



PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS E NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS EM SISTEMAS HETEROGÊNEOS DE
POLIMERIZAÇÃO

Marco Antonio Monteiro de Oliveira

Tese de Doutorado 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 Doutor em Engenharia Química.

Orientador(es): José Carlos Costa da Silva Pinto

Márcio Nele de Souza

Rio de Janeiro
Outubro de 2011

PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS E NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS EM SISTEMAS HETEROGÊNEOS DE
POLIMERIZAÇÃO

Marco Antonio Monteiro de Oliveira

TESE 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 DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

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

Prof. Márcio Nele de Souza, D.Sc.

Prof. Marcos Antonio da Silva Costa, D.Sc.

Prof. Luis Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima, D.Sc.

Prof. Fernando Gomes de Souza Junior, D.Sc.

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

OUTUBRO DE 2011

Oliveira, Marco Antonio Monteiro de

Produção de micropartículas e nanopartículas poliméricas para aplicações biomédicas em sistemas heterogêneos de polimerização/ Marco Antonio Monteiro de Oliveira. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011.

IX, p.: 277 : il.; 29,7 cm.

Orientador: José Carlos Costa da Silva Pinto

Márcio Nele de Souza

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2011.

Referências Bibliográficas: p. 212-237.

1. Polimerização. 2. Sistemas heterogêneos. 3. Polímeros para aplicações biomédicas. I. Pinto, José Carlos Costa da Silva *et al.*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Aos meus pais, Júlio e Margarete.

Agradecimentos

Aos Mestres, familiares, amigos e companheiros, muito obrigado por todo incentivo, ensinamentos e desafios.

O autor também agradece,

Ao Professor Márcio Nele de Souza, pelo convite para ingressar no Doutorado, pela amizade e pela confiança em mim depositada.

Ao Professor José Carlos Costa da Silva Pinto, pela amizade, confiança e dedicação.

Aos Professores Per B. Zetterlund e Thomas P. Davis, pela orientação e amizade, assim como ao Dr. Cyrille Boyer, ao Dr. Michael Raymond Whittaker e todos os membros do *Centre for Advanced Macromolecular Design* da *University of New South Wales* (Sydney, Australia).

Ao Prof. Antonio Gilberto Ferreira e ao laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pelas análises de RMN apresentadas no Capítulo 2.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelas bolsas de estudo e financiamento dos projetos de pesquisa.

Ao corpo docente, pesquisadores e funcionários do Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ao Governo Brasileiro, pelas atuais políticas de incentivo a pesquisa e desenvolvimento.

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

PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS E NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS EM SISTEMAS HETEROGÊNEOS DE
POLIMERIZAÇÃO

Marco Antonio Monteiro de Oliveira

Outubro/2011

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto
Márcio Nele de Souza

Programa: Engenharia Química

Neste trabalho foram estudados dois sistemas de polimerização em sistemas heterogêneos, visando à produção de polímeros para aplicações biomédicas. Em um primeiro momento, o objeto de estudo foi a produção de micropartículas poliméricas dopadas com fármacos para uso em procedimentos de embolização ou quimioembolização vascular. As micropartículas poliméricas foram sintetizadas com a incorporação *in situ* de fármacos durante a polimerização via radical livre em suspensão. Os resultados experimentais indicaram que o tipo de fármaco, a quantidade e sua estratégia de incorporação contribuem para significativas mudanças na morfologia das partículas e nas propriedades moleculares dos polímeros sintetizados. Em um segundo momento, o objeto de estudo foi a síntese de nanogéis biodegradáveis para aplicação em sistemas de liberação controlada de biomoléculas. Utilizando a técnica de polimerização RAFT em miniemulsão inversa, foi desenvolvida uma estratégia para sintetizar nanogéis biodegradáveis com arquitetura molecular bem definida e com características apropriadas para potencial aplicação como sistema de liberação de biomoléculas.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

PRODUCTION OF POLYMERIC MICROPARTICULES AND NANOPARTICULES
USING HETEROGENEOUS POLYMERIZATION SYSTEM FOR BIOMEDICAL
APPLICATION

Marco Antonio Monteiro de Oliveira

October/2011

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto
Márcio Nele de Souza

Department: Chemical Engineering

In this study we report the use of different polymerization systems to produce polymers to be used in biomedical applications. In a first moment, polymer microparticles containing drugs were produced for use as embolic or chemoembolic agents. The polymer microparticles were synthesized by suspension polymerization with *in situ* incorporation of drugs during polymerization reaction. Experimental results showed that the final properties of the obtained polymers depend on the type of drug, amount and strategy of drug incorporation. In a second moment, biodegradable hydrogel nanoparticles were synthesized for use as nanocarriers for bioactive molecules. In order to achieve this objective, an operation strategy was developed to synthesize biodegradable hydrogel nanoparticles *via* RAFT inverse miniemulsion polymerization with well-defined molecular architecture and characteristics that guarantee the potential application of the biodegradable hydrogel nanoparticles for the controlled release of bioactive molecules.

Sumário

Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1 Introdução	2
1.2 Objetivos da Tese	6
1.3 Estrutura da Tese	7
Capítulo 2	9
Síntese de micropartículas poliméricas com a incorporação <i>in situ</i> de fármacos via polimerização em suspensão – Parte 1	9
2.1 Introdução	10
2.1.1 A embolização vascular	10
2.1.2 Polimerização em suspensão	18
2.1.3 Partículas esféricas com morfologia do tipo <i>casca-núcleo</i> de PVA/PVAc	24
2.1.4 Incorporação de fármacos em polímeros	31
2.2 Objetivo e justificativa	36
2.3 Metodologia experimental	37
2.3.1 Materiais	37
2.3.2 Unidade Experimental	38
2.3.3 Métodos	39
2.3.4 Caracterização	41
2.4 Resultados & Discussão	46
2.4.1 Efeitos da incorporação <i>in situ</i> de amoxicilina nas reações de homopolimerização em suspensão do acetato de vinila	46
2.4.2 Efeitos da incorporação <i>in situ</i> de amoxicilina nas reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila.	55
2.5 Conclusões	73
Capítulo 3	75
Síntese de micropartículas poliméricas com a incorporação <i>in situ</i> de fármacos via polimerização em suspensão – Parte 2	75
3.1 Introdução	76
3.1.1 Cinética da polimerização em suspensão	76
3.1.2 Quimioembolização vascular	83
3.1.3 Fármacos potenciais e aplicações	85
3.2 Objetivo e justificativa	94
3.3 Metodologia experimental	95
3.3.1 Materiais	95
3.3.2 Unidade Experimental	96
3.3.3 Métodos	97
3.3.4 Caracterização	100
3.4 Resultados & Discussão	105
3.4.1 Efeitos da incorporação <i>in situ</i> de amoxicilina nas reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila – Parte 2	105
3.4.2 Efeitos da incorporação <i>in situ</i> de doxorrubicina nas reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila	130
3.5 Conclusões	141
Capítulo 4	143

Síntese de nanogel biodegradável para aplicações biotecnológicas através de polimerização RAFT em miniemulsão inversa	143
4.1 Introdução	144
4.1.1 Polimerização radical livre viva/controlada	144
4.1.2 Miniemulsão	154
4.1.3 Nano-hidrogéis	160
4.2 Objetivo e justificativa	162
4.3 Metodologia experimental	164
4.3.1 Materiais	164
4.3.2 Síntese do agente RAFT	165
4.3.3 Síntese do agente macro-RAFT	166
4.3.4 Síntese do agente reticulante biodegradável	167
4.3.5 Polimerização em miniemulsão	168
4.3.6 Caracterização	169
4.4 Resultados & Discussão	172
4.4.1 Síntese dos compostos orgânicos	172
4.4.2 Formação da miniemulsão	177
4.4.3 Polimerização em miniemulsão	181
4.5 Conclusões	208
Capítulo 5	209
Conclusões	209
Sugestões	210
Referências bibliográficas	212
Anexo	238
Teste de atividade farmacológica <i>in vitro</i>	238
Teste de liberação prolongada de fármacos	250
Curvas de DSC	254
Ressonância Magnética Nuclear	269

Capítulo 1

Introdução

Neste Capítulo é apresentada uma introdução do tema central dessa Tese de Doutorado, abordando alguns conceitos gerais que serão aprofundados posteriormente em seções mais específicas do trabalho. Além do texto introdutório, este Capítulo traz ainda o objetivo geral da Tese, bem como uma seção que detalha a forma em que o documento está estruturado.

1.1 Introdução

Polímeros são macromoléculas de alta massa molar, formadas usualmente por um grande número de moléculas pequenas que se *associam* por meio de ligações covalentes. Essas moléculas pequenas que se “*unem*” para dar origem ao polímero são chamadas de monômeros, enquanto a reação que “*une*” essas moléculas é conhecida como polimerização. [1] A transformação de um monômero em polímero pode ser genericamente representado pela Figura 1.1, onde o índice “*n*” representa o grau de polimerização do polímero, ou seja, o número de unidades (ou meros, derivados do monômero) que se repetem ao longo da cadeia do polímero. [2]

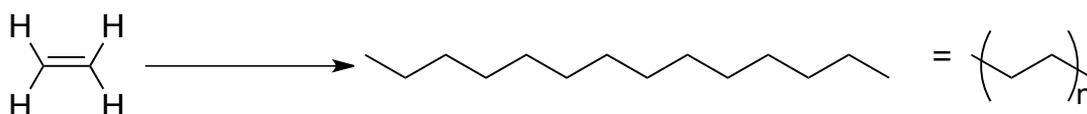


Figura 1.1 – Exemplo de polimerização; etileno.

Embora muitas classificações distintas possam ser propostas e já tenham sido usadas, dois tipos de classificação de polímeros são mais usuais. Um tipo de classificação se baseia na estrutura química dos monômeros e classifica os polímeros em polímero de adição ou polímeros de condensação. Um outro tipo de classificação leva em conta o mecanismo da reação de polimerização, que pode ser basicamente um mecanismo que ocorre em *etapas* ou então um mecanismo de reação em *cadeia*. [1-3] Polímeros de adição são normalmente produzidos por reações em cadeia, enquanto os polímeros de condensação são formados por polimerizações em etapas.

A classificação que leva em conta a estrutura molecular do monômero foi sugerida por *W. H. Carothers*¹ e diz que os polímeros de condensação são formados por dois ou mais monômeros polifuncionais que, ao reagirem entre si, formam a cadeia polimérica e frequentemente uma segunda molécula, que é um subproduto de baixa massa molar. Este tipo de reação é apresentada na Figura 1.2, que representa uma reação entre moléculas de diaminas e diácidos, formando uma poliamida e levando à eliminação de uma molécula de baixa massa molar (no caso, a água). [2, 3]

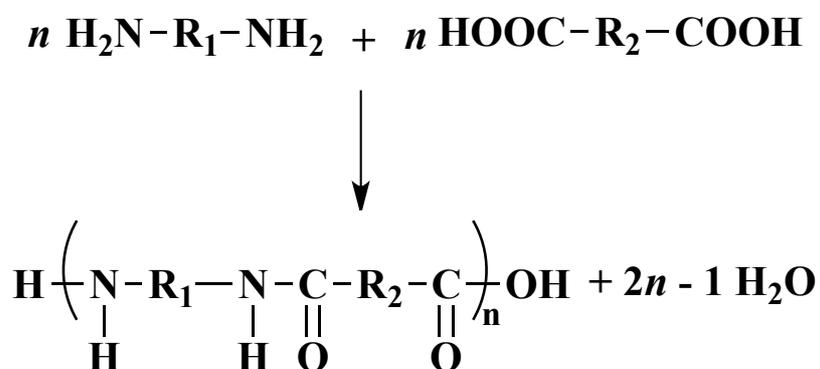


Figura 1.2 – Exemplo de reação de policondensação. [2]

Embora a classificação proposta por *Carothers* tenha sofrido algumas modificações ao longo do tempo, os polímeros obtidos por reações de adição podem ser bem representados pelos materiais formados por monômeros *vinílicos*², não ocorrendo a perda de moléculas de baixa massa molar durante a reação. Neste tipo de polímero, a unidade repetitiva da cadeia principal do polímero possui composição igual ao do monômero, conforme ilustrado anteriormente na Figura 1.1. [2] Nesse tipo de polimerização, a macromolécula cresce gradativamente, por intermédio de adição de unidades méricas individuais, com auxílio de uma espécie ativa (ou catalisador).

¹ Wallace Hume Carothers (1896-1937) – Contribuiu com muitos avanços para a ciência de polímeros. Foi nos laboratórios da DuPont Co. que a equipe de Carothers desenvolveu dois dos polímeros mais usados no século XX: o Nylon® e o Neoprene®.

² Moléculas que possuem dupla ligação carbono-carbono; o termo vinil se refere estritamente ao grupo CH₂=CH-. [4]

Independentemente do mecanismo responsável pela reação de polimerização, existem vários *sistemas* distintos que podem ser usados para conduzir essas reações. De forma genérica, os sistemas disponíveis para conduzir as reações de polimerização podem ser divididos em sistemas homogêneos e sistemas heterogêneos de polimerização.

Nos sistemas homogêneos de polimerização, todos os reagentes e produtos encontram-se solubilizados em uma única fase, sendo os sistemas de polimerização em solução e em massa os exemplos mais estudados. A grande vantagem do uso de sistemas homogêneos de polimerização diz respeito à obtenção de polímeros com alto grau de pureza. Já nos sistemas heterogêneos de polimerização, a presença de duas ou mais fases imiscíveis caracteriza o processo de polimerização. [5] A principal vantagem desses tipo de sistema de polimerização é a fácil recuperação do polímero ao final do processo e a alta taxa de troca de calor. Além disso, é possível obter polímeros com alta massa molar e na forma de partículas sólidas, com tamanhos que podem variar de 100 nm até 2,000 μm . [6]

Nos sistemas heterogêneos de polimerização, convencionalmente o monômero, de natureza hidrofóbica, é disperso em um solvente hidrofílico, geralmente a água. As duas fases imiscíveis são *misturadas*, empregando-se uma força de cisalhamento que promove a quebra da fase dispersa em pequenas *gotas* dispersas no diluente (fase contínua). Para garantir que a fase dispersa permaneça na forma de pequenas gotas durante todo o processo de polimerização, diversas estratégias podem ser adotadas, incluindo a utilização de componentes químicos, que atuam estabilizando a gota contra efeitos de coalescência, e estratégias operacionais fundamentalmente físicas, como a manutenção da agitação *vigorosa* do sistema. [6]

Quando o monômero utilizado apresenta uma natureza hidrofílica, para conduzir uma polimerização em um sistema heterogêneo faz-se necessário o uso de um solvente de natureza hidrofóbica. Neste cenário, diz-se que o processo de polimerização é inverso. Assim como o solvente, os demais componentes químicos utilizados na polimerização devem ser adaptados para interagir melhor com a natureza hidrofílica do monômero ou com a natureza do solvente hidrofóbico empregado. Entretanto, os mesmos conceitos fundamentais podem ser usados para gerar e, em muitos casos, explicar os fenômenos que ocorrem nas polimerizações em sistemas heterogêneos convencionais e inversos.

Os sistemas heterogêneos de polimerização mais estudados são as suspensões e *emulsões*. Embora sejam sistemas onde os monômeros estão dispersos em um diluente, essas técnicas de polimerização se diferenciam em diversos aspectos, principalmente no que diz respeito ao mecanismo de formação das gotas, ao tamanho das gotas geradas e à cinética/mecanismo de polimerização. [6] A depender das características particulares dos sistemas heterogêneos de polimerização, costuma-se escolher o sistema de polimerização de acordo com as características desejadas para o produto final.

Os polímeros naturais estão presentes nos seres vivos na forma de macromoléculas de DNA, proteínas, polissacarídeos, entre tantas outras. [7] Por terem sua síntese regulada por complexos mecanismos celulares e enzimáticos, os polímeros naturais, como o DNA, possuem estrutura estritamente bem definida. [8]

Com o advento da Química Contemporânea, inúmeros avanços foram alcançados no século XX no campo dos sistemas de polimerização, incluindo desde a identificação das macromoléculas [9, 10] até o desenvolvimento de inúmeras técnicas distintas de polimerização. [3] Essas técnicas mudaram a *vida moderna* como um todo, pois permitiram ao homem criar uma nova classe de materiais, que hoje são empregados

nos mais variados tipos de aplicações, incluindo desde a confecção de embalagens para alimentos [11] até dispositivos nanométricos usados para o tratamento de doenças. [12, 13]

Particularmente os polímeros vêm sendo cada vez mais utilizados em aplicações biomédicas nas últimas décadas. [14] A facilidade de obtenção desses materiais e a possibilidade de *sintetizar* um produto de acordo com a patologia e a necessidade do paciente são algumas das diversas vantagens dos polímeros sintéticos frente aos polímeros naturais e outros tipos de materiais. O desenvolvimento de novas *estratégias* de polimerização possibilita cada vez mais a síntese de novos polímeros para aplicações biomédicas que apresentem características bem definidas em relação a morfologia [15] ou a arquitetura molecular precisa do polímero. [16]

O desenvolvimento de novas técnicas médicas e o melhor entendimento de como ocorrem determinadas patologias, até mesmo a nível celular, faz crescer de forma continuada a necessidade do desenvolvimento de novos materiais, precisamente sintetizados para desempenhar papéis específicos no combate à patologias com efeitos colaterais mínimos ao paciente. Desta maneira, a pesquisa de novas *estratégias* de polimerização e o desenvolvimento de novos materiais poliméricos, para uso em aplicações biomédicas, certamente contribuirá de maneira positiva não apenas nas Ciências mas como na qualidade de vida da sociedade.

1.2 Objetivos da Tese

A presente Tese de Doutorado tem como objetivo principal utilizar sistemas heterogêneos de polimerização para a produção de novos materiais poliméricos, na

forma de micropartículas e nanopartículas, para serem usadas em aplicações biomédicas.

As micropartículas poliméricas são produzidas nesse trabalho com auxílio de reações de polimerização em suspensão. Essas reações são conduzidas por intermédio do mecanismo de polimerização via radicais livres, empregando técnicas já reportadas na literatura científica. O diferencial do presente trabalho é a produção das micropartículas com a incorporação *in situ* de fármacos durante as reações de polimerização, sendo avaliada a influência da adição de um fármaco sobre a qualidade final do polímero produzido.

As nanopartículas poliméricas são produzidas nesse trabalho com auxílio de reações de polimerização em miniemulsão inversa. Essas reações são conduzidas utilizando a técnica de polimerização RAFT (*Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*), que permite a síntese de polímeros com arquitetura molecular bem definida. O caráter inédito do presente trabalho está relacionado aos poucos trabalhos publicados na literatura científica acerca de reações de polimerização em miniemulsão inversa, utilizando a técnica de polimerização RAFT.

1.3 Estrutura da Tese

A parte textual desta Tese está organizada em cinco Capítulos, incluindo este primeiro Capítulo introdutório. Apresenta-se ainda uma seção que contém as referências bibliográficas e um Anexo que descreve algumas caracterizações, ambos localizados no final do documento.

Nos Capítulos 2 e 3 é descrita a obtenção de micropartículas poliméricas, para serem posteriormente utilizadas em aplicações biomédicas. As micropartículas são

obtidas com auxílio de reações de polimerização via radicais livres em suspensão, com a incorporação *in situ* de fármacos durante o processo de produção das partículas. No Capítulo 4 é descrito o desenvolvimento de uma estratégia para a produção de nanopartículas poliméricas por intermédio da polimerização em miniemulsão inversa, utilizando a técnica de polimerização RAFT. No Capítulo 5 são apresentadas as principais conclusões, observações e hipóteses, formuladas a partir dos resultados apresentados.

Os Capítulos 2, 3 e 4 desta Tese foram elaborados na forma de artigos científicos. Desta forma, estes Capítulos possuem seções individuais de introdução, descrição da parte experimental, apresentação de resultados e discussão, além das conclusões pertinentes, apresentadas ao final de cada Capítulo. Optou-se por esta organização para facilitar a compreensão do leitor. Excepcionalmente, optou-se no Capítulo 4 pela não tradução de alguns nomes de substâncias, técnicas, métodos, etc., originalmente escritos em *itálico* na língua inglesa e ainda sem tradução consensual para a língua portuguesa.

Seguindo as recomendações das normas de elaboração de Teses da COPPE/UFRJ, as referências bibliográficas estão organizadas de forma numerada, conforme citadas ao longo de todo documento. Desta forma, não há seções de referências individuais para cada Capítulo, mas apenas uma lista comum para todo o documento, localizada na seção final da Tese.

Capítulo 2

Síntese de micropartículas poliméricas com a incorporação *in situ* de fármacos via polimerização em suspensão – Parte 1

Neste capítulo, é apresentada uma investigação dos efeitos da incorporação *in situ* de um fármaco durante reações de polimerização via radicais livres em suspensão, para a produção de micropartículas poliméricas que apresentam uma morfologia do tipo *casca-núcleo* que são empregadas em procedimentos médicos de embolização vascular. Este estudo foi realizado utilizando a amoxicilina como fármaco modelo, em diferentes concentrações e usando diferentes estratégias de incorporação. Parte dos resultados descritos neste Capítulo foram apresentados na forma de trabalho completo no 10º Congresso Brasileiro de Polímeros (2009) [17] e também na forma de artigo na revista *Macromolecular Symposia* (2011). [15]

2.1 Introdução

2.1.1 A embolização vascular

Aplicada clinicamente desde meados de 1960 para corrigir diversos quadros clínicos, como sangramentos, aneurismas e malformações vasculares, a embolização é uma técnica radiológica que consiste na obstrução intencional de um vaso sanguíneo. [18, 19] Para alcançar este objetivo, um pequeno cateter angiográfico é introduzido dentro do sistema vascular e orientado até o local desejado, onde se faz a injeção de um material finamente dividido, que promove a oclusão física do vaso, levando à diminuição do fluxo sanguíneo na região e, conseqüentemente, à necrose do tecido por isquemia. [20] Além de aplicações já consagradas nos últimos 50 anos, atualmente a embolização vem sendo empregada com resultados satisfatórios para o tratamento de leiomioma uterino, malignidade hepática e malformações vasculares. [21] Como o procedimento de embolização possui inúmeras aplicações na área médica, a revisão que será feita focará apenas a utilização da técnica de embolização em miomas uterinos. Entretanto, as considerações aqui feitas podem, em muitos dos casos, servir de base para o uso da embolização no tratamento de outros tipos de patologias.

Os miomas uterinos, também conhecidos por leiomiomas ou fibromas, são tumores benignos difíceis de serem tratados e que frequentemente apresentam complicações, como hemorragias e aumento das dimensões do útero, causando dor e desconforto. Clinicamente, até meados de 1995, a principal indicação de tratamento para todas as mulheres que desejavam manter sua “fertilidade” era a miomectomia³. Desta forma, com o intuito de reduzir e até mesmo eliminar os sintomas do mioma uterino, RAVINA et al. [23] utilizaram a técnica de embolização da artéria uterina,

³ Procedimento cirúrgico usado na remoção de leiomiomas; preserva a fertilidade e o fluxo menstrual da paciente. [22]

obtendo grande sucesso. A partir deste estudo, a embolização da artéria uterina foi, e continua sendo, bastante estudada e indicada como tratamento alternativo para casos de miomatose sintomática. [19] A esquematização de um procedimento de embolização é ilustrado na Figura 2.1

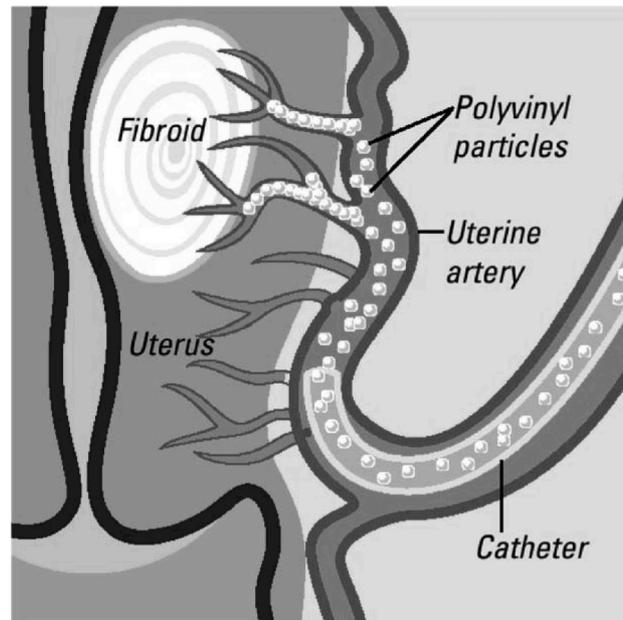


Figura 2.1 – Esquema de embolização de fibroma uterino utilizando partículas de PVA. [24]

Os fatores de risco associados aos tumores uterinos são principalmente relacionados à etnia e à idade. Mulheres negras possuem de duas a três vezes mais chances de desenvolverem esse tipo de tumor, quando comparadas a mulheres de outras etnias. As chances de desenvolver este tipo de anomalia celular diminuem também após a menopausa, sendo de 70 a 90% menores após esta etapa de vida. Redução similar é observada em mulheres que tiveram algum filho. Os miomas uterinos se manifestam por meio de distúrbios na menstruação e outros sintomas relacionados à pressão na região uterina, sendo que os sintomas dependem do tipo, tamanho e localização do tumor. Apesar disso, estima-se que metade das mulheres que apresentem algum tipo de fibroma não manifestem nenhum tipo de sintoma. [24]

O tratamento de tumores sempre requer a tomada de decisões importantes que afetam de alguma forma a saúde do paciente. No caso de tumores uterinos, BANU & MANYONDA [24] apontam ao menos três tipos de abordagens que ainda hoje são usadas para o tratamento dos miomas. A presença de fibromas pequenos e assintomáticos apresentam baixo risco carcinogênico e requerem apenas a observação. Embora o tratamento convencional à base de medicamentos não constitua a intervenção mais usada pelos médicos, o uso de hormônio e outras substâncias, como o ácido tranexâmico, deve ser adotado como tratamento de primeira escolha. A última escolha para o tratamento dos tumores uterinos é a intervenção cirúrgica, classicamente utilizada para este tipo de quadro clínico. A intervenção cirúrgica geralmente é feita com uma histerectomia⁴, que ocasiona a perda da fertilidade, ou da miomectomia, em que a fertilidade é preservada.

PELAGE et al. [26] utilizaram a embolização da artéria uterina para o tratamento de mulheres com leiomiomas, visando principalmente à diminuição de sintomas relacionados a anomalias menstruais. Usando partículas de poli(álcool vinílico) (PVA) na faixa de 150-300 µm, os médicos verificaram que a maioria das 80 pacientes tratadas apresentou grande melhora nos sintomas e diminuição significativa do tamanho dos miomas.

Com o objetivo de determinar a segurança e eficácia do uso da embolização da artéria uterina em pacientes com miomas uterinos, SPIES et al. [27] realizaram um longo estudo com 200 pacientes (entre 1997-1999). Neste estudo, todas as pacientes foram submetidas à embolização com partículas de PVA, com tamanho variando na faixa entre 500-710 µm. Com auxílio de um questionário usado para acompanhamento do trabalho, os pesquisadores verificaram que cerca de 93% das pacientes tratadas

⁴ *Cir.* Ablação (retirada) do útero, em extensão variável. [25]

ficaram satisfeitas com a melhora nos sintomas relacionados aos miomas, como a característica dor na região pélvica e o intenso sangramento menstrual. Desta maneira, os médicos concluíram que a embolização da artéria uterina pode ser considerado um procedimento seguro para o tratamento primário de leiomiomas, com poucas chances de gerar complicações e grande possibilidade de causar a satisfação das pacientes, por causa da melhora dos sintomas associados aos miomas.

Atualmente há um número considerável de publicações que reportam o sucesso clínico do procedimento de embolização da artéria uterina, que é da ordem de 86-100%. Até o ano de 2004, mais de 45.000 procedimentos já tinham sido realizados e apenas três casos de óbitos foram relatados. [24] Entretanto, embora hoje seja largamente empregada nos Estados Unidos e nos países da Europa Ocidental, a embolização da artéria uterina continua sendo um tratamento secundário e ainda sob avaliação, uma vez que a miomectomia permanece sendo o procedimento mais indicado para o tratamento de miomas uterinos, mesmo quando a paciente não deseja manter sua fertilidade. [28] Outro fator que coloca a embolização uterina como um tratamento de segunda escolha pelos médicos é o alto custo, associados ao material usado para promover a embolização. Este alto custo é relevante não apenas no Brasil, mas também em outros países da Europa e América do Norte. Em relação à histerectomia, o procedimento de embolização da artéria uterina já é indicado por alguns centros de excelência como uma técnica alternativa a este procedimento cirúrgico. [28]

Os procedimentos de embolização, de um modo geral, e mais especificamente o procedimento de embolização da artéria uterina, devem ser vistos sempre em função de três pontos fundamentais: a seleção da paciente, a técnica de embolização propriamente dita e os procedimentos pós-operatórios. Quanto à seleção da paciente, é sempre importante ressaltar que menos da metade das mulheres que apresentem algum tipo de

fibroma necessitam de um tratamento. Embora seja um procedimento seguro, o acompanhamento pós-operatório deve ser feito com os procedimentos de rotina, com o intuito de identificar possíveis complicações. [19]

Em relação aos aspectos técnicos, as duas variáveis de maior importância durante a embolização são a escolha do material embolizante e o ponto final da embolização. Embora uma série de materiais já tenha sido empregada como agentes embólicos, incluindo partículas, fluidos, balões e adesivos, [18] os três materiais mais usados atualmente como agentes embólicos são as microesferas calibradas, as esponjas hemostáticas e as partículas de PVA. [19]

O ponto final da embolização parece ser de grande importância para que o procedimento seja bem realizado, já que a injeção insuficiente de material embólico pode não atingir o resultado desejado e uma super-injeção de material pode desencadear intensa isquemia local, aumentando o risco de complicações. Ainda assim, sempre é desejável injetar a menor quantidade possível de partículas embolizantes, para que as chances de que migrações acidentais dessas partículas ocorram para outros locais, principalmente o ovário, sejam minimizadas. [19]

Como observado por PEIXOTO, [29] apesar do procedimento de embolização ser amplamente utilizado, muitos aspectos técnicos ainda não foram bem estabelecidos, como o ponto final mais adequado para o procedimento ou o agente embólico mais propício a ser utilizado, incluindo a faixa apropriada de tamanho. Segundo a autora, observa-se na literatura que cada médico utiliza o procedimento que considera mais indicado, de acordo com a situação clínica da paciente.

Os agentes embólicos

Um agente embólico ideal deve contemplar uma série de características que incluem: i) ser eficiente na oclusão vascular; ii) ser de fácil obtenção; iii) ser biocompatível; iv) passar facilmente pelo cateter; v) levar a uma embolização homogênea; vi) produzir uma resposta inflamatória; vii) não ser carcinogênico. [30] Algumas dessas características, como a facilidade de passar pelo cateter, está intimamente relacionado à morfologia das partículas. [31] Outras características, como a biocompatibilidade e a não-carcinogenicidade, são requisitos básicos para qualquer tipo de biomaterial.

Utilizando essas características como um “guia” das metas a serem atingidas, muitas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de desenvolver novos agentes embólicos, uma vez que a maioria dos agentes existentes ainda apresentam muitas características indesejadas, como morfologia irregular, tendência a formar aglomerados, difícil passagem pelo cateter e a oclusão incompleta dos vasos. [29]

Como citado anteriormente e revisado por KISILEVZKY & MARTINS, [19] atualmente os três principais agentes embólicos usados são as esponjas hemostáticas, as microesferas calibradas e as partículas de PVA. As esponjas hemostáticas, mais conhecidas por *Gelfoam*®, é um material gelatinoso com capacidade de coagular o sangue, que já foi extensamente utilizado em procedimentos de embolização. Comercializado em duas apresentações (pó com granulometria de 40-60 µm ou lâminas), o *Gelfoam*® possui algumas vantagens quando usado como agente embólico, como a fácil injeção e o fato de estar “pronto para uso”, embora sua aplicação mais frequente seja como agente hemostático. [32] Contudo, uma grande desvantagem desse material no uso como agente embólico é a biodegradabilidade, que pode resultar na recanalização dos vasos ou do tecido embolizado com o tempo. [32, 33] Outro fator

importante a ser considerado é que o uso do *Gelfoam*® em pó pode acarretar em necroses além do ponto de embolização desejado, fato esse devido ao tamanho das partículas. [32] Mesmo sendo reabsorvíveis pelo corpo, as esponjas hemostáticas de gelatina são partículas eficientes e seguras para uso em procedimentos de embolização da artéria uterina, podendo ser usada para o tratamento de fibromas sintomáticos. Esse material ainda possui uma propriedade interessante, que é a capacidade de absorção de fluidos. Essa característica pode contribuir para que as partículas de gelatina usadas na embolização absorvam compostos, como por exemplo antibióticos, antes de sua injeção no cateter, contribuindo para a prevenção de complicações, como as infecções bacterianas. [33]

As microesferas calibradas são partículas de gelatina trisacrílica que possuem morfologia esférica bem definida e distribuição de tamanhos monodispersa. Essas partículas, comercializadas com o nome de *EmboSpheres*®, vêm sendo empregadas como um novo tipo de agente embólico e apresentam diversas características desejáveis, como morfologia esférica, faixa de tamanhos precisamente calibrada, propriedades hidrofílicas, *maciez*, não são absorvíveis pelo organismo e apresentam fácil passagem pelo cateter. Todas essas características resultam numa obstrução mais efetiva dos vasos, além de uma penetração mais distal⁵. [29, 34, 35] As microesferas calibradas de gelatina trisacrílica já mostraram eficiência clínica superior frente a outros agentes embolizantes na devascularização de miomas cerebrais [36] e também na embolização de tumores ósseos. [37] Na embolização da artéria uterina, CHUA *et al.* [38] verificaram que as microesferas calibradas (700-900 µm) conseguem penetrar mais na vascularização dos miomas do que partículas não-esféricas de PVA (355-500 µm), resultando em agentes embólicos mais específicos para esta prática em especial. A

⁵ *Anatomia*. Refere-se ao ponto em que uma estrutura ou órgão fica afastado do seu centro ou de sua origem. [25]

agregação das partículas de PVA no cateter durante a aplicação é provavelmente associada ao formato irregular das partículas. [37]

Uma das principais razões para que o PVA seja o material mais escolhido como agente embólico, além da biocompatibilidade, é o aumento de volume do PVA quando entra em contato com meios aquosos, por causa da absorção de água. Essa propriedade permite as partículas de PVA “*inchar*” e provocar a obstrução do vaso embolizado. [29] Outra razão importante é o baixo custo de produção das partículas de PVA, que podem levar à produção de materiais eficientes e acessíveis a populações de baixa renda.

O tamanho das partículas sempre foi ressaltado como um ponto importante, desde que estudos sobre o uso da embolização da artéria uterina começaram a aparecer na literatura médica. A esse respeito, WORTHINGTON-KIRCH *et al.* [39] chamaram a atenção para algumas mudanças importantes nos protocolos de embolização, principalmente associados ao tamanho das partículas de PVA usadas nos procedimentos cirúrgicos, que passaram a ser usadas em duas faixas de tamanho: 300-500 μm e/ou de 500-700 μm . As partículas na faixa de 150-300 μm estão sendo abandonadas, devido ao grande risco de efeitos colaterais, como infecções e necrose do tecido uterino. [26] KISILEVZKY & MARTINS [19] relataram que melhores resultados pós-operatórios são alcançados quando partículas na faixa de 500 a 700 μm são utilizadas.

É muito importante enfatizar que a natureza hidrofílica do PVA promove uma boa interação com os fluidos orgânicos e com as paredes dos vasos, o que permite explicar a eficiência desse material nos agentes embólicos. Contudo, uma eficiência similar pode ser obtida se o PVA constituir a superfície de outras partículas. Como o controle da morfologia das partículas pode ser melhor realizado com outros materiais através de técnicas simples, a incorporação de uma casca de PVA a outros materiais constitui uma alternativa interessante.

Embora o PVA seja largamente utilizado como agente embólico, outros tipos de materiais continuam sendo desenvolvidos e estudados, com a caracterização comparativa de desempenhos em diversos tipos de embolização. Isto inclui micropartículas de hidroxiapatita, [31] esferas de quitosana [40] e líquidos adesivos. [41]

2.1.2 Polimerização em suspensão

A polimerização em suspensão é um processo heterogêneo, que consiste na suspensão inicial de um monômero (contendo um iniciador e/ou catalisador) na forma de gotas em uma fase contínua, que geralmente é a água. As gotas de monômero são mantidas em suspensão e impedidas de aglomerarem por intermédio da combinação de agitação do sistema e da adição de agentes estabilizantes. Os agentes estabilizantes (ou de suspensão) mais usados são os polímeros solúveis em água, como o poli(álcool vinílico) (PVA), e os compostos inorgânicos insolúveis em água, como o fosfato de cálcio. [3] Neste tipo de polimerização, é usado frequentemente um iniciador radicalar solúvel no monômero, tais como os peróxidos. Admite-se em geral que cada gota de monômero suspensa se comporta como um *reator* em miniatura, onde ocorre uma polimerização em massa. Assim, a consideração geralmente feita é de que a cinética da polimerização em suspensão seja similar à cinética da polimerização em massa. [3, 6]

Por apresentar diversas vantagens práticas, como a fácil recuperação do polímero e as baixas viscosidades do meio reacional, a técnica de polimerização em suspensão é usada preferencialmente para obtenção de várias resinas comerciais, incluindo polímeros e copolímeros de estireno, cloreto de vinila, acetato de vinila e metacrilato de metila. [42] Na Figura 2.2, é ilustrado um processo de polimerização em

suspensão convencional, que utiliza um monômero hidrofóbico disperso em um diluente hidrofílico, neste caso a água – que constitui a fase aquosa contínua do sistema.

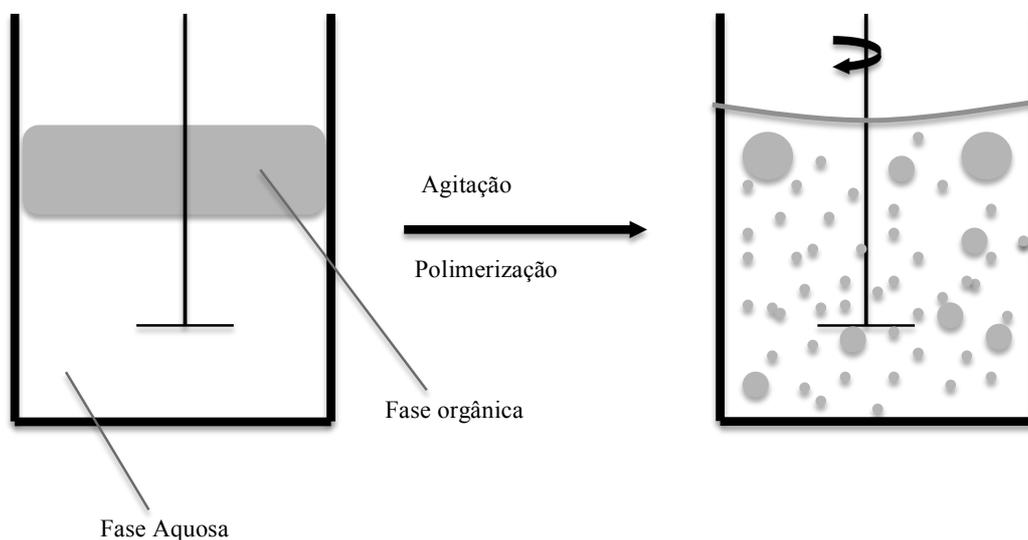


Figura 2.2 – Representação esquemática do processo de polimerização em suspensão convencional, utilizando um monômero orgânico e água como fase contínua.

Como revisado por MACHADO *et al.*, [42] os principais tipos de polimerização em suspensão, usados para a produção comercial de polímeros, incluem a suspensão do tipo pérola, do tipo granular, do tipo massa-suspensão (ou semi-suspensão), a suspensão inversa, do tipo suspensão-emulsão, do tipo dispersão e a micro-suspensão. As principais características desses tipos de polimerização em suspensão estão descritos na Tabela 2.1, conforme revisado e descrito por MACHADO *et al.* [42]

Outra grande vantagem da técnica de polimerização em suspensão é o fato de que é possível controlar o tamanho médio final das partículas e a distribuição do tamanho de partículas por meio de manipulação de variáveis operacionais do sistema, como a velocidade de agitação. O tamanho médio das partículas obtidas na polimerização em suspensão varia na faixa de 20 a 2000 μm , sendo que o tamanho final das partículas e sua distribuição são definidos por um conjunto de fatores que incluem a

concentração e o tipo de agente de suspensão, o tipo de monômero, a velocidade de agitação e a presença de cargas na mistura inicial. [42, 43] Além dessas variáveis, comumente reportadas, fatores como o tipo de *impelidor*⁶ usado, a cinética de polimerização, a tensão interfacial e a viscosidade e densidade das fases contínua e dispersa também exercem grande influência no tamanho final das partículas formadas. [44, 45]

Tabela 2.1 – Principais tipos de polimerização em suspensão. [42]

Tipo de polimerização em suspensão	Principais características
Pérola	Pérolas esféricas de forma definida Conversão entre 65-99%
Granular	Monômero não dissolve o polímero Grãos opacos e irregulares
Semi-suspensão	Processo em duas etapas, considerando inicialmente em massa antes da dispersão Obtenção de partículas com tamanhos homogêneos
Inversa	Monômeros solúveis em água Meio dispersante orgânico
Suspensão-Emulsão	Processo em duas etapas, com produção simultânea de micro e nanopartículas Obtenção de partículas do tipo casca-núcleo
Dispersão	A polimerização começa em solução e ocorre a precipitação da fase polimérica Obtenção de partículas com tamanhos homogêneos
Micro-suspensão	Altas taxas de conversão Obtenção de partículas com tamanhos homogêneos

O processo de formação das partículas em uma polimerização em suspensão pode ser entendido como uma sequência de três etapas. Inicialmente, o que existe é uma dispersão do monômero líquido em pequenas gotas, que são estabilizadas pela ação do agente de suspensão e a velocidade de agitação do sistema. Na segunda etapa, acontece

⁶ Adaptação para a língua portuguesa do termo em inglês *impeller* – parte rotatória de um dispositivo que tem a função de movimentar um fluido por rotação.

um equilíbrio dinâmico, usualmente reportado como de “*quebra-coalescência*”. Esse fenômeno, que ocorre entre as gotas de monômero-polímero, determina o tamanho final das partículas presentes no sistema. O processo de “*quebra-coalescência*” das gotas pode ser entendido da seguinte maneira: ao entrar em contato com o agitador, as gotas se *quebram*; longe do *impelidor* as gotas se “juntam” (*coalescem*), ao entrarem em contato umas com as outras. Na terceira etapa do processo, as gotas atingem uma viscosidade tão alta que se comportam como partículas poliméricas sólidas, não ocorrendo mais nem o quebramento nem a coalescência, fazendo com que as partículas mantenham o tamanho constante. Este fenômeno tem muita importância prática, pois a morfologia das partículas, assim como a e distribuição de tamanhos, afeta diretamente o manuseio e processamento do polímero. [43]

Embora o tamanho das gotas em uma polimerização em suspensão seja função das taxas de quebra e coalescência do sistema, segundo BROOKS *et al.*, [44, 45] a evolução do tamanho de partículas pode ser descrita em quatro estágios característicos. Estes estágios seriam:

Transição – a taxa de *quebra* das gotas é superior ao de *coalescência*; ocorre a redução do tamanho das gotas até a obtenção de tamanhos bastantes homogêneos.

Quasi-estacionário – a taxa de *quebra* é praticamente igual à de *coalescência*; o tamanho das gotas permanece constante. A observação deste estágio depende das condições experimentais usadas na polimerização.

Crescimento – a taxa de *quebra* é inferior à de *coalescência*; crescimento das gotas.

Identificação – devido às altas viscosidades das gotas, estas passam a se comportar como partículas sólidas, não sendo possível mais coalescerem com outras gotas. Nesta fase, as taxas de *quebra* e *coalescência* são nulas.

Conforme revisado por MELO, [46] alguns estudos [44, 47] tiveram conclusões bastante semelhantes sobre a influência de algumas das principais variáveis que influenciam a evolução e o tamanho final da partícula em uma polimerização em suspensão. Uma dessas variáveis é o agente estabilizante usado nas reações em suspensão – também conhecido como agente de suspensão.

O agente de suspensão, é um *componente* indispensável na polimerização em suspensão, pois esta classe de substâncias afeta diretamente a morfologia e a distribuição final de tamanhos das partículas. Os três principais tipos de agentes de suspensão usados nas reações de polimerização em suspensão são os polímeros solúveis em água (como a gelatina e o PVA), os sais inorgânicos insolúveis (como os sais de Mg, Ca e Al) e as misturas (contendo, por exemplo, polímeros orgânicos e sais inorgânicos). [43] Dentre os inúmeros estabilizantes disponíveis, o PVA é um dos compostos mais usados nas polimerizações em suspensão. [42] A grande vantagem do uso do PVA, assim como dos demais agentes de suspensão poliméricos, é que esses estabilizantes diminuem a tensão interfacial entre a gota de monômero e a fase aquosa do sistema, permitindo a estabilização da interface e contribuindo com a redução das taxas de coalescência. Os agentes de suspensão também previnem a coalescência entre as gotas ao adsorverem na superfície e formarem uma fina camada protetora. Os sais inorgânicos usados como agentes de suspensão apresentam algumas vantagens frente aos estabilizantes poliméricos. Dentre essas, destacam-se os fatos de serem mais baratos, causarem menor impacto ambiental e não formarem um *filme* sobre a superfície

das partículas, de maneira que os sais podem ser facilmente retirados do produto final por lavagem. [43] De um modo geral, espera-se uma diminuição no tamanho de partículas, à medida que se aumenta a concentração de agente de suspensão no meio reacional. [44, 47]

Juntamente com a quantidade de agente de suspensão, a velocidade de agitação é a uma das variáveis mais utilizadas para controlar o tamanho de gotas/partículas em uma reação de polimerização em suspensão. O aumento da velocidade de agitação leva à geração de gotas menores, ao aumentar a taxa de *quebra* das gotas, embora o aumento de velocidade também possa aumentar a taxa de coalescência das gotas. [44, 45]

Nos processos de polimerização em que monômeros vinílicos são usados, a polimerização ocorre usualmente por meio do mecanismo de radicais livres. Como já descrito, neste tipo de polimerização é necessário gerar radicais livres para *iniciar* a reação de polimerização, etapa esta que pode ser feita por intermédio de diversos tipos de mecanismos. [1, 3] Assim como os agentes de suspensão, existem diversos tipos de iniciadores disponíveis para os mais diversos tipos de sistemas de polimerização. Entretanto, para a polimerização em suspensão, os iniciadores devem ser solúveis na fase dispersa do sistema; ou seja, na fase que contém os monômeros. Em geral pertencentes à família dos peróxidos orgânicos ou azocompostos, os iniciadores usados nos processos de polimerização em suspensão são misturados à fase dispersa (0,1 a 0,5% em relação à massa de monômero) antes do sistema alcançar a temperatura de reação. [42]

Além das variáveis citadas, o comportamento cinético da polimerização pode influenciar drasticamente o tamanho e a distribuição de tamanhos final das partículas produzidas na polimerização em suspensão. Uma vez que a identidade final das partículas está intimamente associada ao aumento da viscosidade das gotas durante as

reações de polimerização, variáveis que atuam diretamente sobre a cinética de polimerização (como a concentração de iniciador e a temperatura de polimerização) também exercem uma importante influência sobre o tamanho final das partículas formadas e sua distribuição. [44, 45]

Na técnica de suspensão, as reações de copolimerização normalmente são conduzidas em batelada, empregando-se comonômeros miscíveis na fase orgânica e alimentados de uma única vez, embora comonômeros que apresentem solubilidade em água também possam ser empregados. [42] Essas estratégias operacionais não são muito comuns por causa do bem conhecido efeito de desvio de composição em reações de copolimerização conduzidos em batelada. [3]

2.1.3 Partículas esféricas com morfologia do tipo *casca-núcleo* de PVA/PVAc

O PVA, representado na Figura 2.3, é um polímero que não pode ser sintetizado diretamente por polimerização, pois o seu monômero (o álcool vinílico) não existe em estado livre. Desta forma, a estratégia usada para obter o PVA consiste em primeiro sintetizar um polímero, que em geral é um poli(éster vinílico), e depois modificá-lo até a obtenção do PVA. [29, 48, 49]

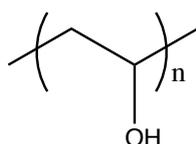


Figura 2.3 – Poli(álcool vinílico) (PVA)

O poli(éster vinílico) mais empregado na produção do PVA é o poli(acetato de vinila) (PVAc). Este polímero pode ser sintetizado através de polimerização via radicais livres a partir do monômero acetato de vinila (VAc), que possui uma grande tendência de formar polímeros ramificados (Figura 2.4). O PVAc é um polímero que possui baixa resistência química e, conseqüentemente, uma alta susceptibilidade à degradação. Dadas essas características, a obtenção do PVA geralmente ocorre em duas etapas: primeiramente faz-se a síntese do PVAc a partir do VAc e, posteriormente, faz-se a modificação do PVAc a PVA por meio de uma reação química. [29]

As propriedades físicas e químicas do PVA sintetizado dependem diretamente do tipo de polímero usado para sua produção e também das condições de operação da etapa de modificação. Variáveis como temperatura de reação, conversão do monômero em polímero, uso de solvente, quantidade e tipo de iniciador, etc., não influenciam apenas a qualidade do PVAc obtido, mas também a qualidade do PVA que será sintetizado. [48]

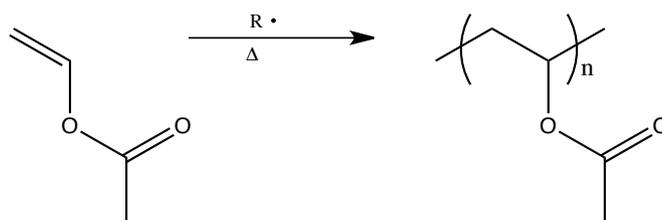


Figura 2.4 – Reação de polimerização do acetato de vinila.

A modificação do PVAc para formar o PVA pode ser realizada com auxílio de diversas estratégias. Geralmente, esses métodos de *hidrólise* são agrupadas de acordo com o tipo de catalisador usado. Essas reações estão representadas nas Figuras 2.5 a 2.8, conforme descrito por FINCH. [49]

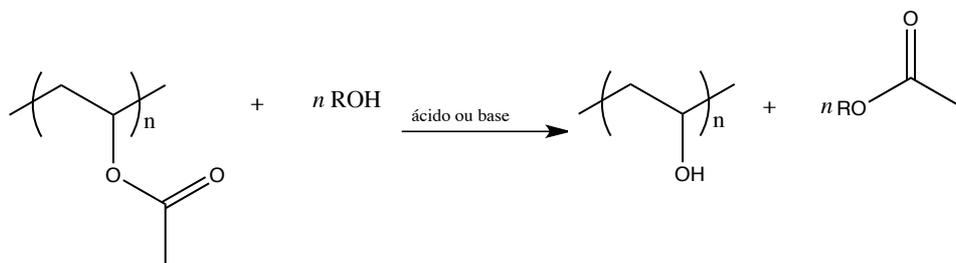


Figura 2.5 – Reação de alcoólise de PVAc.

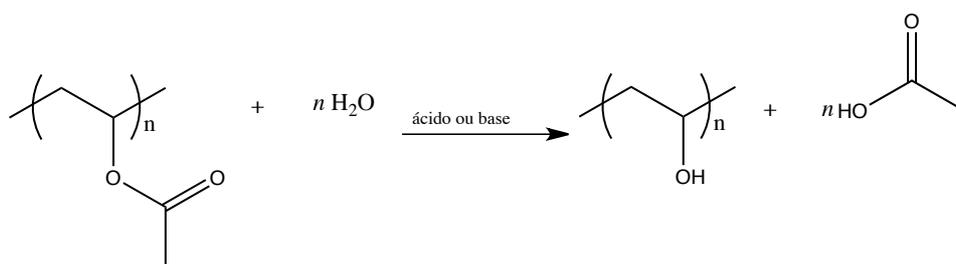


Figura 2.6 – Reação de hidrólise do PVAc.

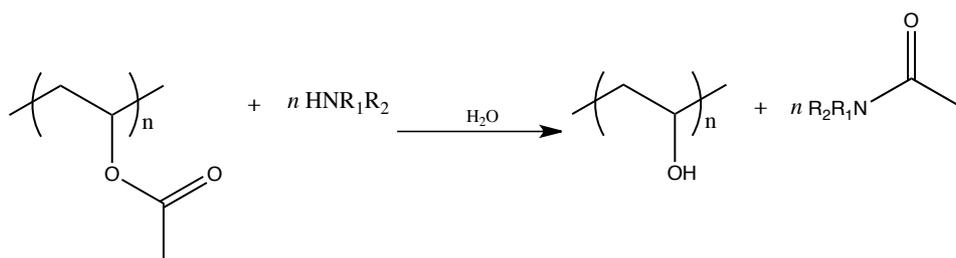


Figura 2.7 – Reação de aminólise do PVAc.

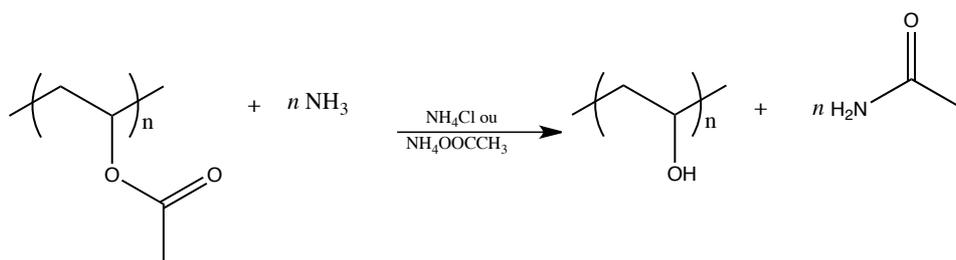


Figura 2.8 – Reação de amonólise do PVAc.

Durante a transformação do PVAc em PVA, deve-se considerar que também acontecem reações secundárias paralelamente à reação principal. Conforme exemplificado na Figura 2.9, uma pequena quantidade de monômero residual (acetato

de vinila) pode reagir, sendo convertido a acetaldeido, caso seja empregado um catalisador alcalino e compostos hidroxilados alifáticos. [50]

Os dois métodos mais empregados para produzir PVA a partir de PVAc são as reações de hidrólise (também conhecida como reação de *saponificação*) e a reação de transesterificação (*alcoólise*). Em ambos os casos, o PVA precipita quase que instantaneamente na forma de flocos com morfologia irregular. [48, 51] O PVA obtido pelos métodos descritos anteriormente costumam apresentar coloração que varia do branco ao amarelo (cor associada à formação de subprodutos indesejados ou à presença de acetato de vinila residual) na forma de pó ou de grânulos. Mesmo existindo uma grande variedade de *qualidades*, os tipos de PVA produzidos e comercializados podem ser classificados como PVA's parcialmente hidrolisados ou totalmente hidrolisados. [48]

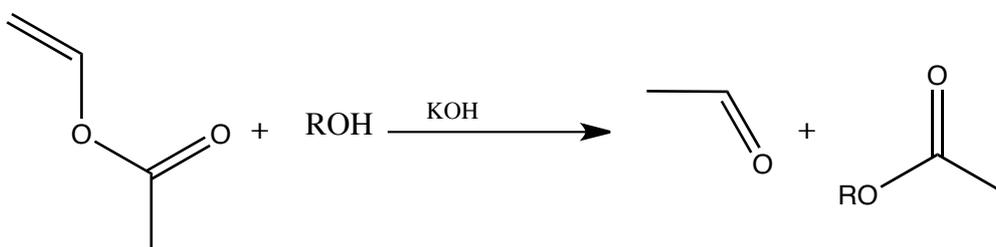


Figura 2.9 – Reação secundária do VAc durante a *hidrólise* do PVAc em PVA.

As resinas de PVA produzidas industrialmente geralmente são obtidas por *alcoólise* do PVAc, que apresenta elevadas taxas de reação e promove a hidrólise do PVAc a PVA quase por completa. Por esta razão, a obtenção de resinas parcialmente hidrolisadas por *alcoólise* é difícil, considerando-se as condições de hidrólise convencionais. Outro fato importante é que a obtenção de partículas com morfologia definida é muito difícil nas condições usuais de operação, já que as resinas de PVA são

insolúveis no álcool usado nas reações (quase sempre o metanol), o que ocasiona sua precipitação na forma de flocos irregulares, à medida que são formadas. [52]

Como discutido nas seções anteriores, os agentes embólicos possuem três requisitos importantes: o tipo de material usado, o tamanho das partículas e a forma das partículas. Entretanto, a maioria dos agentes embólicos hoje disponíveis ainda apresenta uma série de inconvenientes, como morfologia irregular, tendência a formar aglomerados e dificuldade em passar pelo cateter. [29, 52]

De longe, o PVA é o material mais usado e pesquisado, devido a algumas de suas características, principalmente a biocompatibilidade. Mesmo assim, o PVA sintetizado para ser usado como agente embólico deve ter, além das propriedades já mencionadas, boa resistência a solventes e também uma elevada resistência térmica, para que este seja estável a procedimentos de esterilização do material. [53]

PINTO *et al.* [53] observaram que os três requisitos desejados para um agente embólico podem ser controlados, usando o sistema de polimerização em suspensão. A grande questão tecnológica diz respeito à obtenção de partículas esféricas de PVA, já que, como discutido previamente, este polímero não pode ser obtido por polimerização direta de seu monômero. Desta maneira, foi proposta a síntese do PVAc pelo método clássico de polimerização em suspensão, seguida de uma reação de modificação (por exemplo a hidrólise), para obter partículas esféricas com morfologia casca-núcleo, em que a casca modificada é formada por PVA e o núcleo denso é formado por PVAc.

O esquema geral proposto por PINTO *et al.* [53] está representado na Figura 2.10. As principais vantagens do processo incluem a obtenção das partículas esféricas com morfologia *casca-núcleo* em um processo sequencial em duas etapas, a possibilidade de controlar a formação da “casca” de PVA e a flexibilidade de usar

diversas condições experimentais para produzir materiais com propriedades distintas – o que inclui o uso de comonômeros, solventes, fármacos, substâncias ativas, etc.

Posteriormente, PEIXOTO *et al.* [52] e PEIXOTO [29] utilizaram vários tipos de solventes orgânicos (como o pentano, o ciclohexano e o heptano) durante a obtenção das partículas esféricas com morfologia casca-núcleo de PVA/PVAc, misturando-os à fase monomérica. O uso de solvente permitiu a obtenção de partículas porosas menos densas, o que constitui uma vantagem durante a aplicação do agente embólico, pois diminui alguns problemas frequentemente relatado pelos médicos, como agregação no cateter de injeção e a rápida sedimentação das partículas embolizantes ainda na seringa.

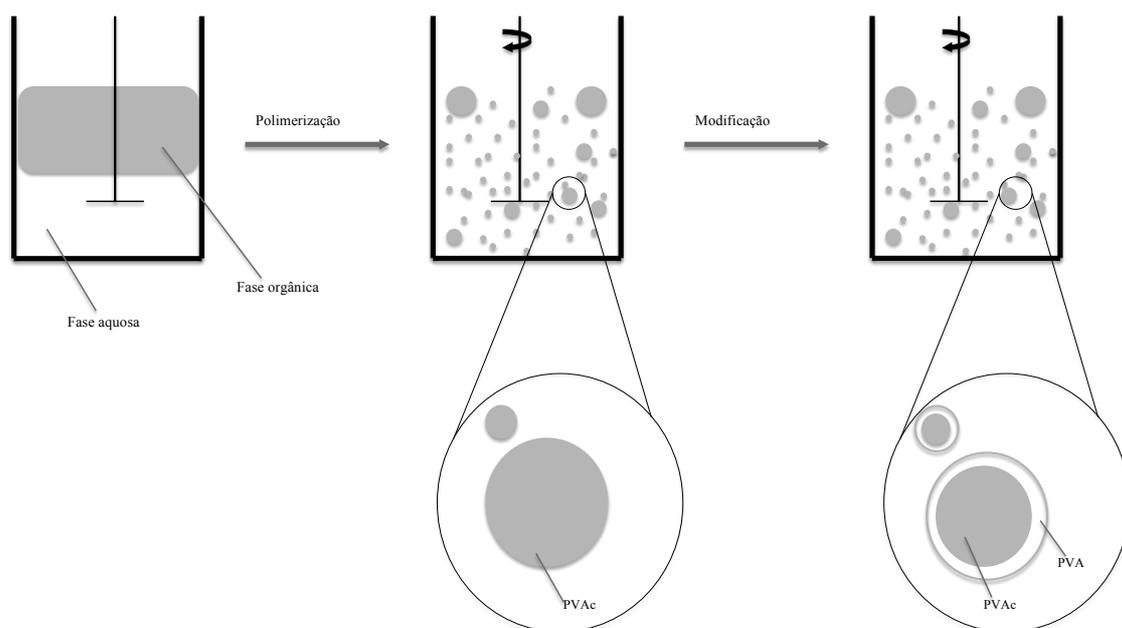


Figura 2.10 – Ilustração do processo de obtenção das partículas esféricas com morfologia tipo casca-núcleo de PVA/PVAc por polimerização em suspensão proposta por PINTO *et al.* [53]

As vantagens práticas observadas pelas partículas casca-núcleo de PVA/PVAc incluem o fato de o PVA encontrar-se suportado em um material praticamente insolúvel em soluções aquosas, que é o PVAc. Isso evita que as partículas se solubilizem em soluções aquosas, o que contribui para melhorar a estabilidade química e mecânica das

partículas, o que é muito positivo nessa aplicação. Além disso, as partículas com estrutura casca-núcleo tendem a “*inchar*” menos, uma vez que a camada de PVA formada não é tão extensa, diminuindo o aumento de volume das partículas e as chances de obstruções não desejadas do cateter. [29] Finalmente, a cobertura da casca de PVA é suficiente para conferir o caráter hidrofílico às partículas preparadas.

Quanto ao desempenho das partículas no procedimento de embolização, as matrizes de PVA/PVAc esféricas e com morfologia casca-núcleo mostraram ser muito mais eficientes que as partículas de PVA com morfologia irregular (Figura 2.11). Testes *in vivo* [21, 52, 53] com coelhos demonstraram que, embora ambos os tipos de partículas sejam eficientes quanto a oclusão do vaso, quando as partículas esféricas foram empregadas, a fibrose do tecido embolizado foi mais intensa.

É importante enfatizar que as partículas foram testadas *in vivo*, para o tratamento pré-operatório de tumores com sucesso. [54, 55] Por isso, o uso desse material foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil), sendo atualmente comercializado com o nome de Spherus® (First Line Brasil).

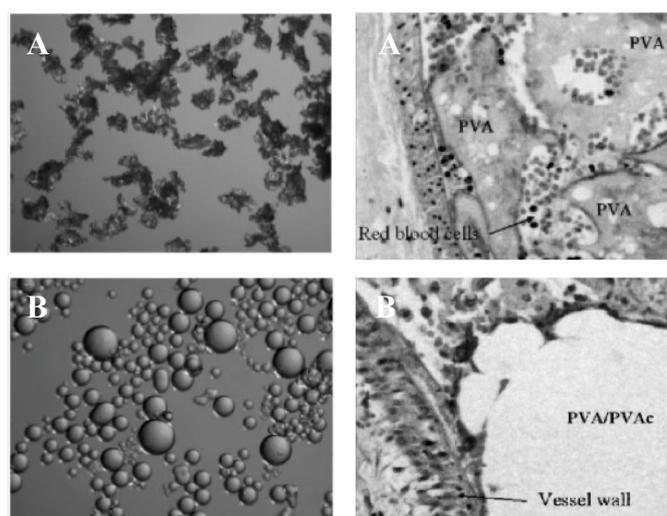


Figura 2.11 – Comparação entre partículas irregulares de PVA (A) e de partículas com morfologia casca-núcleo de PVA/PVAc (B) e suas respectivas eficiências na embolização vascular. [52]

Como verificado por PINTO *et al.* [53], MENDES *et al.* [21] e PEIXOTO *et al.* [52], dentre todas as características e requisitos desejados para um agente embólico, a forma e o tamanho das partículas exercem influência marcante no resultado final da embolização, mostrando-se de forma inequívoca que procedimentos realizados com partículas esféricas apresentaram melhores resultados frente a agentes embólicos irregulares. Entretanto, quando vários agentes embólicos esféricos são comparados, diferenças nas características das partículas e na eficiência das mesmas na embolização vascular podem também ser observadas. [56]

2.1.4 Incorporação de fármacos em polímeros

Em 1968 a *Alza Corporation* (Palo Alto, CA, EUA) criou o termo *drug delivery system* para introduzir o conceito de um sistema de liberação continuada de fármacos, que proporcionaria a ação farmacológica desejada com mínimos efeitos colaterais. As principais características desejadas para um sistema de liberação controlada são a capacidade de absorver o fármaco e a capacidade de liberá-lo de forma controlada em um *sítio* de ação específico. Essas características são melhor entendidas quando os medicamentos usados são os anti-cancerígenos. Nestes casos, essa classe de fármacos é altamente tóxica e responsável por uma série de efeitos colaterais, estes devem ser liberados apenas em “*alvos*” específicos (as células “*doentes*”), em quantidades e tempo suficientes para realizar o tratamento. [57]

Para ser considerado ideal, um sistema de liberação controlada de fármacos deve ter algumas características chaves que incluem a biocompatibilidade, a resistência mecânica, o conforto para o paciente, a absorção de altas quantidades de droga durante o preparado, a não liberação da droga acidentalmente, a fácil produção e a possibilidade de esterilização. Para sistemas de liberação controlada de drogas anti-cancerígenas,

algumas propriedades adicionais são também desejadas. Entre elas podem ser citadas a capacidade atingir o “*câncer*” de maneira específica, promover a absorção da droga pelo tecido “*doente*”, de controlar e manter a liberação da droga durante o tratamento, de aumentar o tempo de exposição do tumor ao fármaco e também de não permitir a elevação dos níveis do medicamento sistemicamente. [58]

Muitos estudos e pesquisas têm sido realizadas para desenvolver sistemas de liberação de fármacos. [57, 59-67] Neste contexto, os materiais poliméricos (principalmente os sintéticos) apareceram com destaque por apresentarem inúmeras vantagens. [68, 69] A principal delas é a facilidade de produzir, sintetizar e/ou modificar inúmeros tipos de polímeros, para serem usados como dispositivos de liberação controlada, em função do fármaco ou alvo desejado. Outras características importantes são a biocompatibilidade e a biodegradabilidade, [70] comuns a muitos polímeros naturais e sintéticos.

No que se refere ao preparo de microcápsulas e/ou microesferas (ou respectivamente nanocápsulas e nanoesferas) poliméricas, para serem usadas como sistemas de liberação controladas de droga, existem basicamente dois métodos usados para carregar as drogas ou substâncias ativas nas matrizes poliméricas: *incorporação* ou *adsorção*. No primeiro método, a substância é solubilizada no meio reacional de polimerização antes da adição do monômero, o que faz com que a substância encapsulada fique *presa* no interior da matriz. Na segunda estratégia, a substância é adicionada ao meio quando a matriz polimérica já está formada. Neste método, a substância encontra-se adsorvida predominantemente na superfície do dispositivo. [61]

O método de incorporação é extremamente interessante, pois permite sintetizar a matriz polimérica e carregar o fármaco desejável simultaneamente. Do ponto de vista de processo, elimina-se uma etapa e reduzem-se os custos globais de produção do

dispositivo. Porém, o maior desafio deste método é garantir que o fármaco incorporado tenha sua atividade preservada, já que os componentes e condições da polimerização podem interagir com o fármaco, destruindo a molécula ou desativando o centro ativo que é responsável pela ação farmacológica.

HENRY-MICHELLAND *et al.* [71] utilizaram a polimerização em emulsão para incorporar antibióticos β -lactâmicos (ampicilina e gentamicina) em nanopartículas biodegradáveis de poliacrilatos. Os autores verificaram que os antibióticos preservaram sua atividade antimicrobiana após o processo de polimerização, além de confirmarem que o perfil de liberação dos antibióticos depende da degradação da matriz polimérica (que, no caso dos acrilatos, é feita principalmente por via enzimática). Usando a mesma estratégia de produção, COUVREUR *et al.* [72] testaram a atividade *in vivo* de nanopartículas de poli(iso-hexilcianoacrilato) carregadas com ampicilina, verificando que a absorção da ampicilina foi maior quando esta estava associada às nanopartículas, em comparação com a droga livre.

FONTANA *et al.* [63] descreveram uma metodologia para preparar nanopartículas de polietilcianoacrilatos (PECA) carregadas com antibiótico (ampicilina). As partículas foram preparadas por polimerização em emulsão e a incorporação do antibiótico foi feita através da fase aquosa do sistema. Os autores observaram que o processo de incorporação da droga não afetou a atividade do fármaco nem o tamanho das nanopartículas formadas. Em outro estudo, FONTANA *et al.* [62] utilizaram a mesma metodologia para preparar nanopartículas de PECA, agora carregadas com outro tipo de antibiótico (amoxicilina), e avaliaram a influência da adição de polietilenoglicol (PEG) no momento da polimerização. O uso do PEG alterou as propriedades das nanopartículas sintetizadas, como o tamanho das partículas

formadas, o potencial zeta, a capacidade de incorporação do fármaco e o perfil de liberação de fármacos das nanopartículas.

SOMA *et al.* [73], com o intuito de contornar efeitos de resistências a drogas, utilizaram a tecnologia de polimerização em emulsão para incorporar dois fármacos com ação anticancerígena em uma mesma nanopartícula de policianoacrilato. Os testes *in vitro* mostraram que, além de terem suas atividades farmacológicas preservadas, a incorporação de ambos os fármacos na mesma nanopartícula provocou uma ação sinérgica positiva.

Como brevemente descrito, a maior parte dos estudos que utilizam a técnica de incorporação de fármacos em partículas poliméricas produz os polímeros por intermédio de sistemas em emulsão. Contudo, há alguns estudos que utilizam outras técnicas, como o caso de ICONOMOPOULOU *et al.* [64], que incorporaram agentes antimicrobianos em partículas poliméricas, usando a técnica de polimerização em suspensão, e por PARK & KIM, [74] que incorporaram um antibiótico em partículas de PVAc por miniemulsão.

O método mais fácil (e mais usado) para carregar dispositivos com fármacos é a metodologia de adsorção clássica, que consiste em colocar os dois materiais em contato. Este método, conforme descrito por LEWIS *et al.*, [75] é o mais empregado para preparar os agentes utilizados em quimioembolização e também para carregar outras substâncias ativas nas partículas de polímeros, como, por exemplo, proteínas e vacinas. [66, 76-78]

Além da adsorção clássica, algumas outras técnicas também são usadas como estratégia para *carregar* fármacos, como a solubilização do polímero em um solvente orgânico, [79] a deposição interfacial, [80] a secagem por *spray-drying* [81] e a técnica de evaporação de solvente. [67, 82]

As técnicas de incorporação e adsorção são usadas conforme a necessidade do dispositivo a ser preparado. Embora o método de incorporação seja atrativo do ponto de vista do processo, nem sempre ele pode ser usado. A escolha entre a técnica de incorporação e a técnica de adsorção depende do tipo de resposta esperada. Como exemplo, ARIAS *et al.* [83] prepararam um sistema polimérico magnético de liberação controlada de quimioterápicos. Os dispositivos, que apresentaram morfologia do tipo casca/núcleo, foram sintetizados via polimerização em emulsão e o *carregamento* dos fármacos nas matrizes poliméricas foi feito tanto pelo método de incorporação quanto pelo método de adsorção. Os autores constataram que, dependendo do método utilizado, diferentes perfis de liberação dos fármacos são obtidos. Em geral, drogas incorporadas no momento da polimerização levam o dispositivo a apresentar um perfil de liberação bifásico e mais lento, quando comparados aos perfis obtidos quando as drogas são adsorvidas nos dispositivos.

TUROS *et al.* [84, 85] desenvolveram uma nova metodologia para carregar antibióticos β -lactâmicos pouco solúveis em água em matrizes poliméricas à base de acrilatos. Segundo a abordagem proposta, primeiro transforma-se inicialmente o fármaco em um derivado de acrilato. Em seguida, o fármaco funcionalizado é dissolvido com o monômero, sendo as partículas poliméricas, com o fármaco incorporado, sintetizadas por polimerização via radicais livre. Os autores mostraram que o uso de fármacos *funcionalizados* leva à formação de um polímero em que o fármaco está de fato ligado covalentemente à matriz e que as partículas poliméricas formadas apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* e mostraram ainda que, de alguma forma, a matriz polimérica aumentou a eficiência do antibiótico, quando este se encontrava ligado covalentemente à matriz. Os autores destacaram que a metodologia torna fácil a preparação de matrizes poliméricas conjugadas com antibióticos e também torna

possível a incorporação de fármacos pouco solúveis em água direto na matriz polimérica, sem a necessidade de pós-processamentos.

Uma outra abordagem alternativa é a *funcionalização* do monômero, para que este apresente atividade farmacológica. Esta foi a estratégia usada por CAO & SUN [86] para o desenvolvimento de uma emulsão polimérica com atividade antimicrobiana, para uso posterior como aditivo de tintas comerciais. Embora este material a princípio não tenha uso farmacêutico, a estratégia utilizada (de primeiro funcionalizar o monômero e depois fazer o polímero) leva à formação de um material com “propriedades farmacológicas”, sem que necessariamente exista um fármaco a ser incorporado e/ou adsorvido à matriz polimérica.

2.2 Objetivo e justificativa

O principal objetivo deste Capítulo é verificar as influências da incorporação *in situ* de um fármaco durante o processo de polimerização em suspensão, para a produção de micropartículas poliméricas, com morfologia tipo casca-núcleo, para serem usadas como agentes embólicos. Para este fim, será usado um fármaco modelo (amoxicilina) e serão avaliadas as alterações nas características morfológicas e moleculares das micropartículas poliméricas sintetizadas na presença do fármaco.

Embora haja muitos estudos que se proponham a encapsular fármacos utilizando técnicas de polimerização, poucos são os que estudam as influências da incorporação *in situ* deste fármaco sobre as características e propriedades finais do polímero obtido. Grande parte, se não todos os estudos, tem como principal foco estudar a cinética de liberação dos fármacos, sendo que a caracterização do polímero é vista como um aspecto secundário do problema, na maior parte das vezes não abordada. Além disso,

nenhum estudo reportou os efeitos da incorporação *in situ* de fármacos durante a polimerização em suspensão para a obtenção de agentes embólicos.

A escolha da amoxicilina é justificada pois além de servir como *fármaco modelo*⁷, o uso de antibióticos é feito profilaticamente em procedimentos de embolização, [20] sendo que alguns autores já previram uma possível associação de fármacos antibióticos com agentes embolizantes; também para fins profiláticos. [33] Além disso, o desenvolvimento de um agente embólico com algum tipo de antibiótico pode aumentar o tempo de armazenamento do material, embora seja importante enfatizar que este tipo de material deve ser estéril e não apenas isento de microrganismos vivos.

2.3 Metodologia experimental

A metodologia experimental usada seguiu basicamente as especificações descritas previamente por PINTO *et al.*, [52, 53] com algumas modificações experimentais para promover a incorporação *in situ* do fármaco.

2.3.1 Materiais

Foram usados os seguintes reagentes: acetato de vinila (VAc, 99%, Vetec Química Fina), água (destilada, desmineralizada e microfiltrada), amoxicilina trihidratada compactada (Grau A, Laboratório Globo Ltda.), clorofórmio deuterado (CDCl₃, 99,8%, Cambridge Isotope Laboratories), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO, 99,9%, Cambridge Isotope Laboratories), hidróxido de sódio (NaOH, 99%, Vetec

⁷ O termo “fármaco modelo” foi empregado nesta Tese sendo um fármaco que possuísse atividade farmacológica direta ou indireta na embolização vascular e que pudesse servir de base comparativa para possíveis estudos com outros fármacos.

Química Fina), lauril sulfato de sódio (LSS, 90%, Vetec Química Fina), metacrilato de metila (MMA, 99%, Sigma-Aldrich ou Denstply Brasil), peróxido de benzoíla (BPO, 97%, Vetec Química Fina), poli(álcool vinílico) (PVA, 88% de hidrólise e $M_w = 78.000$ g/mol, Vetec Química Fina,) e tetrahidrofurano (THF, 99,9%, Tedia).

Em todos os experimentos relatados neste Capítulo, utilizaram-se os reagentes conforme recebidos pelos fornecedores, não sendo empregado nenhum tipo de procedimento de purificação. A única exceção foi a água usada nos experimentos, que foi destilada, desmineralizada e microfiltrada.

2.3.2 Unidade Experimental

A unidade experimental usada nas reações de polimerização e na etapa de saponificação está ilustrada na Figura 2.12. A unidade era operada na pressão atmosférica e a aferição da temperatura dentro do reator acompanhada com *termopar* e eventualmente através de um termômetro de mercúrio.

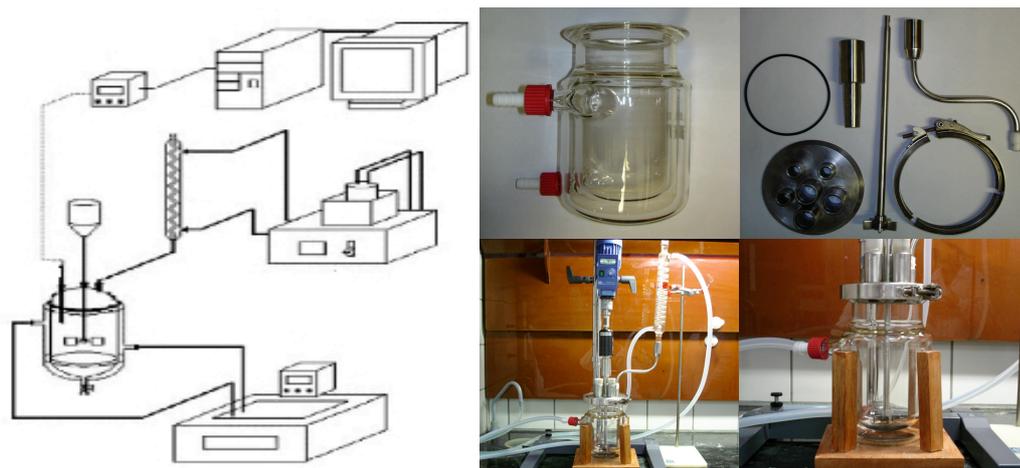


Figura 2.12 – Esquema e fotos parciais da unidade experimental usada nas reações de polimerização e na etapa de saponificação.

A unidade experimental apresentada na Figura 2.12 era composta por: reator de vidro encamisado de 1 L (FGG Equipamentos Científicos Ltda, Brasil), conectado a um sistema de aquecimento/refrigeração a água com temperatura programada Haake Phoenix II (Thermo Electron Co., Alemanha), equipado com tampa de aço inoxidável com 6 orifícios, agitador mecânico EuroStar Digital (IKA, Alemanha), haste reta, *impelidor* tipo hélice com 6 pás e condensador de serpentina de vidro, conectado a um sistema de refrigeração a água com temperatura programada Isotemp 2028P (Fisher Scientific com refrigerador PolyScience KR30A).

2.3.3 Métodos

Polimerização em suspensão

As reações de polimerização em suspensão, via mecanismo clássico de radicais livres, foram realizadas na unidade descrita anteriormente. O procedimento adotado foi o mesmo descrito por PINTO *et al.*, [53] exceto quando especificado.

Os componentes da receita padrão usada nas polimerizações em suspensão estão descritas na Tabela 2.2. Inicialmente adicionava-se ao reator uma solução do agente de suspensão no meio dispersante e aquecia-se o reator até a temperatura estipulada para a reação (70-90°C). Após atingir a temperatura desejada, era adicionada uma solução contendo (co)monômero(s) e o iniciador, mantendo o sistema na temperatura e velocidades de agitação (600-700 rpm) definidos no plano da reação. A adição dos componentes orgânicos da suspensão caracterizava o início da reação, que tinha uma duração de aproximadamente 240 minutos. Ao final da etapa de reação, a temperatura do reator era ajustada para 30 ± 5 °C e o conteúdo do mesmo era retirado. A obtenção do polímero era feita separando-se o precipitado do sobrenadante por filtração,

utilizando-se água destilada para lavar as partículas. O polímero obtido era então seco em estufa a vácuo a 25 °C e processado em gral de porcelana, até a separação dos grânulos observados visualmente. Nas reações realizadas, adicionou-se um fármaco numa proporção que variava de 0-1% (m/m) em relação à quantidade de monômero utilizado na formulação. O fármaco era adicionado ao meio reacional de duas formas: o primeiro método consistia na dissolução do fármaco na solução orgânica, que era composta pela mistura do(s) (co)monômero(s) e iniciador; o segundo método empregado era o de solubilizar o fármaco na fase aquosa do meio.

Tabela 2.2 – Receita genérica de polimerização em suspensão a 70 ou 90 °C.

Fase contínua	Fase dispersa	Quantidade (g)	Função
Água		420	Fase contínua
PVA		0,2	Agente de suspensão
	VAc	140 – 200	(co)Monômero
	MMA	0 – 60	Comonômero
	BPO	2 – 4	Iniciador
	Fármaco*	0 – 2	Fármaco

PVA = poli(álcool vinílico); VAc = acetato de vinila; MMA = metacrilato de metila; BPO = peróxido de benzoíla.

Reação de saponificação

A reação de saponificação, que visa à conversão parcial do PVAc superficial em PVA, foi realizada seguindo basicamente a metodologia descrita por PINTO *et al.* [53] e PEIXOTO [29]. A principal diferença em relação à metodologia originalmente proposta é que, para poder estudar os efeitos da incorporação do fármaco nas propriedades dos polímeros (*núcleo* e também na *casca* de PVA), este processo foi realizado em duas etapas distintas.

No procedimento adotado, em um sistema com controle de agitação e temperatura, 20 g de polímero seco reagem com 20 mL de solução NaOH 40% (m/v) em 80 mL de água, durante 2 horas, mantendo-se a temperatura controlada em 30 ± 5 °C

e a agitação em 500 rpm. Ao final da reação, o polímero era recuperado por filtração, lavado com água destilada e seco em estufa a vácuo a 25°C.

2.3.4 Caracterização

Microscopia

As características macroscópicas das partículas obtidas foram determinadas com auxílio de um microscópio ótico SMZ 800 (Nikon, Japão) e câmera digital Coolpix 995 (Nikon, EUA). A microestrutura das partículas foi analisada com auxílio de microscopia eletrônica de varredura, em equipamento Quanta 200 (FEI Company, EUA). Neste caso, antes da visualização as amostras eram recobertas com uma camada de ouro de 300 nm, utilizando-se um metalizador JFC-1500 (JEOL, Japão).

Cromatografia de permeação em gel (GPC)

As determinações de massas molares dos polímeros sintetizados foram realizadas em cromatógrafo Waters, usando THF como fase móvel (vazão 1 mL/min) e equipado com detector de refração 410 e três colunas Styragel HR (500 – 30×10^3 Da, 5×10^3 – 600×10^3 Da e 2×10^3 – 4×10^6 Da) a 40 °C. O sistema foi calibrado utilizando-se 12 padrões de poliestireno (Shodex Standard).

Todas as análises de GPC descritas neste Capítulo foram realizadas no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM) da Universidade Federal de São Carlos – SP, Brasil. As distribuições de massas molares apresentadas neste Capítulo foram normalizados em relação ao valor máximo, segundo a relação:

$$y_{\text{normalizado}} = \frac{y_i}{y_{\text{máximo}}} \quad (2.1)$$

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Aproximadamente 10 mg de amostra eram pesadas em uma cápsula de alumínio, selada com o auxílio de uma prensa. A determinação da T_g foi realizada em um calorímetro DSC-7 (Perkin-Elmer, EUA), na faixa de -20 a 140 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/minuto e durante a segunda rampa de aquecimento, para eliminar a *história térmica* do polímero.

Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C -RMN)

As análises de ^{13}C -RMN descritas neste Capítulo foram realizadas em equipamento Varian UNIT-Plus (Varian Analytical Instruments, EUA), operando a 100 MHz e equipado com uma sonda de 10 mm de diâmetro interno. Para preparo das amostras, utilizou-se ou clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO). O tetrametilsilano (TMS) foi usado como referência interna e manteve-se a temperatura constante em aproximadamente 25°C em todas as análises realizadas.

A Tabela 2.3 e a Figura 2.13 apresentam os deslocamentos específicos dos núcleos de carbono para o PVAc, PMMA e PVA, de acordo com os polímeros sintetizados e de dados já catalogados na literatura. [87, 88] A Tabela 2.4 apresenta os deslocamentos específicos dos núcleos de carbono da amoxicilina, sendo o espectro de ^{13}C -RMN apresentado na Figura 2.14. Baseando-se em dados já publicados [87] e também em espectros gerados por simuladores de RMN, foi possível identificar todos os deslocamentos específicos para o fármaco, conforme assinalado no espectro.

Tabela 2.3 – Deslocamento dos núcleos de carbono de PVAc e PVAc-co-PVA.

Carbono	PVAc		PMMA		PVA	
	Exp ^a	Ref ^{a,b}	Exp ^a	Ref ^{a,b}	Exp ^a	Ref ^{b,c}
A1	66.4	66.4				
A2	38.8	38.9				
A3			54.2	54.6		
A4			44.7	44.5		
A5					67.9	68.4
A6					44.8	45.3
B1	170.1	170.0				
B2	20.7	20.6				
C1			177.7	177.5		
C2			51.6	51.4		
C3			18.5 16.2	18.1 16.4		

PVAc = poli(acetato de vinila); PMMA = poli(metacrilato de metila); PVA = poli(álcool vinílico).
Valores em ppm para ¹³C-RMN; ^aCDCl₃; ^bBRANDOLINI & HILLS [88]; ^cD₂O.

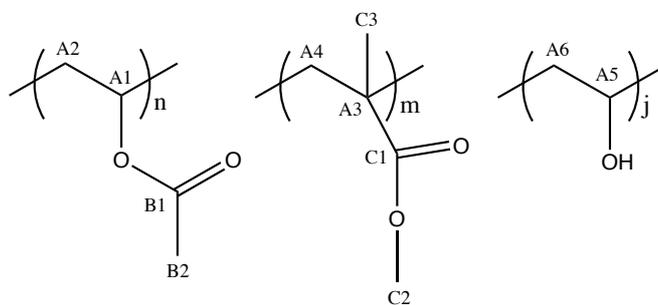


Figura 2.13 – Deslocamento de ¹³C-RMN para poli(acetato de vinila) (PVAc), poli(metacrilato de metila) (PMMA) e poli(álcool vinílico) (PVA).

