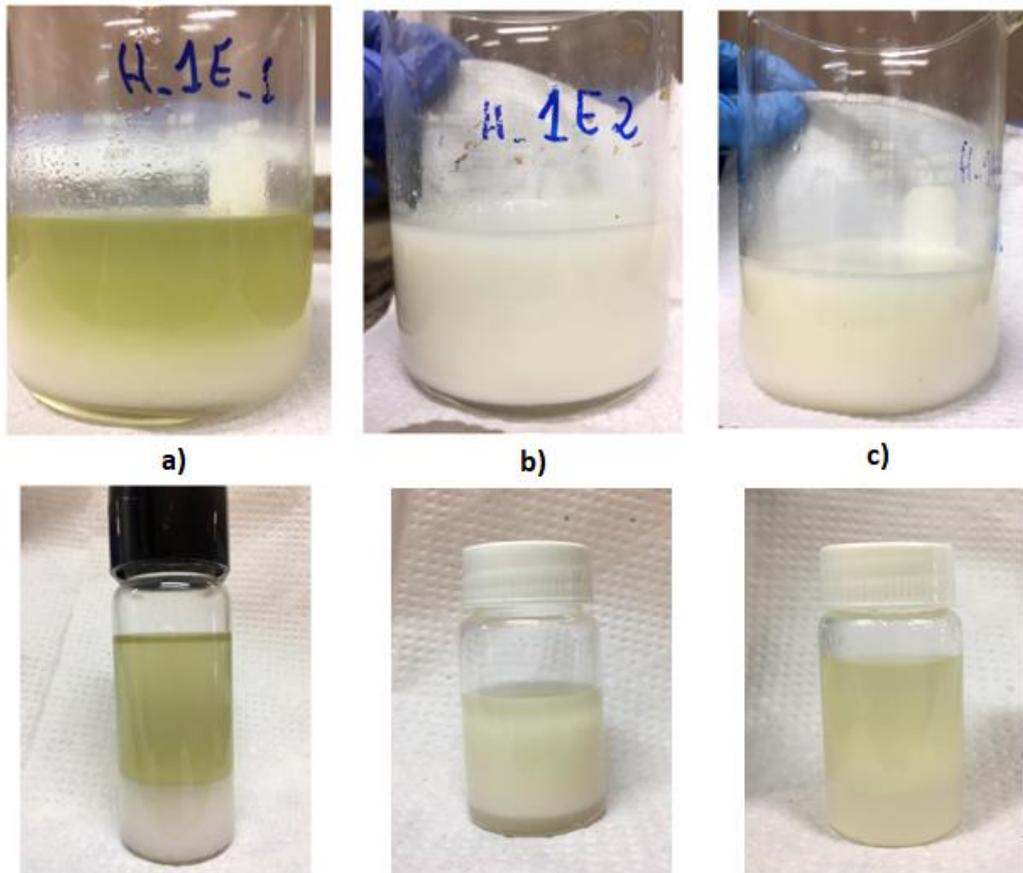


Figura 43 - Aparência das amostras a) H_1E1, b) H_1E2 e c) H_1E3 nos tempo de 1min (linha acima) e 30 min (linha abaixo) após a emulsificação.

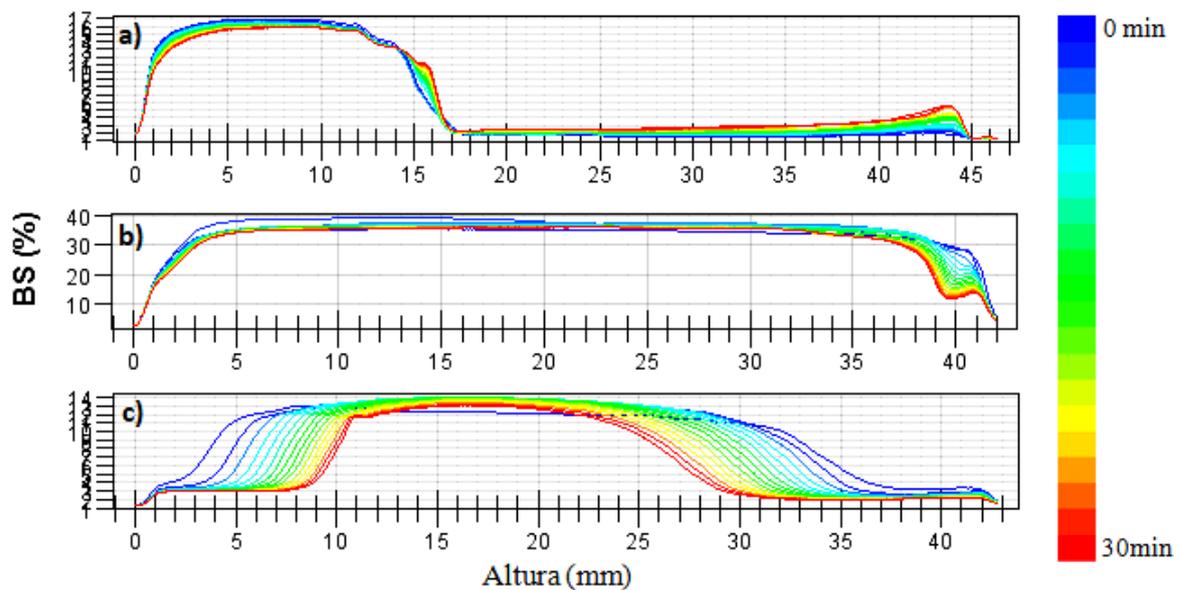


Figura 44 - Estabilidade medida com auxílio do Turbiscan das emulsões primárias a) H_1E1, b) H_1E2 e c) H_1E3.

As micrografias (Figura 45) obtidas com o auxílio de microscópio óptico também confirmam os resultados alcançados nos ensaios conduzidos com o turrax: em

que o aumento da viscosidade promovida pela adição do PMMA causou aumento do tamanho das gotas. Além disso, ao comparar as Figuras 45 b) e c), constatou-se que a pressão de 200 bar gerou gotas mais homogêneas e menores, indicando que pressões maiores podem ocasionar desestabilização da emulsão, como mencionado.

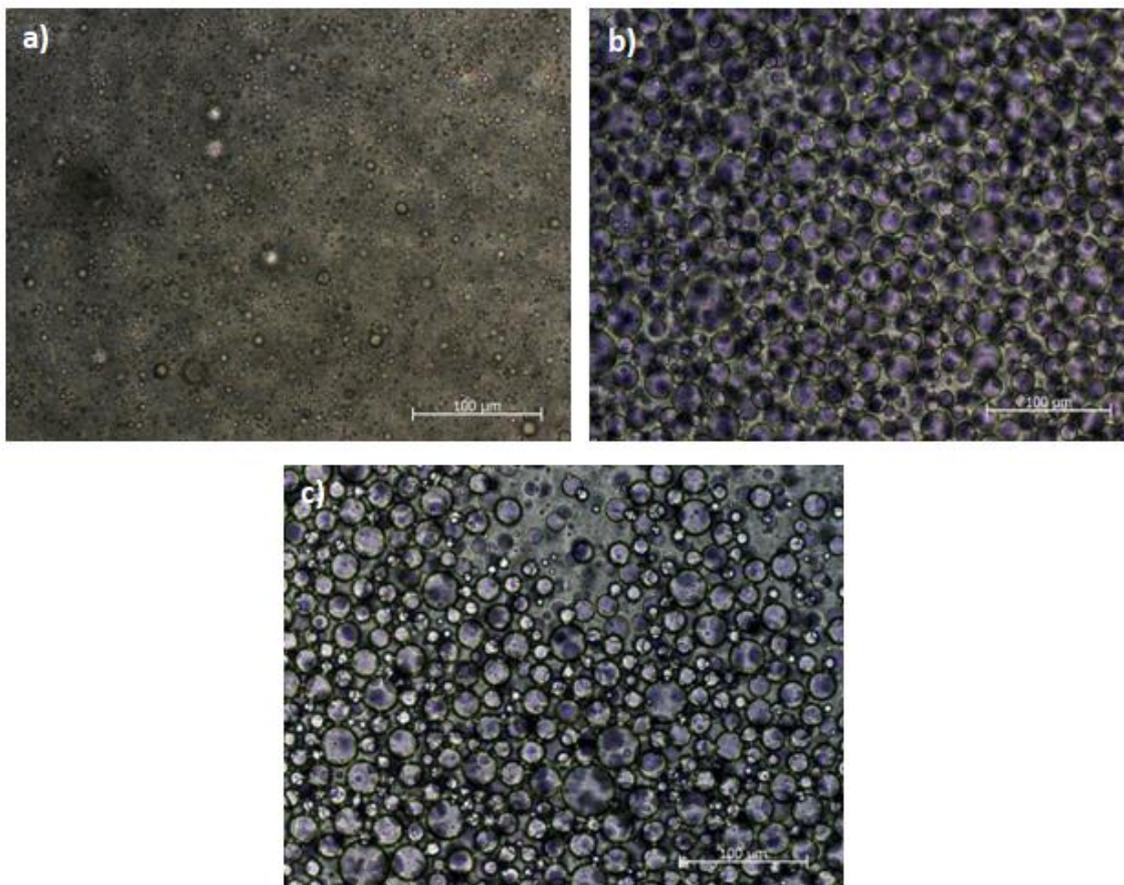


Figura 45 - Micrografias ópticas das emulsões primárias a) H_1E1, b) H_1E2 e c) H_1E3.

Em virtude dos resultados obtidos para a emulsão primária usando o homogeneizador de alta pressão, concluiu-se que a amostra H_1E2, produzido com PMMA e usando pressão de 200 bar foi a mais adequada para dar prosseguimento às etapas de emulsão dupla e polimerização, com o objetivo de gerar as nanopartículas poliméricas.

4.5.2 Formação das Nanopartículas Poliméricas (NPPs)

Para a formação da dupla emulsão foi utilizada a mesma proporção que as empregadas com o ultra-turrax, ou seja, 20% m/m da emulsão primária (H_1E2, neste caso) e 80% m/m da fase aquosa externa. Para a composição da fase aquosa externa,

optou-se por desenvolver a metodologia apenas para a melhor condição estudada com o turrax (2E3), que foi composta por 98% m/m de água e 1% m/m do surfactante LSS e 1% m/m do iniciador KPS, adicionado após a acomodação da dupla emulsão no reator e a estabilização da temperatura.

Tendo em vista relatos abordados na literatura, de que o homogeneizador de alta pressão pode desfazer a dupla emulsão mais facilmente, por ser mais robusto e fazer uso de altas pressões (SAHIN, SAWALHA e SCHROËN, 2014; VRIGNAUD, BENOIT e SAULNIER, 2011a), foram adotadas duas estratégias: formar a dupla emulsão no homogeneizador (amostra H_NP_1a) ou produzir a dupla emulsão diretamente no próprio reator pela adição da fase aquosa externa à emulsão primária, submetendo-se a uma simples agitação mecânica (amostra H_NP_1b), seguida da polimerização.

A aparência da dupla emulsão produzida no homogeneizador, referente à amostra H_NP_1a, mostrou-se estável mesmo passados 20 min após a emulsificação (Figura 46. a)). Na Figura 46 ainda é possível observar o aspecto do látex das duas amostras testadas depois da reação, muito semelhantes (Figura 46.b) e c)).

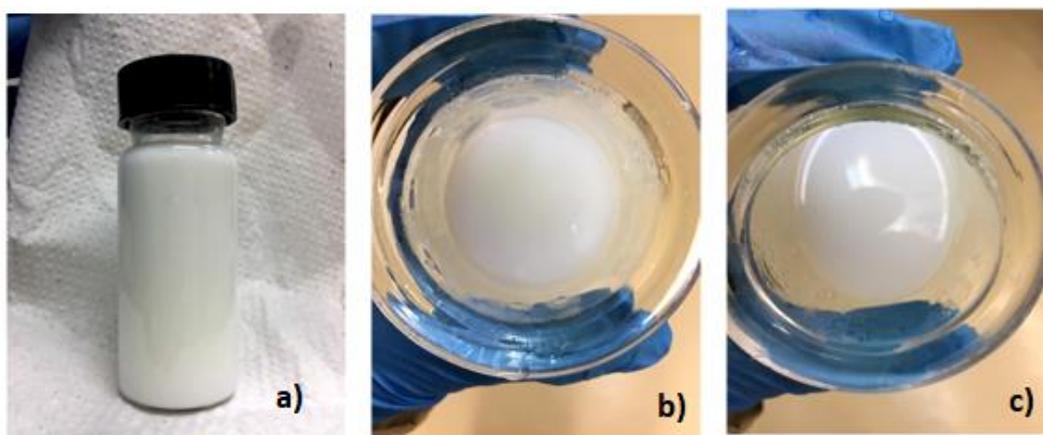


Figura 46 - Aspectos visuais da a) dupla emulsão (A/O/A); e das nanopartículas poliméricas b) H_NP_1a e c) H_NP_1b.

Os látices formados com uso do homogeneizador de alta pressão são mostrados nas micrografias da Figura 47. Não foi possível confirmar inequivocamente a formação da dupla emulsão no látex; porém, notam-se a presença de partículas dispersas no meio, onde possivelmente estão aglomeradas em maior quantidade na amostra H_NP_1b (Figura 47.b)) do que na H_NP_1a (Figura 47.a)). A explicação pode estar atrelada à menor homogeneização obtida durante a formação da segunda emulsão diretamente no reator.

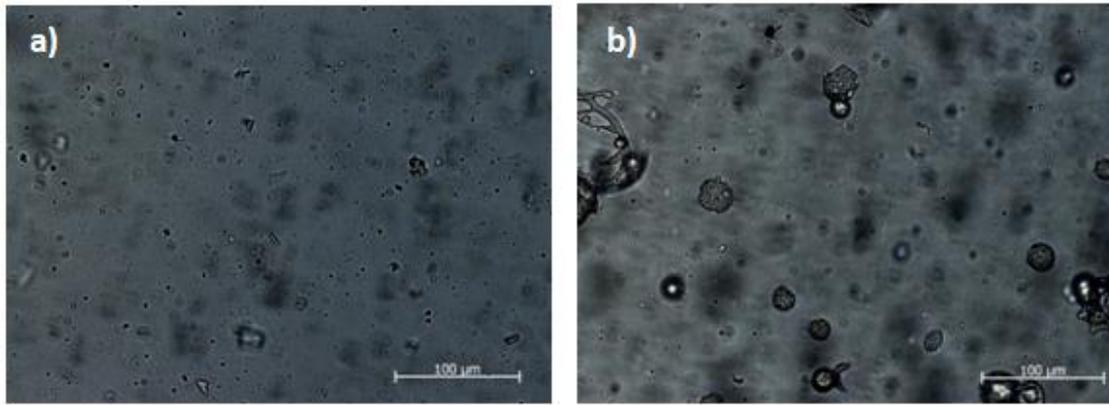


Figura 47 - Micrografias das amostras de nanopartículas a) H_NP_1a e b) H_NP_1b.

A caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (Figura 48) confirmou a aglomeração das partículas após a secagem (coluna da esquerda) e a dimensão submicrométrica das partículas (coluna da direita). Aparentemente, as partículas ficaram menores que as NPPs obtidas com auxílio do turrax (Figura 37.d)).

