

FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA
LIBERAÇÃO DE MEDICAMENTOS SÍTIO-DIRIGIDA

Ana Cristina Bomfim Peixoto

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

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Helen Conceição Ferraz

Rio de Janeiro

Março de 2013

FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA
LIBERAÇÃO DE MEDICAMENTOS SÍTIO-DIRIGIDA

Ana Cristina Bomfim Peixoto

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

Examinada por:

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

Prof^a. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Prof. Marcio Nele de Souza, D.Sc.

Prof^a. Cristina Tristão de Andrade, D.Sc.

Prof^a. Priscilla Vanessa Finotelli, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2013

Peixoto, Ana Cristina Bomfim

Funcionalização de nanopartículas poliméricas para liberação de medicamentos sítio-dirigida/ Ana Cristina Bomfim Peixoto. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013.

XX, 173.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Helen Conceição Ferraz

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 120-129.

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

A minha Família e ao
progresso da ciência.

Agradecimentos

A minha querida mãe, que infelizmente não presenciará esta formação, porém é eterna influenciadora dos meus estudos e conquistas.

A minha família, meu pai lindo, meu irmão João, minha irmã Paula, meus tios e primos e minha sobrinha fofa pelo incentivo, pois, apesar da saudade, me apoiaram nesta escolha. Pai, você é meu porto seguro.

Prof. Zé Carlos pela maravilhosa orientação, que me ensinou a usar “os olhos de quem quer ver”.

Professora Helen Ferraz pela incrível disposição em me ajudar a entender os fenômenos.

Todos os professores internos e externos ao PEQ que, de alguma forma, contribuíram com a minha formação. Especialmente à Prof. Vera Salin (PEQ), por se empenhar na formação de pessoas pensantes e não-conformadas, à Soninha (CCS) pelas aulas de como escrever muito bem e ao Prof. Asher (UFBA) pela carta de recomendação.

A meus amigos da boa terra (Salvador-BA) pela energia enviada.

Aos novos e velhos amigos que (re)encontrei aqui no Rio por me fazerem sentir em casa e pela força de sempre: Bia, Nay, Daniel, Greice, Vitor, Saminha, Lucas...

A meus amigos e colegas da turma de mestrado, pois foram a razão das alegrias e o consolo dos desesperos (entenda-se todos: Anderson, Carla, Bruno, Camila...)

Aos amigos dos laboratórios (LMSCP e GRIFIT), pela sinergia superprodutiva. Especialmente a meus queridos Dirceu, Martinica e Fred, Debbylú, Chê, João Victor, Caio, Keselina, Cauê, Brunos, Pedro, Simoni, as meninas do corpo técnico, o Marco e a Tailane pelas superdicas.

Àqueles grandes incentivadores e responsáveis por eu fazer o mestrado: Suzete, Stefan e Leo.

Aos colegas do PEQ, em geral, que confiaram e me apoiaram como representante discente.

À vida, que é muito boa pra mim!!!

A Deus, aos Orixás, a Buda, Allah, Krishna, Jah e todos os santos que me guiaram.

Ao Prof. Antonio Gilberto Ferreira e ao laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pelas análises de RMN.

À Professora Patricia Zancan e ao Laboratório de Oncobiologia Molecular - LabOMol do Depto Fármacos, Fac. Farmácia – UFRJ, pelas análises de Viabilidade Celular.

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

“ On n'oublie rien de rien
On n'oublie rien du tout
On n'oublie rien de rien
On s'habitue c'est tout

Ni ces départs, ni ces navires
Ni ces voyages qui nous chavirent
De paysages en paysages
Et de visages en visages
Ni tous ces ports, ni tous ces bars
Ni tous ces attrape-cafard
Où l'on attend le matin gris
Au cinéma de son whisky
Ni tout cela, ni rien au monde
Ne sait pas nous faire oublier
Ne peut pas nous faire oublier
Qu'aussi vrai que la terre est ronde.”