Tabela 2.4 – Deslocamento dos núcleos de carbono da amoxicilina.

Carbono	Amoxicilina ^a	Referência ^b	Simulador ^c
C2	60.3	64.6	59.80
C2 α	29.9	27.5	26.49
C2 β	33.7	31.8	31.32
C3	75.4	73.9	69.48
C5	67.0	67.0	66.54
C6	58.4	57.5	60.34
C7	-	170.0	166.30
C9	175.7	173.1	176.30
C10	-	57.2	-
C11	172.4	173.6	171.62
C3' C5'	118.0	115.0	117.22
C1'	129.3	128.1	130.41
C2' C6'	131.5	131.4	127.55
C4'	160.6	156.8	-

Valores em ppm para ¹³C-RMN; ^aDMSO; ^bDI STEFANO *et al.* [87] em DMSO + NAOB em D₂O; ^cSimulador.

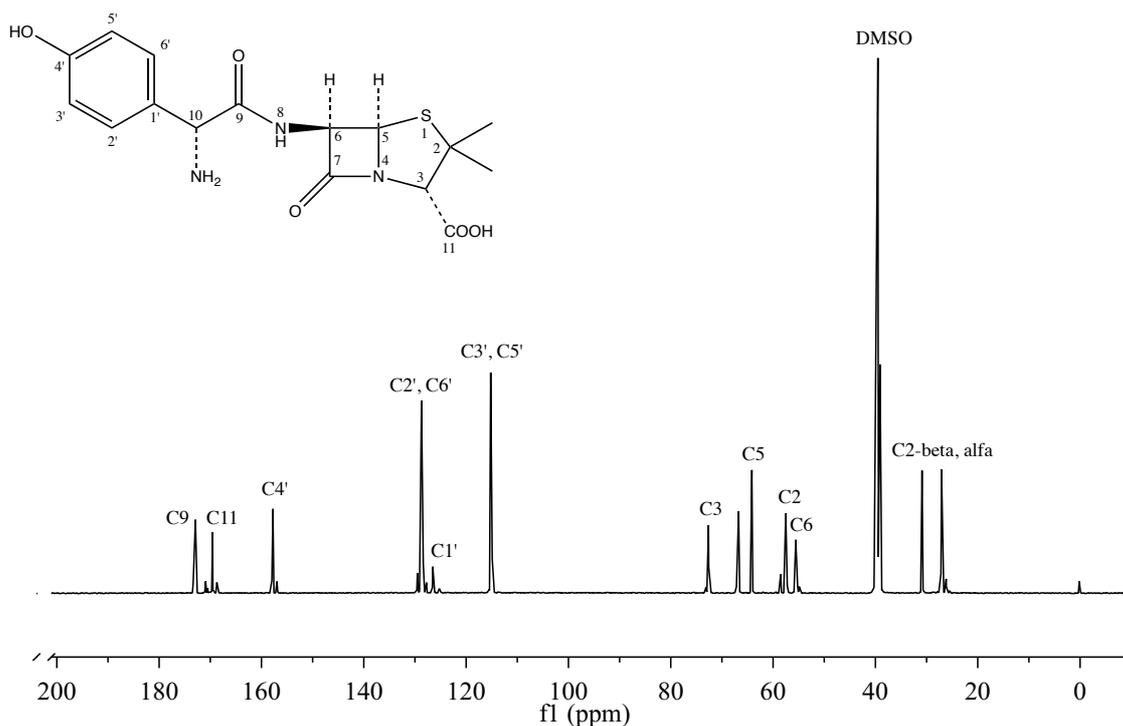


Figura 2.14 – Espectro de ^{13}C -RMN da amoxicilina usada nos experimentos.

Devido à baixa solubilidade da amoxicilina pura em clorofórmio, usou-se como solvente o DMSO, que gera um sinal característico em 39.7 ppm. Como este solvente não apresenta anéis benzênicos em sua estrutura, os dados de deslocamento de núcleos de carbono em DMSO e em clorofórmio podem ser usados de forma comparativa.

Liberação de Fármaco

Os testes de liberação de fármacos e/ou compostos bioativos geralmente são realizados por intermédio de extração da substância de interesse em meio aquoso. Este meio pode ter características especiais, como pH ácido, no caso de fármacos ou compostos que são absorvidas no estômago, ou pH 7,4 para formulações injetáveis. Após um período estabelecido, faz-se uma dosagem do meio extrator para estabelecer a concentração de fármaco liberado. Esta dosagem geralmente é feita por leitura da absorção na região do UV-Vis, em espectrofotômetros ou por cromatografia líquida.

Em um balão volumétrico de 50 mL, pesou-se 1 g de amostra, anotando-se exatamente o peso. Em seguida, completou-se o volume do frasco com uma solução extratora de lauril sulfato de sódio 1% (m/v) em água. O recipiente foi agitado em por 2 horas a temperatura ambiente (placa de agitação horizontal HS-250, IKA, Germany). Após o período de extração, os sólidos foram retirados por filtração e o extrato recolhido em frasco limpo e seco. A absorbância dos extratos aquosos foram determinadas em espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35, Perkin-Elmer, EUA), utilizando cubetas de quartzo de 5 mm, para leituras de varredura entre as regiões de 200-700 nm, e em comprimentos de onda específicos de 228 e 274 nm, correspondentes aos dois picos de absorção da amoxicilina trihidratada neste meio extrator. A solução extratora de lauril sulfato de sódio 1% foi utilizado como branco, para fins de calibração do equipamento. A determinação da concentração de amoxicilina extraída das amostras foi calculada a partir de equações geradas com curvas analíticas, obtidas com soluções de concentrações conhecidas de amoxicilina no meio extrator para os dois comprimentos de onda específico (228 e 274 nm).

2.4 Resultados & Discussão

2.4.1 Efeitos da incorporação *in situ* de amoxicilina nas reações de homopolimerização em suspensão do acetato de vinila

Para estudar os efeitos da incorporação de um fármaco modelo durante a produção de micropartículas de PVAc, utilizaram-se diferentes concentrações de amoxicilina nas homopolimerizações do VAc. O fármaco (amoxicilina) foi incorporado *in situ* ao meio reacional, antes do início da reação de polimerização, utilizando duas estratégias: por meio da solubilização na fase orgânica ou na fase aquosa do sistema de polimerização em suspensão. Os componentes e condições utilizadas nestes experimentos estão especificados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Receita de homopolimerização em suspensão do acetato de vinila.

Fase contínua	Fase dispersa	Quantidade (g)	Função
Água		420	Fase contínua
PVA		0,2	Agente de suspensão
	VAc	200	Monômero
	BPO	2	Iniciador químico
	Amoxicilina	0 – 2*	Fármaco modelo

PVA = poli(álcool vinílico); VAc = acetato de vinila; BPO = peróxido de benzoíla.

*0; 0,1; 0,5 ou 1% (m/m) em relação à massa do monômero; adição em apenas umas das fases.

Reações realizadas com temperatura do reator à 70 ± 5 °C e 700 rpm.

A amoxicilina (Figura 2.15) é uma penicilina semi-sintética de amplo espectro de ação e utilizada principalmente na terapêutica de infecções das vias aéreas superiores. [89, 90] Este fármaco possui aparência de pó branco e cristalino, sendo a

forma tr hidratada a mais utilizada nas formulações comerciais. Em termos de solubilidade, a amoxicilina possui solubilidade em água (4 mg/mL) e praticamente nenhuma solubilidade em diversos solventes orgânicos, [91] sendo a identificação da substância feita geralmente por análises de espectrometria na região do infra-vermelho e ultra-violeta.

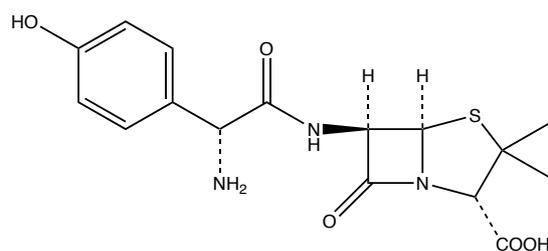


Figura 2.15 – Estrutura da amoxicilina.

Um dos principais objetivos perseguidos durante a produção dos agentes embólicos, como no caso de partículas com morfologia casca-núcleo, é a obtenção dessas micropartículas no formato esférico e com uma faixa de tamanhos definida. Na investigação da morfologia das micropartículas, à medida em que as amostras eram produzidas e processadas, estas eram observadas por microscopia (óptica e eletrônica), para avaliar a morfologia aparente e a existência de micro e nano-estruturas. A incorporação *in situ* da amoxicilina na matriz polimérica (seja na fase orgânica ou na fase aquosa do sistema) ocasionou alterações significativas nas propriedades morfológicas das micropartículas poliméricas produzidas.

A primeira observação feita diz respeito à cor do polímero obtido, como apresentado nas Figuras 2.16 e 2.17. Normalmente, o PVAc obtido por este tipo de reação (polimerização em suspensão do acetato de vinila) apresenta uma coloração branca-opaca. Com a adição da amoxicilina na reação, todos os polímeros apresentaram uma coloração “amarelada”, que aumentava de intensidade, à medida que a

concentração de fármaco também aumentava. Este comportamento foi observado quando o fármaco foi incorporado tanto na fase orgânica do sistema (Figura 2.16) quanto na fase aquosa (Figura 2.17).

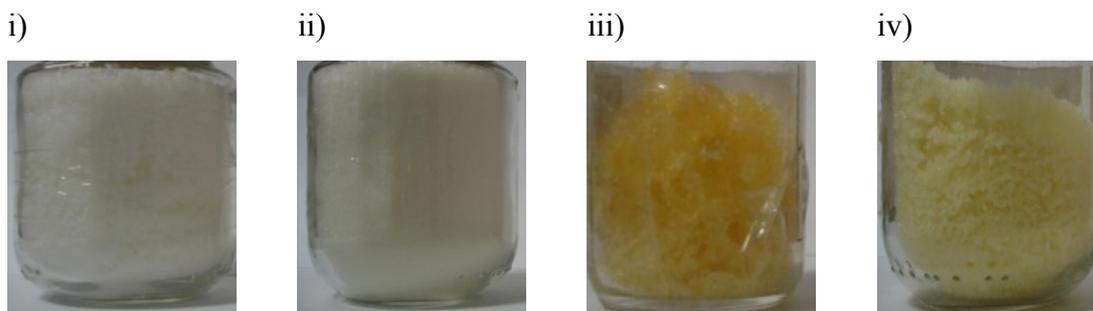


Figura 2.16 – PVAc sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina na fase orgânica da homopolimerização em suspensão do acetato de vinila. i) PVAc; ii) PVAc + 0,1% de amoxicilina; iii) PVAc + 0,5% de amoxicilina; iv) PVAc + 1% de amoxicilina.

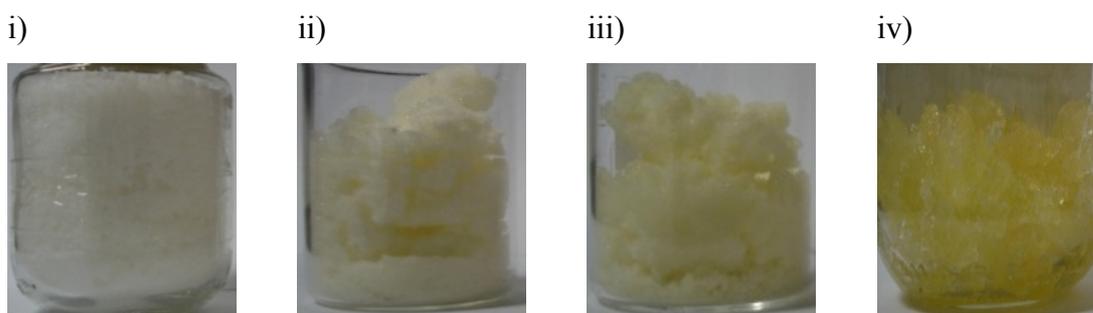


Figura 2.17 – PVAc sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina na fase aquosa da homopolimerização em suspensão do acetato de vinila. i) PVAc; ii) PVAc + 0,1% de amoxicilina; iii) PVAc + 0,5% de amoxicilina; iv) PVAc + 1% de amoxicilina.

Uma mudança de coloração do polímero (de *branco* para *amarelo*) pode ser observada quando o PVAc era hidrolisado com hidróxido de sódio para a obtenção do PVA. [48] Como revisado, a amoxicilina em sua forma trihidratada tem aspecto de um pó branco e cristalino. Desta forma, a mudança na coloração do polímero é um indício de que algum tipo de “modificação” está ocorrendo, seja uma adsorção do fármaco na matriz polimérica, reações de hidrólise do PVAc e/ou outro tipo de interação entre a matriz polimérica e o fármaco. Esta mudança de coloração também pode ser influência

de outro fatores, como a presença considerável concentração de monômero residual e/ou outras impurezas no meio reacional. Embora a mudança de cor seja um aspecto visual importante para monitoramento do processo, para fins de um procedimento de embolização ela não possui importância.

A característica mais desejável do agente embólico, produzido por esta tecnologia de polimerização em suspensão, é a obtenção de partículas com morfologia esférica. Como já observado nas Figuras 2.16 e 2.17, muitas amostras apresentaram uma característica *borrachosa* e outras foram obtidas como grandes aglomerados. A Figura 2.18 apresenta micrografias de amostras das micropartículas de PVAc, com a adição de amoxicilina na fase orgânica (Figura 2.18a) e na fase aquosa do sistema (Figura 2.18b). Além das características já relatadas, foi possível observar por análise de microscopia que a grande maioria das amostras apresentou perda da morfologia esférica.

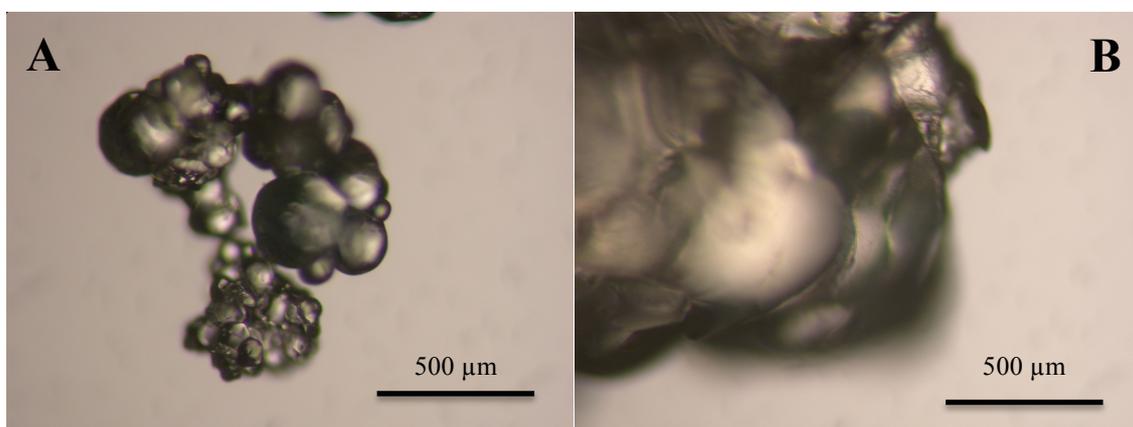


Figura 2.18 – Micropartículas de PVAc sintetizadas com incorporação *in situ* de 1% de amoxicilina à fase orgânica (A) ou a fase aquosa (B) da homopolimerização em suspensão do acetato de vinila.

Pelo fato da maior parte das amostras ter apresentado aspecto *borrachoso*, formação de aglomerados e perda da morfologia esférica, o pós-processamento e

manuseio das amostras ficou comprometido, impossibilitando a realização da segunda etapa do processo de formação das partículas com morfologia casca-núcleo: a reação de *saponificação*.

O aspecto *borrachoso* do material está normalmente associado a três fatores: às baixas massas molares (indicando que a amoxicilina pode atuar como um agente de transferência de cadeia), à baixa cristalinidade do produto final (indicando que a amoxicilina pode ser incorporada ao polímero, perturbando a estrutura regular do material) ou às baixas conversões (indicando que a amoxicilina pode atuar como um inibidor de reação).

O método empregado para incorporar o fármaco no momento da formação das matrizes poliméricas provocou alterações significativas nas propriedades dos polímeros sintetizados, como mostrado a seguir. A Tabela 2.6 contém os valores das massas molares médias e das temperaturas de transição vítrea (T_g), como funções da concentração e da fase na qual o fármaco foi adicionado, para a homopolimerização em suspensão do acetato de vinila.

Tabela 2.6 – Valores de massa molar e T_g do como função dos teores de amoxicilina no meio reacional da homopolimerização do acetato de vinila a 70 °C.

Concentração de amoxicilina (% m/m)		Massa molar ($\times 10^3$ g/mol)			T_g (°C)
Fase orgânica	Fase aquosa	M_n	M_w	M_w/M_n	
-	-	15	125	8,28	40,95
0,1	-	103	252	2,44	40,43
0,5	-	8	58	7,52	32,38
1,0	-	74	166	2,26	33,66
	0,1	122	286	2,34	41,39
	0,5	115	285	2,48	41,18
	1,0	113	244	2,15	29,44

Como pode ser observado na Tabela 2.6, a adição de fármaco em concentrações superiores a 0,1% ocasionou alterações significativas nos valores da T_g do polímero. Quando a concentração do fármaco adicionado na fase aquosa aumentou de 0,5% para

1,0%, ocorreu uma queda no valor da T_g de aproximadamente 10°C. Este comportamento não foi observado quando o fármaco foi adicionado à fase orgânica do sistema, já que uma queda brusca no valor da T_g ocorreu quando a concentração de fármaco aumentou de 0,1 para 0,5%, com um ligeiro aumento no valor da T_g quando a concentração aumentou de 0,5 para 1,0%. Pode-se dizer que a adição da amoxicilina causa redução da T_g do produto final, sendo esse efeito mais significativo quando a adição ocorre na fase aquosa.

A Tabela 2.6 também traz os resultados das massas molares médias dos polímeros de PVAc obtidos na presença da amoxicilina. Uma análise dos dados numéricos apresentados aponta para um aumento da massa molar quando se adiciona o fármaco no sistema. As curvas de distribuição de massa molar (Figura 2.19) confirmam os dados numéricos apresentados, indicando a presença de polímeros de alta massa molar e elevadas razões M_w/M_n , característico de processos de polimerização via radicais livres. [3] Entretanto, os resultados da Tabela 2.6 e da Figura 2.19 apontam para a existência de um comportamento complexo, quando a amoxicilina é adicionada *in situ* durante a reação de polimerização.

Conforme foi analisado, o aumento inicial de massa molar é seguido de queda consistente, à medida que aumentam os teores de amoxicilina no meio. O comportamento observado para a relação “*massa molar x concentração de fármaco*”, de certa forma, foi o oposto do esperado, uma vez que a expectativa era de que o fármaco pudesse atuar como um agente de transferência de cadeia, o que levaria a uma redução da massa do polímero, à medida que a concentração do fármaco aumentasse no sistema. O único caso em que de fato isso ocorreu foi quando o fármaco estava em concentração de 0,5% na fase orgânica do sistema.

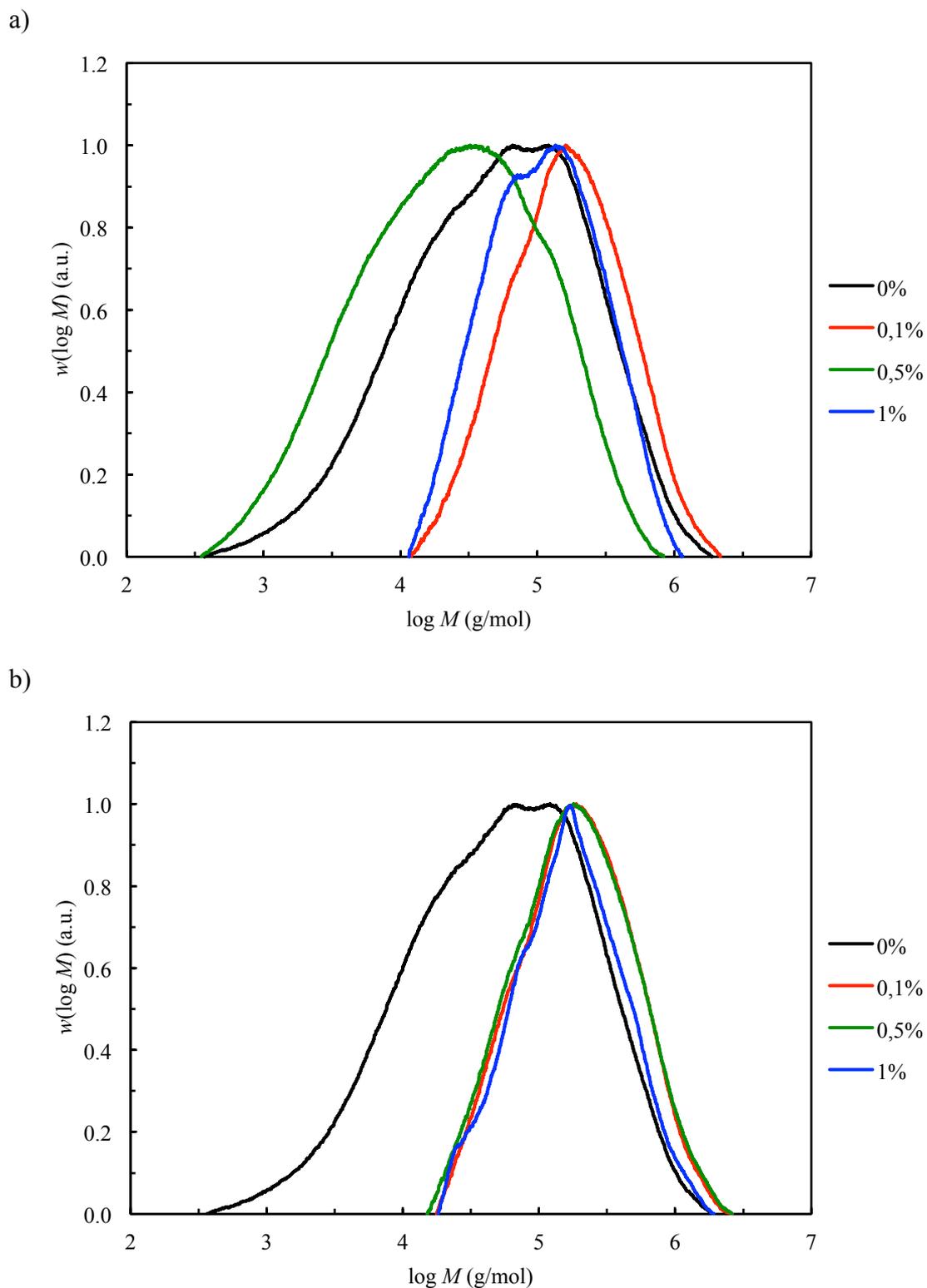


Figura 2.19 – Distribuições de massas molares dos homopolímeros de PVAc sintetizados com incorporação *in situ* de amoxicilina à homopolimerização em suspensão do acetato de vilina. a) adição da amoxicilina na fase orgânica; b) adição da amoxicilina na fase aquosa.

Estes primeiros resultados apresentados sugerem que a amoxicilina, nesta faixa de concentração, não atua como um agente de transferência de cadeia, mas como comonômero e/ou um plastificante, devido a redução nos valores de T_g . Isso pode explicar por que a massa molar aumenta e a temperatura de transição vítrea diminui, sugerindo mudanças de arquitetura molecular do polímero. O efeito menos pronunciado na fase aquosa pode estar associado à menor incorporação do comonômero e à maior atividade de reação quando as concentrações de comonômero são menores.

Para tentar elucidar a hipótese de incorporação do fármaco na estrutura molecular, testes de ^{13}C -RMN foram realizados com o intuito de determinar a composição dos polímeros sintetizados nesta etapa. Os espectros obtidos quando a amoxicilina foi incorporada aos polímeros apresentaram interpretações semelhantes (ver Anexo), sendo ilustrado pela Figura 2.20.

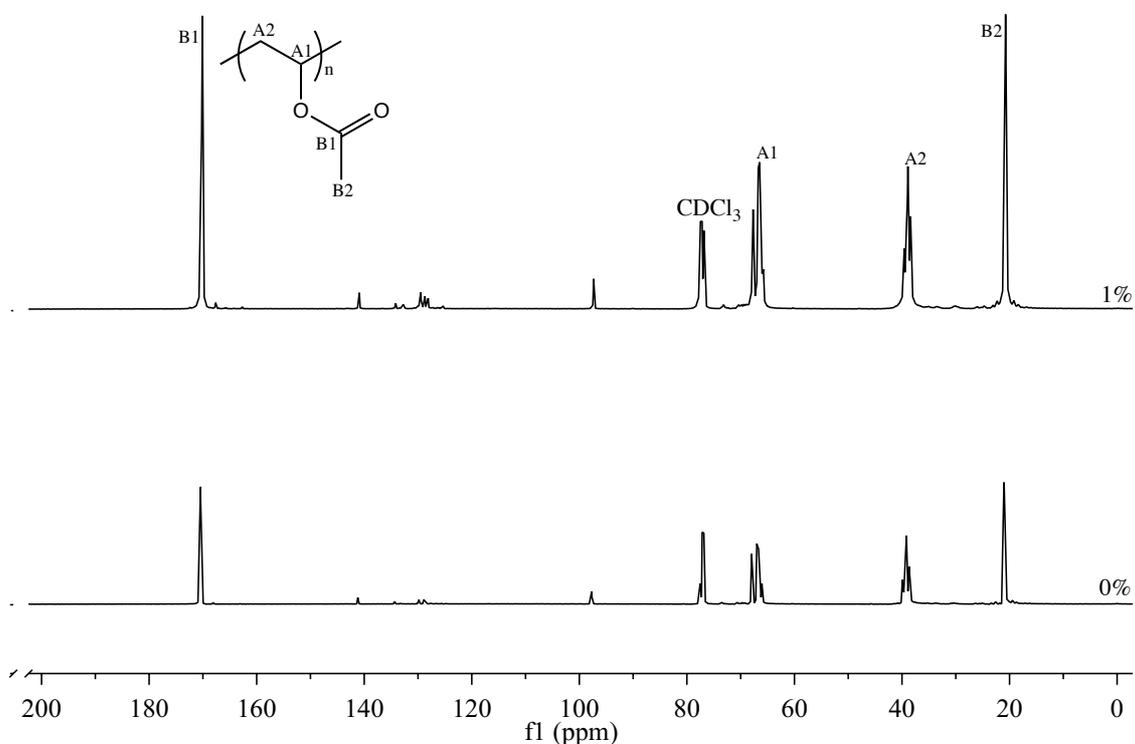


Figura 2.20 – Espectro de ^{13}C -RMN do PVAc sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina (0-1%) à fase orgânica da polimerização em suspensão do acetato de vinila.

Os espectros anteriormente apresentados na Figura 2.20 são referente às amostras de PVAc sintetizado na ausência ou com a incorporação *in situ* de 1% de amoxicilina à fase orgânica da homopolimerização em suspensão do acetato de vinila. Entretanto, neste e em todos os outros espectros analisados (ver Anexo), foi possível identificar os deslocamentos dos núcleos de carbono referentes ao PVAc ($\delta = 21.1, 38.7, 66.9$ e 170.3 ppm), além de outros sinais referentes ao resíduo de solvente (CDCl_3 , $\delta = 77.16$ ppm), ao iniciador (BPO, $\delta = 128.7$ ppm) e ao monômero (VAc, $\delta = 20.7, 97.4$ e 141.3 ppm). Entretanto, não foram observados deslocamentos específicos referentes aos núcleos de carbono da amoxicilina, podendo-se concluir que: (i) ou não ocorreu a incorporação através de ligação química entre as moléculas do fármaco e a matriz polimérica sintetizada, (ii) ou a incorporação foi muito pequena, estando próxima dos limites de detecção da técnica de ^{13}C -RMN.

A etapa de saponificação não foi realizada para este conjunto de amostras devido à natureza dos polímeros obtidos. Os baixos valores de T_g , a presença de monômero residual e tendência a formar polímeros ramificados produziu polímeros de PVAc com aspecto borrachoso e uma alta tendência a formar aglomerados, o que inviabilizou qualquer tipo de etapa de pós processamento.

2.4.2 Efeitos da incorporação *in situ* de amoxicilina nas reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila.

Para minimizar os efeitos de aglomeração, formação de polímeros *borrachosos* com alta tendência a formar aglomerados e de perda de morfologia esférica, como discutido anteriormente, acrescentou-se à formulação um comonômero (MMA), para que a temperatura de transição vítrea (T_g) do material fosse elevada e, desta maneira, o polímero obtido apresentasse uma característica *mais estável* na temperatura ambiente, possibilitando um melhor manuseio e pós-processamento das amostras após a primeira etapa de copolimerização em suspensão. A Tabela 2.7 especifica as reações realizadas nesta etapa.

Tabela 2.7 – Receita de copolimerização em suspensão.

Fase contínua	Fase dispersa	Quantidade (g)	Função
Água		420	Fase contínua
PVA		0,2	Agente de suspensão
	VAc	140	Comonômero
	MMA	60	Comonômero
	BPO	4	Iniciador
	Amoxicilina	0 – 2*	Fármaco modelo

PVA = poli(álcool vinílico); VAc = acetato de vinila; MMA = metacrilato de metila; BPO = peróxido de benzoila.

*0; 0,1; 0,5 ou 1% (m/m) em relação à massa total de comonômero; adição em apenas umas das fases.

Reações realizadas com temperatura do reator à 90 ± 5 °C e 600 rpm.

As metas propostas foram alcançadas (como discutido adiante), pois a substituição do VAc por uma mistura de comonômeros (VAc : MMA; 70:30) elevou a T_g do material, permitindo a síntese de copolímeros com características de pó uniforme, bem diferente dos homopolímeros de PVAc obtidos nas reações anteriores. As Figuras

2.21 e 2.22 apresentam as micrografias das partículas de PVAc-co-PMMA, obtidas com a adição de amoxicilina na fase orgânica (Figura 2.21) e na fase aquosa do sistema (Figura 2.22).

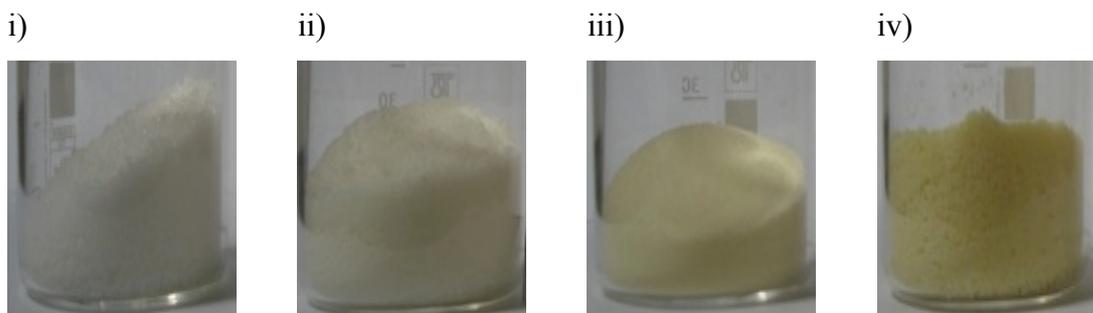


Figura 2.21 – PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina na fase orgânica da copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila.

i) PVAc-co-PMMA; ii) PVAc-co-PMMA + 0,1% de amoxicilina; iii) PVAc-co-PMMA + 0,5% de amoxicilina; iv) PVAc-co-PMMA + 1% de amoxicilina.

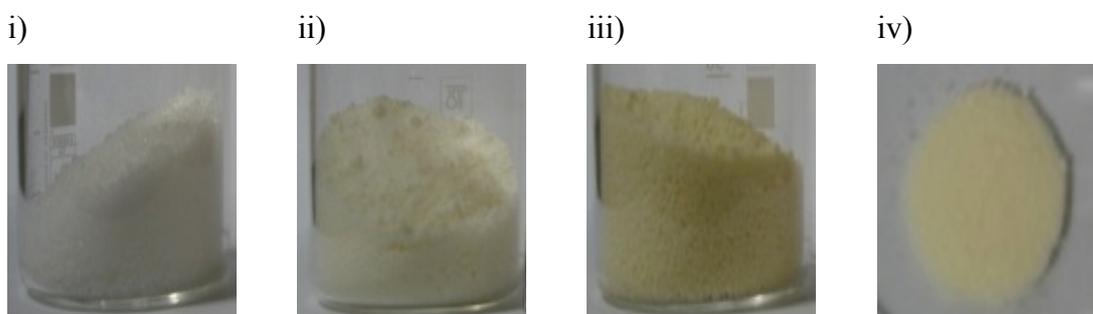


Figura 2.22 – PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina na fase aquosa da copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila.

i) PVAc-co-PMMA; ii) PVAc-co-PMMA + 0,1% de amoxicilina; iii) PVAc-co-PMMA + 0,5% de amoxicilina; iv) PVAc-co-PMMA + 1% de amoxicilina.

Embora, em termos de manuseio, as amostras de copolímero PVAc-co-PMMA com amoxicilina tenham apresentado desempenho bem superior ao dos polímeros de PVAc, as Figuras 2.23a e 2.23b permitiram concluir que a adição do fármaco *in situ* nas reações de polimerização parece perturbar a formação de micropartículas esféricas.

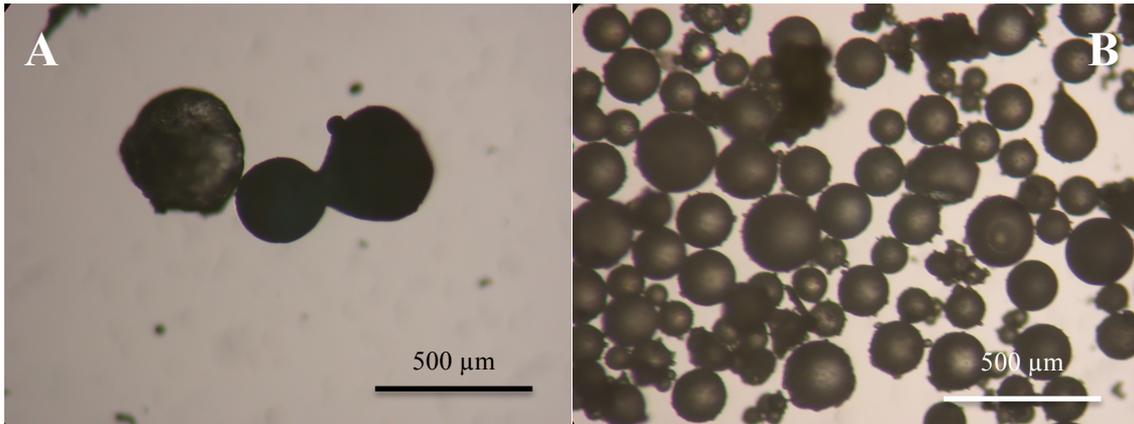


Figura 2.23 – Micropartículas de PVAc-co-PMMA sintetizadas com incorporação *in situ* de 1% de amoxicilina à fase orgânica (A) ou a fase aquosa (B) da copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila.

Embora a concentração de fármaco no meio seja relativamente baixa, essas primeiras observações podem ser um indício de que o fármaco tenha atividade superficial, o que levaria à modificação da tensão interfacial do meio e à modificação da morfologia das micropartículas obtidas.

A técnica de microscopia óptica possui grande utilidade para a identificação da morfologia das partículas sintetizadas; porém, a resolução desta técnica é limitada. Para observar a formação de possíveis microestruturas, algumas amostras foram investigadas utilizando a microscopia eletrônica de varredura. Como observado pela microscopia óptica, na microscopia eletrônica a morfologia esférica dos copolímeros também foi observada, porém com algumas diferenças nas características superficiais das partículas. A Figura 2.24 mostra detalhes da estrutura superficial e interna das micropartículas de PVA/PVAc-co-PMMA sintetizada por meio da copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila e posterior etapa de saponificação. As micropartículas podem apresentar deformações superficiais que alteram a morfologia esférica ideal. Entretanto, é provável que todas as partículas sejam densas e não possuam microestrutura porosa no interior da partícula.

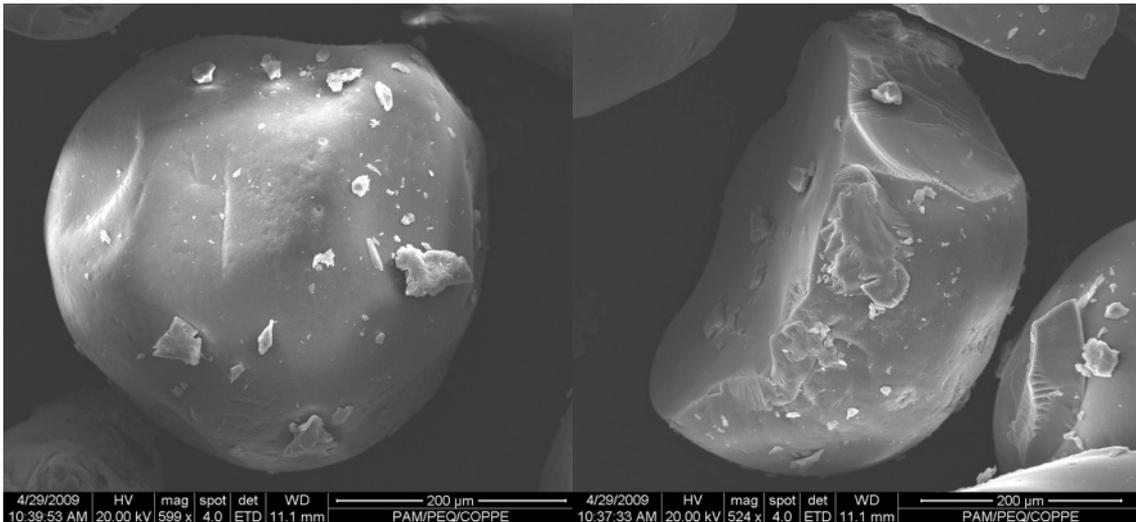


Figura 2.24 – Detalhe da superfície e do interior das micropartículas de PVA/PVAc-co-PMMA sintetizada por meio da copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila e posterior etapa de saponificação.

Quando o fármaco foi incorporado na fase orgânica da suspensão, as micropartículas apresentaram muitos e pequenos poros superficiais, como pode ser visto na Figura 2.25. O diâmetro característico desses poros variou de 500 a 1.000 nm de diâmetro. Além disso, estas micropartículas apresentaram uma rugosidade superficial bastante pronunciada e característica, além morfologia esférica mais regular, quando comparadas com as micropartículas sintetizadas sem a presença do fármaco nas mesmas condições de síntese. Na Figura 2.25 é possível identificar uma “*casca*”, com cerca de 5 µm, na superfície da partícula, indicando a atividade superficial do fármaco e a interação com o meio de reação. Outra característica observada foi de que, assim como para as partículas produzidas sem fármaco, as partículas sintetizadas com a adição de amoxicilina à fase orgânica da suspensão observadas também se apresentaram densas e sem a presença de microestruturas no interior das partículas, conforme Figura 2.25. Pelas observações realizadas durante as análises de microscopia e no processo de amostragem, é provável que todas as partículas apresentem essa densidade característica e a ausência de microestruturas no interior das mesmas.

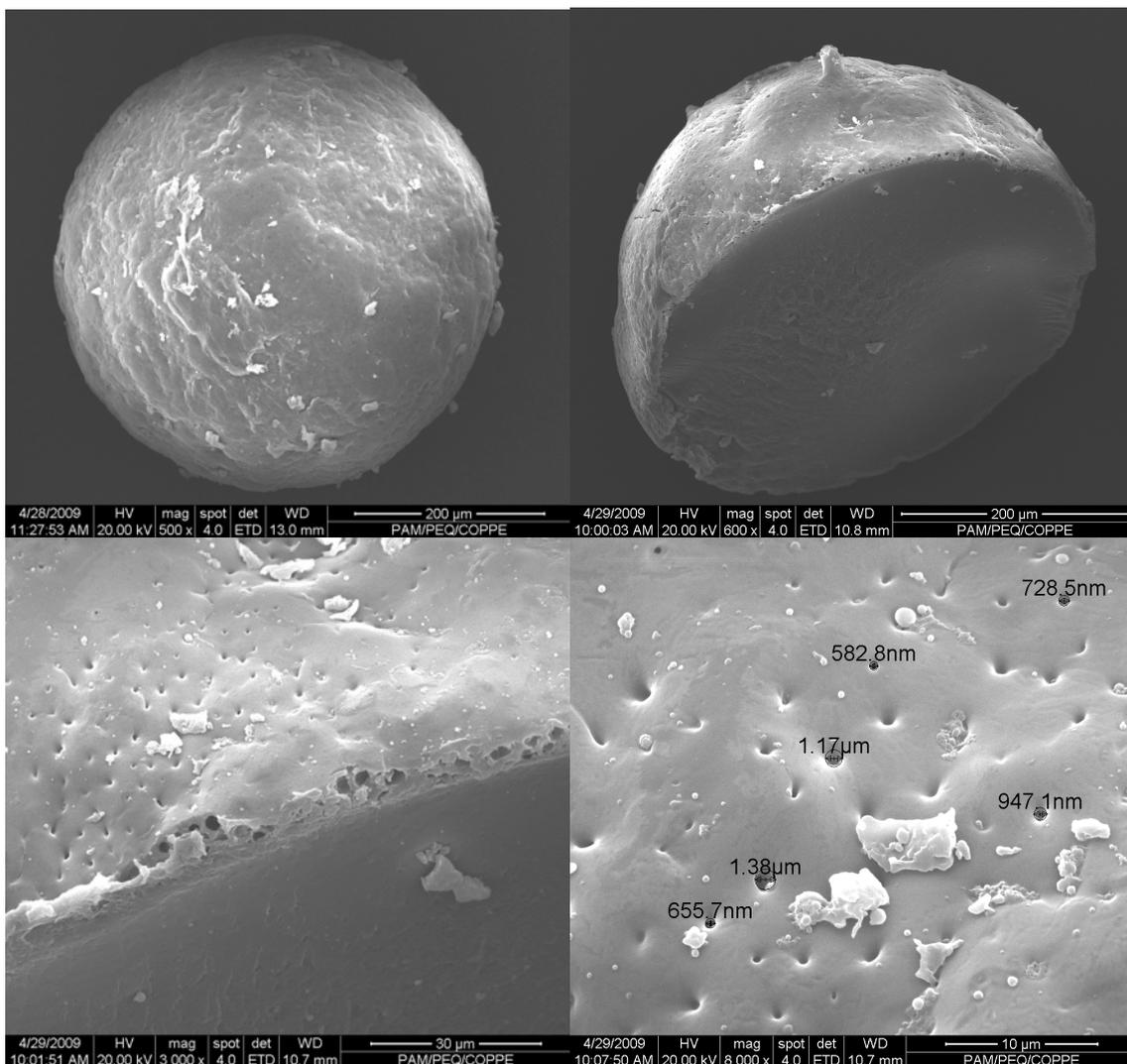


Figura 2.25 – Detalhe da superfície e interior de micropartículas de PVA/PVAc-co-PMMA sintetizadas com incorporação *in situ* de 1% de amoxicilina à fase orgânica da copolimerização em suspensão do acetato de vilina e metacrilato de metila e posterior etapa de saponificação.

A incorporação da amoxicilina na fase aquosa da suspensão levou em geral à formação de micropartículas com morfologia esférica bem definida, porém sem a presença de rugosidade superficial acentuada, como pode ser visto na Figura 2.26. Nestas micropartículas, além dos poros superficiais, foi verificada também a existência de poros nas camadas mais internas da matriz polimérica, provavelmente devido à incorporação de microgotas de água. Entretanto, é bastante provável que a maioria das partículas apresente uma estrutura densa em seu interior.

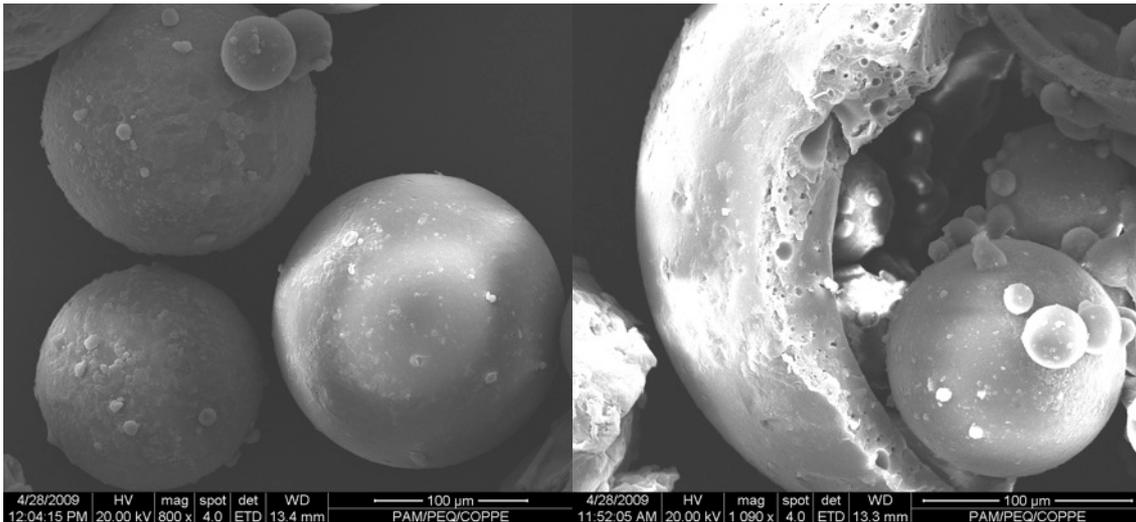


Figura 2.26 – Detalhe da superfície e interior de micropartículas de PVA/PVAc-co-PMMA sintetizadas com incorporação *in situ* de 1% de amoxicilina à fase aquosa da copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila e posterior etapa de saponificação.

As análises de microscopia óptica e eletrônica indicam que a incorporação do fármaco modelo influencia as propriedades morfológicas das micropartículas produzidas. Nos copolímeros produzidos, quando o fármaco foi adicionado ao sistema, obtiveram-se micropartículas com uma morfologia esférica mais bem definida. Uma hipótese a ser considerada é de que o fármaco atue como um co-estabilizante, fato este que pode ser observado mais facilmente quando o fármaco foi incorporado na fase aquosa da suspensão, onde sua solubilidade é aparentemente maior e onde a interação química com o meio reacional pode ser minimizada.

A polimerização em suspensão é um processo que gera partículas dentro de uma faixa de 20 a 2.000 μm . [43] Por esta razão, muitos pesquisadores escolhem esta técnica para a produção de polímeros para serem usados como agente embólicos. [52, 53, 92] Entretanto, como descrito anteriormente, além da morfologia esférica, é importante que as partículas apresentem uma distribuição homogênea de tamanho. Essa distribuição homogênea pode ser alcançada ajustando-se algumas variáveis do processo de polimerização, como a concentração do agente de suspensão, a velocidade de agitação,

etc. [43] ou através de pós-processamento da amostra, que consiste basicamente em etapas de moagem e tamisação. [92]

Embora o processo de tamisação seja muito empregado para separar as partículas em classes de tamanho bastante homogêneas (ex. 200-300 μm), observações práticas mostram que o processo de moagem pode gerar uma alta taxa de partículas quebradas, especialmente se estas partículas apresentaram altos valores de T_g , como no caso dos copolímeros de PVAc-co-PMMA, como discutido adiante.

A Figura 2.27 apresenta algumas micrografias onde é possível observar detalhes dos fragmentos dos copolímeros (sintetizados na presença de fármaco) após processo de moagem. Além de confirmar que estes fragmentos são oriundos de partículas esféricas, também foi observado que, em alguns casos, algumas micropartículas mostraram evidências de serem “ocas” e com a presença de alguns pequenos poros, contrastando com as partículas sintetizadas na ausência de qualquer tipo de fármaco, que apresentaram estrutura densa e sem nenhum tipo de poro no interior da partícula.

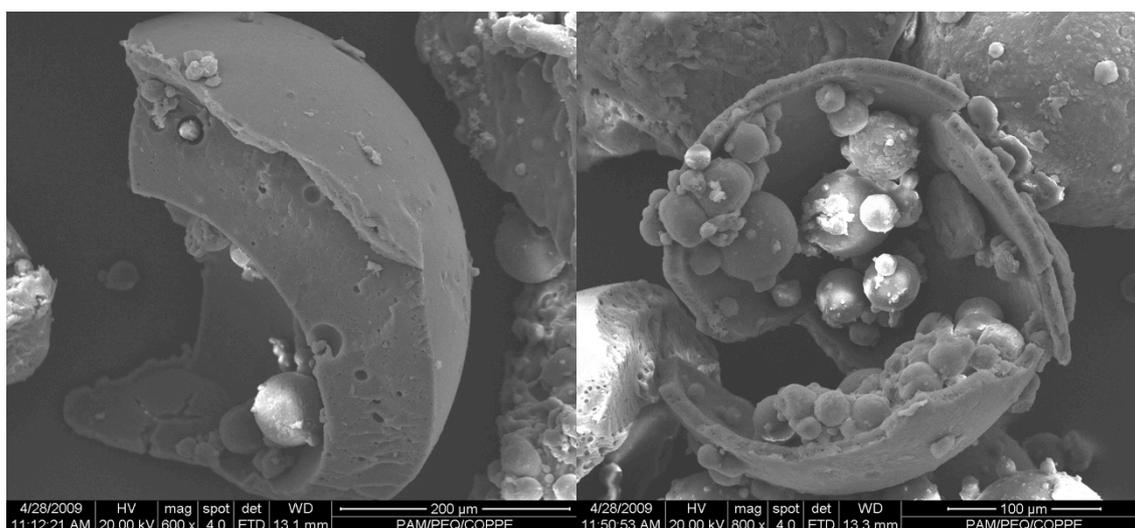


Figura 2.27 – PVAc-co-PMMA e PVA/PVAc-co-PMMA sintetizadas com incorporação *in situ* de 1% de amoxicilina à fase aquosa da copolimerização em suspensão do acetato de vilina e metacrilato de metila (esquerda) e após etapa de saponificação (direita).

A Tabela 2.8 contém os resultados de massa molar e temperatura de transição vítrea (T_g), como função da concentração e da fase na qual o fármaco foi adicionado, para os copolímeros de PVAc-co-PMMA. Novamente, a adição de fármaco no sistema de polimerização levou a mudanças significativas nos valores de massa molar e T_g do material. Entretanto, as distribuições de massas molares (Figura 2.28) indicam que essas alterações foram significativamente diferente do comportamento observados para os homopolímeros de PVAc.

Tabela 2.8 – Valores de massa molar e T_g do como função dos teores de amoxicilina no meio reacional da copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila a 90 °C.

Concentração de amoxicilina (% m/m)		Massa molar ($\times 10^{-3}$ g/mol)			T_g (°C)
Fase orgânica	Fase aquosa	M_n	M_w	M_w/M_n	
0	0	24	63	2,60	57,41
0,1	-	30	61	2,05	62,22
0,5	-	5	78	16,35	36,52
1,0	-	29	81	2,77	54,99
	0,1	33	66	2,02	66,53
	0,5	20	59	2,96	63,56
	1,0	49	78	1,59	82,32

Os dados da Tabela 2.8 e da Figura 2.28 indicam que nas reações de copolimerização com adição *in situ* de fármaco ocorreu novamente um aumento da massa molar com o aumento da concentração de fármaco no meio, confirmando observações anteriores. Entretanto, os valores de M_w obtidos foram bem inferiores aos obtidos com os homopolímeros de PVAc, fato este provavelmente resultante das taxas de terminação mais elevadas durante a copolimerização do acetato de vinila e do metacrilato de metila. [93]

Assim como observado para os homopolímeros de PVAc, novamente a relação “*massa molar x concentração de fármaco*” foi a oposta à esperada, uma vez que a expectativa era de que o fármaco pudesse atuar como um agente de transferência de cadeia.

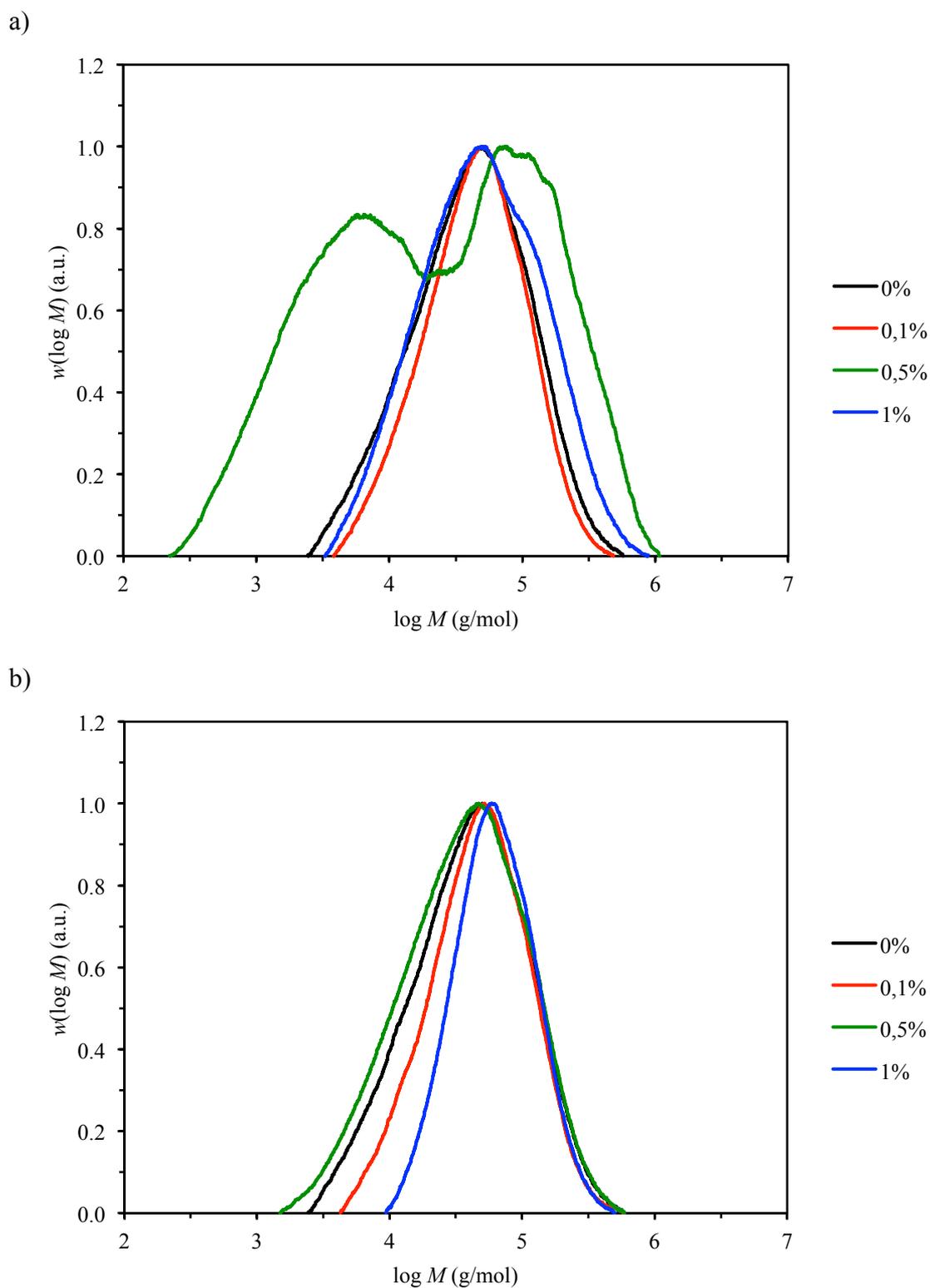


Figura 2.28 – Distribuições de massas molares dos copolímeros de PVAc-co-PMMA sintetizadas com incorporação *in situ* de amoxicilina à copolimerização em suspensão do acetato de vilina e metacrilato de metila. a) adição da amoxicilina na fase orgânica; b) adição da amoxicilina na fase aquosa.

A Tabela 2.9 mostra os resultado das massas molares como função da concentração e da fase na qual o fármaco foi adicionado, após o processo de saponificação (PVA/PVAc-co-PMMA). A Figura 2.29 mostra as curvas de distribuições de massa molar dos copolímeros, antes e após a etapa de saponificação.

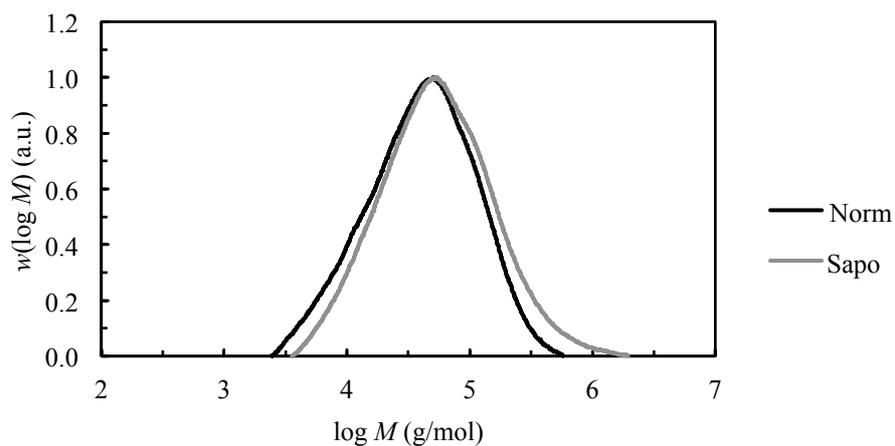
Tabela 2.9 – Valores de massa molar como função dos teores de amoxicilina no meio reacional da copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila a 90 °C e posterior etapa de saponificação.

Concentração de amoxicilina (% m/m)		Massa molar ($\times 10^{-3}$ g/mol)		
Fase orgânica	Fase aquosa	M_n	M_w	M_w/M_n
0	0	33	94	2,88
1	0	31	77	2,49
0	1	45	72	1,60

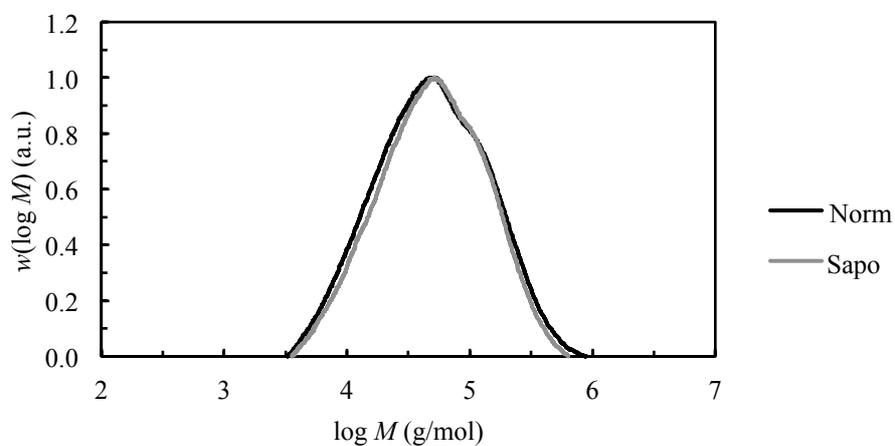
Os resultados mostram que a reação de saponificação não alterou de maneira significativa os valores das massas molares média dos copolímeros, exceto no caso em que o copolímero for sintetizado sem a presença de amoxicilina, em que se observou um ligeiro aumento no valor de massa molar do material.

Desta forma, os valores de M_w apresentados indicam que o fármaco incorporado *in situ* influencia o processo de polimerização e, através de possíveis interações do fármaco com o polímero em formação, as propriedades finais do material obtido. Como a hipótese de o fármaco atuar como um agente de transferência de cadeia, nesta faixa de concentração da amoxicilina, pode ser a princípio *descartada*, outras hipóteses devem então ser levantadas para tentar elucidar os comportamentos observados. Uma dessas hipóteses, como já discutido, é admitir que parte das moléculas da amoxicilina atua como comonômero e/ou um agente reticulante durante o processo de polimerização (o que é compatível com a estrutura molecular multifuncional e insaturada da molécula de amoxicilina).

a)



b)



c)

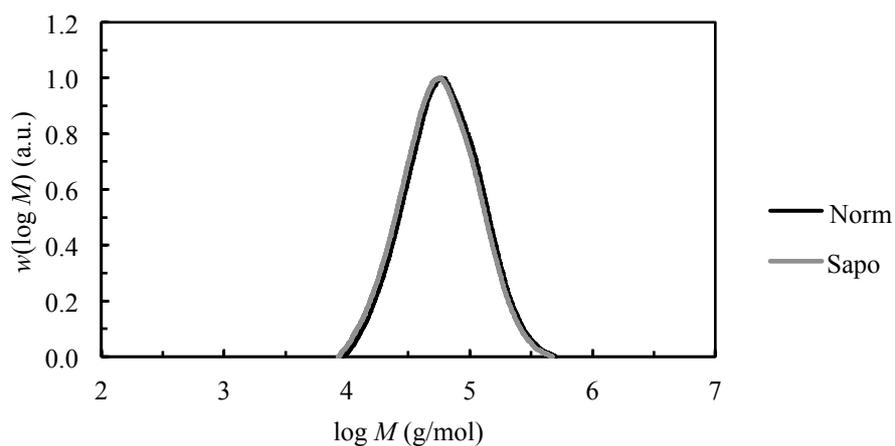


Figura 2.29 – Distribuições de massas molares dos copolímeros de sintetizadas com incorporação *in situ* de amoxicilina à copolimerização em suspensão do acetato de vilina e metacrilato de metila. (a) sem adição de amoxicilina; (b) adição de 1% de amoxicilina na fase orgânica; (c) adição de 1% de amoxicilina na fase aquosa. “Norm” = PVAc-co-PMMA, “Sapo” = PVA/PVAc-co-PMMA.

Para tentar elucidar a hipótese de incorporação do fármaco na estrutura molecular, análises de ^{13}C -RMN foram realizados com o intuito de determinar a composição dos copolímeros sintetizados. Todos os espectros obtidos (ver Anexo) apresentaram interpretações semelhantes e são ilustrados nas Figuras 2.30 e 2.31.

Nos espectros analisados, foi possível identificar os deslocamentos dos núcleos de carbono referentes ao PVAc, PMMA e PVA (quando presente), além de outros sinais, referentes à resíduos do solvente (CDCl_3 , $\delta = 77.16$ ppm), do iniciador (BPO, $\delta = 128.7$ ppm) e comonômeros (VAc, $\delta = 20.7, 97.4$ e 141.3 ppm; MMA, $\delta = 18.5, 51.6$ e 167.8 ppm). Entretanto, assim como observado nos homopolímeros de PVAc, novamente não foram observados deslocamentos específicos referentes aos núcleos de carbono da amoxicilina.

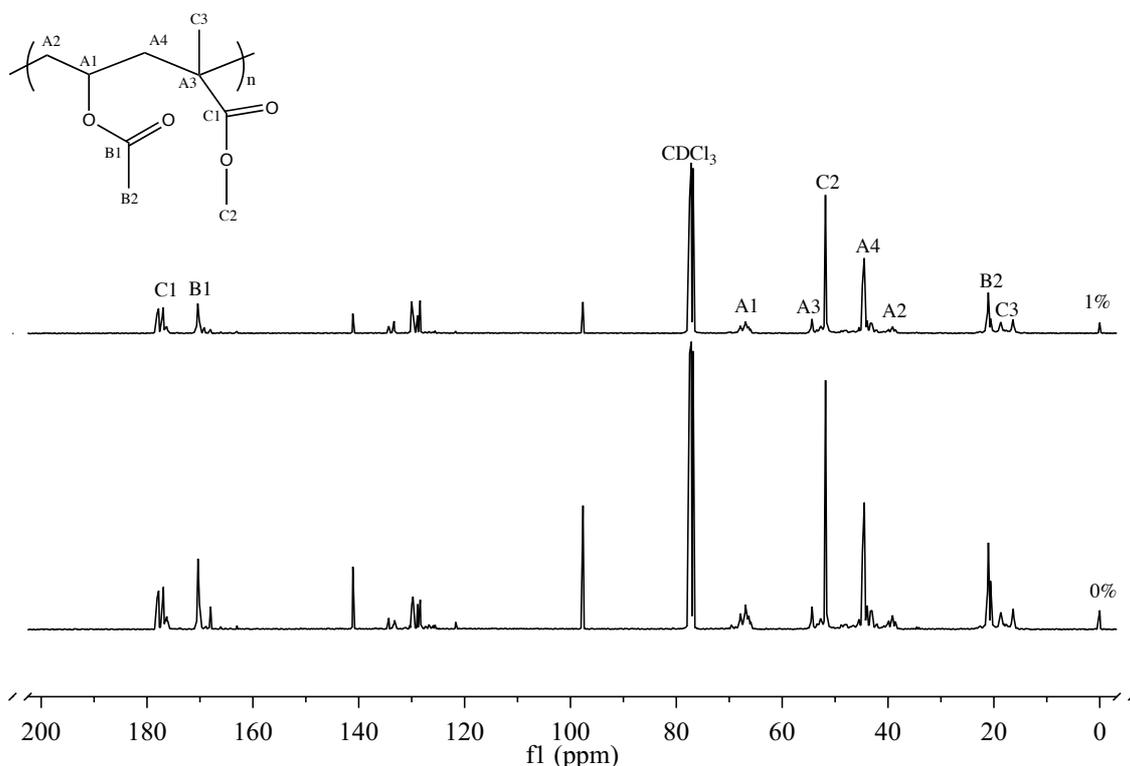


Figura 2.30 –Espectro de ^{13}C -RMN do PVAc-co-PMMA sintetizado na ausência e com incorporação *in situ* de 1% de amoxicilina à fase orgânica da copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila (copolímero aleatório).

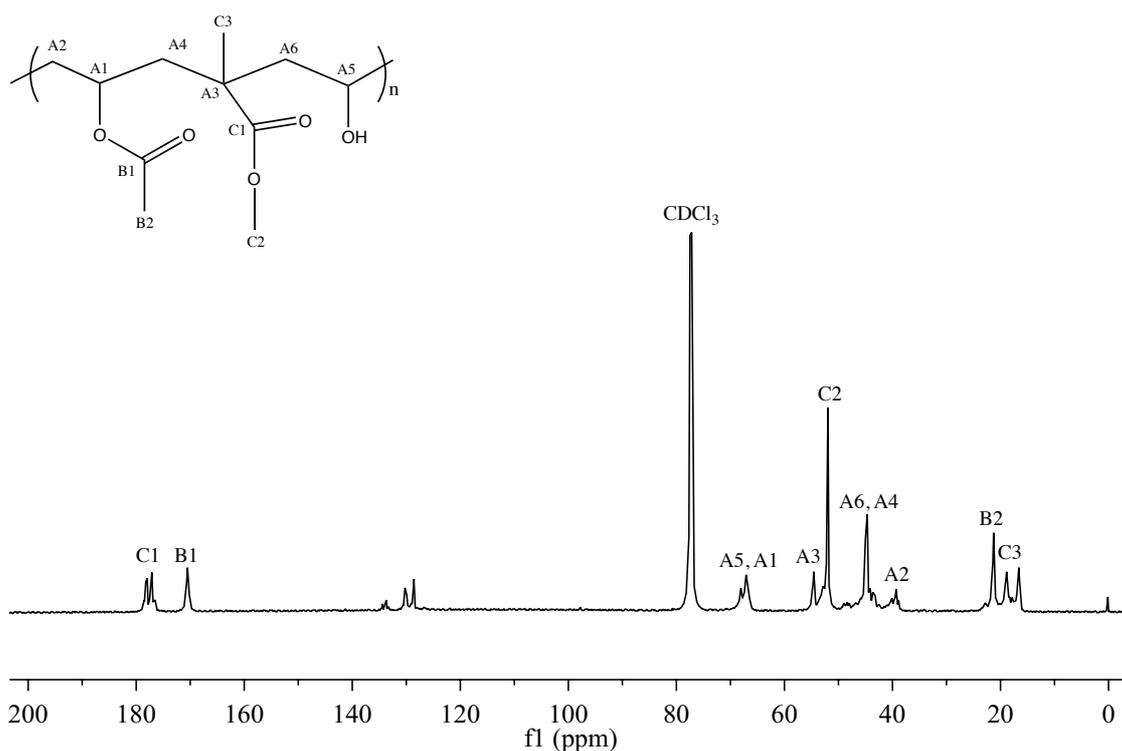


Figura 2.31 –Espectro de ^{13}C -RMN do PVA/PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de 1% de amoxicilina à fase orgânica da copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila e posterior etapa de saponificação (copolímero aleatório).

Uma vez que não foram observados deslocamentos específicos referentes aos núcleos de carbono da amoxicilina, pode-se concluir que: ou não ocorreu a incorporação através de ligação química entre as moléculas do fármaco e a matriz polimérica sintetizada, ou a incorporação foi muito pequena – estando próxima dos limites de detecção da técnica de ^{13}C -RMN (ao redor de 1%).

A técnica de RMN pode ser usada com um caráter quantitativo quando o foco está voltado a definir a composição de uma amostra. Esse estudo é realizado calculando-se a área dos picos referentes aos carbonos e fazendo correlações de proporcionalidade. A Tabela 2.10 a seguir apresenta os cálculos de composição dos copolímeros sintetizados, com maiores detalhes apresentados no Anexo desta Tese.

Table 2.10 – Composição dos copolímeros sintetizados.

Copolímero	% PVAc	% PMMA	% PVA
PVAc-co-PMMA	21.7	78.3	0
PVA/PVAc-co-PMMA	15.4	78.0	6.6
PVAc-co-PMMA 1% (fase orgânica)	38.7	61.3	0
PVA/PVAc-co-PMMA 1% (fase orgânica)	15.3	76.3	8.3

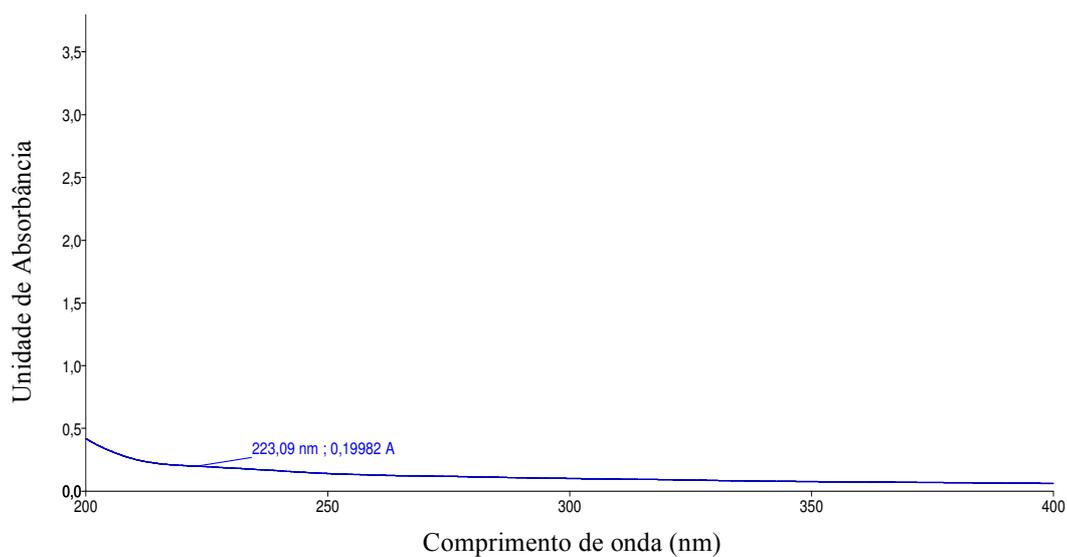
PVAc = poli(acetato de vinila); PMMA = poli(metacrilato de metila); PVA = poli(álcool vinílico).

Embora os resultados de ^{13}C -RMN não tenham sido conclusivos, uma hipótese provável é a de que parte das moléculas de amoxicilina estejam ligadas à matriz polimérica de forma não covalente. Isso permitiria que parte significativa deste fármaco possa ser liberado ou difundido para um meio extrator. É importante observar que, mesmo que esta hipótese seja confirmada, não seria possível concluir que uma pequena fração das moléculas não tenha interagido quimicamente com a matriz polimérica no momento da polimerização, já que foram apresentados indícios de modificação da estrutura molecular do material produzido.

Para verificar se os polímeros sintetizados com a incorporação da amoxicilina *in situ* apresentava algum perfil de liberação do fármaco, foram realizados testes de *liberação*. Estes testes consistiram em extrair o fármaco para um meio aquoso e posteriormente determinar a quantidade de amoxicilina presente neste meio.

Utilizando uma solução extratora de LSS 1%, determinaram-se os comprimentos de onda, na região do UV-Vis, onde ocorrem os máximos de absorção da amoxicilina neste meio (228 e 274 nm). Além disso, foi observado que os extratos obtidos dos polímeros apresentavam perfis de absorção distintos na região do UV-Vis (Figura 2.32), o que permitiu correlacionar as absorções lidas com a liberação do fármaco para o meio extrator.

a)



b)

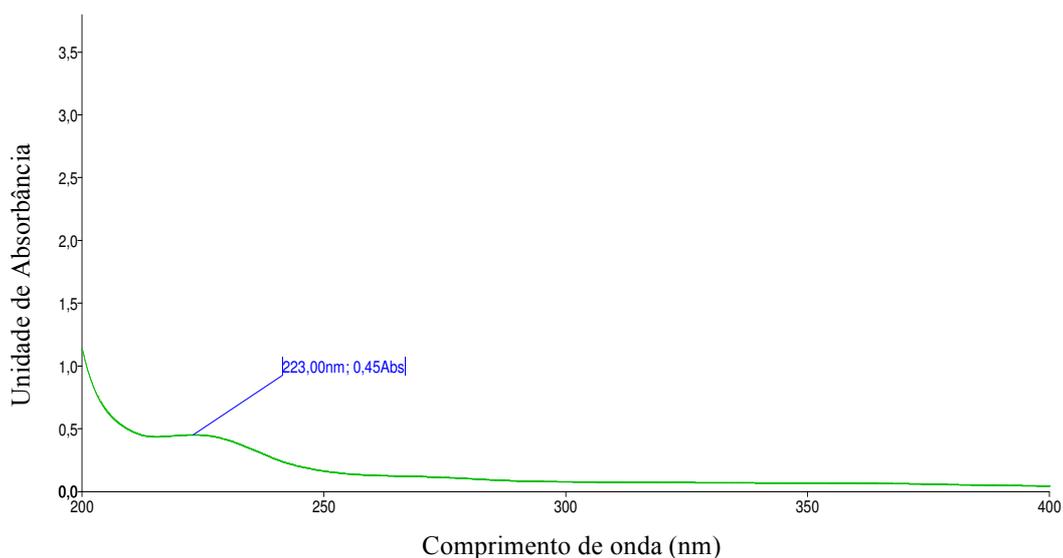


Figura 2.32 – Exemplo de espectro de varredura na região do UV-Vis de extrato de copolímero em solução extratora de lauril sulfato de sódio 1%. a) PVAc-co-PMMA; b) PVAc-co-PMMA com 1% de amoxicilina (fase orgânica).

Como todas as amostras apresentaram absorção nos comprimentos de onda específicos da amoxicilina (228 e 274 nm), para poder estabelecer apenas a absorção associada ao fármaco, a absorção dos polímeros sem fármacos (PVAc-co-PMMA e PVA/PVAc-co-PMMA) nestes comprimentos de onda específicos foram descontados

para fins de cálculo. A Tabela 2.11 resume os resultados dos testes de liberação de amoxicilina dos copolímeros de PVAc-co-PMMA e PVA/PVAc-co-PMMA, utilizando curvas analíticas de amoxicilina na mesma solução extratora como referências para os cálculos das concentrações de amoxicilina liberada (Figuras 2.33a e 2.33b).

Tabela 2.11 – Teor de amoxicilina liberada dos copolímeros.

Amostra	228 nm		274 nm	
	A	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	A	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)
PVAc-co-PMMA	-	-	-	-
PVA/PVAc-co-PMMA	-	-	-	-
PVAc-co-PMMA 1% (org)	-	-	-	-
PVA/PVAc-co-PMMA 1% (org)	$0,26 \pm 0,02$	$24,12 \pm 1,90$	$0,03 \pm 0,00$	$26,69 \pm 3,26$
PVAc-co-PMMA 1% (aquo)	$0,52 \pm 0,01$	$48,19 \pm 1,37$	$0,08 \pm 0,01$	$59,77 \pm 5,44$
PVA/PVAc-co-PMMA 1% (aquo)	$0,05 \pm 0,01$	$4,81 \pm 0,92$	-	-

PVAc = poli(acetato de vinila); PMMA = poli(metacrilato de metila); PVA = poli(álcool vinílico).
A = absorvância; Conc. = concentração da amoxicilina liberada; média \pm desvio padrão, n = 2

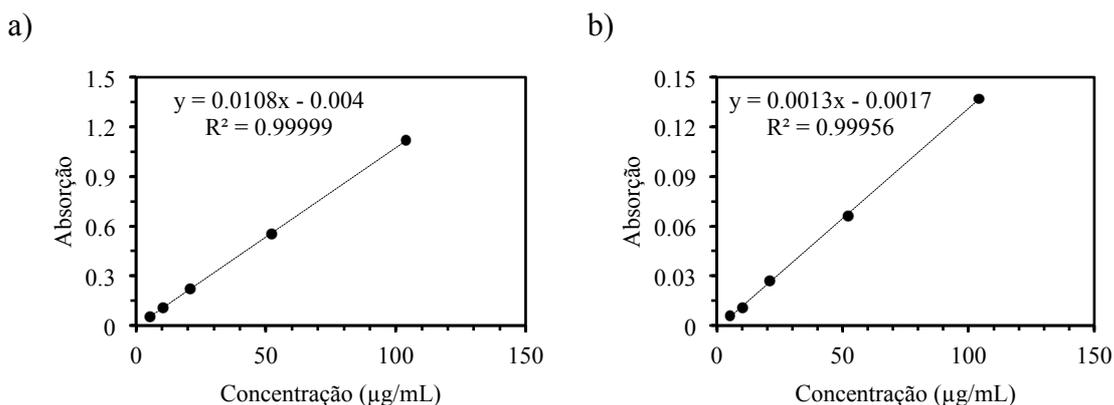


Figura 2.33 – Curvas analíticas de amoxicilina em solução de lauril sulfato de sódio 1%.

a) leitura em comprimento de onda = 228 nm; b) leitura em comprimento de onda = 274 nm.

Pelos dados obtidos por espectrofotometria na região do UV-Vis, pode-se concluir que ocorreu a extração de quantidades apreciáveis do fármaco em algumas amostras, demonstrando que parte da amoxicilina não se encontra ligada covalentemente às cadeias poliméricas. Entretanto, é pouco provável que o procedimento de extração tenha esgotado toda amoxicilina *adsorvida* (de forma não-covalente) nas partículas de copolímeros, uma vez que o tempo de extração do fármaco

foi de apenas 2 horas. Desta forma, embora apreciáveis quantidades de amoxicilina tenha sido liberada das partículas durante o processo de extração, é provável que ainda haja uma fração adsorvida e possivelmente outra (provavelmente em menor quantidade) ligada covalentemente nas cadeias de copolímero. Sendo assim, os dados apresentados na Tabela 2.11 servem como um *bom* indicativo de que a maior fração de amoxicilina está adsorvida nas partículas; e um *incerto* indicativo da eficiência de incorporação e/ou fração de fármaco ligada covalentemente às cadeias poliméricas.

De acordo com o perfil de liberação observado na Tabela 2.11, pode-se admitir que, quando o fármaco é incorporado na fase orgânica, este encontra-se disperso de forma mais homogênea no interior da partícula, o que reduz de forma significativa a quantidade do fármaco extraído destas partículas. Entretanto, quando estas partículas são saponificadas, pode-se observar a liberação de fármaco para o meio. Este perfil de liberação nas partículas com “*casca*” de PVA pode ser associado a uma maior facilidade de penetração do meio extrator nas partículas e, com isso, uma transferência de massa mais facilitada.

Entretanto, quando o fármaco foi incorporado na fase aquosa do sistema, o perfil de liberação observado foi o oposto. Nas partículas não saponificadas, observou-se um perfil de liberação significativo do fármaco. Isso aponta para a existência de uma maior concentração de fármaco na superfície da partícula, o que já poderia ser esperado, uma vez que nas polimerizações em suspensão as reações ocorrem essencialmente na fase orgânica. A não liberação do fármaco quando os copolímeros foram saponificados pode estar associado à “*destruição*” e pré-extração do fármaco, ocasionada pelas condições de saponificação empregadas. Baseado nas observações feitas anteriormente, foi proposto um mecanismo esquemático do possível comportamento de distribuição da

amoxicilina nas matrizes poliméricas, antes e após o processo de saponificação, como ilustrado na Figura 2.34.

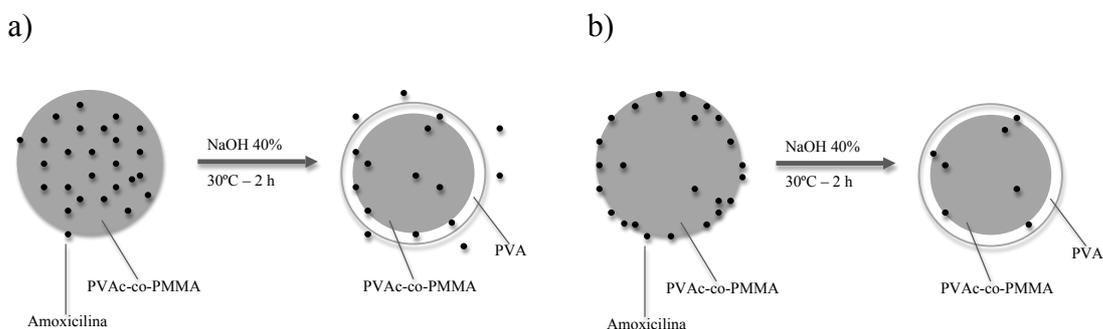


Figura 2.34 – Perfil hipotético de distribuição de amoxicilina nos copolímeros antes (PVAc-co-PMMA) e após etapa de saponificação (PVA/PVAc-co-PMMA); a) amoxicilina incorporada *in situ* através da fase orgânica do sistema; b) amoxicilina incorporada *in situ* através da fase aquosa do sistema.

Uma observação pertinente pode ser feita a respeito da produção da casca de PVA na superfície das micropartículas de PVAc-co-PMMA. Conforme visto por FINCH, [49] os meros de PMMA dificilmente são atacados nesse tipo de reação de hidrólise. Mesmo em condições *drásticas*, apenas uma pequena porcentagem de PMMA sofre hidrólise, conforme ilustrado na Figura 2.35. Assim, pode-se admitir que no processo de saponificação empregado, apenas os radicais acetatos presente na superfície das partículas de copolímero sofreram reação de hidrólise.

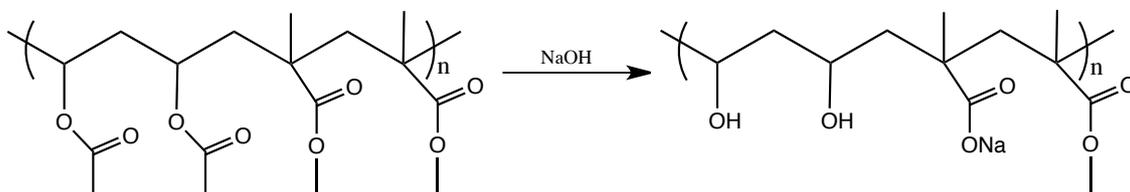


Figura 2.35 – Esquematização da reação de saponificação de copolímero de PVAc-co-PMMA conforme descrito por FINCH. [49]

2.5 Conclusões

Reações de homopolimerização e copolimerização em suspensão foram realizadas na presença de amoxicilina, para a síntese de micropartículas poliméricas para uso em embolização vascular. Observou-se que de fato é possível incorporar a amoxicilina nas micropartículas poliméricas no momento de sua síntese. Entretanto, dependendo da estratégia e concentração da amoxicilina incorporada *in situ*, foram observadas diversas alterações na morfologia e nas características moleculares dos polímeros produzidos.

Embora seja possível produzir micropartículas de PVAc por meio da polimerização em suspensão do acetato de vinila, os polímeros sintetizados na presença de amoxicilina apresentaram aspecto *borrachoso*, tendência a formar aglomerados e perda da morfologia esférica. A incorporação *in situ* de fármaco, na faixa de 0,1 a 1%, ocasionou significativas alterações nas propriedades moleculares finais do PVAc produzido. Este fato foi comprovado por alterações nos valores de massa molar e temperatura de transição vítrea das micropartículas de PVAc, em função da concentração de fármaco e estratégia de incorporação.

A utilização do MMA como comonômero permitiu a síntese de micropartículas de PVAc-co-PMMA, na presença de amoxicilina, com morfologia esférica e sem tendência a formar aglomerados. Análises mais detalhadas das micropartículas permitiram concluir que a estratégia de incorporação da amoxicilina possui influência direta na morfologia das micropartículas. Assim como observado para as micropartículas de PVAc, a incorporação *in situ* de amoxicilina na faixa de 0,1 a 1%, também ocasionou significativas alterações nas propriedades moleculares finais dos copolímeros de PVAc-co-PMMA produzidos. Este fato foi comprovado por alterações

nos valores de massa molar e temperatura de transição vítrea das micropartículas, em função da concentração de fármaco e estratégia de incorporação.

Os resultados obtidos para as micropartículas de PVAc-co-PMMA permitem concluir que, pelas mudanças nas morfologias das micropartículas, é provável que a amoxicilina possua algum tipo de atividade superficial, mesmo presente em pequenas concentrações. Também é provável o fato de que a amoxicilina modifique o mecanismo de polimerização, uma vez que foram observadas significativas alterações nas propriedades dos copolímeros sintetizados.

Adicionalmente, os experimentos de liberação de fármaco indicaram que grande parte da amoxicilina incorporada não está ligada quimicamente às cadeias poliméricas, fato este também confirmado por análises de RMN. Os experimentos de liberação de amoxicilina dos copolímeros de PVAc-co-PMMA e PVA/PVAc-co-PMMA também indicaram que a distribuição do fármaco nas partículas está associada à sua estratégia de incorporação *in situ* e que o perfil de liberação da amoxicilina está intimamente ligada à etapa de saponificação, responsável pela formação da *casca* de PVA.