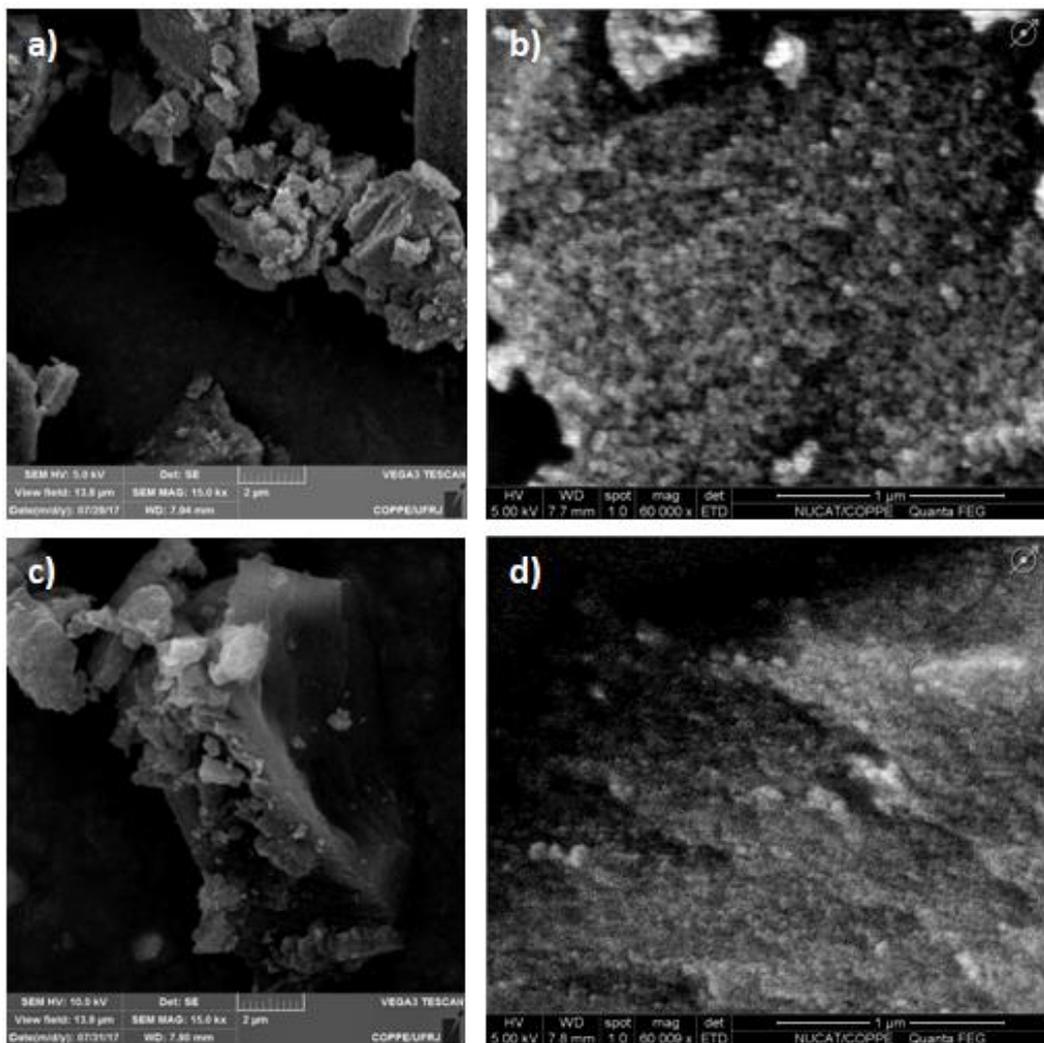


Figura 48 - Micrografias por MEV das amostras de nanopartículas a) H_NP_1a e b) H_NP_1b.

Para confirmar de fato os tamanhos das partículas e comparar os desempenhos do homogeneizador e do turrax, as amostras foram analisadas no Malvern Instruments ZetaSizer (Nano-ZS) para aferição do diâmetro médio e distribuição do tamanho de partículas. Assim, as partículas alcançaram tamanhos nanométricos (Tabela 35) e com PDI relativamente baixos, sendo que o diâmetro médio da amostra H_NP_1b foi maior que da H_NP_1a, como esperado. O perfil das distribuições de tamanhos de ambas amostras ficou estreito e monomodal após 2h de reação (Figura 49), o que potencializa a viabilidade do uso do homogeneizador para aplicações farmacológicas. Acredita-se que o pequeno pico na região de maiores tamanhos da Figura 49. a) foi causado por alguma interferência na medição, pois o pico não é acentuado e encontra-se na região limite de medição do aparelho.

Tabela 35 - Diâmetro médio das partículas usando o homogeneizador de alta pressão.

Amostra	d [nm]	Desvio [nm]	PDI
H_NP_1a	52.72	1.956	0.314
H_NP_1b	110.3	7.169	0.195

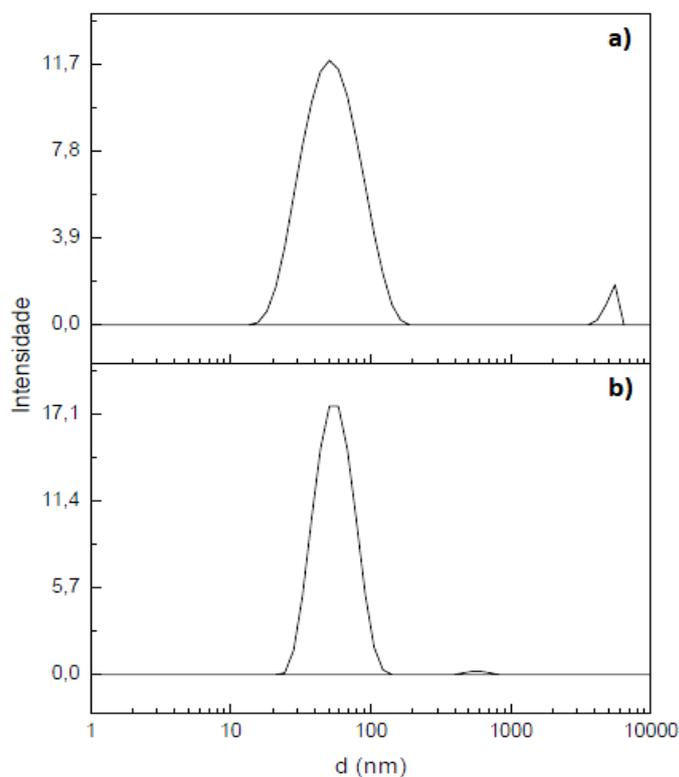


Figura 49 - Distribuição do tamanho de partícula das amostras a) H_NP_1a; b) H_NP_1b no tempo de 2h.

A verificação da interferência do homogeneizador de alta pressão sobre a cinética de conversão do PMMA é mostrada no gráfico da Figura 50. Foi observado um aumento de conversão considerável nos instantes iniciais de reação e a obtenção de conversão de 100% após cerca de 20 min. Tal resultado foi muito similar ao obtido em escala laboratorial anteriormente (Figura 40), confirmando que o procedimento não afeta a cinética de polimerização em miniemulsão.

Além disso, as curvas estão praticamente sobrepostas, o que sugere que as etapas de emulsificação dupla, como homogeneizador ou no próprio reator, não constituíram fator significativo para a cinética de polimerização. Esta constatação confronta se há real necessidade de formar a dupla emulsão no homogeneizador, uma vez que, eliminando esse estágio, pode existir economia significativa de tempo e energia durante o processo, o que é benéfico para a operação.

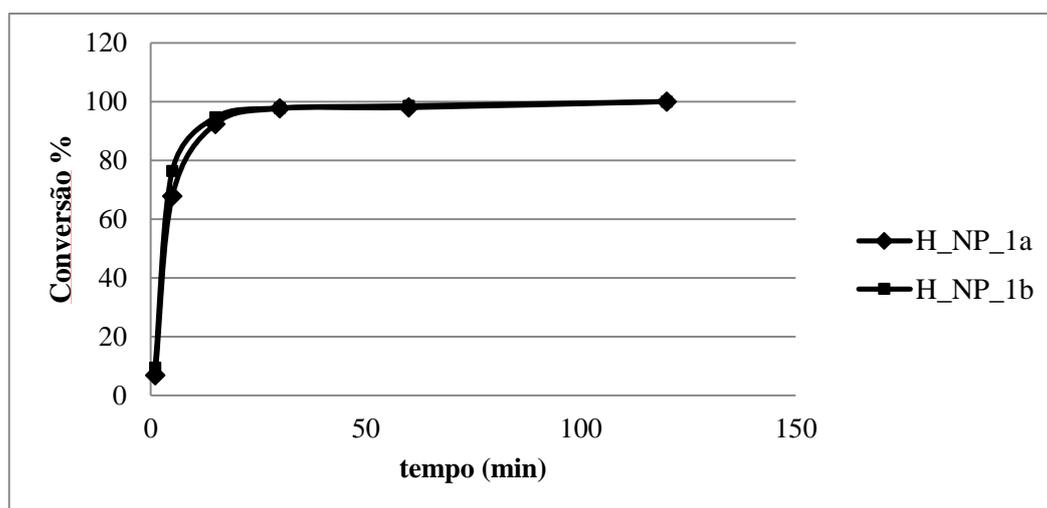


Figura 50 - Conversão de monômero no ensaio das amostras a) H_NP_1a e b) H_NP_1b.

Por fim, mediu-se a massa molar das amostras por análises de GPC. Novamente, comprovou-se que as duas técnicas de dispersão em estudo não resultaram em diferenças significativas, como apresentado nas distribuições de massas molares da Figura 51 e da Tabela 36, mostrando que a técnica utilizada não parece afetar as propriedades intrínsecas do polímero.

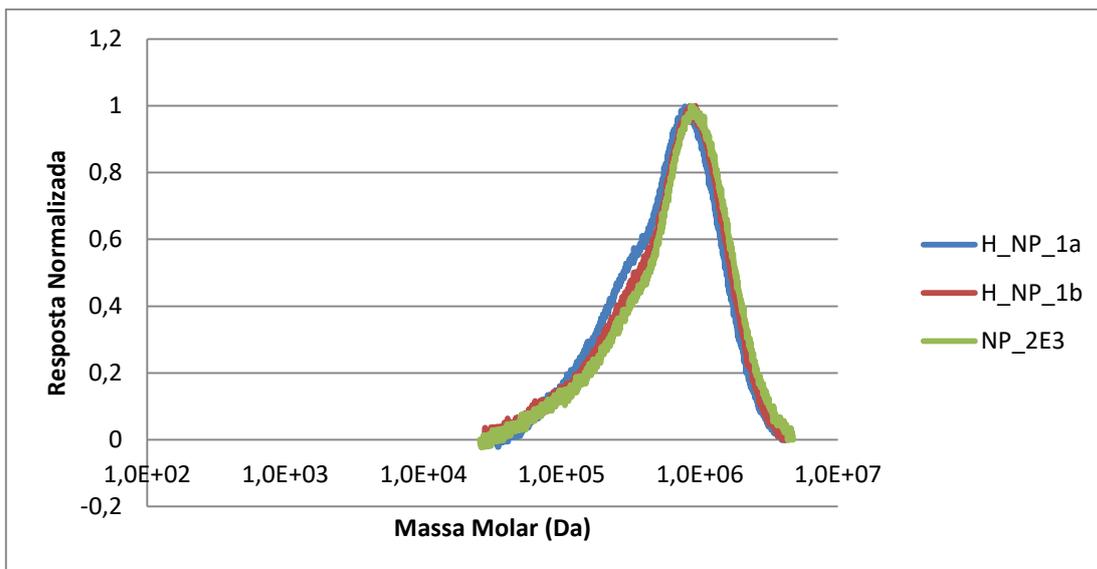


Figura 51 - Distribuição da massa molar normalizada por GPC das NPPs usando o homogeneizador H_NP_1a e H_NP_1b; e a NP_2E3 (produzida com o uso do Turrax, como comparação).

Tabela 36 - Massa molar média das partículas produzidas usando o homogeneizador de alta pressão e o turrax para emulsificação.

Amostra	Meio de Mistura	Mn (Da)	Mw (Da)	PDI (Mw/Mn)
H_NP_1a	Turrax	2,77E+05	6,75E+05	2,438
H_NP_1b	Homogeneizador	2,83E+05	7,45E+05	2,630
NP_2E3	Homogeneizador	2,67E+05	7,88E+05	2,955

Em suma, por meios das análises realizadas, concluiu-se que os testes conduzidos com o uso do homogeneizador de alta pressão são propícios para o estudo e desenvolvimento de nanopartículas poliméricas obtidas por polimerização em miniemulsão via emulsão dupla. Tal fato se baseia na obtenção de resultados condizentes com a literatura, bem como a proximidade com o estudo em escala de bancada. Dessa forma, o presente trabalho retrata o potencial para a viabilidade do processo em aplicações em escala industrial para fins farmacêuticos.

4.6 SÍNTESE DAS NPPs COM AGENTE ENCAPSULADO

Foi empregada a mesma metodologia aplicada que nos tópicos anteriores, porém esta etapa do trabalho também abordou testes de encapsulamento da proteína Albumina de soro bovino (BSA) nas nanopartículas poliméricas de PMMA. Como consequência,

foram explanados ensaios de preparação de primeira emulsão com BSA, para posterior formação da dupla emulsão e polimerização, utilizando o ultra-turrax ou o homogeneizador de alta pressão na etapa de mistura. O sistema foi então caracterizado quanto à estabilidade da emulsão, a cinética de reação, os tamanhos das partículas, as distribuições de massas molares, a eficiência de encapsulamento e a liberação da BSA.

Vale ressaltar que a única mudança feita diz respeito à substituição da água Milli-Q da fase aquosa interna pela solução tampão fosfato 0,1M e pH 7, condições essas mais adequadas à manutenção da conformação nativa da proteína.

Ao final, foi feita ainda a incorporação de um corante comercial no lugar da BSA, como tentativa de observar a estrutura interna das nanopartículas poliméricas por meio de microscopia óptica Zeiss (modelo Imager.M2).

4.6.1 Aparência das Emulsões e dos Látex com BSA

A Figura 52 apresenta as emulsões primárias e secundárias obtidas a partir do ultra-turrax e do homogeneizador de alta pressão, usando o Span 80 e o LSS como surfactantes das fases interna e externa, respectivamente. Ambas demonstraram-se leitosas e esbranquiçadas, além de similares às amostras preparadas sem a BSA. Assim, aparentemente a BSA não afetou a estabilidade das emulsões. De mesmo modo, na Figura 53 é apresentado o látex referente a cada amostra testada, NP_2E3_BSA, H_NP_1a_BSA e H_NP_1b_BSA, que tiveram o mesmo aspecto dos respectivos brancos, embora um pouco mais amarronzadas, provavelmente devido à mudança da composição de fase interna.



Figura 52 - Aparência da primeira emulsão (coluna à esquerda) e da dupla emulsão (coluna à direita) das amostras preparadas com BSA usando o a) e b) ultra-turrax ou c) e d) homogeneizador de alta pressão.

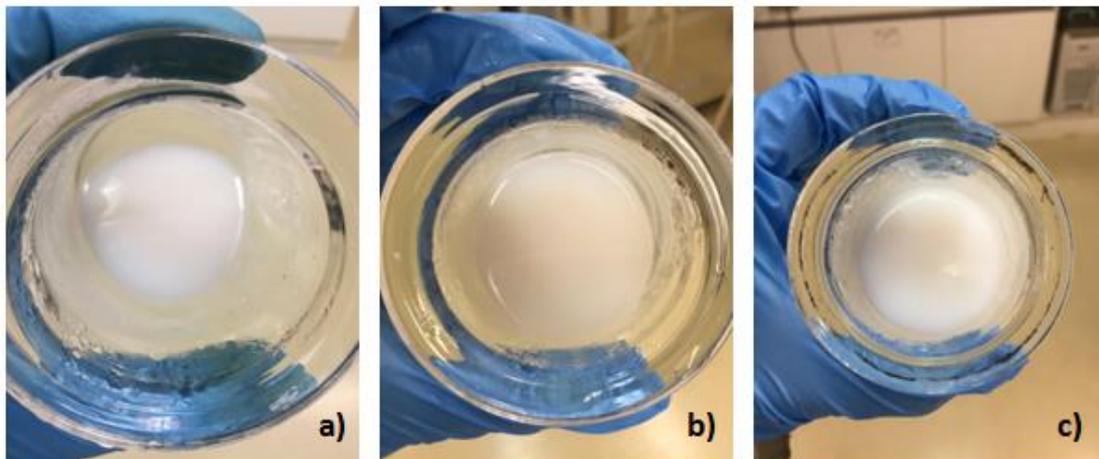


Figura 53 - Aparência do látex das amostras preparadas com BSA a) NP_2E3_BSA (usando o Turrax), b) H_NP_1a_BSA (usando o Homogeneizador) e c) H_NP_1b_BSA (usando o Homogeneizador) .