Capítulo 3

Síntese de micropartículas poliméricas com a incorporação *in situ* de fármacos via polimerização em suspensão – Parte 2

No Capítulo anterior foi mostrado que a incorporação *in situ* de amoxicilina durante a polimerização em suspensão promove significativas alterações nas propriedades morfológicas e moleculares dos polímeros sintetizados. Neste Capítulo é feito um estudo mais detalhado dessas alterações, incluindo um estudo sobre a influência dos fármacos na cinética da polimerização em suspensão. Além da amoxicilina, também são descritos os efeitos da incorporação *in situ* da doxorubicina, na copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila.

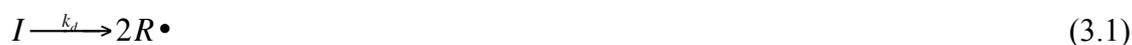
3.1 Introdução

3.1.1 Cinética da polimerização em suspensão

Os processos de polimerização via radicais livres são largamente empregados para a produção de polímeros comerciais. A escolha deste processo para implementação em plantas industriais é devida a algumas vantagens frente a outros métodos de polimerização. Dentre estas vantagens, é possível citar (i) a possibilidade de usar uma larga gama de monômeros, (ii) tolerância à presença de grupos funcionais contaminantes, (iii) condições reacionais amplas e (iv) possibilidade de usar distintas técnicas de polimerização. [3] Desta forma, o processo de polimerização via radicais livres é uma técnica fácil de ser implementada, sendo considerada relativamente de baixo custo, quando comparada a outras tecnologias disponíveis.

As reações de polimerização via radicais livres podem ser descritas em termos de equações matemáticas clássicas, que descrevem de maneira resumida o mecanismo cinético das reações. As etapas e o mecanismo cinético podem ser descritos em termos das seguintes etapas:

Iniciação:



Propagação:



Terminação:



A primeira etapa da reação é a *iniciação*, em que os radicais livres são gerados. Normalmente são usados iniciadores químicos que geram radicais livres por decomposição térmica; [3, 42] porém, outros tipos de iniciação (fotoquímica, radiação ionizante, etc.) podem ser empregados para a geração de radicais livres. [1, 3, 94] A etapa de iniciação está relacionada à geração do radical primário (R•) por decomposição do iniciador (I) e à combinação deste radical com uma molécula de monômero (M), que culmina na formação da primeira cadeia de polímero vivo (P₁•), com comprimento de cadeia unitário.

Conforme descrito por ODIAN, [3] na etapa de iniciação anteriormente descrita o consumo do iniciador químico usado para gerar os radicais livres pode ser descrita pela Equação 3.6, embora a decomposição dos iniciadores químicos geralmente seja expressa em termos de *meia-vida* (t_{1/2}), conforme descrito na Equação 3.7.

$$\frac{-d[I]}{dt} = k_d[I] \quad (3.6)$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_d} \quad (3.7)$$

onde k_d é a constante cinética de decomposição do iniciador.

Iniciadores químicos com diferentes estruturas possuem taxas de decomposição e tempo de *meia-vida* (t_{1/2}) distintos; porém, a temperatura, e também o solvente usado na polimerização, exercem influência direta no tempo de *meia-vida* (t_{1/2}) de um

determinado iniciador químico, sendo que o tempo *meia-vida* ($t_{1/2}$) diminui quando a temperatura do sistema é aumentada. Como atualmente existe uma grande variedade de iniciadores químicos disponíveis comercialmente, as constantes de dissociação térmica (k_d) podem ser facilmente encontradas na literatura científica, facilitando desta forma a determinação do tempo de *meia-vida* ($t_{1/2}$) do iniciador em um determinado solvente e temperatura. [95]

Conforme descrito anteriormente, a etapa de iniciação é constituída de duas reações, sendo a primeira delas (decomposição do iniciador) a etapa determinante da iniciação. Assim, a taxa de geração dos radicais primários responsáveis pela formação das cadeias pode ser representada pela Equação 3.8, em que f representa a eficiência do iniciador (ou seja, fração de iniciador efetivamente útil na formação do polímeros):

$$R_r = 2fk_d[I] \quad (3.8)$$

Na segunda etapa da reação, a *propagação*, ocorre o crescimento da cadeia polimérica por meio de seguidas incorporações de monômeros (M) à espécie ativa em crescimento ($P_n\bullet$), gerando uma cadeia de polímero com comprimento cada vez maior ($P_{n+1}\bullet$). A *taxa de polimerização* pode então ser associada principalmente ao consumo do monômero durante essa etapa da reação. Embora haja um pequeno consumo de unidades monoméricas na etapa de *iniciação*, este consumo pode ser negligenciado frente ao grande consumo de monômero na etapa de propagação. Assim, a *taxa de polimerização* (ou *taxa de consumo de monômero*) pode ser definido na forma

$$R_p = k_p[P_n\bullet][M] \quad (3.9)$$

onde $[M]$ é a concentração de monômero e $[P_n\bullet]$ é a quantidade total de cadeias em crescimento. [3]

A última etapa da reação compreende a terminação, quando ocorre a *morte* (ou perda de atividade) do radical livre. A terminação pode ocorrer por combinação, quando duas espécies ativas em crescimento ($P_n\bullet$ e $P_m\bullet$) reagem, formando uma cadeia polimérica *morta* de comprimento maior (Λ_{n+m}). A etapa de terminação também pode ocorrer por desproporcionamento. Nesse caso, ao invés de duas cadeias poliméricas ativas se combinarem formando uma espécie maior, elas reagem formando duas espécies *mortas* similares (Λ_n e Λ_m). Como ocorre a abstração de um átomo de hidrogênio de uma das cadeias nessa etapa, uma das espécies *mortas* formada é insaturada, o que pode ser importante para descrever a estabilidade química final do material produzido. [3]

Existem ainda outros tipos de etapas em que cadeias de polímero mortas são formadas. Por exemplo, durante a etapa conhecida como de transferência de cadeia, as espécies ativas ($P_n\bullet$) podem transferir a atividade para uma outra espécie, como o solvente ou o monômero, formando uma cadeia de polímero morta (Λ_n) e uma espécie ativa que continua a reação. Essa etapa costuma controlar a massa molar do polímero final, porque ela interrompe o crescimento da cadeia.

Na polimerização via radicais livres em geral admite-se como válida a hipótese de estado-estacionário para a concentração de radicais (Equação 3.10). De acordo com essa hipótese, a concentração de radicais atinge quase que instantaneamente um patamar e permanece em equilíbrio durante toda a reação, uma vez que as taxas de iniciação (R_i) e as taxas de terminação (R_t) são muito elevadas e, por isso mesmo, iguais. [3]

$$R_i = R_t = k_t[P\bullet]^2 \quad (3.10)$$

Reorganizando a Equação 3.10 e substituindo-a na Equação 3.9, obtém-se a expressão da *taxa de polimerização* (3.11), que geralmente é expressa na forma da Equação 3.12 ao se substituir o termo “ R_i ”, previamente definido.

$$R_p = k_p[M] \left(\frac{R_i}{k_t} \right)^{1/2} \quad (3.11)$$

$$R_p = k_p[M] \left(\frac{2fk_d[I]}{k_t} \right)^{1/2} \quad (3.12)$$

As polimerizações que ocorrem via radicais livres apresentam algumas peculiaridades quanto à cinética de reação. Uma delas é o efeito gel (também conhecido como efeito *Trommsdorff* ou efeito *Norrish-Smith*), que é uma auto-aceleração da reação. [1] Normalmente, espera-se que a taxa de reação diminua com o tempo, principalmente por causa do consumo dos reagentes. Na presença do efeito gel pode ocorrer o oposto, observando-se uma dramática aceleração da cinética de reação quando as conversões atingem faixas de 20-40%. [3] Este efeito é consequência da diminuição das reações de terminação devido à menor mobilidade das cadeias poliméricas em um meio progressivamente mais viscoso. [1, 96] A ocorrência do efeito gel pode ser operacionalmente perigosa, pois a auto-aceleração pode ocasionar a elevação da temperatura dentro do reator de maneira muito brusca, além de afetar diretamente as propriedades finais do polímero sintetizado. [42, 96]

Outro efeito bastante comum em polimerizações via radicais livres é o *efeito vítreo*. Normalmente, à medida que a conversão aumenta, a fração da fase polimérica

também aumenta, fazendo com que esta passe gradualmente para o estado sólido (vítreo). Assim, quando a polimerização é realizada a uma temperatura inferior à temperatura de transição vítrea do material (que aumenta com a conversão) observa-se a diminuição da constante de propagação da reação, influenciada por uma menor mobilidade das moléculas de monômero dentro da fase dispersa do sistema. [46, 96] Esse efeito reduz a taxa efetiva de reação e contribui com a manutenção de altos teores de monômero residual no meio.

Quando dois ou mais monômeros distintos são usados no mesmo processo de polimerização, diz-se que o processo é de copolimerização. As espécies monoméricas usadas na copolimerização, chamadas de comonômeros, podem ser distribuídas de diversas formas ao longo da cadeia de polímero. A distribuição pode ser aleatória, alternada, em blocos ou na forma de enxertos. [3, 42] Em cada caso, obtém-se um conjunto distinto de propriedades para o produto final, de maneira que não é possível descrever o sistema apenas com base na composição do copolímero obtido.

As reações de copolimerização possuem uma importância tecnológica muito grande, uma vez que é possível modificar as propriedades de um material polimérico adicionando-se um segundo monômero à reação de polimerização. Além disso, as reações de copolimerização permitem a produção de uma vasta gama de materiais com propriedades distintas, uma vez que é possível utilizar diversas combinações de monômeros em diversas concentrações e manipulando diferentes variáveis de processo. Essas características fazem com que as reações de copolimerização tenham grande importância industrial, de maneira que grande parte dos materiais poliméricos produzidos são resultantes de reações de copolimerização. [3]

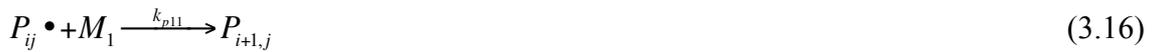
Assim como nas reações de *homopolimerização*, em que apenas um monômero é usado, as reações de copolimerização também apresentam as etapas de iniciação,

propagação e terminação. Entretanto, com a adição de um segundo monômero à reação de polimerização, o modelo matemático usado deve incluir novas equações, para desta forma descrever melhor o sistema. Essas equações, descritas a seguir, são equações que descrevem o mecanismo clássico de copolimerizações via radicais livres em solução, sendo as notações aqui apresentadas as mesmas utilizadas por PINTO & RAY. [93]

Iniciação



Propagação



Terminação



Conforme revisto por ODIAN, [3] o mecanismo de copolimerização normalmente se baseia no modelo último, que admite que a reatividade das cadeias vivas (cadeias em crescimento) depende unicamente da atividade da unidade terminal,

sendo a composição final do copolímero dependente deste fator. Desta maneira, supondo que dois monômeros (M_1 e M_2) possam ser copolimerizados, é possível descrever quatro possíveis reações na etapa de propagação da copolimerização (conforme demonstrado anteriormente) e novos parâmetros que descrevem a propagação cruzada (Equação 3.23) e a terminação cruzada (Equação 3.24) nas reações de copolimerização.

$$r_{ij} = \frac{k_{pji}}{k_{pji}} \quad (3.23)$$

$$\psi_{ij} = \frac{k_{tij}}{\sqrt{k_{tii}k_{tjj}}} \quad (3.24)$$

As equações apresentadas anteriormente descrevem importantes informações sobre o sistema de copolimerização. O termo “ r_{ij} ” define a reatividade dos monômeros, ou em outras palavras, o quão diferente é a reação de propagação cruzada se comparadas com as reações de homopolimerização dos respectivos monômeros. Já o termo “ ψ_{ij} ” determina a constante de terminação cruzada das cadeias de copolímeros. Embora essas equações sejam aceitas como parte do mecanismo clássico de copolimerização, elas apresentam algumas falhas que em geral são alvo de críticas, como o fato do termo “ ψ ” geralmente ser influenciado pela composição de alimentação do sistema. [93]

3.1.2 Quimioembolização vascular

Estudando as propriedades de liberação controlada de um quimioterápico microencapsulado em artérias renais de cachorros, KATO *et al.* [97] observaram que o

efeito terapêutico da infusão dessas microcápsulas era resultante da ação conjunta da liberação local do fármaco e da embolização do vaso. Isso levou os autores a postularem o termo *quimioembolização*⁸, [98] que consiste em combinar a infusão intra-arterial de um quimioterápico com a embolização vascular.

A ideia de adicionar um fármaco quimioterápico a um agente embólico possui outras vantagens. Com a oclusão do vaso e consequente desenvolvimento de isquemia local, o agente embólico tem um contato mais próximo com as células tumorais. Dessa forma, a liberação do fármaco estaria mais restrita a um local de ação específico, diminuindo as concentrações do fármaco na circulação sistêmica, contribuindo desta maneira com a diminuição dos efeitos colaterais. [98, 99]

Nas últimas décadas, diversas pesquisas foram realizadas com o intuito de desenvolver agentes embólicos e *carregá-los* com medicamentos quimioterápicos para uso na quimioembolização transarterial. [58] De um modo geral, o conceito seguido sempre visa combinar a ação de um fármaco quimioterápico com a embolização da artéria que alimenta o tumor. Entretanto, ainda não existe uma metodologia que possa ser usada como referência na realização da quimioembolização transarterial, uma vez que há muitas variações na escolha do fármaco, do material embolizante e do contraste utilizado. [75]

DC Bead® (Biocompatibles, Surrey, UK) são microesferas não-biodegradáveis usadas como agente embólico. Essas esferas são feitas de PVA modificado com grupos sulfonatos, o que permite a este dispositivo “sequestrar” fármacos com cargas opostas e liberá-los de forma controlada. O produto possui certificação para ser usado no tratamento de tumores hipervascularizados, podendo ser carregado com fármacos quimioterápicos, como a doxorrubicina e o irinotecan. [58, 75]

⁸ Adaptação do termo original em língua inglesa *chemoembolization*.

LEWIS *et al.* [75] analisaram a capacidade de quatro tipos de microesferas comerciais usadas como agentes embólicos (*Countor SE®*, *Embosphere®*, *Bead Block®* e *DC Bead®*) de absorverem e liberarem doxorrubicina. Por apresentarem cargas em sua superfície, apenas as microesferas DC Bead® apresentaram capacidade de absorção e liberação, conseguindo absorver 45 mg/mL de fármaco e apresentando um perfil de liberação que se prolongou por alguns dias. Essas características encorajam a utilização desse dispositivo na quimioembolização transarterial, com a liberação da droga no sítio tumoral e com a provável diminuição dos efeitos colaterais.

Microesferas degradáveis também são alvo de estudos sobre dispositivos para a quimioembolização. WU *et al.* [100] prepararam microesferas de gelatina contendo glicopeptídeo antitumoral, para uso em procedimentos de embolização de tumores faciais. Os bons resultados observados pelos autores apontam para o potencial uso dessas microesferas como veículos para drogas a serem usadas em procedimentos de quimioembolização.

É importante salientar que nenhum estudo reporta a incorporação de fármacos *in situ* durante a produção das partículas embolizantes. Portanto, esse tema precisa ser ainda investigado, já que incorporação *in situ* pode tornar o processo mais simples e eficiente.

3.1.3 Fármacos potenciais e aplicações

Embora existam diversos agentes quimioterápicos e alguns deles, como irinotecano, doxorrubicina e mitomicina C, já sejam utilizados em quimioembolização, [75, 78, 97, 98, 101-103] outros fármacos ou biomoléculas também podem ser usados em conjunto com agentes embólicos e quimioembólicos.

Penicilina

Observada pela primeira vez por Alexander Fleming em 1928 e posteriormente isolada em 1940 por Florey, Chain & Abraham, as penicilinas constituem um dos principais antibióticos, sendo ainda amplamente utilizadas no tratamento de inúmeras doenças infecciosas. Pertencente ao grupo de drogas β -lactâmicas, o núcleo básico da penicilina, apresentado na Figura 3.1, é constituído por um anel tiazolidínico ligado a um anel β -lactâmico, que é o sítio ativo da molécula. As primeiras penicilinas isoladas foram as benzilpenicilinas (penicilina G) de ocorrência natural e outras penicilinas semelhantes. Embora elas apresentem atividade frente a uma grande variedade de microorganismos, as benzilpenicilinas apresentam alguns inconvenientes, como a precária absorção quando administrada via oral e a sensibilidade a enzimas bacterianas β -lactamases. [89, 90]

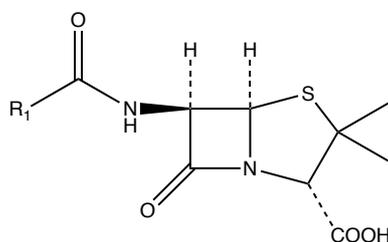


Figura 3.1 – Estrutura básica da penicilina

As drogas β -lactâmicas apresentam mecanismo de ação que corresponde à inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana. Esta inibição é desencadeada após a droga se unir ao sítio de ligação na bactéria (proteínas de ligação da penicilina), que resulta na inibição da formação das ligações cruzadas das cadeias peptídicas, integrantes da estrutura do peptidoglicano celular bacteriano. Assim, ocorre

a inibição das enzimas autolíticas da parede celular, resultando na lise⁹ da bactéria. A resistência à penicilina apresentada por algumas bactérias pode ser enquadrada em três causas principais: produção de enzimas β -lactamases (que cliva o anel β -lactâmico da droga), redução da permeabilidade da membrana externa (menor chance da droga atingir no local-alvo) ou modificações nos sítios de ligação à penicilina. [89]

Conforme já descrito no Capítulo 2, a amoxicilina (Figura 3.2) é uma penicilina semi-sintética, de amplo espectro de ação e que apresenta uma excelente absorção quando administrada via oral, podendo também ser administrada via parenteral. Com tempo de meia-vida de 80 minutos, geralmente está disponível em formulações comerciais em associação com o ácido clavulônico, que é um inibidor da enzima β -lactamase. Quando administrados 250 mg, concentrações máximas médias de 4 $\mu\text{g/mL}$ são alcançadas após 2 horas da ingestão. Aproximadamente 20% da amoxicilina absorvida se liga às proteínas plasmáticas do sangue, enquanto a maior parte ingerida da droga é excretada na urina em sua forma ativa. As indicações terapêuticas da amoxicilina incluem principalmente as infecções das vias aéreas superiores, que são causadas principalmente por patógenos como *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. [89, 90]

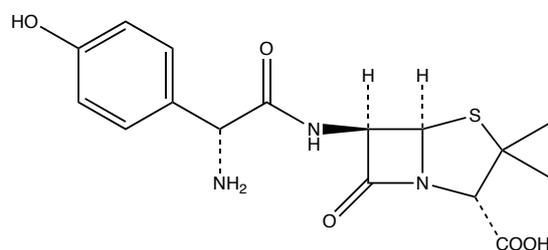


Figura 3.2 – Estrutura da amoxicilina (previamente apresentada no Capítulo 2).

⁹ *Bioquímica*. “Ruptura ou dissolução de membrana plasmática ou de parede bacteriana, e que leva à morte da célula e à liberação de seu conteúdo”. [25]

A amoxicilina e a ampicilina (fármaco modelo do grupo da amoxicilina) possuem estruturas muito semelhantes, divergindo apenas quanto ao grupo hidroxila ligado ao anel benzênico da estrutura, que na ampicilina é substituído por um radical hidrogênio. Devido à grande similaridade estrutural, o espectro antimicrobiano destes fármacos é praticamente o mesmo. A exceção se faz pelo fato de que a amoxicilina apresenta uma menor eficiência no tratamento da *Shigelse*, em comparação com a ampicilina. [90] Nas formulações comerciais, a amoxicilina geralmente se encontram na forma trihidratada (pó branco cristalino), que apresenta certa solubilidade em água (4 mg/mL), metanol (7,5 mg/mL) e etanol (3,4 mg/mL) e praticamente nenhuma solubilidade em hexano, benzeno, etilacetato e acetonitrila, [91] sendo a identificação da substância feita geralmente por espectrometria na região do infra-vermelho e ultravioleta (com absorções específicas em 230 e 274 nm).

Asparaginase

Dentre as inúmeras drogas usadas para o tratamento de doenças neoplásicas, a L-asparaginase destaca-se por sua ação antileucêmica e por vir sendo utilizada na quimioterapia do câncer há mais de 40 anos. Seu mecanismo de ação consiste na hidrólise do aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônia, o que induz a morte celular, uma vez que este aminoácido é essencial para a síntese de proteínas. [90]

A L-asparaginase é produzida em grandes quantidades por *Escherichia coli* e *Erwinia caratovora* (*Erwinia chrysanthemi*), que produzem enzimas que apresentam mecanismos de ação similares, divergindo apenas nas propriedades farmacocinéticas e no potencial alergênico que o paciente pode apresentar, dependendo da fonte de obtenção da enzima. Embora a fonte de L-asparaginase comercial seja geralmente obtida de uma das bactérias mencionadas, ela também pode ser isolada do soro de

mamíferos e de outras bactérias, [104] como a *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis*. [105]

Um tipo de produto enzimático produzido a partir da L-asparaginase nas décadas de 1970 e 1980 é o PEG-L-asparaginase. Esta é uma forma modificada da enzima obtida de *Escherichia coli*, através de combinação com o polietilenoglicol (PEG), que resulta em uma ação mais prolongada e uma menor sensibilidade à droga, em relação à enzima original. [104, 105]

A enzima L-asparaginase é composta por quatro subunidades idênticas, que permanecem ligadas principalmente por forças de interação não-covalentes. [105, 106] As enzimas isoladas de *Escherichia coli* apresentam massa molar de 138.000 a 141.000 Da, enquanto que as formas isoladas de *Erwinia chrysanthemi* normalmente apresentam massa molar de 138.000 Da e diferente ponto isoelétrico, em relação à enzima de *Escherichia coli*. [107]

A L-asparaginase obtida de *Escherichia coli* apresenta grande estabilidade, quando armazenada sob refrigeração (8°C) em meio estéril, não sendo muito influente o tipo de material do recipiente usado para o armazenamento. Em função do pH e da temperatura, a estabilidade da enzima pode variar de acordo com as condições empregadas. Numa faixa de pH entre 4,5 e 11,0 a enzima mantém sua atividade; porém, quando o meio é mais alcalino, há uma maior estabilidade. A temperatura parece influenciar mais a estabilidade da enzima, uma vez que acima de 60°C a proteína desnatura e, dependendo do pH do meio, a recuperação da sua atividade pode não ser mais possível. [106]

A atividade antitumoral da L-asparaginase permite a utilização desta enzima no tratamento de diferentes tipos de tumores, tanto em crianças como em pacientes com idade avançada. [107] As diversas indicações terapêuticas do uso da L-asparaginase

incluem principalmente o tratamento de leucemia linfocítica aguda, da doença de Hodgkin, da leucemia mielomonocítica aguda e no tratamento de linfosarcomas e melanossarcoma. [105, 108] Geralmente a L-asparaginase é um componente nos esquemas de tratamentos, já que ela quase sempre é administrada em combinação com outros fármacos (como o metotrexato, a doxorrubicina, a vincristina, a prednisona, dentre outros) para o esquema de tratamento da leucemia linfocítica aguda. A enzima produzida a partir de *Escherichia coli* pode ser administrada via intramuscular ou via intravenosa, utilizando várias estratégias. Uma estratégia bastante utilizada é a administração de 5.000-10.000 U/m² alternadamente ou a cada 3 dias, por um período de 2 a 4 semanas. Uma outra alternativa é a administração de dose única semanal de 25.000 U. A PEG-L-asparaginase é administrada em doses de 2.500 U/m² em semanas alternadas, uma vez que esta forma possui um tempo de meia vida maior. [90]

A toxicidade relacionada ao uso da L-asparaginase pode ser resumida em dois grupos de efeitos colaterais. No primeiro grupo se enquadram todos os efeitos tóxicos relacionados à sensibilização do sistema imunológico à presença de uma proteína exógena. O segundo grupo de efeitos é composto pelos sintomas relacionados à inibição da síntese da asparagina. Os principais efeitos tóxicos associados à L-asparaginase são semelhantes para os diversos tipos de enzima (exceto para as reações de hipersensibilidade) e incluem disfunção hepática, pancreatite, imunossupressão, deficiência nos fatores de coagulação, entre outros. [104]

Embora efeitos colaterais sejam frequentemente relatados, MÜLLER & BOOS [107] chama a atenção para o fato que, em muitos casos, a asparaginase é administrada em conjunto com outros medicamentos, dificultando desta maneira especificar se a reação adversa observada é realmente resultante da ação da L-asparaginase ou das outras drogas administradas.

Recentemente, PINTO *et al.* [109] desenvolveram uma metodologia para produção de L-asparaginase em fermentações de *Zymomonas mobilis*. A enzima é produzida em largas quantidades quando a fermentação é conduzida em meio de cultura que contém asparagina ou sais de aspartato como fontes de nitrogênio.

Ácido Tranexâmico

O ácido tranexâmico (Figura 3.3) é um agente antifibrinolítico sintético derivado da lisina, usado em diversas situações clínicas que envolvem hemorragias, com o principal objetivo de diminuir a perda de sangue e a necessidade de transfusões durante procedimentos cirúrgicos. Dentre as principais aplicações, destaca-se o uso do ácido tranexâmico em cirurgias cardíacas, transplantes e alguns procedimentos ortopédicos. [110, 111] Este ácido apresenta uma solubilidade em água de 0,17 g/mL, sendo muito pouco solúvel em álcool e éter e praticamente insolúvel na maioria dos solventes orgânicos. Quimicamente estável e não higroscópico, a DL₅₀ para ratos e camundongos é de aproximadamente 1200 e 1500 mg/kg (via intravenosa), respectivamente. [91]

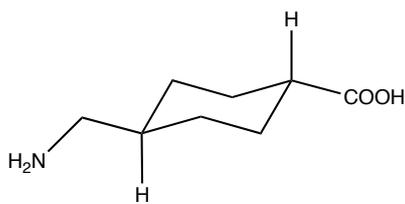


Figura 3.3 – Ácido tranexâmico

Além das aplicações já mencionadas, o ácido tranexâmico mostrou-se eficaz no tratamento de sangramentos em pacientes que apresentam algum tipo de desordem na coagulação do sangue, seja esta doença adquirida ou congênita. Um exemplo disto é que o uso desse agente, como droga profilática ou de tratamento, pode ser bastante conveniente para casos de sangramentos em pacientes que apresentem hemofilia

adquirida. [112] Em pacientes com câncer avançado, o uso de ácido tranexâmico e outros agentes anti-fibrinolíticos para o controle de sangramentos, ainda requer mais estudos clínicos que comprovem de fato a sua eficácia terapêutica. [113] Na área de ginecologia, o ácido tranexâmico já foi usado em diferentes casos, sendo efetivo na redução da perda de sangue associada à menstruação e em sangramentos associados à gestação. [110] No caso de miomas uterinos, embora as intervenções cirúrgicas sejam o tratamento mais adotado, o ácido tranexâmico pode ser um dos medicamentos usados para o alívio de alguns sintomas associados. [24] Contudo, os efeitos do uso deste fármaco em cirurgias ginecológicas foram muito pouco relatados na literatura médica. [111]

Atualmente o ácido tranexâmico possui apresentações para uso oral e intravenoso, sendo bem tolerado e apresentando poucos efeitos colaterais. [110] As apresentações disponíveis para administração por via oral incluem cápsulas, comprimidos e xarope, sendo que a dose recomendada varia de acordo indicação terapêutica. [114] Em procedimentos cirúrgicos, embora existam algumas diferenças, geralmente o esquema adotado é o de administrar uma dose de 10 mg/kg via intravenosa antes da cirurgia e posteriormente seguir com uma infusão de 1mg/kg/h do fármaco. [110, 111]

Utilizando o esquema de administração descrito anteriormente, CAGLAR *et al.* [111] conduziram um estudo sobre os efeitos do uso pré e pós-operatório do ácido tranexâmico como agente terapêutico para redução do sangramento em procedimentos de retirada de miomas uterinos. Embora os autores tenham observado uma significativa redução do sangramento quando o ácido tranexâmico foi administrado, a redução da perda de sangue (cerca 200 mL) não foi considerada *muito significativa*. Desta forma,

os pesquisadores concluíram que aparentemente o uso do ácido tranexâmico no esquema de administração proposto não trouxe maiores benefícios na miomectomia.

Doxorrubicina

A doxorrubicina é um antibiótico da antraciclina produzidos pelo fungo *Streptococcus peucetius* var. *caesius*, e é considerado como um dos mais importantes quimioterápicos antitumorais, [90] sendo comumente usado em procedimentos de quimioembolização. [115-117] Embora a doxorrubicina possua um amplo espectro de ação para neoplasias humanas, incluindo tumores sólidos, seu uso clínico é limitado pelos seus efeitos colaterias (cardiopatia, mielosupressão, distúrbios gastrointestinais, dentre outros), que em geral é associado a dose administrada. [90]

A estrutura química da doxorrubicina está representada na Figura 3.4. Como todos os antibióticos antraciclínicos, a doxorrubicina possui em sua estrutura um açúcar pouco comum (daunosamina), além de componentes quinona e hidroquinona, que permitem à molécula atuar como agentes doadores e aceptores de elétrons. [90]

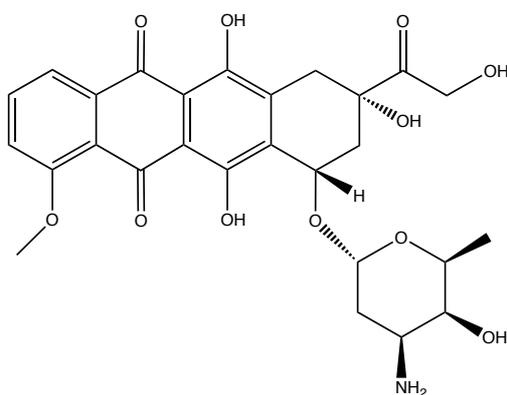


Figura 3.4 – Estrutura da doxorrubicina

O mecanismo de ação da doxorubicina baseia-se na habilidade desta molécula de se intercalar com o DNA e com isso afetar muitas funções reguladas pelo DNA, como por exemplo a síntese de DNA e RNA. Desta forma, a doxorubicina e as antraciclinas são consideradas tanto mutagênicas quanto carcinogênicas. [90] Embora o mecanismo de ação deste medicamento seja primariamente na intercalação com o DNA celular, outras rotas de ação têm sido propostas, envolvendo a indução de morte celular por exposição ao medicamento a receptores presentes na superfície e no interior da célula. [90, 115, 118]

O cloridrato de doxorubicina é o nome genérico do medicamento, disponível apenas em pó para solução injetável. Sua aparência é de um sólido cristalino de coloração vermelha, *livremente* solúvel em água e álcoois hidratados, moderadamente solúvel em metanol anidro e insolúvel em solventes orgânicos apolares. [91]

3.2 Objetivo e justificativa

O principal objetivo deste Capítulo é apresentar informações mais detalhadas a respeito das influências da incorporação *in situ* da amoxicilina durante o processo de polimerização em suspensão, para a produção de micropartículas poliméricas com morfologia tipo casca-núcleo, para serem usadas como agentes embólicos. Além das propriedades morfológicas e moleculares, também são apresentadas informações sobre a cinética de polimerização na presença de amoxicilina. Também é objeto de estudo neste Capítulo avaliar as influências da incorporação *in situ* de um quimioterápico comumente usado no tratamento de tumores (doxorubicina), avaliando sua influência nas propriedades morfológicas e moleculares dos polímeros sintetizados, bem como sua influência sobre a cinética de polimerização em suspensão.

Conforme justificado no Capítulo anterior, embora haja muitos estudos que se proponham a encapsular fármacos utilizando técnicas de polimerização, poucos são aqueles que estudam as influências da incorporação *in situ* deste fármaco sobre as características e propriedades finais do polímero obtido, sendo que nenhum estudo reportou os efeitos da incorporação *in situ* de fármacos durante a polimerização em suspensão, para a obtenção de agentes embólicos. Além de apresentar informações mais detalhadas dos efeitos da incorporação *in situ* da amoxicilina, este Capítulo também traz um estudo dos efeitos da incorporação *in situ* da doxorrubicina, que é um fármaco comumente usado no tratamento de tumores e em procedimentos de quimioembolização.

3.3 Metodologia experimental

A metodologia experimental usada seguiu basicamente as especificações descritas previamente por PINTO *et al.*, [52, 53] com algumas modificações nos experimentais necessários para promover a incorporação *in situ* do fármaco.

3.3.1 Materiais

Os reagentes usados foram: acetato de vinila (VAc, 99%, Vetec Química Fina), água (destilada, desmineralizada e microfiltrada), amoxicilina trihidratada compactada (Grau A, Laboratório Globo Ltda.), clorofórmio deuterado (CDCl_3 , 99,8%, Cambridge Isotope Laboratories), dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$, 99,9%, Cambridge Isotope Laboratories), doxorrubicina (cloridrato; Eurofarma, Brasil), hidróxido de sódio (NaOH , 99%, Vetec Química Fina), metacrilato de metila (MMA, 99%, Sigma-Aldrich ou Denstply Brasil), peróxido de benzoíla (BPO, 97%, Vetec Química Fina), poli(álcool

vinílico) (PVA, 88% de hidrólise e $M_w = 78.000$ g/mol, Vetec Química Fina.), tetrahidrofurano (THF, 99,9%, Tedia).

Os reagentes foram utilizados conforme recebido pelos fornecedores, exceto quando especificado. A água utilizada nos experimentos foi destilada, desmineralizada e microfiltrada.

3.3.2 Unidade Experimental

A unidade experimental usada nas reações de polimerização e na etapa de saponificação foi a mesma descrita no Capítulo 2 e está ilustrada na Figura 3.5. A unidade era operada na pressão atmosférica e a aferição da temperatura dentro do reator acompanhada com *termopar* e eventualmente através de um termômetro de mercúrio.

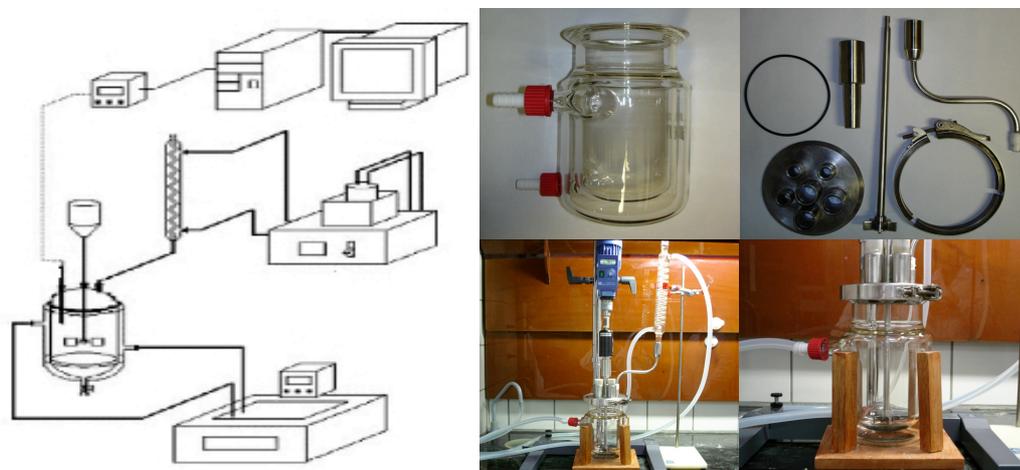


Figura 3.5 – Esquema e fotos parciais da unidade experimental usada nas reações de polimerização e na etapa de saponificação (previamente apresentada no Capítulo 2).

A unidade experimental apresentada na Figura 3.5 era composta por: reator de vidro encamisado de 1 L (FGG Equipamentos Científicos Ltda, Brasil), conectado a um sistema de aquecimento/refrigeração a água com temperatura programada Haake

Phoenix II (Thermo Electron Co., Alemanha), equipado com tampa de aço inoxidável com 6 orifícios, agitador mecânico EuroStar Digital (IKA, Alemanha), haste reta, *impelidor* tipo hélice com 6 pás e condensador de serpentina de vidro, conectado a um sistema de refrigeração a água com temperatura programada Isotemp 2028P (Fisher Scientific com refrigerador PolyScience KR30A).

3.3.3 Métodos

Purificação dos monômeros

Os monômeros, acetato de vinila (VAc) e metacrilato de metila (MMA), foram purificados separadamente antes de serem utilizados nas reações e/ou análises. Inicialmente, utilizando um funil de separação, os monômeros eram *lavados* duas vezes com uma solução aquosa de NaOH 3% (m/v), na proporção de 1:1 (monômero : solução de NaOH), descartando-se a fase aquosa. Após este processo, o monômero era *neutralizado* com água destilada, na proporção de 1:1 (monômero : água), até que a fase orgânica atingisse pH = 7. O monômero *lavado e neutralizado* era então transferido para um frasco âmbar (contendo uma pequena quantidade de cloreto de cálcio) e acondicionado sob refrigeração (-15 °C) por pelo menos 24 horas. Posteriormente, o cloreto de cálcio era removido por filtração e pequenas quantidades de água eram removidas com o auxílio de um funil de separação. O monômero *lavado e neutralizado* era então destilado sob atmosfera de nitrogênio, sendo o monômero *purificado* recuperado e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (-15 °C) até sua utilização.

Polimerização em suspensão

As reações de polimerização em suspensão via mecanismo clássico de radicais livres, foram realizadas na unidade descrita anteriormente. O procedimento adotado foi fundamentalmente o mesmo descrito por PINTO *et al.*, [53] exceto quando especificado.

Os componentes da receita padrão usada nas polimerizações em suspensão estão descritas na Tabela 3.1. Inicialmente adicionava-se ao reator uma solução do agente de suspensão no meio dispersante e aquecia-se o reator até a temperatura estipulada para a reação (70 ± 5 °C). Após atingir a temperatura desejada, era adicionada uma solução contendo comonômeros purificados e o iniciador, mantendo o sistema na temperatura e velocidades de agitação (700 rpm) definidos no plano da reação. A adição dos componentes orgânicos da suspensão caracterizava o início da reação, que tinha uma duração de aproximadamente 240 minutos. Ao final da etapa de reação, a temperatura do reator era ajustada para 30 ± 5 °C e o conteúdo do mesmo era retirado. A obtenção do polímero era feita separando-se o precipitado do sobrenadante por filtração, utilizando-se água destilada para lavar as partículas. O polímero obtido era então seco em estufa a vácuo a 25 °C e processado em gral de porcelana, até a separação dos grânulos observados visualmente.

Nas reações realizadas neste Capítulo, a incorporação do fármaco ocorreu somente por intermédio da fase aquosa do sistema, dissolvendo uma quantidade determinada do medicamento na fase contínua da suspensão antes do início da reação. No caso da amoxicilina, a quantidade de fármaco adicionada variou entre 0-3% (m/m). No caso da doxorrubicina, o fármaco era reconstituído em água e posteriormente adicionado à fase contínua do sistema. Neste caso específico, a quantidade de

doxorrubicina final adicionada era igual a aproximadamente 0,12 g/L (ou $2,05 \times 10^{-4}$ mol/L).

Tabela 3.1 – Receita genérica de polimerização em suspensão a 70 °C.

Fase contínua	Fase dispersa	Quantidade (g)	Função
Água		420	Fase contínua
PVA		0,2	Agente de suspensão
	VAc	140 - 200	Comonômero
	MMA	0 - 60	Comonômero
	BPO	2 - 4	Iniciador
	Fármaco*	0 - 3%	Fármaco

PVA = poli(álcool vinílico); VAc = acetato de vinila; MMA = metacrilato de metila; BPO = peróxido de benzoíla.

Durante as reações de polimerização, amostras foram retiradas em intervalos pré-determinados para a caracterização do material. O procedimento consistia em transferir aproximadamente 4 g de amostra do reator para uma cápsula de alumínio, contendo pequenas gotas de uma solução aquosa de hidroquinona 1%. O peso de cada amostra era determinado imediatamente após o processo de amostragem, levando em consideração o peso da cápsula e da solução de hidroquinona. Após atingir a temperatura ambiente, as amostras eram secas em estufa de circulação de ar (65 ± 5 °C), até que todas as amostras tivessem atingido peso constante ($\pm 0,0005$ g).

Reação de saponificação

A reação de saponificação, que visa à conversão parcial do PVAc superficial em PVA, foi realizada seguindo basicamente a metodologia proposta por PINTO *et al.* [53] e PEIXOTO [29]. A principal diferença em relação à metodologia originalmente proposta é que, para poder estudar os efeitos da incorporação do fármaco nas propriedades dos polímeros (*núcleo* e também na *casca* de PVA), este processo foi realizado em duas etapas distintas.

No procedimento adotado, em um sistema com controle de agitação e temperatura, 20 g de polímero seco reagem com 20 mL de solução NaOH 40% (m/v) em 80 mL de água durante 2 horas, mantendo-se a temperatura controlada em 30 ± 5 °C e a agitação em 500 rpm. Ao final da reação, o polímero era recuperado por filtração, lavados com água destilada e secos em estufa a vácuo a 25 °C.

3.3.4 Caracterização

Teste de solubilidade

A amoxicilina trihidratada possui uma solubilidade em água de 4 mg/mL; [91] entretanto, sua solubilidade em outras soluções aquosas e solventes orgânicos não é conhecida. Para determinar a solubilidade da amoxicilina em solução aquosa de PVA, acetato de vinila e metacrilato de metila, foram realizados testes de solubilidade conforme descrito a seguir.

Em um frasco de 100 mL equipado com barra magnética, adicionaram-se 50 mL de *solvente* (monômero ou solução aquosa de PVA 0,5 mg/mL). Sob leve agitação, adicionou-se amoxicilina até completa saturação/precipitação. O recipiente foi mantido sob temperatura e agitação constante por aproximadamente 1 hora. Após este período, a solução foi filtrada e a absorbância das soluções determinadas em espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35, Perkin-Elmer, EUA), utilizando cubetas de quartzo de 5 mm, nos comprimentos de onda de 228 e 272nm. A determinação da solubilidade das amostras foi feita comparando as leituras obtidas com soluções contendo quantidades conhecidas de amoxicilina (solução padrão) para cada *solvente* testado (solução de PVA, acetato de vinila e metacrilato de metila). Os testes de solubilidade da amoxicilina em solução de

PVA foram realizados a 25 e 75 °C e com os monômeros acetato de vinila e metacrilato de metila a 25 e 50 °C. Os testes de solubilidade foram realizados em duplicata.

Tensão interfacial

Análises de tensão interfacial foram realizadas com auxílio de um tensiômetro de gota pendente DSA-100 (Krüss, Alemanha). De acordo com essa técnica, uma gota é formada em um tamanho e formato tal que é possível calcular a tensão interfacial (através da equação de Laplace) entre a gota e um meio em que esta é imiscível. Todas as análises foram realizadas a 20,6 °C, utilizando os valores de 0,9980 g/cm³ para a densidade de água ou solução de PVA (0,48 g/L), 0,9340 g/cm³ para a densidade do acetato de vinila (VAc) e 0,9400 g/cm³ para a densidade do metacrilato de metila (MMA) ou para a mistura de monômeros. Em alguns testes, amoxicilina foi misturada à fase aquosa (água ou solução de PVA) ou à fase orgânica (mistura de monômeros). A quantidade de fármaco adicionada foi de aproximadamente 0,5 g/L à fase aquosa e em quantidade que atingisse a saturação a 22 °C na fase orgânica (menos de 0,5 g/L).

Microscopia

A microestrutura da partícula de polímero foi analisada por meio de microfotografias feitas em microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 (FEI Company, EUA). Segundo esta metodologia, as amostras eram recobertas com uma camada de ouro de 300 nm, utilizando-se um metalizador JFC-1500 (JEOL, Japão), antes da visualização.

Tamanho de partículas

A distribuição de tamanho de partículas foi determinada utilizando um analisador de tamanho de partículas Mastersizer 2000 (Malvern, UK). Um pequena quantidade de polímero seco era diretamente colocada no equipamento até a obtenção de um nível mínimo de espalhamento de luz (obscurência).

Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Para realizar as determinações de massas molares, as amostras de polímero eram solubilizadas em THF, filtradas em filtro de 0,45 µm e injetadas em sistema cromatográfico, usando THF como fase móvel, vazão de 1 mL/min, na temperatura de 40°C. As análises foram realizadas em cromatógrafo Viscotek (VE2001) equipado com detector de refração Viscotek VE3580 e quatro colunas Phenomenex (10⁶, 10⁵, 10³ e 500 Å) e calibradas com padrões de poliestireno. As curvas de distribuições de massas molares apresentadas neste Capítulo foram normalizados em relação ao valor máximo, segundo a relação:

$$y_{\text{normalizado}} = \frac{y_i}{y_{\text{máximo}}} \quad (3.25)$$

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A análises de DSC foram realizadas em equipamento DSC 1822e (Mettler Toledo, Brasil). Cerca de 3 mg de amostra tiveram seu peso exatamente determinado e submetido a uma faixa de aquecimento de 25 a 250°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min em cápsula de alumínio com tampa furada. Nitrogênio foi utilizado como gás

de arraste numa vazão de 80 mL/min. Nas análises realizadas, uma cápsula de alumínio vazia foi utilizada como referência.

Ressonância Magnética Nuclear de Prótons ($^1\text{H-RMN}$)

As análises de $^1\text{H-RMN}$ descritas neste Capítulo foram realizadas em equipamento Bruker DPX 300 (Bruker Co.), operado a 300 MHz e equipado com sonda de 5 mm de diâmetro. Para preparo das amostras, utilizou-se ou clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO). O tetrametilsilano (TMS) foi usado como referência interna e manteve-se a temperatura constante em 25°C . A Figura 3.6 e a Tabela 3.2 apresentam os deslocamentos específicos de prótons para o PVAc, PMMA e PVA. [88]

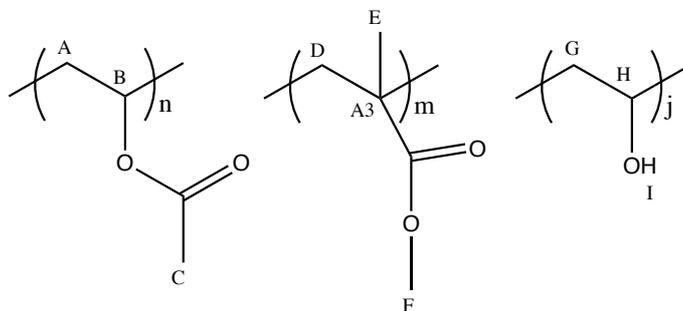


Figura 3.6 – Deslocamento característico dos prótons do PVAc, PMMA e PVA.

Tabela 3.2 – Deslocamento dos prótons dos polímeros PVAc, PMMA e PVA.

Próton	PVAc		PMMA		PVA	
	Exp ^a	Ref ^{b,c}	Exp ^a	Ref ^{b,c}	Exp	Ref ^{b,d}
A	1.8	2.1				
B	4.8	5.2				
C	2.1	2.3				
D			1.8	2.7		
E			0.7-0.9	1.2-1.4		
F			3.5-3.8	4.0		
G					-	1.9
H					-	4.3
I					-	4.8

PVAc = poli(acetato de vinila); PMMA = poli(metacrilato de metila); PVA = poli(álcool vinílico).
Valores em ppm para $^1\text{H-RMN}$; ^aDMSO; ^bBRANDOLINI & HILLS [88]; ^c CDCl_3 ; ^d D_2O .

Nas Figuras 3.7 e 3.8 são ilustrados os deslocamentos dos prótons para a amoxicilina e para a doxorrubicina, segundo simuladores de RMN.

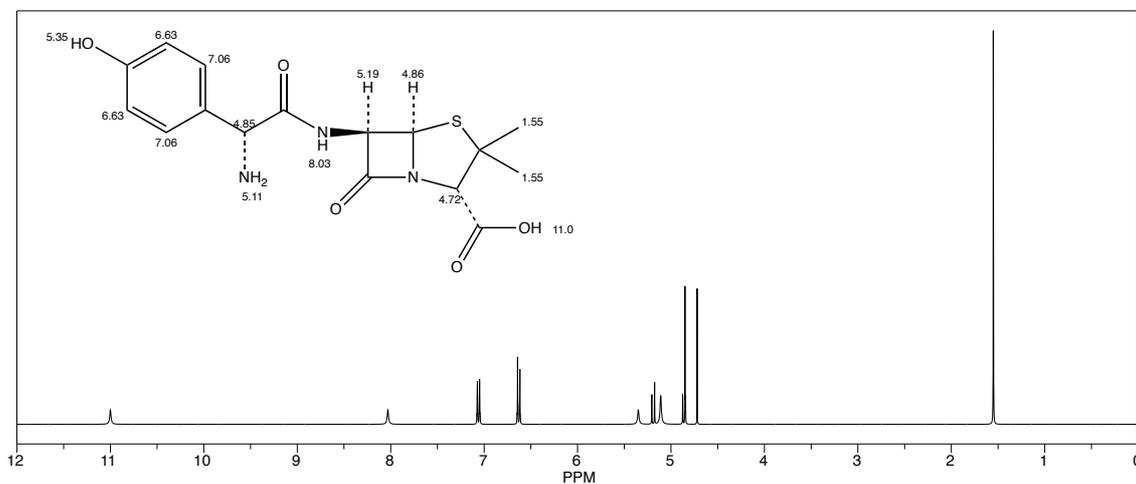


Figura 3.7 – Espectro simulado de ^1H -RMN da amoxicilina.

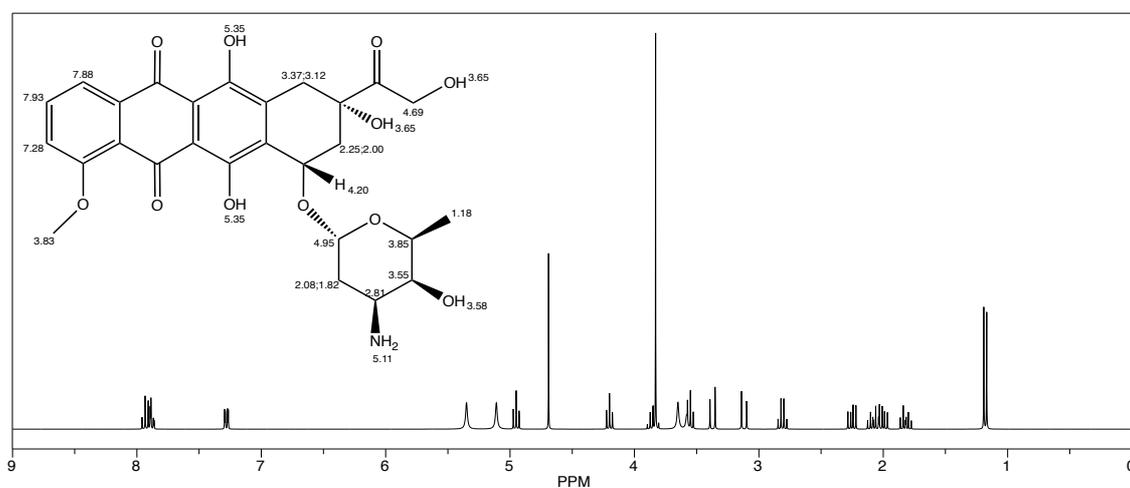


Figura 3.8 – Espectro simulado de ^1H -RMN da doxorrubicina.

Incorporação de Fármaco

Durante as reações de polimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila, amostras foram retiradas em intervalos pré-determinados para a avaliação da eficiência

de incorporação do fármaco nas partículas poliméricas. O procedimento consistia em transferir uma alíquota de aproximadamente 5 mL da fase contínua para um recipiente de vidro. Em seguida, possíveis sólidos eram removidos por filtração e a amostra submetida à duas diluições seriadas, tomando-se alíquotas de 1 mL, utilizando uma *solução aquosa de PVA*¹⁰ (0,48 g/L) como diluente e balões volumétricos de 25 mL. A determinação das absorvâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35, Perkin-Elmer, EUA), utilizando cubetas de quartzo de 5 mm e comprimento de onda específico de 228 e 274 nm. A quantidade de amoxicilina incorporada foi calculada a partir de correlações com dados de concentrações conhecidas de amoxicilina no meio reacional

3.4 Resultados & Discussão

3.4.1 Efeitos da incorporação *in situ* de amoxicilina nas reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila – Parte 2

No Capítulo anterior, foi demonstrado ser possível sintetizar partículas esféricas de PVAc-co-PMMA na presença de amoxicilina adicionada *in situ* durante a reação de polimerização em suspensão. Os resultados permitiram concluir que, pelas mudanças morfológicas e moleculares observadas, a amoxicilina provavelmente exerce algum tipo

¹⁰ A solução aquosa de PVA utilizada nos testes analíticos, como *branco* ou como diluente, foi a mesma utilizada como fase contínua nas reações de polimerização.

de atividade superficial, além de provavelmente alterar a cinética da polimerização.

Para avaliar o tipo de interação que a amoxicilina estabelece com as fases dispersa (orgânica; comonômeros) e contínua (aquosa; solução de PVA) do sistema de polimerização em suspensão, foram determinadas as solubilidades do fármaco nas diferentes fases. Na fase contínua, composta de água purificada e uma pequena quantidade de agente de suspensão (0,48 g/L), a amoxicilina apresentou uma faixa de solubilidade de 2,9 a 15,4 g/L, quando a temperatura variou entre 25 e 70 °C. Essas solubilidades são equivalentes a 0,3 a 1,5% da massa de monômero no sistema de polimerização em suspensão. Já a solubilidade da amoxicilina no acetato de vinila (VAc) foi de 0,15 a 0,22 g/L para uma variação de temperatura de 25 a 50 °C, o que representa somente uma concentração de 0,02 a 0,03%, em relação à massa de monômero. O fármaco não apresenta qualquer solubilidade significativa no metacrilato de metila (MMA).

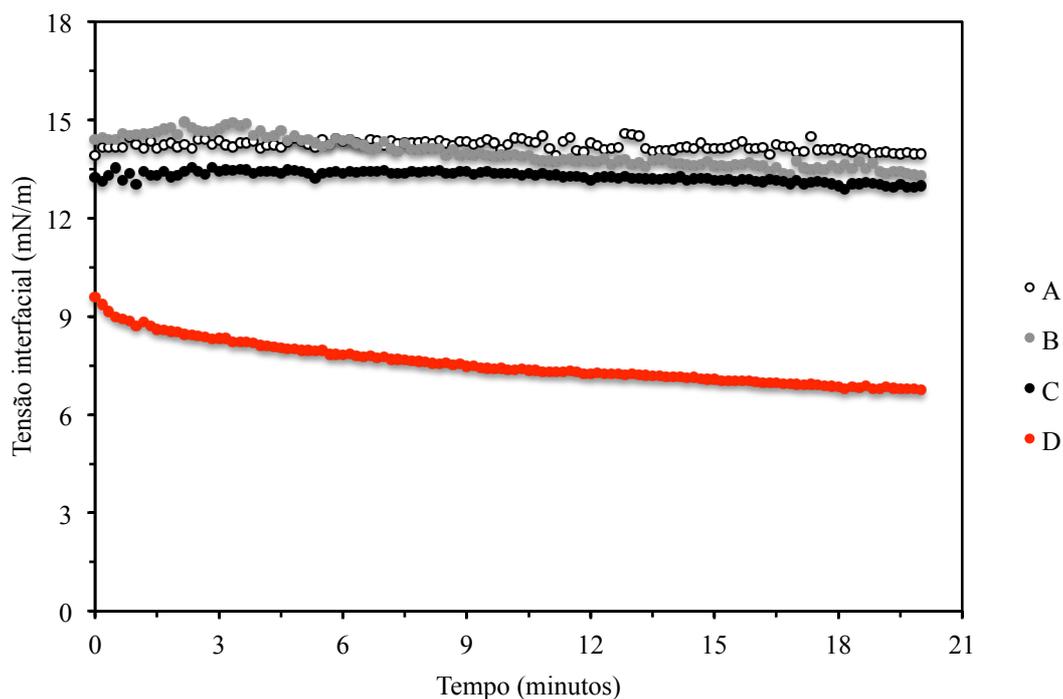
Os resultados de solubilidade levam a concluir que, quando a amoxicilina é adicionada no reator de polimerização através da fase aquosa do sistema, o fármaco é completamente solubilizado quando a temperatura interna do reator atinge a temperatura de reação (70 °C). Entretanto, quando se adiciona o fármaco diretamente na fase dispersa do sistema (fase orgânica; comonômeros), a amoxicilina não se dissolve completamente. Consequentemente, nesse caso o fármaco está presente no sistema na forma de um pó finamente dividido e suspenso nas gotas de monômeros. Essa fato pode explicar a acumulação do fármaco na superfície das partículas e a consequente formação da rugosidade e poros superficiais, principalmente após o processo de *saponificação* das partículas. Isso explica também porque a incorporação de fármaco na cadeia polimérica não pode ser grande e porque existe sempre quantidade apreciável de amoxicilina livre no meio.

Devido às alterações observadas na morfologia superficial das partículas, conforme apresentado no Capítulo 2, considerou-se a hipótese de que, quando a amoxicilina é adicionada *in situ* ao sistema de polimerização em suspensão, esta atue como um coestabilizante ou exerça alguma atividade superficial, sendo este efeito melhor visualizado quando o fármaco é dissolvido na fase aquosa do sistema. Entretanto, os resultados apresentados na Figura 3.9 não demonstraram nenhuma modificação nos valores da tensão interfacial quando a amoxicilina foi adicionada ao sistema. Conforme observado na Figura 3.9, a adição da amoxicilina, tanto na fase aquosa quanto na fase orgânica do sistema, não influenciou a tensão interfacial das gotas.

O decréscimo na tensão interfacial só foi observado quando um agente de suspensão (PVA, 0,48 g/L) foi adicionada. Entretanto não foi observado um efeito sinérgico do fármaco na redução da tensão interfacial.

Conforme a Figura 3.9, os testes realizados apenas com amoxicilina (sem adição de PVA à fase contínua) demonstraram que o fármaco de fato não atua reduzindo a tensão interfacial do sistema. Desta forma, a partir dos resultados apresentados anteriormente, não foi possível atribuir um efeito positivo da amoxicilina na redução da tensão interfacial entre a fase aquosa contínua e a fase dispersa (gota de comonômero). Sendo assim, os efeitos morfológicos parecem estar associados ao depósito de sólido na superfície da partícula orgânica dispersa no meio. Embora seja de conhecimento que o aumento de concentração de estabilizante e temperatura atuem reduzindo a tensão interfacial em sistemas dispersos, [47] devido à grande instabilidade do sistema experimental de análise de tensão interfacial, não foi possível obter medidas de tensão em temperaturas superiores a 20,6 °C. Este fator influenciou de maneira significativa a quantidade de fármaco que pode ser solubilizado no sistema.

a)



b)

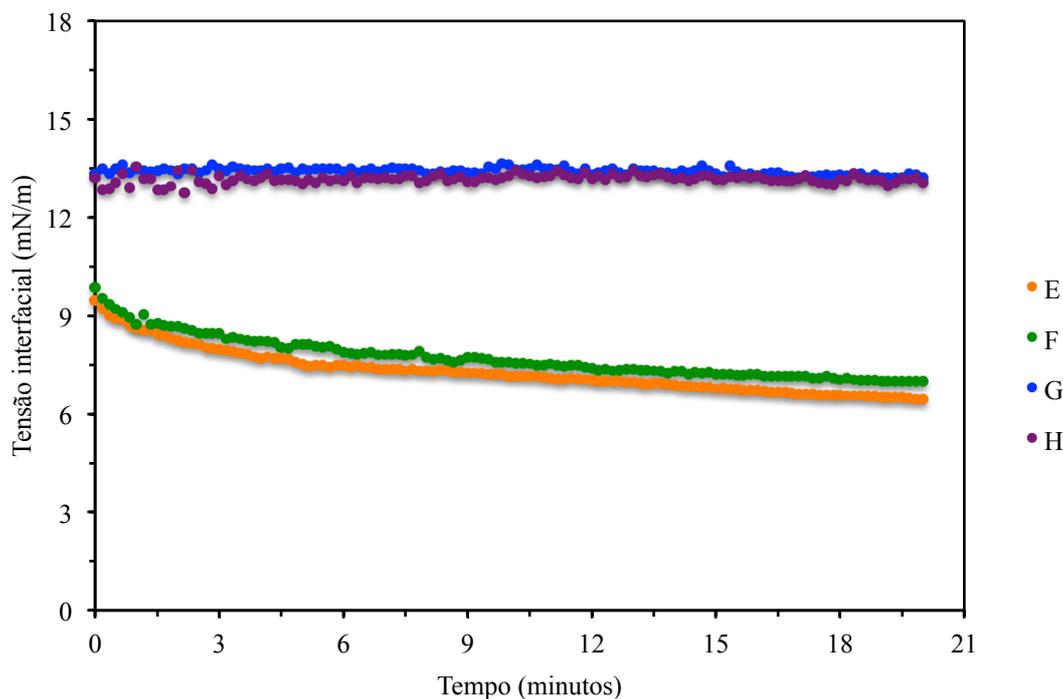


Figura 3.9 – Tensão interfacial de gotas de monômeros em meio aquoso. a) (A) VAc em H₂O; (B) MMA em H₂O; (C) VAc/MMA (70:30) em H₂O; (D) VAc/MMA (70:30) em solução de PVA. b) (E) VAc/MMA (70:30), em solução de PVA + amoxicilina; (F) VAc/MMA (70:30) + amoxicilina, em solução de PVA; (G) VAc/MMA (70:30), em H₂O + amoxicilina; (H) VAc/MMA (70:30) + amoxicilina, em H₂O.

Embora os testes de tensão interfacial não tenham apontado para nenhum efeito sinérgico da amoxicilina quando a estabilização da fase dispersa do sistema (gotas de comonômeros), os resultados dos testes de solubilidade permitiram estimar as quantidades máximas em que este fármaco pode ser incorporada *in situ* durante as reações de polimerização em suspensão. Baseando-se nesses resultados, novas reações de copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila foram realizadas, promovendo a adição da amoxicilina apenas pela fase aquosa do sistema e em uma faixa mais ampla de concentração, que variou de 1 a 3% em relação à massa de monômero. Desta forma, quando as incorporações foram realizadas na faixa de 1%, o fármaco estava completamente solúvel na fase contínua do sistema, ao passo que, quando a concentração era igual a 3%, apenas parte da amoxicilina estava solúvel.

A análise da morfologia final das partículas de copolímeros foi realizada com auxílio de análises de microscopia eletrônica de varredura. Conforme demonstrado na Figura 3.10, na ausência de fármaco foi possível sintetizar partículas de copolímero com morfologia esférica bem definida, o que contrasta com os resultados anteriormente apresentados no Capítulo 2. Esse resultado provavelmente está associado ao uso de comonômeros purificados, uma vez que os mesmos resultados foram observados para homopolimerização em suspensão do acetato de vinila.

Outra observação feita foi de que as partículas esféricas produzidas na ausência de fármaco não apresentaram poros superficiais e ou poros/microestruturas nas camadas mais internas das partículas, fato este que já tinha sido observado nos experimentos previamente apresentados no Capítulo 2. Além disso, conforme já descrito, pela característica das amostras analisadas, é provável que todas as partículas sejam densas e não possuam microestruturas porosas no seu interior, provavelmente devido a ausência

de fármaco no meio reacional e ao não aprisionamento de microgotas de água durante a formação das partículas.

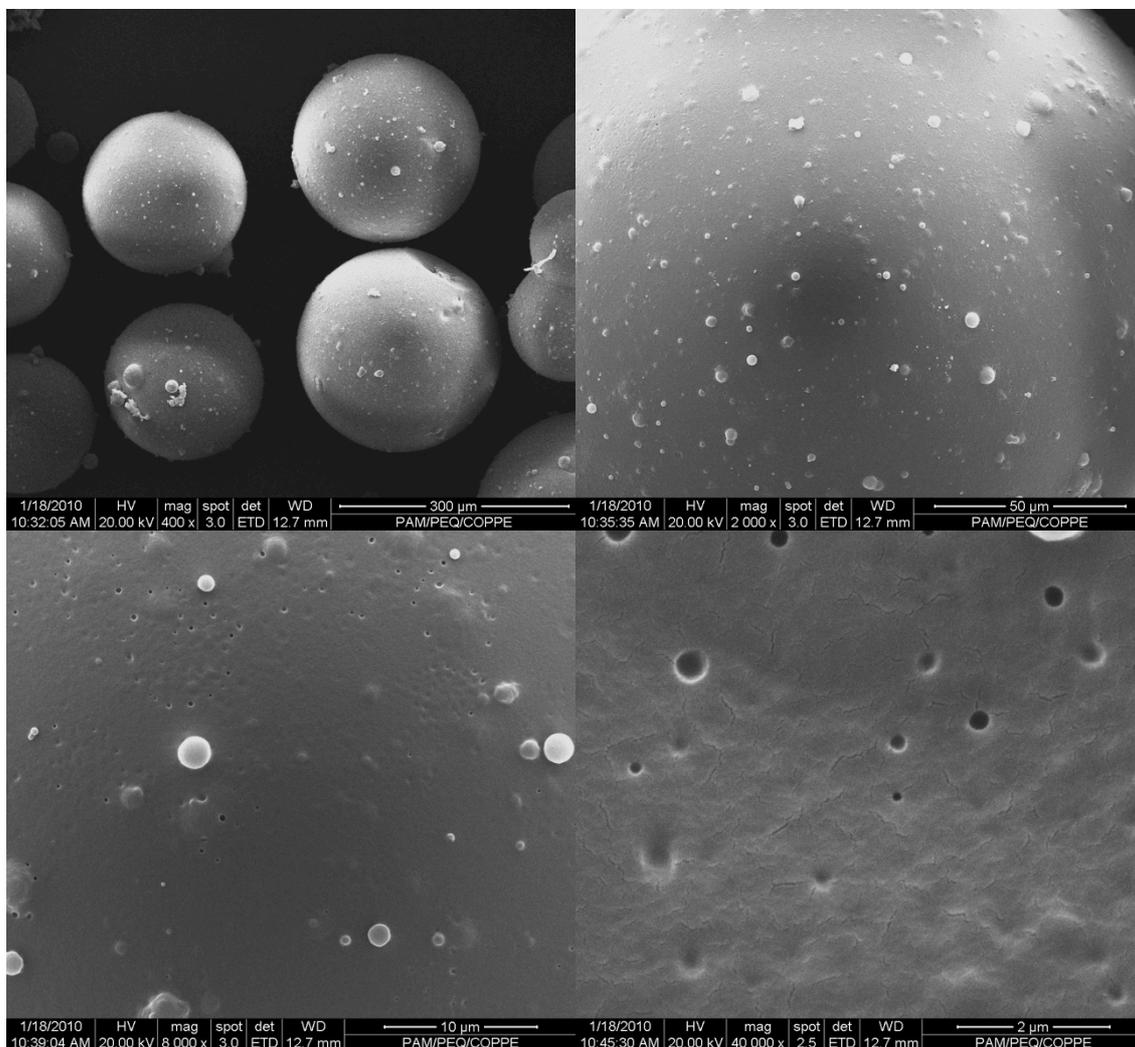


Figura 3.10 – Micrografia das partículas de copolímero de PVAc-co-PMMA

A etapa de saponificação do copolímero não promoveu alterações na morfologia esférica das partículas, conforme mostrado na Figura 3.11. Entretanto, pode-se observar a formação de pequenos poros superficiais em grande parte da superfície das partículas, o que pode ser correlacionado à reação de hidrólise dos radicais acetato presentes nas esferas de copolímero, uma vez que essas amostras foram sintetizadas na ausência de fármaco.

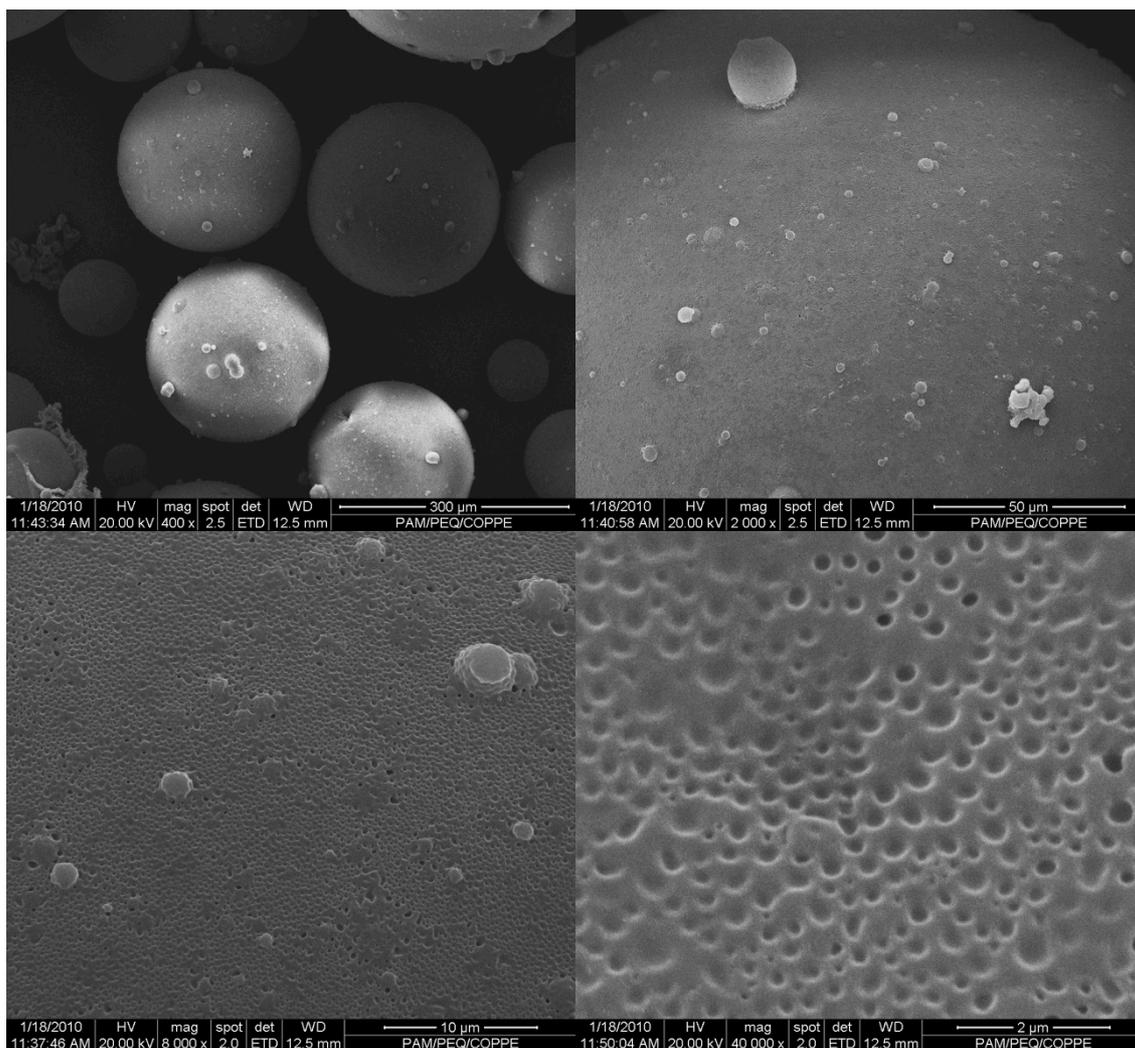


Figura 3.11 – Micrografia das partículas de copolímero após reação de saponificação (PVA/PVAc-co-PMMA).

Entretanto, ao se incorporar 3% de amoxicilina à fase aquosa da reação de polimerização em suspensão, significativas alterações nas características morfológicas das partículas puderam novamente ser observadas, conforme mostrado Figura 3.12. Novamente foi possível afirmar que a adição *in situ* de amoxicilina de fato promove alterações na morfologia da partícula, o que reforça as observações feitas no Capítulo 2. Desta forma, a presença da amoxicilina na forma de um pó finamente dividido mais uma vez explica a formação de uma superfície rugosa, devido à acumulação da droga

nas vizinhanças da superfície das partículas. Entretanto, a etapa de saponificação parece exercer um efeito sinérgico, em relação à formação de poros superficiais.

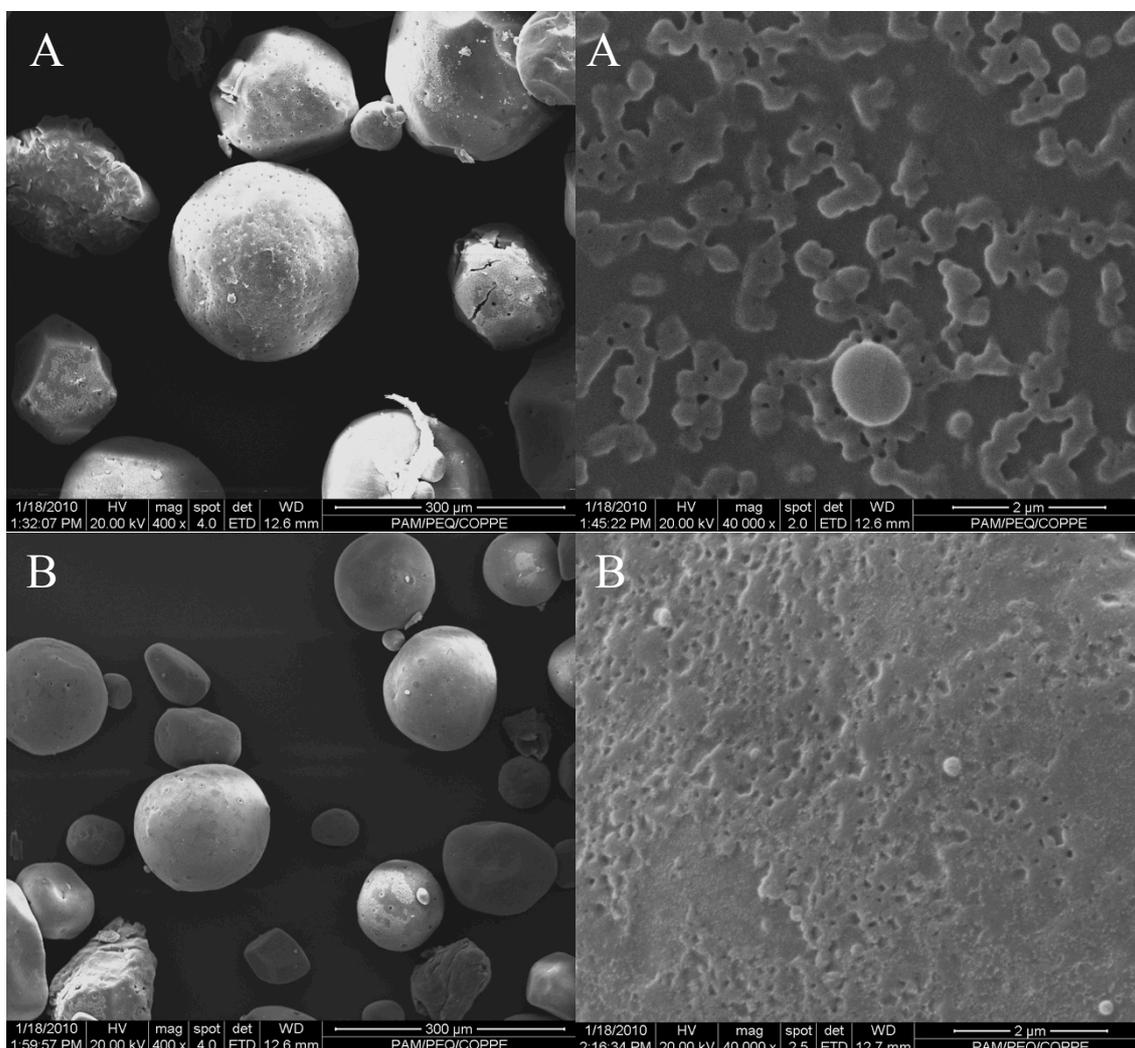


Figura 3.12 – Micrografia das partículas de copolímero de PVAc-co-PMMA com 3% de amoxicilina adicionada *in situ* à reação de polimerização. A) antes da reação de saponificação; B) após a reação de saponificação.

A adição e acúmulo de amoxicilina acima do limite de solubilidade do fármaco no meio possui influência definitiva no controle da morfologia esférica da partícula. Conforme demonstrado anteriormente na Figura 3.12, a presença de partículas esféricas é representativamente inferior ao de partículas com deformação na morfologia esférica “padrão” das partículas de copolímero. Como os testes de tensão interfacial

demonstraram que a amoxicilina não possui efeito positivo na redução da tensão interfacial das gotas de comonômeros, a adição em excesso deste fármaco pode interferir de maneira negativa na formação de partículas esféricas, uma vez que a amoxicilina não atua como um coestabilizador das gotas de comonômeros.

Na Figura 3.13 é apresentado o espectro de ^1H -RMN do copolímero sintetizado na presença de diferentes concentrações de amoxicilina (0-3%). Neste espectro foi possível identificar os deslocamentos específicos dos prótons relacionados ao copolímero aleatório sintetizado (VAc em $\delta = 4.8$ ppm ($-\text{CHO}-$) e do MMA em $\delta = 3.6-3.8$ ppm ($-\text{COOCH}_3$)). Porém, não foi possível identificar nenhum sinal específico referente à amoxicilina ou aos prótons do segmento de PVA, provavelmente devido às baixas concentrações dessas substâncias nas matrizes poliméricas. Os sinais observados entre $\delta = 7.0-8.0$ ppm são deslocamentos relacionados ao iniciador utilizado (BPO).

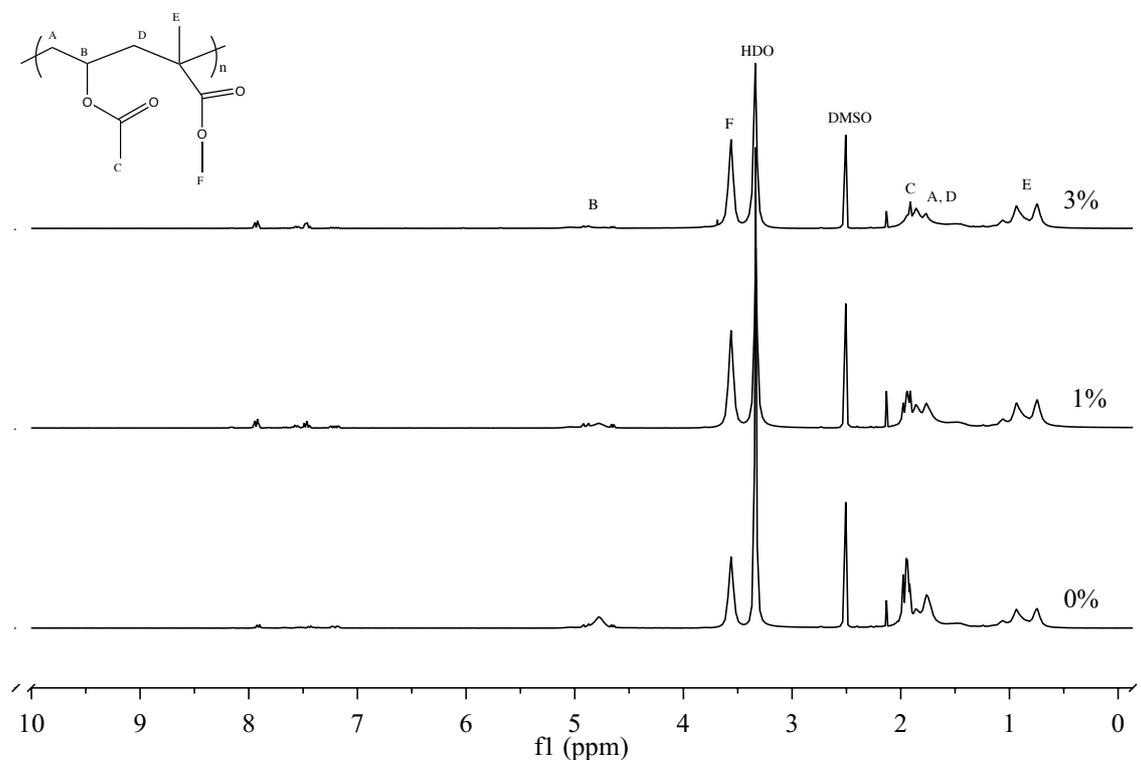


Figura 3.13 - ^1H -RMN para copolímero aleatório de PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina, após o processo de saponificação (PVA/PVAc-co-PMMA).

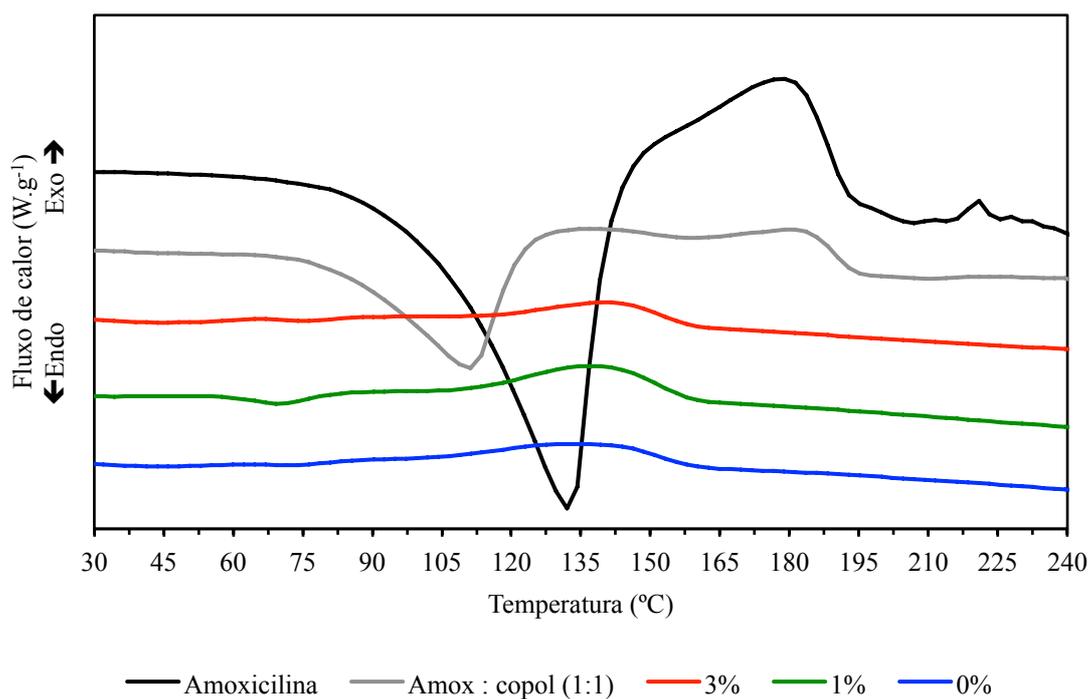
Com auxílio de cálculos de integração das áreas dos picos, pode-se determinar que os copolímeros sintetizados na ausência de amoxicilina apresentaram uma composição média de 1 : 1,2 (VAc : MMA). Esse fato pode ser explicado devido às maiores constantes cinéticas de propagação do MMA em relação ao VAc, [93] uma vez que a composição inicial da mistura de comonômeros era de 70:30 (VAc:MMA). Entretanto, ao se analisar detalhadamente os espectros, pode-se observar que o aumento da concentração de amoxicilina no sistema provoca a redução da proporção final de PVAc. Efeito similar havia sido detectado no Capítulo anterior e talvez indique que a amoxicilina reage preferencialmente com os radicais VAc, tornando as polimerizações de VAc mais sensíveis à presença de amoxicilina que as copolimerizações.

Na Figura 3.14 são apresentados os resultados de DSC para a amoxicilina e para os copolímeros sintetizados, antes e após processo de saponificação das partículas. Os resultados indicaram que, quando misturas físicas de amoxicilina e copolímero são feitas, o perfil térmico da amostra é resultado da contribuição de ambos os tipos de moléculas.

Entretanto, para as amostras de copolímero sintetizadas na presença de amoxicilina, não foi possível observar claramente o sinal característico da amoxicilina, fato este que pode estar correlacionado à baixa concentração de fármaco presente nas amostras. O mesmo fato foi observado para as amostras saponificadas, uma vez que o baixo conteúdo de PVA nas matrizes poliméricas também não influenciou de maneira significativa o perfil térmico das amostras.

Uma característica importante da técnica de embolização vascular é o tamanho do agente embólico usado. Por exemplo, para procedimentos de embolização da artéria uterina, é recomendado o uso de partículas na faixa de 300-700 μm . [39] Por meio de

a)



b)

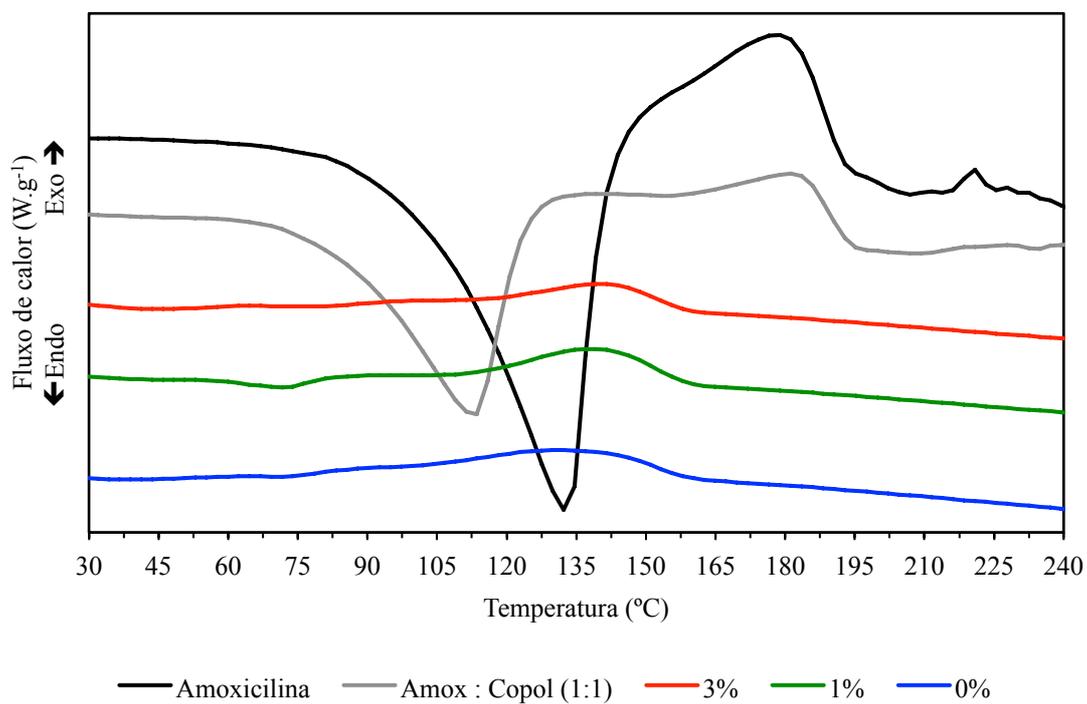


Figura 3.14 – Curvas de DSC para amoxicilina e copolímeros sintetizados com a incorporação *in situ* de amoxicilina (0-3%) durante reações de polimerização em suspensão. (a) copolímeros antes da saponificação; (b) copolímeros após a saponificação.

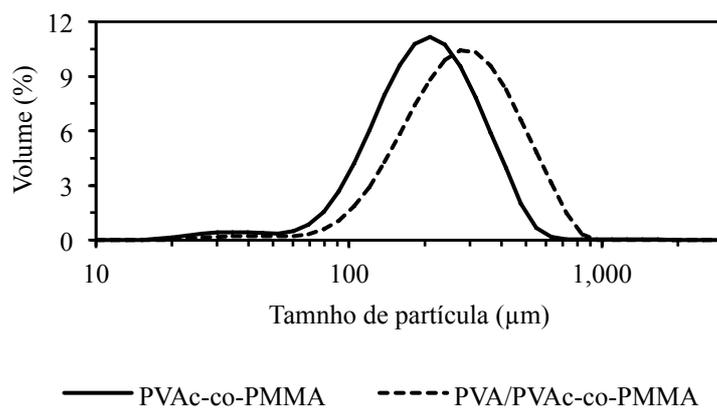
análises de tamanho de partícula (Figura 3.15), pode-se determinar que o tamanho médio das partículas sintetizadas foi de 200-320 μm . Embora este valor seja um pouco inferior ao tamanho médio recomendado para os procedimentos de embolização da artéria uterina, este valor é na verdade uma média dos vários tipos de frações de partículas obtidas, onde as maiores frações obtidas estiveram dentro de uma faixa de 100-600 μm . Além disso, é sabido que o controle do tamanho final das partículas poliméricas produzidas por intermédio de polimerizações em suspensão pode ser ajustado com um controle mais refinado de algumas variáveis de processo, como por exemplo a velocidade de agitação do sistema e também a concentração de agente de suspensão utilizado. [42-45]

Uma outra alternativa para obter um controle mais refinado do tamanho final das partículas é a utilização de tipos específicos de polimerização em suspensão, como é o caso da Semi-suspensão, que é um processo em duas etapas onde as partículas obtidas possuem tamanhos bastante homogêneos. [42]

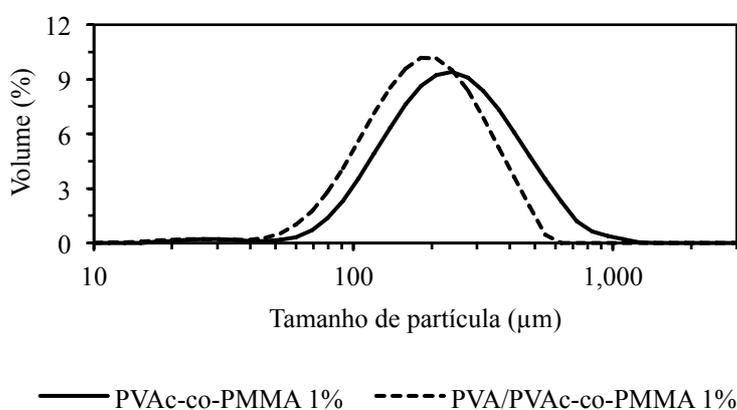
Entretanto, conforme observado na Figura 3.15, tanto a incorporação *in situ* de amoxicilina quanto a etapa de saponificação das partículas de copolímero promoveram alterações no tamanho final das partículas. Através dos resultados apresentados, pode-se concluir que a etapa de saponificação reduziu o tamanho médio das partículas nas amostras que foram sintetizadas na presença de amoxicilina. Já nas partículas sintetizadas na ausência de fármaco, o efeito oposto foi observado.

A etapa de saponificação (Figura 3.16) tem como objetivo tornar o copolímero mais biocompatível, formando uma camada superficial de PVA, por meio da hidrólise de radicais acetatos. Admitindo a hipótese que apenas os radicais acetatos participam da reação de hidrólise (a hidrólise de radicais acrilatos só ocorre em condições extremamente alcalinas [49]), o aumento no tamanho final das partículas só pode ter

a)



b)



c)

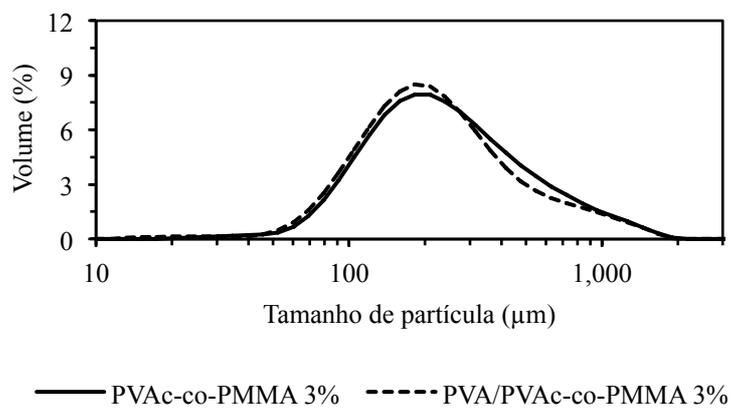


Figura 3.15 – Distribuição de tamanho de partículas de copolímeros antes (PVAc-co-PMMA) e após a etapa de saponificação (PVA/PVAc-co-PMMA). (a) sem incorporação de amoxicilina; (b) com incorporação *in situ* de 1% de amoxicilina; (c) com incorporação *in situ* de 3% de amoxicilina.

vido ocasionado pelo consumo das partículas menores. Como o PVA é solúvel em água e como a massa das partículas diminui com a saponificação, o deslocamento de distribuição de tamanhos pode ser ocasionada pela dissolução das partículas menores no meio aquoso.

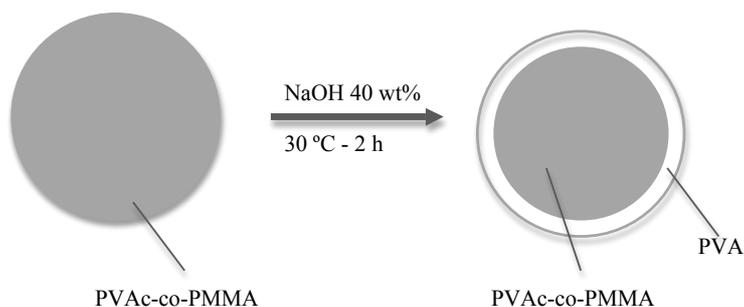


Figura 3.16 – Representação esquemática do processo de saponificação de partículas esféricas de copolímero aleatório de PVAc-co-PMMA.

É muito curioso perceber que a presença de amoxicilina provoca deslocamento dos tamanhos de partícula para valores maiores, provavelmente porque se deposita na superfície e reduz a eficiência de proteção do agente de suspensão. Durante a saponificação, os deslocamentos são pouco pronunciados na direção de tamanhos menores, como seria esperado se a saponificação não é muito intensa e se o PVA não se dissolve no meio.

Como demonstrado no Capítulo 2, a incorporação *in situ* da amoxicilina através da fase aquosa do sistema de polimerização em suspensão acarreta na adsorção do fármaco preferencialmente na superfície das partículas de copolímero. Desta forma, teoricamente a etapa de saponificação promove uma remoção (ou hidrólise) da amoxicilina adsorvida na superfície das partículas. A Figura 3.15, além das micrografias anteriormente apresentadas, reforçam essa hipótese, uma vez que partículas sintetizadas na presença de diferentes concentrações de amoxicilina apresentam distribuições

distintas de tamanho de partículas. Após a etapa de saponificação, a amoxicilina presente na superfície das partículas é removida, mas evita a remoção pronunciada de PVA da superfície, efeito que ocasiona uma ligeira redução no tamanho médio final das partículas de copolímero.

A redução no tamanho médio das partículas de copolímero sintetizadas na presença de amoxicilina, após o processo de saponificação também pode estar relacionada à uma menor quantidade de reações de ramificação, uma vez que os dados de $^1\text{H-RMN}$ revelaram uma menor concentração de radicais acetatos disponíveis para reagirem em reações de saponificação.

A dinâmica da conversão global dos monômeros foi monitorada quando diferentes concentrações de amoxicilina foram adicionadas ao reator durante as reações de polimerização do VAc e MMA. Conforme demonstrado na Figura 3.17, a homopolimerização do VAc é significativamente afetada pela aumento da concentração de amoxicilina no meio reacional. Neste caso, o fármaco exerce uma clara ação inibitória nas taxas reacionais.

Entretanto, nas reações de copolimerização do VAc/MMA, o efeito inibitório não se mostrou tão evidente, conforme mostrado na Figura 3.18. Esse fato pode ser função das altas taxas de terminação dos radicais livres em reações de copolimerização na presença de MMA. Apesar disto, é interessante observar que o efeito inibitório da amoxicilina parece depender da composição do meio reacional. Nas reações de copolimerização, na ausência ou presença de fármaco, a conversão global não ultrapassaram mais do que 50%, indicando que nesse tipo de copolimerização faz-se necessário adotar estratégias para atingir valores mais elevados de conversão. Desta forma, devido às baixas taxas reacionais, as copolimerizações de VAc/MMA devem ser realizadas em mais altas temperaturas, por longos períodos e adotando procedimentos

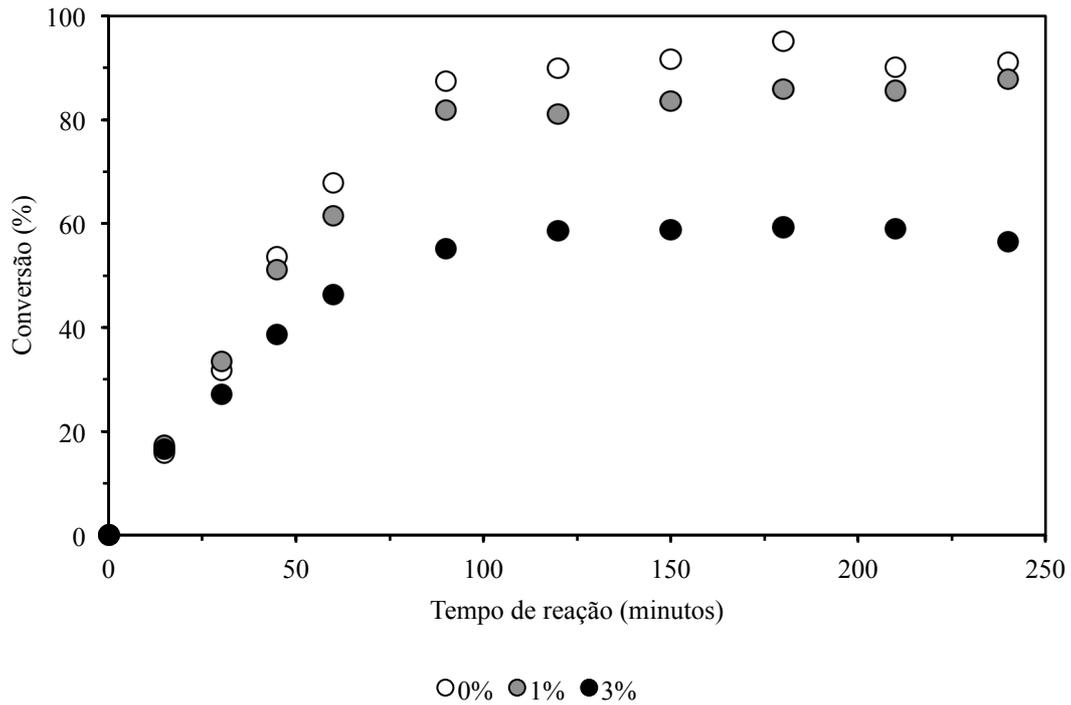


Figura 3.17 – Evolução da conversão global do monômero com o tempo de reação, na ausência (0%) e na presença (1-3%) de amoxicilina incorporada *in situ* durante as reações de homopolimerização em suspensão do acetato de vinila (VAc).

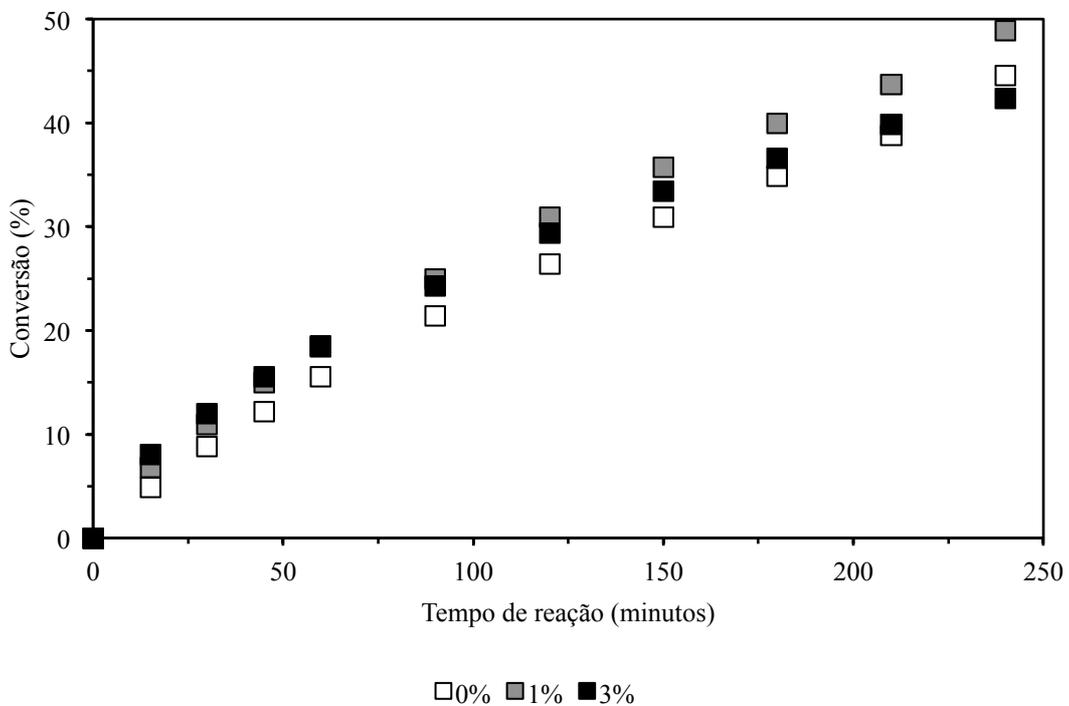


Figura 3.18 – Evolução da conversão global de comonômeros com o tempo de reação, na ausência (0%) e na presença (1-3%) de amoxicilina incorporada *in situ* durante as reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila (VAc) e metacrilato de metila (MMA).

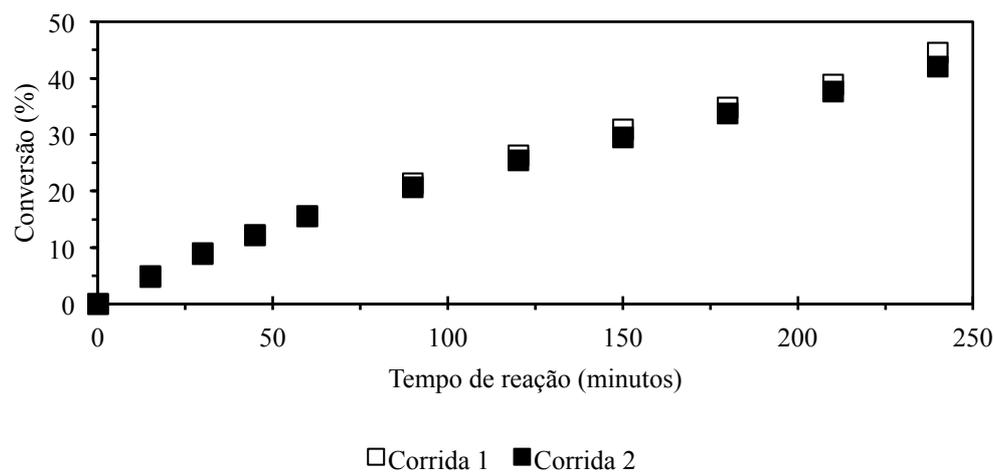
que aumentem a quantidade o tempo de vida dos radicais livres, seja pelo uso de maiores concentrações de iniciadores químicos ou em combinação com outras estratégias.

A dinâmica da conversão global dos monômeros foi monitorada em diversas oportunidades, tanto para a homopolimerização do VAc quanto para a copolimerização do VAc/MMA. Nas reações de homopolimerização, o gráfico apresentado na Figura 3.17 representa os resultados mais consistentes obtidos, avaliando o comportamento dinâmico de conversão em relação à concentração de fármaco incorporada *in situ* durante a reação de polimerização em suspensão do acetato de vinila. Embora não apresentados, esse comportamento dinâmico apresentou o mesmo perfil quando outros conjuntos de reações foram realizados.

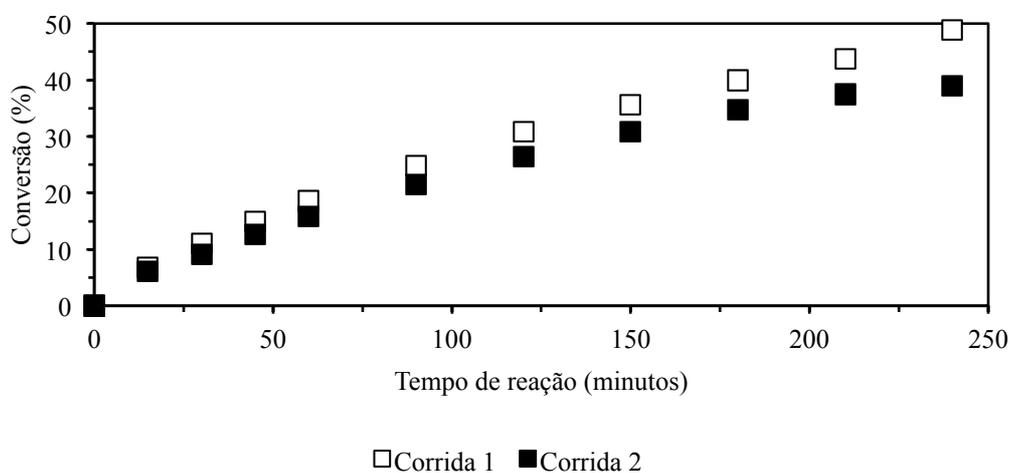
Conforme observado na Figura 3.18, a dinâmica de conversão global dos comonômeros, para a reação de copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila, não apresentou o mesmo perfil cinético em relação à reação de homopolimerização do acetato de vinila. Desta forma, outras reações foram conduzidas para verificar a reprodutibilidade dos dados anteriormente apresentados, conforme demonstrado nos gráficos da Figura 3.19 (que comprova o comportamento cinético anteriormente apresentado na Figura 3.18).

No Capítulo 2, observou-se que a incorporação *in situ* de amoxicilina nas reações de copolimerização promove significativas alterações nos valores de massa molar final dos copolímeros obtidos. Desta forma, quando a amoxicilina era incorporada em pequenas quantidades, o efeito observado foi o de um aumento da massa molar do copolímero obtido. Observou-se que esse aumento está relacionado à quantidade de fármaco adicionado ao meio reacional, uma vez que a massa molar aumentava, à medida em que a quantidade de amoxicilina era aumentada no meio

a)



b)



c)

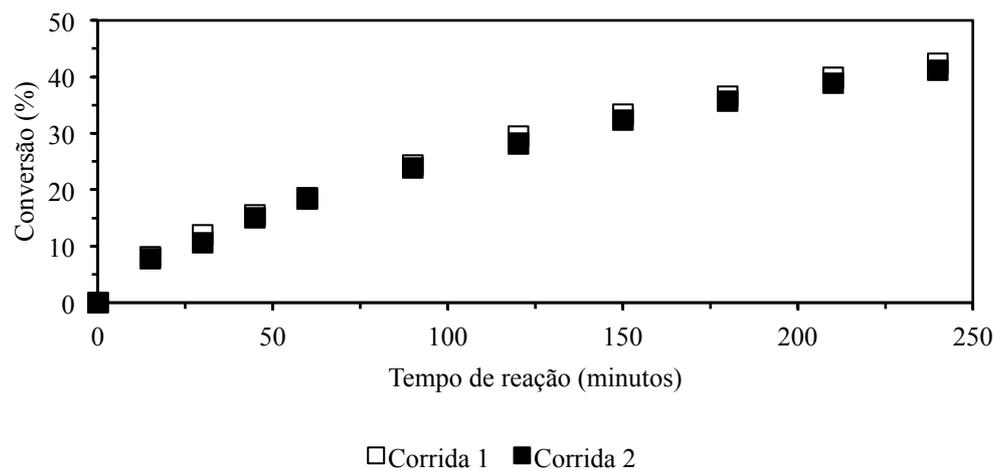


Figura 3.19 – Réplica das medidas de conversão global das reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila. (a) sem incorporação de amoxicilina; (b) com incorporação *in situ* de 1% de amoxicilina; (c) com incorporação *in situ* de 3% de amoxicilina.

reacional, independentemente da fase em que o fármaco era incorporado. Desta forma, baseado nos dados previamente apresentados, especulou-se que parte do fármaco poderia estar atuando como agente reticulante, quando utilizado em baixas concentrações (até 1% em relação à massa do monômero).

Nos experimentos relatados neste Capítulo, a concentração de amoxicilina no meio reacional variou entre 0-3%. Os dados de massa molar dos copolímeros obtidos (Tabela 3.3) indicaram que a incorporação de 1% de amoxicilina no meio reacional aumentou ligeiramente os valores de massa molar dos copolímeros. Este efeito não foi observado quando a concentração de amoxicilina no meio reacional de copolimerização foi de 3%.

Table 3.3 – Valores de massa molar para copolímeros de acetato de vinila e metacrilato de metila sintetizados com adição *in situ* de amoxicilina (0-3%) durante a copolimerização em suspensão antes (PVAc-co-PMMA) e após a etapa de saponificação (PVA/PVAc-co-PMMA).

Amostra	Conversão	$M_n \times 10^{-3}$ (g/mol)	$M_w \times 10^{-3}$ (g/mol)	M_w/M_n
PVAc-co-PMMA 0%*	45	37	64	1,72
PVAc-co-PMMA 1%*	49	39	84	2,18
PVAc-co-PMMA 3%*	42	21	60	2,84
PVA/PVAc-co-PMMA 0%	> 45	37	64	1,73
PVA/PVAc-co-PMMA 1%	> 49	40	79	1,96
PVA/PVAc-co-PMMA 3%	> 42	29	68	2,32

PVAc = poli(acetato de vinila); PMMA = poli(metacrilato de metila); PVA = poli(álcool vinílico).

* amostra retirada após 240 minutos de polimerização.

Na Figura 3.20 estão ilustradas as distribuições de massas molares dos copolímeros de PVAc-co-PMMA obtidos nas reações de copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila. A incorporação *in situ* de 1% de amoxicilina produziu um pequeno deslocamento da curva de distribuição da massa molar, principalmente nas frações poliméricas de valores elevados de massa molar, sendo este um efeito ligeiramente diferente do observado anteriormente no Capítulo 2.

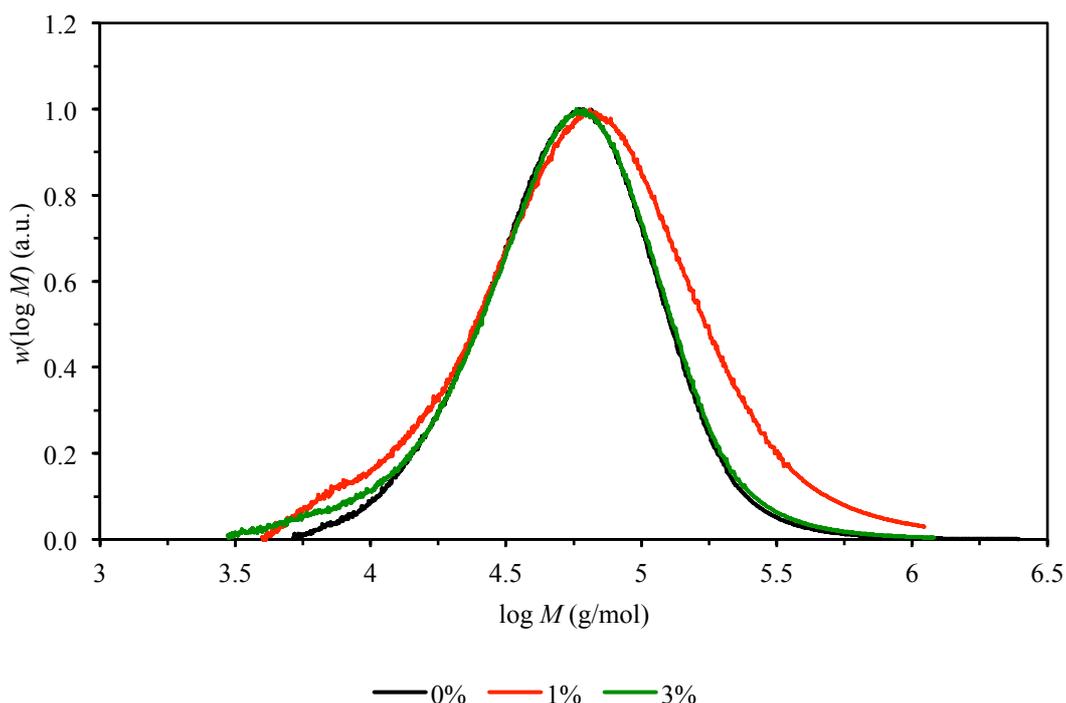


Figura 3.20 – Curvas de distribuição de massa molar das amostras finais de copolímeros de acetato de vinila e metacrilato de metila sintetizados como incorporação *in situ* de 0-3% de amoxicilina (PVAc-co-PMMA). 0%) $M_w = 64 \times 10^3$ g/mol, $M_w/M_n = 1,72$; 1%) $M_w = 82 \times 10^3$ g/mol, $M_w/M_n = 2,40$; 3%) $M_w = 64 \times 10^3$ g/mol, $M_w/M_n = 1,97$.

Entretanto, a incorporação *in situ* de 3% de amoxicilina não ocasionou um deslocamento da curva de distribuição de massa molar do copolímero produzido, sendo o perfil da curva bastante similar ao do copolímero sintetizado na ausência de fármaco. Neste caso, o excesso de amoxicilina presente no meio reacional pode estar atuando como um agente de transferência de cadeia, reduzindo os valores de M_w . É provável que o comportamento complexo (aumento, seguido de queda) tenha relação com a incorporação da amoxicilina como comonômero e possível reticulação. A incorporação exagerada pode levar à inibição e redução de massa molares.

A etapa de saponificação dos copolímeros produzidos não alterou de maneira significativa os valores de massa molar dos polímeros, conforme demonstrado na Tabela 3.3. A mesma conclusão pode ser feita para as curvas de distribuição de massa

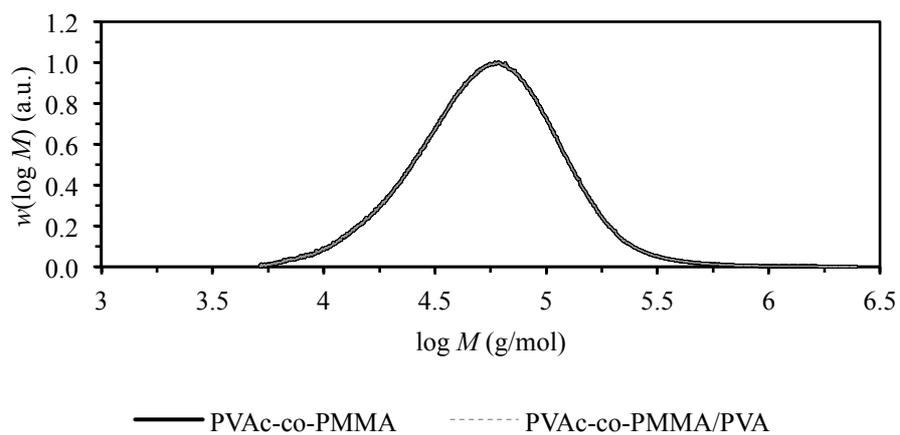
molar dos copolímeros após o processo de saponificação (Figura 3.21), onde apenas algumas pequenas alterações na distribuição da massa molar foram observadas. Portanto, parece certo que a presença do PMMA e da amoxicilina reduzem a sensibilidade do material à etapa de saponificação.

Uma análise mais detalhada da dinâmica de evolução das massa molares durante as reações de copolimerização é apresentada nas Figuras 3.22 e 3.23. Os dados apresentados indicam que as massa molares apresentam um comportamento dinâmico bastante similar, para reações conduzidas na presença de diferentes concentrações de amoxicilina.

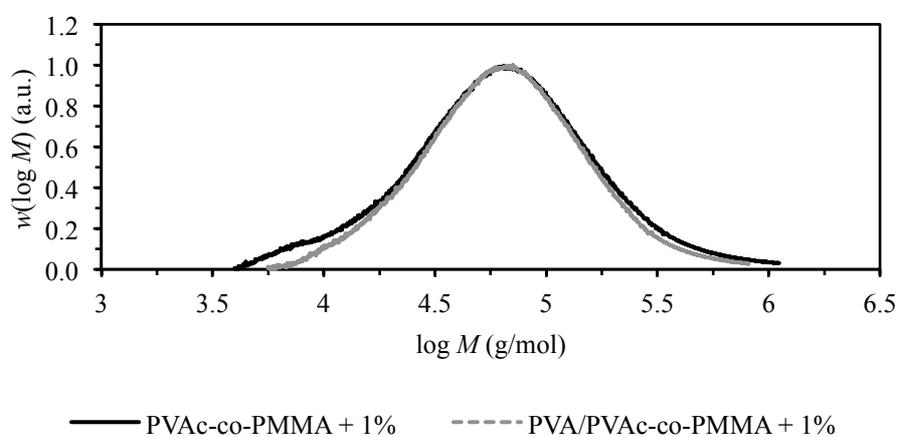
De acordo com os dados das Figuras 3.22 e 3.23, o comportamento dinâmico das massas molares médias (M_n e M_w) tendem a permanecer em um patamar constante após os primeiros minutos de reação, apresentando apenas um ligeiro aumento nos instantes finais da reação. Este efeito é claramente observado quando a concentração de amoxicilina presente no meio reacional é de 1%.

Analisando os resultados apresentados e também os resultados apresentados no Capítulo 2, parece claro que a amoxicilina afeta as reações de copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila de diferentes maneiras. Quando o fármaco está presente no meio reacional em concentrações de até 1%, o efeito observado foi de uma grande interação do fármaco com as cadeias poliméricas, o que ocasionou uma pequena elevação da massa molar final dos copolímeros produzidos. Entretanto, para concentrações superiores a 1%, a tendência é de que o excesso de amoxicilina no meio reacional (superior ao limite de solubilidade do fármaco) promova não mais um incremento da massa molar final, mas sim uma redução da massa molar final do copolímero, atuando neste caso como um agente de transferência de cadeia.

a)



b)



c)

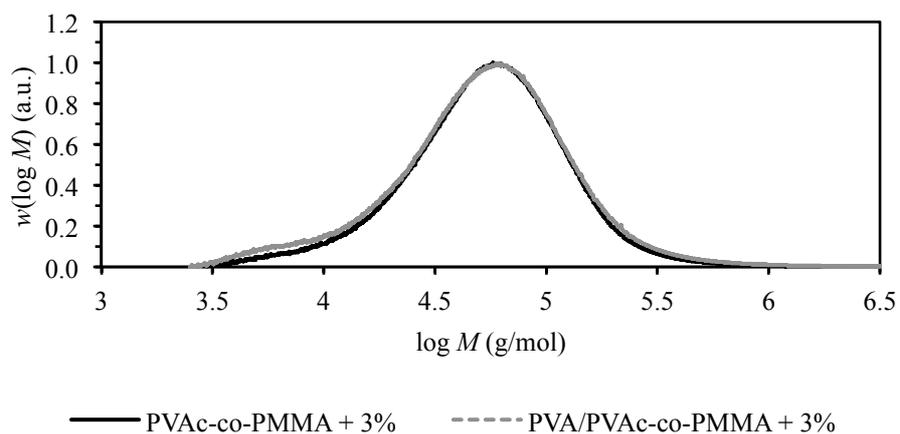


Figura 3.21 – Curvas de distribuição de massa molar das amostras finais de copolímeros de VAc/MMA sintetizados como incorporação *in situ* de amoxicilina, antes (PVAc-co-PMMA) e após processo de saponificação (PVA/PVAc-co-PMMA). (a) sem incorporação de amoxicilina; (b) com incorporação *in situ* de 1% de amoxicilina; (c) com incorporação *in situ* de 3% de amoxicilina.

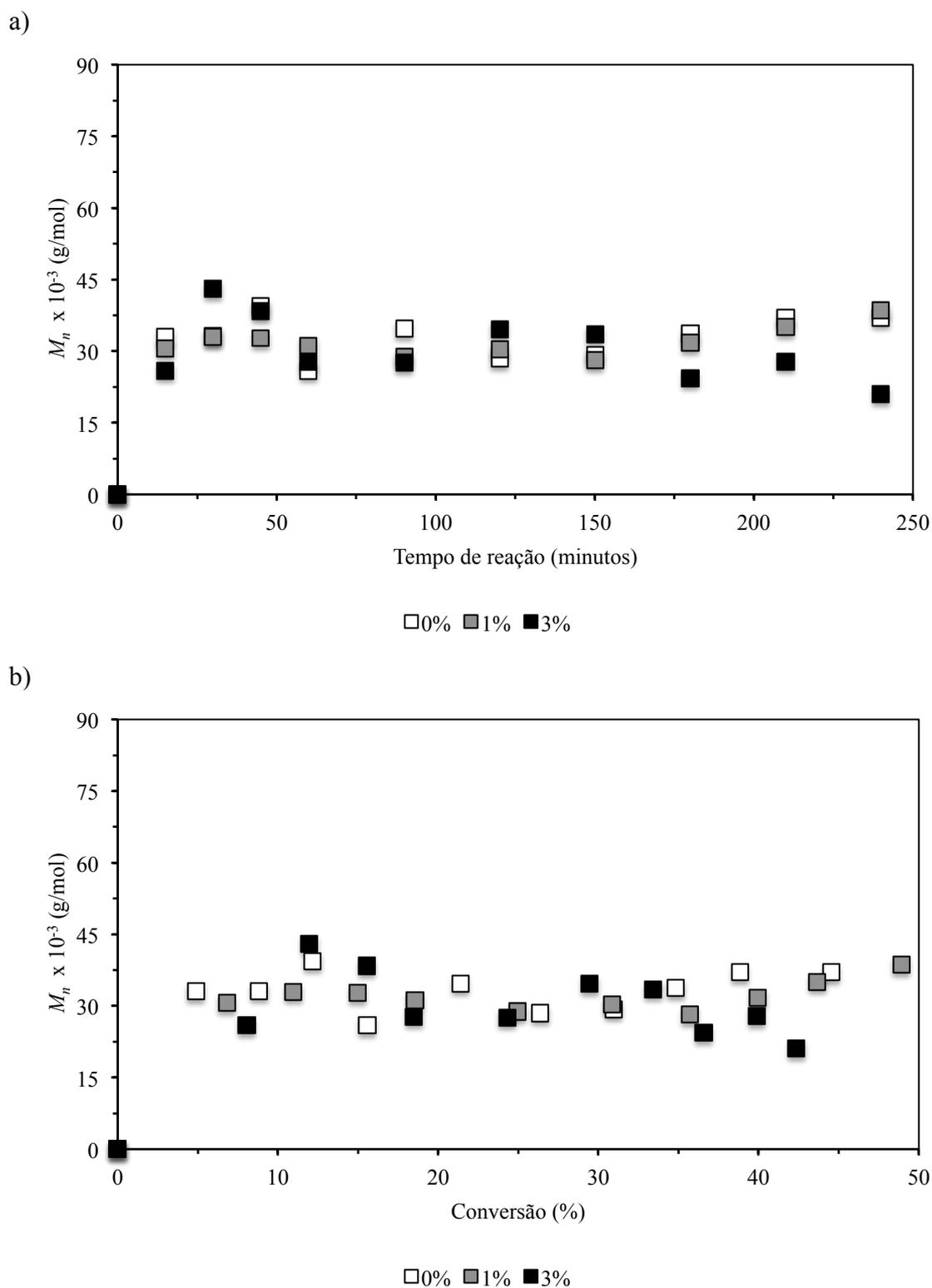


Figura 3.22 – Evolução dinâmica da massa molar numérica (M_n) em função (a) do tempo de reação e (b) da conversão global, para reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila, na ausência (0%) e com a incorporação *in situ* de diferentes concentrações de amoxicilina (1-3%).

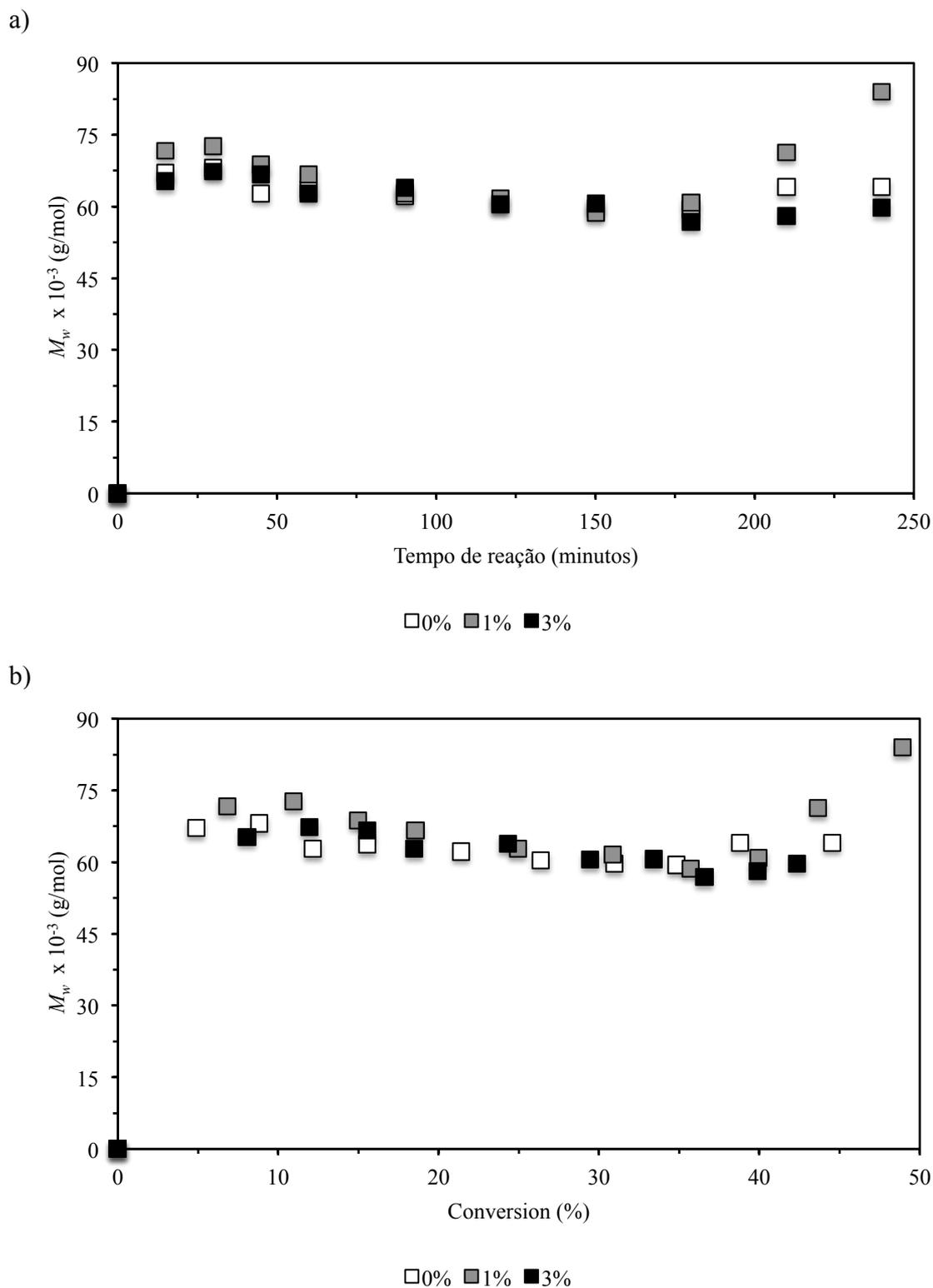


Figura 3.23 – Evolução dinâmica da massa molar ponderal (M_w) em função (a) do tempo de reação e (b) da conversão global, para reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila, na ausência (0%) e com a incorporação *in situ* de diferentes concentrações de amoxicilina (1-3%).

Esse comportamento está possivelmente relacionado aos limites de solubilidade do material e acúmulo de sólido na superfície das partículas de polímero, uma vez que a amoxicilina acima do limite de solubilidade deve permanecer na interface gota-água do sistema. Entretanto, também é importante ressaltar que os efeitos cinéticos promovidos pela amoxicilina estão provavelmente relacionados à presença de múltiplas funcionalidades na molécula de fármaco. Além disso, é possível que os efeitos cinéticos observados também possam ser função de limitações quanto à difusão de reagentes ao longo da copolimerização e/ou um possível *efeito gel*, comum nesses tipos de reações.

No Capítulo 2, foi demonstrado (e proposto) um perfil hipotético de incorporação e liberação de amoxicilina das partículas poliméricas. Com base nos resultados obtidos, hipotetizou-se que grande parte das moléculas de amoxicilina não se encontra ligada covalentemente às cadeias poliméricas e sim *adsorvidas* a matriz polimérica. Entretanto, devido ao processo de extração de fármaco utilizado, também hipotetizou-se ser provável que nem todo o fármaco possivelmente *adsorvido* foi extraído dos polímeros, sendo assim incerto determinar o percentual (ou eficiência) de incorporação *in situ* do fármaco nos copolímeros.

Nas reações realizadas neste Capítulo, a adição *in situ* da amoxicilina foi realizada apenas pela fase aquosa do sistema e em concentrações superiores as usadas anteriormente (1-3%). Desta forma, análises de espectrofotometria na região do UV-Vis da fase contínua da suspensão, no início e final das reações de polimerização, permitiram determinar que a quantidade de amoxicilina incorporada *in situ* durante as reações de copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila provavelmente está na faixa de 7-8%.

3.4.2 Efeitos da incorporação *in situ* de doxorubicina nas reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila

Nas seções anteriores foi demonstrado que a incorporação *in situ* de amoxicilina durante a copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila contribui para significativas modificações em algumas das propriedades finais das partículas, o que inclui a morfologia, a massa molar e comportamento térmico dos copolímeros. Concluiu-se que tanto a concentração quanto a estratégia de incorporação da droga afetam essas propriedades. A seguir, será descrito como a incorporação *in situ* de doxorubicina, durante a copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila, afeta as propriedades morfológicas e moleculares das partículas de copolímero, bem como a cinética de copolimerização.

Na Figura 3.24 são apresentadas micrografias das partículas de copolímero de VAc e MMA sintetizadas na presença de doxorubicina. De uma forma geral, foi possível sintetizar partículas com uma morfologia esférica bem definida. Entretanto, assim como observado quando a amoxicilina foi utilizada como droga modelo, a doxorubicina também leva à formação de uma superfície irregular. Devido à natureza polar da molécula de doxorubicina, este fármaco mostrou-se totalmente insolúvel nos monômeros acetato de vinila e metacrilato de metila. Desta forma, a incorporação da doxorubicina ocorreu somente através da fase contínua (aquosa) do sistema de polimerização em suspensão, fato que contribui para uma possível acumulação do fármaco na superfície das partículas de copolímero.

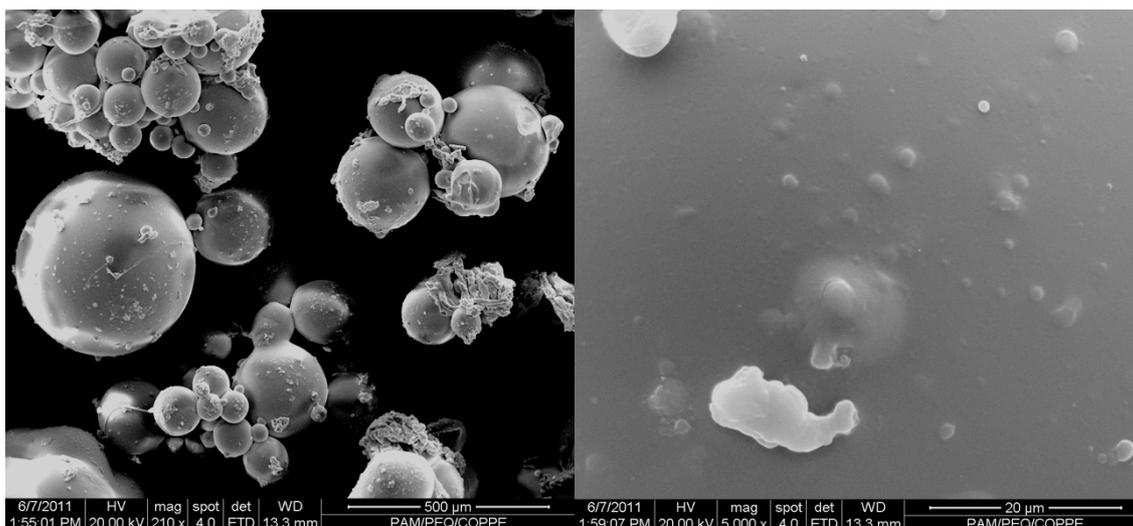


Figura 3.24 – Micrografia de partículas de copolímero sintetizadas com a incorporação *in situ* de doxorrubicina durante a polimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila (PVAc-co-PMMA).

Utilizando a mesma estratégia de síntese apresentada anteriormente, com o intuito de obter partículas com *maior* biocompatibilidade, após a obtenção das partículas de copolímero estas foram submetidas a uma posterior etapa de *saponificação*, para a produção de uma casca de PVA na superfície das partículas por meio da hidrólise dos radicais acetatos. Na Figura 3.25 são apresentadas as micrografias após o processo de saponificação, sendo possível afirmar que, nas condições usadas, esta etapa não ocasionou modificações na morfologia esférica das partículas. Entretanto, uma análise mais minuciosa indicou mudanças significativa nas superfícies das partículas, com acúmulo de pó e presença de rugosidade, porém sem a formação de poros superficiais. Essas modificações superficiais seguiram o mesmo comportamento quando a amoxicilina foi usada como fármaco modelo e incorporado através da fase aquosa do sistema de polimerização. [15]

As micropartículas poliméricas foram obtidas na forma de um pó finamente dividido, apresentando uma coloração ligeiramente avermelhada, provavelmente devido a alguma adsorção de doxorrubicina à superfície das partículas, uma vez que esse

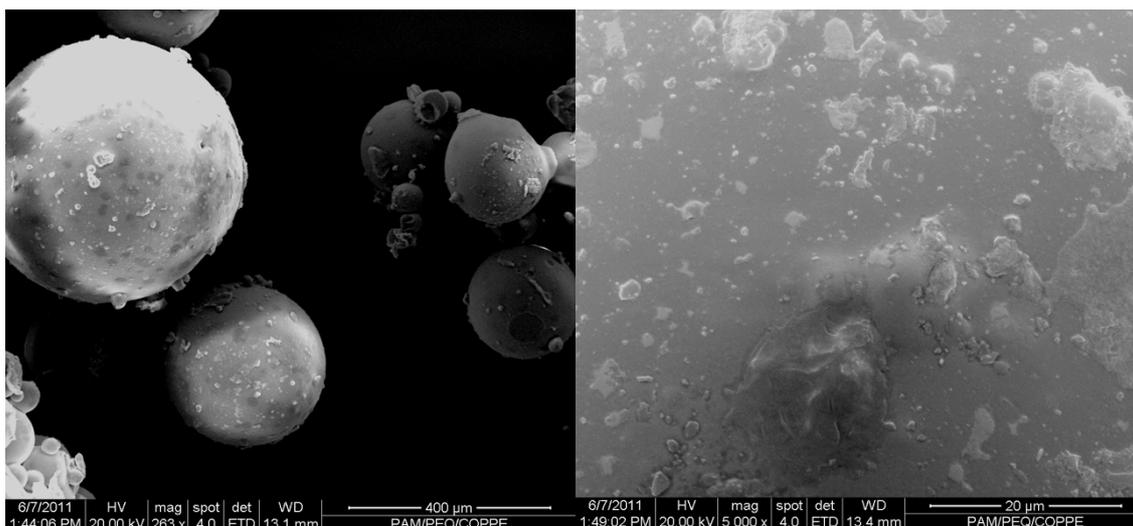


Figura 3.25 – Micrografia de partículas de copolímero de sintetizadas com a incorporação *in situ* de doxorrubicina durante a polimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila após o processo de *saponificação* (PVA/PVAc-co-PMMA).

medicamento apresenta uma intensa e característica coloração vermelha quando solubilizado em água. Entretanto, análises espectrofotométricas de UV-Vis (480-490 nm; específico para a doxorrubicina) da fase contínua do sistema de polimerização em suspensão, onde a droga fora incorporada, mostraram-se inconclusivos quanto à incorporação da doxorrubicina no polímero.

Dessa maneira, outra técnicas analítica (^1H -RMN) foi utilizada para determinar, mesmo que qualitativamente, se houve alguma incorporação de doxorrubicina na superfície das partículas. Porém, novamente não foi possível chegar a uma conclusão a respeito da incorporação do fármaco nas partículas. Na Figura 3.26 é apresentado o espectro de ^1H -RMN do copolímero sintetizado na presença de doxorrubicina. Assim como no espectro de ^1H -RMN do copolímero sintetizado na presença de amoxicilina, também foi possível identificar os deslocamentos específicos dos prótons relacionados ao copolímero aleatório sintetizado, que são os sinais de ressonância do PVAc em $\delta = 4.8$ ppm ($-\text{CHO}-$) e do PMMA em $\delta = 3.6$ - 3.8 ppm ($-\text{COOCH}_3$). Porém, não foi possível identificar nenhum sinal específico que poderia ser relacionado à doxorrubicina

e aos segmentos de PVA para as amostras *saponificadas*. Os sinais observados entre $\delta = 7.0-8.0$ ppm são os sinais relacionados aos prótons aromáticos do iniciador utilizado (BPO), sendo observado em todos os $^1\text{H-RMN}$ para este tipo de copolímero, inclusive para as amostras sintetizadas na ausência de fármaco.

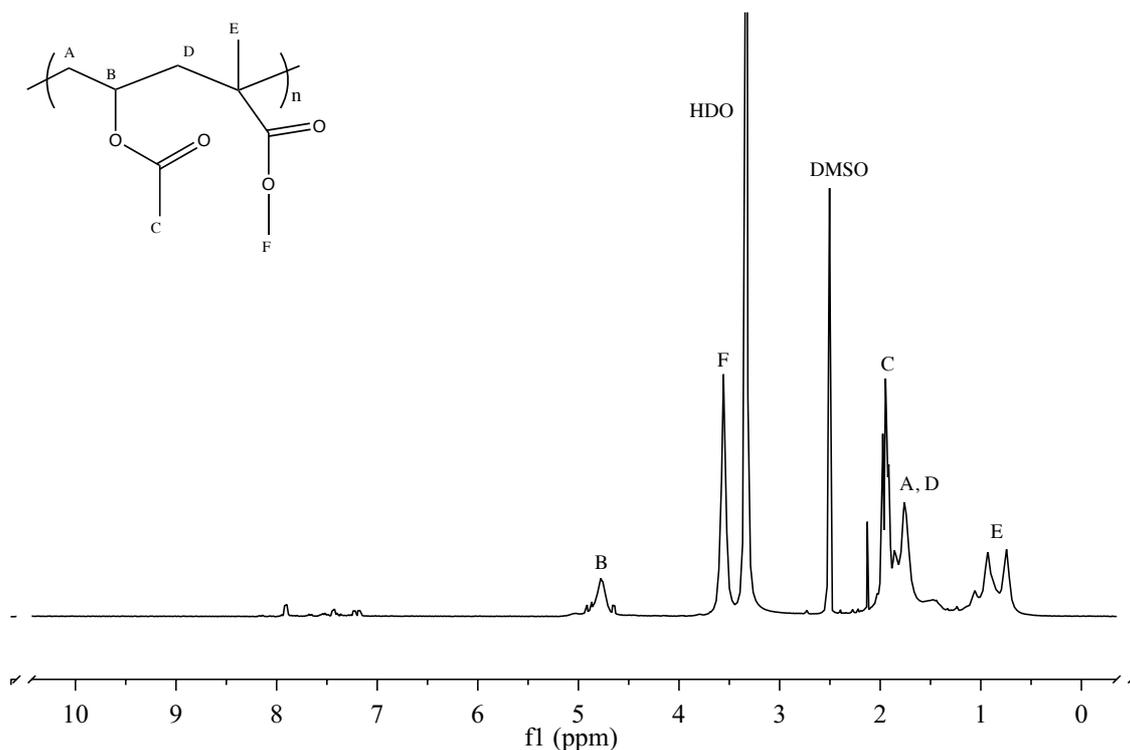


Figura 3.26 – $^1\text{H-RMN}$ para copolímero aleatório de PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de doxorrubicina após o processo de saponificação (PVA/PVAc-co-PMMA).

Com auxílio das análises de tamanho de partícula (Figura 3.27), pode-se determinar que as maiores frações de partículas obtidas estiveram dentro de uma faixa de 200-1.000 μm . Embora este valor seja um pouco superior ao tamanho médio obtido quando a síntese ocorreu na presença da amoxicilina (e/ou na ausência de qualquer tipo de fármaco; $\sim 100-600 \mu\text{m}$), este valor é na verdade uma média dos vários tipos de frações de partículas obtidos. Este deslocamento de tamanho de partícula para frações

superiores pode estar relacionado à etapa de pós-processamento das amostras, onde uma leve maceração manual dos *grãos* foi feita para desfazer possíveis aglomerados poliméricos. Apesar disso, nota-se um significativo deslocamento para valores mais altos, indicativo de maior aglomeração de partículas na presença de fármaco.

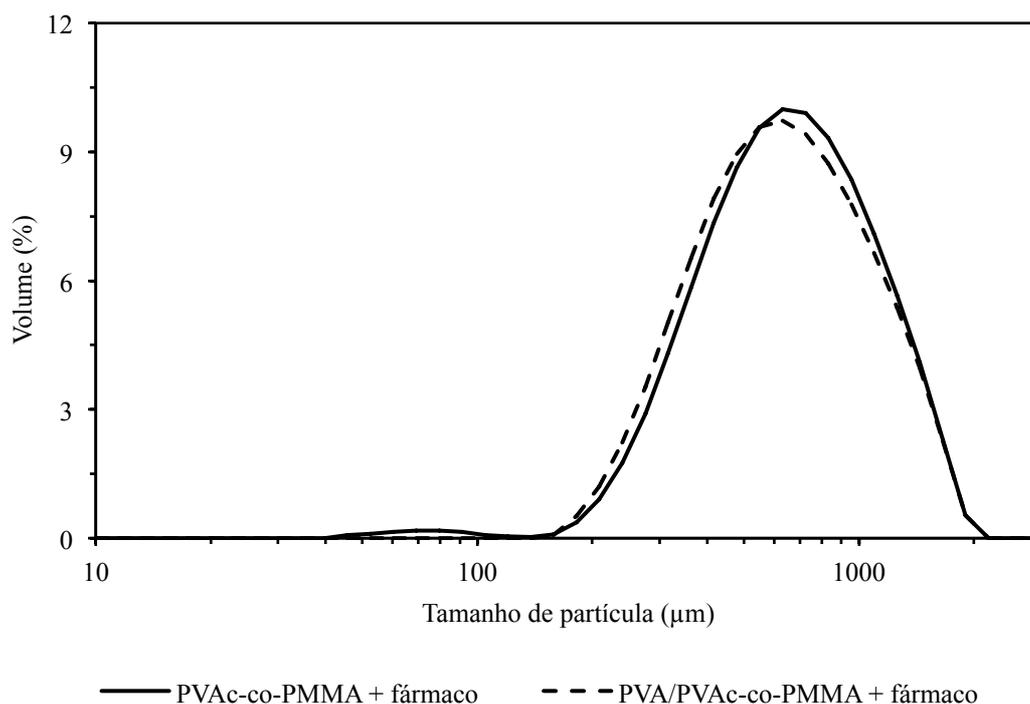


Figura 3.27 –Distribuição de tamanho de partículas de copolímeros sintetizados com a incorporação *in situ* de doxorrubicina antes (PVAc-co-PMMA) e após a etapa de saponificação (PVA/PVAc-co-PMMA).

Conforme observado na Figura 3.27, tanto a incorporação *in situ* de doxorrubicina quanto a etapa de saponificação das partículas de copolímero não promoveram significativas alterações no tamanho final das partículas, sendo este um efeito contrário ao observado quando a amoxicilina foi usada como fármaco. Porém, é importante ressaltar que a quantidade de doxorrubicina adicionada ao meio reacional (0,12 g/L) foi significativamente inferior ao de amoxicilina (até 14 g/L; 3%).

A trajetória da cinética de polimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila foi monitorada na ausência e na presença de doxorrubicina (Figura 3.28). Mesmo presente em pequena concentração, a doxorrubicina parece afetar a cinética da reação, exercendo um efeito inibitório em relação à evolução da conversão global.

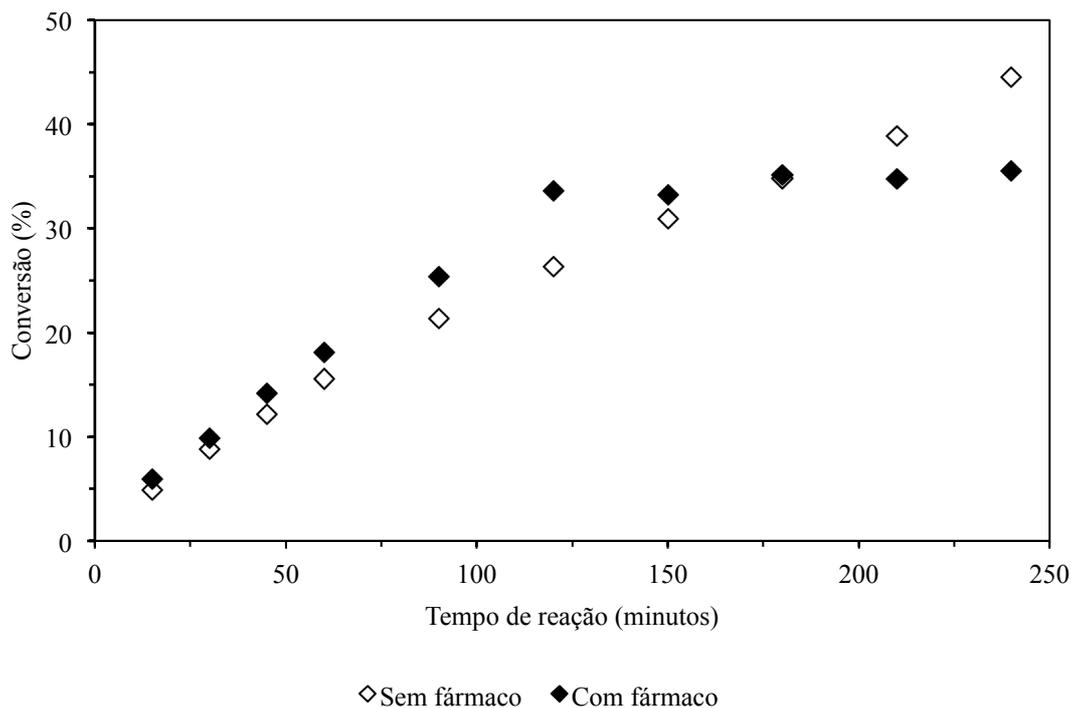


Figura 3.28 – Evolução da conversão global de comonômeros com o tempo de reação, na ausência e na presença de doxorrubicina incorporada *in situ* durante as reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila (VAc) e metacrilato de metila (MMA).

Novamente, a conversão global não ultrapassou mais do que 50%, indicando que nesse tipo de copolimerização faz-se necessário adotar estratégias para atingir valores mais elevados de conversão. Entretanto, conforme observado anteriormente para as reações realizadas na presença de amoxicilina, a presença de um fármaco multifuncional durante as reações de copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila possui uma significativa influência na cinética de copolimerização. O efeito inibitório da doxorrubicina pode estar associado à estrutura do fármaco, que possui certa

semelhança ao de inibidores químicos de polimerização, como é o caso da hidroquinona (Figura 3.29). Além disso, os efeitos cinéticos induzidos pela presença de doxorrubicina podem também estarem associados a efeitos de difusão ou *efeitos gel* no sistema de polimerização.

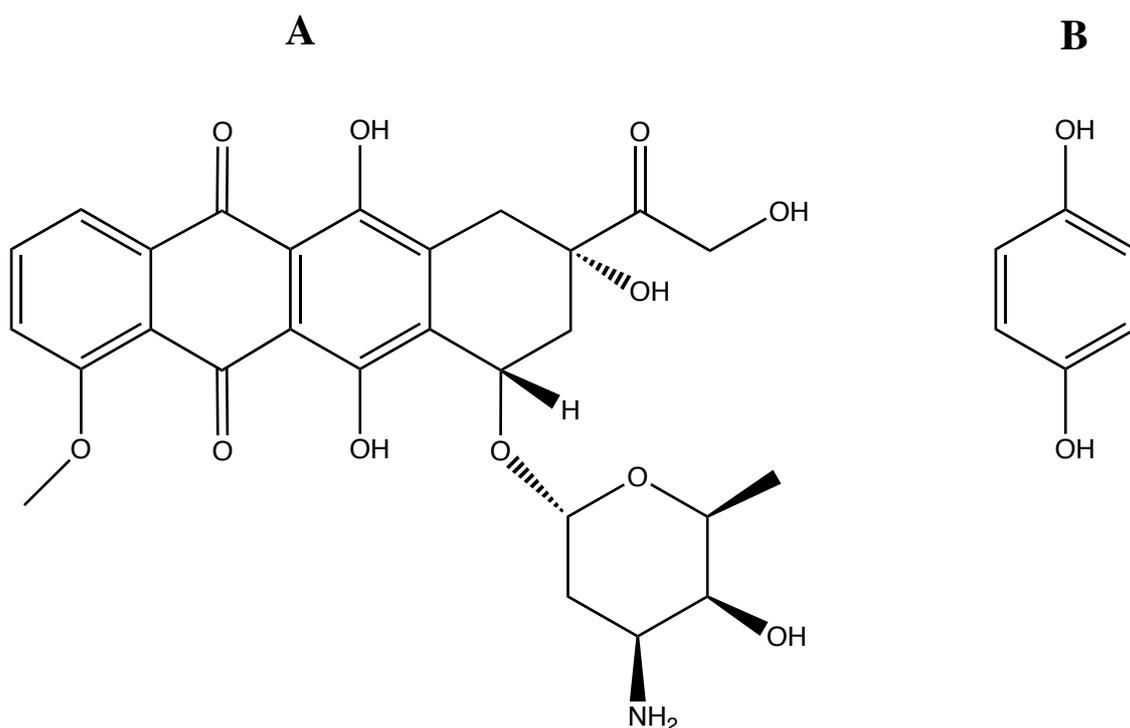


Figura 3.29 – Comparação entre a estrutura da doxorrubicina (A) e da hidroquinona (B).

A incorporação *in situ* de doxorrubicina também ocasionou uma significativa modificação na dinâmica da trajetória da massa molar do copolímero ao longo da reação de copolimerização. Como demonstrado na Figura 3.30, a massa molar numérica média (M_n) permaneceu praticamente constante ao longo de toda a reação conduzida na ausência de fármaco. Na presença de doxorrubicina, os valores de M_n permaneceram em um patamar até um determinado valor de conversão, apresentando uma tendência a um decréscimo após este ponto.

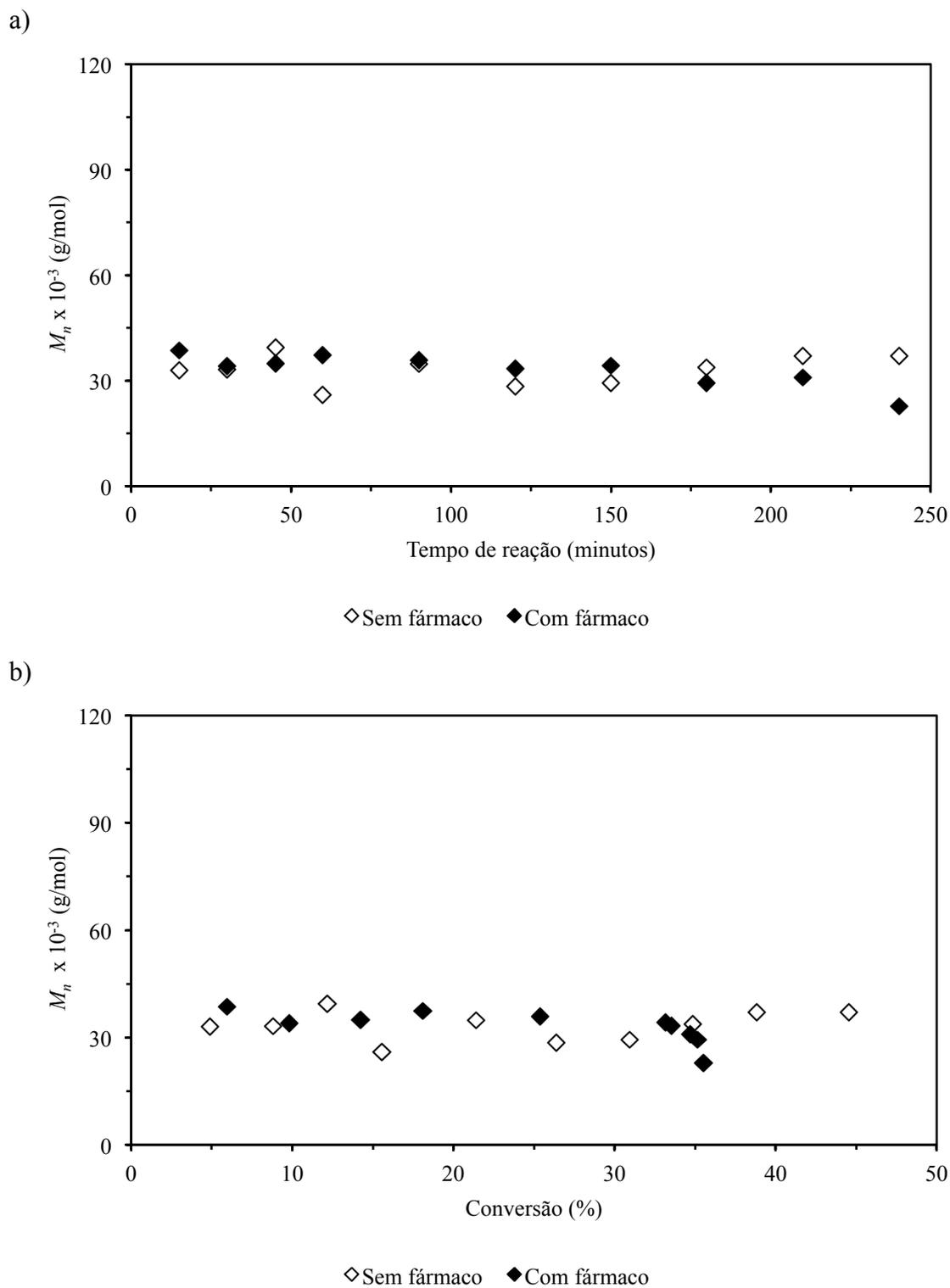


Figura 3.30 – Evolução dinâmica da massa molar numérica (M_n) em função (a) do tempo de reação e (b) da conversão global, para reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila, na ausência e com a incorporação *in situ* de doxorrubicina.

Na Figura 3.31 são apresentados os dados em relação à massa molar ponderal (M_w). Quando a reação foi realizada na ausência de fármaco, os valores de M_w permaneceram constantes ao longo da reação/conversão. Na presença de doxorubicina, os valores de M_w permaneceram em um mesmo patamar até a conversão global atingir um determinado valor. Entretanto, ao contrário do observado para os valores de M_n , os valores de M_w sofreram um incremento considerável. Efeitos similares foram observados quando pequenas quantidades de amoxicilina foram adicionadas durante a polimerização, [15] sendo o efeito de aumento dos valores de M_w atribuídos a possíveis reações de reticulação, devido às múltiplas reações de transferência à molécula do fármaco e também a possíveis efeitos de difusão de reagentes ao longo da copolimerização. Neste caso em particular é provável que a abrupta elevação dos valores de M_w seja função de um forte *efeito gel* do sistema de copolimerização em presença de doxorubicina.

Na Figura 3.32 são apresentadas as distribuições de massas molares dos copolímeros obtidos ao final do processo de polimerização. Conforme pode ser observado, a incorporação *in situ* de doxorubicina promoveu significativas alterações na distribuição de massas molares dos copolímeros obtidos, sendo as maiores diferenças observadas para frações de cadeias de baixo e alta massas molares quando as reações foram realizadas na presença de fármaco. Os resultados reforçam o provável efeito de reticulação resultante de múltiplas etapas de transferência para o fármaco, resultando em alargamento expressivo das distribuições de massas molares.

O processo de *saponificação* promoveu apenas algumas pequenas alterações nos perfis de distribuição de massa molar. O efeito observado neste caso pode estar relacionado a reações de ramificação de monômeros residuais presentes nas partículas, principalmente acetato de vinila residual.

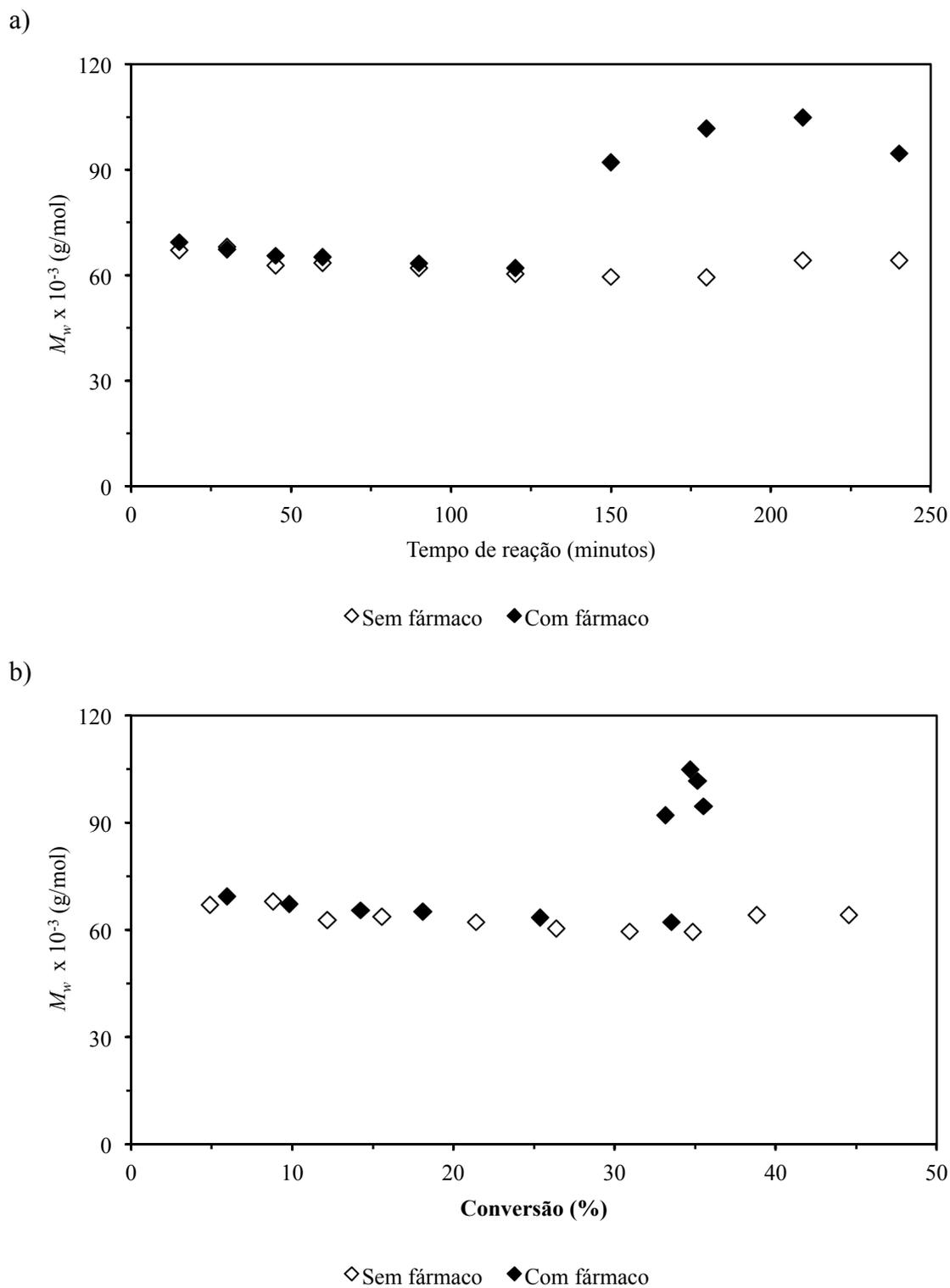


Figura 3.31 – Evolução dinâmica da massa molar ponderal (M_w) em função (a) do tempo de reação e (b) da conversão global, para reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila, na ausência e com a incorporação *in situ* de doxorrubicina.

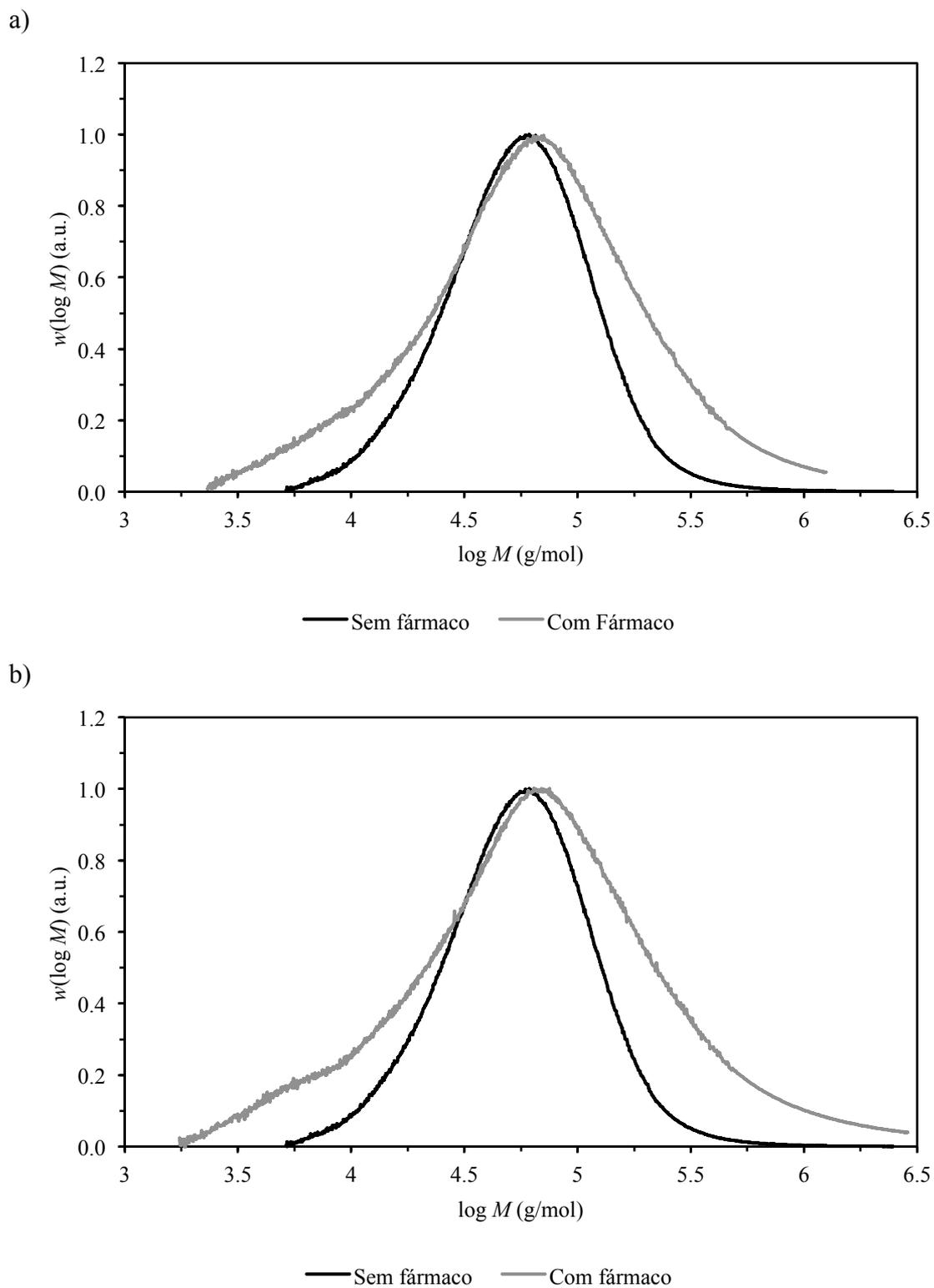


Figura 3.32 – Curva de distribuição da massa molar da amostra final de copolímero VAc/MMA sintetizado na ausência e na presença de doxorrubicina incorporada *in situ* durante a copolimerização em suspensão do VAc e do MMA. (a) antes da reação de saponificação; (b) após a reação de saponificação.

3.5 Conclusões

Neste Capítulo foram realizados estudos mais aprofundados a respeito das reações de copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila na presença de fármacos, adicionados *in situ* no meio reacional durante as reações de polimerização.

Utilizando novamente a amoxicilina como fármaco modelo, pode-se confirmar que a adição *in situ* do fármaco promove significativas alterações nas características finais dos copolímeros formados. Observou-se que a morfologia e as características superficiais das partículas são alteradas pela quantidade de fármaco adicionado e também pelo processo de saponificação. No entanto, os efeitos morfológicos são provavelmente devido ao depósito de fina película de sólido pulverizado na superfície das partículas. Em termos cinéticos, a adição *in situ* de fármaco promove significativas alterações na cinética de homopolimerização do acetato de vinila, sendo que um forte efeito inibitório foi observado com o aumento da concentração de fármaco no meio reacional. Nas reações de copolimerização, esse efeito inibitório foi minimizado pela presença do metacrilato de metila, indicando a incorporação preferencial de amoxicilina por radicais acetato de vinila. As propriedades moleculares finais dos copolímeros sintetizados também foram afetadas, embora resultados de ¹H-RMN e análises térmicas não tenham apresentado significativas diferenças. Entretanto, pode-se concluir que a amoxicilina pode exercer efeitos cinéticos competitivos nas propriedades moleculares finais dos copolímeros. Desta forma, variações na concentração de fármaco de 0-1% parece exercer um efeito aditivo para as propriedades moleculares, ao passo que concentrações acima de 1% tendem a exercer um efeito inibitório.

Neste Capítulo também foi estudado o uso de outro tipo de fármaco na copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila. Utilizando as mesmas condições experimentais e a mesma estratégia de incorporação *in situ*, observou-se que pequenas concentrações de doxorubicina promoveram significativas alterações nas características finais dos copolímeros produzidos. Além de mudanças na morfologia das partículas, a presença de doxorubicina também provocou alterações na cinética de copolimerização, sendo que um forte efeito inibitório foi observado. Entretanto, a presença deste fármaco no meio reacional ocasionou um significativo aumento da massa molar final do copolímero produzido, apontando para um possível efeito reticulador deste fármaco nas reações de polimerização.

Capítulo 4

Síntese de nanogel biodegradável para aplicações biotecnológicas através de polimerização RAFT em miniemulsão inversa

Neste Capítulo é descrita uma metodologia que viabiliza a utilização do monômero 2-(dimetilamino) metacrilato de etila em sistemas heterogêneos inversos de polimerização. Mais especificamente, utilizando a técnica de polimerização RAFT em miniemulsão inversa, foi possível sintetizar nano-hidrogéis biodegradáveis a partir do monômero 2-(dimetilamino) metacrilato de etila. Devido às propriedades singulares do monômero usado, o hidrogel sintetizado possui grande potencial para ser usado como plataformas de liberação controlada de fármacos ou biomoléculas. Os resultados apresentados neste Capítulo foram publicados como artigo na *Macromolecules*. [16]

4.1 Introdução

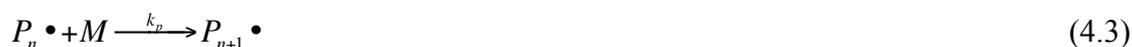
4.1.1 Polimerização radical livre viva/controlada

Como descrito nos capítulos anteriores, as reações de polimerização via radicais livres ocorrem basicamente ao longo de três etapas. Na primeira etapa (*iniciação*) são gerados os radicais livres que dão início à reação de polimerização. Na segunda etapa (*propagação*) ocorre o crescimento da cadeia polimérica, por intermédio de seguidas incorporações de monômeros à espécie ativa em crescimento. Na última etapa da reação (*terminação*), ocorre a “morte” (perda de atividade) da espécie ativa em crescimento, formando então uma cadeia de polímero *morto* inativo. Esta etapa possui grande importância no controle do tamanho final da cadeia de polímero formada, podendo ocorrer por diversos tipos de mecanismos. [3, 42] Essas etapas são geralmente descritas da seguinte forma:

Iniciação:



Propagação:



Terminação:



Neste tipo de reação de polimerização, a concentração das espécies em crescimento é de aproximadamente 10^{-7} M, [3, 119] sendo que as cadeias crescem por aproximadamente 1 segundo antes de sofrerem a terminação, ocasionando a formação de cadeias poliméricas “mortas”. [120] As reações de polimerização via radicais livres também são caracterizadas pela formação de cadeias de tamanho heterogêneo e com altos valores de massa molar, características que resultam em altos índices de polidispersão ($M_w/M_n > 1,5$). [119]

Quando dois ou mais monômeros distintos são usados no mesmo processo de polimerização, diz-se então que o processo é de copolimerização. Os comonômeros podem estar distribuídos de diversas formas ao longo da cadeia polimérica, de forma aleatória, alternada, em blocos ou na forma de enxertos. [42] Em cada caso, obtém-se um conjunto distinto de propriedades para o produto final, de maneira que não é possível descrever o sistema apenas com base na composição do copolímero obtido. Os processos de copolimerização possuem uma importância tecnológica muito importante, pois permitem que sejam produzidos materiais com propriedades específicas. Como nos processos de copolimerização dois ou mais comonômeros são envolvidos, pode-se dizer que existem virtualmente infinitas possibilidades de se produzir copolímeros distintos, com as mais diversas propriedades. [3]

Os processos de polimerização via radicais livres são largamente empregados para a produção de resinas poliméricas de alta massa molar. O que leva a escolha desta técnica na implementação em plantas industriais são basicamente três fatores: primeiro, esta técnica pode ser usada com uma larga gama de monômeros vinílicos; segundo, esta técnica é considerada “robusta”, por ser tolerante à presença de uma grande gama de grupos funcionais, condições reacionais e impurezas; por fim, é uma técnica fácil de ser implementada, sendo considerada de relativamente baixo custo, em comparação com

outras tecnologias disponíveis. Porém, a técnica de polimerização via radicais livres apresenta também algumas desvantagens. A principal delas é o pobre controle que esta técnica oferece sobre a *estrutura* das moléculas, principalmente em relação à massa molar final do polímero, à composição e à arquitetura obtida. [119] Desta maneira, quando se utiliza a técnica de polimerização via radicais livres, não é possível sintetizar copolímeros em bloco, polímeros com distribuição estreita de massas molares e nem polímeros com arquitetura molecular complexa. Isso ocorre porque a alta reatividade dos radicais presentes no meio reacional, que se envolvem espontaneamente em reações de terminação ou outros tipos de reações secundárias, [3, 121] causa a *morte* do radical e a interrupção do crescimento da cadeia polimérica. A alta reatividade dos radicais pode ser exemplificada através do tempo de vida da cadeia polimérica em crescimento, que em geral é da ordem de 1 segundo (da etapa de iniciação à terminação). Por isso, novas cadeias são continuamente geradas durante toda a reação de polimerização. [120]

Uma alternativa desenvolvida para a obtenção de polímeros com estrutura molecular mais bem definida é o mecanismo de *polimerização viva* em que a etapa de terminação é suprimida (ou significativamente inibida). Utilizando esta técnica, é possível obter copolímeros em bloco e polímeros com arquitetura extremamente precisa. O que caracteriza as reações de *polimerização viva* é que não há reações de terminação entre as cadeias poliméricas, ou qualquer outro tipo de reação que resulte na *morte* do radical propagador da cadeia. Desta forma, o radical em propagação continua presente no meio reacional até que se esgote o monômero (e ao final do processo, obtém-se um polímero *vivo*). Se mais monômero for adicionado ao meio reacional, a reação polimerização é reiniciada, até que se esgote novamente o monômero do meio reacional. [3, 122] Em um processo ideal de *polimerização viva*, todas as cadeias são iniciadas no início da reação e todas as cadeias crescem simultaneamente com a mesma

velocidade de propagação. [119] O grande empecilho para o uso da técnica de polimerização viva é que ela é extremamente sensível a mudanças nas composições dos componentes químicos, à presença de impurezas e a mudanças nas condições reacionais, além de serem compatíveis apenas com uma limitada gama de solventes. [3]

A *polimerização via radicais livres viva/controlada (Controlled/Living Radical Polymerization, CLRP)* é caracterizada por ser uma polimerização via radicais livres que exibe características de uma *polimerização viva*; ou seja, as reações de terminação e outras reações secundárias, que ocasionam a *morte* da espécie ativa, são mantidas em níveis negligenciáveis. [94] Embora a polimerização radicalar controlada não constitua uma polimerização realmente *viva*, uma vez que a etapa de terminação não é completamente suprimida, as técnicas de CLRP possuem uma série de vantagens em relação às técnicas de *polimerização via e radicais livres*, permitindo exercer um nível de controle do polímero final comparável aos de *polimerizações vivas*. Dentre essas vantagens, incluem a compatibilidade com uma larga gama de monômeros, grupos funcionais e condições reacionais. [94, 121]

Todos os tipos de CLRP seguem basicamente o mesmo princípio quanto ao mecanismo de crescimento de cadeia, durante a etapa de *propagação*. Neste mecanismo, genericamente exemplificado pela Figura 4.1, as cadeias em crescimento alternam estados “ativos” e “dormentes”, ocorrendo o crescimento da cadeias (com incorporações de unidades monoméricas) quando esta se encontra no estado ativo. [119, 121] Diferentes espécies podem provocar a “dormência” das espécies ativas, gerando diferentes técnicas de CLRP.