4.6.2 Diâmetro Médio e Distribuição de Tamanho das Partículas

As amostras contendo BSA também foram submetidas à análise de tamanho de partícula e seus resultados encontram-se reportados na Tabela 37. Primeiramente,

observa-se que o diâmetro médio não se alterou significativamente em relação aos meios de emulsão utilizados. Ademais, todos os diâmetros médios obtidos com BSA encapsulada foram um pouco maiores que os seus respectivos brancos (Tabelas 32 e 35). Esse comportamento também foi observado no trabalho de Lamprecht *et al.* (2000) e provavelmente refletem a maior viscosidade do meio, além das características elétricas induzidas pelos sais do tampão.

Tabela 37 - Diâmetro médio das NPPs produzidas com BSA.

Amostra	Modo de Mistura	Tempo [h]	d [nm]	PDI
NP_2E3_BSA	Ultra-turrax	0	9942	0,652
		2	167,6	0,441
H_NP_1a_BSA	Homogeneizador	2	153,7	0,250
H_NP_1b_BSA	Homogeneizador	2	142,1	0,198

Além da determinação dos diâmetros médios, a Figura 54 apresenta as distribuições de tamanho das partículas. Após a reação (tempo de 2h), as distribuições de tamanhos de partículas foram relativamente estreitas e monomodais, assim como para as amostras produzidas sem BSA. Vale lembrar que uma distribuição de tamanhos estreita (monodispersa) proporciona melhor controle sobre a dose e o comportamento de liberação do fármaco encapsulado, garantindo maior eficiência de encapsulamento e melhor biocompatibilidade com células e tecidos do corpo (LIU *et al.*, 2011).

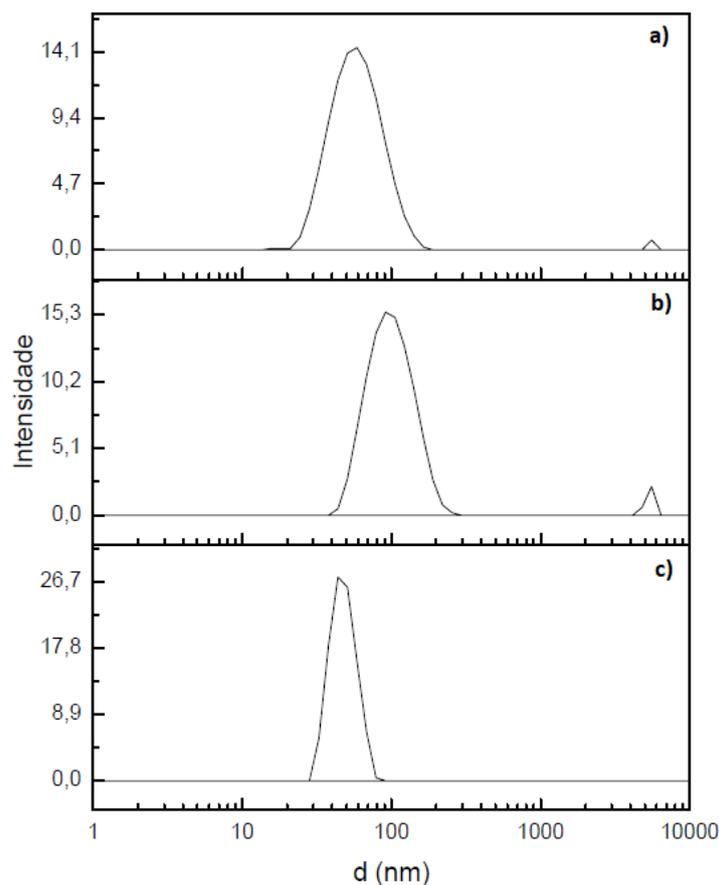


Figura 54 - Distribuições de tamanhos de partícula das amostras produzidas com BSA a) H_NP_1b_BSA, b) H_NP_1a_BSA e c) NP_2E3_BSA no tempo de 2h.

4.6.3 Análise de Conversão

Verificou-se a possibilidade de interferência da BSA sobre a cinética de polimerização do PMMA por meio da análise gravimétrica (Figura 55). Foi adicionada também uma amostra sem BSA, para fins comparativos.

Para as amostras em que foi usado o homogeneizador, o perfil cinético não se alterou muito com a adição da BSA, observando-se crescimento significativo de conversão antes dos 15 min de reação, seguindo-se uma cinética constante e sustentada. Contudo, para a amostra usando o turrax (NP_2E3_BSA), nota-se um atraso importante para iniciar a polimerização, o que ocorre somente após 30 min. Neste caso, pode ter acontecido alguma interferência ou interação da BSA com o iniciador, ocasionado possivelmente pela quebra das nanopartículas devido a rotação intensa do turrax, e assim alguma fração de BSA pode ter escapado da fase aquosa interna. O efeito é muito significativo e não deve ser ignorado em operações reais.

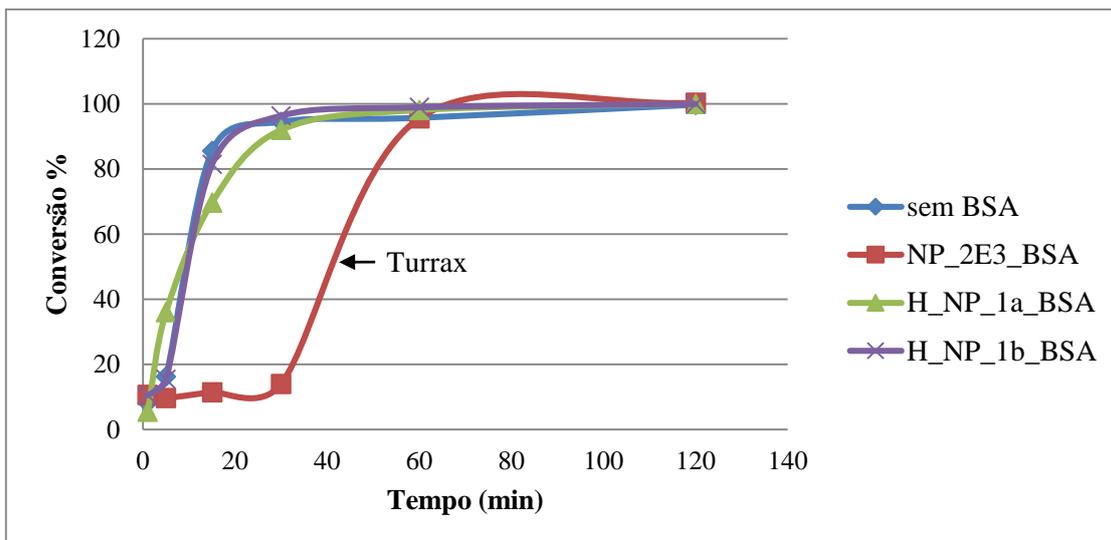


Figura 55 - Conversão de monômero das amostras produzidas com BSA e sem BSA para comparação.

4.6.4 Massa Molar das NPPs produzidos com BSA

O estudo foi complementado com a análise de massas molares por meio do GPC. Observa-se na Tabela 38 e Figura 56 que as massas molares ponderais médias (Mw) foram um pouco menores e que as curvas apresentam um leve deslocamento para à esquerda, quando comparadas com as amostras produzidas sem BSA. Isso indica que pode ter ocorrido pequenas alterações nas propriedades mecânicas do polímero e que o deslocamento da curva corrobora ao aumento de diâmetro da partícula, como já explicado.

As massas molares numéricas médias (Mn) não apresentaram mudanças consideráveis, o que sugere que as propriedades osmóticas permaneceram as mesmas. Os índices de polidispersão indicaram que houve menor variância da distribuição na presença de BSA. Todos esses fatores indicam que os sais afetam o andamento das reações, possivelmente por conta da modificação das propriedades elétricas do meio e modificação das taxas de captura e dessorção de radicais pelas partículas.

Tabela 38 - Massas molares médias de NPPs produzidas com e sem BSA.

Amostra	d [nm]	Mn (Da)	Mw (Da)	PDI (Mw/Mn)
NP_2E3_BSA	167,6	3,17E+05	6,31E+05	1,989
H_NP_1a_BSA	153,7	2,83E+05	6,26E+05	2,207
H_NP_1b_BSA	142,1	2,98E+05	6,00E+05	2,012
Sem BSA	54,72	2,67E+05	7,88E+05	2,955

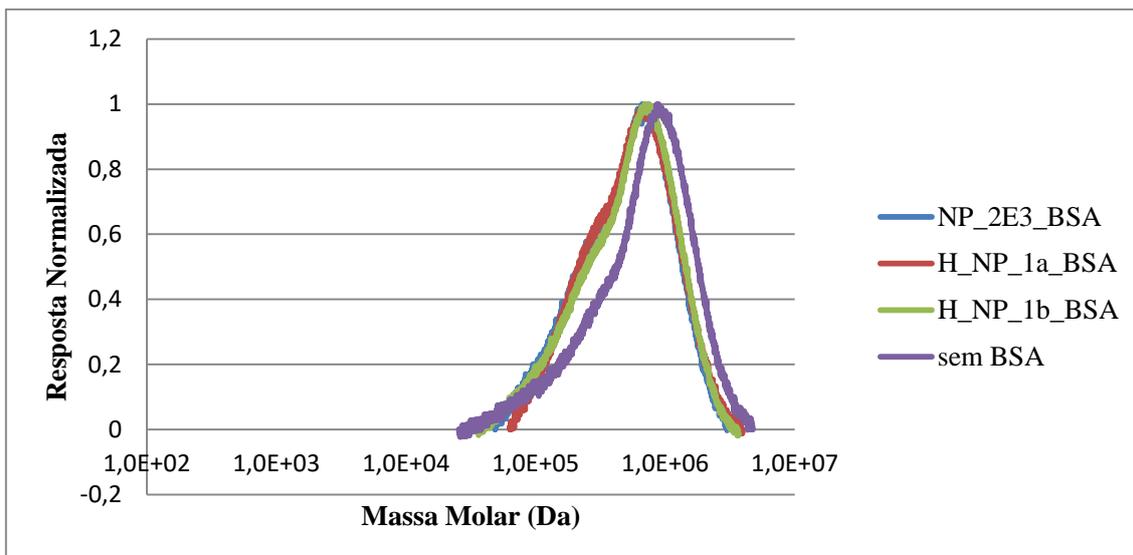


Figura 56 - Distribuição da massa molar normalizada por GPC das amostras com e sem BSA.

4.6.5 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica dos polímeros formados com a incorporação da BSA foram analisados por TGA e DSC.

A Figura 57 mostra o perfil de perda de massa com a temperatura para os polímeros produzidos com e sem BSA. Percebe-se que os perfis das amostras foram semelhantes, com perdas de massa similares presentes em ambas as amostras e originadas pela ruptura e cisão de cadeia polimérica, como já explanado no tópico 4.4.4. Entretanto, a queda referente à degradação térmica do polímero (terceiro estágio) da NP_2E3_BSA ocorreu um pouco antes, uma vez que a curva está mais deslocada para a esquerda. Esse fato sugere a presença do BSA nas NPPs. Ademais, pode ter ocorrido uma possível interação, embora pequena e apenas física, entre a cadeia polimérica e a BSA ou com os componentes da solução tampão da fase aquosa interna. Além disso, a redução das massas molares pode explicar os resultados obtidos.

Essa ligeira mudança pode ser confirmada na pequena diferença encontrada na temperatura de transição vítrea por DSC (Tabela 39), a qual ainda é condizente com a literatura, que situa-se em torno de 105 °C (MANO e MENDES, 2004). A curva de DSC da amostra NP_2E3_BSA está descrita no Apêndice B.

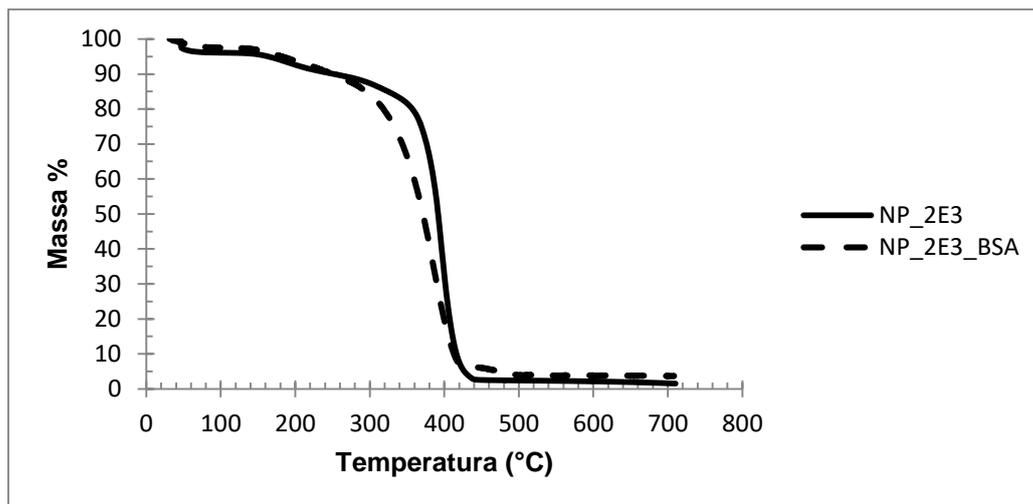


Figura 57 - TGA das amostras produzidas com e sem BSA.

Tabela 39 - Temperatura de transição vítrea das NPPs produzidas com e sem BSA.

Amostra	Tg (°C)
NP_2E3	107,92
NP_2E3_BSA	103,51

4.6.6 Eficiência de Encapsulamento e Liberação da BSA

Uma vez formada as nanopartículas poliméricas e executado o encapsulamento da biomolécula, é de grande importância determinar a quantidade real que ficou incorporada nas NPPs após o processo, bem como a capacidade de liberação controlada em meio fisiológico. De fato, Ye, Kim e Park (2010) relataram que micropartículas ideais deveriam apresentar alta eficiência de encapsulamento e capacidade de carregamento, além de perfil de liberação sustentada para alcançar desejáveis efeitos terapêuticos. Em vista disso, retrata-se a seguir o estudo da eficiência de encapsulamento da BSA nas NPPs e da liberação de BSA *in vitro*.

Para a quantificação da eficiência de encapsulamento (%EE) e da liberação (%Lib), os ensaios fizeram uso da metodologia de Bradford (1976). A absorbância foi convertida em concentração por intermédio de uma curva de calibração constituída por padrões obtidos com soluções de diferentes concentrações de BSA, assim como exemplificado por uma das curvas obtidas durante o teste (Figura 58). Por fim, a massa de proteína era quantificada por balanço de massa e eram calculadas a %EE e a %Lib.

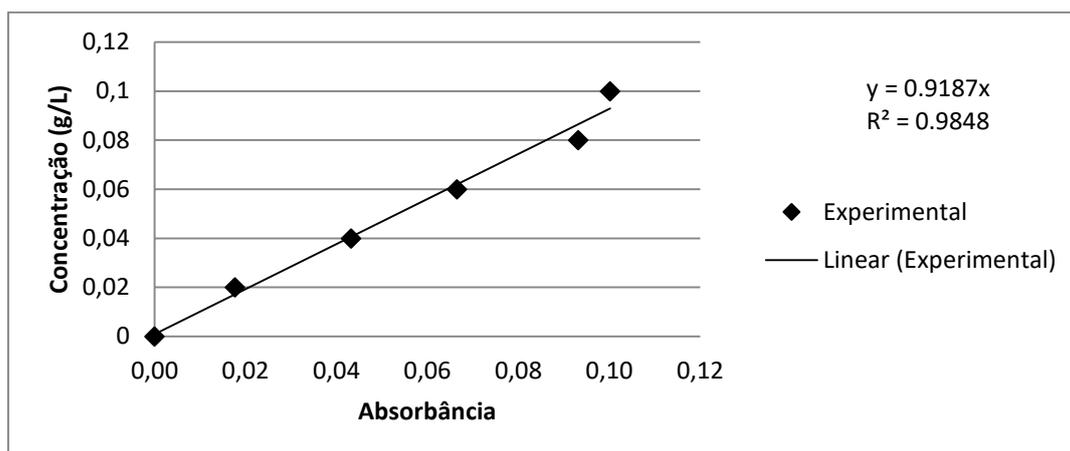


Figura 58 - Exemplo de umas das curvas de calibração do BSA por Bradford feita durante o ensaio de eficiência de encapsulamento e liberação.