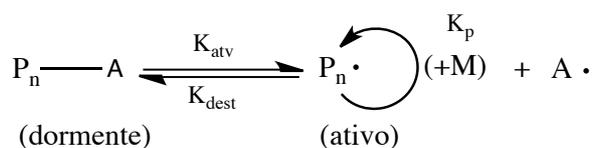


Figure 4.1 – Representação genérica de equilíbrio *ativo-dormente* em sistemas de CLRP.

O leitor deve tomar alguns cuidados para não confundir alguns conceitos que têm sido difundidos de maneira equivocada na literatura científica. Conforme revisado por ZETTERLUND et al., [121] deve ser observado que:

- “*Vivo*” – o termo “vivo” (*livingness*) em ciência de polímeros deve ser usado estritamente para descrever mecanismos em que as cadeias poliméricas podem ter seu tamanho estendido quando mais monômero for adicionado ao meio reacional. [123] Como já discutido, as técnicas CLRP não são verdadeiramente *vivas*.
- *Controle* – este termo deve ser empregado quando o valor de M_n cresce de maneira linear com o aumento da conversão, enquanto o índice M_w/M_n decresce com o aumento da conversão. [123] Nem toda polimerização *viva* permite o controle da massa molar.
- *Concentração de cadeias em crescimento* ($[P\bullet]$) – é um equívoco associar o sucesso de *control/livingness* ao equilíbrio das espécies ativas e dormentes, ocasionando uma baixa concentração de $[P\bullet]$ e, por conseguinte, baixas taxas de terminação. O fato é que uma redução em $[P\bullet]$ não necessariamente resulta em uma menor taxa de terminação em relação à taxa de propagação. O ponto fundamental para o sucesso das técnicas de CLRP é que, como nestes sistemas o número de cadeias é muito maior, a *taxa de terminação por cadeia é muito menor*.

Embora existam diversas técnicas de CLRP, [121] as mais conhecidas e pesquisadas até o momento são a *polimerização mediada por nitróxido* (*Nitroxide-Mediated Polymerization*, NMP), *polimerização por transferência de átomo* (*Atom-Transfer Radical Polymerization*, ATRP) e *transferência de cadeia por adição-*

fragmentação reversível (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer, RAFT). [119, 121] Dentre estas técnicas, a polimerização RAFT é uma das mais versáteis, [94, 124, 125] podendo ser usada com uma diversa gama de monômeros, sistemas de polimerização e condições reacionais, gerando polímeros com distribuições de massas molares bastante estreitas. [94, 126]

Polimerização RAFT

As técnicas de polimerização RAFT [127] e *Macromolecular Design via the Interchange of Xanthates* (MADIX) [128] foram reportadas na literatura científica quase que simultaneamente. Ambas as técnicas de CLRP utilizam o mesmo tipo de mecanismo químico, divergindo apenas em relação ao tipo de agente de transferência utilizado nas reações de polimerização, que geralmente são reportados apenas como *agentes RAFT*. [94] Conforme descrito por MOAD *et al.*, [119] idealmente, as principais características de uma polimerização RAFT são:

- a) As reações de polimerização RAFT podem ser realizadas adicionando-se uma certa quantidade de agente RAFT a uma reação de polimerização convencional, não sendo necessário trocar nenhum componente químico (monômero, iniciador ou solvente) nem mesmo ajustar as condições operacionais do sistema (temperatura, pressão, entre outras).
- b) A polimerização RAFT deve apresentar características das *polimerizações vivas*.
- c) A massa molar pode ser predeterminada usando a Equação 4.6, em que o termo $[M]_0 - [M]_t$ representa a quantidade de monômero consumido e “*mM*” é a massa molar do monômero:

$$M_{n(\text{teórico})} \approx \frac{[M]_0 - [M]_t}{[1]_0} mM \quad (4.6)$$

- d) Os polímeros gerados possuem estreita distribuição de massas molares ($M_w/M_n \approx 1,1$)
- e) A técnica RAFT deve permitir a síntese de moléculas com arquitetura bem definida, permitindo a formação de copolímeros de bloco, copolímeros tipo “estrela” e outros tipo de estruturas moleculares complexas, conforme ilustrado na Figura 4.2.

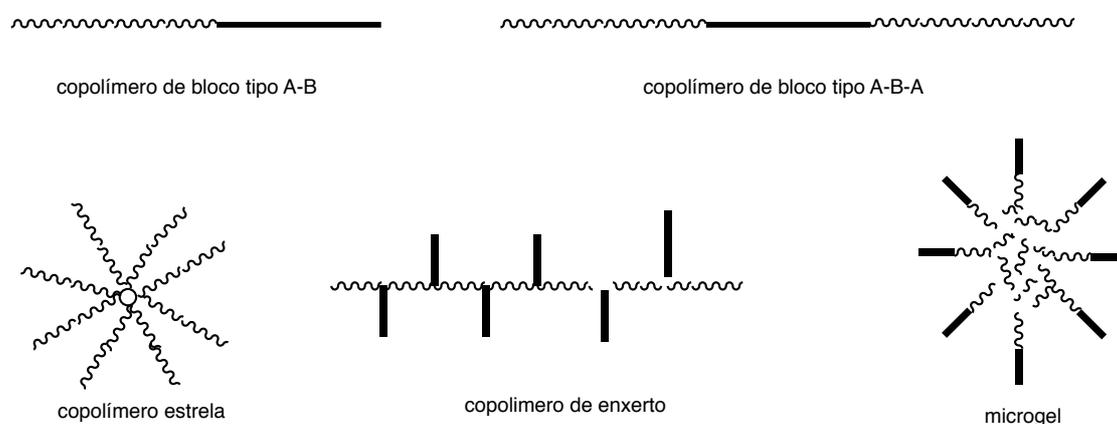


Figura 4.2 – Alguns tipos de arquitetura polimérica que podem ser sintetizadas com a técnica de polimerização RAFT. Adaptação da figura originalmente publicada por MOAD *et al.* [119]

Os agentes RAFT (Figura 4.3) são compostos químicos que possuem uma função tiocarboníltio ligada a dois “grupos” distintos, normalmente representados como sendo um grupo “Z” e grupo um “R”. Esses grupos possuem funções específicas e a escolha/combinção de grupos no agente RAFT possui influência direta no controle da polimerização, uma vez que esses grupos possuem funções distintas. O grupo “Z” possui a função de ativar a dupla ligação C=S, para favorecer a adição de radicais nesta parte de molécula e altas constantes de transferência de fragmentos. Já o grupo “R”

deve ser um bom grupo de saída e re-iniciador de reações de radicais livres. [94, 119, 126]

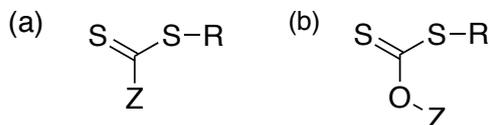


Figura 4.3 – Estrutura genérica de um agente RAFT (a) e um agente MADIX (b), conforme apresentado por BOYER *et al.* [94]

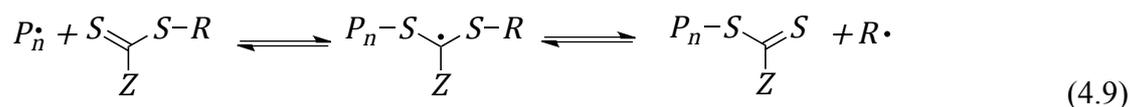
Atualmente, comparado-se com os dados publicados na literatura, [119, 129, 130] poucos são os agentes RAFT disponíveis comercialmente. Entretanto, essas substâncias podem ser obtidas em laboratório com auxílio de técnicas de síntese orgânica em processos relativamente simples, com relativa pureza e alto rendimento. [119]

O mecanismo pelo qual ocorre a polimerização RAFT geralmente pode ser descrito em termos de cinco etapas, [94, 119, 124, 129-131] conforme ilustrado a seguir:

Iniciação:



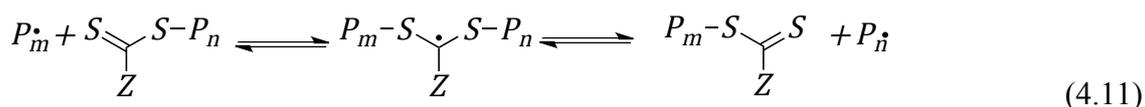
Transferência de cadeia reversível:



Re-iniciação:



Equilíbrio de cadeia:



Terminação:



A primeira etapa (*iniciação*) ocorre exatamente como numa reação convencional via radicais livres, em que são gerados os radicais livres¹¹ que dão início à reação de polimerização. Embora seja possível usar diferentes métodos para gerar os radicais livres, a decomposição térmica de iniciadores químicos é o método mais adotado para gerar os radicais livres em polimerizações RAFT. Em seguida, pequenas espécies em crescimento oriundas da etapa de iniciação reagem preferencialmente com todas as moléculas de agente RAFT presentes no meio reacional, devido à alta reatividade da ligação C=S do agente RAFT frente a qualquer outro tipo de dupla ligação presente no meio reacional (como as duplas ligações dos monômeros vinílicos). O agente RAFT pode então *retornar* a sua configuração original e/ou “liberar” o radical R•. Na etapa seguinte, ocorre o crescimento da cadeia polimérica por meio de seguidas incorporações de monômero à espécie ativa em crescimento, gerando uma cadeia de polímero cada vez maior. A principal diferença para a reação via radicais livres convencional é que na reação RAFT as cadeias em crescimento são “rapidamente capturadas” pelo grupo tiocarbonila do agente RAFT e desta forma, o *intercâmbio* de cadeias em crescimento entre o agente RAFT garante que todas as cadeias tenham a mesma “chance” de crescer. A última etapa do processo, embora minimizada, compreende a reações de terminação.

¹¹ Para as reações viva/controlada, na etapa de iniciação o radical livre é representado por X• ao invés de R•.

Conforme revisado por BOYER *et al.*, [94] polímeros sintéticos têm sido largamente utilizado em aplicações biotecnológicas, o que inclui a produção de compostos para uso na indústria farmacêutica, implantes biomédicos, entre outros. Em geral, a estratégia de síntese do polímero pode variar de acordo com a aplicação final desejada. Entretanto, um ponto em comum para um melhor desempenho do material é a *uniformidade* das principais propriedades do polímero, que normalmente são as características de massa molar, *arquitetura* da cadeia polimérica, composição e funcionalidades químicas.

Por ser uma técnica versátil, o uso da polimerização RAFT oferece inúmeras vantagens para a síntese de polímeros para aplicação biotecnológica, [94, 125] dentre as quais podem ser citadas três principais pontos:

- 1) Possibilidade do uso de uma grande variedade de monômeros e solventes. [119, 127]
- 2) O uso da técnica RAFT possibilita também a síntese de polímeros com diversos tipos de arquitetura molecular, como os copolímeros em bloco, de enxerto, tipo estrela, entre outros. [119, 124]
- 3) A técnica RAFT foi adaptada para uso em diferentes sistemas de polimerização, incluindo polimerizações em suspensão, [132] emulsão, [133, 134] miniemulsão, [134] miniemulsão inversa [135] e microemulsão. [136]

Além das características anteriormente descritas, uma vantagem única dos polímeros sintetizados com auxílio da técnica RAFT é a possibilidade de reação dos grupos terminais das cadeias poliméricas com uma inúmera gama de reagentes, [94, 125] o que abre inúmeras possibilidades de pós-funcionalização e bioconjugação dos polímeros formados.

Embora a técnica de polimerização RAFT seja bastante atrativa, inclusive para implementação em ambientes industriais, esta técnica também apresenta algumas desvantagens. Em um passado recente, um dos maiores obstáculos para o uso desta técnica era o acesso aos agentes RAFT. Entretanto, este cenário reverteu-se nos últimos anos, sendo que atualmente uma considerável variedade de agentes RAFT está disponível comercialmente [125] embora a maior parte deles tenham que ser obtidos por processos simplificados de síntese orgânica. [130]

Outro aspecto negativo relacionado à técnica RAFT, especialmente quando se deseja empregar o produto em aplicações biotecnológicas, é a toxicidade do agente RAFT. Um estudo recente realizado por CHANG *et al.* [137] demonstrou que a toxicidade do polímero final depende do tipo de agente RAFT utilizado, sendo necessário adotar estratégias para eliminar a toxicidade do produto final produzido, antes de empregá-lo em aplicações biotecnológicas.

4.1.2 Miniemulsão

As miniemulsões convencionais são sistemas compreendidos basicamente por uma dispersão de surfactantes hidrossolúveis em água, que estabilizam gotas hidrofóbicas de tamanho entre 50-500 nm. Esses sistemas são preparados misturando-se o componente hidrofóbico em água, na presença do surfactante hidrossolúvel e também de uma agente de pressão osmótica. [138, 139] Como em qualquer sistema heterogêneo, existem duas fases: uma fase contínua e uma fase dispersa. A fase contínua representa a maior fração do sistema (usualmente ao redor de $\frac{3}{4}$ a $\frac{4}{5}$ do volume total), sendo constituída nos sistemas convencionais por um solvente polar e nos sistemas inversos por algum tipo de solvente apolar. A fase dispersa das miniemulsões poliméricas convencionais tem como componente principal uma mistura de monômeros

hidrofóbicos (como o estireno), enquanto os sistemas inversos utilizam monômeros hidrofílicos (como o ácido acrílico). [138]

Como as miniemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, a formação desses sistemas requer o emprego de uma força de cisalhamento de alta energia para “quebrar” a fase dispersa em gotas de tamanho nanométrico. Diversos processos podem ser empregados para gerar as miniemulsões; contudo, o uso de sondas de ultrassom e homogeneizadores são as técnicas mais empregadas para esse fim, sendo o último citado o único atualmente viável para uso em plantas industriais. Além disso, é recomendado que seja feita uma pré-mistura antes do processo de *emulsificação*, uma vez que, embora os equipamentos usados para gerar as emulsões consigam gerar altas forças de cisalhamento, normalmente esses mesmos sistemas não promovem uma boa agitação. [140] Embora a utilização de equipamentos que empregam uma força de cisalhamento de alta energia constitua o método mais usado para gerar miniemulsões, alternativas que utilizam baixa energia também já foram reportados. [141-143]

Como as miniemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, faz-se necessário também o uso de um agente surfactante, que diminui a tensão interfacial entre a fase dispersa e a fase contínua. [144] Nos sistemas convencionais de miniemulsão, geralmente são empregados surfactantes iônicos, [140] embora seja possível usar outros tipos de surfactantes. [145, 146] Já nos sistemas inversos, são usados tipicamente surfactantes não-iônicos, que atuam prevenindo a fusão das gotas hidrofílicas por estabilização estérica. [144] Como os sistemas inversos requerem o uso de surfactantes com baixos valores HLB¹², [138] os surfactantes mais usados incluem o *Span 80*[®], o *Tween 85*[®] e surfactantes poliméricos. [144]

¹² Balanço hidrofílico-lipofílico (*Hydrophile-lipophile balance*, HLB) – valor arbitrário de 0-20 que indica o conteúdo das partes hidrofílicas e hidrofóbicas da molécula de surfactante e seu comportamento. [4]

O efeito *Ostwald ripening* (degradação difusional) possui grande influência na estabilidade de emulsões em geral. Este efeito é governado pela pressão de Laplace entre gotas da fase dispersa que possuem tamanhos diferentes, que culmina na transferência de massa na fase dispersa, das gotas menores para as gotas de maior tamanho. A transferência de massa é governada tanto pela curvatura das gotas quanto pela diferente composição química no interior das gotas. [147] Basicamente, por causa do acúmulo de energia na interface existente entre a fase dispersa e a fase contínua, o potencial químico dos componentes existentes na fase dispersa aumenta com a redução do tamanho da gota. Uma estratégia desenvolvida para aumentar a estabilidade das miniemulsões é adicionar à fase dispersa um agente de pressão osmótica. Essa substância tem como objetivo equilibrar a pressão osmótica no interior das gotas, e com isso, evitar efeitos de degradação difusional. A adição de um “coestabilizante” reduz a tensão interfacial e a concentração do monômero, reduzindo o potencial químico e as taxas de transferência de massa. Nos sistemas convencionais, os agentes de pressão osmótica devem, independentemente de sua característica química, ser substâncias hidrofóbicas e apresentar pouca solubilidade em água (menos de 10^{-7} mL/mL), ao passo que nos sistemas inversos os agentes de pressão osmótica são sais e/ou uma pequena quantidade de água. [138, 139]

Segundo ANTONIETTI & LANDFESTER, [148] as principais características que uma miniemulsão polimérica deve apresentar são:

- 1) Durante o processo de *emulsificação*, que requer o emprego de altas energias de cisalhamento, o tamanho das gotas é caracterizado por um processo dinâmico de fissão e fusão das gotas, que tende a chegar a um estado de equilíbrio cinético de quebra-coalescência.

- 2) O uso de um agente de pressão osmótica garante a estabilidade das gotas após o processo de *emulsificação*. Quando todas as gotas possuem a mesma pressão interna efetiva, o tamanho das gotas não se altera por efeitos de degradação difusional, mas apenas por colisão das gotas.
- 3) A polimerização em miniemulsões só ocorre por intermédio da etapa de nucleação das gotas.
- 4) Em um sistema de miniemulsão, a cobertura das gotas com surfactante é quase sempre incompleta, para evitar a formação de micelas e o mecanismo de nucleação micelar.
- 5) O tamanho final das gotas está relacionado à quantidade de surfactante presente na superfície das gotas. Quanto maior for a concentração de surfactante no meio, menor será o tamanho das gotas e maior a cobertura das gotas com surfactante.

Além desses pontos, CAPEK [144] também acrescenta as seguintes características para as miniemulsões inversas:

- A existência de uma interface compacta de surfactantes pode ajudar a estabilizar as gotas, mas pode formar uma barreira intransponível à entrada de radicais da fase contínua do sistema.
- Nos sistemas inversos, a polimerização pode ser iniciada por radiação, iniciadores químicos hidrofílicos, e/ou iniciadores químicos hidrofóbicos.

Embora os sistemas heterogêneos de polimerização gerem partículas poliméricas de tamanhos distintos, esses sistemas (principalmente as miniemulsões) não são definidos pela faixa de tamanho de gota/partícula gerada, mas sim pelo mecanismo com que estas gotas/partículas são formadas. [148]

As microemulsões são sistemas geralmente formados pela mistura de grandes quantidades de surfactantes, o que implica na falta de necessidade de usar alta energia de cisalhamento para formar a emulsão. As gotas apresentam em geral uma cobertura completa de sua superfície, sendo que a polimerização ocorre por mecanismos de nucleação primária e secundária, gerando ao final do processo a um pequeno aumento das distribuições do tamanho das gotas, além da presença de micelas vazias nos sistemas. Em geral, as microemulsões geram um látex composto por micelas/partículas bem pequenas, em torno de 5-50 nm. [148]

As macroemulsões poliméricas possuem um mecanismo de reação bastante particular. [149-153] Neste sistema, após o processo de *emulsificação*, as gotas geradas (estabilizadas por surfactantes) funcionam como um reservatório de monômero. Este monômero difunde-se através da fase contínua até chegar a uma micela ou gota (ambas também estabilizadas por surfactante), onde ocorre a reação de polimerização. Entretanto, as miniemulsões poliméricas apresentam um mecanismo completamente diferente de nucleação, já que os locais da reação de polimerização são as próprias gotas de monômero, que funcionam como um “nano reator”. Desta forma, o látex polimérico final é basicamente uma “cópia” das gotas originalmente formadas, sendo que o tamanho final das partículas é definido pelo processo de dispersão em conjunto com a estabilidade das gotas/partículas durante a polimerização. [144, 148, 154] Comparativamente, as suspensões poliméricas são bastantes similares ao sistemas de miniemulsões, diferenciando-se basicamente em relação ao tamanho das gotas/partículas formadas (na faixa de micras) e estabilidade das partículas. [148]

Conforme descrito por ANTONIETTI & LANDFESTER, [148] a polimerização via radicais livres em miniemulsões ocorre por meio do mecanismo de nucleação das gotas. Neste mecanismo, as gotas formadas durante o processo de emulsificação são

nucleadas pela entrada de radicais, que são gerados quase sempre na fase contínua do sistema. De forma ideal, assume-se que o processo de nucleação das gotas é o mecanismo dominante e que todas as gotas do sistema são nucleadas. Isso implica que, desconsiderando os processos de coalescência e/ou degradação difusiva das gotas [140], o número de partículas poliméricas não se altera durante a reação de polimerização. Também é possível usar iniciadores solúveis na fase dispersa das minemulsões. Neste caso, a geração dos radicais ocorrerá diretamente no interior de cada gota.

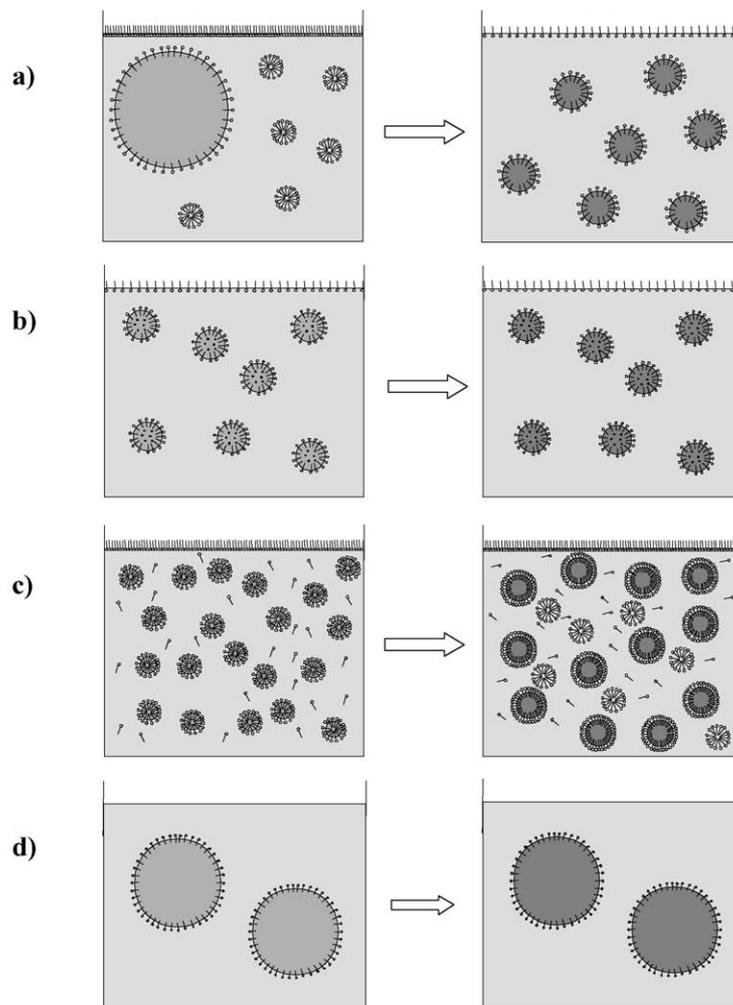


Figura 4.4 – Comparação dos diferentes processos de polimerização em sistemas heterogêneos. (a) macroemulsão; (b) miniemulsão; (c) microemulsão; (d) suspensão. Figuras à esquerda da seta = antes da polimerização; Figuras a direita da seta = após a polimerização. [148]

Até a presente data, poucos trabalhos descrevem técnicas de CLRP em miniemulsão inversa utilizando ATRP [155-158] ou RAFT. [119, 125] Mais especificamente sobre a polimerização RAFT em miniemulsão inversa, Schork *et al.* estudaram o comportamento desse sistema de polimerização com os monômeros acrilamida, [135, 159, 160] ácido acrílico [160] e N-isopropilacrilamida, [161] enquanto que McCormick *et al.* utilizaram o monômero N,N-dimetilacrilamida. [162]

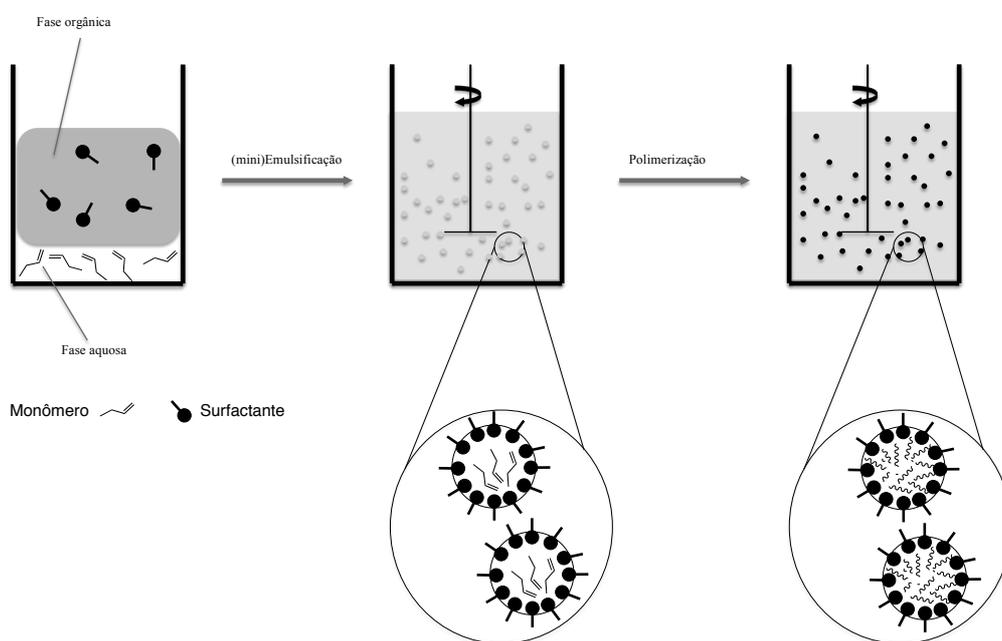


Figura 4.5 – Representação de um processo de polimerização em miniemulsão inversa. Adaptado da figura originalmente publicada por ANTONIETTI & LANDFESTER. [148]

4.1.3 Nano-hidrogéis

Os nano-hidrogéis (nanopartículas poliméricas hidrofílicas e reticuladas) possuem um grande número de propriedades vantajosas em aplicações de liberação controlada. [155, 163-165] Algumas dessas vantagens incluem: (i) a possibilidade de controlar o tamanho das nanopartículas com relativa precisão, (ii) a grande interface disponível para a realização de bioconjugações; e (iii) o interior das partículas pode ser

usado para carrear fármacos. Por meio do controle da densidade da reticulação dos nano-hidrogéis, é possível criar uma matriz com uma porosidade definida, o que permite um controle preciso da capacidade do nano-gel polimérico de absorver e liberar fármacos (ou biomoléculas) de uma maneira controlada. [164]

Para otimizar o desempenho dos nano-hidrogéis em aplicações de liberação controlada, uma série de critérios deve ser preenchidos. [163] Isso inclui uma longa estabilidade durante a circulação *in vivo*, a presença de grupos funcionais na superfície das nanopartículas (introduzido através de pós-modificação para aumentar o “reconhecimento” das nanopartículas por receptores celulares), o tamanho de partícula menor de 200 nm e a habilidade do nano-hidrogel de se degradar por meio de estímulo externo (pH, ação enzimática, dentre outros). Em um cenário de liberação controlada de fármacos ou biomoléculas, a biodegradação é um fator importante não apenas para facilitar a liberação do composto de interesse, mas também para facilitar a remoção das nanopartículas “vazias” e seus resíduos. [16]

Conforme descrito anteriormente, as técnicas de *polimerização via radicais livres viva/controlada* (*Controlled/Living Radical Polymerization*, CLRP) [166] permite a síntese de polímeros com arquitetura molecular bem definida, tendo sido recentemente adaptada para uso em diversos tipos de sistemas dispersos (como emulsão, miniemulsão e microemulsão), o que torna possível o uso destas técnicas como rota de síntese de nanopartículas compostas por polímeros com arquitetura molecular complexa e definida. [121, 167] As técnicas de CLRP também podem ser empregadas em polimerizações reticuladoras. Neste caso, é possível sintetizar matrizes poliméricas mais homogêneas e definidas. [168-171] Desta forma, as técnicas de CLRP em sistemas dispersos oferecem uma atrativa rota de síntese para o preparo de nano-hidrogéis, redes poliméricas adaptáveis e com estrutura molecular bem definida, para uso posterior em

aplicações de liberação controlada de fármacos ou biomoléculas. [155, 163, 164] Dentre as diversas técnicas de CLRP, a técnica RAFT é tida como a mais versátil, [124, 125] sendo desta forma uma técnica interessante para ser usada no preparo de polímeros para aplicação biomédica (liberação controlada de fármacos e biomoléculas), devido à baixa toxicidade dos agentes RAFT usualmente empregados na polimerização. [137, 172]

Para sintetizar nano-hidrogéis por meio de polimerizações reticuladoras, é quase sempre necessário usar um sistema inverso, ou seja, um sistema em que a fase contínua seja lipofílica e a fase dispersa hidrofílica, estabilizado por um surfactante lipofílico. [121] O sistema heterogêneo de polimerização mais viável para a implementação de uma técnica de CLRP, e também para sintetizar nanopartículas híbridas, [173-175] é a polimerização em miniemulsão. [176, 177]

4.2 Objetivo e justificativa

Neste Capítulo, é feito o desenvolvimento de uma metodologia que possibilita a polimerização RAFT em miniemulsão inversa, utilizando o monômero hidrofílico 2-(dimetilamino) metacrilato de etila (DMAEMA). Polímeros contendo DMAEMA em sua estrutura têm atraído atenção de muitos pesquisadores, devido à habilidade deste tipo de monômero/polímero de interagir com moléculas de DNA ou RNA, formando complexos do tipo plasmídeo-polímero, que podem ser *absorvidos* por células. [178-181] Esta interação se dá pelo fato de que grupos aminos, como o presente no DMAEMA, podem ser facilmente quaternizados para formar polímeros com cargas positivas (Figura 4.6), sendo este polímero com carga superficial pode interagir de maneira eletrostáticas com alguns tipos de biomoléculas, como é o caso do RNA. [182-185]

Pelas razões apresentadas, o DMAEMA é um monômero que possui uma grande importância tecnológica, pois permite que sejam sintetizados polímeros sensíveis a estímulos de pH e temperatura, podendo ser empregados no preparo de plataformas de sistemas de liberação controlada de fármacos ou biomoléculas. [186-188]

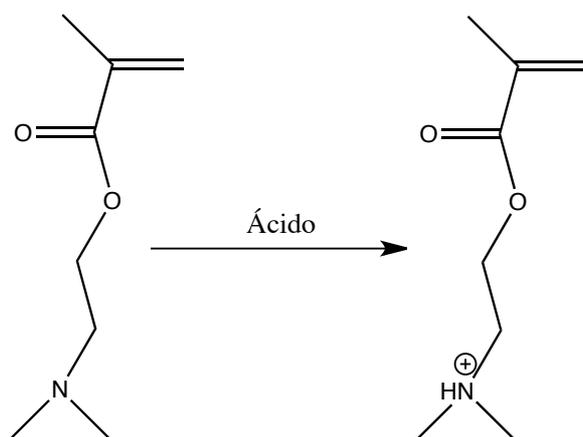


Figura 4.6 – Exemplo de quaternização do DMAEMA com ácido.

Outra justificativa para a realização deste trabalho é que, poucos foram os trabalhos publicados na literatura científica que utilizam alguma técnica de polimerização viva/controlada em sistema heterogêneo de polimerização, especialmente utilizando monômeros hidrossolúveis (sistemas inversos de polimerização). WANG *et al.* [189] recentemente reportaram o preparo de nanopartículas via miniemulsão inversa à base de PDMAEMA. Entretanto, a estratégia utilizada pelos autores foi a utilização do PDMAEMA como um “macro-iniciador” da polimerização em miniemulsão. A presente proposta visa à adaptação da técnica de miniemulsão inversa para possibilitar o uso do monômero DMAEMA como principal constituinte da fase dispersa do sistema de polimerização RAFT (ou CLRP em geral). Desta forma, este trabalho contribuirá com valiosas informações acerca da cinética/mecanismo de polimerização do sistema estudado.

4.3 Metodologia experimental

4.3.1 Materiais

Todos os reagentes foram usados conforme recebido: 2-(dimetilamino) acrilato de etila (DMAEA, 98%, Aldrich), 2-(dimetilamino) metacrilato de etila (DMAEMA, 98%, Aldrich), 2,2'-azo-bis[2-(imidazoli-2-il) propano] dicloridrato (VA-044, 97%, Waco), 3,3'-ácido ditiopropanoico (99%, Sigma-Aldrich), 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 99%, Aldrich), 4,4'-azobis(ácido 4-cianopentanoico) (98%, Fluka), acetonitrila (99,7%, Ajax Finechem), cloreto de benzila (99%, Sigma Aldrich), cicloexano (99%, Ajax Finechem), clorofórmio deuterado (CDCl_3 , 99,8%, Cambridge Isotope Laboratories), dimetil-sulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$, 99,9%, Cambridge Isotope Laboratories), óxido de deutério (D_2O , 99,9%, Cambridge Isotope Laboratories), diclorometano (DCM, 99,5%, Ajax Finechem), éter etílico (99%, Ajax Finechem), difenil éter (99%, Sigma Aldrich), DL-ditiotreitól (99%, Sigma-Aldrich), enxofre (APS, 99,3%), acetato de etila (99,5%, Ajax Finechem), ácido clorídrico (HCl, 32%, Ajax Finechem), metanol anidro (99,8%, Sigma-Aldrich), *n*-hexano (95%, Ajax Finechem), trietilamina (99%, Sigma-Aldrich), N,N-dicilohexilcarbodiimida (DCC, 99%, Fluka), N,N-dimetilacetamida (DMAc; 99,9%, Sigma Aldrich), éter de petróleo (BR 40-60°C, Ajax Finechem), poli(etileno glicol) metacrilato ($M_n = 526$ g/mol, Aldrich), poli(etileno glicol) metacrilato de éter metílico (PEG-MA, $M_n = 475$ g/mol, Sigma-Aldrich), ferricianeto de potássio (98%, Sigma-Aldrich), sílica gel (60 Å, 70-230 mesh, Grace), cloreto de sódio (NaCl, 99%, Sigma-Aldrich), hidróxido de sódio (NaOH, 97%, Ajax Finechem), solução de metóxido de sódio 25% em metanol (Sigma-Aldrich), sulfato de

sódio (99%, Ajax Finechem), Span 80 (Fluka), tetraidrofurano (THF, Honeywell, grau HPLC), tolueno (99,5%, Ajax Finechem).

2,2'-azo-bis(isobutironitrila) (AIBN, 98%, Sigma-Aldrich) foi recristalizado duas vezes em acetona antes de ser usado.

4.3.2 Síntese do agente RAFT

O agente RAFT ácido 4-cianopentanóico ditiobenzóico foi sintetizado conforme metodologia descrita na literatura, [190, 191] com algumas pequenas adaptações experimentais. O procedimento de síntese foi constituído de três etapas sequenciais, como descrito a seguir:

1) Síntese do ácido ditiobenzóico. Em um balão de fundo redondo de três bocas, adicionou-se solução de metóxido de sódio 25% em metanol (108 g, 0,5 mol), metanol anidro (125 g) e enxofre (16 g, 0,5 mol). Cloreto de benzila (31,5 g, 0,25 mol) foi adicionado durante 1 hora sob agitação a temperatura ambiente. O sistema foi então mantido sob agitação e aquecimento (67 °C) durante pernoite. A reação foi resfriada com auxílio de um banho de gelo até 0 °C. O sal precipitado foi removido por filtração e o excesso de solvente foi removido por evaporação rotatória. Ao resíduo viscoso, acrescentaram-se 250 mL de água deionizada e a solução transferida para um funil de separação. A solução de ditiobenzoato de sódio foi *lavada* primeiro com éter etílico (300 mL) + HCl 1N (250 mL) e posteriormente com água deionizada (100 mL) + NaOH 1 N (250 mL). Este procedimento de *lavagem* foi realizado por três vezes, até a obtenção de uma solução de ditiobenzoato de sódio.

2) Síntese do dissulfeto de bis(tiobenzóila). 175 mL da solução de ditiobenzoato de sódio foram transferidos para um balão de fundo redondo de três bocas. Posteriormente,

adicionou-se uma solução de ferricianeto de potássio (16,5 g, 0,05 mol em 250 mL de água deionizada) por 1 hora, mantendo-se forte agitação a temperatura ambiente. O precipitado resultante, de coloração vermelho/roxo, foi filtrado e lavado com água deionizada até que a água de lavagem não apresentasse coloração residual. Os sólidos foram secos à vácuo a temperatura ambiente.

3) Síntese do ácido 4-cianopentanóico ditiobenzóico. Em um balão de fundo redondo adicionou-se acetato de etila (80 mL), 4,4'-azo-bis(ácido 4-cianopentanoico) (8,5 g, 0,03 mol) e dissulfeto de bis(tiobenzóila) (5,7 g, 0,018 mol). A solução resultante foi aquecida sob refluxo durante pernoite. Após o período de reação, o solvente foi removido por evaporação rotatória e o produto foi isolado por coluna cromatográfica recheada de sílica gel (fase estacionária), usando acetato de etila e éter de petróleo (50/50 v/v) como eluente (fase móvel). Frações que apresentaram coloração vermelha/rosa foram combinadas e o solvente removido por rota-evaporação. O produto final foi armazenado a -15 °C.

4.3.3 Síntese do agente macro-RAFT

Poli(etileno glicol) metacrilato de éter metílico (PEG-MA, 8 g, 16,8 mmol; $M_n = 475$ g/mol), AIBN (27,2 mg, 0,16 mmol), agente RAFT (232 mg, 0,8 mmol) e acetonitrila (8 g, 2 mol) foram carregados em um frasco de fundo redondo equipado com uma barra magnética. O recipiente foi selado e purgado com nitrogênio por 1 hora a 15 °C. O frasco foi então transferido para um banho, onde permaneceu por 6 horas a 70 °C sob agitação. Após este período, o excesso de solvente foi removido com ar comprimido a temperatura ambiente. O produto viscoso resultante foi purificado por diálise, utilizando uma membrana de celulose (MW 3.500 g/mol), primeiro com água

deionizada e posteriormente com metanol. Após o processo de diálise, o excesso de solvente foi novamente removido com ar comprimido a temperatura ambiente. O produto final, com característica vermelha e viscosa, foi armazenado a -15 °C.

4.3.4 Síntese do agente reticulante biodegradável

O agente reticulante biodegradável (Ditiopropionil poli(etileno glicol) dimetacrilato, DMA-PEOSS) foi preparado conforme metodologia descrita na literatura, [157] com algumas pequenas adaptações experimentais.

Inicialmente, poli(etileno glicol) metacrilato ($M_n = 526$ g/mol) foi purificado, conforme metodologia descrita por STÖVER *et al.* (2004). [192] Em um funil de separação, 50 mL de poli(etileno glicol) metacrilato foram dissolvidos em 200 mL de água deionizada e posteriormente extraídos com difenil éter (2×50 mL). A suspensão resultante foi então separada por centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos. A fase orgânica foi descartada e a fase aquosa extraída com uma solução de diclorometano/hexano (3:1) (2×250 mL). A suspensão foi novamente separada (5.000 rpm por 5 minutos), descartando-se a fase aquosa. O poli(etileno glicol) metacrilato purificado foi recuperado da fase orgânica após remoção do solvente (por evaporação rotatória a 40 °C).

Em um balão de fundo redondo contendo poli(etileno glicol) metacrilato purificado (10 g, 19 mmol), DCM (60 mL), DCC (3,9 g, 19 mmol) e DMAP (0,5 g), foi adicionada lentamente durante 20 minutos uma solução de 3,3'-ácido ditiopropanóico (2,3 g, 10 mmol) em THF (30 mL), mantendo-se o frasco em um banho de gelo e sob agitação constante. Após o término da adição, a mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente durante pernoite. Os sólidos formados foram removidos por duas

filtrações a vácuo e o solvente foi removido por evaporação rotatória a 30 °C. O óleo resultante, de coloração amarelada, foi armazenado a -15 °C.

4.3.5 Polimerização em miniemulsão

A receita básica de preparo da miniemulsão (Tabela 4.1) foi desenvolvida baseando-se nos trabalhos de SCHORK e colaboradores. [135, 159] O procedimento adotado nos testes seguiu a metodologia descrita a seguir. Inicialmente, em um frasco de vidro descartável, uma solução contendo todos os componentes da fase aquosa eram dissolvidos em uma solução aquosa de HCl 1%. O pH da fase aquosa era então ajustado para um valor final de pH na faixa 2-3 usando uma solução de HCl 20%. Em um outro frasco de vidro descartável foi preparada uma solução da fase orgânica, dissolvendo-se o surfactante Span 80 em cicloexano. A fase aquosa (fase dispersa) era então misturada à fase orgânica (fase contínua) com auxílio de agitação por 30 minutos a 15 °C, sendo posteriormente ultrassonicada por 10 minutos (70% de amplitude, Brason Digital Sonifier 450), mantendo-se o frasco resfriado em um banho de gelo. A miniemulsão resultante era então transferida para um balão de fundo redondo de 50 mL, equipado com uma barra magnética, sendo o frasco selado com septo de borracha e purgado com nitrogênio por 30 minutos a 15 °C.

As reações de polimerização eram realizadas a 60 °C sob agitação constante. Amostras eram tiradas em intervalos pré-determinados para caracterização, com auxílio de uma seringa descartável de 5 mL. Após a reação (ou amostragem), adicionava-se acetona à miniemulsão, seguida de procedimento de centrifugação a 7.500 rpm por 15 minutos. A mistura contendo cicloexano/acetona era então removida e o precipitado era seco a vácuo a temperatura ambiente. Dez miligramas de amostra seca eram então tratados com algumas gotas de trietilamina por 30 minutos (para neutralizar as cargas

positivas dos polímeros). Em seguida, a amostra era dissolvida em solvente apropriado para análise de GPC ou RMN. Para as reações de polimerização em que foi usado o agente reticulante, após o processo de neutralização, as amostras eram sequencialmente tratadas com 100 μL de uma solução de DL-ditiotreitol 0,5 M por uma hora (para a quebra das ligações dissulfeto). A solução resultante era então seca por processo de *freeze-drying* e o polímero resultante era solubilizado em solvente apropriado para análise de GPC ou RMN.

Tabela 4.1 – Receita de polimerização em miniemulsão inversa a 60 °C

Fase contínua	Fase dispersa	Quantidade (g)	Observações
Cicloexano		20	
Span 80		1	
	^a HCl _(aquoso) 1%	2,5	
	NaCl	0,05	
	VA-044	0,0051	[M]:[I] = 400:1
	DMAEMA	1	[M]:[RAFT] = 100:1
	macro-RAFT	0,87 ^b ou 0,90 ^c	Conforme M_n
	DMA-PEOSS	0,05	Quando presente

VA-044 = 2,2'-azo-bis[2-(imidazoli-2-il) propano] dicloridrato; DMAEMA = 2-(dimetilamino) metacrilato de etila; DMA-PEOSS = ditiopropionil poli(etileno glicol) dimetacrilato. ^a O pH final da fase dispersa foi ajustado com HCl_(aquoso) 20% até pH = 2-3. ^b macro-RAFT₁: M_n = 13.650 g/mol, M_w/M_n = 1,11. ^c macro-RAFT₂: M_n = 14.200 g/mol, M_w/M_n = 1,09.

4.3.6 Caracterização

Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Para realizar as determinações de massas molares, as amostras de polímero (previamente processadas) eram solubilizadas em DMAc, filtradas em filtro de 0,45 μm e injetadas em sistema cromatográfico, usando DMAc como fase móvel na vazão de 1 mL/min. A temperatura das colunas era mantida em 50°C. As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu equipado com detector de refração RID-10A, pre-coluna de 5 mm (Polymer Laboratories, 50 \times 7,8 mm²) e quatro colunas PL Styragel (10⁵, 10⁴, 10³ e 500 Å), calibradas com padrões de poliestireno de 500 a 10⁶ g/mol.

A massa molar numérica média teórica ($M_{n,th}$) foi calculada com base nas Equações 4.13 e 4.14:

$$M_{n,th} = \frac{[M]_0 MW_{mon} \alpha}{[MacroRAFT]_0} + MW_{MacroRAFT} \quad (4.13)$$

$$M_{n,th} = \frac{[M]_0 MW_{mon} \alpha}{[MacroRAFT]_0} + \frac{[AR]_0 MW_{AR} \alpha}{[MacroRAFT]_0} + MW_{MacroRAFT} \quad (4.14)$$

onde “M” representa monômero, “MW” é a massa molar, “ α ” é a conversão e “AR” representa agente reticulante. A Equação 4.13 foi usada para o cálculo da massa molecular teórica para as reações que usaram apenas o macro-RAFT agente. A Equação 4.14 foi usada para calcular a massa molecular teórica dos polímero em reações que utilizaram o macro-RAFT agente e o agente reticulante, considerando a massa molar após o processo de clivagem das ligações dissulfeto. As curvas de distribuições de massas molares apresentadas neste Capítulo foram normalizados em relação ao valor máximo, segundo a relação:

$$y_{normalizado} = \frac{y_i}{y_{máximo}} \quad (4.15)$$

Cromatografia gasosa (GC)

A conversão do monômero foi determinada por cromatografia gasosa, utilizando o procedimento descrito a seguir: 0,1 g da amostragem obtida da miniemulsão era diluída em 2 mL de uma solução GC (cicloexano:tolueno, 1.000:2) e injetadas em cromatógrafo gasoso. As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu 17A,

equipado com coluna AT-Wax (Heliflex capillary, Altech) e usando H₂ como gás carreador. O injetor, a coluna e o detector operavam a 200, 120 e 250 °C, respectivamente. O cálculo de conversão foi feito comparando-se as áreas do monômero, do solvente (cicloexano) e do padrão interno (tolueno).

Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (¹H-RMN)

As análises de ¹H-RMN descritas neste Capítulo foram realizadas em equipamento Bruker DPX 300 (Bruker Co.), operado a 300 MHz e equipado com sonda de 5 mm de diâmetro. Para preparo das amostras, utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl₃), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO) ou óxido de deutério (D₂O). O tetrametilsilano (TMS) foi usado como referência interna e manteve-se a temperatura constante em aproximadamente 25°C em todas as análises realizadas.

Tamanho de partícula (por Dynamic Light Scattering – DLS)

As medidas de DLS foram realizadas em instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS, equipado com laser 4 mW He-Ne, operando no comprimento de onda 633 nm e utilizando um detector de fotodiodo de alta eficiência. A miniemulsão foi analisada conforme retirada do processo de amostragem.

Também foi determinado o tamanho médio das nanopartículas reticuladas em solução tampão. Essas nanopartículas foram isoladas a partir do látex final, adicionando-se acetona à miniemulsão, seguida de procedimento de centrifugação a 7.500 rpm por 15 minutos. A mistura de cicloexano/acetona era então removida e o precipitado seco a vácuo a temperatura ambiente. As partículas foram re-suspensas em solução aquosa de HCl 20% (pH = 1-2), água deionizada (pH = 7) e carbonato de sódio

aquoso (pH =12). O potencial zeta das nanopartículas foi determinado em água deionizada.

4.4 Resultados & Discussão

4.4.1 Síntese dos compostos orgânicos

O agente RAFT ácido 4-cianopentanóico ditiobenzóico (Figura 4.7) foi preparado seguindo basicamente a rota de síntese descrita por MITSUKAMI *et al.*, [190] e também na metodologia descrita por THANG *et al.* [191].

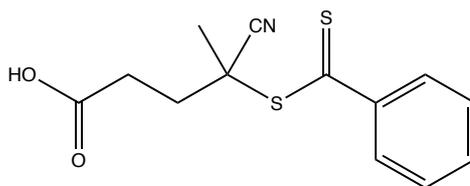


Figura 4.7 – Estrutura do agente RAFT ácido 4-cianopentanóico ditiobenzóico sintetizado.

Esta é uma rota de síntese considerada simples e constituída de três etapas sequenciais. A primeira etapa do processo é a síntese do ácido ditiobenzóico (DTBA), que é revertido em sua forma salina (conforme Figura 4.8). Embora existam outras rotas para a produção do DTBA, a rota de síntese seguida é reportada como a metodologia de síntese de melhores rendimentos finais. [190]

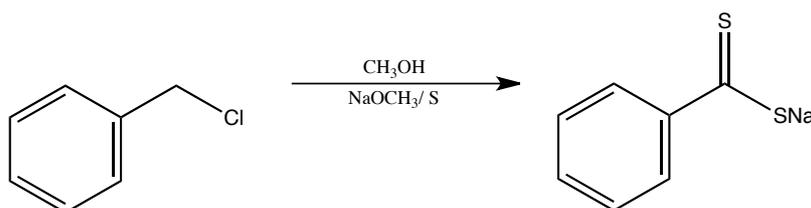


Figura 4.8 – Esquema da reação de síntese do ácido ditiobenzóico (DTBA).

A segunda etapa do processo consiste na reação de uma solução de ditiobenzoato de sódio com ferricianeto de potássio, que resulta na síntese do dissulfeto de bis(tiobenzoila) como composto principal (conforme Figura 4.9).

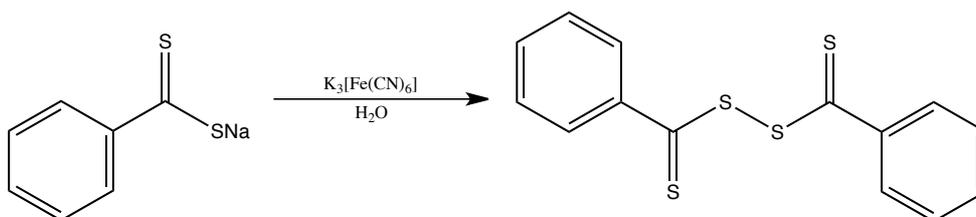


Figura 4.9 – Esquema da reação de síntese do dissulfeto de bis(tiobenzoila).

A terceira etapa de síntese consiste em reagir o dissulfeto de bis(tiobenzoila) produzido com um *azo-composto* (4,4'-azo-bis(ácido 4-cianopentanóico) em acetato de etila (conforme Figura 4.10), para a obtenção do agente RAFT desejável.

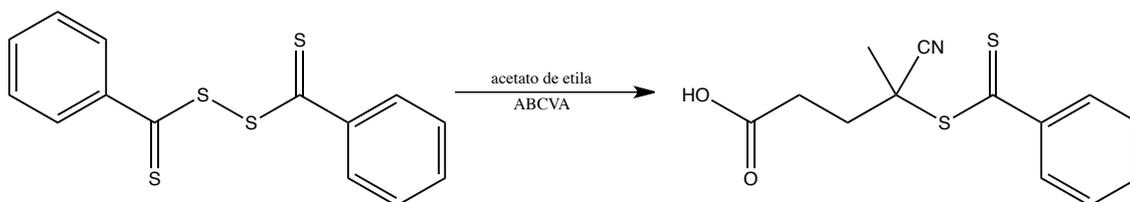


Figura 4.10 – Esquema da reação de síntese do agente RAFT ácido 4-cianopentanóico ditiobenzóico sintetizado. *4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio) pentanoic acid*.

A pureza final do produto depende dos métodos de purificação empregados após a síntese do composto. Diversas estratégias podem ser adotadas, como a combinação de duas ou mais técnicas de purificação, para eliminação de subprodutos e solventes residuais. No presente trabalho, o produto final foi purificado utilizando a técnica de coluna cromatográfica, [193] utilizando acetato de etila e éter de petróleo como eluente,

sendo que a confirmação da obtenção do produto desejado foi feita por ^1H -RMN (Figura 4.11).

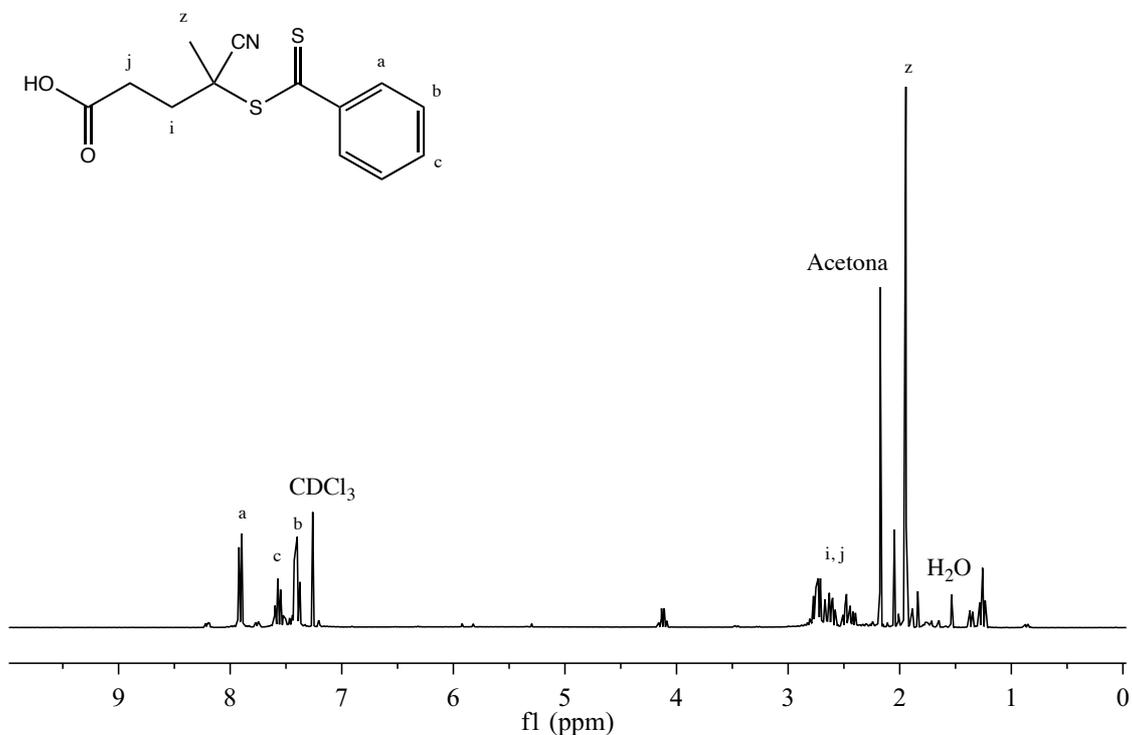


Figura 4.11 – Espectro de ^1H -RMN do agente RAFT ácido 4-cianopentanóico ditiobenzóico sintetizado; ressonâncias observadas (300 MHz, CDCl_3)/ δ ppm: 1.94 (s, 3H, CH_3); 2.39-2.77 (m, 4H, CH_2CH_2); 7.42 (m, 2H, m-ArH); 7.59 (m, 1H, p-ArH) e 7.92 (m, 2H, o-ArH).

De acordo com algumas referências, [190, 191] as ressonâncias entre $\delta \sim 7.4$ -8.0 ppm representam os prótons do anel aromático do grupamento fenila; entre $\delta \sim 2.4$ -3.0 ppm, os prótons do grupamento metileno do ácido cianopentanóico; e as ressonâncias próximas de $\delta \sim 2.0$ ppm, os prótons do grupamento metila do mesmo fragmento. O espectro da Figura 4.11 também apresentou alguns outros picos, todos eles associados a impurezas, [194] como o pico do solvente (CDCl_3 , $\delta \sim 7.26$ ppm), diclorometano ($\delta \sim 5.30$ ppm), acetona ($\delta \sim 2.17$ ppm), água ($\delta \sim 1.52$ ppm) e alguns outros não assinalados.

Conforme mencionando anteriormente, essas impurezas podem ser removidas por sucessivos processos de cromatografia, alternando-se a composição do eluente, por exemplo. Outra estratégia bastante usada é a combinação de dois ou mais processos de purificação (como, por exemplo, cromatografia, pervaporação e cristalização), uma vez que grande parte das impurezas observadas no espectro são resíduos de solventes usados durante o processo de síntese/purificação. Entretanto, a Figura 4.11 apresentada indica a obtenção do produto final pretendido com relativo grau de pureza, após o processo de purificação por coluna cromatográfica.

O agente reticulante escolhido para ser usado (DMA-PEOSS, Figura 4.12) foi sintetizado conforme metodologia descrita por OH *et al.* [157] Os diferenciais desse agente reticulante incluem a solubilidade em água e a presença de uma ponte dissulfeto (o que confere biodegradabilidade à molécula), além da rota de síntese relativamente simples.

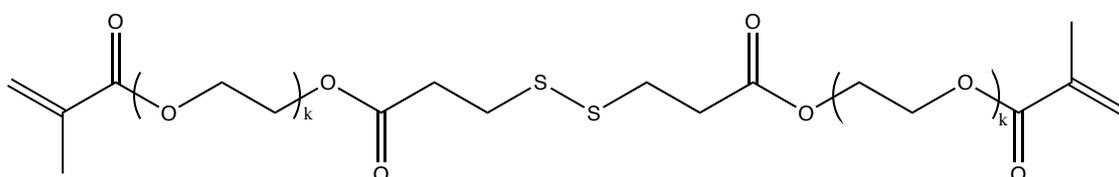


Figura 4.12 – Estrutura do agente reticulante biodegradável (Ditiopropionil poli(etileno glicol) dimetacrilato, DMA-PEOSS). *Dithiopropionyl poly(ethylene glycol) dimethacrylate*.

Este composto foi obtido por uma reação direta entre o poli(etileno glicol) metacrilato e o ácido ditiopropiônico (Figura 4.13) e posterior processos de purificação. A confirmação da obtenção do produto desejado foi feita por ^1H -RMN (Figura 4.14).

Conforme observado pelo espectro de ^1H -RMN, o produto final também apresentou algumas impurezas que não foram removidas pelas etapas de purificação realizadas. Além disso, o produto final obtido apresentou uma pequena quantidade de

sal, além de um aspecto ligeiramente diferente do relatado por OH et al. [157] Entretanto, testes preliminares realizados demonstraram que o agente reticulante sintetizado mostrou-se eficaz em promover a reticulação de redes poliméricas e sofrer posterior degradação em ambientes redutores, através da quebra das ligações dissulfeto.

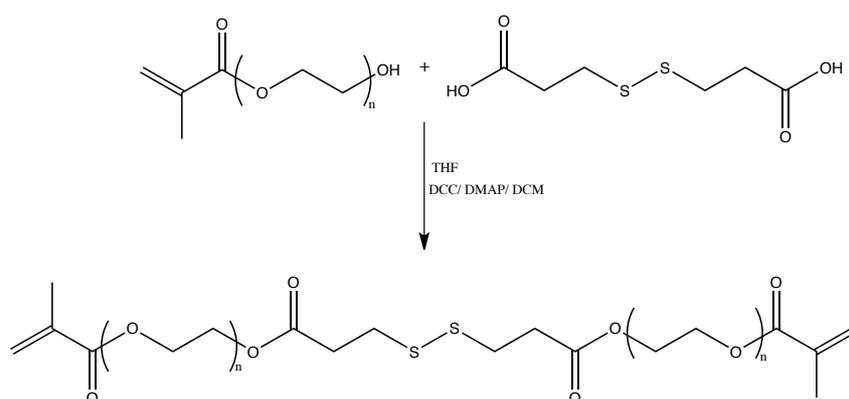


Figura 4.13 – Reação de síntese do agente reticulante DMA-PEOSS

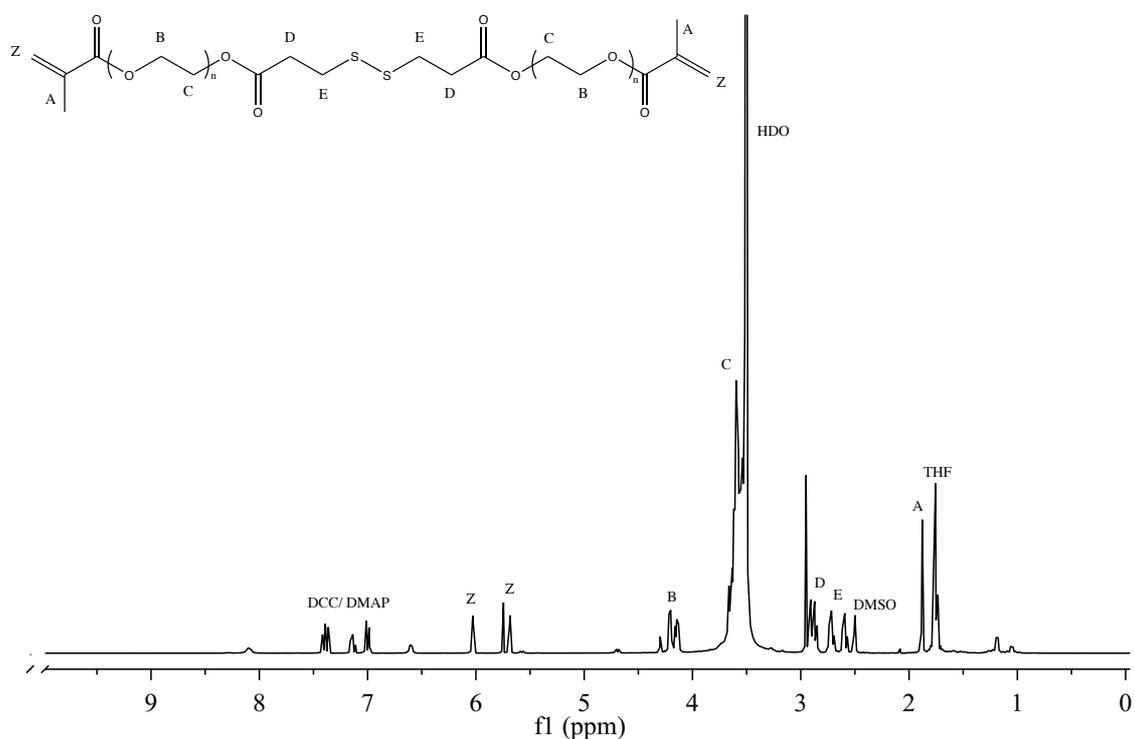


Figura 4.14 – Espectro do ^1H -RMN do agente reticulante DMA-PEOSS sintetizado; ressonâncias observadas (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)/ δ ppm: 1.9 (s, 6H, CH_3 -), 2.7 (t, 4H, $-\text{COCH}_2\text{-CH}_2\text{-SS-}$), 2.9 (t, 4H, $-\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SS-}$), 3.3-3.7 (m, 72H, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$), 4.0-4.3 (m, 8H, $-\text{COO-CH}_2-$ e $-\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 5.7 (s, 2H, CH=), 6.0 (s, 2H, CH=).

4.4.2 Formação da miniemulsão

Em um sistema de polimerização em miniemulsão inversa, um monômero hidrofílico é usado como principal componente da fase dispersa (fase aquosa) e um solvente não polar é usado como principal componente da fase contínua do sistema (fase orgânica). Usualmente, este tipo de miniemulsão inversa (água-em-óleo ou simplesmente w/o) produz um sistema leitoso opaco bem característico, que é bem reportado na literatura. [135]

Um critério fundamental para a formação de uma miniemulsão estável é que o monômero tenha uma solubilidade limitada na fase contínua. Desta maneira, em um sistema inverso, quanto mais hidrofílico for o monômero, mais estável será o sistema, devido à baixa (ou nenhuma) solubilidade do monômero na fase contínua, [144] fato este que também previne efeitos como o de degradação difusional. O monômero escolhido DMAEMA (e seu derivado acrilato) é um composto que apresenta miscibilidade em uma grande variedade de solventes, o que inclui solventes polares, como a água, e solventes apolares, como cicloexano, n-hexano e heptano, que poderiam ser candidatos primários para constituição da fase contínua de uma miniemulsão inversa.

Para contornar esta dificuldade, optou-se em seguir o procedimento utilizado por ARMES *et al.*, [195, 196] em que a adição de cargas positivas em monômeros que apresentam aminas terciárias, como é o caso do DMAEMA, aumenta consideravelmente a solubilidade desses monômeros em meios aquosos neutros e ácidos, conseqüentemente reduzindo a solubilidade em meios orgânicos. Para realizar a adição de cargas à estes monômeros, o que leva à protonação das aminas terciárias, foi necessário utilizar soluções aquosas ácidas (HCl 1-20 %), ajustando o pH final para valores ácidos (pH < 4). Este procedimento assegurou que o monômero protonado

permanecesse predominantemente na fase aquosa do sistema, fato este comprovado pela formação de duas fases distintas e não-detecção de traços de monômero na fase contínua (cicloexano), conforme análises ^1H -RMN apresentadas nas Figuras 4.15 e 4.16.

Embora uma miniemulsão inversa possa ser preparada usando-se apenas um surfactante com baixo valor HLB, [138, 144] para prevenir a ocorrência de efeitos como o de degradação difusional, que desestabilizam a miniemulsão é necessário adicionar um agente de pressão osmótica. [197] Este agente é caracterizado por ser uma substância de baixa massa molar, solúvel na fase dispersa e que apresente baixa solubilidade na fase contínua. No caso de uma miniemulsão inversa, em que a fase dispersa é aquosa, esse agente de pressão osmótica geralmente é um sal, como o NaCl, Na_2SO_4 ou o K_2SO_4 . [138, 144]

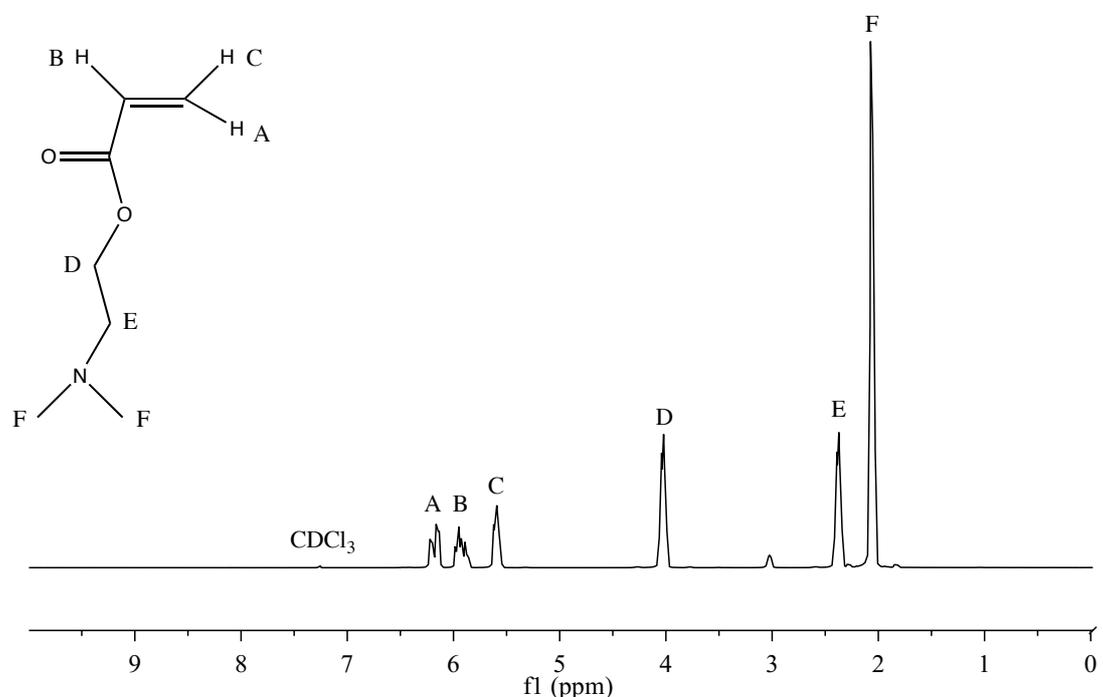


Figura 4.15 – ^1H -RMN do monômero 2-(dimetil amino) acrilato de etila purificado em CDCl_3 .

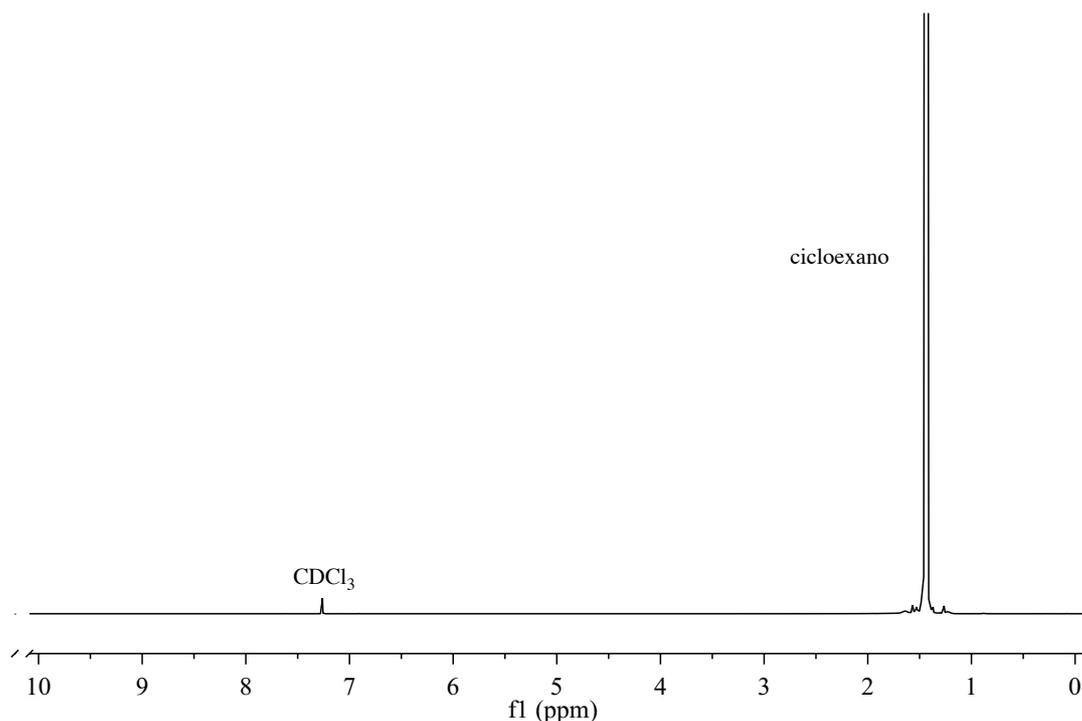


Figura 4.16 – Teste de partição do monômero DMAEMA protonado em cicloexano.¹³

Desta forma, testes preliminares foram realizados para avaliar principalmente a estabilidade do sistema frente a diferentes tipos de componentes básicos da miniemulsão, além de suas respectivas concentrações. Algumas variáveis do processo de preparo da miniemulsão, além da estratégia de preparo, também foram objeto de estudo nesta fase. O procedimento adotado nestes testes preliminares é ilustrado no Esquema 4.1.



Esquema 4.1 – Procedimento adotado para o preparo da miniemulsão inversa.

¹³ Procedimento experimental do teste: (1) dissolução do monômero em solução aquosa ácida (HCl 20%) e mistura com cicloexano; (2) ultrasonificação por 10 minutos a 70% de amplitude; (3) mistura por 24 horas a 45 °C; (4) separação das fases e análise do cicloexano por ¹H-RMN em CDCl₃.

Os testes foram realizados utilizando o monômero DMAEMA ou seu derivado acrilato (DMAEA), o cicloexano como o principal constituinte da fase contínua, NaCl como o principal agente de pressão osmótica e alguns tipos de surfactantes em diferentes concentrações (Span 80[®], Span 85[®], Pluronic[®] L-121 ou Pluronic[®] L-81). O procedimento de miniemulsificação foi realizado após o preparo da pré-mistura, aplicando-se ultrassom a amostra (5-10 minutos, amplitude entre 45 e 70%) e um banho de gelo para resfriar o sistema. Após a obtenção da miniemulsão, parte das amostras foi degaseificada com nitrogênio por 30 minutos. As amostras submetidas ao processo de degaseificação foram posteriormente testadas em reações preliminares de polimerização, conduzidas em diversos intervalos de tempo (60-1.200 minutos) e de temperatura (44-60°C).

Embora diferentes testes tenham sido realizados, aqueles que utilizaram o cicloexano como solvente orgânico, o Span 80 (Figura 4.17) como surfactante e o NaCl como agente de pressão osmótica apresentaram melhores resultados quanto à estabilidade da miniemulsão formada. O ácido escolhido para o ajuste do pH do meio, garantindo assim a protonação do monômero, foi o HCl_{aq} em concentrações que variaram entre 1 e 20%.

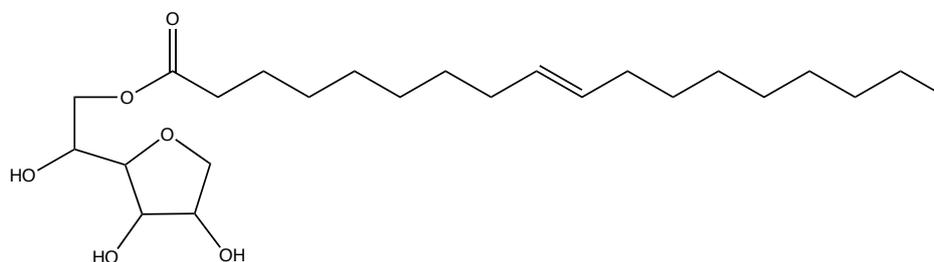


Figura 4.17 – Estrutura do surfactante Span 80[®].

Independentemente da estabilidade, prolongada ou não, todos os testes produziram miniemulsões inversas com característica *leitosa opaca*, normalmente

esperada para este tipo de sistema. Esta receita genérica mostrou-se bastante robusta, pois foi possível acrescentar outros constituintes à formulação (agente RAFT e agente reticulante) e/ou elevar a proporção da fase dispersa do sistema para até 20 % do total da miniemulsão e ainda assim obter miniemulsões estáveis por mais de 72 horas. A Figura 4.18 representa um tipo de miniemulsão inversa obtida nestes testes preliminares.

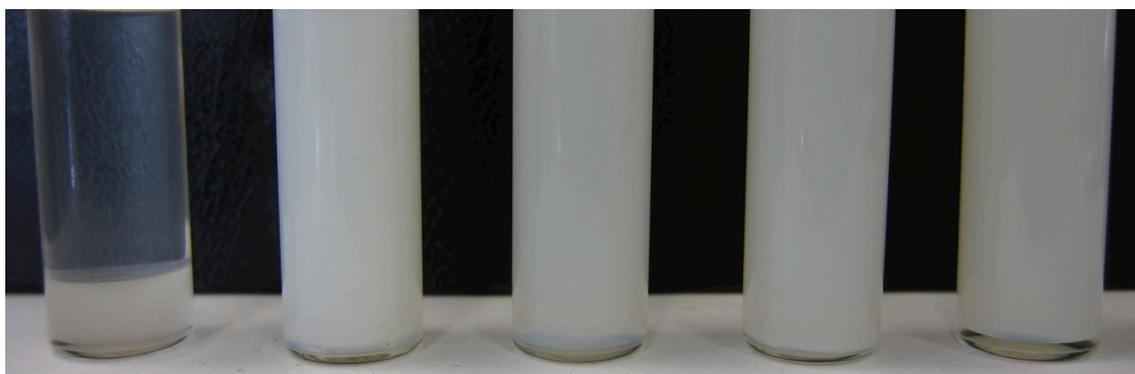


Figura 4.18 – Teste de polimerização em miniemulsão inversa com o monômero DMAEA. Polimerização via radicais livres à 44 °C por 360 minutos.¹⁴ Frascos da esquerda para a direita: (1) antes da ultrasonificação, (2) após a ultrasonificação, (3) 120 minutos, (4) 240 minutos e (5) 360 minutos de polimerização. Foto tirada 24 horas após a reação.

Com base nessa receita, foi possível estabelecer uma receita e uma metodologia de preparo para a produção da miniemulsão inversa, previamente apresentadas na Tabela 4.1 da seção de materiais e métodos deste Capítulo.

4.4.3 Polimerização em miniemulsão

O plano proposto foi o de utilizar a receita/metodologia desenvolvida para conduzir três tipos de reações de polimerização em miniemulsão inversa, utilizando o 2-

¹⁴ Receita usada: cicloexano (20 g), Span 80 (1 g), HCl 1% (2,5 g), NaCl (0,05 g), VA-044 (0,0056 g), DMAEA (1 g) e HCl 20% (~30 gotas).

(dimetilamino) metacrilato de etila (DMAEMA) como monômero. Os tipos de reações realizadas foram a polimerização *convencional*, a polimerização na presença do agente RAFT sintetizado e a polimerização na presença do agente RAFT e do agente reticulante DMA-PEOSS. Desta forma, como discutido ao longo do texto, foi possível comparar a estabilidade da miniemulsão inversa e o comportamento da polimerização (cinética, evolução de massa molar dos polímeros, etc.) com base nos diferentes tipos de reações de polimerização realizadas.

Polimerização convencional

A polimerização *convencional* em miniemulsão inversa do DMAEMA (Figura 4.19) foi conduzida utilizando a receita e procedimento estabelecidos e descritos na seção experimental. Entretanto, por ser uma reação conduzida em mecanismo *clássico* de radicais livres, não foi empregado o agente RAFT. Neste conjunto de reação também não foi empregado o agente reticulante.

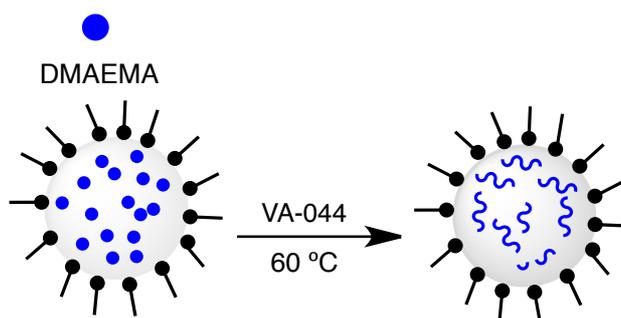


Figura 4.19 – Esquema da polimerização *convencional* em miniemulsão inversa do DMAEMA.

Conforme observado nos testes preliminares e demonstrado pela Figura 4.20, a miniemulsão gerada apresentou predominantemente uma característica *leitosa opaca*. A miniemulsão gerada apresentou uma estabilidade visual de algumas horas, o que

garantia a estabilidade do sistema entre a etapa de formação da emulsão e o início da polimerização, quando o processo era realizado sob forte agitação mecânica.

Entretanto, conforme observado na Figura 4.20, após 24 horas algumas amostras apresentaram uma visível separação de fases no fundo do frasco e possivelmente alguma coagulação na fase interna do látex, embora este fato não tenha sido comprovado. Todas as amostras apresentaram sedimentação após 7 dias (armazenadas a temperatura ambiente e ao abrigo de luz), indicando que a estabilidade da *emulsão* produzida foi suficiente apenas para conduzir a reação de polimerização.

a)



b)



Figura 4.20 – Exemplo de polimerização *convencional* em miniemulsão inversa. Reação conduzida a 60 °C por 360 minutos; receita segundo Tabela 4.1. a) após 24 horas; b) após 7 dias. Frascos da esquerda para a direita: (1) antes da ultrassonificação, (2) após a ultrassonificação, (3) 15 minutos, (4) 30 minutos, (5) 60 minutos, (6) 120 minutos e (7) 360 minutos de polimerização.

A polimerização *convencional* em miniemulsão inversa do DMAEMA apresentou uma cinética bastante rápida (Figura 4.21), com aproximadamente 70% de conversão em 1 hora de reação. Entretanto, por meio da realização de várias reações, observou-se que a conversão para este tipo de sistema parece não ultrapassar o patamar de ~90%, mesmo após 6 horas de polimerização. Em alguns testes foi possível atingir conversões de 95-98%, mantendo o sistema sob condições reacionais constantes por aproximadamente 20 horas. Entretanto, foi observado uma total perda de estabilidade do látex final obtido nestas reações.

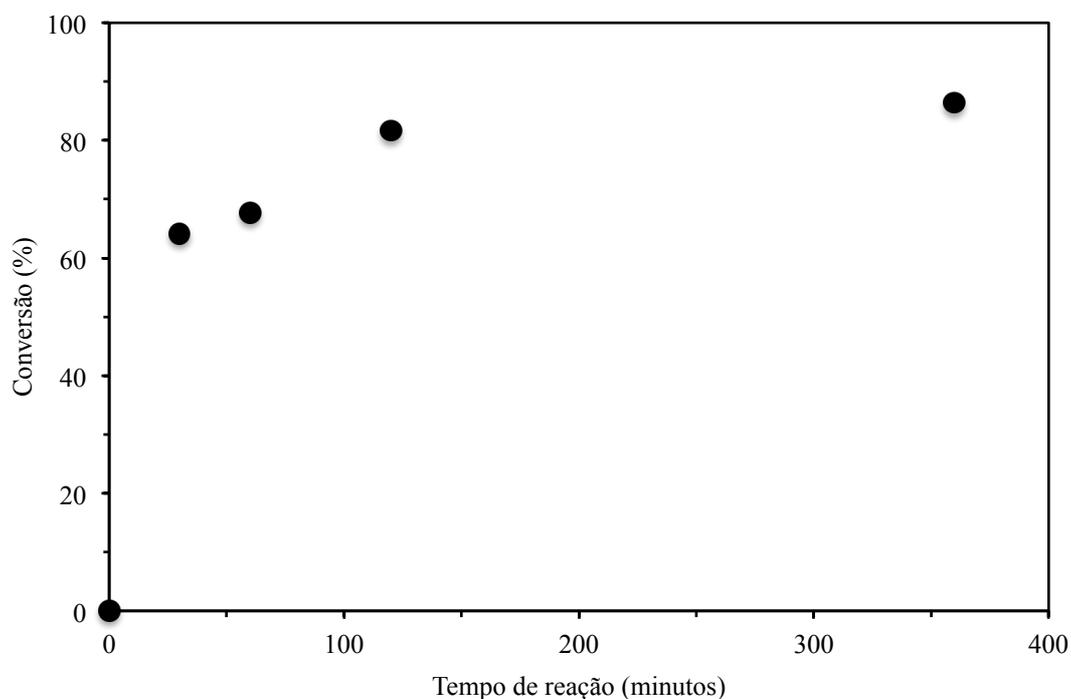


Figura 4.21 – Gráfico de conversão *versus* tempo de reação da polimerização *convencional* em miniemulsão inversa do DMAEMA.

Os resultados de massa molar obtidos para a reação de polimerização convencional em miniemulsão inversa do DMAEMA (Tabela 4.2 e Figura 4.22) apresentaram resultados numéricos bastante elevados (da ordem de 10^5 g/mol), o que

era esperado para polímeros sintetizados por mecanismo de polimerização via radicais livres em miniemulsão. A distribuição de massas molares (Figura 4.22) apresentou um perfil bimodal, provavelmente por causa da variação da concentração dos reagentes e taxas de reação de terminação com a conversão. Entretanto, os resultados de massa molar apresentados foram considerados satisfatórios, uma vez que eles confirmaram a viabilidade da síntese do PDMAEMA pelo mecanismo convencional de radicais livres, caracterizado por amostras com altos valores de massa molar e alto índice de polidispersão M_w/M_n .

Tabela 4.2 – Dados de massa molar para as amostras de PDMAEMA obtidos por meio da polimerização *convencional* em miniemulsão inversa do DMAEMA.

Tempo de reação (min)	Conversão (%)	$M_n \times 10^{-3}$ (g/mol)	M_w/M_n
30	64	368	3,03
60	68	215	2,60
120	82	139	3,90
360	86	226	3,62

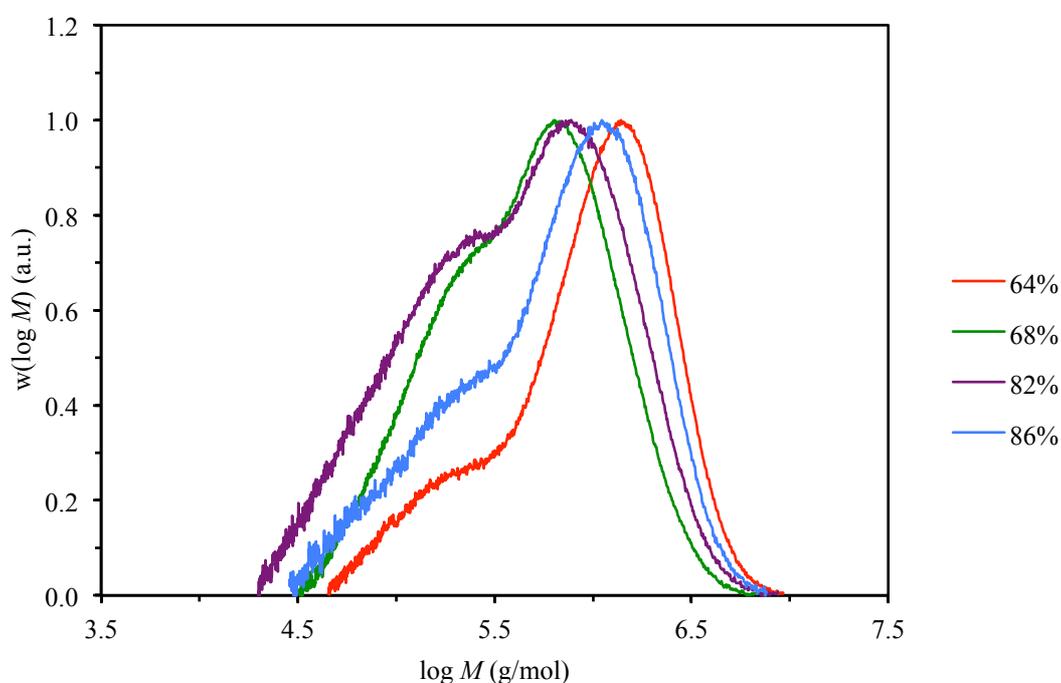
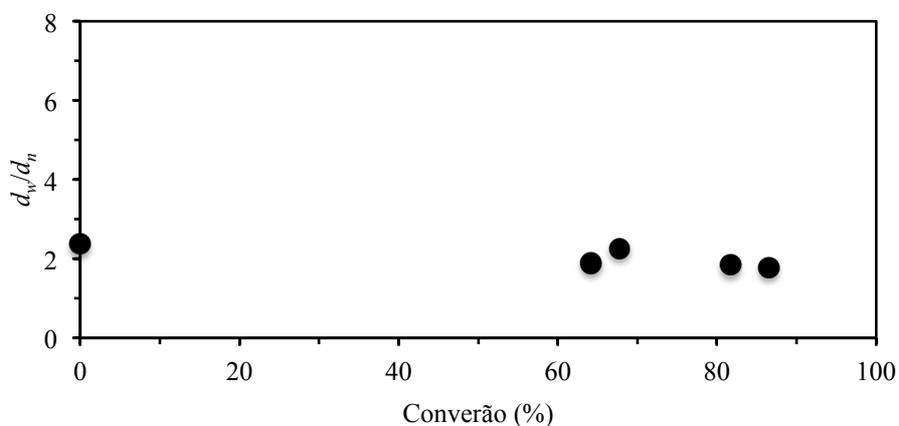


Figura 4.22 – Distribuição de massas molares para as amostras de PDMAEMA obtidas por meio da polimerização *convencional* em miniemulsão inversa do DMAEMA.

As *emulsões*, antes e após o processo de polimerização, também foram avaliadas quanto ao tamanho de gotas/partículas geradas. Conforme mostrado na Figura 4.23, para as diversas polimerizações convencional em miniemulsão inversa do DMAEMA, o tamanho médio de *partículas* gerado foi de aproximadamente 100 nm, valor que permaneceu relativamente constante durante todo o processo de polimerização.

a)



b)

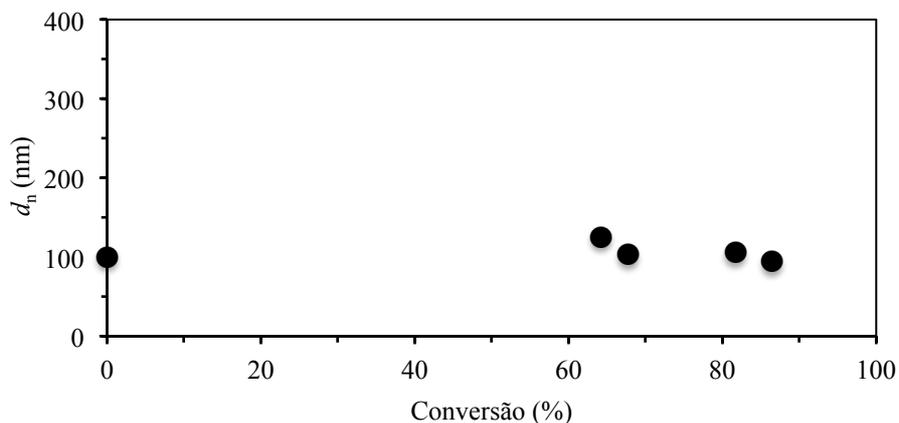


Figura 4.23 – Tamanhos médios de partícula em função da conversão para a polimerização *convencional* em miniemulsão inversa do DMAEMA. a) $d_{\text{volume}}/d_{\text{numérico}}$; b) $d_{\text{numérico}}$.

A distribuição de tamanhos de partícula (Figura 4.24) para uma amostra obtida durante o processo de polimerização *convencional* em miniemulsão inversa do

DAMEMA aponta para uma relativa homogenidade do tamanho de partículas formadas e ausência de frações de tamanho de partícula elevados.

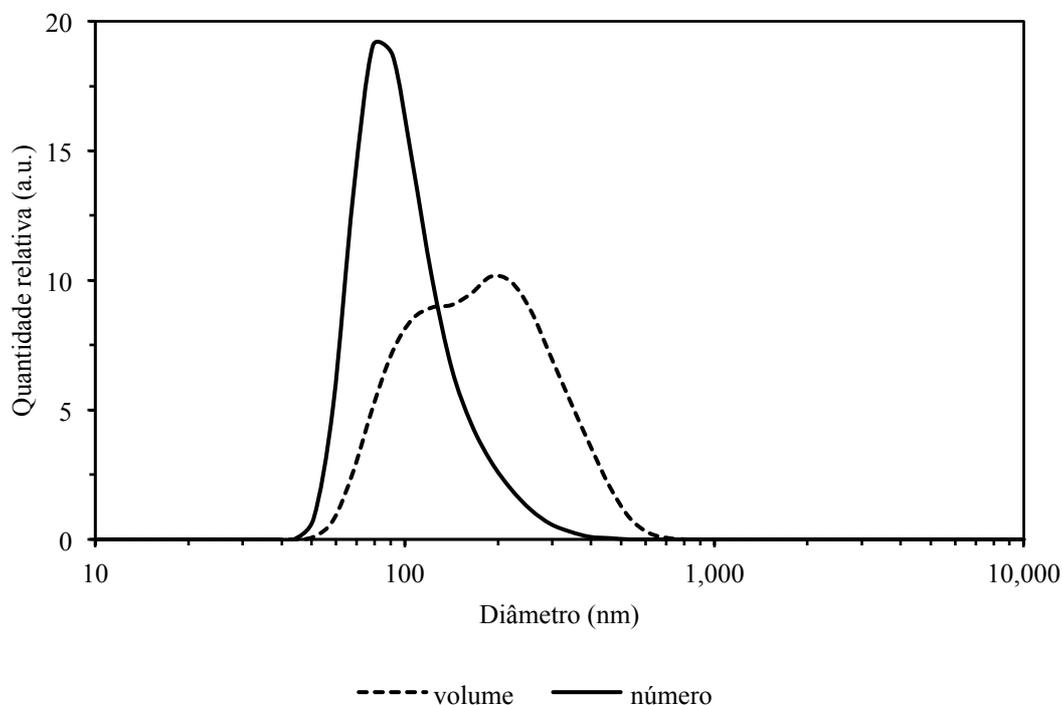


Figura 4.24 – Distribuições de tamanhos de partículas para a polimerização *convencional* em miniemulsão inversa do DMAEMA. Látex da amostra com 82% de conversão.

Com o conjunto de dados apresentados, foi possível estabelecer um conjunto de características básicas do processo de polimerização em miniemulsão inversa do DMAEMA, que servirá de base para a comparação com os resultados obtidos quando a polimerização foi conduzida na presença do agente RAFT e do agente reticulante, conforme apresentado nas próximas seções.

Polimerização RAFT

Foram realizadas reações de polimerização em miniemulsão inversa do DMAEMA na presença do agente RAFT previamente sintetizado. Conforme

apresentado na Tabela 4.1, a diferença da polimerização convencional para a polimerização RAFT é a adição do agente RAFT à receita de polimerização. A concentração do agente RAFT escolhida foi de 1:100 em relação à quantidade de monômero presente. Neste conjunto de reações, para poder avaliar apenas o desempenho do agente RAFT, também não foi empregado o agente reticulante.

A polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA tem sua reação esquematizada na Figura 4.25. De acordo com o esquema proposto, cada cadeia em crescimento só possui apenas uma única molécula do agente RAFT, embora também sejam geradas cadeias de PDMAEMA sem agente RAFT em sua estrutura ao longo da polimerização.

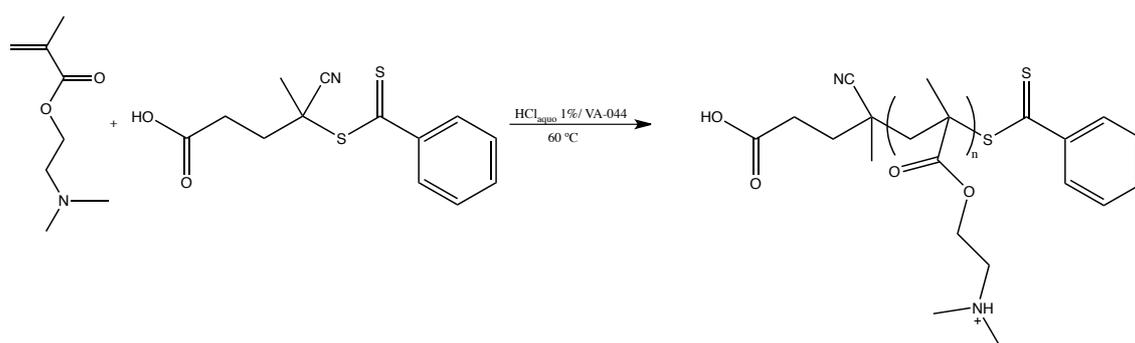


Figura 4.25 – Reação de polimerização do DMAEMA na presença do agente RAFT ácido 4-cianopentanóico ditiobenzóico sintetizado.

Um desafio particular encontrado ao incluir o agente RAFT sintetizado na receita de miniemulsão inversa foi a migração dos componentes entre as fases do sistema. Embora o agente RAFT tenha de fato solubilidade na fase dispersa do sistema (fase aquosa), durante a etapa de pré-mistura este composto também apresentou uma grande afinidade pela fase contínua (orgânica).

O agente RAFT sintetizado (ácido 4-cianopentanóico ditiobenzóico) possui uma característica coloração vermelha/rosa. Desta forma, sua adição no sistema confere uma

coloração *rósea* característica, facilitando a monitoração da migração do componente e também de sua degradação ao longo da polimerização. Com o intuito de proceder uma polimerização RAFT controlada, o agente foi solubilizado na fase dispersa do sistema antes de ser misturado com a fase contínua. Entretanto, conforme ilustrado na Figura 4.26, após alguns minutos da etapa da pré-mistura (onde ambas as fases são misturadas) praticamente todo o agente RAFT migrou para a fase orgânica do sistema.



Figura 4.26 – Migração do agente RAFT (ácido 4-cianopentanóico ditiobenzóico) da fase dispersa (aquosa) para a fase contínua (orgânica) do sistema de pré-mistura da miniemulsão inversa. Teste realizado utilizando DMAEA como monômero e 0,01 g de agente RAFT. Frascos da esquerda para a direita: (1) antes da ultrassonificação, (2) após a ultrassonificação, (3) 60 minutos, (4) 240 minutos e (5) 20 horas de polimerização.

Os dados reportados indicam que, mesmo solubilizando o agente RAFT na fase dispersa da miniemulsão, realizando o processo de miniemulsificação e posteriormente o processo de polimerização, durante as duas últimas etapas o agente RAFT utilizado tende a migrar para a fase contínua do sistema, culminando numa maior instabilidade do sistema formado. Além disso, a saída do agente RAFT das gotas formadas, onde ocorre as reações de polimerização, também levam a um pobre controle da polimerização RAFT em miniemulsão e, conseqüentemente, a um produto final fora dos padrões desejadas para uma técnica de CLRP.

A solução encontrada para aumentar a afinidade do agente RAFT pela fase dispersa do sistema de miniemulsão inversa foi o de “modificar” o agente RAFT sintetizado. A modificação proposta consistiu em “adicionar” ao agente RAFT um bloco de poli(etileno glicol), que aumenta a afinidade do agente por meios polares (no caso, a fase dispersa do sistema; ácida/aquosa) e conseqüentemente causa a redução da solubilidade do agente RAFT em meios apolares (no caso a fase contínua; cicloexano). A modificação do agente RAFT, produzindo um agente macro-RAFT, se deu através de uma reação de polimerização em solução (Figura 4.27) na presença do monômero poli(etileno glicol) metil eter metacrilato (PEG-MA; $M_n = 475$ g/mol), sendo o produto final obtido após processos de purificação (diálise utilizando solventes polares).

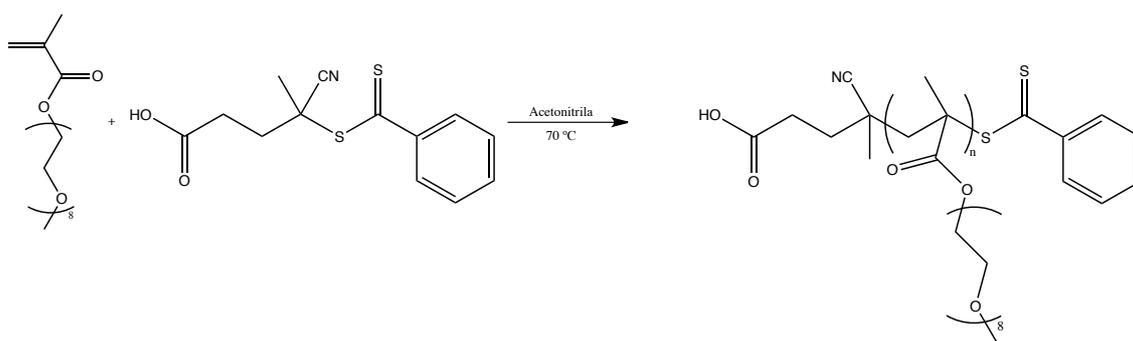


Figura 4.27 – Reação de modificação do agente RAFT ácido 4-cianopentanóico ditiobenzóico, resultando na formação de um agente macro-RAFT.

Durante esta etapa, diversos lotes de agente macro-RAFT foram produzidos e analisados por GPC e ^1H -RMN. Os dados de ^1H -RMN comprovaram o sucesso da reação de modificação, que pode ser vista como uma reação de “extensão de cadeia” do agente RAFT original. Na Figura 4.28 é ilustrado o espectro de ^1H -RMN de um lote de macro-RAFT sintetizado, em que são observados os deslocamentos químicos do bloco polimérico inserido e do agente RAFT original.

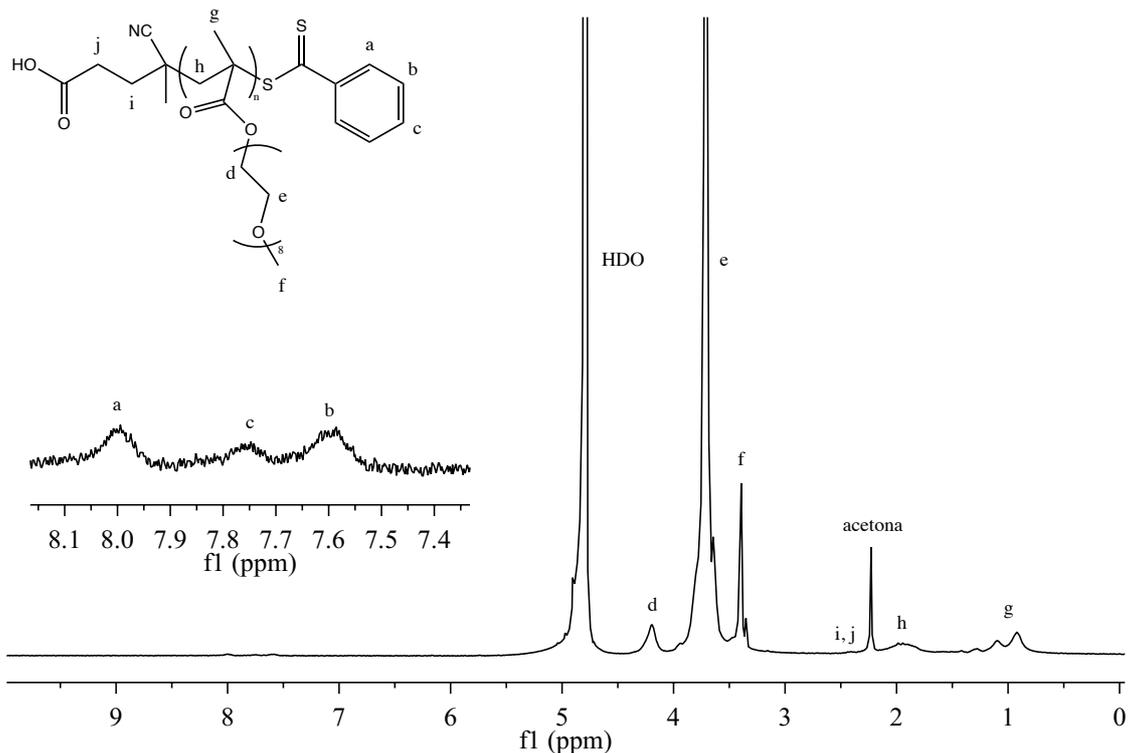


Figura 4.28 – Espectro de ^1H -RMN do agente macro-RAFT₁ sintetizado com auxílio de reação de extensão de cadeia; ressonâncias observadas (300 MHz, D₂O)/ δ ppm: 1.5-2.0 (m, 3H, CH₂-CH), 3.36 (s, 3H, CH₃), 3.60 (m, nH, O-CH₂-CH₂-O-), 4.10 (s, 2H, COO-CH₂), 7.36 (m, 2H, m-ArH), 7.50 (m, 1H, p-ArH), 7.87 (m, 2H, o-ArH).

Além dos dados de ^1H -RMN, os dados de GPC obtidos comprovaram um ótimo controle da reação de “extensão de cadeia”, fato este que pode ser traduzido por valores de $M_w/M_n < 1,10$ e massas molares (M_n) próximas aos valores teóricos calculados e/ou em concordância com os valores calculados com auxílio dos dados obtidos por ^1H -RMN, conforme demonstrado na Tabela 4.3.

Seguindo a receita/metodologia apresentada anteriormente e usada na polimerização convencional, reações de polimerização na presença do agente macro-RAFT foram conduzidas em miniemulsão inversa. Este tipo de reação gerou copolímeros em blocos, conforme esquema geral de reação apresentado na Figura 4.29.

Tabela 4.3 – Características dos macro-RAFT agente produzidos

Amostra	Teórico* M_n (g/mol)	$^1\text{H-RMN}$		GPC	
		M_n (g/mol)	M_n (g/mol)	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)
macro-RAFT ₁	9.780	16.110	13.650	15.180	1,11
macro-RAFT ₂	9.780	20.070	14.200	15.450	1,09

* Considerando 99% de conversão.

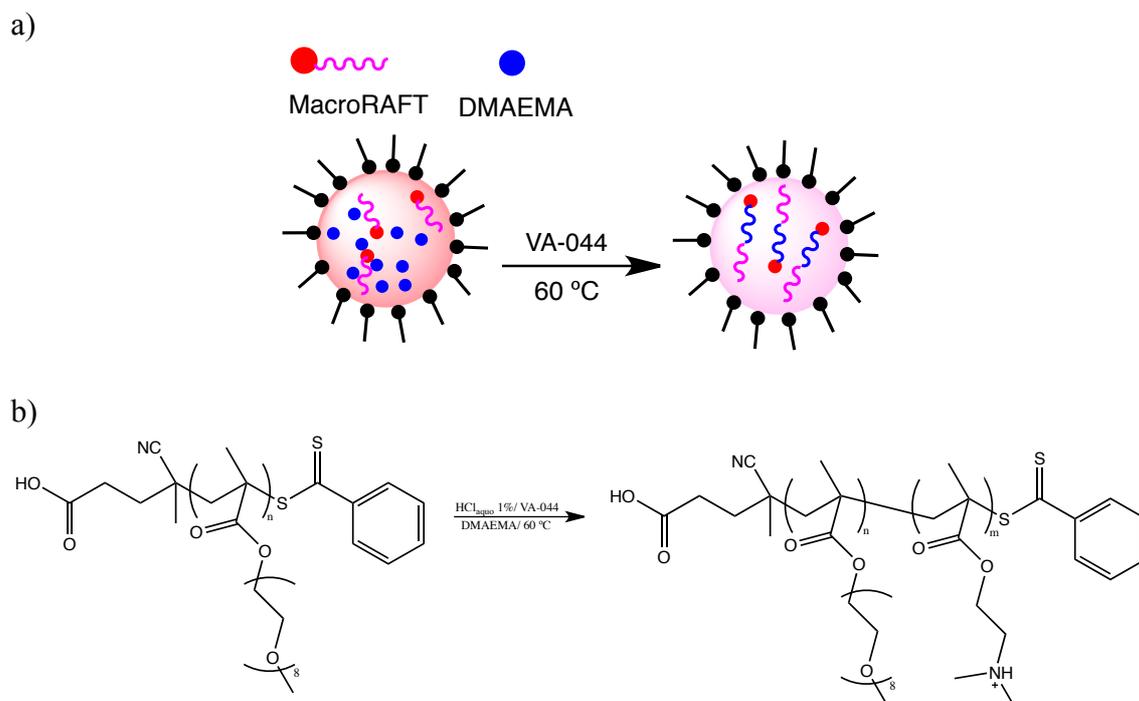


Figura 4.29 – Esquema da polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA. a) esquematização geral da reação nas gotas da miniemulsão; b) reação química.

Na Figura 4.30 é apresentado um exemplo da miniemulsão inversa obtida utilizando o agente macro-RAFT. Por causa da forte coloração do composto RAFT, a simples análise visual da pré-mistura formada (antes da etapa de ultrasonificação) confirma que a estratégia de “extensão de cadeia” com um monômero à base de poli(etileno glicol) de fato conferiu uma maior hidrossolubilidade ao agente RAFT. Desta forma, pouca ou nenhuma migração do agente macro-RAFT para a fase contínua do sistema foi observada. Além disso, as *emulsões* produzidas na presença do agente macro-RAFT apresentaram uma maior estabilidade, se comparadas às *emulsões* produzidas sem o agente macro-RAFT (polimerização *convencional*). Esta estabilidade

ficou próxima de sete dias, sendo que apenas após este período, algumas amostras apresentaram coagulação ou a presença de precipitados.

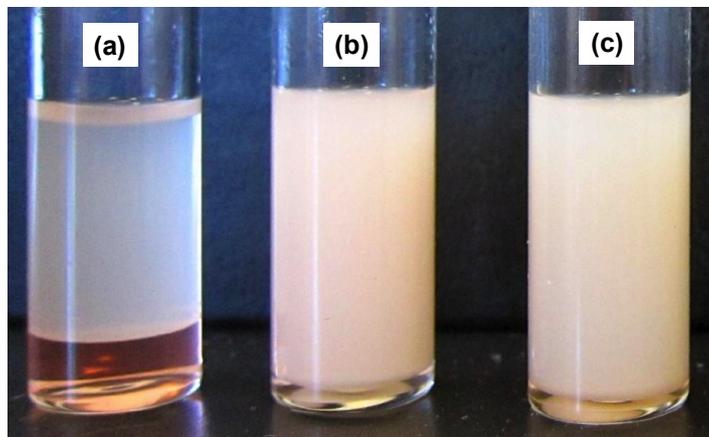


Figura 4.30 – Exemplo de miniemulsão inversa preparada na presença do agente macro-RAFT. a) antes de etapa de ultrasonificação; b) após a etapa de ultrasonificação; b) após 30 minutos de polimerização (~ 36% de conversão).

Assim como observado para as reações de polimerização *convencional*, a polimerização do DMAEMA na presença do agente macro RAFT também apresentou comportamento similar (Figura 4.31), com uma rápida velocidade de polimerização, atingindo conversões próximas a 70% em 60 minutos de reação. A diferença observada para as duas reações foi de que, na polimerização RAFT, foi alcançada quase a completa conversão (> 98%) em 360 minutos de reação. Já na polimerização *convencional*, conversões próximas a 98% só foram alcançadas quando a reação foi estendida para além de 20 horas, conforme discutido anteriormente.

Os dados de distribuição de massas molares para polimerização realizada na presença do agente macro-RAFT (Figura 4.32) demonstra o deslocamento das curvas para valores de maior massa molar à medida que ocorre o aumento da conversão. Este fato é consistente com um processo de polimerização tipo CLRP. Entretanto, as distribuições de massas molares para conversões diferentes de zero apresentam uma

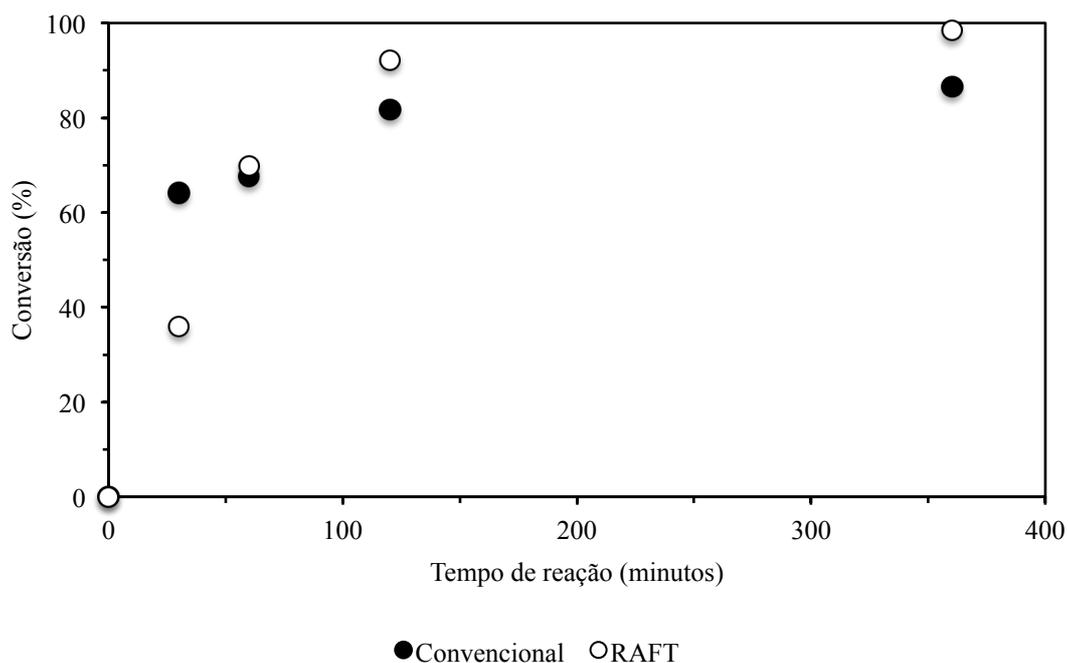


Figura 4.31 – Gráfico de conversão *versus* tempo de reação da polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA. Os dados relativos ao processo *convencional* foram previamente apresentados na Figura 4.21.

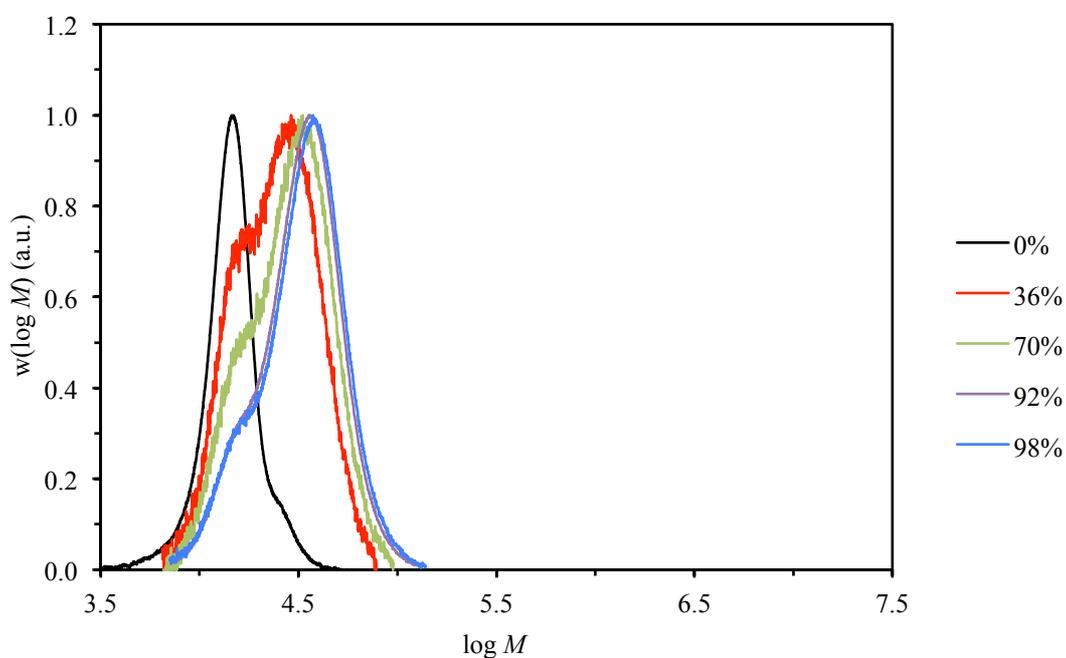


Figura 4.32 – Distribuições de massas molares para as amostras de PDMAEMA obtidas por intermédio da polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA. 0% indica a distribuição de massas molares do agente macro-RAFT.

pequena *inflexão*. Neste caso, essa inflexão pode ser um indicativo de que uma fração do agente macro-RAFT possivelmente não *participou* da reação de polimerização. Este efeito pode ter sido ocasionado por diversos fatores, como a presença de *cadeias mortas* do agente macro-RAFT inicial (cadeias que não continham o agente macro-RAFT como grupo terminal) ou uma característica inerente da própria polimerização heterogênea.

Além do deslocamento das distribuições de massas molares para valores mais elevados, o “controle” de reações do tipo CLRP muitas vezes é avaliada também pelos dados de evolução da massa molar média em função da conversão do monômero. A Figura 4.33 traz os dados da evolução dos valores de massa molar média (M_n) e índice de polidispersão M_w/M_n em função da conversão do DMAEMA, realizada na presença do agente macro-RAFT. Como demonstrado, os valores de M_n crescem linearmente com a conversão, alcançando valores próximos dos valores teóricos calculados. Este fato demonstra que o sistema se comportou de forma “controlada”, uma vez que os dados de M_n são consistentes com as distribuições, ambos demonstrando a evolução das massas molares com a conversão. O “controle” da reação de polimerização RAFT também é ressaltado pelos valores de M_w/M_n ($< 1,3$), indicando a efetiva ação do agente macro-RAFT em promover o crescimento do bloco de PDMAEMA de forma controlada.

Conforme apresentado na Figura 4.33, os valores das massas molares médias para os polímeros sintetizados sem a presença do agente macro-RAFT foram muito superiores, quando comparados aos valores obtidos nas polimerizações feitas na presença do agente macro-RAFT. Embora as distribuições de massas molares dos polímeros sintetizados na presença do agente macro-RAFT tenha apresentado uma aparente larga distribuição, o que não seria condizente com os valores de $M_w/M_n < 1,3$, quando se comparam as distribuições de massas molares para as reações de

polimerização *convencional* e RAFT do DMAEMA (Figura 4.34), é possível verificar que os dados são coerentes. Na polimerização *convencional*, a distribuição larga das curvas são condizentes com valores de M_w/M_n maior do que 2,5 (e maior do que nas reações conduzidas na presença do agente macro-RAFT).

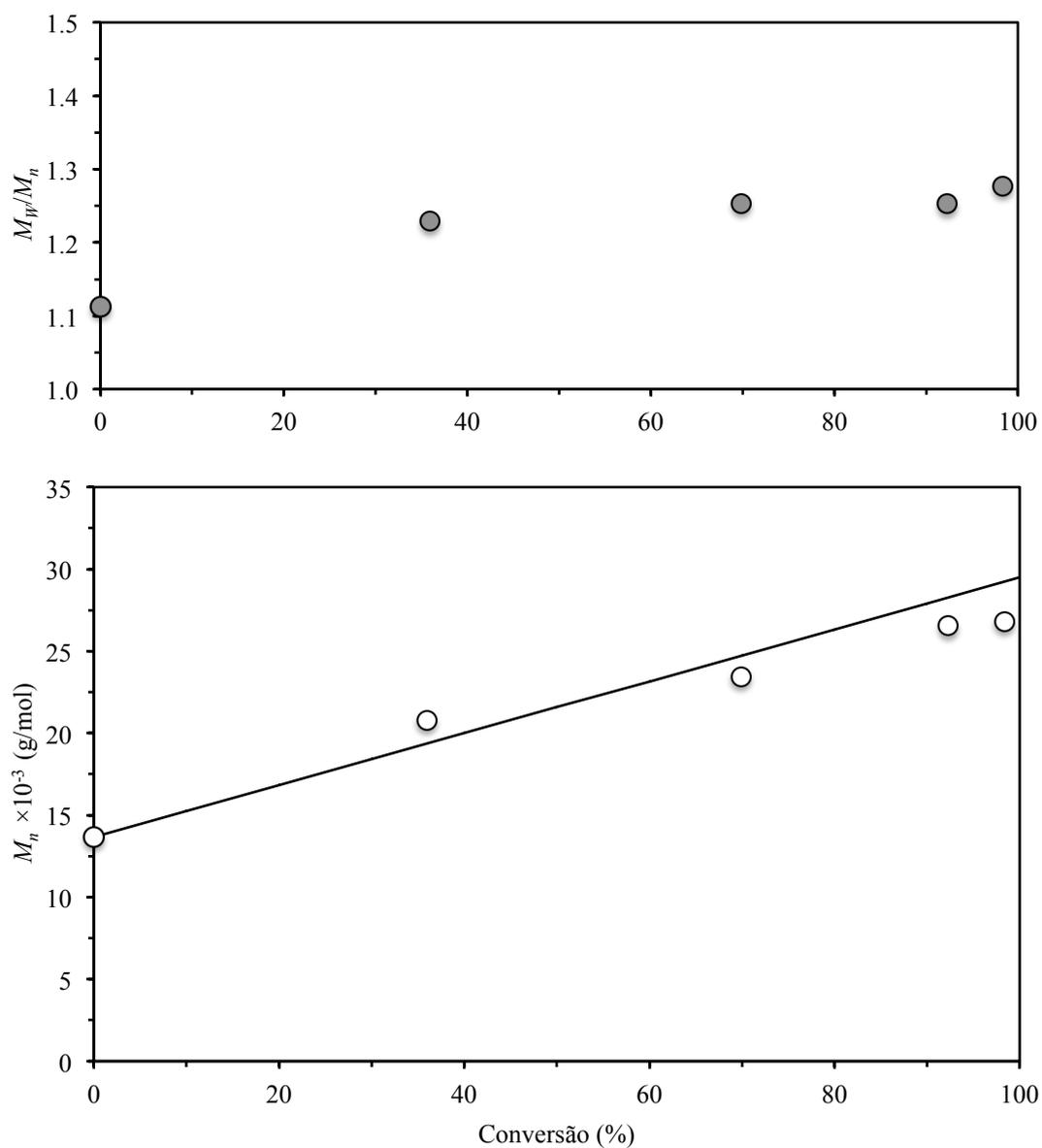


Figura 4.33 – M_w/M_n e M_n em função da conversão para reação de polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA.

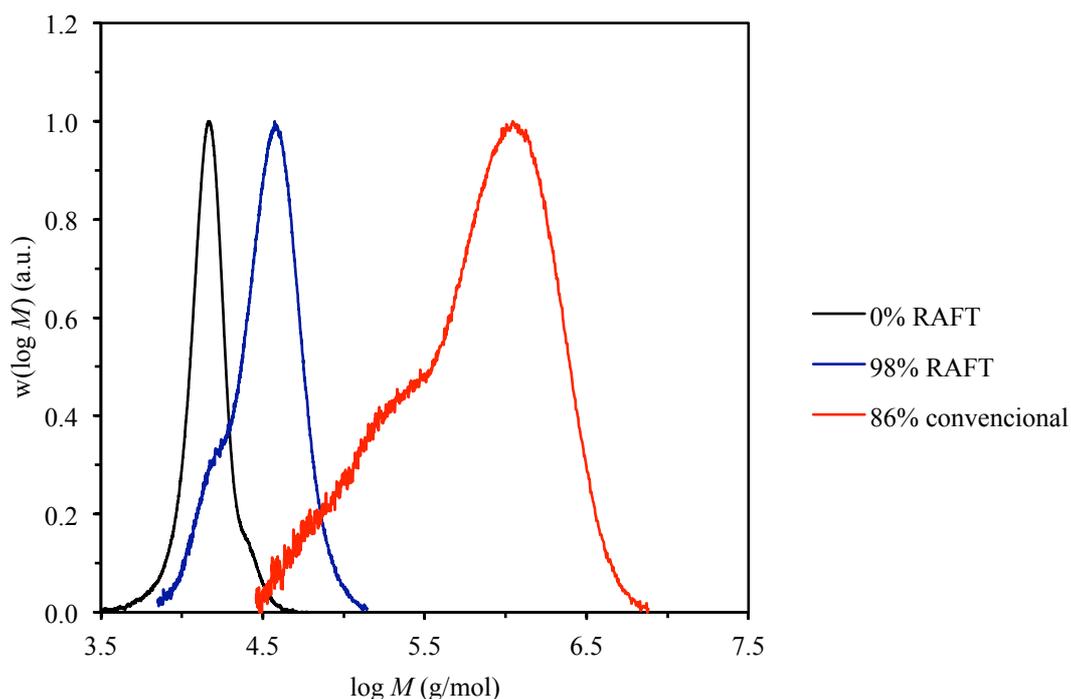


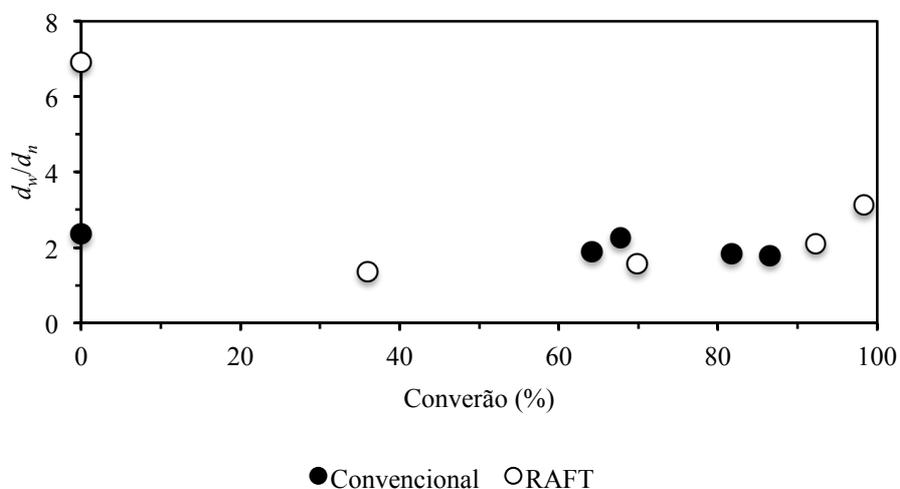
Figura 4.34 – Comparativo das distribuições de massas molares da polimerização convencional e RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA.

Conforme descrito anteriormente, na polimerização *convencional* em miniemulsão inversa do DMAEMA, o tamanho médio das gotas geradas foi de aproximadamente 100 nm, sendo que este valor permaneceu relativamente constante durante todo o processo de polimerização. Para a polimerização RAFT (Figura 4.35), o diâmetro numérico médio foi bastante similar antes da polimerização ($d_n \approx 100$ nm).

Entretanto, com o andamento das reações de polimerização, comportamentos distintos foram observados. Enquanto que nas reações *convencionais* o tamanho médio de partículas permaneceu constante, nas reações realizadas na presença do agente macro-RAFT foi observado um aumento significativo do tamanho de partícula quando a conversão variou entre 0-30%. Quando a conversão atingiu valores superiores a 30%, aparentemente o tamanho médio das partículas permaneceu em um patamar entre 250-290 nm. Este efeito de certa forma era esperado, uma vez que é reportado que manter a

estabilidade coloidal em um sistema CLRP é mais difícil do que em sistemas convencionais. [121, 198] Além disso, a distribuição inicial de tamanhos é muito mais larga no caso da polimerização RAFT, o que favorece efeitos de degradação difusiva de tamanhos. Provavelmente a distribuição inicial de tamanhos é distinta por causa das diferentes viscosidades do meio reacional.

a)



b)

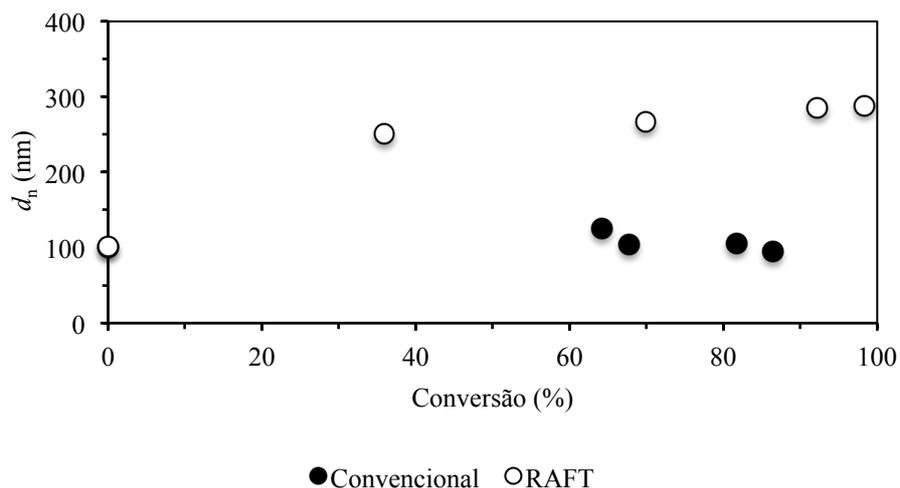


Figura 4.35 – Gráficos de tamanho médio de partícula em função da conversão para a polimerização *convencional* e polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA. a) $d_{\text{volume}}/d_{\text{numérico}}$; b) $d_{\text{numérico}}$. Os dados da polimerização *convencional* foram previamente apresentados na Figura 4.23.

A distribuição de tamanhos por peso em altas conversões (Figura 4.36) revela que uma pequena população de micro-partículas estava presente no sistema RAFT; porém, não foram identificadas no sistema convencional. Os valores de d_w/d_n foram similares para ambos os sistemas durante toda a polimerização, embora o sistema que continha o agente RAFT tenha apresentado uma distribuição de tamanho de gota inicial mais larga do que o sistema convencional.

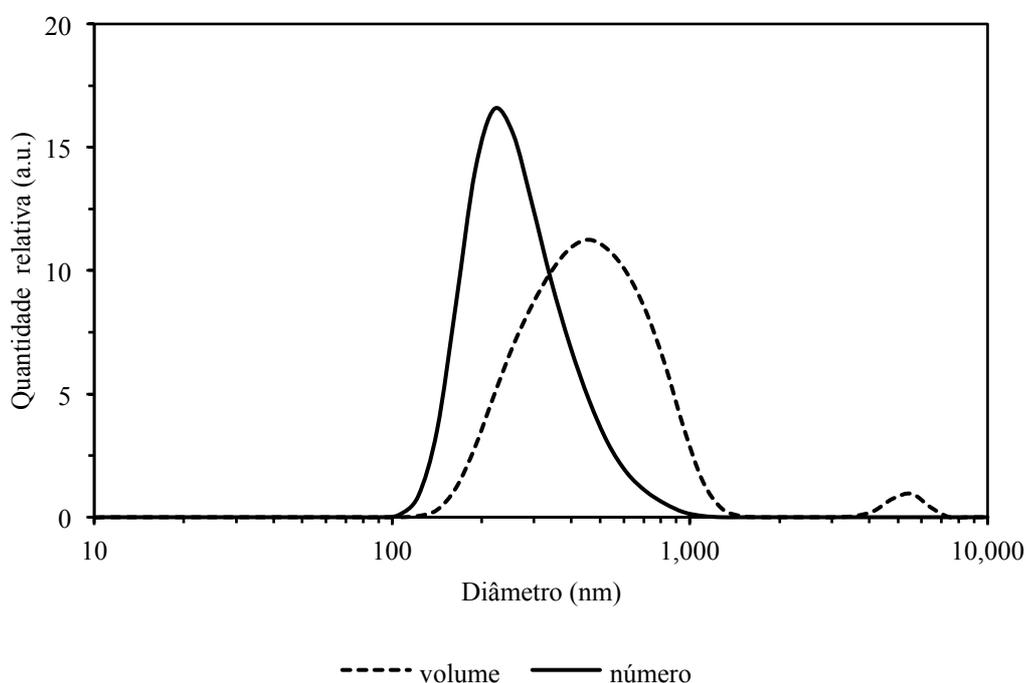


Figura 4.36 – Distribuições de tamanho de partículas para a polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA. Latex da amostra com 92% de conversão.

A confirmação da formação do produto desejado também foi confirmada por ^1H -RMN, conforme espectro apresentado na Figura 4.37. No espectro apresentado, foi possível identificar os principais deslocamentos associados ao agente RAFT original, ao bloco de poli(etileno glicol) e também ao bloco de PDMAEMA adicionado posteriormente nas reações de polimerização. Este resultado é mais um indício da atividade do agente RAFT sintetizado e da realização de uma reação do tipo CLRP.

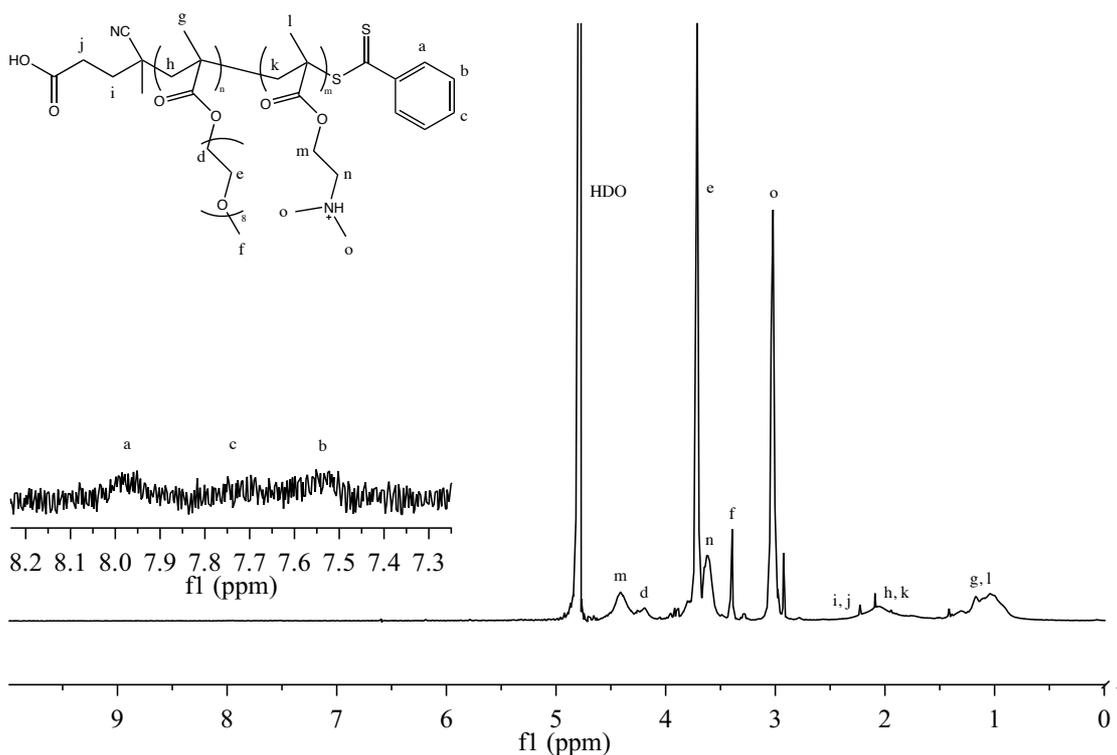


Figura 4.37 – Espectro de ¹H-RMN do PDMAEMA-b-P(OEG-MA) sintetizado através de polimerização em miniemulsão inversa na presença do agente macro-RAFT. Amostra t = 360 minutos; 98% de conversão.

Espectros similares também foram obtidos para as amostras de látex recolhidas durante os processos de amostragem da reação de polimerização RAFT. As maiores diferenças observadas foram relativa às áreas dos picos em $\delta = 3.0$ e $\delta = 3.4$ ppm, relativos aos picos característicos do PDMAEMA e do agente macro-RAFT. Como é esperado, a relação entre esses picos muda com o aumento da conversão do monômero. Desta forma, também é possível utilizar os espectros de RMN para prever a massa molar numérica (M_n) final do copolímero em bloco obtido, como foi feito para os diferentes lotes de agente macro-RAFT produzidos.

Polimerização RAFT com agente reticulante biodegradável

Após observar o comportamento da polimerização *convencional* e RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA, um terceiro tipo de reação foi conduzido: a polimerização RAFT na presença do agente reticulante DMA-PEOSS, conforme esquema apresentado na Figura 4.38.

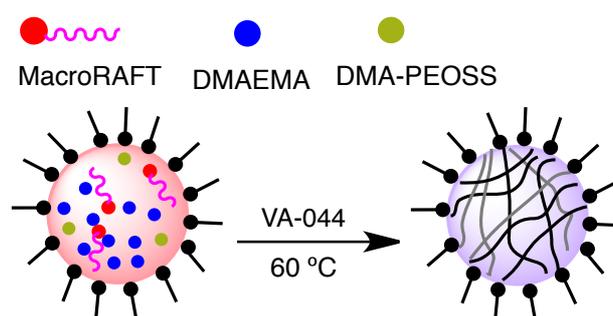


Figura 4.38 – Esquema da polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA na presença do agente reticulante DMA-PEOSS.

Devido à característica da receita de miniemulsão desenvolvida, em que uma grande quantidade de “solvente” continua presente dentro das gotas, o *látex* final gerado após o processo de miniemulsão pode não conter de fato partículas poliméricas. Numa visão mais criteriosa, as cadeias poliméricas sintetizadas estão solubilizadas dentro das gotas da miniemulsão inversa. Desta forma, a obtenção de partículas só pode ser alcançada se um agente reticulante é introduzido no sistema. Neste caso, o DMA-PEOSS pode atuar formando o nano-hidrogel, que na verdade são nanopartículas poliméricas hidrofílicas e reticuladas.

Utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente, partículas reticuladas biodegradáveis foram sintetizadas *via* polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA na presença do agente reticulante DMA-PEOSS. Em termos práticos,

conforme descrito na Tabela 4.1, a diferença entre a polimerização RAFT e esta foi a adição do agente reticulante à receita de miniemulsão inversa.

A taxa de polimerização para esta reação foi bastante similar se comparada com a reação de polimerização RAFT sem a presença do agente reticulante, conforme é mostrada na Figura 4.39.

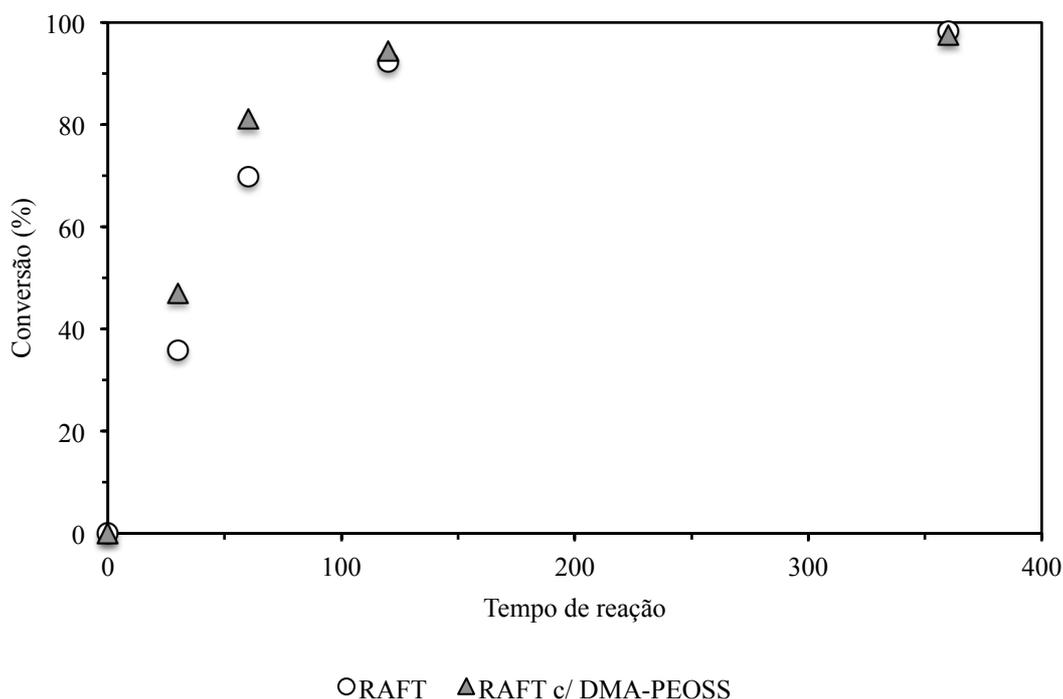
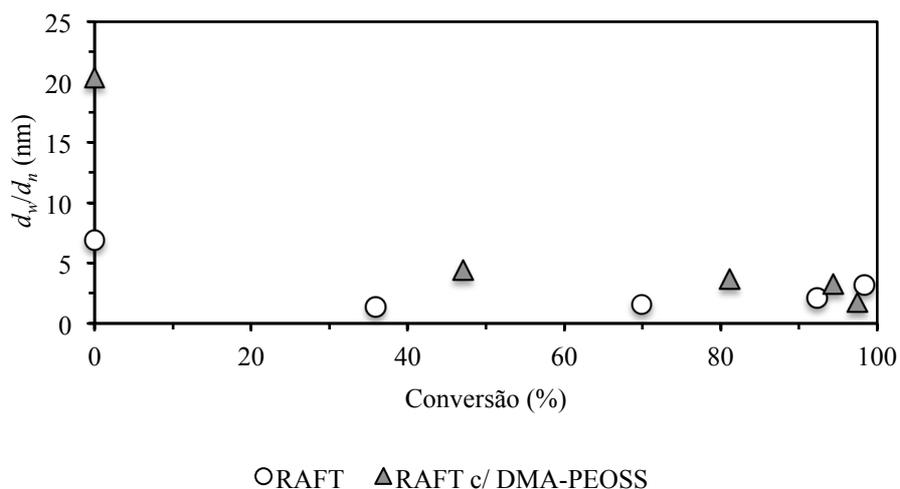


Figura 4.39 – Gráfico de conversão *versus* tempo de reação da polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA, com e sem a presença do agente reticulante DMA-PEOSS. Os dados da cinética RAFT foram previamente apresentados na Figura 4.31.

Em relação aos tamanhos médios de partícula obtidos para as reações realizadas na presença do agente reticulante, o tamanho numérico médio obtido foi menor, em comparação com os tamanhos observados na polimerização conduzida sem o agente RAFT (Figura 4.40). Os dados indicaram que o tamanho médio foi de aproximadamente 200 nm, para conversões entre 30-100%.

a)



b)

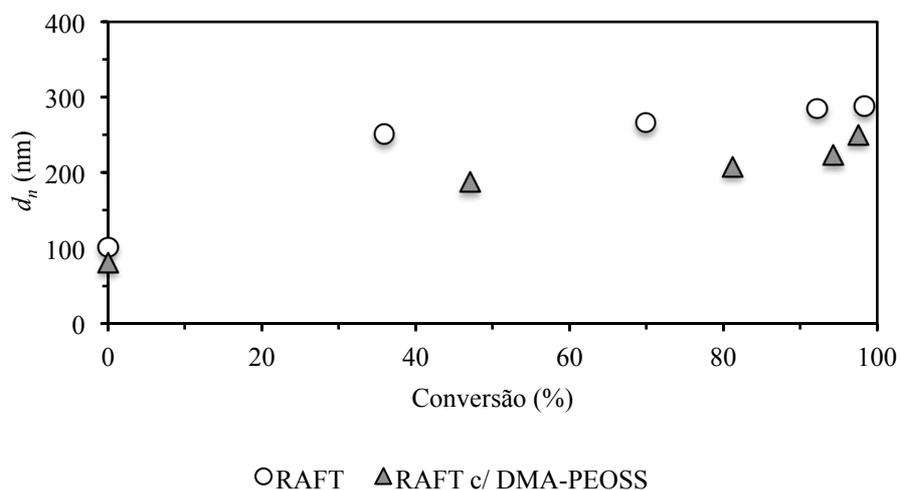


Figura 4.40 – Gráficos de tamanho médio de partícula como função da conversão para a polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA com e sem a presença do agente reticulante DMA-PEOSS. a) $d_{\text{volume}}/d_{\text{numérico}}$; b) $d_{\text{numérico}}$. Os dados da polimerização RAFT foram previamente apresentados na Figura 4.35.

Observa-se entretanto, que a distribuição de tamanhos de partículas apresentou-se significativamente larga, dado este indicado pelos elevados valores iniciais de d_w/d_n (Figura 4.40). Além disso, para as reações de polimerização RAFT realizadas na presença do agente reticulante, foi observada uma grande população de partículas na faixa de micra, conforme dados da Figura 4.41. O aumento dos índices de polidispersão estão provavelmente relacionados ao aumento da viscosidade inicial da fase dispersa.

Os menores tamanhos médios provavelmente se devem ao aumento mais rápido das viscosidades da fase dispersa, que tendem à minimizar os efeitos de difusão degradativa dos tamanhos.

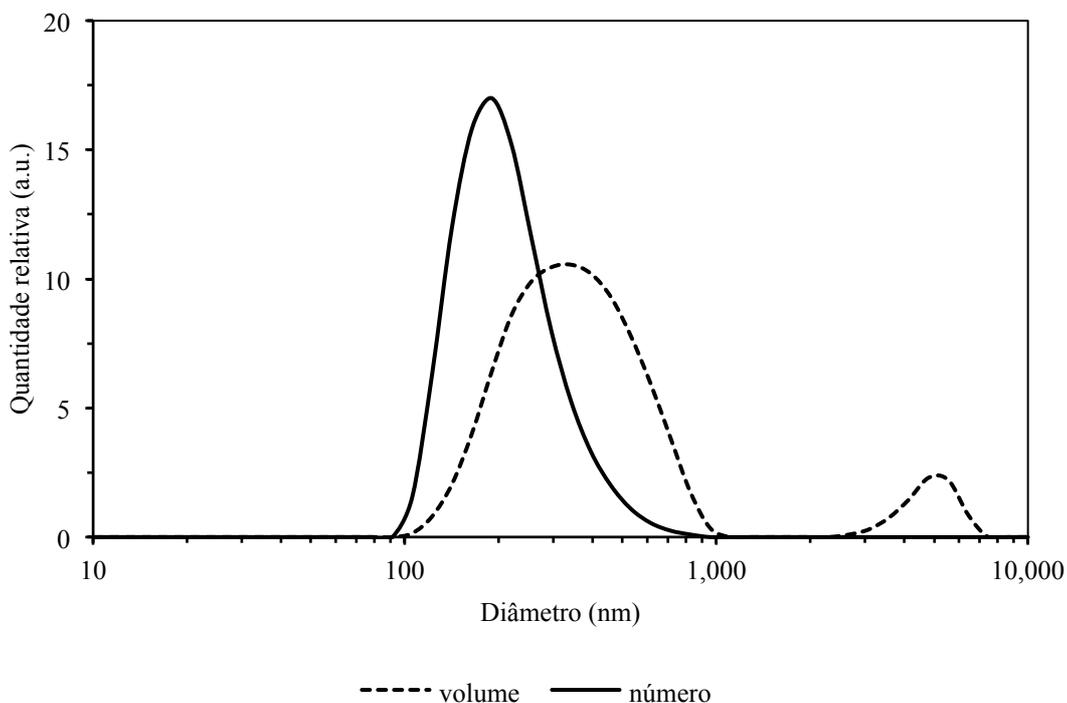


Figura 4.41 – Curva de distribuição de tamanho de partículas para a polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA com a presença do agente reticulante DMA-PEOSS. Latex da amostra com 94% de conversão.

As nanopartículas reticuladas obtidas foram subsequentemente induzidas à reação de oxi-redução com ditiotreitól. Este procedimento tinha o objetivo de reduzir as ligações dissulfeto, gerando cadeias primárias do gel. Idealmente, essas cadeias primárias teriam distribuições de massa molar bastante similar ao do polímero obtido sem a presença do agente reticulante. [169-171, 199] No caso específico, este estudo compara as reações de polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA, com e sem a presença do agente reticulante DMA-PEOSS.

As distribuições de massas molares das cadeias após o processo de degradação do hidrogel (Figura 4.42) revelam uma estreita distribuição monomodal de massa molar que cresce com a conversão do monômero.

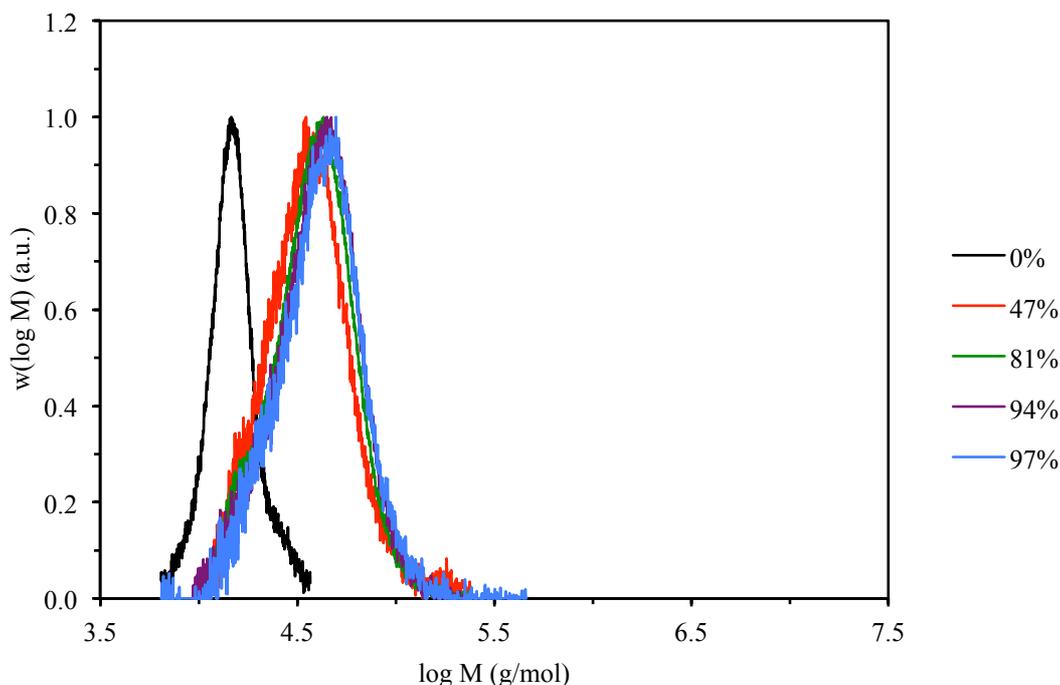


Figura 4.42 – Distribuições de massas molares para as cadeias primárias de PDMAEMA obtidas através da polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA com a presença do agente reticulante DMA-PEOSS. 0% indica distribuições de massa molares do agente macro-RAFT; após redução do gel pela ação do DL-ditiotreitol para quebrar as pontes dissulfeto.

Interessantemente, o pequeno “ombro” de frações de baixa massa molar presente na reação de polimerização RAFT (sem agente reticulante, Figura 4.32) não está presente quando a reação foi conduzida na presença do agente reticulante. Este fato sugere que o pequeno “ombro” de frações de baixa massa molar observados em reações de polimerização RAFT sem a presença do agente reticulante, se deve ao mecanismo heterogêneo da polimerização, não sendo causado necessariamente por cadeias “mortas”

do agente macro-RAFT, conforme hipótese proposta anteriormente. Caso isso fosse verdade, a presença do ombro deveria ser confirmada no hidrogel.

Nas reações de polimerização RAFT realizadas na presença do agente reticulante, observou-se que os valores de massa molar (M_n) das cadeias cresceu com a conversão conforme esperado para este tipo de reação (Figura 4.43). Entretanto, esses valores numéricos foram ligeiramente superiores aos valores teóricos calculados, embora os valores de polidispersão tenham permanecidos baixos ($M_w/M_n < 1,3$), mesmo para as amostras de alta conversão. Isso possivelmente indica que a degradação das ligações de reticulação não é de fato completa.

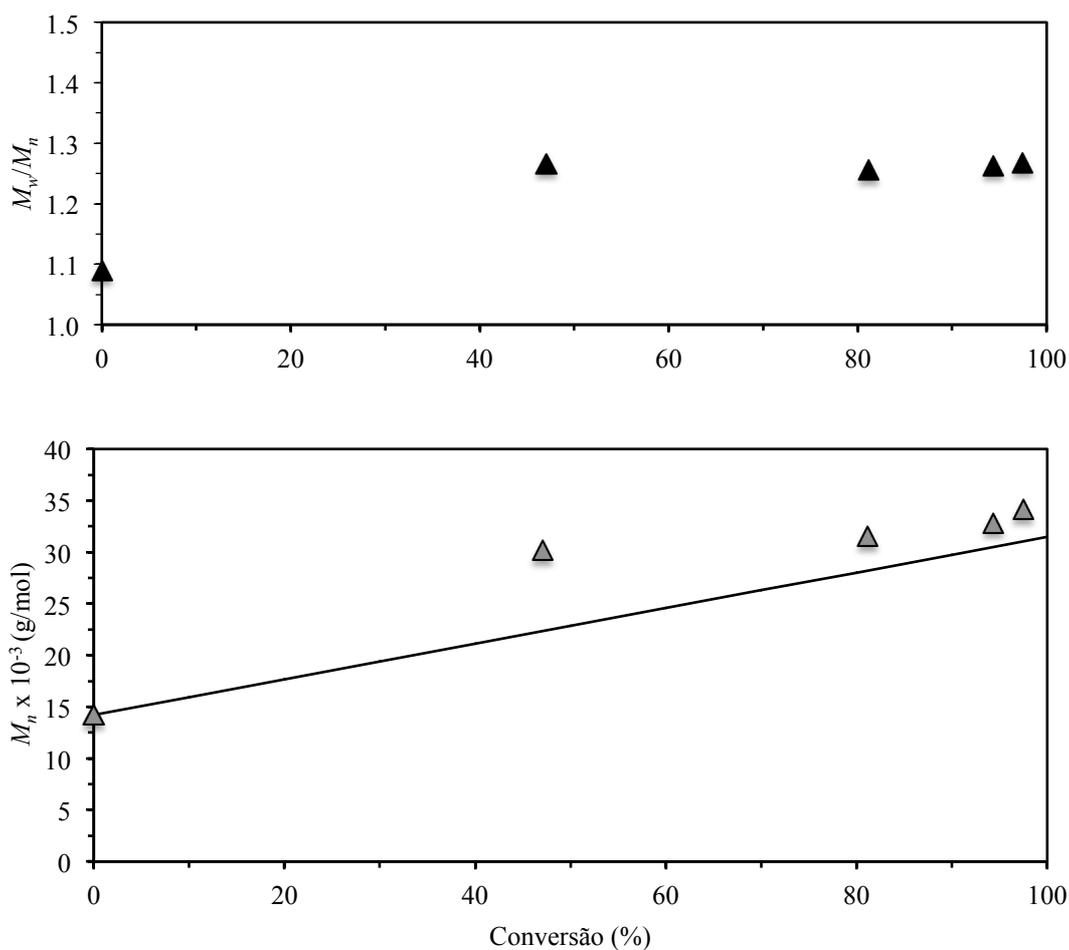


Figura 4.43 – M_w/M_n e M_n em função da conversão para a reação de polimerização RAFT em miniemulsão inversa do DMAEMA com a presença do agente reticulante DMA-PEOSS.

Após serem isoladas e purificadas, as nanopartículas podem ser facilmente redispersas em meio aquoso, onde apresentam um comportamento dependente do pH do meio em que são dispersas. [186] As observações experimentais indicaram uma diminuição do tamanho das partículas com o aumento do pH do meio aquoso em que as nanopartículas foram redispersas (Figura 4.44). O decréscimo de tamanho foi da ordem de 100 nm e pode ser atribuído às menores solubilidades do PDMAEMA em valores elevados de pH.

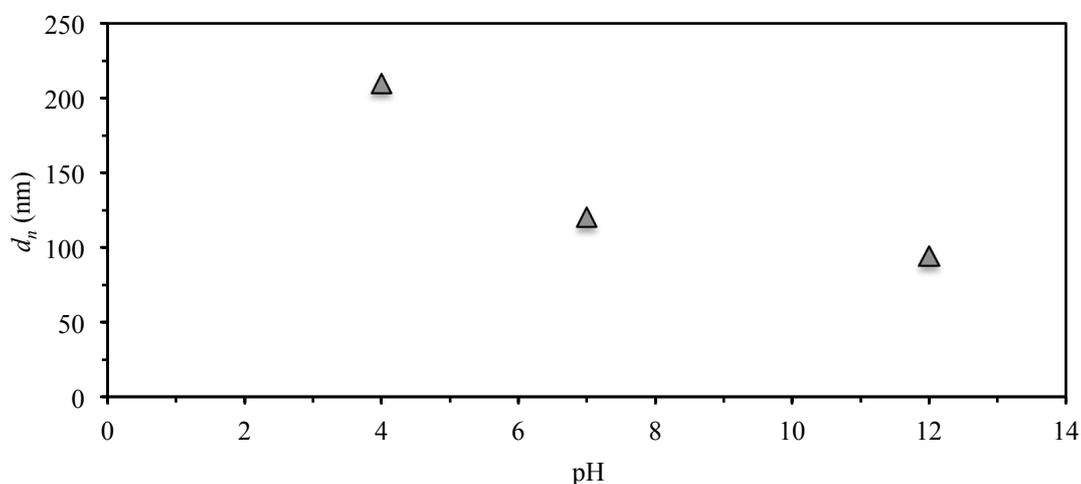


Figura 4.44 – Alteração do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas reticuladas a base de PDMAEMA em função do pH do meio aquoso.

As nanopartículas purificadas também foram avaliadas quanto à presença de carga superficial em pH neutro. Conforme esperado, o potencial zeta das partículas em água (pH \approx 7) foi de +42 mV, indicando a presença de cargas positivas na superfície das partículas. Esta presença de cargas positivas na superfície do nanogel oferece a possibilidade do uso desta matriz como sistema de liberação controlada de genes, uma vez que, em tese, pode-se promover a conjugação deste nanogel com biomoléculas de interesse, como o RNA ou DNA.

4.5 Conclusões

Neste Capítulo foi descrita a síntese de nanopartículas de hidogel biodegradável com auxílio da polimerização em miniemulsão inversa do monômero 2-(dimetilamino) metacrilato de etila (DMAEMA), na presença de um agente RAFT e um agente reticulante específico.

As condições experimentais foram otimizadas para, durante o processo de emulsificação, minimizar a partição do monômero e também do agente RAFT para a fase contínua da miniemulsão inversa. Mais especificamente, a estratégia de acidificação da fase dispersa permitiu a utilização deste monômero em um sistema de polimerização heterogêneo. Além disso, as estratégias adotadas traduziram-se na possibilidade de obter nanopartículas com uma estrutura bem definida.

As análises de massa molar realizadas apontaram para a condução de dois tipos de mecanismos de polimerização. Na ausência de agente RAFT, o sistema se comportou como uma polimerização em miniemulsão via radicais livres *convencional*, caracterizado por elevados valores de massa molar e polidispersão (M_w/M_n). Entretanto, ao incluir o agente RAFT na miniemulsão inversa, o mecanismo observado foi de polimerizações conduzidas segundo um mecanismo *vivo/controlado*. Este fato foi comprovado pela preservação de atividade do agente RAFT, formação de blocos de copolímeros, estreitas distribuições de massas molares, baixo valores de polidispersão (M_w/M_n) e evolução linear da massa molar com a conversão.

A reticulação das partículas foi alcançada usando-se um agente reticulante biodegradável. Além disso, a presença de cargas na superfície conferiu às partículas uma característica bastante desejável, caso estas sejam usadas como sistemas de liberação de biomoléculas.

Capítulo 5

Conclusões

O objetivo geral da Tese apresentada foi o de utilizar sistemas heterogêneos de polimerização para a produção de novos materiais poliméricos, na forma de micropartículas e nanopartículas, para serem usados em aplicações biomédicas.

Em um primeiro momento, o estudo foi direcionado para a síntese de micropartículas poliméricas por meio de reações de polimerização via radicais livres em suspensão. O diferencial da proposta foi a incorporação *in situ* de medicamentos durante a reação de polimerização do acetato de vinila e a copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila. Com base nos dados apresentados, foi possível concluir que a incorporação *in situ* de fármacos multifuncionais durante as reações de polimerização é uma estratégia viável para a obtenção de micropartículas carregadas com medicamento. Entretanto, o tipo de fármaco escolhido, a concentração e a estratégia de incorporação promovem significativas alterações nas propriedades morfológicas e moleculares das micropartículas, além de exercerem influência direta na cinética de polimerização.

Em um segundo momento, foi descrita uma metodologia que possibilitou a produção de nanopartículas poliméricas hidrossolúveis a partir do monômero hidrofílico 2-(dimetilamino) metacrilato de etila. Neste caso, a estratégia de síntese de compostos orgânicos e de formação da emulsão permitiu a obtenção nanopartículas por meio de reações de polimerização via mecanismo de *transferência de cadeia por adição-fragmentação reversível* (RAFT) em miniemulsão inversa. Conforme foi demonstrado, a polimerização ocorreu através de um mecanismo *controlado/vivo*, fato este comprovado pela preservação da atividade dos agentes RAFT sintetizados, pelo formação de blocos de copolímeros, pelas estreitas distribuições de massa molar, por baixos valores de índice de polidispersão (M_w/M_n) e pela evolução linear da massa molar com a conversão. A adição de um agente reticulante à miniemulsão conferiu biodegradabilidade ao nano-hidrogel produzido, que apresentou características desejáveis para serem usadas como plataforma para a liberação de fármacos e biomoléculas.

Sugestões

Embora os resultados apresentados na presente Tese tenham sido conclusivos e suficientes para a elaboração das hipóteses apresentadas, diversos outros aspectos não foram objetos de estudo. Desta forma, as seguintes sugestões para a realização de trabalhos futuros certamente contribuirão para a complementação dos resultados aqui apresentados.

Uma preocupação percebida durante os experimentos foi a retenção de atividade farmacológica dos fármacos incorporados durante as reações de polimerização em suspensão, uma vez que estas reações ocorrem em altas temperaturas e na presença de

radicais livres. Desta forma, testes *in vitro* e *in vivo* são necessários para a comprovação da atividade farmacológica dos fármacos incorporados às matrizes poliméricas. Conforme apresentado no Anexo, testes preliminares foram conduzidos, mas não de maneira conclusiva.

Embora os resultados de liberação apresentados no Capítulo 2 tenham sido suficientes para traçar algumas hipóteses, faz-se necessário realizar testes mais específicos de liberação controlada de fármacos. Conforme foi suposto, o tempo de extração do fármaco (2 horas) provavelmente não foi suficiente para extrair toda amoxicilina adsorvida na matriz polimérica. Desta forma, sugere-se que estes testes sejam realizados por períodos prolongados (de 24 horas ou mais) e baseados em metodologias oficiais de análise, o que certamente contribuirá para traçar um perfil farmacocinético mais específico de liberação do fármaco e também dados mais precisos em relação a eficiência de incorporação do fármaco na matriz polimérica. Uma metodologia para a avaliação da extração do fármaco por períodos prolongados foi proposta e está apresentada no Anexo desta Tese.

Conforme explicado no Capítulo 4, os nanogéis a base de PDMAEMA têm atraído bastante interesse devido a sua interação/uso em sistema de liberação de fármacos e biomoléculas, em especial moléculas de DNA e RNA. Desta forma, sugere-se testar os nanogéis a base de PDMAEMA sintetizados quanto sua capacidade de conjugação e liberação de biomoléculas (DNA e RNA).

A estratégia desenvolvida e apresentada no Capítulo 4 permite que outros monômeros hidrofílicos possam ser usados para a produção de nanogéis. Desta forma, sugere-se que outras estratégias de produção de nanogéis sejam feitas, utilizando diferentes monômeros, agentes reticulantes, agentes RAFT e condições experimentais.

Referências bibliográficas

1. STEVENS, M.P., Polymer Chemistry - An Introduction. 3. ed. New York, Oxford University Press, 1999.
2. LUCAS, E.F., SOARES, B.G., MONTEIRO, E., Caracterização de Polímeros. Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica. 1. ed. Rio de Janeiro, E-Papers, 2001.
3. ODIAN, G., Principles of Polymerization. 4th. ed. New York, 2004.
4. GOOCH, J.W., Encyclopedic Dictionary of Polymers. Atlanta, 2007.
5. HERK, A.M., 2008, "Chemistry and Technology of Emulsion Polymerisation", *Blackwell Publishing*, v., pp. 1-324.
6. BRAUN, D., CHERDRON, H., REHAHN, M. *et al.*, 2005, "Polymer Synthesis: Theory and Practice", pp. 1-401.
7. YOUNG, R.J., LOVELL, P.A., Introduction to Polymers. Second. ed. London, Chapman & Hall, 1991.
8. STRYER, L., Bioquímica. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996.
9. STAUDINGER, H., 1920, "Über Polymerisation", *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, v. 53, n. 6, pp. 1073-1085.
10. MÜLHAUPT, R., 2004, "Hermann Staudinger and the Origin of Macromolecular Chemistry", *Angewandte Chemie International Edition*, v. 43, n. 9, pp. 1054-1063.
11. THARANATHAN, R.N., 2003, "Biodegradable films and composite coatings: past, present and future", *Trends in Food Science & Technology*, v. 14, n. 3, pp. 71-78.

12. PURUSHOTHAM, S., CHANG, P.E.J., RUMPEL, H. *et al.*, 2009, "Thermoresponsive core-shell magnetic nanoparticles for combined modalities of cancer therapy", *Nanotechnology*, v. 20, n. 30
13. RAPOPORT, N., 2007, "Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery", *Progress in Polymer Science*, v. 32, n. 8-9, pp. 962-990.
14. CHIELLINI, E., SUNAMOTO, J., MIGLIARESI, C. *et al.*, 2002, "Biomedical Polymers and Polymer Therapeutics", *Kluwer Academic Publishers*, v., pp. 1-470.
15. OLIVEIRA, M.A.M., MELO, P.A., NELE, M. *et al.*, 2011, "In-Situ Incorporation of Amoxicillin in PVA/PVAc-co-PMMA Particles during Suspension Polymerizations", *Macromolecular Symposia*, v. 299-300, n. 1, pp. 34-40.
16. OLIVEIRA, M.A.M., BOYER, C., NELE, M. *et al.*, 2011, "Synthesis of Biodegradable Hydrogel Nanoparticles for Bioapplications using Inverse Miniemulsion RAFT Polymerization", *Macromolecules*, v. 44, n. 18, pp. 7167-7175.
17. OLIVEIRA, M., MELO, P., NELE, M. *et al.* Incorporação In-Situ de Amoxicilina em Polimerização em Suspensão de Acetato de Vinila. 10º Congresso Brasileiro de Polímeros. Foz do Iguaçu, PR, Brasil2009.
18. KADIR, S., Selected Techniques in Interventional Radiology. London, W.B. Saunders, 1982.
19. KISILEVZKY, N., MARTINS, M., 2003, "Embolização uterina para tratamento de mioma sintomático. Experiência inicial revisão da literatura", *Radiologia Brasileira*, v. 36, n. 3, pp. 129-140.
20. SMITH, S.J., 2000, "Uterine fibroid embolization", *American Family Physician*, v. 61, n. 12, pp. 3601-3614.

21. MENDES, W.D.S., CHAGAS, V.L.A., PINTO, J.C. *et al.*, 2005, "Estudo comparativo da reação inflamatória renal entre álcool de polivinil-flocular e álcool de polivinil+ acetato de polivinil-esférico: estudo experimental", *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 32, n. 3, pp. 120-126.
22. MESSINA, M.D.L., MARTINS, V.M., FRATEZI, A.C. *et al.*, 2001, "Tratamento dos Leiomiomas por Embolização das Artérias Uterinas", *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 23, pp. 597-602.
23. RAVINA, J.H., HERBRETEAU, D., CIRARU-VIGNERON, N. *et al.*, 1995, "Arterial embolisation to treat uterine myomata", *The Lancet*, v. 346, n. 8976, pp. 671-672.
24. BANU, N.S., MANYONDA, I.T., 2004, "Myometrial tumours", *Current Obstetrics & Gynaecology*, v. 14, n. 5, pp. 327-336.
25. FERREIRA, A.B.D.H. Novo Aurélio Século XXI: o dicionário da língua portuguesa. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999.
26. PELAGE, J.P., DREF, O., SOYER, P. *et al.*, 2000, "Fibroid-related Menorrhagia - Treatment with superselective embolization of the uterine arteries and midterm follow-up", *Radiology*, v. 215, pp. 428-431.
27. SPIES, J.B., ASCHER, S.A., ROTH, A.R. *et al.*, 2001, "Uterine artery embolization for leiomyomata", *Obstetrics & Gynecology*, v. 98, n. 1, pp. 29-34.
28. MUKHOPADHAYA, N., SILVA, C., MANYONDA, I.T., 2008, "Conventional myomectomy", *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 22, n. 4, pp. 677-705.
29. PEIXOTO, L. Produção de Partículas Esféricas de PVA/PVAc com Morfologia Casca-Núcleo para uso em Embolização Vascular. (2007). (M.Sc.) - Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

30. TURJMAN, F., MASSOUD, T.F., VINTERS, H.V. *et al.*, 1995, "Collagen microbeads_experimental evaluation of an embolic agent in the rete mirabile of the swine", *American Journal of Neuroradiology*, v. 16, pp. 1031-1036.
31. KUBO, M., KUWAYAMA, N., HIRASHIMA, Y. *et al.*, 2003, "Hydroxyapatite ceramics as a particulate embolic material: Report of the clinical experience", *American Journal of Neuroradiology*, v. 24, n. 8, pp. 1545-1547.
32. BERENSTEIN, A., RUSSELL, E., 1981, "Gelatin sponge in therapeutic neuroradiology: a subject review.", *Radiology*, v. 141, n. 1, pp. 105-112.
33. KATSUMORI, T., NAKAJIMA, K., MIHARA, T. *et al.*, 2002, "Uterine Artery Embolization Using Gelatin Sponge Particles Alone for Symptomatic Uterine Fibroids: Midterm Results", *American Journal of Roentgenology*, v. 178, n. 1, pp. 135-139.
34. LAURENT, A., BEAUJEU, R., WASSEF, M. *et al.*, 1996, "Trisacryl gelatin microspheres for therapeutic embolization, I: development and in vitro evaluation", *American Journal of Neuroradiology*, v. 17, n. 3, pp. 533-540.
35. BEAUJEU, R., LAURENT, A., WASSEF, M. *et al.*, 1996, "Trisacryl gelatin microspheres for therapeutic embolization, II: preliminary clinical evaluation in tumors and arteriovenous malformations", *American Journal of Neuroradiology*, v. 17, n. 3, pp. 541-548.
36. BENDSZUS, M., KLEIN, R., BURGER, R. *et al.*, 2000, "Efficacy of Trisacryl Gelatin Microspheres versus Polyvinyl Alcohol Particles in the Preoperative Embolization of Meningiomas", *American Journal of Neuroradiology*, v. 21, pp. 255-261.
37. BASILE, A., RAND, T., LOMOSCHITZ, F. *et al.*, 2004, "Trisacryl gelatin microspheres versus polyvinyl alcohol particles in the preoperative embolization of

- bone Neoplasms", *CardioVascular and Interventional Radiology*, v. 27, n. 5, pp. 495-502.
38. CHUA, G.C., WILSHER, M., YOUNG, M.P.A. *et al.*, 2005, "Comparison of particle penetration with non-spherical polyvinyl alcohol versus trisacryl gelatin microspheres in women undergoing premyomectomy uterine artery embolization", *Clinical Radiology*, v. 60, n. 1, pp. 116-122.
39. WORTHINGTON-KIRSCH, R.L., FUEREDI, G.A., GOODWIN, S.C. *et al.*, 2001, "Polyvinyl alcohol particle size for uterine artery embolization", *Radiology*, v. 218, n. 2, pp. 605.
40. KANG, M.J., PARK, J.M., CHOI, W.S. *et al.*, 2010, "Highly spherical and deformable chitosan microspheres for arterial embolization", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 58, n. 3, pp. 288-292.
41. KATSANOS, K., SABHARWAL, T., AHMAD, F. *et al.*, 2009, "Onyx embolization of sporadic angiomyolipoma", *CardioVascular and Interventional Radiology*, v. 32, n. 6, pp. 1291-1295.
42. MACHADO, F., LIMA, E.L., PINTO, J.C., 2007, "Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão", *Polímeros*, v. 17, n. 2, pp. 166-179.
43. YUAN, H.G., KALFAS, G., RAY, W.H., 1991, "Suspension Polymerization - A Review", *Journal of Macromolecular Science - Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics*, v. C31, pp. 215-299.
44. JAHANZAD, F., SAJJADI, S., BROOKS, B.W., 2005, "Characteristic intervals in suspension polymerisation reactors: An experimental and modelling study", *Chemical Engineering Science*, v. 60, n. 20, pp. 5574-5589.

45. _____, 2005, "Comparative study of particle size in suspension polymerization and corresponding monomer-water dispersion", *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 44, n. 11, pp. 4112-4119.
46. MELO, C.K. Reciclagem de Materiais Poliméricos por Incorporação In Situ na Polimerização em Suspensão de Estireno. (2009). (M.Sc.) - Programa de Engenharia Química/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
47. LAZRAK, N., LE BOLAY, N., RICARD, A., 1998, "Droplet stabilization in high holdup fraction suspension polymerization reactors", *European Polymer Journal*, v. 34, n. 11, pp. 1637-1647.
48. BIKALES, N.M., *Encyclopedia of Polymer Science and Technology: plastics, resins, rubbers, fibers*. New York, John Wiley & Sons, 1971.
49. FINCH, C.A., *Polyvinyl Alcohol - Properties and Applications*. Bristol, John Wiley & Sons, 1973.
50. ADELMAN, R.L., 1953, "The Reactions of Vinyl Acetate with Aliphatic Hydroxy Compounds. A New Synthesis of Vinyl Ethers¹", *Journal of the American Chemical Society*, v. 75, n. 11, pp. 2678-2682.
51. SAKURADA, I., *Polyvinyl Alcohol Fibers*. 1. ed. New York, Marcel Dekker, Inc, 1985.
52. PEIXOTO, L.S., SILVA, F.M., NIEMEYER, M.A.L. *et al.*, 2006, "Synthesis of Poly (Vinyl Alcohol) and/or Poly (Vinyl Acetate) particles with spherical morphology and core-shell structure and its use in vascular embolization", *Macromolecular Symposia*, v. 243, n. 1, pp. 190-199.
53. PINTO, J.C., ESPINOSA, G., LIMERIRA, M.A.N. *et al.* Process for the synthesis of Poly(vinyl alcohol) and/or poly(vinyl acetate) with spherical morphology and

- shell-and-nucleus structure and its use in vascular embolization. n. WO 2006/050591 A2, 18/05/2006 2006.
54. ESPINOSA, G., SILVA, L.F., FERNANDES, A.L. *et al.*, 2006, "Embolização intra-arterial pré-operatória de tumor do corpo carotídeo", *J. vasc. bras*, v. 5, n. 3, pp. 237-241.
55. ESPINOSA, G., MIRANDA, L.C.D., MATIAS, V.A.D.C. *et al.*, 2008, "Embolização pré-operatória de tumores renais com microparticulas esféricas de tecnologia nacional. (Spherus-First line Brasil)", *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 35, pp. 51-55.
56. BILBAO, J.I., LUIS, E., JALÓN, J.A.G. *et al.*, 2008, "Comparative study of four different spherical embolic particles in an animal model: a morphologic and histologic evaluation", *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, v. 19, n. 11, pp. 1625-1638.
57. TAKAHASHI, T., 2002, "Development and clinical application of drug delivery systems for cancer treatment", *International Journal of Clinical Oncology*, v. 7, n. 4, pp. 206-218.
58. LIAPI, E., LEE, K., GEORGIADES, C.C. *et al.*, 2008, "Drug-eluting particles for interventional pharmacology", *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*, v. 10, pp. 261-269.
59. CAVALLARO, G., FRESTA, M., GIAMMONA, G. *et al.*, 1994, "Entrapment of [beta]-lactams antibiotics in polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Studies on the possible in vivo application of this colloidal delivery system", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 111, n. 1, pp. 31-41.