Desse modo, a Tabela 40 mostra a eficiência de encapsulamento alcançada nos experimentos utilizando tanto o ultra-turrax quanto o homogeneizador de alta pressão. Nota-se que as amostras que fizeram uso do homogeneizador resultaram em altas eficiências de encapsulamento, o que não se observou quando foi utilizado o turrax, indicando que o encapsulamento da BSA dependeu também de efeitos hidrodinâmicos, e não apenas termodinâmicos. Nesse caso, o homogeneizador resultou em melhor desempenho.

Tabela 40 - Porcentagem de Eficiência de Encapsulamento da BSA nas NPPs.

Amostra	Meio de Mistura	%EE
NP_2E3_BSA	Turrax	63,66 ± 2,38
H_NP_1a_BSA	Homogeneizador	93,67 ± 4,74
H_NP_1b_BSA	Homogeneizador	87,81 ± 5,25

Os resultados foram condizentes com os relatos de Wischke e Borchert (2006), em que a eficiência de encapsulamento de uma BSA modificada com um fluoróforo foi maior nas amostras emulsificadas pelo homogeneizador de alta pressão do que pelo ultra-turrax, $94,5 \pm 3,0$ contra $78,7 \pm 5,0$, respectivamente. Os autores justificam esse resultado à diferente localização do BSA quando mudado o meio de mistura. Ao utilizarem o ultra-turrax, as micrografias confocal a laser indicaram claramente que a BSA se encontrava perto da superfície das NPPs. Em contrapartida, as proteínas estavam totalmente dispersas nas cavidades do interior das nanopartículas para o homogeneizador. Conseqüentemente, a BSA tinha maior facilidade de se liberar quando

localizado próximo à superfície, diminuindo a eficiência de encapsulamento ao usar o turrax.

Além disso, a perda de proteínas durante a preparação das micropartículas pode ser atribuída a dois principais fatores: ruptura mecânica das micropartículas durante a homogeneização; e difusão resultante do gradiente de concentração, que pode ser controlada mudando parâmetros como a carga da proteína, adição de excipientes, razão entre as fases, método de emulsificação, pressão osmótica, taxa de polimerização, entre outros (YE, KIM e PARK, 2010). Neste caso, o turrax pode ter proporcionado maior ruptura mecânica e, por isso, o ensaio resultou em menor eficiência de encapsulamento. Por consequência, a parcela da proteína que escapou das NPPs pode ter interagido com o iniciador ou outro componente durante a polimerização, causando o atraso na cinética de conversão, como retratado na seção 4.6.3.

Com relação à taxa de liberação da BSA, foram tiradas alíquotas nos tempos 24 e 48 h após colocar o látex em meio tamponado de PBS a 37 °C. Assim foram calculadas as porcentagens de liberação de BSA das amostras, conforme mostrada na Tabela 41. Percebe-se que a liberação do BSA foi baixa para todas as amostras e para os dois tempos medidos, sendo menores que 10% até para o tempo de 48 h.

Tabela 41 - Porcentagem de Liberação da BSA.

Amostra	Meio de Mistura	Tempo [h]	%EE
NP_2E3_BSA	Turrax	24	2,327 ± 0,522
		48	7,364 ± 2,946
H_NP_1a_BSA	Homogeneizador	24	3,644 ± 1,737
		48	5,426 ± 0,923
H_NP_1b_BSA	Homogeneizador	24	1,543 ± 0,687
		48	3,664 ± 0,851

Esse fato está relacionado principalmente a dois fatores. O primeiro é devido à própria proteína modelo, pois a BSA é uma molécula grande, de peso molecular em torno de 66000 Da. Outras proteínas ou mesmo fármacos hidrossolúveis, como a lisozima e a insulina, possuem massas molares bem menores, entre 5000 a 20000 Da. Assim sendo, a BSA detém maior dificuldade para se difundir pela matriz polimérica que constitui as partículas até atingir a superfície para ser liberada. O segundo motivo consiste no polímero usado, PMMA. Por se tratar de um polímero sintético e de baixa biodegradabilidade, ele não se degrada facilmente em meio fisiológico e, portanto, a

liberação se dá majoritariamente por difusão da BSA por entre as cavidades formadas nas NPPs, ao contrário de polímeros biodegradáveis, que podem liberar também por degradação e erosão. Portanto, a liberação pode ter ocorrido apenas das proteínas mais próximas à superfície das NPPs.

A não-biodegradabilidade pode consistir em um ponto positivo quando se deseja que as nanopartículas circulem por longos períodos de tempo no sangue; em outras palavras, quando se almeja obter uma liberação mais controlada e sustentada (HOLZAPFEL *et al.*, 2005). Além disso, evita-se um alto *burst* inicial de liberação, isto é, uma liberação imediata do encapsulado. Um alto *burst* inicial acarreta em uma redução da vida útil efetiva do dispositivo de administração do fármaco, diminuindo sua eficácia tanto em termos terapêuticos como econômicos. Se for excessivamente elevado, o *burst* pode resultar em níveis de drogas próximos ou superiores aos níveis tóxicos (ZHENG, 2009).

A respeito disso, os dados mostram que as taxas de liberação de BSA são sustentadas, aumentando com o tempo de ensaio em todos os casos. Análises mais detalhadas devem ser realizadas por tempos maiores para identificar com maior precisão os perfis de liberação.

4.6.7 Encapsulamento do Corante Azul nas NPPs

Essa análise foi feita como tentativa de observar a estrutura interna das nanopartículas poliméricas. Para isso, a amostra NP_2E3 foi replicada; porém, neste momento foi encapsulado um corante comercial azul no lugar do BSA, com a finalidade de verificar o contraste de pigmentação entre a nanopartícula e o corante. Espera-se uma estrutura do tipo casca-núcleo; isto é, um núcleo formado pela fase aquosa interna e uma casca composta pela matriz polimérica de PMMA.

A Figura 59 apresenta o látex formado quando foi encapsulado o corante azul (amostra NP_2E3_CorA). A textura líquida do produto foi similar ao referente branco (NP_2E3), porém com uma coloração azul intensa, como esperado.

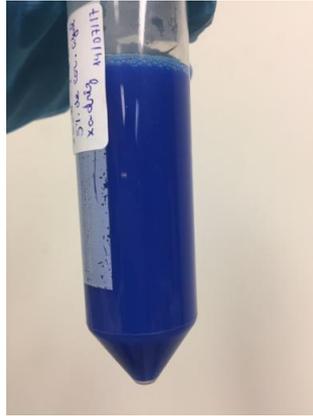


Figura 59 - Látex formado com corante azul encapsulado (amostra NP_2E3_CorA).

Na Figura 60 são mostradas as micrografias do branco (NP_2E3) e da NP_2E3_CorA. Observa-se claramente a existência de gotas maiores, com gotas do corante azul ou aglomerados aprisionados em uma fina camada, que supostamente seria a matriz polimérica (Figuras 60.c) e d)), o que não se verifica na amostra sem o encapsulado (Figuras 60.a) e b)). Isso pode ser um indício da formação casca-núcleo e confirmação da eficácia do procedimento de dupla emulsão seguida de polimerização, porém seriam necessários outros testes, como a microscopia eletrônica de transmissão, para melhor visualização em escala nanométrica.

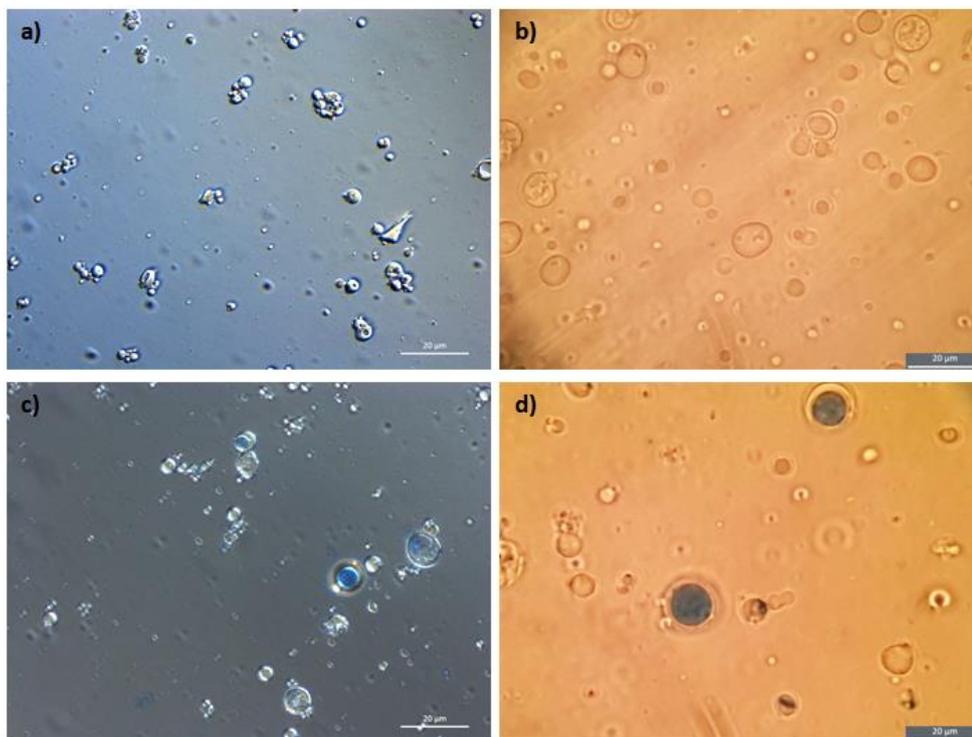


Figura 60 - Micrografias óptica das NPPs preparadas a) e b) sem e c) e d) com corante azul encapsulado. A diferença entre as colunas da direita e esquerda é decorrente das condições de luz transmitida e dos efeitos de edição.

Capítulo V

Conclusão e Sugestões

5.1 CONCLUSÃO

O presente trabalho abrangeu a obtenção um sistema de emulsão dupla A/O/A estável para manipulação, adequado à polimerização em miniemulsão do monômero metacrilato de metila (MMA) e a formação das nanopartículas do polímero, visando ao encapsulamento de fármacos hidrossolúveis. Desse modo, a etapa inicial envolveu o planejamento experimental para estudo de estabilidade da primeira emulsão (A/O), comparando a atuação do MMA com a dos óleos diesel e heptano. Os resultados pareceram indicar que os aspectos mecânicos controlam a estabilidade das dispersões em meio mais hidrofóbico e baixa viscosidade (diesel e heptano), e que os aspectos químicos de composição afetam mais as dispersões em meio mais hidrofílico (MMA).

A análise estatística revelou que a instabilidade das emulsões contendo MMA é inversamente proporcional à carga de surfactante presente. Além disso, foi possível selecionar formulações que permitiram a obtenção de emulsões com estabilidade adequada quando o polímero PMMA foi adicionado ao MMA, proporcionando aumento da viscosidade da fase oleosa.

Com relação aos testes para a produção de emulsões duplas, utilizou-se o monômero MMA como componente majoritário na fase oleosa e diferentes surfactantes na fase aquosa externa. Foram realizadas análises de estabilidade cinética e térmica, de morfologia por microscopia óptica e eletrônica de varredura, tamanho de partícula e massa molar, com a finalidade de encontrar uma formulação adequada para posterior polimerização em miniemulsão. A amostra contendo o surfactante lauril sulfato de sódio foi aquela que apresentou as melhores propriedades para formação e uso do látex polimérico. Com tal formulação, a reação de polimerização alcançou conversão máxima nos primeiros 20 minutos e um látex com tamanho de partícula em torno de 55 nm, massa molar de 8×10^5 Da e temperatura de transição vítrea (T_g) de 108 °C.

Em seguida, foram estudadas metodologias de emulsificação e polimerização utilizando o homogeneizador de alta pressão como meio emulsificante, a fim de

viabilizar o processo em escala industrial. Os resultados de morfologia, estabilidade, cinética, tamanho de partícula e massa molar mostraram que as propriedades obtidas foram semelhantes ou até melhores que às alcançadas quando usado o ultra-turrax. Além disso, a amostra em que a dupla emulsão foi formada no homogeneizador apresentou menor tamanho de partícula, como era esperado; entretanto, a amostra produzida diretamente no reator também apresentou boas propriedades. Uma vez eliminado o estágio de emulsificação dupla no homogeneizador, pode-se obter significativas economias de tempo e de energia durante o processo.

A fim de investigar a incorporação de agentes hidrofílicos no sistema proposto, foi adicionada a proteína-modelo Albumina de soro bovino (BSA) à fase aquosa interna. A comparação das amostras preparadas com e sem a inserção da BSA foi auxiliada pelas análises de estabilidade de emulsão, cinética de reação, tamanho de partícula e massa molar. As partículas preparadas com a BSA apresentaram diâmetros relativamente maiores (na ordem de 150 nm), o que justifica a ligeira queda na massa molar ponderal encontrada. Em contrapartida, a cinética de conversão também alcançou valores próximos de 100% e a Tg foi igual a 103,51°C.

Quanto ao uso do ultra-turrax ou do homogeneizador de alta pressão na emulsificação, a cinética de polimerização e a eficiência de encapsulamento foram os parâmetros que permitiram observar diferenças mais significativas. Para o turrax, houve um atraso para iniciar a polimerização, indicando que pode ter ocorrido algum tipo de interação entre a fase aquosa interna e os componentes reacionais. Tal fato foi condizente com a porcentagem de encapsulamento obtida, em torno de 64% para o turrax, contra 90% para o uso do homogeneizador, sugerindo que a fase aquosa interna pode ter entrado em contato com a fase aquosa externa. Já a taxa de liberação para todos os casos foi muito pequena nos tempos medidos, decorrente em especial do alto peso molecular da proteína usada, o que dificulta sua passagem pelas cavidades da matriz polimérica, além da baixa biodegradabilidade inerente do próprio polímero, na qual torna a liberação mais lenta, devido apenas à difusão. A respeito disso, observou-se uma lenta e sustentada liberação de BSA das partículas, que incentivam o uso desses sistemas para aplicações de liberação controlada.

O resultado de microscopia da amostra contendo o corante azul mostrou a existência de gotas maiores, onde gotas do corante azul ou aglomerados estão

aprisionados em uma fina camada, supostamente formada pela matriz polimérica. Isso pode ser um indício da formação das estruturas casca-núcleo e confirmação da eficácia do procedimento de dupla emulsão seguida de polimerização.

Dessa maneira, as etapas fundamentais que compõem os objetivos do trabalho foram executadas de maneira satisfatória e o processo proposto (dupla emulsão A/O/A seguida da polimerização em miniemulsão) para encapsulamento de uma molécula hidrofílica mostrou-se eficaz e facilmente escalável, servindo como uma plataforma para outros fármacos hidrofílicos. Entretanto, é importante a implementação de outros estudos complementares para comprovar e aprimorar a metodologia aplicada, possibilitando o estudo e o emprego futuro deste procedimento para encapsulamento de diversos tipos de medicamentos proteicos e agentes hidrossolúveis em geral.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Há um longo caminho pela frente para que estas nanopartículas possam ser enfim utilizadas pela indústria farmacêutica. Para que isso aconteça, sugerem-se como possíveis trabalhos futuros a realização de testes tanto para a formulação, quanto para o processo e caracterização.

Primeiramente, sugere-se o estudo da formulação da emulsão primária com uma menor quantidade de Span 80, mas mantendo a adição do PMMA. De mesmo modo, seria interessante fazer um planejamento experimental alterando as condições de formação da dupla emulsão, como a mudança nas proporções das fases dispersa e contínua. Um planejamento experimental com as condições do homogeneizador, também pode ser relevante.

Com relação às nanopartículas geradas, outros testes de caracterizações poderiam ser considerados, como testes de microscopia eletrônica de transmissão, para confirmação da incorporação do ativo e formação da estrutura casca-núcleo.

Outra sugestão baseia-se em alterações induzidas pelo agente encapsulado. Em princípio, poderia ser possível abaixar a temperatura de reação para prevenir a não desnaturação das proteínas, mas sem prejudicar a polimerização. Devido ao alto preço de muitas proteínas e fármacos hidrofílicos, sugere-se o estudo com aumento da carga

de BSA, além da avaliação de citotoxicidade e da preservação da sua estrutura secundária após o procedimento de encapsulamento, como testes de dicroísmo circular. Por fim, podem ser realizadas de análises *in vivo*. Posteriormente, quando as condições já estiverem estabelecidas, recomendam-se pesquisas com fármacos comerciais, como a insulina, e também a análise da aplicação para diferentes vias administrativas.

Capítulo VI

Referências Bibliográficas

- ACOFARMA. “Ficha de Dados de Segurança - Span 80”. Acofarma Distribuição S.A., 2010.
- ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical Chemistry of Surfaces**. 6. ed. New York, NY: John Wiley & Sons, 1997.
- AKCELRUD, L. “Fundamentos da Ciência dos Polímeros”. Barueri, SP: Manoele, 2007.
- AMERICAS, I. “The HLB System: A Time-saving Guide to Emulsifier Selection” Wilmington ICI Americas Inc., , 1980.
- ANGUITA-ALONSO, P. et al. “RNAIII-inhibiting-peptide-loaded in vivo Polymethylmethacrylate prevents in vivo Staphylococcus aureus biofilm formation”. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, pp. 2594–6, 2007.
- ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. “Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review”. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, pp. 185–199, 2008.
- ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. “Polyreactions in miniemulsions”. **Progress in Polymer Science**, v. 27, pp. 689–757, 2002.
- ANVISA. “Adjuvantes Farmacotécnicos”. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/2006/especificas/adjuvantes.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2017.
- ARIAS, J. L.; REDDY, L. H.; COUVREUR, P. “Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine”. **Journal of Drug Targeting**, v. 17, n. 8, pp. 586–598, 2009.
- ARTEPEÇAS. “Homogeneizadores”. Disponível em: <www.artepecas.com.br>. Acesso em: 22 nov. 2017.
- ASUA, J. M. “Miniemulsion polymerization”. **Progress in Polymer Science**, v. 27, pp. 1283–1346, 2002.
- ASUA, J. M. “Emulsion polymerization: From fundamental mechanisms to process developments”. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, n. 5, pp. 1025–1041, 2004.
- BAI, Z. et al. “Spatial wettability patterning of glass microchips for water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsion preparation”. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 215, pp. 330–336, 2015.

- BALOGH, T.S., PEDRIALI, C.A., BABY, A.R., VELASCO, M.V.R., KANEKO, T.M., “Proteção à Radiação Ultravioleta: Recursos Disponíveis na Atualidade em Fotoproteção”, **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, pp. 732-742, 2011.
- BANGA, A. K.; CHIEN, Y. W. “Systemic delivery of therapeutic peptides and proteins”. **International Journal of Pharmacy**, v. 48, pp. 15–16, 1988.
- BETTENCOURT, A.; ALMEIDA, A. J. "Poly(methyl methacrylate) particulate carriers in drug delivery". **Journal of Microencapsulation**, v. 29. n. 4, pp. 353–367, 2012.
- BRADFORD, M. M. “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye binding”. **Analytical Biochemistry**, v. 72, pp. 248–254, 1976.
- CAMEO CHEMICALS. "Database of hazardous materials". Disponível em: <<https://cameochemicals.noaa.gov/chris/MMM.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2017.
- CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos polímeros**. 2 ed. São Paulo, SP: Artliber Editora, 2006.
- CAPEK, I. “On inverse miniemulsion polymerization of conventional water-soluble monomers”. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 156, pp. 35–61, 2010.
- CAYLA, A.; SALAÜN, F. “Microscopy as a tool to control predicted morphology and / or dispersion of a binary and ternary compounds in polymeric particles and fibre”. **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology (A. Méndez-Vilas, Ed.)**, n. 3, pp. 1283–1290, 2012.
- CELIA, C. et al. "Long term stability evaluation of prostacyclin released from biomedical device through turbiscan lab expert". **Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, pp. 391–399, 2015.
- CHEN, R. H.; CHEN, C. T. “Collision between immiscible drops with large surface tension difference: Diesel oil and water”. **Experiments in Fluids**, v. 41, n. 3, pp. 453–461, 2006.
- CONNROT, J. M. O. 2011, *Avaliação da Incorporação de Levofloxacina em Partículas de um Biomaterial Ortopédico para Tratamento da Osteomielite*. Relatório de Projecto, Fundação Amadeu Dias, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.
- DAUDT, R. et al. “A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de Cosméticos”. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, pp. 28–31, 2013.
- DE ALMEIDA, M. L., 2014, *Estabilidade de Emulsões de Água-em-Óleo na Presença de Campo Elétrico Externo*. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- DHANA LEKSHMI, U. M. et al. "In vitro characterization and in vivo toxicity study of

- repaglinide loaded poly (methyl methacrylate) nanoparticles". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, pp. 194–203, 2010.
- DYMOND, J. H. et al. "(p, ρ , T) of n-heptane, toluene, and oct-1-ene in the range 298 to 373 K and 0.1 to 400 MPa and representation by the Tait equation". **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 20, n. 5, pp. 603–614, 1988.
- DYMOND, J. H.; O/YE, H. A. "Viscosity of Selected Liquid n-Alkanes". **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 23, n. 1, pp. 41–53, 1994.
- FADISTA, A. F. S. 2011, *Insulinoterapia: vias e sistemas de administração alternativos*. Dissertação de M.Sc., Universidade do Algarve, Faro, Portugal.
- FAHNING, B. M.; LOBÃO, E. B. *Nanotecnologia aplicada a fármacos*. Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, Vitória, ES, BR, 2011.
- FERREIRA, E. S., 2009, *Interação da albumina de soro bovino (BSA) com substratos sintéticos*. Tese de D.Sc., Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- FICHEUX, M. F. et al. "Some Stability Criteria for Double Emulsions". **Langmuir**, v. 14, n. 10, pp. 2702–2706, 1998.
- FLORENCE, A. T.; WHITEHILL, D. "Some Features of Breakdown in Water-in-Oil-in-Water Multiple Emulsions". **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 79, n. 1, pp. 243–256, 1981.
- FLORY, P. J. "**Principles of Polymer Chemistry**". Ithaca, NY: Cornell University Press, 1953.
- FONSECA, A. C. et al. "Drug delivery systems for predictive medicine: polymers as tools for advanced applications". In *New Strategies to Advance Pre/Diabetes Care: Integrative Approach by PPPM, Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine*. v. 3, pp. 211–232, 2013a.
- FONSECA, L. B. et al. "Production of PMMA Nanoparticles Loaded with Praziquantel Through "In Situ" Miniemulsion Polymerization". **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 7, pp. 54–63, 2013b.
- FONSECA, L. B. 2012. *Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo praziquantel para o tratamento da esquistossomose*. Tese de D.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FORMULATION. "**Stability of Suspensions for Electronic Applications**", Application paper, 2009.
- FORMULATION. "**User Guide Turbiscan LAB, version 2.0**", 2013.
- FRANÇA, B. B. et al. "Stability and microwave demulsification of water in castor oil biodiesel emulsions". **Energy and Fuels**, v. 28, n. 2, pp. 1053–1058, 2014.
- GALKA, P.; KOWALONEK, J.; KACZMAREK, H. "Thermogravimetric analysis of thermal stability of poly(methyl methacrylate) films modified with

- photoinitiators”. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 2, pp. 1387–1394, 2014.
- GEZE, A. ET. AL. “Development of 5-iodo-2’-deoxyuridine milling process to reduce initial burst release from PLGA microparticles”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 178, n. 2, pp. 157–268, 1999.
- GLASSER, C. A. et al. “Development of a water-in-oil-in-water multiple emulsion system integrating biomimetic aqueous-core lipid nanodroplets for protein entity stabilization. Part II: process and product characterization”. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 9045, pp. 1–11, 2016.
- GOODWIN, J. W. “**Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers – An Introduction**”. England: John Wiley and Sons LTD, 2004.
- GRIFFIN, W. C. "Classification of surface active-agents by HLB". **Journal of Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, pp. 311–326, 1949.
- HAGE, E. J. “A história dos polímeros: aspectos históricos sobre o desenvolvimento da ciência e da tecnologia de polímeros”. **Polímeros**, v. 8, n. 2, 1998.
- HATTREM, M. N. et al. "Macro- vs. micromolecular stabilisation of W/O/W-emulsions". **Food Hydrocolloids**, v. 37, pp. 77–85, 2014.
- HERMOSILLA, L.; CARLES, M. “Nanomedicina: médicos microscópicos”. **Revista Científica Eletônica de Psicologia**, v. 6, n. 6, 2007.
- HOLZAPFEL, V. et al. “Preparation of Fluorescent Carboxyl and Amino Functionalized Polystyrene Particles by Miniemulsion Polymerization as Markers for Cells”. **Macromolecular Chemistry and Physics**, 2005.
- HUCK-IRIART, C.; CANDAL, R. J.; HERRERA, M. L. “Effect of processing conditions and composition on sodium caseinate emulsions stability”. **Procedia Food Science**, v. 1, pp. 116–122, 2011.
- HUNTER, R. L.; BENNETT, C. "Multiple emulsions and methods of preparation", 1997. Disponível em: <<https://patentimages.storage.googleapis.com/55/82/9a/9a064de4e46c4f/US5622649.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2017.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF diabetes atlas**. [s.l: s.n.] 2012.
- IQBAL, M. et al. "Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, n. 2, pp. 173–190, 2015.
- JOÃO, C. A. R. 2013, *Encapsulação e libertação controlada de fármacos*. Dissertação de M.Sc., Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal.
- KASHIWAGI, T., INABI, A., HAMINS, A. “Behavior of Primary Radicals During Thermal Degradation of Poly(methyl methacrylate)”. **Polymer Degradation and Stability**, v. 26, pp. 161-184, 1989.

- KIM, M. R.; CHEONG, I. W. "Stimuli-triggered Formation of Polymersomes from W/O/W Multiple Double Emulsion Droplets Containing Poly(styrene)-blockpoly(N-isopropylacrylamide-co-spironaphthoxazine methacryloyl)". **Langmuir**, v. 32, n. 36, pp. 9223–9228, 2016.
- KIM, B.; KIM, J.; SUH, K. "Poly (methyl methacrylate) Multihollow Particles by Water in Oil in Water Emulsion Polymerization". **Journal of Applied Polymer Science**, v. 76, pp. 38–44, 2000.
- KIM, J.-W. et al. "Multihollow polymer microcapsules by water-in-oil-in-water emulsion polymerization: morphological study and entrapment characteristics". **Colloid and Polymer Science**, v. 281, n. 2, pp. 157–163, 2003.
- KIM, J. W.; JOE, Y.G. SUH, K. D. "Poly (methyl methacrylate) hollow particles by water-in-oil-in-water emulsion polymerization". **Colloid Polym Sci**, v. 277, pp. 252–256, 1999.
- KOKAI, L. E. et al. "Protein bioactivity and polymer orientation is affected by stabilizer incorporation for double-walled microspheres". **Journal of Controlled Release**, v. 141, n. 2, pp. 168–176, 2010.
- KOWALSKA, M. "Physical Stability and the Droplet Distribution of Rice Oil – in - Water Emulsion". **Journal of Dispersion Science and Technology**, 2015.
- KREUTER, J. "Nanoparticles". In: SWARBRICK, J. .; BOYLAN, J. C.; EDS. (Eds.). . **Encyclopedia of Pharmaceutical technology**. 10. ed. New York, NY: Marcel Dekker, pp. 165–190, 1994.
- LAMPRECHT, A. et al. "Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion ultrasonication technique". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, pp. 177–182, 2000.
- LANDFESTER, K. "Synthesis of colloidal particles in miniemulsions". **Annu. Rev. Mater. Res.**, v. 36, pp. 231–279, 2006.
- LENSEN, D.; VRIEZEMA, D. M.; HEST, J. C. M. VAN. "Polymeric microcapsules for synthetic applications". **Macromol. Biosci**, v. 8, pp. 991–1005, 2008.
- LINDMAN, B. . et al. "**Surfactants am Polymers in Aqueous Solution**". 2 ed. England: John Wiley and Sons LTD, 2000.
- LIU, W.; YANG, X. L.; WINSTON HO, W. S. "Preparation of uniform-sized multiple emulsions and micro/nano particulates for drug delivery by membrane emulsification". **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 1, pp. 75–93, 2011.
- LOPEZ, A. et al. "Miniemulsification of Monomer-Resin Hybrid Systems". **Ind. Eng. Res**, v. 47, pp. 6289–6297, 2008.
- LORCA, B. S. S. 2012, *Desenvolvimento de Formulação Fotoprotetora Contendo Nanopartículas Poliméricas com Filtro Solar*. Dissertação de M.Sc., PEQ/Coppe/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- LORCA, B. S. S. et al. "Preparation of PMMA nanoparticles loaded with

- benzophenone-3 through miniemulsion polymerization". **Macromol. Symp**, v. 319, pp. 246-250, 2012.
- MAGRINI, A. et al. "**Impactos ambientais causados pelos plásticos: uma discussão abrangente sobre os mitos e os dados científicos**". 2. ed. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2012.
- MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução à Polímeros**. 2 ed. rev. ed. São Paulo: EDITORA EDGARD BLUCHER, 2004.
- MARQUEZ, A. L. ; PALAZOLO, G. G. ; WAGNER, J. R. "Water in oil (w/o) and double (w/o/w) emulsions prepared with spans: microstructure, stability, and rheology". **Colloid Polym. Sci**, v. 285, pp. 1119–1128, 2007.
- MARTINS, M. G., 2017, *Encapsulamento de Nanopartículas Magnéticas em Polímeros Acrílicos e Avaliação de Hipertermia para Potencial Tratamento de Câncer*, Dissertação de M.Sc., PEQ/Coppe/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- MEDEIROS, G. R. 2013, *Modelagem Matemática da Liberação de Compostos Hidrofílicos Incorporados por Dupla Emulsão em Micropartículas de PLGA*. Dissertação de M.Sc., UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.
- MELO, C. K. 2015. *Modelagem e Monitoramento da Polimerização em Miniemulsão do Metacrilato De Metila*. Tese de D.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- MENDES, A. N. et al. "Preparation and Cytotoxicity of Poly(Methyl Methacrylate) Nanoparticles for Drug Encapsulation". **Macromolecular Symposia**, v. 319, pp. 34–40, 2012.
- MENGUAL, O. et al. "Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: The TURBISCAN MA 1000". **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1–2, pp. 111–123, 1999.
- MILLER, C. M. 1994. *Particle Formation and Growth During Styrene Oil-in- Water Miniemulsion Polymerization*. Tese de D.Sc., Lehigh University, Bethlehem, PA, EUA.
- MORAIS, J. M. et al. "W/O/W Multiple Emulsions Obtained by One-Step Emulsification Method and Evaluation of the Involved Variables". **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 29, pp. 63–69, 2008.
- MORRAL-RUÍZ, G. et al. "Multifunctional polyurethane-urea nanoparticles to target and arrest inflamed vascular environment: A potential tool for cancer therapy and diagnosis". **Journal of Controlled Release**, v. 171, n. 2, pp. 163–171, 2013.
- MUN, S. et al. "Preparation and Characterization of Water/Oil/Water Emulsions Stabilized by Polyglycerol Polyricinoleate and Whey Protein Isolate". **Journal of Food Science**, v. 75, n. 2, 2010.
- MYERS, D. **Surfaces, interfaces, and colloids: Principles and Applications**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.
- NORDSTIERNA, L. et al. "Molecular release from painted surfaces: free and