60. BRANNON-PEPPAS, L., 1995, "Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 116, n. 1, pp. 1-9.
61. FRESTA, M., CAVALLARO, G., GIAMMONA, G. *et al.*, 1996, "Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs", *Biomaterials*, v. 17, n. 8, pp. 751-758.
62. FONTANA, G., LICCIARDI, M., MANSUETO, S. *et al.*, 2001, "Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake", *Biomaterials*, v. 22, n. 21, pp. 2857-2865.
63. FONTANA, G., PITARRESI, G., TOMARCHIO, V. *et al.*, 1998, "Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles", *Biomaterials*, v. 19, n. 11-12, pp. 1009-1017.
64. ICONOMOPOULOU, S.M., ANDREOPOULOU, A.K., SOTO, A. *et al.*, 2005, "Incorporation of low molecular weight biocides into polystyrene-divinyl benzene beads with controlled release characteristics", *Journal of Controlled Release*, v. 102, n. 1, pp. 223-233.
65. CHOI, S.W., KIM, J.H., 2007, "Design of surface-modified poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone", *Journal of Controlled Release*, v. 122, n. 1, pp. 24-30.
66. VOLTAN, R., CASTALDELLO, A., BROCCA-COFANO, E. *et al.*, 2007, "Preparation and characterization of innovative protein-coated poly (methylmethacrylate) core-shell nanoparticles for vaccine purposes", *Pharmaceutical Research*, v. 24, n. 10, pp. 1870-1882.

67. ITO, F., FUJIMORI, H., HONNAMI, H. *et al.*, 2008, "Effect of polyethylene glycol on preparation of rifampicin-loaded PLGA microspheres with membrane emulsification technique", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 66, n. 1, pp. 65-70.
68. UHRICH, K.E., CANNIZZARO, S.M., LANGER, R.S. *et al.*, 1999, "Polymeric systems for controlled drug release", *Chemical Reviews*, v. 99, n. 11, pp. 3181-3198.
69. PILLAI, O., PANCHAGNULA, R., 2001, "Polymers in drug delivery", *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5, n. 4, pp. 447-451.
70. WON, C.-Y., CHU, C.-C., YU, T.-J., 1996, "Novel amine-containing biodegradable polyester via copolymerization of aspartic anhydride and 1,4-cyclohexanedimethanol", *Macromolecular Rapid Communications*, v. 17, n. 9, pp. 653-659.
71. HENRY-MICHELLAND, S., ALONSO, M.J., ANDREMONT, A. *et al.*, 1987, "Attachment of antibiotics to nanoparticles: preparation, drug-release and antimicrobial activity in vitro", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 35, n. 1-2, pp. 121-127.
72. COUVREUR, P., FATTAL, E., ALPHANDARY, H. *et al.*, 1992, "Intracellular targeting of antibiotics by means of biodegradable nanoparticles", *Journal of Controlled Release*, v. 19, n. 1-3, pp. 259-268.
73. SOMA, C.L., DUBERNET, C., BENTOLILA, D. *et al.*, 2000, "Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles", *Biomaterials*, v. 21, n. 1, pp. 1-7.

74. PARK, S.J., KIM, K.S., 2005, "Influence of hydrophobe on the release behavior of vinyl acetate miniemulsion polymerization", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 46, n. 1, pp. 52-56.
75. LEWIS, A.L., GONZALEZ, M., LLOYD, A.W. *et al.*, 2006, "DC bead: in vitro characterization of a drug-delivery device for transarterial chemoembolization", *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, v. 17, n. 2, pp. 335-342.
76. FRESTA, M., PUGLISI, G., GIAMMONA, G. *et al.*, 1995, "Pefloxacin mesilate- and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: characterization of the colloidal drug carrier formulation", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 84, n. 7, pp. 895-902.
77. MADER, J.T., CALHOUN, J., COBOS, J., 1997, "In vitro evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, n. 2, pp. 415-418.
78. EYOL, E., BOLEIJ, A., TAYLOR, R.R. *et al.*, 2008, "Chemoembolisation of rat colorectal liver metastases with drug eluting beads loaded with irinotecan or doxorubicin", *Clinical and Experimental Metastasis*, v. 25, n. 3, pp. 273-282.
79. REVERCHON, E., CARDEA, S., RAPPO, E.S., 2006, "Production of loaded PMMA structures using the supercritical CO₂ phase inversion process", *Journal of Membrane Science*, v. 273, n. 1-2, pp. 97-105.
80. SANTOS-MAGALHÃES, N.S., PONTES, A., PEREIRA, V.M.W. *et al.*, 2000, "Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 208, n. 1-2, pp. 71-80.

81. ZUCCARI, G., CAROSIO, R., FINI, A. *et al.*, 2005, "Modified polyvinylalcohol for encapsulation of all-trans-retinoic acid in polymeric micelles", *Journal of Controlled Release*, v. 103, n. 2, pp. 369-380.
82. SCHLICHER, E.J.A.M., POSTMA, N.S., ZUIDEMA, J. *et al.*, 1997, "Preparation and characterisation of Poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres containing desferrioxamine", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 153, n. 2, pp. 235-245.
83. ARIAS, J.L., LINARES-MOLINERO, F., GALLARDO, V. *et al.*, 2008, "Study of carbonyl iron/poly (butylcyanoacrylate)(core/shell) particles as anticancer drug delivery systems:: Loading and release properties", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 33, n. 3, pp. 252-261.
84. TUROS, E., REDDY, G.S.K., GREENHALGH, K. *et al.*, 2007, "Penicillin-bound polyacrylate nanoparticles: Restoring the activity of [beta]-lactam antibiotics against MRSA", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 17, n. 12, pp. 3468-3472.
85. TUROS, E., SHIM, J.Y., WANG, Y. *et al.*, 2007, "Antibiotic-conjugated polyacrylate nanoparticles: New opportunities for development of anti-MRSA agents", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 17, n. 1, pp. 53-56.
86. CAO, Z., SUN, Y., 2009, "Polymeric N-Halamine Latex Emulsions for Use in Antimicrobial Paints", *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 1, n. 2, pp. 494-504.
87. DI STEFANO, R., SCOPELLITI, M., PELLERITO, C. *et al.*, 2002, "Organometallic complexes with biological molecules:: XVII. Triorganotin (IV) complexes with amoxicillin and ampicillin", *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 89, n. 3-4, pp. 279-292.
88. BRANDOLINI, A.J., HILLS, D.D., NMR Spectra of Polymers and Polymer Additives. New York, Marcel Dekker, 2000.

89. RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., *Farmacologia*. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.
90. HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., GILMAN, A.G., *Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2003.
91. O'NEIL, M.J.E., *The Merck Index Merck: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 14. ed. New Jersey, Merck, 2006.
92. LEE, S.G., KIM, J.P., KWON, I.C. *et al.*, 2006, "Heterogeneous surface saponification of suspension-polymerized monodisperse poly (vinyl acetate) microspheres using various ions", *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, v. 44, n. 11, pp. 3567-3576.
93. PINTO, J.C., RAY, W.H., 1995, "The dynamic behavior of continuous solution polymerization reactors--VII. Experimental study of a copolymerization reactor", *Chemical Engineering Science*, v. 50, n. 4, pp. 715-736.
94. BOYER, C., BULMUS, V., DAVIS, T.P. *et al.*, 2009, "Bioapplications of RAFT Polymerization", *Chemical Reviews*, v. 109, n. 11, pp. 5402-5436.
95. DIXON, K.W. Decomposition rates of Organic Free Radical Initiators. In: J. BRANDRUP, *et al.* (Ed.). *Polymer Handbook*. New York: Wiley, 1999. p. p. II/12.
96. ACHILIAS, D.S., KIPARISSIDES, C., 1992, "Development of a general mathematical framework for modeling diffusion-controlled free-radical polymerization reactions", *Macromolecules*, v. 25, pp. 3739-3750.
97. KATO, T., NEMOTO, R., MORI, H. *et al.*, 1980, "Sustained-release properties of microencapsulated mitomycin C with ethylcellulose infused into the renal artery of the dog", *Cancer*, v. 46, n. 1, pp. 14-21.

98. KATO, T., NEMOTO, R., MORI, H. *et al.*, 1981, "Arterial chemoembolization with mitomycin C microcapsules in the treatment of primary or secondary carcinoma of the kidney, liver, bone and intrapelvic organs", *Cancer*, v. 48, n. 3, pp. 674-680.
99. WALLACE, S., CHARNSANGAVEJ, C., CARRASCO, C. *et al.*, 1984, "Infusion-embolization", *Cancer*, v. 54, pp. 2751-2765.
100. WU, H., ZHANG, Z., WU, D. *et al.*, 2005, "Preparation and drug release characteristics of pingyangmycin-loaded dextran cross-linked gelatin microspheres for embolization therapy", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 78, n. 1, pp. 56-62.
101. GONZALEZ, M.V., TANG, Y., PHILLIPS, G.J. *et al.*, 2008, "Doxorubicin eluting beads—2: methods for evaluating drug elution and in-vitro: in-vivo correlation", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, n. 2, pp. 767-775.
102. LEWIS, A.L., GONZALEZ, M.V., LEPPARD, S.W. *et al.*, 2007, "Doxorubicin eluting beads— 1: Effects of drug loading on bead characteristics and drug distribution", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 18, n. 9, pp. 1691-1699.
103. TAYLOR, R.R., TANG, Y., GONZALEZ, M.V. *et al.*, 2007, "Irinotecan drug eluting beads for use in chemoembolization: in vitro and in vivo evaluation of drug release properties", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 30, n. 1, pp. 7-14.
104. GRAHAM, M.L., 2003, "Pegaspargase: a review of clinical studies", *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 55, n. 10, pp. 1293-1302.

105. ABUD, A.K.S. Estudo do Controle de Qualidade do Processo de Produção de L-asparaginase por *Zymomonas Mobilis*. (2005). (D.Sc) - Programa de Engenharia Química/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
106. STECHER, A.L., DEUS, P.M., POLIKARPOV, I. *et al.*, 1999, "Stability of asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment", *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 74, n. 1, pp. 1-9.
107. MÜLLER, H.J., BOOS, J., 1998, "Use of L-asparaginase in childhood ALL.", *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 28, n. 2, pp. 97-113.
108. SOARES, A.L., GUIMARÃES, G.M., POLAKIEWICZ, B. *et al.*, 2002, "Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 237, n. 1-2, pp. 163-170.
109. PINTO, J.C., ALVES, T.L.M., ABUD, A.K.S. Processo de Produção de Asparaginase pela Bactéria *Zymomonas mobilis* e Uso do Caldo Fermentativo e/ou da Enzima Purificada no Tratamento de Doenças. Brasil n. PI0404994-2, 2004.
110. DUNN, C.J., GOA, K.L., 1999, "Tranexamic acid: a review of its use in surgery and other indications", *Drugs*, v. 57, n. 6, pp. 1005-1032.
111. CAGLAR, G.S., TASCI, Y., KAYIKCIOGLU, F. *et al.*, 2008, "Intravenous tranexamic acid use in myomectomy: A prospective randomized double-blind placebo controlled study", *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 137, n. 2, pp. 227-231.
112. TAPARIA, M., CORDINGLEY, F.T., LEAHY, M.F., 2002, "Pulmonary embolism associated with tranexamic acid in severe acquired haemophilia", *European journal of haematology*, v. 68, n. 5, pp. 307-309.

113. PEREIRA, J., PHAN, T., 2004, "Management of bleeding in patients with advanced cancer", *The Oncologist*, v. 9, n. 5, pp. 561-570.
114. WELLINGTON, K., WAGSTAFF, A.J., 2003, "Tranexamic acid: a review of its use in the management of menorrhagia", *Drugs*, v. 63, n. 13, pp. 1417-1433.
115. LIU, D.M., KOS, S., BUCZKOWSKI, A. *et al.*, 2011, "Optimization of Doxorubicin Loading for Superabsorbent Polymer Microspheres: in vitro Analysis", *CardioVascular and Interventional Radiology*, v., pp. 1-8.
116. VARELA, M., REAL, M.I., BURREL, M. *et al.*, 2007, "Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: Efficacy and doxorubicin pharmacokinetics", *Journal of Hepatology*, v. 46, n. 3, pp. 474-481.
117. LLOVET, J.M., BURROUGHS, A., BRUIX, J., 2003, "Hepatocellular carcinoma", *The Lancet*, v. 362, n. 9399, pp. 1907-1917.
118. TRITTON, T.R., 1991, "Cell surface actions of adriamycin", *Pharmacology and Therapeutics*, v. 49, n. 3, pp. 293-309.
119. MOAD, G., RIZZARDO, E., THANG, S.H., 2005, "Living Radical Polymerization by RAFT Process", *Australian Journal of Chemistry*, v. 58, n. 6, pp. 379-410.
120. GOTO, A., FUKUDA, T., 2004, "Kinetics of living radical polymerization", *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 29, n. 4, pp. 329-385.
121. ZETTERLUND, P.B., KAGAWA, Y., OKUBO, M., 2008, "Controlled/living radical polymerization in dispersed systems", *Chemical Reviews*, v. 108, n. 9, pp. 3747-3794.
122. SZWARC, M., LEVY, M., MILKOVICH, R., 1956, "Polymerization Initiated by Electron Transfer to Monomer - A New Method of Formation of Block Polymers", *Journal of the American Chemical Society*, v. 78, pp. 2656-2657.

123. FISCHER, H. In: K. MATYJASZEWSKI (Ed.). *Advances in Controlled/Living Radical Polymerization*. Washington, D.C.: American Chemical Society, 2003. p. 704. (ACS Symposium Series 854).
124. BARNER-KOWOLLIK, C., *Handbook of RAFT Polymerization*. Sydney, Wiley-VCH, 2008.
125. BOYER, C., STENZEL, M.H., DAVIS, T.P., 2011, "Building nanostructures using RAFT polymerization", *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, v. 49, n. 3, pp. 551-595.
126. CHIEFARI, J., CHONG, Y.K., ERCOLE, F. *et al.*, 1998, "Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer - The RAFT Process", *Macromolecules*, v. 31, pp. 5559-5562.
127. CHIEFARI, J., CHONG, Y.K., ERCOLE, F. *et al.*, 1998, "Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: The RAFT process", *Macromolecules*, v. 31, pp. 5559-5562.
128. CHARMOT, D., CORPART, P., ADAM, H. *et al.*, 2000, "Controlled radical polymerization in dispersed media", *Macromolecular Symposia*, v. 150, pp. 23-32.
129. MOAD, G., RIZZARDO, E., THANG, S.H., 2006, "Living Radical Polymerization by the RAFT Process—A First Update", *Australian Journal of Chemistry*, v. 59, n. 10, pp. 669-692.
130. MOAD, G., RIZZARDO, E., THANG, S.H., 2009, "Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A Second Update", *Australian Journal of Chemistry*, v. 62, n. 11, pp. 1402-1472.
131. QUINN, J.F., DAVIS, T.P., BARNER, L. *et al.*, 2007, "The application of ionizing radiation in reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT)

- polymerization: Renaissance of a key synthetic and kinetic tool", *Polymer*, v. 48, n. 22, pp. 6467-6480.
132. BIASUTTI, J.D., DAVIS, T.P., LUCIEN, F.P. *et al.*, 2005, "Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization of methyl methacrylate in suspension", *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, v. 43, n. 10, pp. 2001-2012.
133. KANAGASABAPATH, S., CLAVERIE, J., UVILINA, I., 1999, "Synthesis of well defined triblock copolymer by reversible addition fragmentation chain transfer (raft) polymerization in emulsion", *American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry*, v. 40, n. 2, pp. 1080-1081.
134. GEORGOUSSIS, G., NIKONOROVA, N.A., BARMATOV, E.B. *et al.*, 2000, "Living free radical polymerization with reversible addition-fragmentation chain transfer (the life of RAFT)", *Polymer International*, v. 49, n. 9, pp. 993-1001.
135. QI, G., JONES, C.W., SCHORK, F.J., 2007, "RAFT inverse miniemulsion polymerization of acrylamide", *Macromolecular Rapid Communications*, v. 28, n. 9, pp. 1010-1016.
136. LIU, S., HERMANSON, K.D., KALER, E.W., 2006, "Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization in Microemulsion", *Macromolecules*, v. 39, n. 13, pp. 4345-4350.
137. CHANG, C.-W., BAYS, E., TAO, L. *et al.*, 2009, "Differences in cytotoxicity of poly(PEGA)s synthesized by reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization", *Chemical Communications*, v., n. 24, pp. 3580-3582.
138. LANDFESTER, K., WILLERT, M., ANTONIETTI, M., 2000, "Preparation of Polymer Particles in Nonaqueous Direct and Inverse Miniemulsions", *Macromolecules*, v. 33, n. 7, pp. 2370-2376.

139. LANDFESTER, K., BECHTHOLD, N., TIARKS, F. *et al.*, 1999, "Formulation and stability mechanisms of polymerizable miniemulsions", *Macromolecules*, v. 32, n. 16, pp. 5222-5228.
140. SCHORK, F.J., LUO, Y.W., SMULDERS, W. *et al.*, 2005, "Miniemulsion polymerization", *Advances in Polymer Science*, v. 175, pp. 129-255.
141. SPERNATH, L., MAGDASSI, S., 2007, "A new method for preparation of poly-lauryl acrylate nanoparticles from nanoemulsions obtained by the phase inversion temperature process", *Polymers for Advanced Technologies*, v. 18, pp. 705-711.
142. GUO, Y., LIU, J.Q., ZETTERLUND, P.B., 2010, "Nitroxide-Mediated Radical Polymerization in Miniemulsion On the Basis of in Situ Surfactant Formation without Use of Homogenization Device", *Macromolecules*, v. 43, pp. 5914-5916.
143. CHENG, S.Q., GUO, Y., ZETTERLUND, P.B., 2010, "Miniemulsion Polymerization Based on Low Energy Emulsification with Preservation of Initial Droplet Identity", *Macromolecules*, v. 43, pp. 7905-7907.
144. CAPEK, I., 2010, "On inverse miniemulsion polymerization of conventional water-soluble monomers", *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 156, pp. 35-61.
145. LANDFESTER, K., BECHTHOLD, N., TIARKS, F. *et al.*, 1999, "Miniemulsion Polymerization with Cationic and Nonionic Surfactants: A Very Efficient Use of Surfactants for Heterophase Polymerization", *Macromolecules*, v. 32, n. 8, pp. 2679-2683.
146. BECHTHOLD, N., TIARKS, F., WILLERT, M. *et al.*, 2000, "Miniemulsion polymerization: Applications and new materials", *Macromolecular Symposia*, v. 151, pp. 549-555.

147. LEAL-CALERON, F., SCHMITT, V., BIBETTE, J., Emulsion Science. 2. ed. New York, Springer, 2007.
148. ANTONIETTI, M., LANDFESTER, K., 2002, "Polyreactions in miniemulsions", *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 27, n. 4, pp. 689-757.
149. HARKINS, W., 1947, "A General Theory of the Mechanism of Emulsion Polymerization I", *Journal of the American Chemical Society*, v. 69, n. 6, pp. 1428-1444.
150. _____, 1946, "A general theory of the reaction loci in emulsion polymerization. II", *The journal of chemical physics*, v. 14, pp. 47.
151. HARKINS, W., STEARNS, R., 1946, "Loci of Emulsion Polymerization: Diffusion of Organic Molecules from Emulsion Droplets through an Aqueous Phase into Polymer Latex Particles", *Journal of Chemical Physics*, v. 14, pp. 215-216.
152. HARKINS, W., 1945, "A general theory of the reaction loci in emulsion polymerization", *Journal of Chemical Physics*, v. 13, pp. 381-382.
153. SMITH, W., EWART, R., 1948, "Kinetics of emulsion polymerization", *The journal of chemical physics*, v. 16, pp. 592.
154. LANDFESTER, K., 2001, "The generation of nanoparticles in miniemulsions", *Advanced Materials*, v. 13, n. 10, pp. 765-768.
155. OH, J.K., SIEGWART, D.J., LEE, H. *et al.*, 2007, "Biodegradable Nanogels Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization as Potential Drug Delivery Carriers: Synthesis, Biodegradation, in Vitro Release, and Bioconjugation", *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, pp. 5939-5945.
156. OH, J.K., PERINEAU, F., MATYJASZEWSKI, K., 2006, "Preparation of nanoparticles of well-controlled water-soluble homopolymer and block copolymers using an inverse miniemulsion ATRP", *Macromolecules*, v. 39, pp. 8003-8010.

157. OH, J.K., TANG, C., GAO, H. *et al.*, 2006, "Inverse Miniemulsion ATRP - A New Method for Synthesis and Functionalization of Well-Defined Water-Soluble:Cross-Linked Polymeric Particles", *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 16, pp. 5578-5584.
158. OH, J.K., DONG, H., ZHANG, R. *et al.*, 2007, "Preparation of nanoparticles of double-hydrophilic PEO-PHEMA block copolymers by AGET ATRP in inverse miniemulsion", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v. 45, pp. 4764-4772.
159. QI, G., ELEAZER, B., JONES, C.W. *et al.*, 2009, "Mechanistic Aspects of Sterically Stabilized Controlled Radical Inverse Miniemulsion Polymerization", *Macromolecules*, v. 42, n. 12, pp. 3906-3916.
160. OUYANG, L., WANG, L., SCHORK, F.J., 2010, "Synthesis of Well-Defined Statistical and Diblock Copolymers of Acrylamide and Acrylic Acid by Inverse Miniemulsion Raft Polymerization", *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 211, n. 18, pp. 1977-1983.
161. LU, F., LUO, Y., LI, B. *et al.*, 2010, "Synthesis of Thermo-Sensitive Nanocapsules via Inverse Miniemulsion Polymerization Using a PEO, ðRAFT Agent", *Macromolecules*, v. 43, n. 1, pp. 568-571.
162. SOGABE, A., MCCORMICK, C.L., 2009, "Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization in an Inverse Microemulsion System: Homopolymerization, Chain Extension, and Block Copolymerization", *Macromolecules*, v. 42, n. 14, pp. 5043-5052.
163. OH, J.K., DRUMRIGHT, R., SIEGWART, D.J. *et al.*, 2008, "The development of microgels/nanogels for drug delivery applications", *Progress in Polymer Science*, v. 33, n. 4, pp. 448-477.

164. HOARE, T.R., KOHANE, D.S., 2008, "Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges", *Polymer*, v. 49, pp. 1993-2007.
165. RYU, J.H., CHACKO, R.T., JIWPANICH, S. *et al.*, 2010, "Self-cross-linked polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform", *Journal of the American Chemical Society*, v. 132, n. 48, pp. 17227-17235.
166. BRAUNECKER, W.A., MATYJASZEWSKI, K., 2007, "Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives", *Progress in Polymer Science*, v. 32, pp. 93-146.
167. CUNNINGHAM, M.F., 2008, "Controlled/living radical polymerization in aqueous dispersed systems", *Progress in Polymer Science*, v. 33, pp. 365-398.
168. IDE, N., FUKUDA, T., 1999, "Nitroxide-Controlled Free-radical Copolymerization of Vinyl and Divinyl Monomers. gelation", *Macromolecules*, v. 32, pp. 95-99.
169. ZETTERLUND, P.B., ALAM, M.N., MINAMI, H. *et al.*, 2005, "Nitroxide-mediated controlled/living free radical copolymerization of styrene and divinylbenzene in aqueous miniemulsion", *Macromolecular Rapid Communications*, v. 26, n. 12, pp. 955-960.
170. SAKA, Y., ZETTERLUND, P.B., OKUBO, M., 2007, "Gel formation and primary chain lengths in nitroxide-mediated radical copolymerization of styrene and divinylbenzene in miniemulsion", *Polymer*, v. 48, n. 5, pp. 1229-1236.
171. GAO, H., MATYJASZEWSKI, K., 2009, "Synthesis of functional polymers with controlled architecture by CRP of monomers in the presence of cross-linkers: From stars to gels", *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 34, n. 4, pp. 317-350.
172. PISSUWAN, D., BOYER, C., GUNASEKARAN, K. *et al.*, 2010, "In Vitro Cytotoxicity of RAFT Polymers", *Biomacromolecules*, v. 11, n. 2, pp. 412-420.

173. LANDFESTER, K., 2009, "Miniemulsion polymerization and the structure of polymer and hybrid nanoparticles", *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 48, n. 25, pp. 4488-4508.
174. FAUCHEU, J., GAUTHIER, C., CHAZEAU, L. *et al.*, 2010, "Miniemulsion polymerization for synthesis of structured clay/polymer nanocomposites: Short review and recent advances", *Polymer*, v. 51, n. 1, pp. 6-17.
175. VAN BERKEL, K.Y., HAWKER, C.J., 2010, "Tailored composite polymer-metal nanoparticles by miniemulsion polymerization and thiol-ene functionalization", *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, v. 48, n. 7, pp. 1594-1606.
176. ASUA, J.M., 2002, "Miniemulsion polymerization", *Progress in Polymer Science*, v. 27, pp. 1283.
177. LANDFESTER, K., 2001, "Polyreactions in Miniemulsions", *Macromolecular Rapid Communications*, v. 22, pp. 896.
178. LIM, D.W., YEOM, Y.I., PARK, T.G., 2000, "Poly(DMAEMA-NVP)-b-PEG-galactose as Gene Delivery Vector for Hepatocytes", *Bioconjugate Chemistry*, v. 11, n. 5, pp. 688-695.
179. VAN DE WETERING, P., MORET, E.E., SCHUURMANS-NIEUWENBROEK, N.M.E. *et al.*, 1999, "Structure, Activity Relationships of Water-Soluble Cationic Methacrylate/Methacrylamide Polymers for Nonviral Gene Delivery", *Bioconjugate Chemistry*, v. 10, n. 4, pp. 589-597.
180. JIANG, X., LOK, M.C., HENNINK, W.E., 2007, "Degradable-Brushed pHEMA-*b*-DMAEMA Synthesized via ATRP and Click Chemistry for Gene Delivery", *Bioconjugate Chemistry*, v. 18, n. 6, pp. 2077-2084.

181. LIN, S., DU, F., WANG, Y. *et al.*, 2007, "An Acid-Labile Block Copolymer of PDMAEMA and PEG as Potential Carrier for Intelligent Gene Delivery Systems", *Biomacromolecules*, v. 9, n. 1, pp. 109-115.
182. WETERING, P., ZUIDAM, N.J., STEENBERGEN, M.J. *et al.*, 1998, "A Mechanistic Study of the Hydrolytic Stability of Poly(2-Dimethylamino)ethyl methacrylate", *Macromolecules*, v. 31, pp. 8063-8068.
183. CHERNG, J., WETERING, P., TALSMA, H. *et al.*, 1996, "Effect of Size and Serum Proteins on Transfection Efficiency of ((2-dimethylamino)ethyl Methacrylate)-Plasmid Nanoparticles", *Pharmaceutical Research*, v. 13, n. 7, pp. 1038-1042.
184. WETERING, P., CHERNG, J., TALSMA, H. *et al.*, 1998, "2-(dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents", *Journal of Controlled Release*, v. 53, pp. 145-153.
185. WETERING, P., CHERNG, J., TALSMA, H. *et al.*, 1997, "Relation between transfection efficiency and cytotoxicity of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)/plasmid complexes", *Journal of Controlled Release*, v. 49, pp. 59-69.
186. YUK, S.H., CHO, S.H., LEE, S.H., 1997, "pH/temperature-responsive polymer composed of poly((N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate-co-ethylacrylamide)", *Macromolecules*, v. 30, n. 22, pp. 6856-6859.
187. LIU, F., URBAN, M.W., 2008, "Dual temperature and pH responsiveness of poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate-co-n-butyl acrylate) colloidal dispersions and their films", *Macromolecules*, v. 41, n. 17, pp. 6531-6539.
188. LIU, X., NI, P., HE, J. *et al.*, 2010, "Synthesis and micellization of pH/temperature-responsive double-hydrophilic diblock copolymers

- polyphosphoester- block -poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate] prepared via ROP and ATRP", *Macromolecules*, v. 43, n. 10, pp. 4771-4781.
189. WANG, Y., JIANG, G., ZHANG, M. *et al.*, 2011, "Facile one-pot preparation of novel shell cross-linked nanocapsules: inverse miniemulsion RAFT polymerization as an alternative approach", *Soft Matter*, v. 7, pp. 5348-5352.
190. MITSUKAMI, Y., DONOVAN, M.S., LOWE, A.B. *et al.*, 2001, "Water-soluble polymers. 81. Direct synthesis of hydrophilic styrenic-based homopolymers and block copolymers in aqueous solution via RAFT", *Macromolecules*, v. 34, n. 7, pp. 2248-2256.
191. THANG, S.H., CHONG, Y.K., MAYADUNNE, R.T.A. *et al.*, 1999, "A novel synthesis of functional dithioesters, dithiocarbamates, xanthates and trithiocarbonates", *Tetrahedron Letters*, v. 40, n. 12, pp. 2435-2438.
192. ALI, M.M., STÖVER, H.D.H., 2004, "Well-defined amphiphilic thermosensitive copolymers based on poly(ethylene glycol monomethacrylate) and methyl methacrylate prepared by atom transfer radical polymerization", *Macromolecules*, v. 37, n. 14, pp. 5219-5227.
193. STILL, W.C., KAHN, M., MITRA, A., 1978, "Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution", *Journal of Organic Chemistry*, v. 43, n. 14, pp. 2923-2925.
194. FULMER, G.R., MILLER, A.J.M., SHERDEN, N.H. *et al.*, 2010, "NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist", *Organometallics*, v. 29, n. 9, pp. 2176-2179.
195. BÜTÜN, V., BILLINGHAM, N.C., ARMES, S.P., 1997, "Synthesis and aqueous solution properties of novel hydrophilic-hydrophilic block copolymers

- based on tertiary amine methacrylates", *Chemical Communications*, v., pp. 671-672.
196. LEE, A.S., GAST, A.P., BÜTÜN, V. *et al.*, 1999, "Characterizing the Structure of pH Dependent Polyelectrolyte Block Copolymer Micelles", *Macromolecules*, v. 32, n. 13, pp. 4302-4310.
197. TAYLOR, P., 1998, "Ostwald ripening in emulsions", *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 75, n. 2, pp. 107-163.
198. LUO, Y., TSAVALAS, J., SCHORK, F.J., 2001, "Theoretical aspects of particle swelling in living free radical miniemulsion polymerization", *Macromolecules*, v. 34, n. 16, pp. 5501-5507.
199. LI, Y., ARMES, S.P., 2005, "Synthesis and chemical degradation of branched vinyl polymers prepared via ATRP: Use of a cleavable disulfide-based branching agent", *Macromolecules*, v. 38, n. 20, pp. 8155-8162.
200. OLIVEIRA, G.F. Avaliação da Atividade Antimicrobiana, In Vitro, do Extrato Hidroalcoólico Bruto das Folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Jambolão). (2005). (M.Sc.), Universidade de Franca, Franca, 2005.
201. AMYOT, F., JURSKI, K., DUFAUX, J. *et al.*, 2002, "An experimental and theoretical study of mass transfer from loaded embolisation microbeads: Possible optimisation", *International Communications in Heat and Mass Transfer*, v. 29, n. 5, pp. 623-632.
202. AMYOT, F., BOUDY, V., JURSKI, K. *et al.*, 2002, "A new experimental method for the evaluation of the release profiles of drug-loaded microbeads designed for embolisation", *Innovation et Technologie en Biologie Medicines*, v. 23, n. 5, pp. 285-289.

203. BOROVIAC, T., PELAGE, J.P., KASSELOURI, A. *et al.*, 2006, "Release of ibuprofen from beads for embolization: In vitro and in vivo studies", *Journal of Controlled Release*, v. 115, n. 3, pp. 266-274.

Anexo

Teste de atividade farmacológica *in vitro*

No Capítulo 2 foi demonstrada a incorporação *in situ* durante a reação de copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila da amoxicilina. Um questionamento que deve ser levado em consideração na estratégia de incorporação *in situ* de fármacos é a retenção de atividade farmacológica do fármaco após o processo de polimerização/síntese das partículas. No caso específico da amoxicilina, a principal preocupação está relacionada à degradação do anel β -lacâmico do composto, que é responsável pela ação antibacteriana da amoxicilina. Neste caso, a confirmação da retenção de atividade da amoxicilina pode ser verificada com auxílio de testes microbiológicos *in vitro*.

O teste microbiológico *in vitro* pode ser realizado com a elaboração de diversas metodologias. Entretanto, duas delas parecem ser mais adequadas para o presente caso: o contato direto das micropartículas com fármaco com microorganismos sensíveis à amoxicilina ou a extração do fármaco das partículas e posterior teste microbiológico. Neste anexo, são apresentados alguns resultados preliminares relacionados a segunda estratégia apenas.

Metodologia experimental

Teste microbiológico

A técnica seguida foi o “Método da difusão em ágar – técnica do disco”, que tem como fundamento medir um halo de inibição de crescimento em uma placa contendo um microrganismo. Este halo de inibição observado é proporcional à difusão e à concentração de um determinado antibiótico para o meio de cultura. Os procedimentos experimentais descritos a seguir foram baseados na metodologia descrita por OLIVEIRA (2005) [200], com algumas pequenas modificações experimentais.

1. Preparo dos discos de papel absorvente

- a. Foram utilizados discos de papel secos, esterilizados e sem antibióticos de aproximadamente 6 mm de diâmetro (DME – Araçatuba, SP).
- b. Cada disco foi impregnado com 15 µL de “solução teste” em câmara de fluxo laminar.

2. Preparo das placas

- a. Prepararam-se antecipadamente placas contendo ágar Mueller-Hinton¹⁵ e também caldos Mueller-Hinton.
- b. Dois microrganismos foram reativados em placas contendo ágar nutriente (24 h a 35°C) e inoculados nos caldos Muller-Hinton para promover seu crescimento (48 h a 35°C).
- c. Utilizando um *swab* (haste de plástico com algodão nas pontas) esterilizado, distribuiu-se o inóculo microbiano sobre a superfície do ágar.
- d. Com um pinça estéril, distribuíram-se os discos (que foram previamente impregnados) sobre a superfície do ágar.
- e. Incubaram-se as placas contendo os discos em estufa a 35°C por um período de 16-18 h. Após esse período, fizeram-se as leituras das placas, para verificar os halos de inibição de crescimento formado.

¹⁵ Ágar Mueller-Hinton – meio de cultura usado para testes de sensibilidade de microrganismos à antibióticos. Sua composição aproximada consiste de extrato de carne (2 g/L), caseína hidrolisada (17,5 g/L), amido (1,5 g/L) e ágar (17 g/L).

A Tabela A1 resume os resultados obtidos para os extratos aquosos das amostras testadas neste teste microbiológico. Os extratos poliméricos foram obtidos conforme descrito no teste de liberação do fármaco, exceto pela proporção polímero/solução extratora. Em cada placa de teste colocaram-se seis discos com os extratos já impregnados: um disco para o branco, um disco para cada concentração de amoxicilina testada, um disco para o extrato da amostra e mais um disco contendo uma concentração determinada de amoxicilina (10 µg/disco – DME, Araçatuba, SP).

Tabela A1 – Extratos aquosos usados no teste microbiológico.

Extrato Aquoso	Característica	Amoxicilina (µg/µL)*
Solução Extratora	Branco	0
Amox 1	Controle positivo	0,33
Amox 2	Controle positivo	0,66
Amox 3	Controle positivo	1,33
PVAc-co-PMMA	Amostra	0
PVA/PVAc-co-PMMA	Amostra	0
PVAc-co-PMMA 1% (org)	Amostra	0
PVA/PVAc-co-PMMA 1% (org)	Amostra	0,25
PVAc-co-PMMA 1% (aquo)	Amostra	0,60
PVA/PVAc-co-PMMA 1% (aquo)	Amostra	0

Amox = amoxicilina; PVAc = poli(acetato de vinila); PMMA = poli(metacrilato de metila); PVA = poli(álcool vinílico).

* Concentração estimada

Os testes foram realizados em duplicata, utilizando-se dois conjuntos de placas. Em um primeiro conjunto, o microorganismo que foi inoculado foi a *Escherichia coli* DH5alfa (ATCC 53868), que é sensível à amoxicilina, o que faz deste microorganismo o controle positivo do ensaio. Em um outro conjunto de placas, o microorganismo que foi inoculado foi a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, que é resistente à amoxicilina, sendo este o controle negativo. Os tamanhos dos halos observados nas placas foram determinados com o auxílio de uma régua.

Teste de liberação de fármacos

Em um recipiente com volume exato, pesou-se uma certa quantidade de amostra (polímero ou amoxicilina) e adicionou-se um meio extrator, que consistia de uma solução aquosa de lauril sulfato de sódio 1% (m/v). O recipiente foi então agitado em *shaker* horizontal HS-250 (IKA, Germany) por 2 horas a temperatura ambiente, para promover a extração da amoxicilina para o meio extrator. Após o período de *extração*, foi determinada a concentração do fármaco na solução extratora por absorção na região do UV-VIS ou por cromatografia líquida.

- **Absorção na região do UV-Vis**

A absorbância dos extratos aquosos foram determinadas utilizando espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35, Perkin-Elmer, EUA) para leituras de varredura entre as regiões de 200-700 nm e em comprimentos de onda específicos de 228 e 274 nm, correspondentes aos dois picos de absorção da amoxicilina trihidratada neste meio extrator. A solução aquosa de lauril sulfato de sódio 1% foi utilizado como branco, para fins de calibração do equipamento. A determinação da concentração de amoxicilina no meio foi calculada a partir de equações geradas com curvas de calibração, obtidas com soluções de concentrações conhecidas de amoxicilina no meio extrator para os dois comprimentos de onda específicos (conforme Capítulo 2).

- **Cromatografia líquida de alta eficiência**

A concentração de amoxicilina liberada nos extratos aquosos de algumas amostras foi determinadas por cromatografia líquida. Para isto, utilizou-se um sistema cromatográfico modelo Elite Lachrom (Merck, EUA), equipado com detector DAD e utilizando coluna C-18 250 x 4 mm, com poros de 10 µm (Teknokroma). A metodologia experimental seguida foi referente ao método de detecção para amoxicilina comprimidos (USP, 2008).

Resultados

Com base nos resultados obtidos do teste de liberação do fármaco para o meio extrator, foi observado que algumas amostras do copolímero de PVAc-co-PMMA liberaram amoxicilina para a solução extratora. Resta apenas saber se esta “amoxicilina” liberada está em sua forma ativa; ou seja, inibindo o crescimento de microorganismos sensíveis a ela.

Como a concentração obtida no primeiro teste de liberação foi muito baixa, para poder observar uma inibição de crescimento bacteriano, um novo procedimento de extração foi realizado, aumentando-se a relação polímero/solução extratora, a fim de obter extratos com maiores concentrações do fármaco. A Tabela A.2 traz os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir de algumas amostras de copolímeros de PVAc-co-PMMA e PVA/PVAc-co-PMMA. Além dos extratos poliméricos, foram testados quanto a atividade antimicrobiana a solução extratora de LSS 1% (branco), soluções de amoxicilina preparadas com a solução extratora de LSS 1% e um disco padrão comercial contendo uma quantidade determinada de amoxicilina.

Tabela A.2 – Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de copolímeros pelo método de difusão em ágar (técnica do disco).

Polímero	Amostra	Branco	Amox 1	Amox 2	Amo 3	Padrão
PVAc-co-PMMA	-	-	25,0 ± 1,4	23,0 ± 1,4	25,0 ± 1,4	32,0 ± 2,8
PVA/PVAc-co-PMMA	-	-	26,0 ± 2,8	25,0 ± 1,4	23,0 ± 4,2	30,0 ± 8,5
PVAc-co-PMMA 1% (org)	-	-	22,0 ± 8,5	26,0 ± 5,7	25,0 ± 4,2	39,0 ± 9,9
PVA/PVAc-co-PMMA 1% (org)	-	-	26,0 ± 0,0	25,0 ± 1,4	25,0 ± 1,4	38,0 ± 0,0
PVAc-co-PMMA 1% (aquo)	-	-	27,0 ± 1,4	27,0 ± 1,4	28,0 ± 0,0	30,0 ± 0,0
PVA/PVAc-co-PMMA 1%(aquo)	-	-	26,0 ± 0,0	25,0 ± 1,4	26,0 ± 0,0	25,0 ± 4,2

PVAc = poli(acetato de vinila); PMMA = poli(metacrilato de metila); PVA = poli(álcool vinílico).

*Diâmetro do halo de inibição em mm para placas com *E. coli*; Média ± Desvio padrão, n= 2

Controle Negativo (*Pseudomonas aeruginosa*) = não foi observada inibição do crescimento para nenhum disco

Antes da análise dos dados obtidos nos testes microbiológicos, é importante frisar que os resultados descritos anteriormente na Tabela A.2 são meramente qualitativos, embora os testes tenham sido feitos em duplicata e seguindo todas as recomendações para testes de atividade microbiana. O motivo da não interpretação quantitativa dos resultados é a baixa precisão associada à medida dos halos.

Algumas conclusões podem ser tomadas com base nos resultados apresentados na Tabela A.2. A primeira delas é que o teste foi bem realizado, ao passo que o microorganismo sensível (*E. coli*) e o resistente (*P. aeruginosa*) comportaram-se de acordo com o esperado. A segunda conclusão foi quanto aos resultados das soluções controle (branco e padrões de amoxicilina). A solução extratora não inibiu o crescimento da bactéria, o que era um comportamento esperado. Além deste, outro comportamento esperado foi a inibição do crescimento da *E. coli* pelas três soluções contendo amoxicilina (amox 1, amox 2 e amox 3) e também pelo disco padrão.

Embora qualitativamente os controles positivos tenham se comportado conforme previsto, “quantitativamente” eles apresentaram algumas divergências. A primeira delas ficou por conta do tamanho dos halos observados para as soluções de amoxicilina, já que as amostras possuíam concentrações distintas do fármaco, o que deveria gerar halos de tamanhos diferentes. A segunda divergência foi em relação ao tamanho dos halos gerados pelos discos comerciais padrões de amoxicilina. Segundo informações do fabricante, o disco deveria gerar um halo de 16-22 mm, usando *E. coli* ATC 25922. Os resultados obtidos foram ligeiramente superiores a esta faixa; porém, como dito anteriormente, estão de acordo com o esperado. Além disso, é importante recordar que o tamanho do halo gerado teoricamente depende do tipo de microorganismo utilizado e da concentração de antibiótico, entre outros fatores.

Pelos resultados preliminares de liberação do fármaco, era esperado que apenas as amostras de PVA/PVAc-co-PMMA 1% (fase orgânica) e PVAc-co-PMMA 1% (fase aquosa) liberassem amoxicilina para a solução extratora, fazendo com que essas amostras inibissem o crescimento microbiano. Os demais extratos poliméricos não deveriam promover a inibição do crescimento microbiano, por não conterem amoxicilina ou não liberá-la para o meio.

Os extratos poliméricos que não continham amoxicilina, ou onde esta não era liberada, conforme especulações realizadas nos testes de liberação do fármaco, comportaram-se de forma esperada: não inibiram o crescimento do microorganismo. Este resultado, de certa forma, contribui para reforçar o argumento do modelo gerado e também para comprovar que a matriz polimérica pura (PVAc-co-PMMA ou PVA/PVAc-co-PMMA) não possui atividade antibacteriana. Contudo, as soluções dos polímeros que teoricamente liberariam amoxicilina para a solução extratora não inibiram o crescimento microbiano. Este resultado, a princípio, levou à formulação das seguintes hipóteses:

- Não ocorreu liberação de amoxicilina para a solução extratora testada;
- Ocorreu liberação de amoxicilina em quantidades insuficientes para inibir o crescimento bacteriano;
- Ocorreu a liberação de uma amoxicilina sem ação antimicrobiana.

Para tentar responder essas hipóteses, utilizou-se a mesma metodologia de leitura dos extratos na região do UV-Vis, para determinar a concentração de fármaco nos extratos testados. Esses resultados são apresentados na Tabela A.3. Diferentemente dos testes de liberação do fármaco, o procedimento de extração foi realizado apenas uma vez. As leituras em 228 nm não foram computados, pois muitas delas extrapolaram

a escala de absorção na região do UV-Vis. Desta forma, assim como realizado anteriormente, para fins de quantificação apenas os dados calculados na região de 274 nm foram considerados.

Tabela A.3 – Concentração de amoxicilina nas soluções poliméricas utilizadas nos ensaios microbiológicos.

Amostra	228 nm		274 nm	
	A	Conc Amox (µg/mL)	A	Conc Amox (µg/mL)
PVAc-co-PMMA	-	-	-	-
PVA/PVAc-co-PMMA	-	-	-	-
PVAc-co-PMMA 1% (org)	-	-	0,10 ± 0,00	74,38 ± 0,00
PVA/PVAc-co-PMMA 1% (org)	-	-	0,23 ± 0,00	179,77 ± 0,00
PVAc-co-PMMA 1% (aquo)	-	-	1,16 ± 0,00	120,54 ± 0,00
PVA/PVAc-co-PMMA 1% (aquo)	-	-	0,02 ± 0,00	15,92 ± 0,00

PVAc = poli(acetato de vinila); PMMA = poli(metacrilato de metila); PVA = poli(álcool vinílico).

% = concentração de amoxicilina adicionada ao meio de reação; Média ± Desvio padrão para n = 2 (leituras).

Comparando-se os resultados da Tabela A.3 com os dados de liberação de fármaco apresentados no Capítulo 2, observa-se que a concentração de amoxicilina presente nos extratos foi significativamente superior, sendo possível identificar a liberação de fármaco inclusive em polímeros onde antes isso não foi possível. Este perfil era esperado pois, intencionalmente, a proporção polímero/solução extratora foi alterada, para que houvesse uma maior liberação de amoxicilina para o meio aquoso. É importante observar que os novos resultados obtidos corroboram os perfis apresentados anteriormente no Capítulo 2.

Apesar de uma maior quantidade de amostra, essas concentrações ainda foram muito baixas e não atingiram a meta de 660 µg/mL, o que garantiria um conteúdo de 10µg de amoxicilina por disco, valor este igual ao de um dos padrões positivos. Para se ter uma idéia da baixa concentração dos extratos, a amostra de PVA/PVAc-co-PMMA

1% (fase orgânica), com 180 µg/mL, só garante aproximadamente cerca de 2,7 µg de amoxicilina no disco teste, o que não é uma quantidade apreciável do fármaco para que um halo de inibição qualitativo pudesse ser observado.

Embora os resultados de espectrofotometria na região do UV-Vis tenham permitido quantificar a liberação da amoxicilina, esta técnica possui algumas limitações. A principal delas é a absorção do polímero na mesma faixa de comprimento de onda da amoxicilina, que pode estar influenciando os resultados, mesmo que a absorção do polímero tenha sido descontada nos cálculos. Para avaliar de fato a presença da amoxicilina nos extratos, esses foram analisados por cromatografia líquida, que utiliza um princípio de separação e detecção mais preciso. As Figuras A1 , A2 e A3 ilustram os multicromatogramas da amoxicilina padrão, do extrato de PVAc-co-PMMA e do PVAc-co-PMMA com 1% de amoxicilina incorporado na fase aquosa da suspensão, respectivamente.

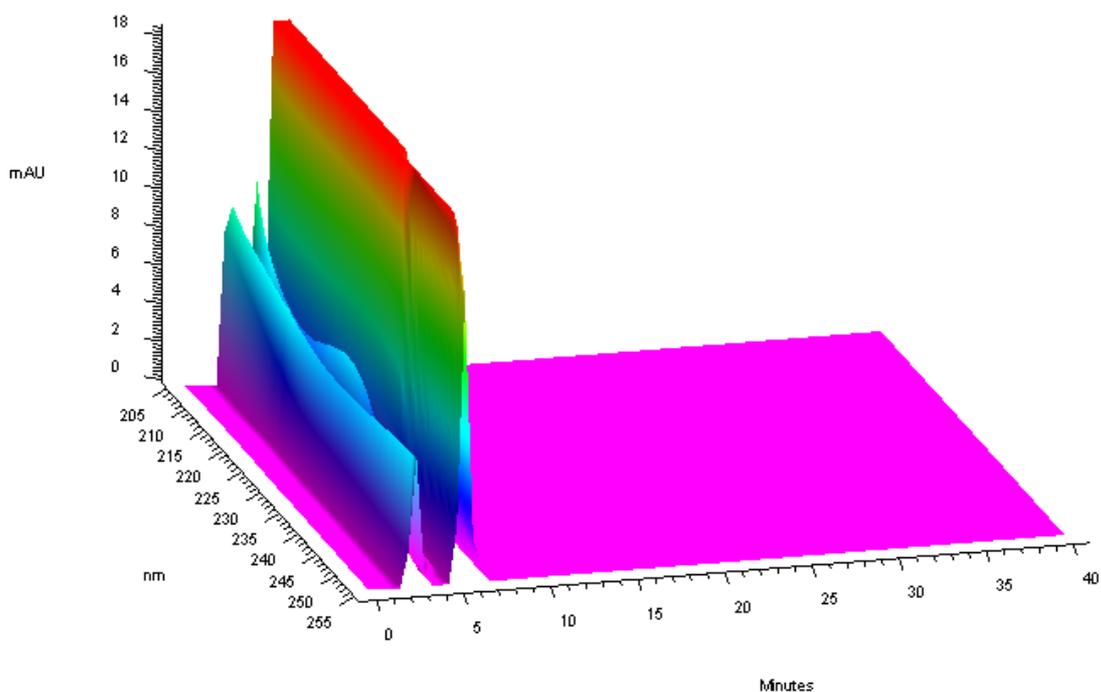


Figura A1 – Multicromatograma da Amoxicilina pura.

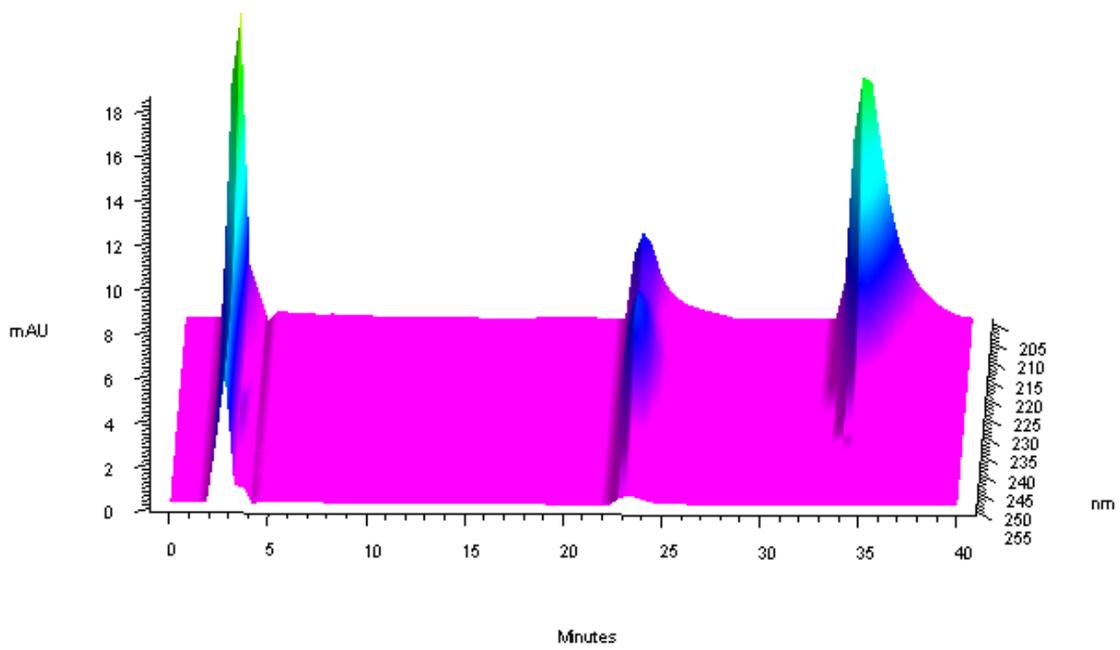


Figura A2 – Multicromatograma do extrato de PVAc-co-PMMA puro.

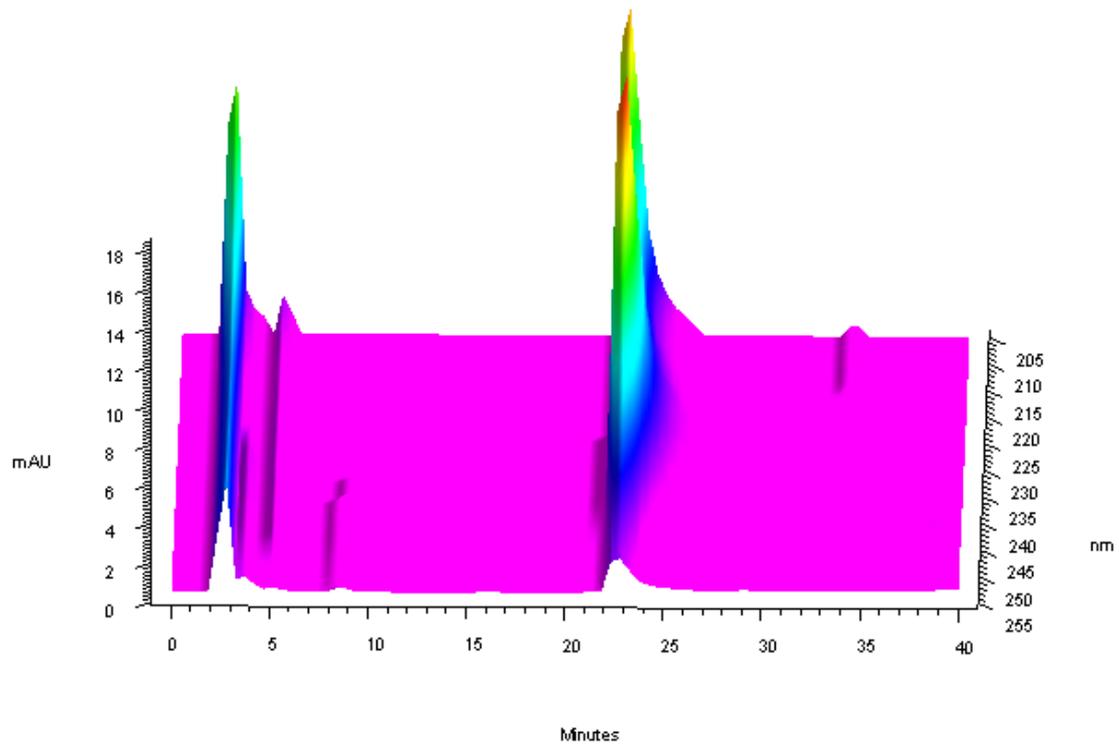


Figura A3 – Multicromatograma do extrato de PVAc-co-PMMA com 1% de amoxicilina (adição na fase aquosa).

Os multicromatogramas são gráficos bastantes ilustrativos pois, além da relação “absorção x tempo” de retenção, eles também trazem a intensidade da absorção em função dos diversos comprimentos de onda. Conforme observado na Figura A1, que traz o multicromatograma da amoxicilina padrão, este fármaco possui seu pico de absorção facilmente identificado por uma grande absorção no tempo de retenção de 5 minutos. A Figura A2, referente ao PVAc-co-PMMA, possui dois picos de retenção em 20-25 minutos e 35 minutos aproximadamente, que provavelmente é uma absorção associada ao polímero que foi solubilizado no meio aquoso. Em ambos os gráficos, o pico na região entre 0-5 minutos é referente à solução extratora de LSS 1%.

A Figura A3, referente à amostra de PVAc-co-PMMA com 1% de amoxicilina incorporada na fase aquosa da suspensão, apresentou um pequeno pico de absorção em 5 minutos, que é correspondente à amoxicilina. Entretanto, por ser um pico de baixa intensidade, não foi possível determinar a concentração da amoxicilina nesta amostra, mas apenas assinalar sua presença. O multicromatograma para este extrato também apresentou picos de absorção referentes à solução extratora de LSS 1% e também ao provável pico do polímero em 20-25 minutos. Os demais extratos das outras amostras poliméricas testadas nos ensaios microbiológicos e que “continham” amoxicilina apresentaram a mesma interpretação feita para a Figura A3. Devido ao baixo teor de amoxicilina nas amostras/extratos, o pico específico da amoxicilina em 5 minutos teve uma difícil identificação, o que impossibilitou quantificação da amoxicilina nos extratos pela técnica de cromatografia.

As soluções padrões de amoxicilina tiveram seus resultados de concentrações confirmados com alta precisão tanto pela técnica de UV-Vis quanto pela técnica cromatográfica. A não quantificação da amoxicilina dos extratos poliméricos, pela

técnica de cromatografia, pode ser um indício de uma superestimação dos resultados de UV-Vis, ou apenas uma baixa concentração de fármaco nos extratos.

Desta forma, das três hipóteses anteriormente levantadas, aparentemente a primeira delas, *“Não ocorreu liberação de amoxicilina para a solução extratora testada”*, poderia ser descartada, já que foi “observada” a presença de amoxicilina tanto pela técnica de UV-Vis quanto pela técnica cromatográfica. A hipótese *“ocorreu liberação de amoxicilina em quantidades insuficientes para inibir o crescimento bacteriano”* ainda parece ser a mais concordante com os resultados reunidos até então, embora não se tenha provado de fato que a amoxicilina manteve sua atividade antimicrobiana intacta. Esses questionamentos levam a considerar que também não é possível descartar a última hipótese levantada, de que *“ocorreu liberação de uma amoxicilina sem atividade antimicrobiana”*.

Como de fato nenhuma hipótese foi comprovada e nem descartada, é sugerido que novos testes, com concentrações mais elevadas da amoxicilina no meio reacional, sejam realizados para comprovar a atividade antimicrobiana do fármaco após a sua incorporação na matriz polimérica, além de seu perfil de liberação. No entanto, parece muito claro que as quantidades de fármaco liberadas na condição presente são pequenas, havendo talvez a necessidade de aperfeiçoar a estrutura da partícula para aumentar a liberação no meio. Outra sugestão seria a realização destes testes segundo uma outra metodologia, em que as partículas poliméricas com fármacos incorporados sejam introduzidas diretamente no meio de cultura. Desta forma, seria avaliada a atividade antimicrobiana da partícula polimérica como um todo – e não apenas do fármaco incorporado nas partículas.

Teste de liberação prolongada de fármacos

No Capítulo 2 foi demonstrado que a amoxicilina incorporada in situ durante as reações de copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila pode ser extraída quando colocada em contato com uma solução extratora. Entretanto, caso as micropartículas sejam usadas em procedimentos de quimioembolização, será necessário conhecer o perfil de liberação do fármaco incorporado nas micropartículas.

Seguindo algumas metodologias, [101, 201-203] foi testada de forma preliminar a liberação prolongada da amoxicilina. Esta metodologia, que utiliza um *Aparato T* (Figura A4), tenta simular uma difusão do medicamento da partícula para o meio extrator, conforme provavelmente aconteceria no sistema vascular. Desta forma, é possível acompanhar a difusão do medicamento por longos períodos (24h – 72 h).

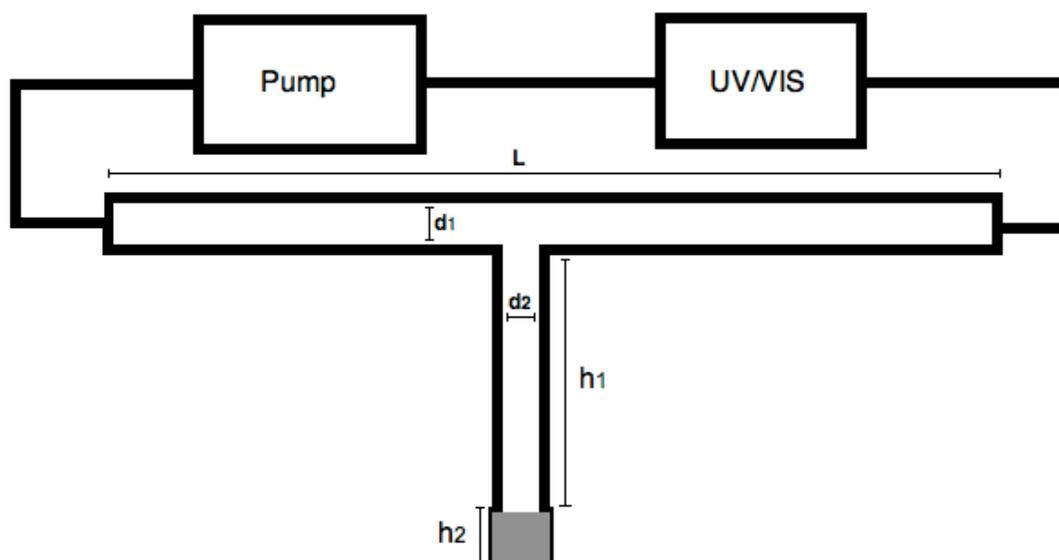


Figura A4 – Esquema da vidraria *Aparato T* conectada à bomba de circulação e ao aparelho de UV-Vis.

Metodologia experimental

Material

Polímero com faixa de tamanho estreita, bomba de circulação, banho de refrigeração, placa de agitação magnética com aquecimento, solução aquosa de SLS 1%, *ependorff*, espátula, proveta de 250 mL, becher de 200 mL e vidraria *Aparato T* com as seguintes dimensões: L = 20 cm; d1 = 1,5 cm; d2 = 1,0 cm; h1 = 10,0 cm; h2 = 5,5 cm.

Metodologia

- 1) Em um becher, colocar **200 mL** de solução SLS 1%. Posicionar o becher em uma placa com sonda de controle de temperatura e ajustar para **37°C**. Colocar também uma pequena barra magnética e iniciar uma agitação “bem fraca” da solução.
- 2) Posicionara sonda do UV/VIS no becher com a solução de SLS 1% e “zerar” o aparelho no comprimento de onda específico de leitura do medicamento.
- 3) Posicionar o *Aparato T* em uma posição adequada, com o auxílio de um suporte e garras. Conectar as mangueiras do banho de refrigeração. Ligar o banho de refrigeração, ajustando a temperatura para **40°C**.
- 4) Em um *ependorff*, pesar aproximadamente **0,1 g** da amostra de polímero seco. Anotar o peso. Conectar o *ependorff* ao *Aparato T*.
- 5) Conectar as mangueiras do *Aparato T* na bomba e no becher – que já está com a sonda e a Sol. SLS 1%.
- 6) Acionar a bomba para uma vazão de **50 mL/min**, garantindo que o líquido preencha todo o sistema.

- 7) Assim que a bomba for acionada, iniciar a aquisição de dados. Programar o computador para fazer leituras a cada **5 minutos** por um período total de **24h** (tempo total do experimento).
- 8) Após o fim do experimento, descartar o *eppendorff* e o polímero. Lavar toda a vidraria usada e circular água destilada pelas mangueiras da bomba antes de iniciar um novo procedimento.

Observações:

- Usar amostras com faixa de tamanho estreita. Usar conjunto de peneiras para garantir esta faixa de tamanho.
- Ao invés de Sol SLS 1%, pode-se fazer o experimento com Solução Tampão Fosfato (PBS), pH 7.4.

Resultados

Utilizando o polímero PVA/PVAc-co-PMMA + 3% de amoxicilina (Capítulo 3), o gráfico apresentado na Figura A5 foi obtido e indica que de fato há uma liberação prolongada do fármaco. Entretanto, conforme demonstrado nas seções anteriores, faz-se necessário comparar os resultados obtidos com o polímero sem amoxicilina, uma vez que o PVA presente na partícula também se solubiliza na solução extratora, promovendo absorção na mesma região de leitura da amoxicilina.

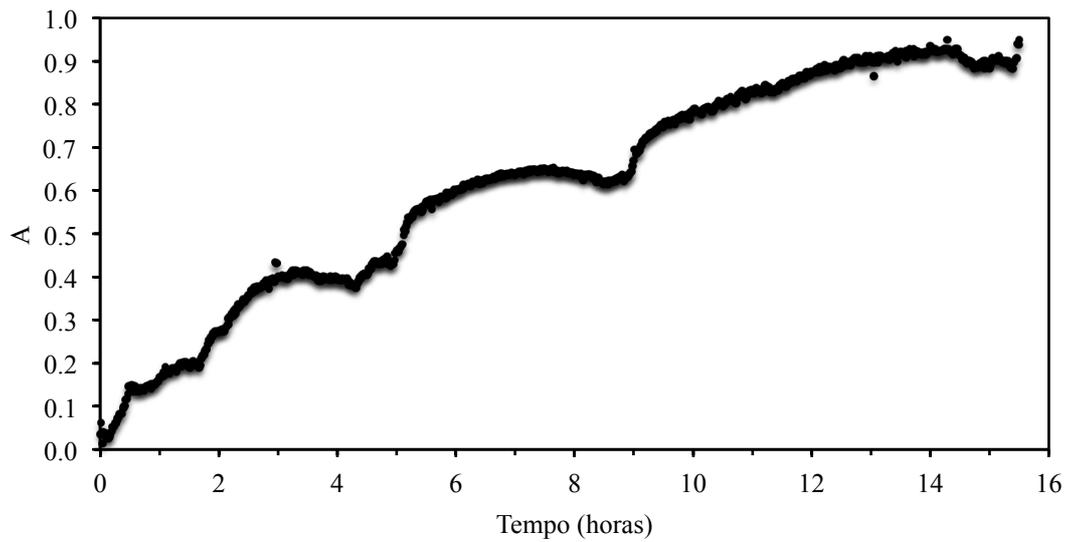


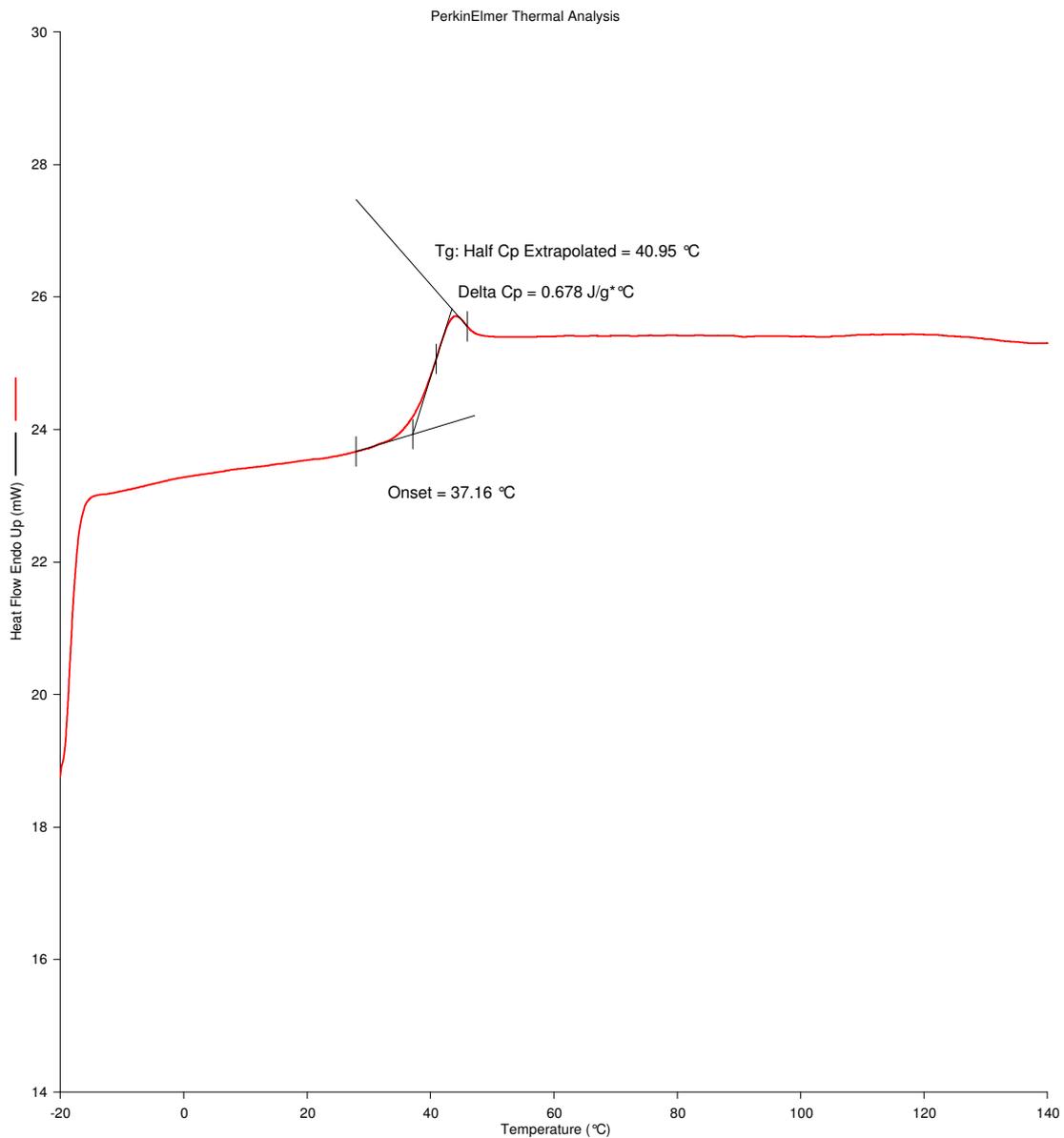
Figura A5 – Perfil de liberação prolongada da amoxicilina extraída do copolímero PVA/PVAc-co-PMMA + 3%.

Curvas de DSC

A seguir são apresentadas as curvas de *calorimetria diferencial de varredura* (DSC) dos polímeros de PVAc e copolímeros de PVAc-co-PMMA apresentados no Capítulo 2. Conforme descrito na seção de material e métodos do Capítulo 2, as análises de DSC foram realizadas em um calorímetro DSC-7 (Perkin-Elmer), na faixa de -20 a 140 °C e utilizando uma taxa de aquecimento de 10 °C/minuto. Para a determinação dos valores de T_g dos polímeros, considerou-se apenas a segunda rampa de aquecimentos, para desta forma eliminar a *história térmica* do polímero analisado.

Nas páginas a seguir, são reportadas as curvas de DSC obtidas para os polímeros mencionados.

Filename C:\Program Files\Pyr...\amostra6(marco).dsd
Operator ID
Sample ID amostra6(marco)
Sample Weight 18.200 mg
Comment:

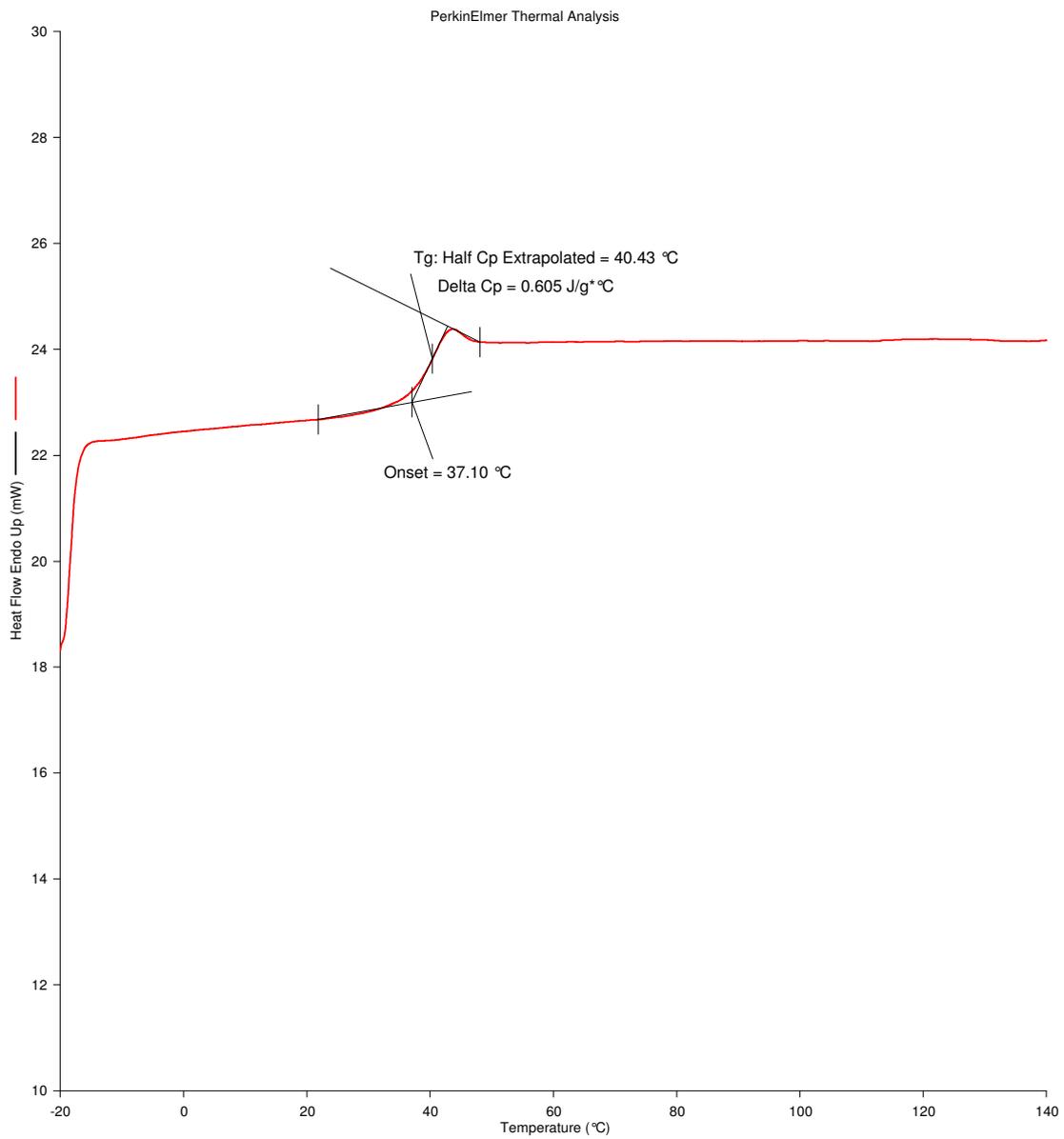


12/17/2008 2:56:48 PM

- | | |
|---|--|
| 1) Hold for 1.0 min at -20.00°C | 4) Hold for 3.0 min at -20.00°C |
| 2) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min | 5) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min |
| 3) Cool from 140.00°C to -20.00°C at 100.00°C/min | |

Figura A6 – Curva de DSC do PVAc.

Filename C:\Program Files\Pyr...\amostra5(marco).dsd
Operator ID
Sample ID amostra5(marco)
Sample Weight 14.950 mg
Comment:

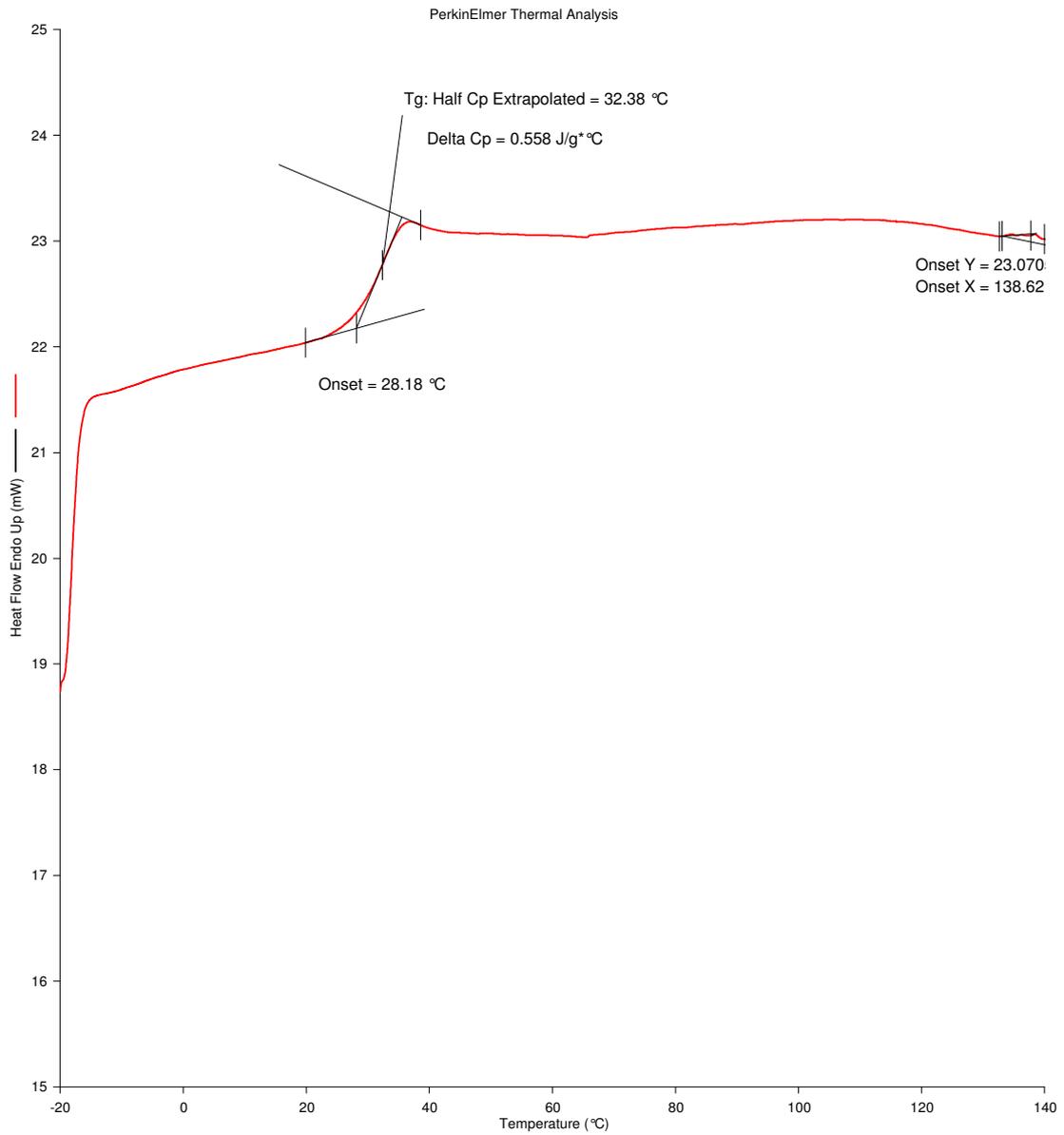


12/10/2008 3:25:03 PM

1) Hold for 1.0 min at -20.00°C
2) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min
3) Cool from 140.00°C to -20.00°C at 100.00°C/min
4) Hold for 3.0 min at -20.00°C
5) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min

Figura A7 – Curva de DSC do PVAc + 0,1% amoxicilina (fase orgânica).

Filename C:\Program Files\Pyr...\amostra2(marco).dsc
Operator ID
Sample ID amostra2(marco)
Sample Weight 11.430 mg
Comment:

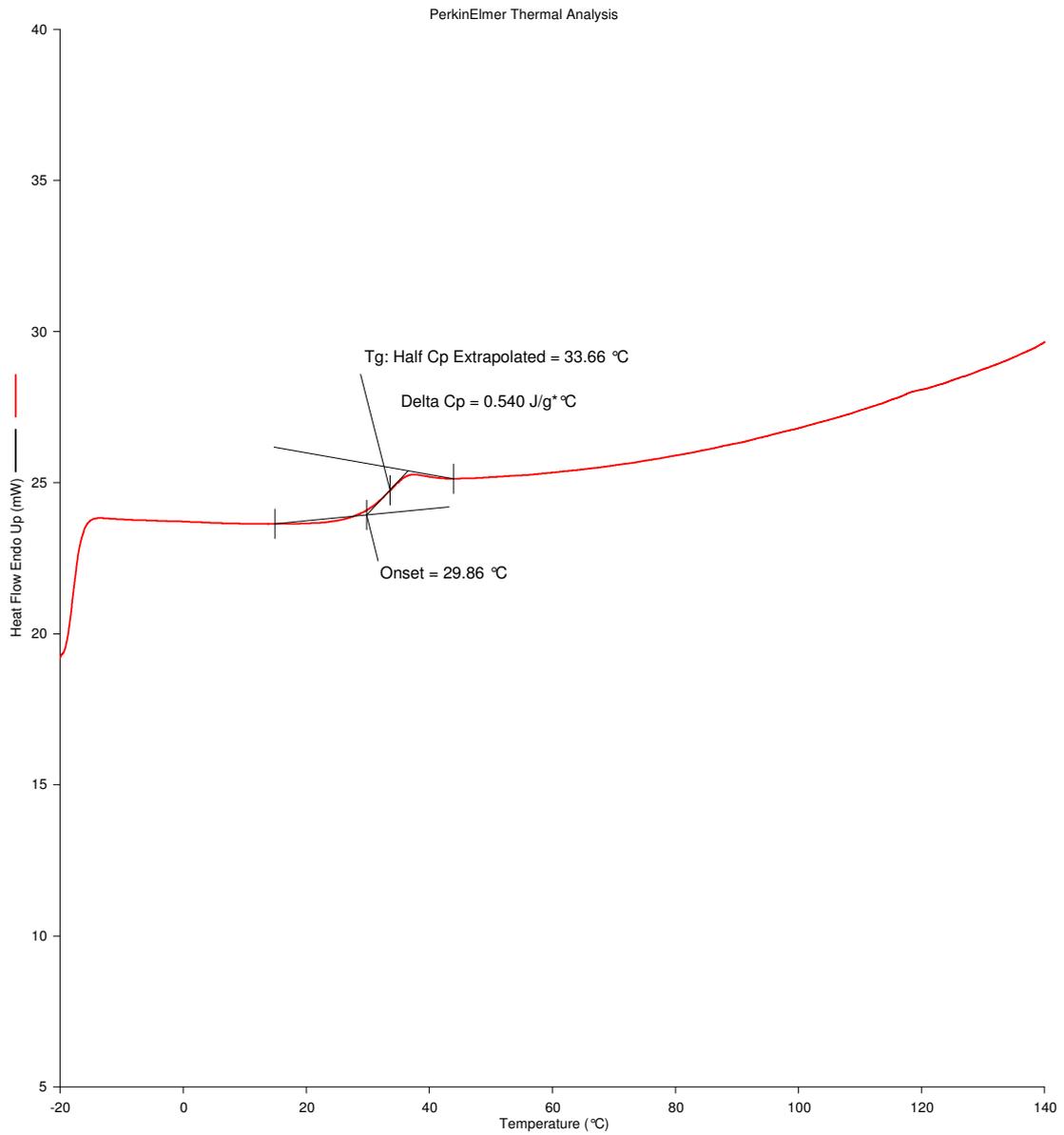


12/10/2008 12:56:45 PM

1) Hold for 1.0 min at -20.00°C
2) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min
3) Cool from 140.00°C to -20.00°C at 100.00°C/min
4) Hold for 3.0 min at -20.00°C
5) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min

Figura A8 – Curva de DSC do PVAc + 0,5% amoxicilina (fase orgânica).

Filename C:\Program Files\Pyr...\amostra4(marco).dsd
Operator ID
Sample ID amostra4(marco)
Sample Weight 16.630 mg
Comment:

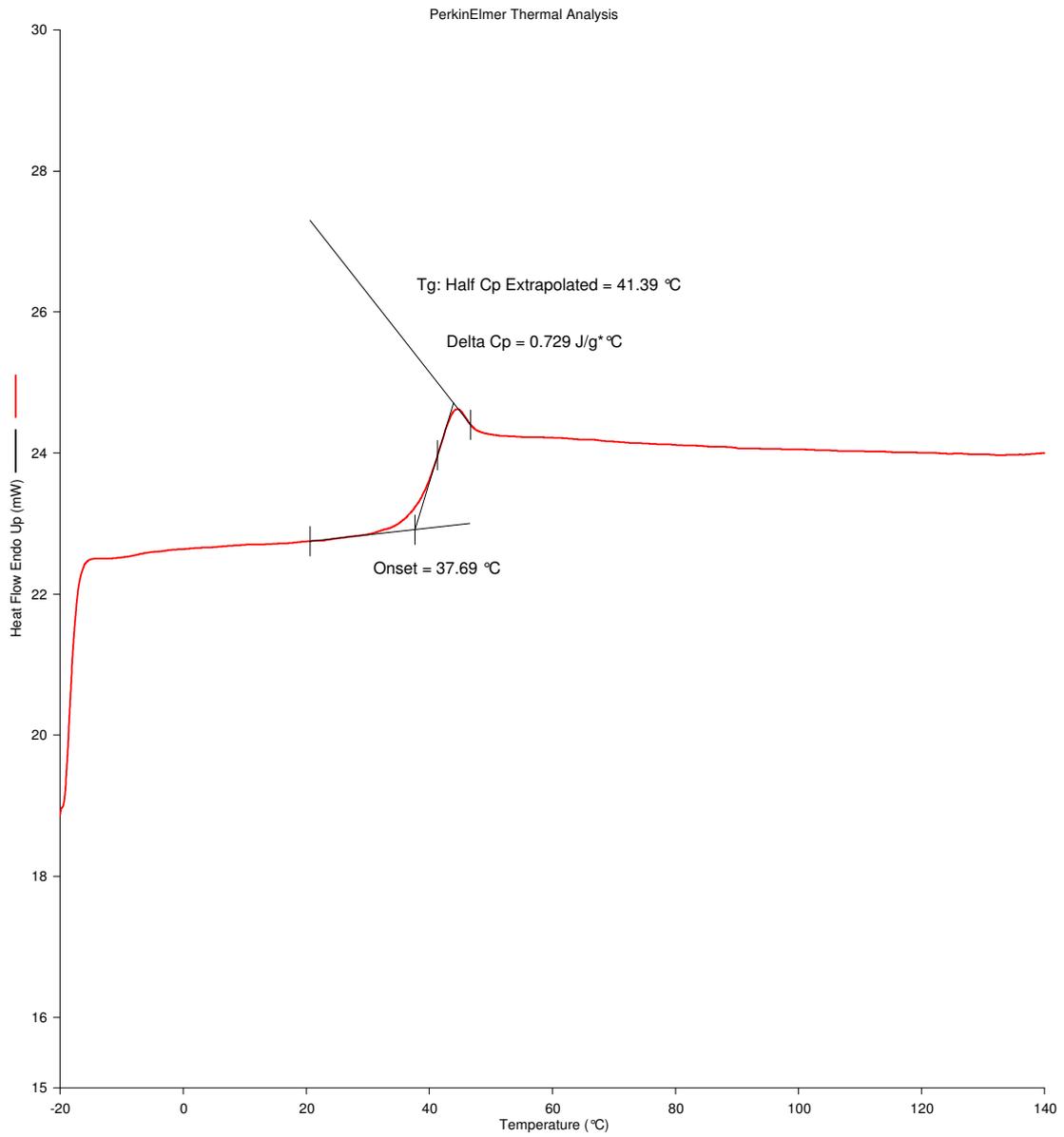


12/10/2008 3:31:05 PM

1) Hold for 1.0 min at -20.00°C
2) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min
3) Cool from 140.00°C to -20.00°C at 100.00°C/min
4) Hold for 3.0 min at -20.00°C
5) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min

Figura A9 – Curva de DSC do PVAc + 1,0% amoxicilina (fase orgânica).