- encapsulated biocides”. **Prog. Org. Coat**, v. 69, pp. 45–48, 2010.
- ODIAN, G. “**Principles of Polymerization**”. 4 ed. New Jersey, USA: John Wiley & Sons., 2004.
- OLEJNIK, A.; SCHROEDER, G.; NOWAK, I. “The tetrapeptide N-acetyl-Pro-Pro-Tyr-Leu in skin care formulations - Physicochemical and release studies”. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 492, n. 1–2, pp. 161–168, 2015.
- OLIVEIRA; M. P. 2010. *Síntese de novos estabilizantes poliméricos do tipo poli(álcool vinílico-co-neo decanoato de vinila) para utilização na copolimerização em miniemulsão do acetato de vinila (VAc) com o neo-nonanoato de vinila (VEOVA-9)*. Tese de D.Sc., USP, Lorena, SP, Brasil.
- OLIVEIRA, M. A. M.; NELE, M.; PINTO, J. C. “Polimerização RAFT em miniemulsão”. **Polímeros**, v. 23, n. 6, pp. 784–797, 2013.
- ORÉFICE, J.; CUNHA, A. "Aplicações farmacêuticas de polímeros". **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, pp. 51-64, 2010.
- PAIVA, T.; MELO, P. Jr.; PINTO, J. C. "Comparative analysis of sunscreen nanoencapsulation process". **Macromol. Symp**, v. 368, pp. 60-69, 2016.
- PAL, R. "Rheology of simple and multiple emulsions". **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 1, pp. 41–60, 2011.
- PANDEY, R.; KHULLER, G. K. “Oral nanoparticle-based antituberculosis drug delivery to the brain in an experimental model”. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 6, pp. 1146–1152, 2006.
- PASUT, G.; VERONESE, F. M. “Polymer–drug conjugation, recent achievements and general strategies”. **Progress in Polymer Science**, v. 32, pp. 933–961, 2007.
- PAVEL, F. M. "Microemulsion Polymerization". **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 25, n. 1, pp. 1–16, 2004.
- PAYS, K. et al. "Double emulsions: how does release occur?". **Journal of Controlled Release**, v. 79, n. 1–3, pp. 193–205, 2002.
- PEIXOTO, A. C. B. et al. "Use of hidrofilic monomers to avoid secondary particle nucleation in miniemulsion polymerizations of methyl methacrylate". **Journal of Research Updates in Polymer Science**, v. 5, pp. 60-71, 2016.
- PEIXOTO, A. C. B. 2013. *Funcionalização de Nanopartículas Poliméricas para Liberação de Medicamentos Sítio-Dirigida*. Dissertação de M.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PEREIRA, L. J. B.; GARCIA-ROJAS, E. E. “Emulsões múltiplas: formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos Multiple emulsions: formation and application in microencapsulation of bioactive components”. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 45, n. 1, pp. 155–162, 2015.
- PINTO, M. C. C. 2013. *Influência de Variáveis Operacionais na Morfologia de Suportes Enzimáticos Preparados por Polimerização em Suspensão-Emulsão*.

Dissertação de M.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- RAO, J. P.; GECKELER, K. E. "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters". **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 7, pp. 887–913, 2011.
- ROLO, L. I. et al. "Surface tension of heptane, decane, hexadecane, eicosane, and some of their binary mixtures". **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 47, n. 6, pp. 1442–1445, 2002.
- ROMIO, A. P. 2011. *Encapsulação de Nanopartículas de Níquel Obtidas a partir da Técnica de Polimerização em Miniemulsão Direta e Inversa*. Tese de D.Sc., UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.
- ROSCA, I. D.; WATARI, F.; UO, M. "Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation". **Journal of Controlled Release**, v. 99, pp. 271–280, 2004.
- SAHIN, S.; SAWALHA, H.; SCHROËN, K. "High throughput production of double emulsions using packed bed premix emulsification". **Food Research International**, v. 66, pp. 78–85, 2014.
- SALAÜN, F.; VROMAN, I.; AUBRY, C. "Preparation of double layered shell microparticles containing an acid dye by a melt dispersion-coacervation technique". **Powder Technology**, v. 192, n. 3, pp. 375–383, 2009.
- SALOMÃO, B. R., 2016. *Preparação de nanopartículas de poli(metacrilato de metila) carregadas com filtros solares por processo mediado por membrana de vidro (SPG)*, Dissertação de M.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SAMER, C. J.; SCHORK, F. J. "The Role of High Shear in Continuous Miniemulsion Polymerization". **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, n. 5, pp. 1801–1807, 1999.
- SCHAFFAZICK, S. et al. "Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos". **Química Nova**, v. 25, n. 5, pp. 726 – 737, 2003.
- SCHMIDTS, T. et al. "Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions". **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 338, n. 1, pp. 184–192, 2009.
- SCHMIDTS, T. et al. "Multiple W/O/W emulsions-Using the required HLB for emulsifier evaluation". **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 372, n. 1–3, pp. 48–54, 2010.
- SCHRAMM, L. "Emulsions, foams and suspensions". Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
- SCHUCH, A.; LEAL, L. G.; SCHUCHMANN, H. P. "Production of W/O/W double emulsions. Part I: Visual observation of deformation and breakup of double emulsion drops and coalescence of the inner droplets". **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2013.
- SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. "Análises de Dados Experimentais I: Fundamentos

- de Estatística e Estimação de Parâmetros**". Rio de Janeiro, RJ: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2007.
- SEIFRIZ, W. "Studies in Emulsions. III-V". **J. Phys. Chem.**, v. 29, n. 6, pp. 738–749, 1924.
- SHI, M. et al. "Double walled POE / PLGA microspheres : encapsulation of water-soluble and water-insoluble proteins and their release properties". **Journal of Controlled Release**, v. 89, pp. 167–177, 2003.
- SHLOMO, M.; ALEXANDER, K. **Encyclopedia of Surface and Colloid Science**. 2. ed. [s.l.] Taylor & Francis, 2007.
- SILVA, A. S.; TAVARES, M. T.; AGUIAR-RICARDO, A. "Sustainable strategies for nano-in-micro particle engineering for pulmonary delivery". **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 11, 2014.
- SILVA, C. et al. "Administração oral de peptídeos e proteínas: I. Estratégias gerais para da biodisponibilidade oral". **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, pp. 125–140, 2002.
- SILVA, C. et al. "Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação". **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, pp. 1–20, 2003.
- SINTOV, A. C.; LEVY, H. V.; BOTNER, S. "Systemic delivery of insulin via the nasal route using a new microemulsion system: In vitro and in vivo studies". **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 2, pp. 168–176, 2010.
- STEWART, M.; ARNOLD, K. **"Emulsions and Oil Treatment Equipment"**. 1 ed. Burlington: Elsevier, 2009.
- TAMNAK, S. et al. "Food Hydrocolloids Encapsulation properties , release behavior and physicochemical characteristics of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsion stabilized with pectin e pea protein isolate conjugate and Tween 80". **Food hydrocolloids**, v. 61, pp. 599–608, 2016.
- TAO, S. L.; LUBELEY, M. W.; DESAI, T. A. "Bioadhesive poly(methyl methacrylate) microdevices for controlled drug delivery". **Journal Control Release**, v. 88, pp. 215–228, 2003.
- TATAR, B. C.; SUMNU, G.; SAHIN, S. **Rheology of Emulsions. In: Advances in Food Rheology and Its Applications**. [s.l.] Elsevier, pp. 437–457, 2017.
- TELLES, F. F. G. 2013. *Produção de Micropartículas para Liberação Controlada de Insulina*. Dissertação de M.Sc., PEQ/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- THIES, C. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. New York, NY: J. I. Kroschwitz, Wiley, 2005.
- TIAN, H.; TANG, Z.; ZHUANG, X.; CHEN, X.; JING, X.. "Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application". **Progress in Polymer Science**, v. 37, pp. 237-280, 2012.

- TIARKS, F.; LANDFESTER, K.; ANTONIETTI, M. "Preparation of Polymeric Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization". **Langmuir**, v. 17, pp. 908–918, 2001.
- TROJER, M. et al. "Encapsulation of actives for sustained releas". **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 15, n. 41, pp. 17727–41, 2013.
- UCHEGBU, I.; SCHATZLEIN, A. "**Polymers in drug delivery**". Boca Raton: CRC Press, 2006.
- UGELSTAD, J.; EL-AASSER, M. S.; VANDEERHOFF, J. W. "Emulsion polymerization - initiation of polymerization in monomer droplets". **Journal of Polymer Science Part C - Polymer Letters**, v. 11, pp. 503–513, 1973.
- VRIGNAUD, S.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. "Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles". **Biomaterials**, v. 32, n. 33, pp. 8593–8604, 2011a.
- VRIGNAUD, S.; BENOIT, J.; SAULNIER, P. "Biomaterials Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles". **Biomaterials**, v. 32, n. 33, pp. 8593–8604, 2011b.
- WANG, F.; WU, J.; LIU, Z. "Surface tensions of mixtures of diesel oil or gasoline and dimethoxymethane, dimethyl carbonate, or ethanol". **Energy and Fuels**, v. 20, n. 6, pp. 2471–2474, 2006.
- WANG, W.-T. et al. "One-step microfluidic production of gas-in-water-in-oil multi-cores double emulsions". **Chemical Engineering Journal**, p. 412–418, mar. 2014.
- WISCHKE, C.; BORCHERT, H.-H. "Influence of the primary emulsification procedure on the characteristics of small protein-loaded PLGA microparticles for antigen delivery". **Journal of microencapsulation**, v. 23, n. 4, p. 435–448, 2006.
- WIŚNIEWSKA, M. "Influences of polyacrylic acid adsorption and temperature on the alumina suspension stability". **Powder Technology**, v. 198, n. 2, p. 258–266, 2010.
- XIAO, C. DA; SHEN, X. C.; TAO, L. "Modified emulsion solvent evaporation method for fabricating core-shell microspheres". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 452, n. 1–2, p. 227–232, 2013.
- YE, M.; KIM, S.; PARK, K. "Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles". **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 2, p. 241–260, 2010.
- YILDIRIM, M.; SUMNU, G.; SAHIN, S. "The effects of emulsifier type, phase ratio, and homogenization methods on stability of the double emulsion". **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 38, n. 6, p. 807–814, 2017.
- YUKSEL, N. et al. "Investigation of triacetin effect on indomethacin release from poly(methyl methacrylate) microspheres: Evaluation of interactions using FT-IR and NMR spectroscopies". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p. 102–109, 2011.

- Zhang, Y. et al. " Impact of electrolytes on double emulsion systems (W/O/W) stabilized by an amphiphilic block copolymer". **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 368-374, 2014.
- ZHENG, W. "A water-in-oil-in-oil-in-water (W/O/O/W) method for producing drug-releasing double-walled microspheres". **International Journal of Pharmaceutics**, v. 374, p. 90-95, 2009.
- ZHU, K. J. et al. "Preparation and characterization of hCG-loaded polylactide or poly(lactide-co-glycolide) microspheres using a modified water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion solvent evaporation technique". **Journal of Microencapsulation**, v. 18, n. 2, p. 247–260, 2001.
- ZHU, Q. et al. "Impact of the release rate of magnesium ions in multiple emulsions (water-in-oil-in-water) containing BSA on the resulting physical properties and microstructure of soy protein gel". **Food Chemistry**, v. 220, p. 452–459, 2017.
- ZHU, Y. et al. "Influence of surfactants on the parameters of polylactide nanocapsules containing insulin". **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 8, n. 4, p. 353–358, 2005.

APÊNDICE A

A seguir, são apresentadas as demais curvas qualitativas da estabilidade de emulsões do planejamento experimental.

Diesel

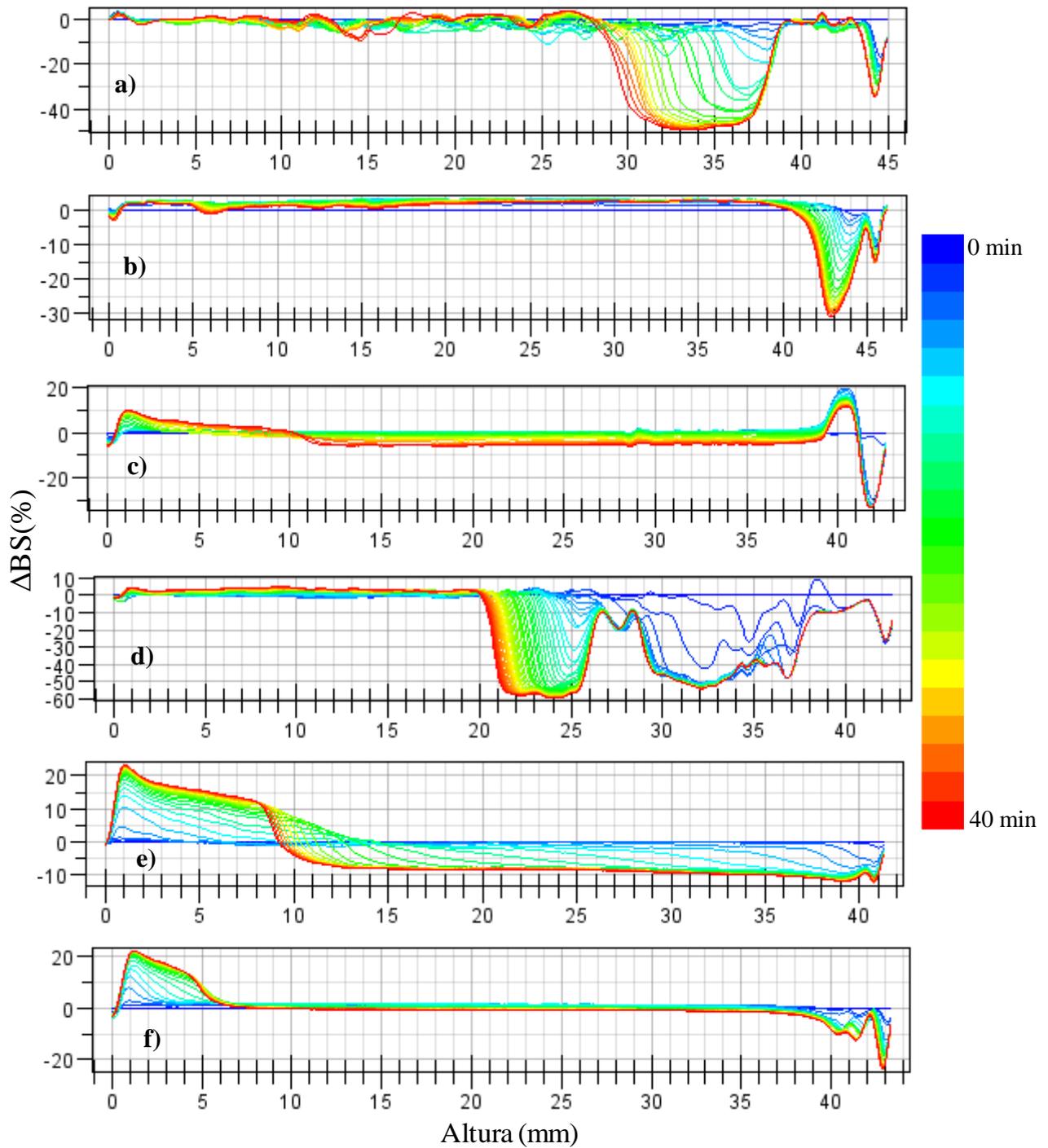


Figura A.1 - Perfis qualitativos de estabilidade para emulsão de água em óleo diesel para amostras do planejamento experimental: a) N_01; b) N_02; c) N_03; d) N_05; e) N_07; f) N_08.

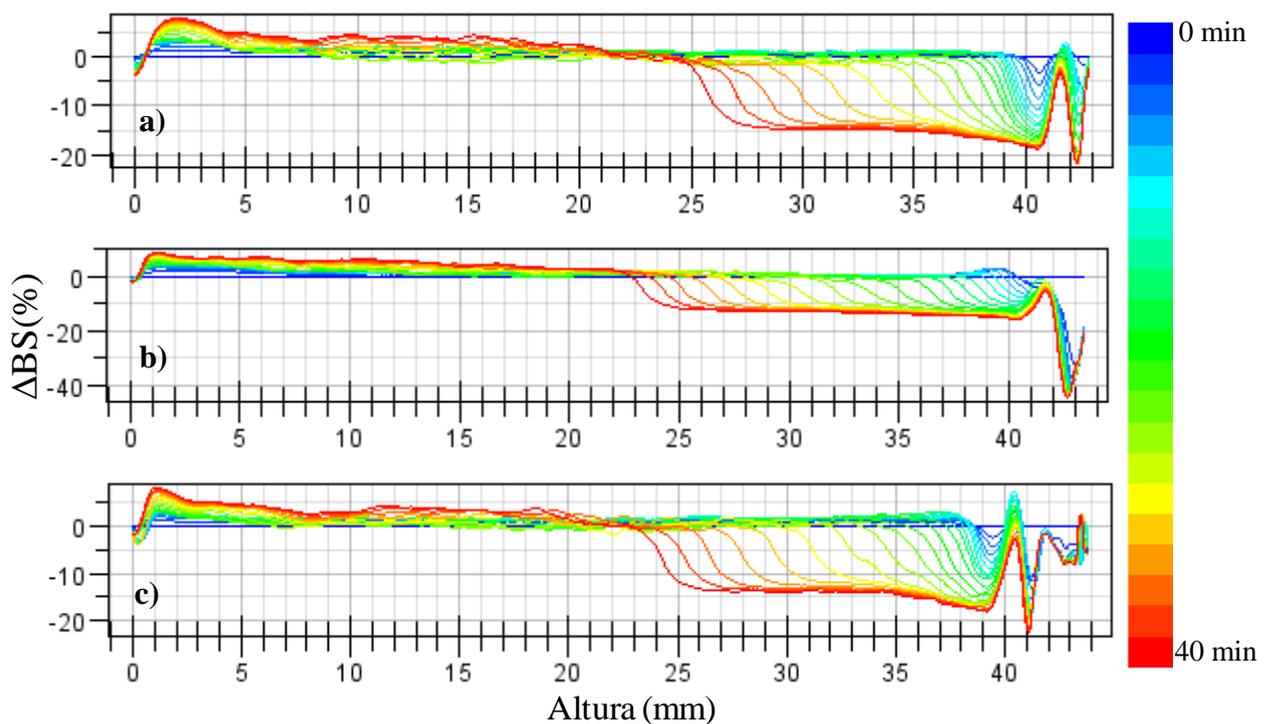


Figura A.2 - Perfis qualitativos de estabilidade para emulsões de água em óleo diesel para amostras do ponto central do planejamento experimental: a) N_09; b) N_10; c) N_11.

Heptano

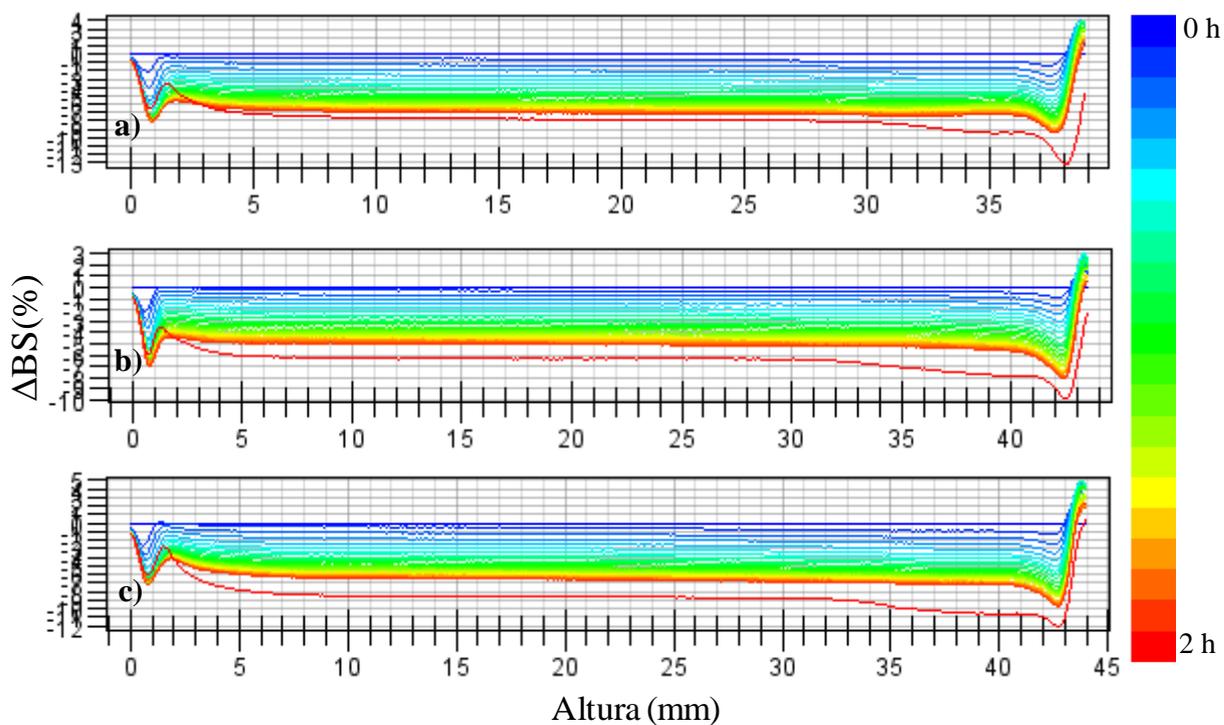


Figura A.3 -- Perfis qualitativos de estabilidade para emulsões de água em heptano para amostras do ponto central do planejamento experimental: a) N_09; b) N_10; c) N_11.

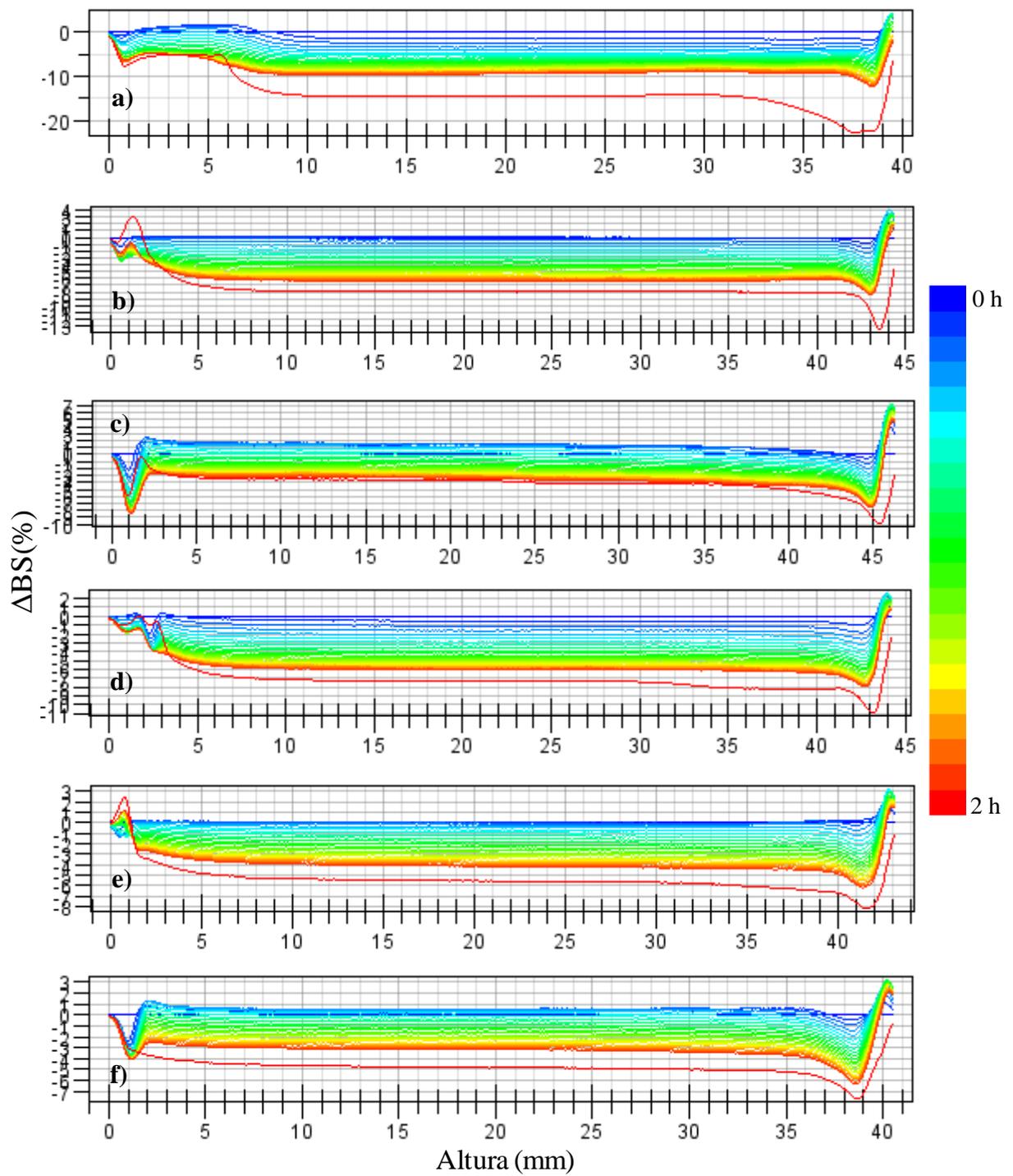


Figura A.4 - Perfis qualitativos de estabilidade para emulsões de água em heptano para amostras do planejamento experimental: a) N_01; b) N_03; c) N_04; d) N_06; e) N_07; f) N_08.

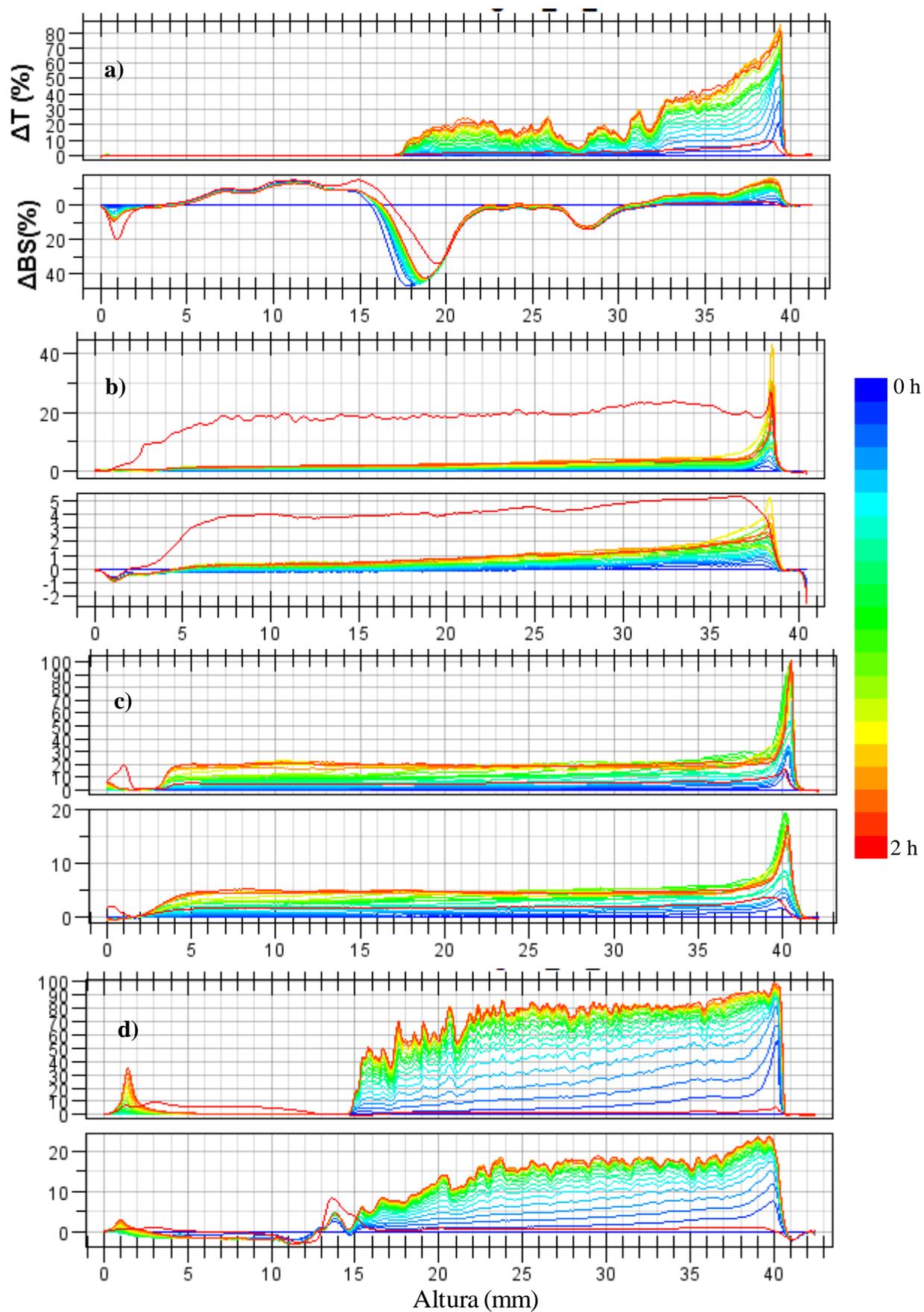


Figura A.5 - Perfis qualitativos de estabilidade para emulsões de água em MMA para amostras do planejamento experimental: a) N_01; b) N_04; c) N_05; d) N_06.

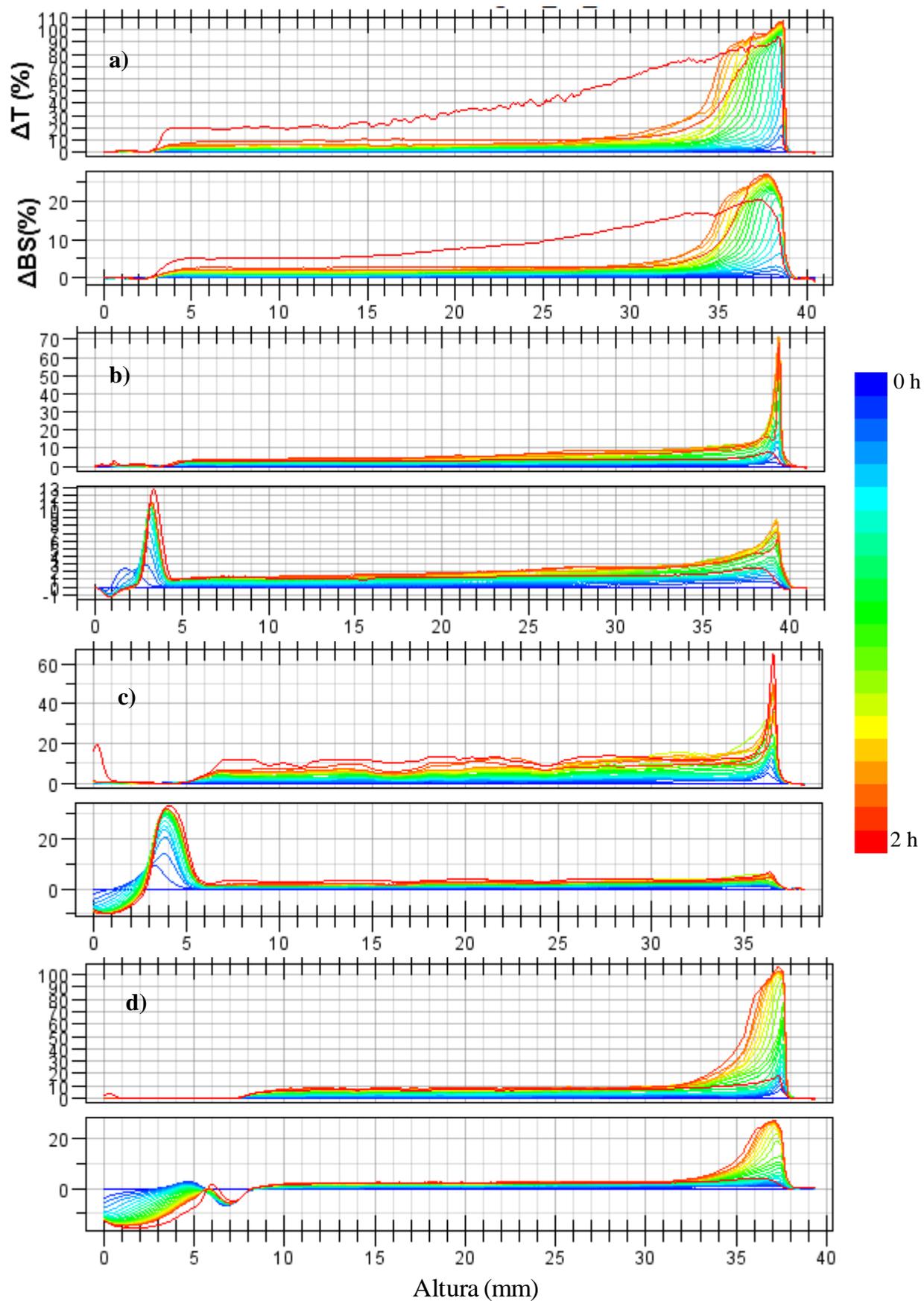


Figura A.6 - Perfil qualitativo de estabilidade para emulsão de água em MMA para amostras do planejamento experimental: a) N_07; b) N_09; c) N_10; d) N_11.