Filename C:\Program Files\Py...lamostra11(marco).dsd
Operator ID Grazielle
Sample ID amostra11(marco)
Sample Weight 16.830 mg
Comment:

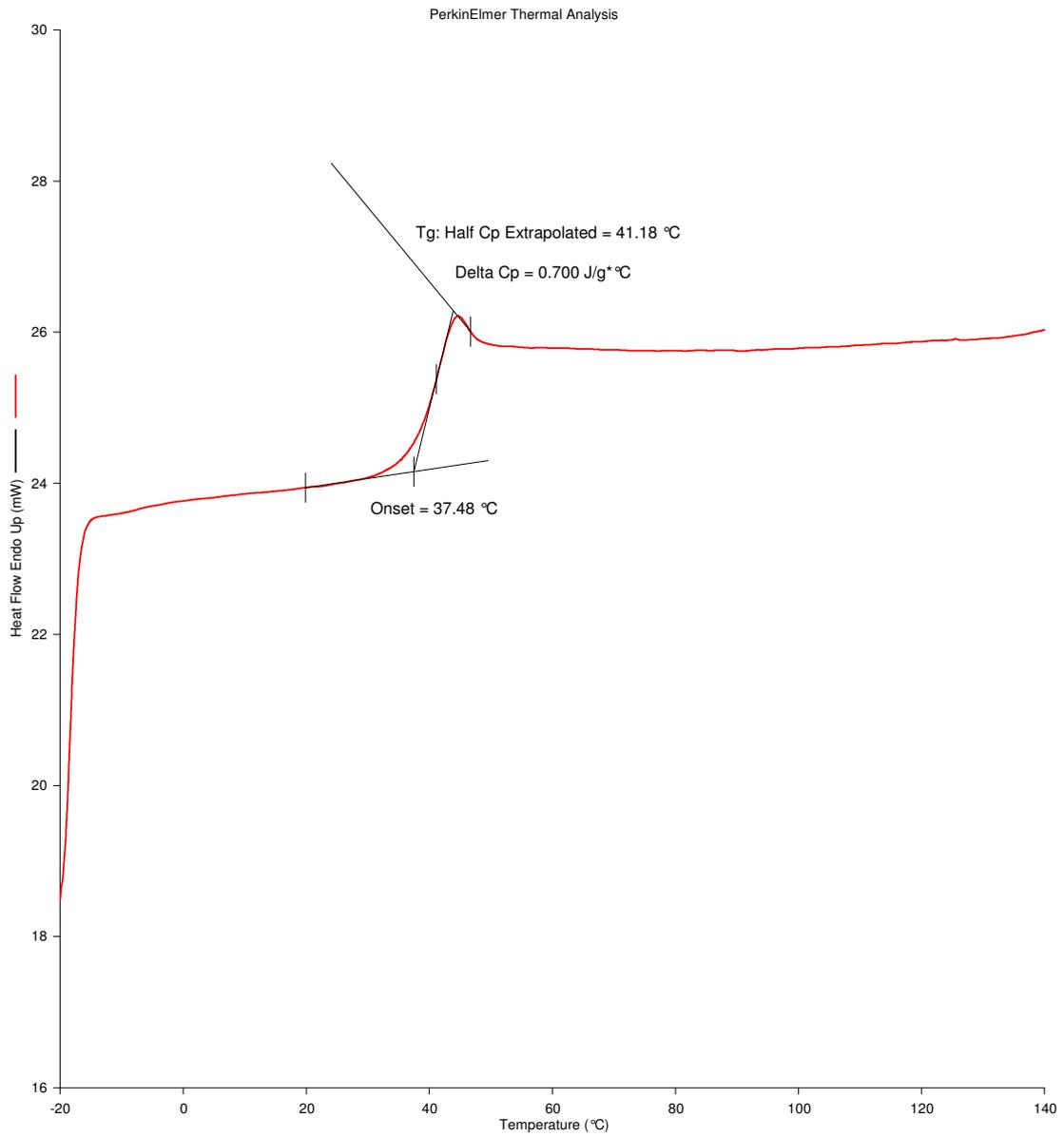


1/15/2009 3:24:21 PM

1) Hold for 1.0 min at -20.00°C
2) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min
3) Cool from 140.00°C to -20.00°C at 100.00°C/min
4) Hold for 3.0 min at -20.00°C
5) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min

Figura A10 – Curva de DSC do PVAc + 0,1% amoxicilina (fase aquosa).

Filename C:\Program Files\Py...lamostra12(marco).dsd
Operator ID Grazielle
Sample ID amostra12(marco)
Sample Weight 20.190 mg
Comment:

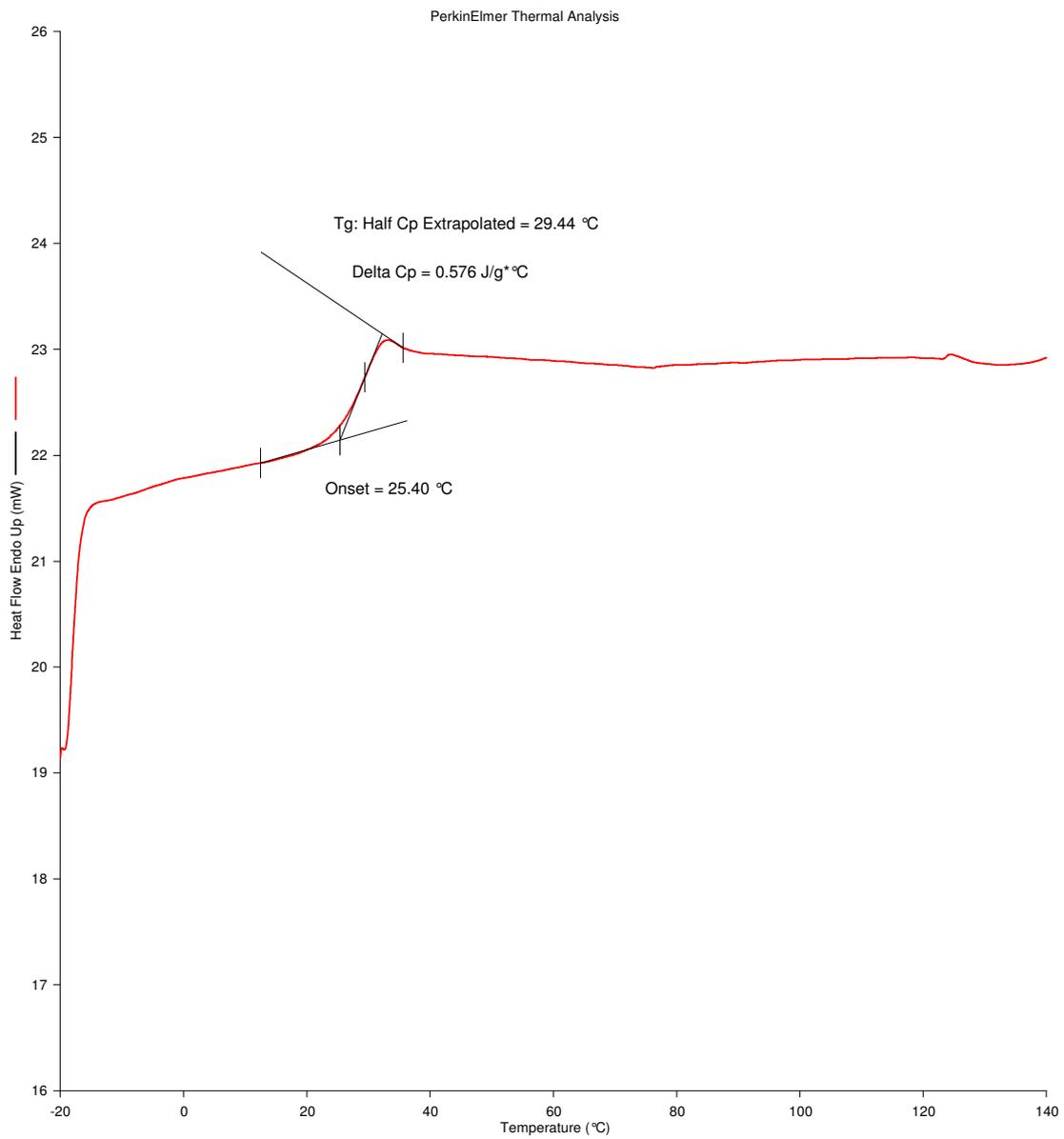


1/15/2009 3:27:09 PM

1) Hold for 1.0 min at -20.00 °C
2) Heat from -20.00 °C to 140.00 °C at 10.00 °C/min
3) Cool from 140.00 °C to -20.00 °C at 100.00 °C/min
4) Hold for 3.0 min at -20.00 °C
5) Heat from -20.00 °C to 140.00 °C at 10.00 °C/min

Figura A11 – Curva de DSC do PVAc + 0,5% amoxicilina (fase aquosa).

Filename C:\Program Files\Pyr...\amostra7(marco).dsd
Operator ID
Sample ID amostra7(marco)
Sample Weight 10.900 mg
Comment:

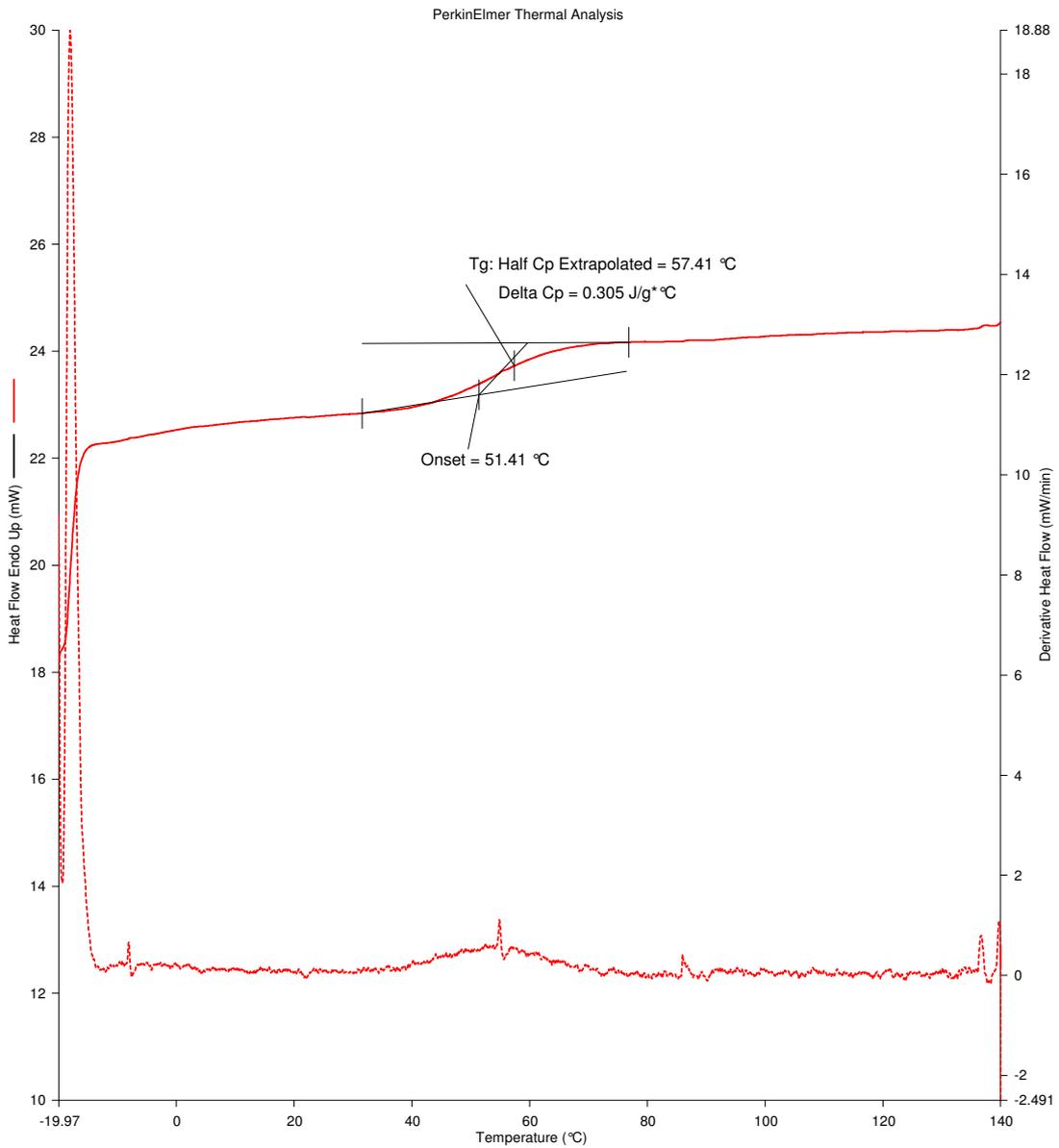


12/17/2008 2:19:17 PM

1) Hold for 1.0 min at -20.00°C
2) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min
3) Cool from 140.00°C to -20.00°C at 100.00°C/min
4) Hold for 3.0 min at -20.00°C
5) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min

Figura A12 – Curva de DSC do PVAc + 1,0% amoxicilina (fase aquosa).

Filename C:\Program Files\Py...lamostra15(marco).dsd
 Operator ID Grazielle
 Sample ID amostra15(marco)
 Sample Weight 17.060 mg
 Comment:

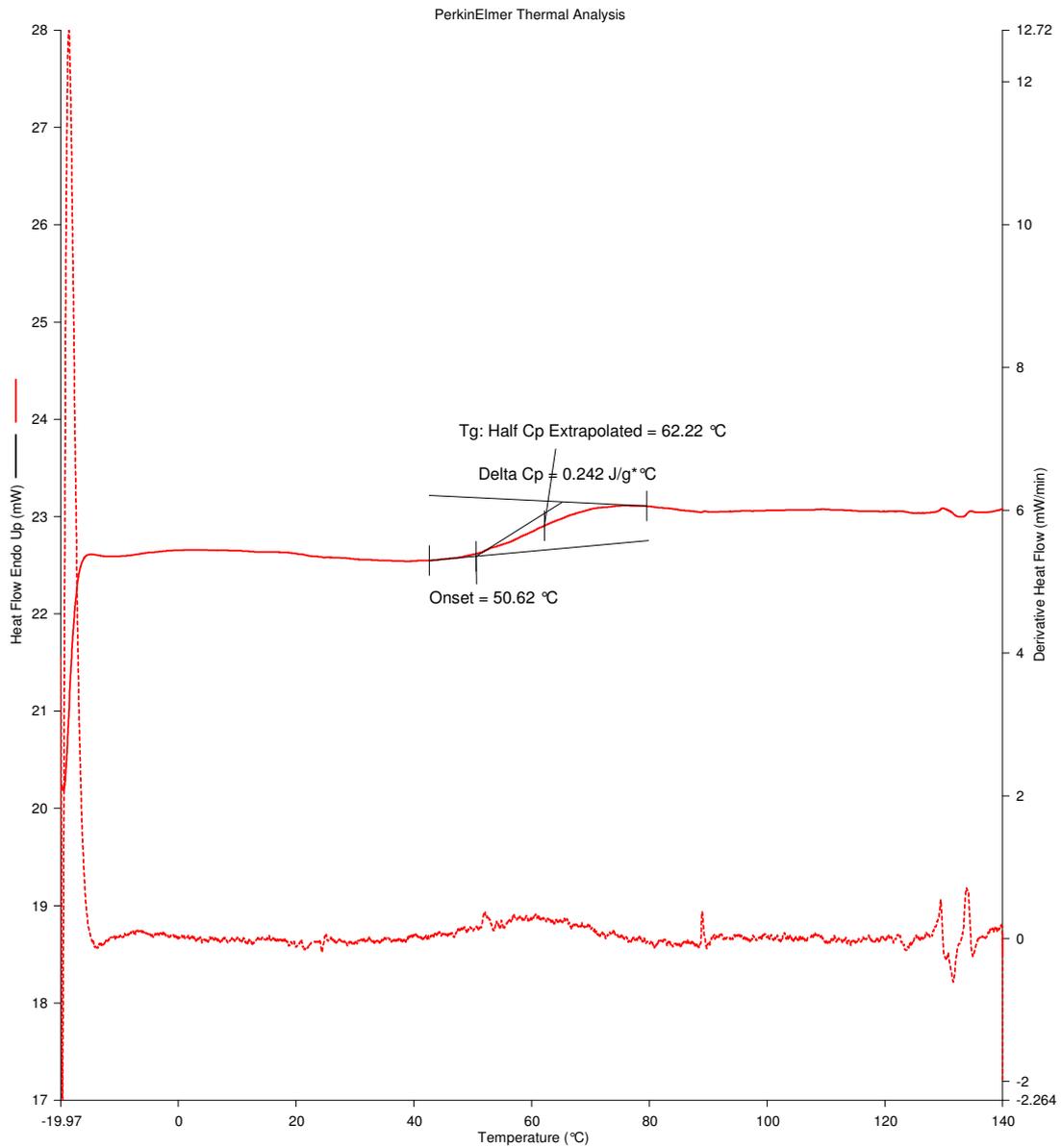


1/28/2009 3:53:19 PM

- | | |
|---|--|
| 1) Hold for 1.0 min at -20.00°C | 4) Hold for 3.0 min at -20.00°C |
| 2) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min | 5) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min |
| 3) Cool from 140.00°C to -20.00°C at 100.00°C/min | |

Figura A13 – Curva de DSC do PVAc-co-PMMA.

Filename	C:\Program Files\Py...lamostra16(marco).dsd
Operator ID	Grazielle
Sample ID	amostra16(marco)
Sample Weight	12.460 mg
Comment:	

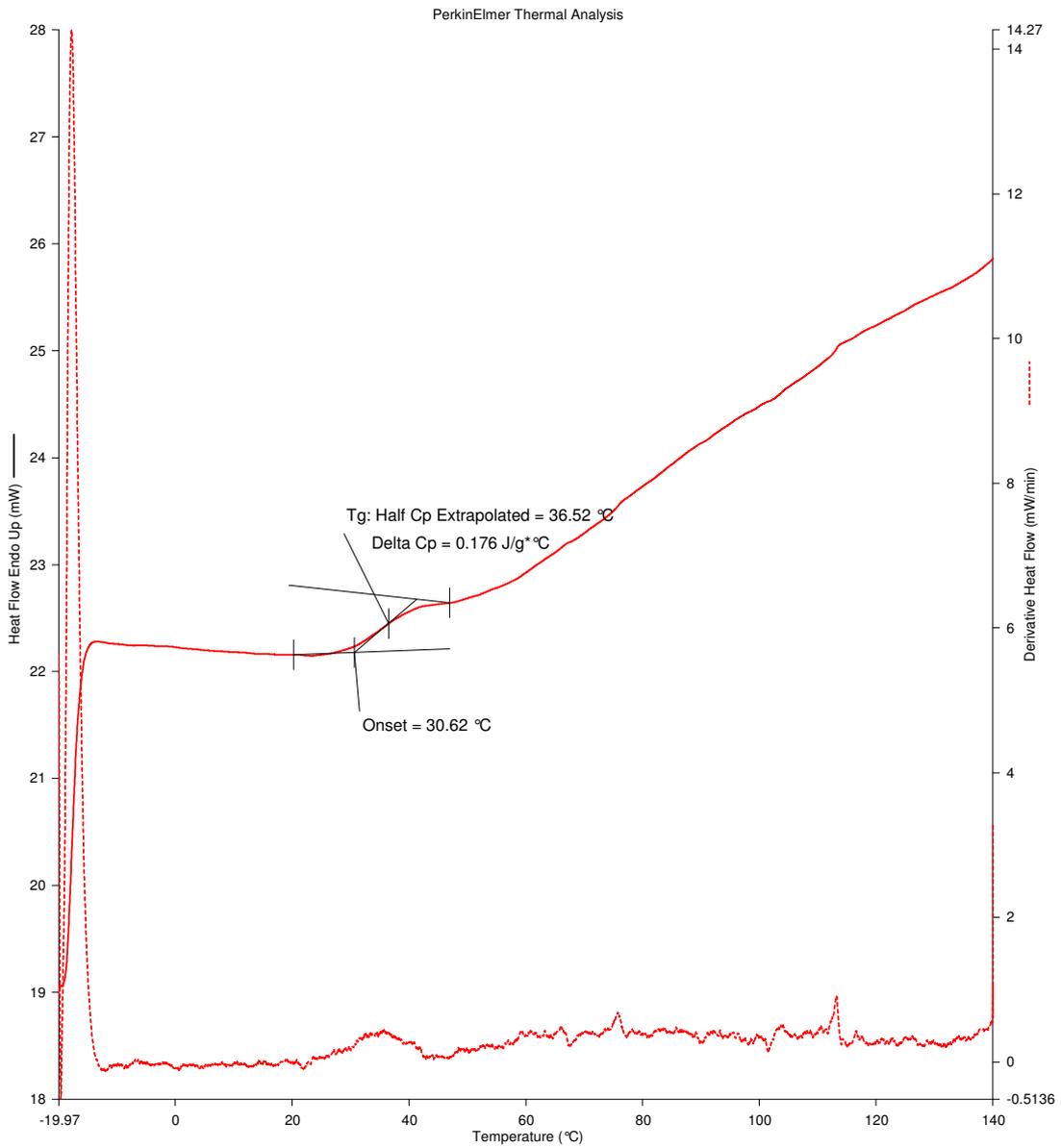


2/12/2009 4:43:11 PM

1) Hold for 1.0 min at -20.00°C	4) Hold for 3.0 min at -20.00°C
2) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min	5) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min
3) Cool from 140.00°C to -20.00°C at 100.00°C/min	

Figura A14 – Curva de DSC do PVAc-co-PMMA + 0,1% amoxicilina (fase orgânica).

Filename C:\Program Files\Py...lamostra10(marco).dsd
 Operator ID
 Sample ID amostra10(marco)
 Sample Weight 17.560 mg
 Comment:

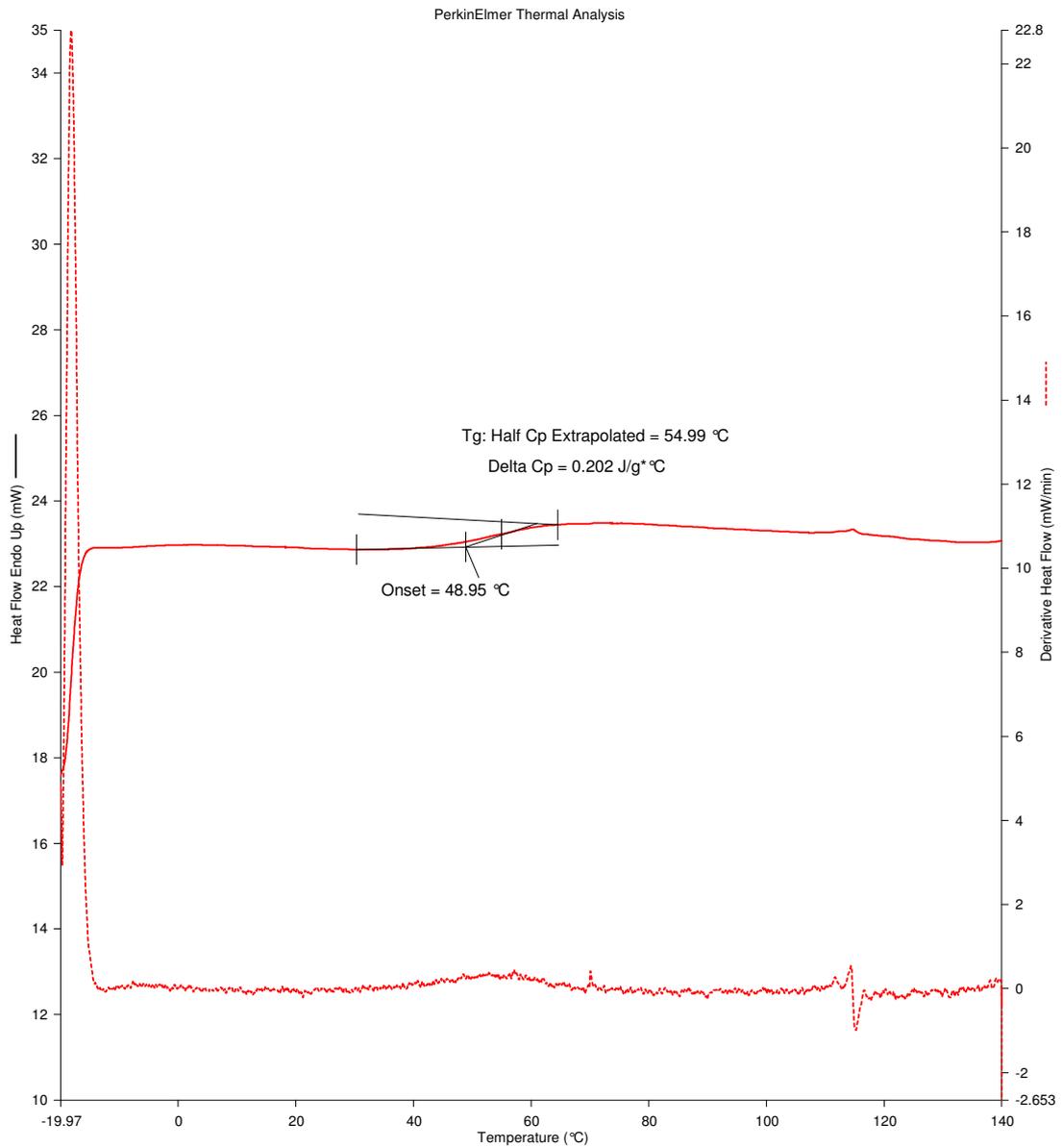


12/17/2008 1:27:31 PM

1) Hold for 1.0 min at -20.00°C	4) Hold for 3.0 min at -20.00°C
2) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min	5) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min
3) Cool from 140.00°C to -20.00°C at 100.00°C/min	

Figura A15 – Curva de DSC do PVAc-co-PMMA + 0,5% amoxicilina (fase orgânica).

Filename C:\Program Files\Py...lamostra14(marco).dsd
 Operator ID Grazielle
 Sample ID amostra14(marco)
 Sample Weight 17.090 mg
 Comment:

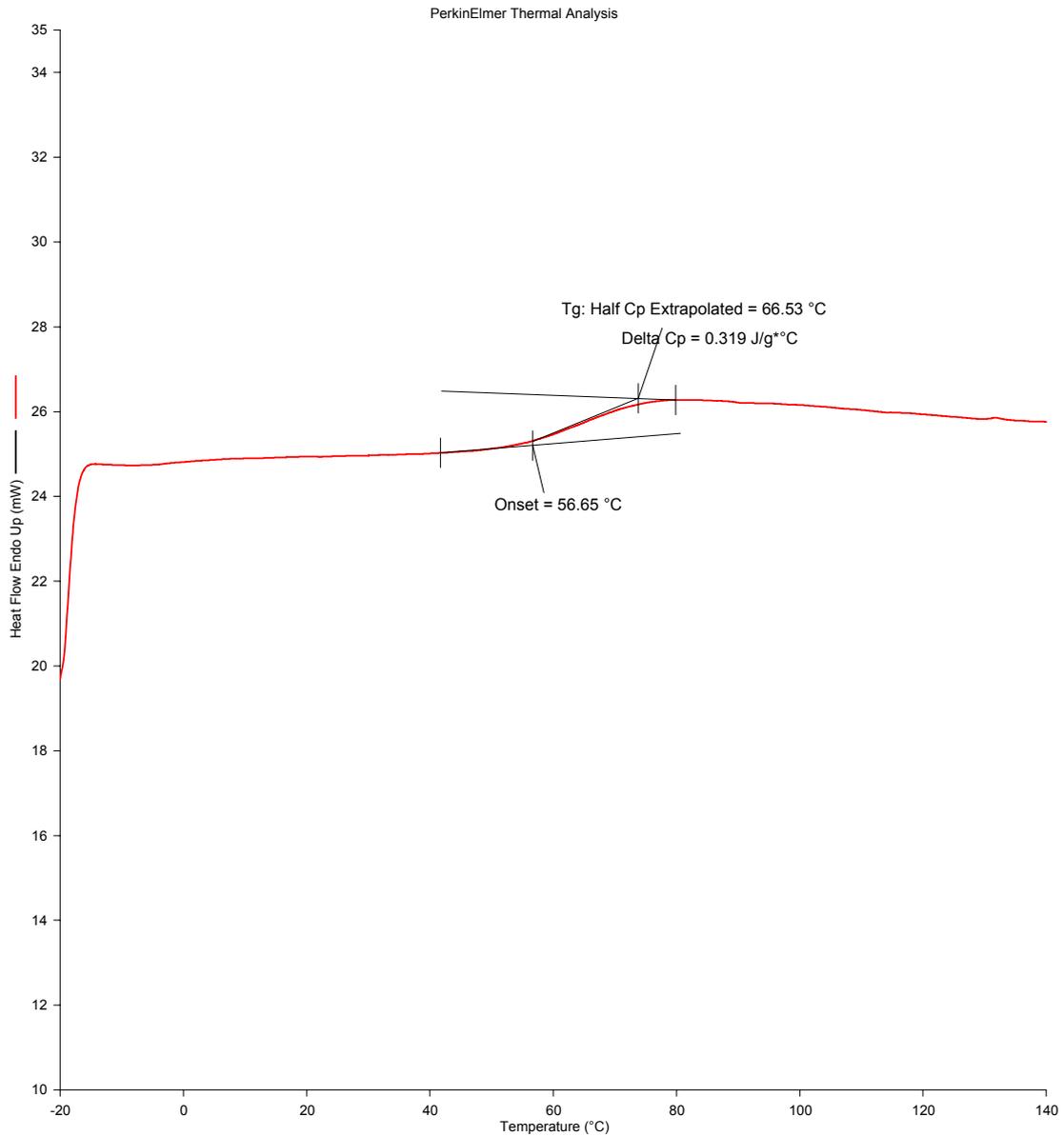


1/28/2009 2:54:47 PM

1) Hold for 1.0 min at -20.00°C
 2) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min
 3) Cool from 140.00°C to -20.00°C at 100.00°C/min
 4) Hold for 3.0 min at -20.00°C
 5) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min

Figura A16 – Curva de DSC do PVAc-co-PMMA + 1,0% amoxicilina (fase orgânica).

Filename	C:\Program Fil...\amostra17(leilane)dsd.dsd
Operator ID:	Grazielle
Sample ID:	amostra17(leilane)
Sample Weight:	19.450 mg
Comment:	

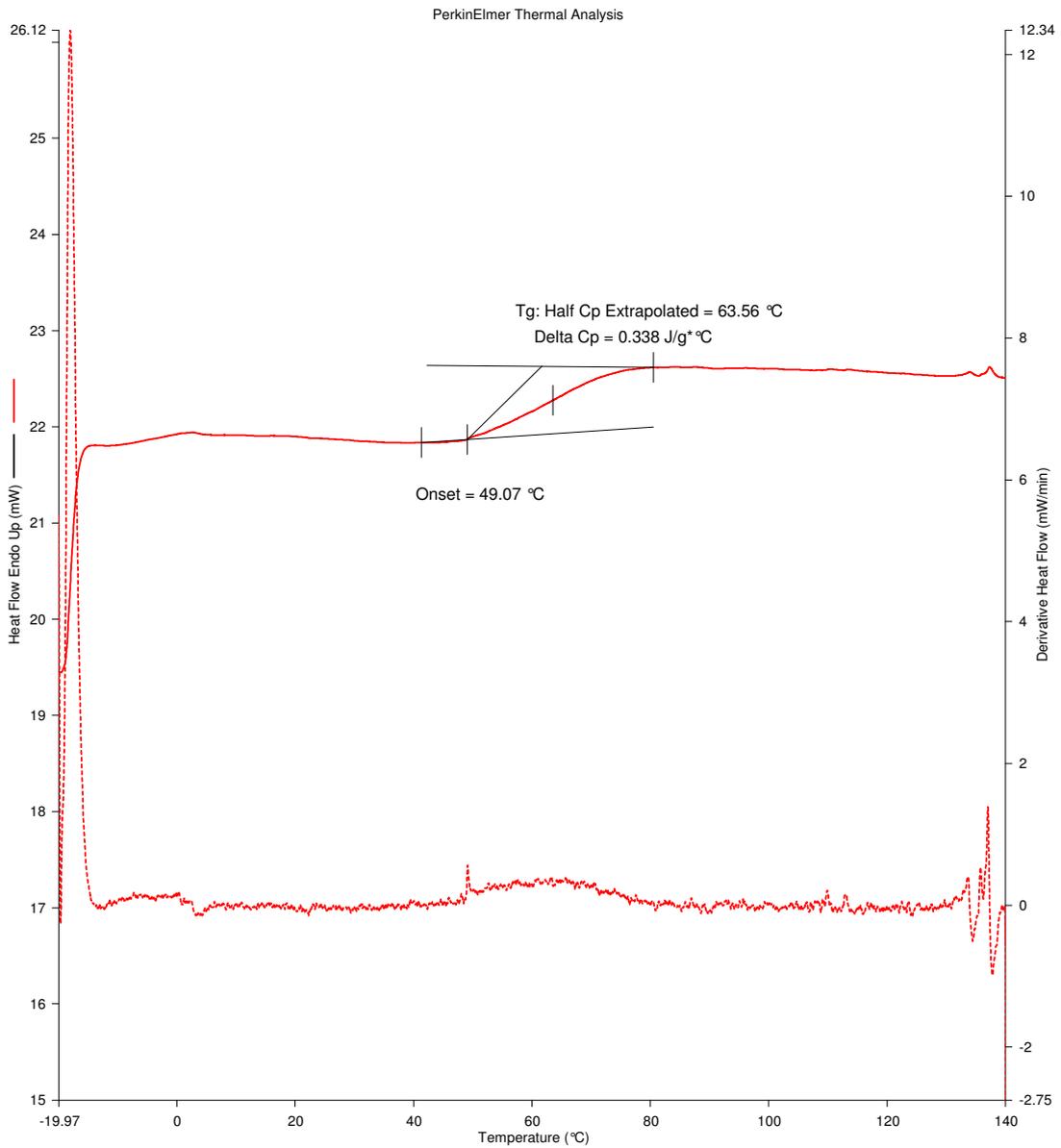


7/20/2009 2:31:37 PM

1) Hold for 1.0 min at -20.00°C	4) Hold for 3.0 min at -20.00°C
2) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min	5) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min
3) Cool from 140.00°C to -20.00°C at 100.00°C/min	

Figura A17 – Curva de DSC do PVAc-co-PMMA + 0,1% amoxicilina (fase aquosa).

Filename C:\Pro...\amostra14(marco)\090128142731.dsd
 Operator ID Grazielle
 Sample ID amostra13(marco)
 Sample Weight 12.430 mg
 Comment:

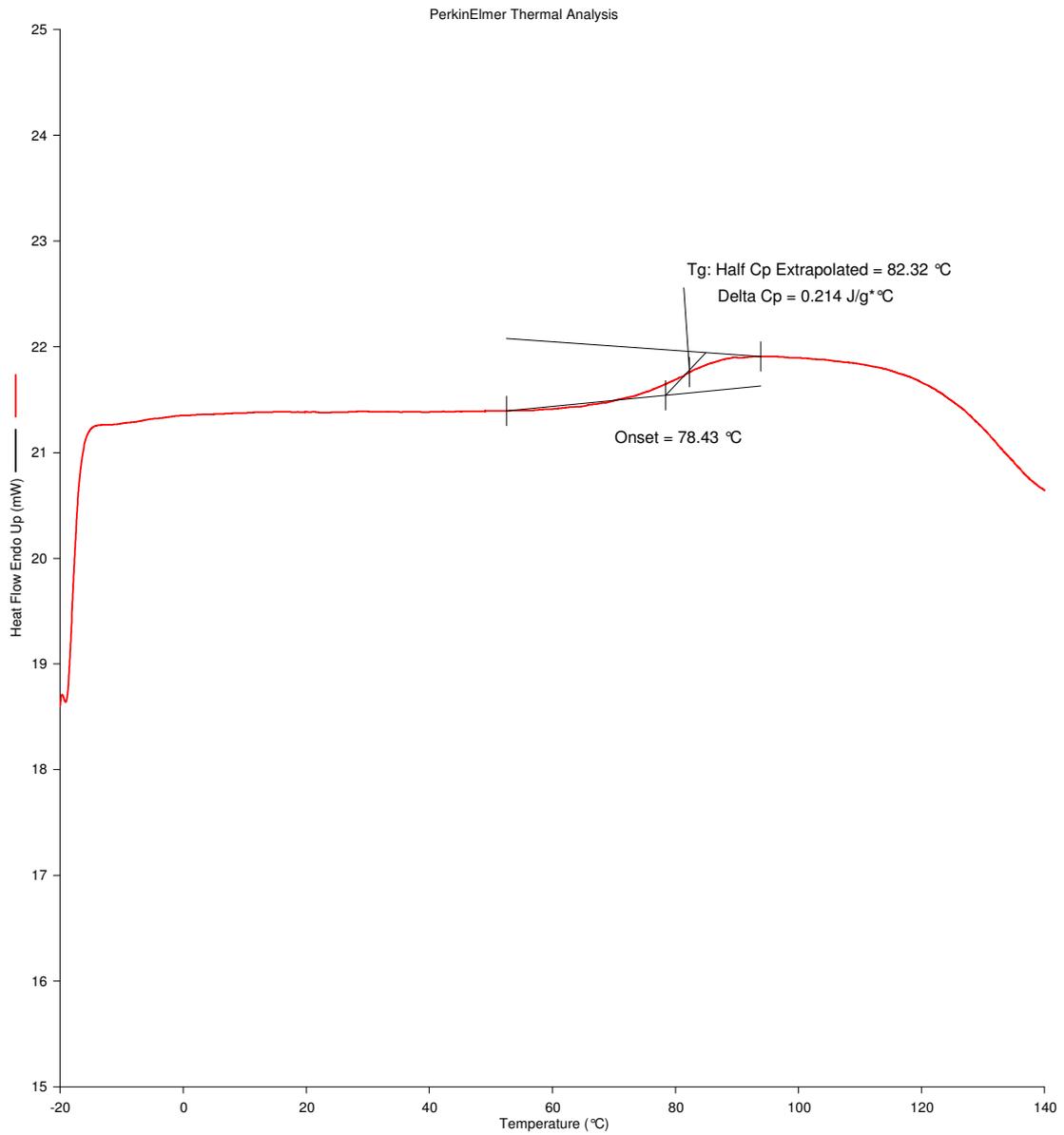


1/28/2009 3:10:45 PM

1) Hold for 1.0 min at -20.00 °C
 2) Heat from -20.00 °C to 140.00 °C at 10.00 °C/min
 3) Cool from 140.00 °C to -20.00 °C at 100.00 °C/min
 4) Hold for 3.0 min at -20.00 °C
 5) Heat from -20.00 °C to 140.00 °C at 10.00 °C/min

Figura A18 – Curva de DSC do PVAc-co-PMMA + 0,5% amoxicilina (fase aquosa).

Filename C:\Program Files\Pyr...\amostra8(marco).dsd
Operator ID
Sample ID amostra8(marco)
Sample Weight 11.010 mg
Comment:



12/10/2008 4:02:38 PM

1) Hold for 1.0 min at -20.00°C
2) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min
3) Cool from 140.00°C to -20.00°C at 100.00°C/min
4) Hold for 3.0 min at -20.00°C
5) Heat from -20.00°C to 140.00°C at 10.00°C/min

Figura A19 – Curva de DSC do PVAc-co-PMMA + 1,0% amoxicilina (fase aquosa).

Ressonância Magnética Nuclear

Nas páginas a seguir são apresentadas espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de outras amostras de polímeros de PVAc e copolímeros de PVAc-co-PMMA que não foram apresentados no Capítulo 2 e no Capítulo 3.

Conforme descrito na seção de material e métodos do Capítulo 2, as análises de ^{13}C -RMN foram realizadas em equipamento Varian UNIT-Plus (Varian Analytical Instruments, EUA), operado a 100 MHz e equipado com sonda de 10 mm de diâmetro interno. Para o preparo das amostras, utilizou-se clorofórmido deuterado (CDCl_3 ; $\delta = 77.16$ ppm). O tetrametilsilano (TMS) foi usado como referência interna e manteve-se a temperatura em aproximadamente 25 °C em todas as análises.

Os espectros de ^1H -RMN são referentes às amostras reportadas no Capítulo 3 e conforme descrito na seção de material e métodos do Capítulo 3, as análises foram realizadas em equipamento Bruker DPX 300 (Bruker Co.), operado a 300 MHz e equipado com sonda de 5 mm de diâmetro interno. Para o preparo das amostras, utilizou-se dimetilsulfóxido deuterado (DMSO ; $\delta = 2.5$ ppm). O tetrametilsilano (TMS) foi usado como referência interna e manteve-se a temperatura em aproximadamente 25 °C em todas as análises.

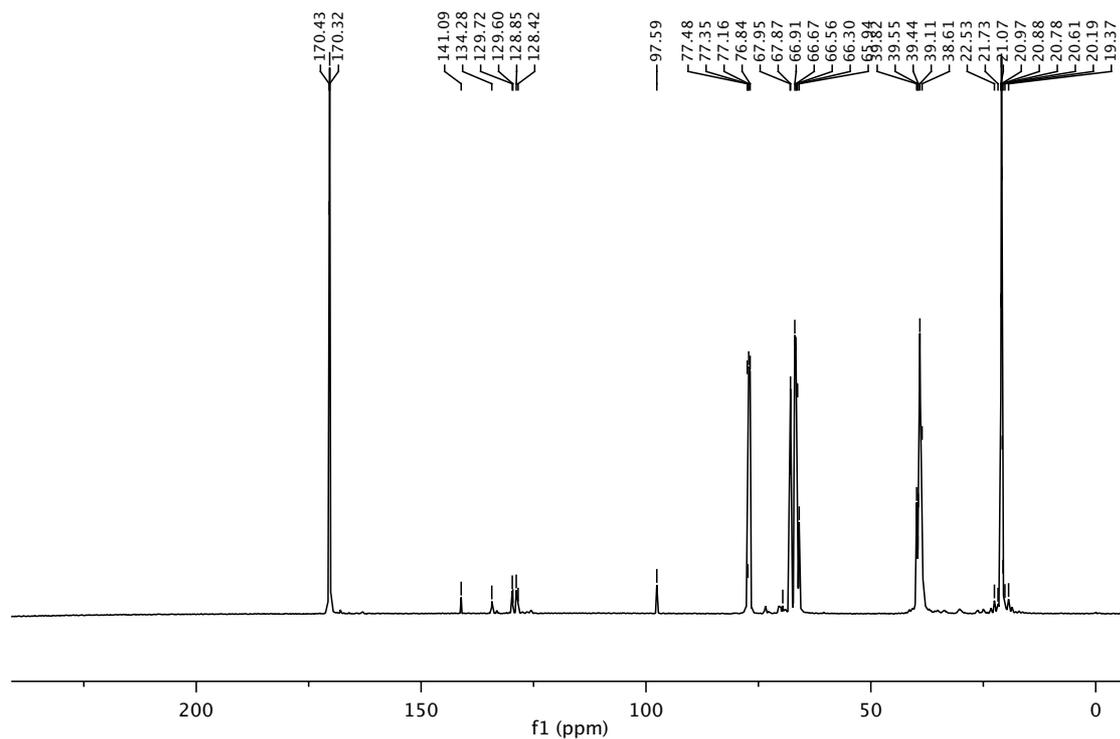


Figura A20 – Espectro de ^{13}C -RMN do PVAc sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina (0,1%) à fase orgânica da polimerização do acetato de vinila (Capítulo 2).

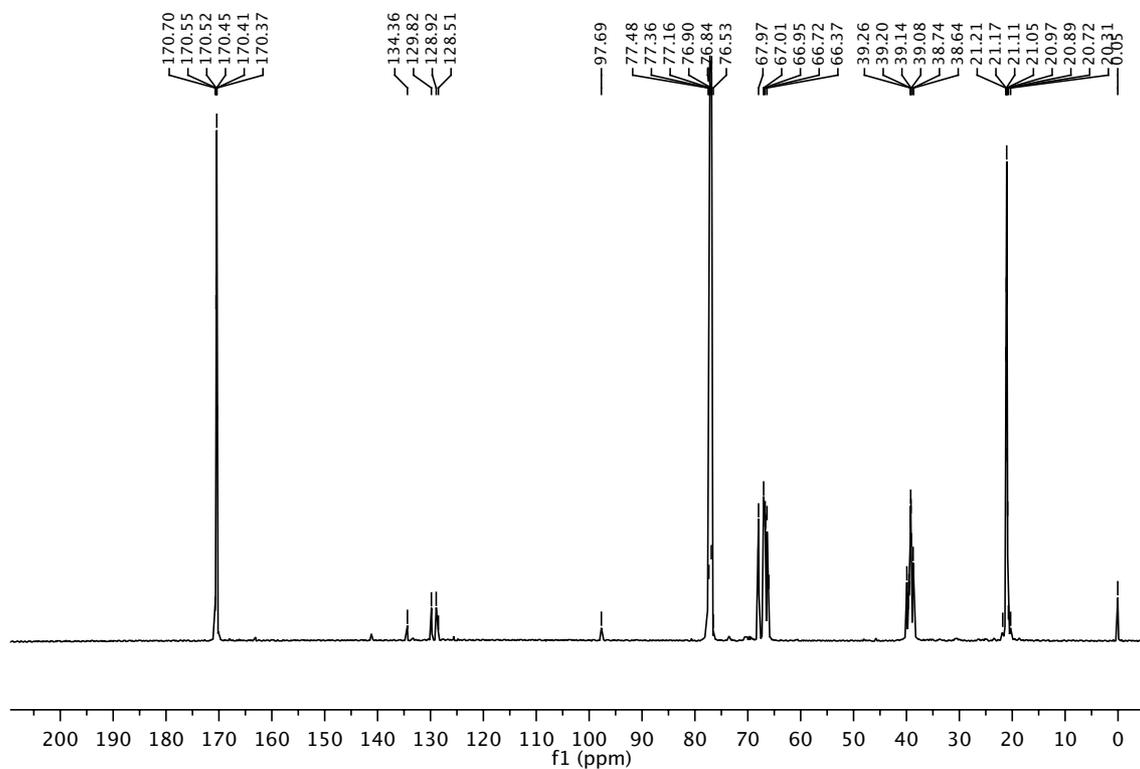


Figura A21 – Espectro de ^{13}C -RMN do PVAc sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina (0,1%) à fase aquosa da polimerização do acetato de vinila (Capítulo 2).

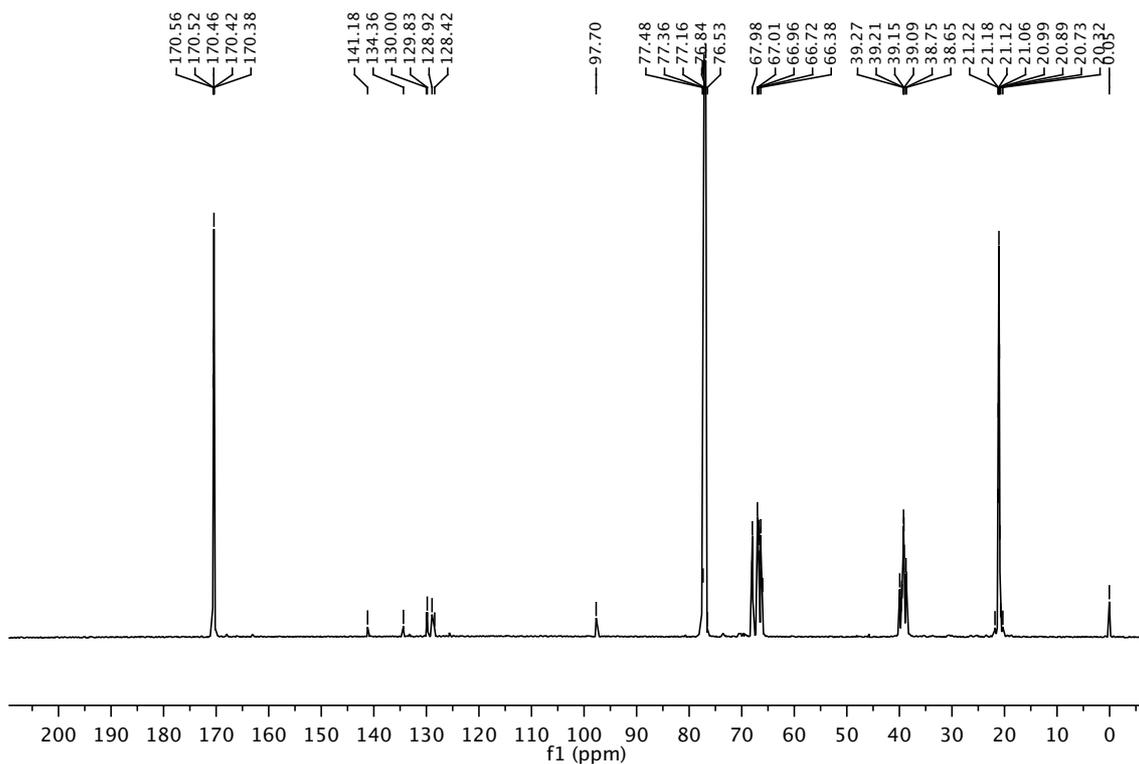


Figura A22 – Espectro de ^{13}C -RMN do PVAc sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina (0,5%) à fase aquosa da polimerização do acetato de vinila (Capítulo 2).

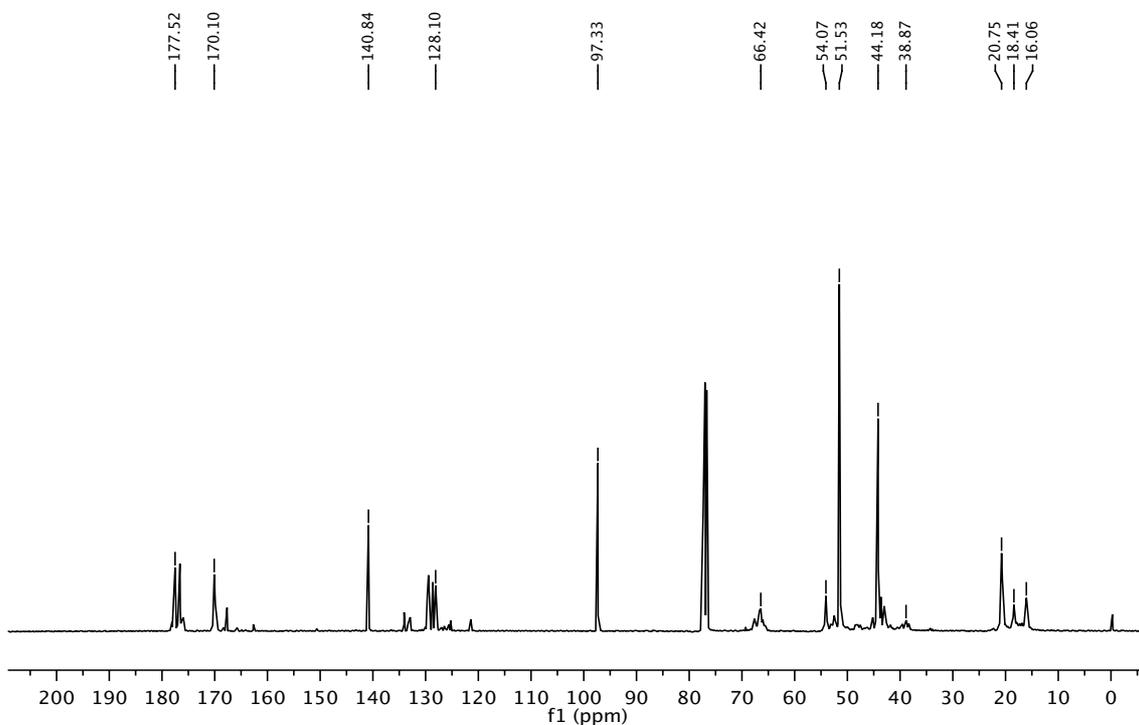


Figura A23 – Espectro de ^{13}C -RMN do PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina (0,1%) à fase orgânica da copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila (Capítulo 2).

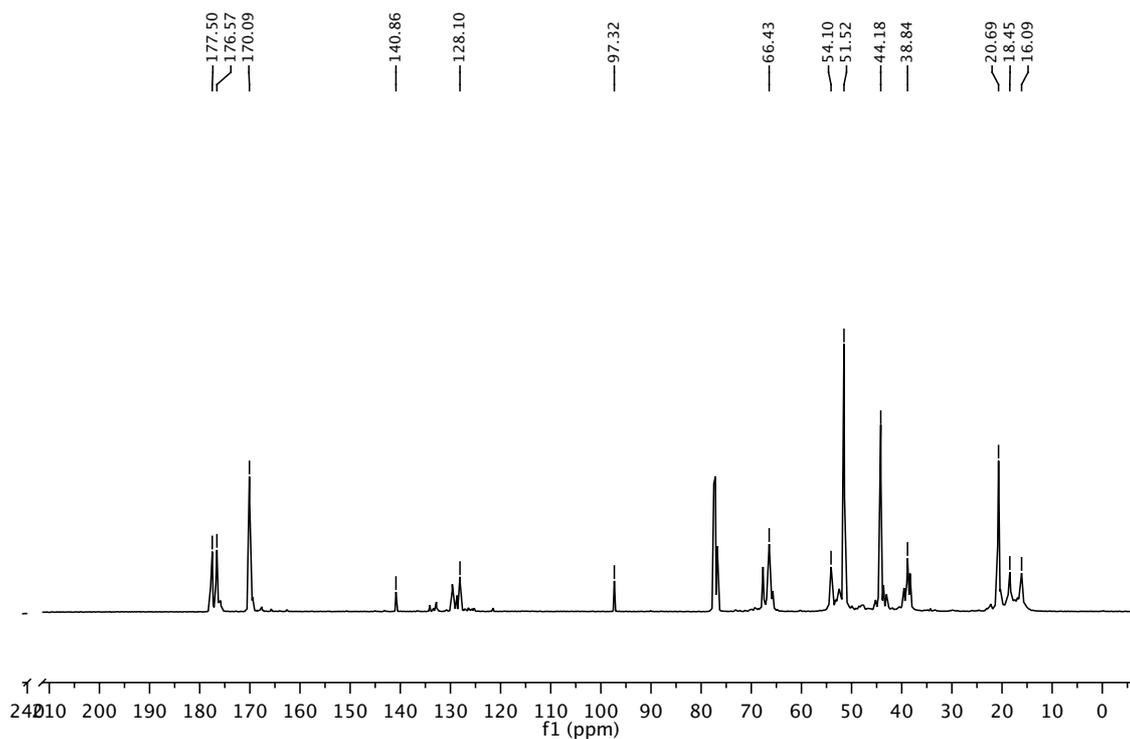


Figura A24 – Espectro de ^{13}C -RMN do PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina (0,5%) à fase orgânica da copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila (Capítulo 2).

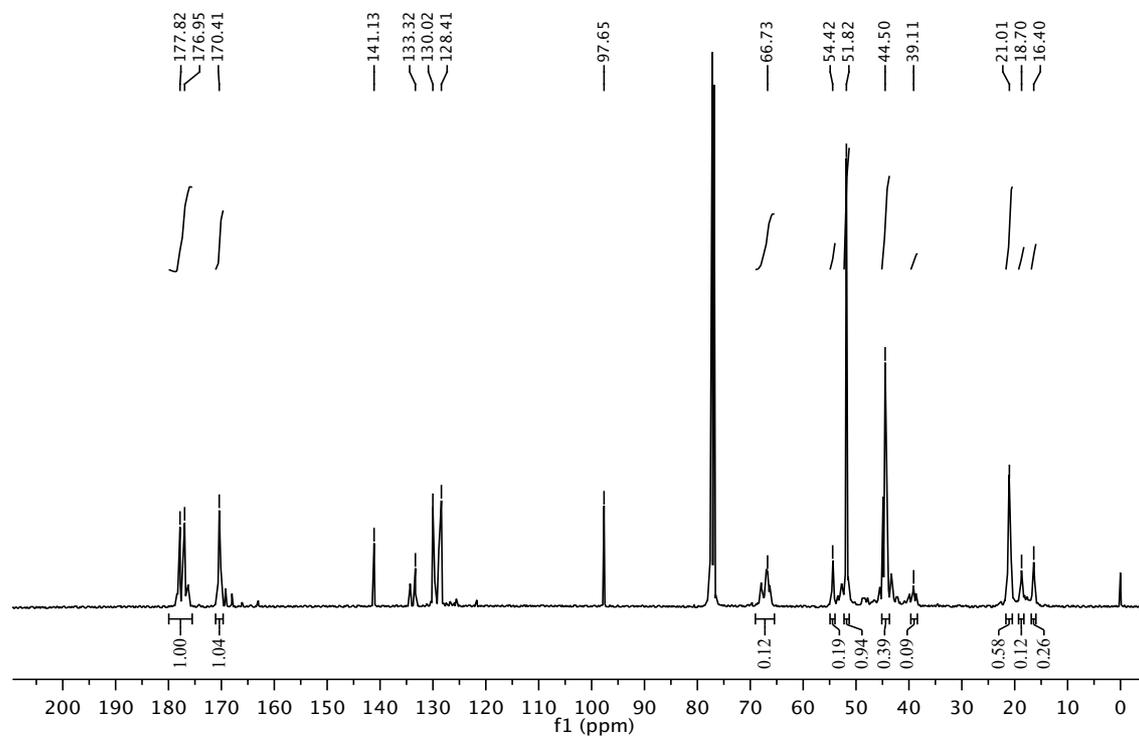


Figura A25 – Espectro de ^{13}C -RMN do PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina (1%) à fase orgânica da copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila (Capítulo 2).

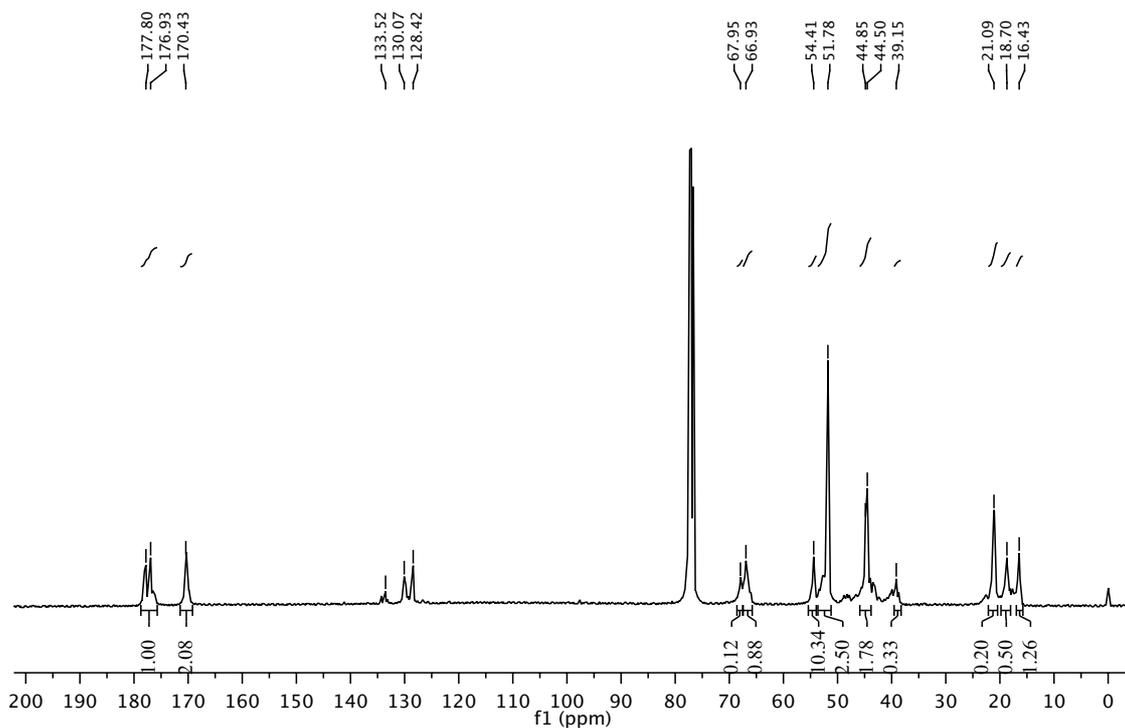


Figura A26 – Espectro de ^{13}C -RMN do PVA/PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina (1%) à fase orgânica da copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila e posterior processo de saponificação (Capítulo 2).

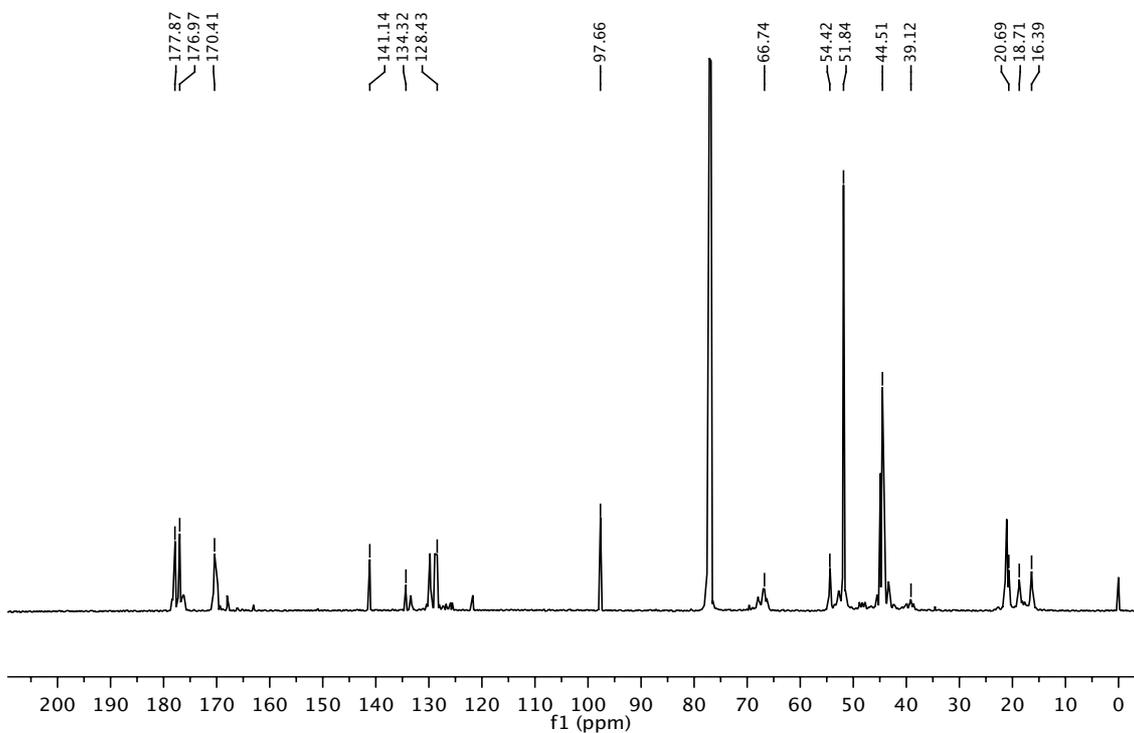


Figura A27 – Espectro de ^{13}C -RMN do PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina (0,1%) à fase aquosa da copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila (Capítulo 2).

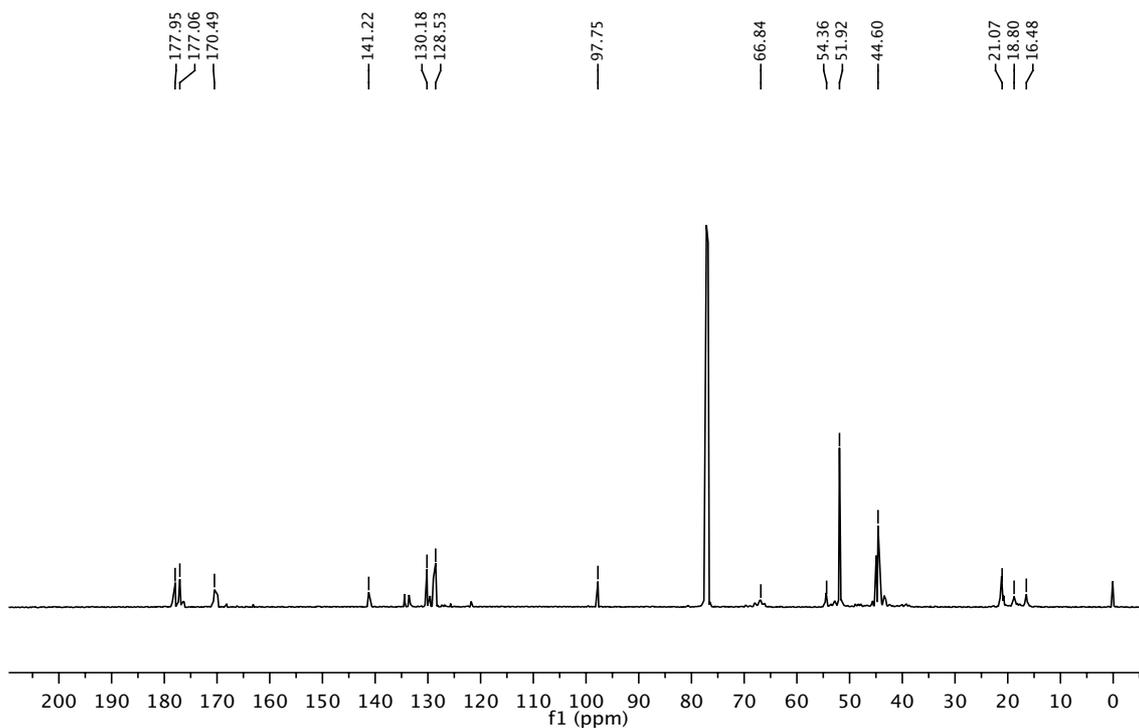


Figura A28 – Espectro de ^{13}C -RMN do PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina (0,5%) à fase aquosa da copolimerização do acetato de vinila e metacrilato de metila (Capítulo 2).

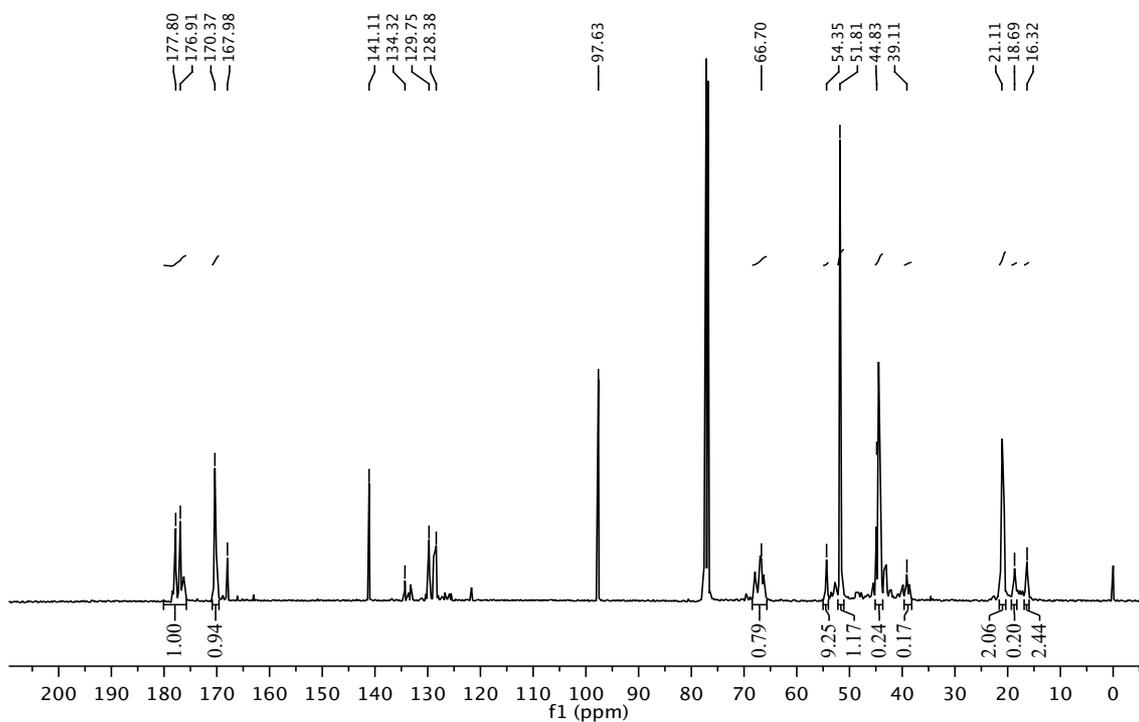


Figura A29 – Espectro de ^{13}C -RMN do PVAc-co-PMMA (Capítulo 2).

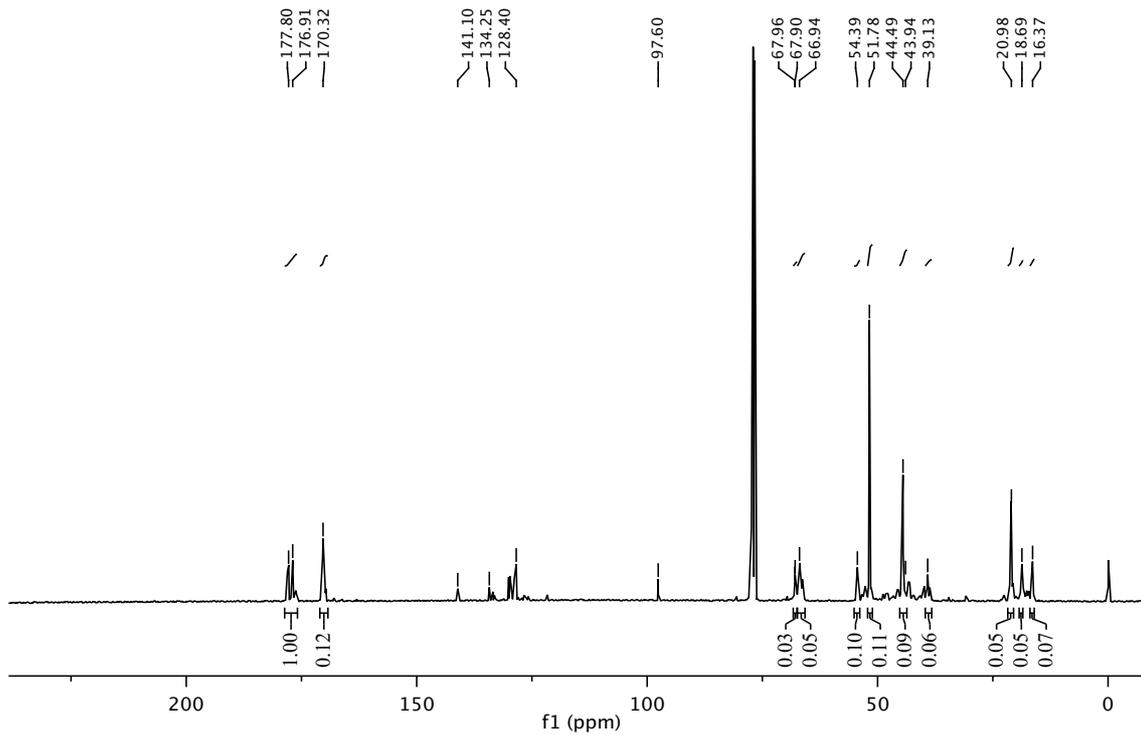


Figura A30 – Espectro de ^{13}C -RMN do PVA/PVAc-co-PMMA (Capítulo 2).

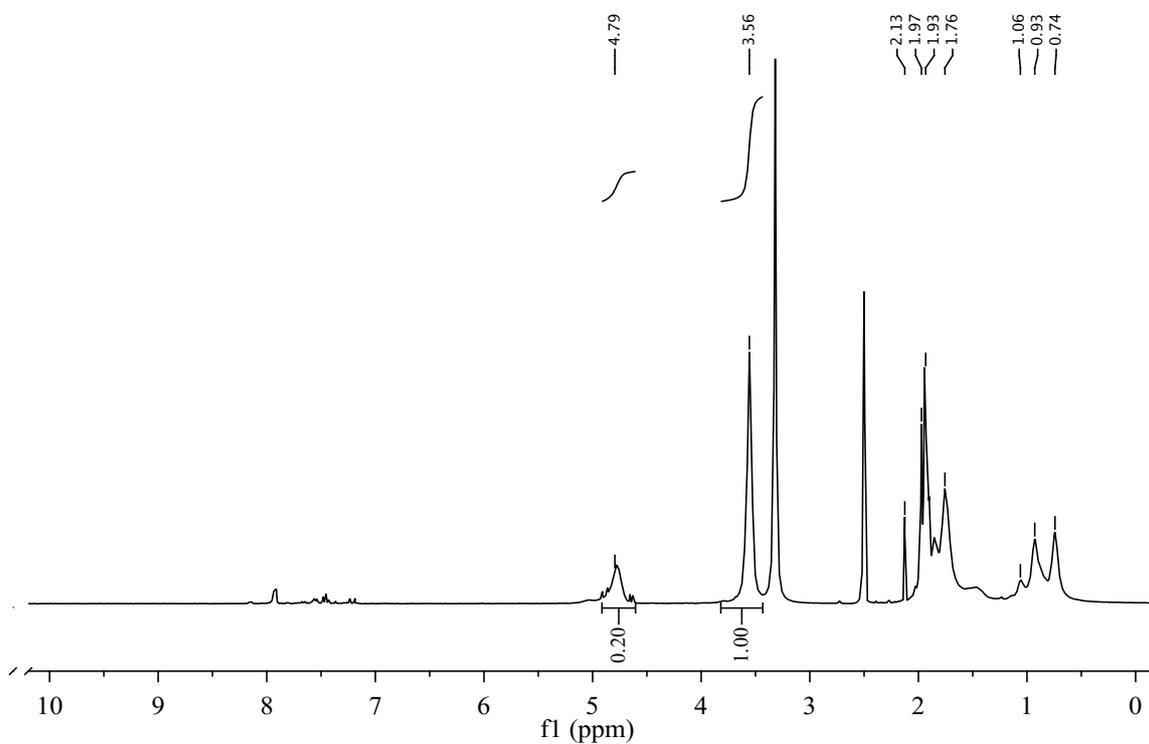


Figura A31 – Espectro de ^1H -RMN do PVAc-co-PMMA (Capítulo 3).

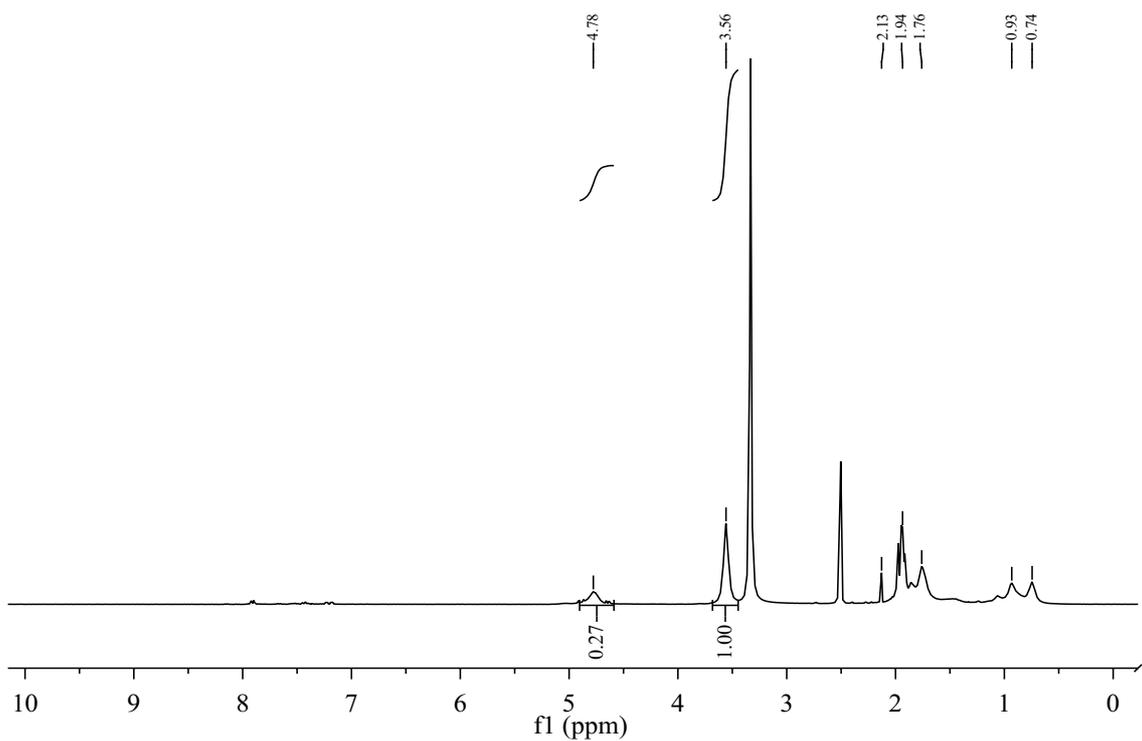


Figura A32 – Espectro de ^1H -RMN do PVA/PVAc-co-PMMA (Capítulo 3).

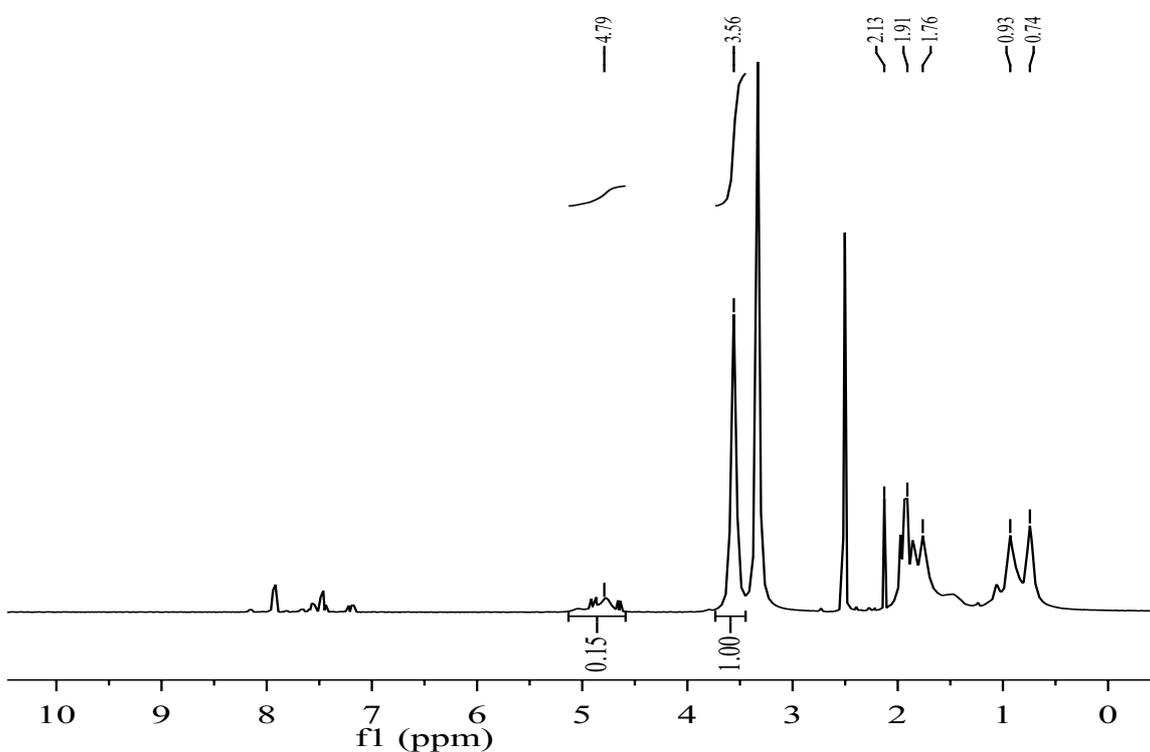


Figura A31 – Espectro de ^1H -RMN do PVA/PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina (1%) à fase aquosa da copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila e posterior processo de saponificação (Capítulo 3).

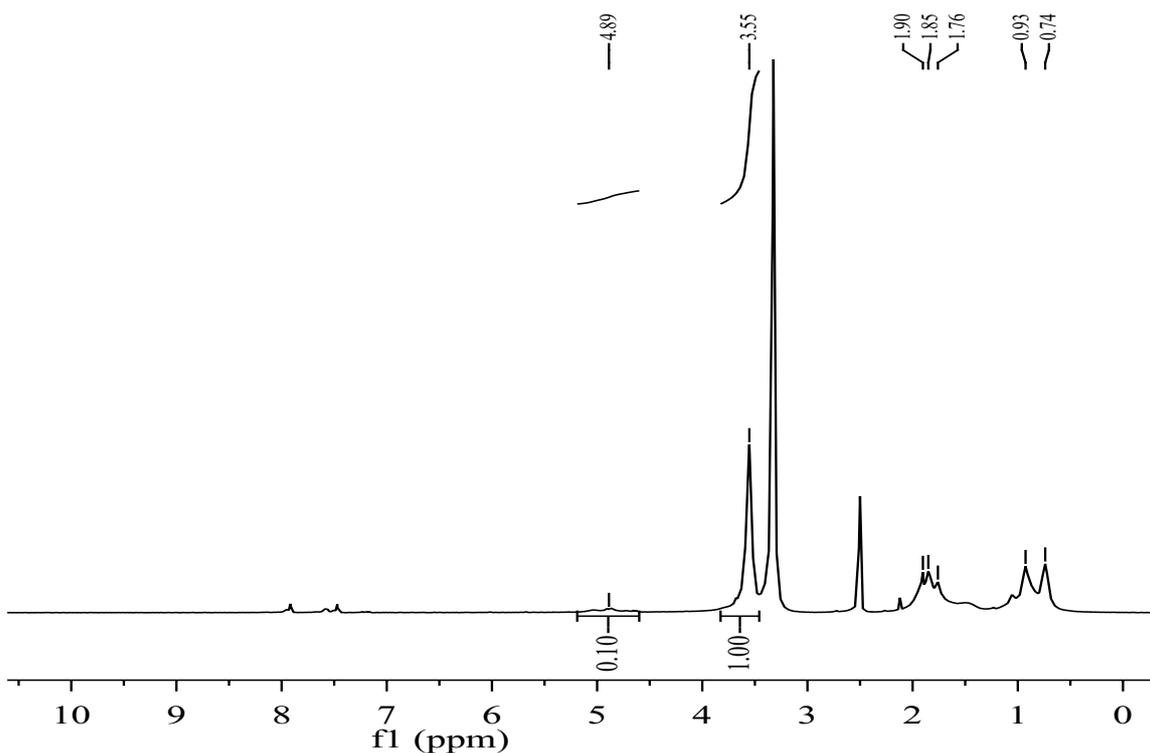


Figura A32 – Espectro de ¹H-RMN do PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina (3%) à fase aquosa da copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila (Capítulo 3).

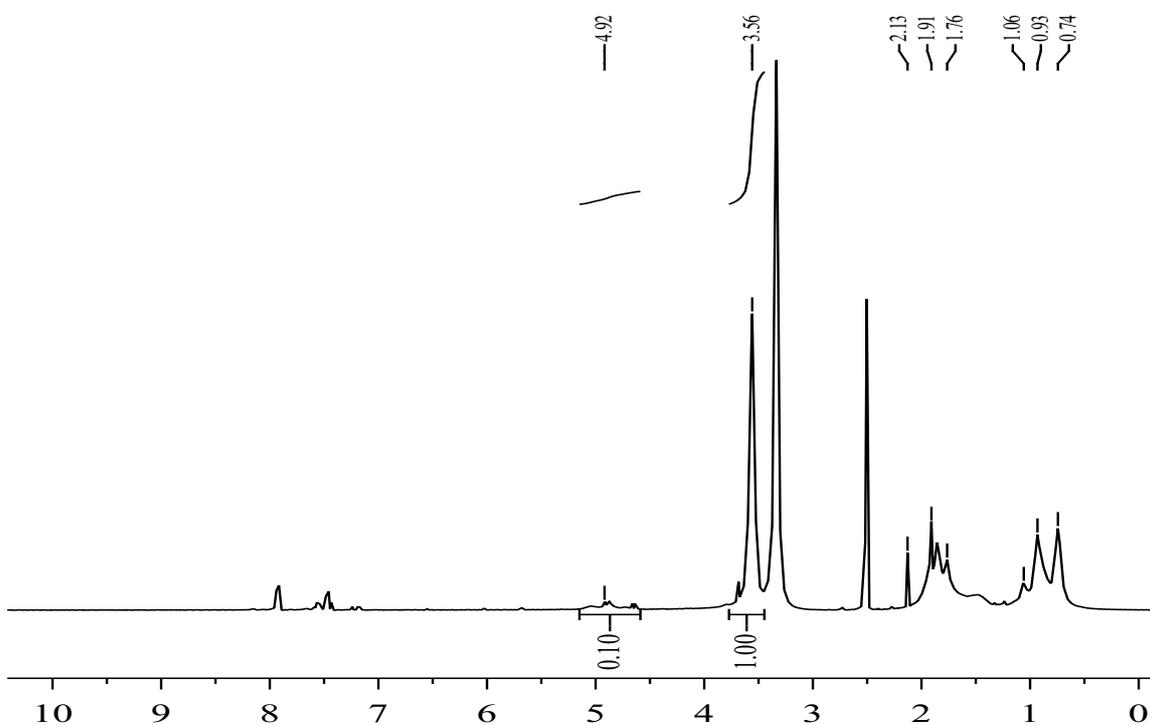


Figura A31 – Espectro de ¹H-RMN do PVA/PVAc-co-PMMA sintetizado com incorporação *in situ* de amoxicilina (3%) à fase aquosa da copolimerização em suspensão do acetato de vinila e metacrilato de metila e posterior processo de saponificação (Capítulo 3).