APÊNDICE B

A seguir, estão apresentados os resultados de TGA e DSC do PVA, bem como as análises de DSC das partículas formadas.

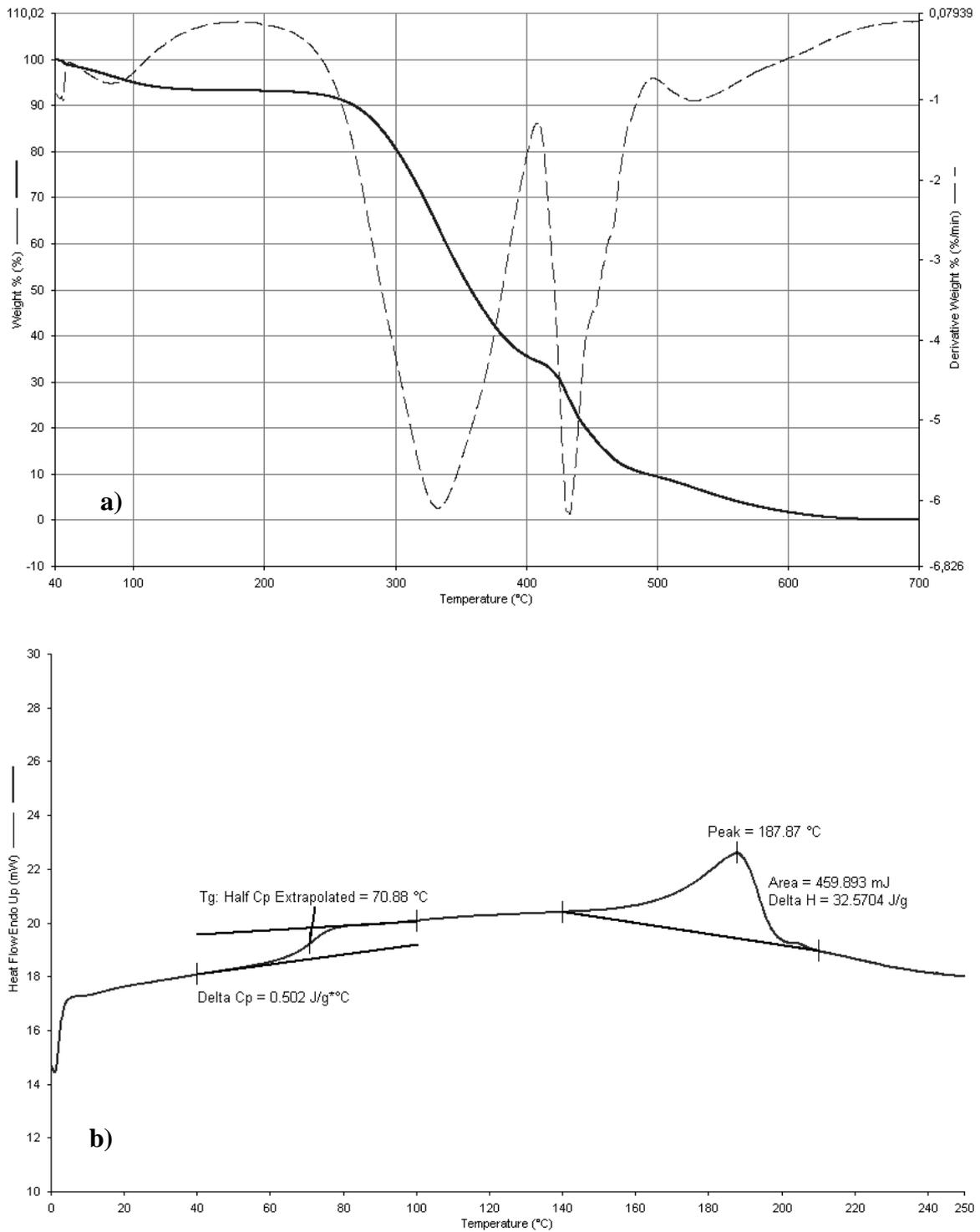


Figura B.1 - Análises de a) TGA e b) DSC do PVA.

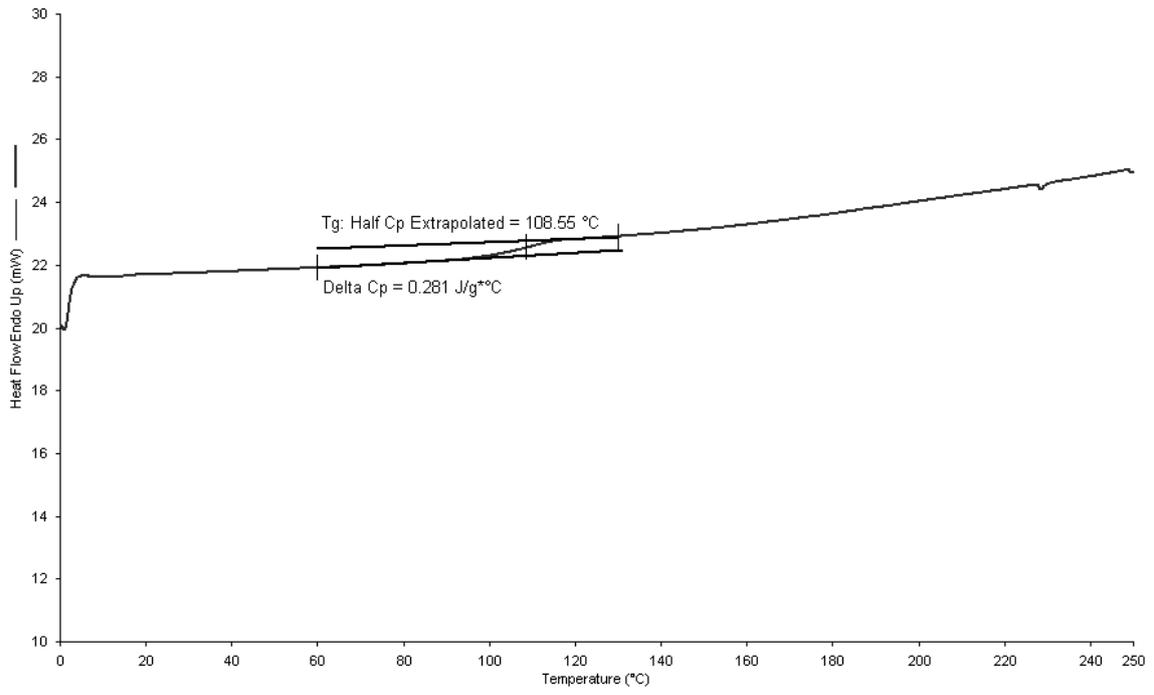


Figura B.2 - DSC da amostra NP_2E2.

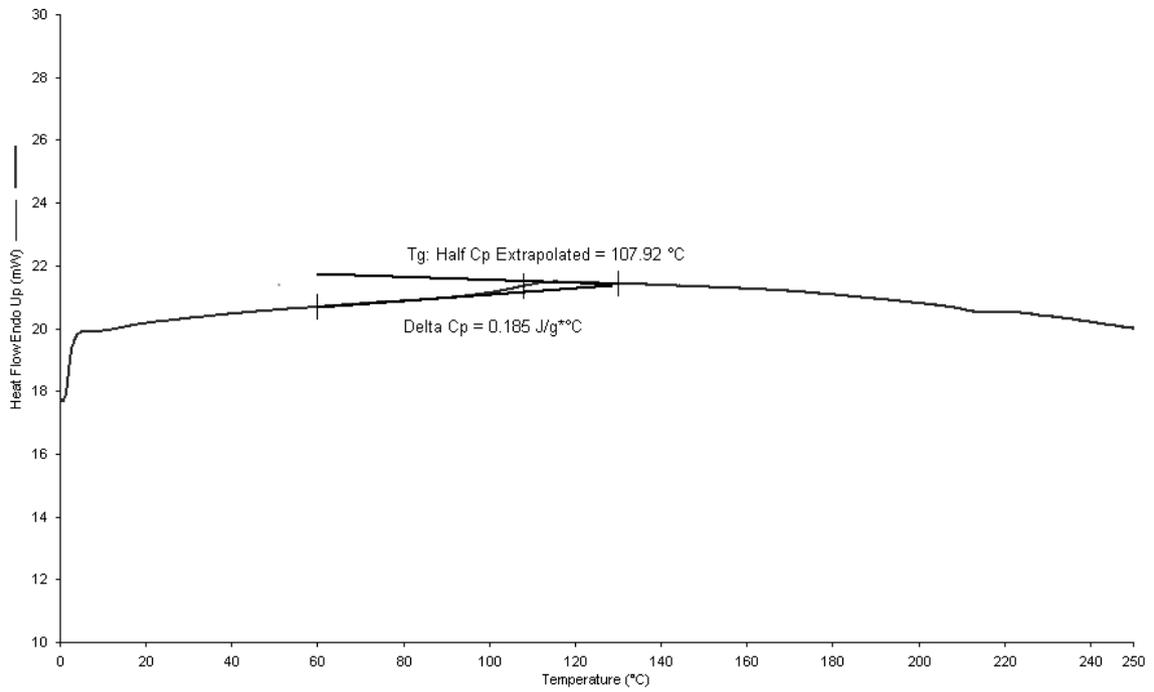


Figura B.3 - DSC da amostra NP_2E3.

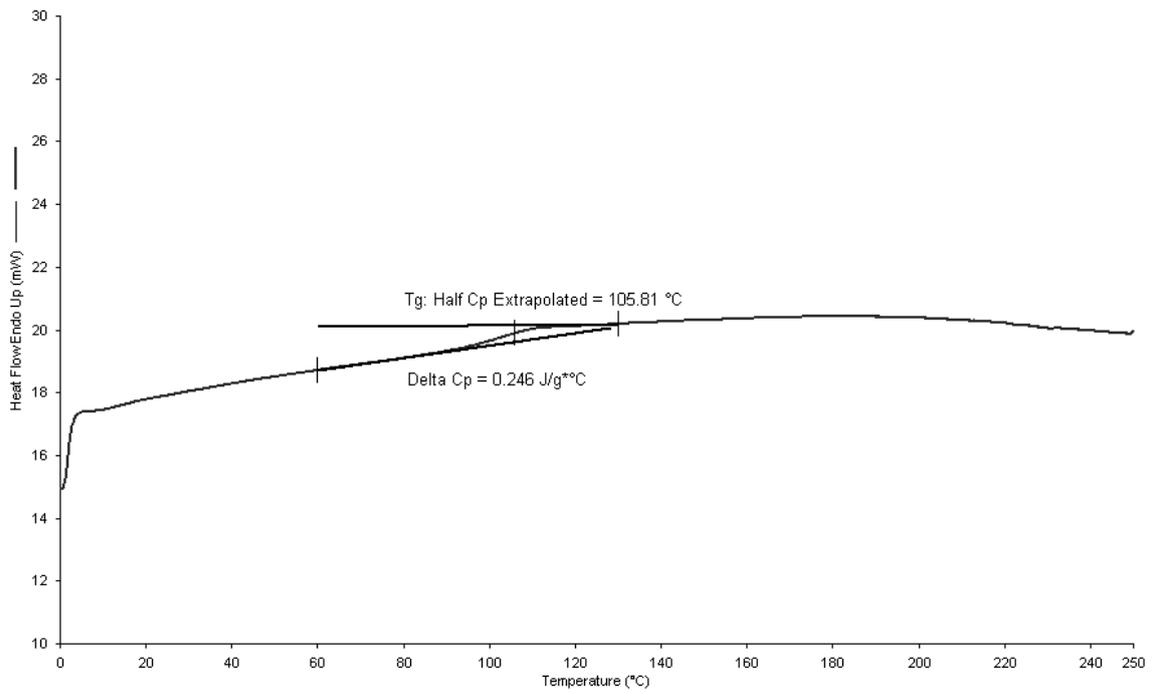


Figura B.4 - DSC da amostra NP_2E4.

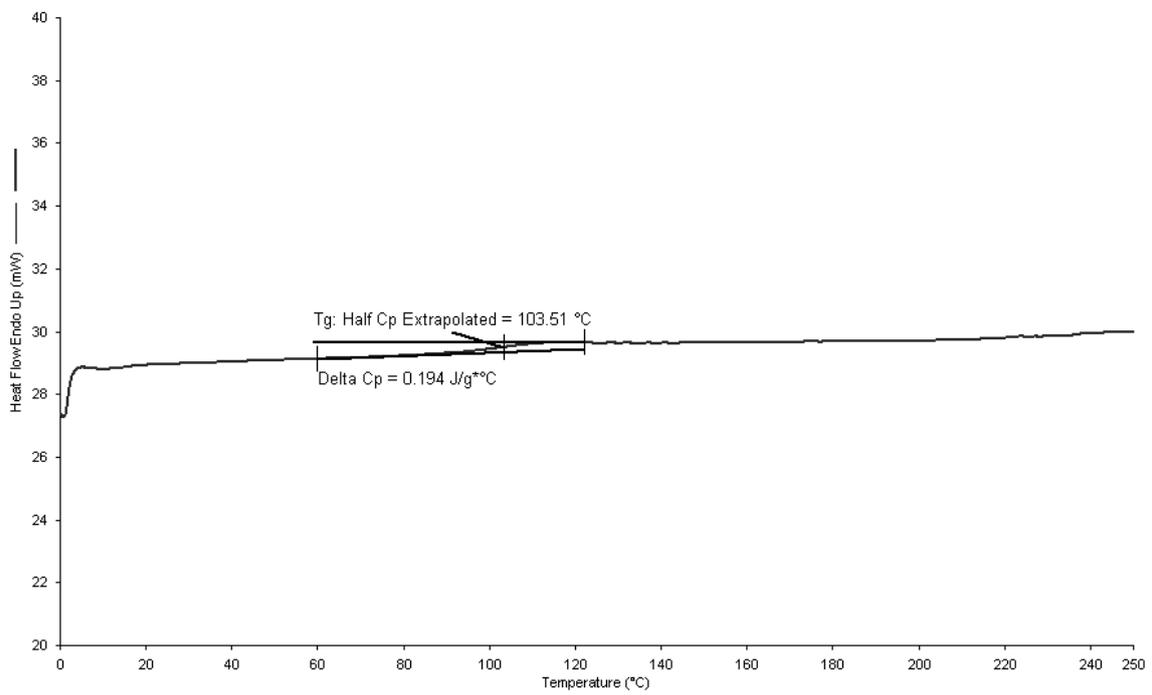


Figura B.5 - DSC da amostra NP_2E3_BSA.