On N'Oublie Rien (Jacques Brel)

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

FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA LIBERAÇÃO DE MEDICAMENTOS SÍTIO-DIRIGIDA

Ana Cristina Bomfim Peixoto

Março/2013

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Helen Conceição Ferraz

Programa: Engenharia Química

A liberação controlada de medicamentos destaca-se entre as aplicações poliméricas na área biomédica. Particularmente, a liberação *in situ* por meio de partículas poliméricas sinalizadas e capazes de serem reconhecidas por receptores nas células alvo, potencializa a eficiência dos sistemas de liberação. O objetivo deste trabalho foi desenvolver partículas poliméricas funcionalizadas e com a capacidade de interagir com biomoléculas. A funcionalização foi realizada adicionando-se grupos químicos por intermédio de copolimerização em miniemulsão entre o MMA e os comonômeros AA, AMA, HEMA, DMAEMA e MAM. Os comonômeros concentram-se na superfície da partícula de polímero devido à afinidade pelo meio aquoso, levando à funcionalização. Para avaliar a vetorização, foram feitos estudos de adsorção de BSA nas superfícies das partículas. A técnica utilizada foi capaz de promover com sucesso a funcionalização das nanopartículas. Observou-se que os materiais, de forma geral, apresentaram-se como bons adsorventes, capazes de imobilizar de 15% a 35% da solução de proteína inicial, o que corresponde a aproximadamente 100 mg/g ou 4 mg/m². As interações presentes são favoráveis à adsorção, que é bem ajustada pelo modelo de isoterma de Freundlich. Um estudo da influência dos iniciadores e surfactante na adsorção mostrou que o aumento da concentração inicial destes componentes promove um aumento na adsorção e influencia na dessorção em diferentes meios. Ensaio de viabilidade celular *in vitro* foram realizados, confirmando a não-toxicidade das partículas de PMMA produzidas à linhagem celular MCF-7.

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

FUNCTIONALIZATION OF POLYMERIC NANOPARTICLES FOR TARGETING DRUG DELIVERY SYSTEMS

Ana Cristina Bomfim Peixoto

March/2013

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto

Helen Conceição Ferraz

Department: Chemical Engineering

Drug delivery systems constitute an important application of polymer materials in the biomedical field. Particularly, targeting polymers with biomolecules that can be recognized by cellular receptors can cause the increase of the drug release efficiency. The aim of the present study was to develop functionalized polymer particles with ability to interact with biomolecules. The functionalization was accomplished by adding functional groups to polymer particles through miniemulsion copolymerization between MMA and some other comonomers, such as AA, MAA, HEMA DMAEMA and MAAM. Due to the great affinity with water, comonomers concentrate on the surface of the polymer particles, leading to functionalization. In order to evaluate the vectorization, adsorption studies were performed with BSA. It was shown that the proposed techniques were able to successfully promote functionalization of polymeric nanoparticles. It was found that all materials are good adsorbents leading to immobilization of 15% to 35% of the initial protein charge, which corresponds to about 100 mg/g or 4 mg/m². The interactions favor the BSA adsorption, which is well described by the Freundlich isotherm model. The increase of the initiator and surfactant concentrations lead to increase of the adsorbed content and decrease of desorption in different media. Cell viability essays were carried out *in vitro* and showed that the produced PMMA particles were not toxic for the MCF-7 cell lineage.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVO	2
1.2	APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS	3
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS	5
2.1.1	<i>Encapsulamento</i>	6
2.1.2	<i>Liberação controlada in situ</i>	7
2.2	SISTEMAS POLIMÉRICOS USADOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS	11
2.2.1	<i>Polímeros mais utilizados</i>	14
2.2.2	<i>Biocompatibilidade versus Biodegradabilidade</i>	20
2.2.3	<i>Toxicidade e viabilidade celular de nanopartículas poliméricas</i>	21
2.3	POLÍMEROS FUNCIONALIZADOS.....	22
2.3.1	<i>Técnicas para funcionalizar a superfície de polímeros</i>	23
2.4	POLIMERIZAÇÕES VIA RADICAIS LIVRES PELA TÉCNICA DE MINIEMULSÃO	24
2.5	ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS EM POLÍMEROS	30
2.5.1	<i>Adsorção física</i>	31
2.5.2	<i>Adsorção química / ligação covalente</i>	35
2.5.3	<i>Isotermas de Adsorção</i>	36
2.6	COMENTÁRIOS FINAIS	37
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	MATERIAIS	39
3.2	EQUIPAMENTOS.....	41
3.3	POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO.....	42
3.3.1	<i>Testes de copolimerização e funcionalização das partículas</i>	43
3.3.2	<i>Avaliação da composição da superfície</i>	46
3.4	ENSAIOS DE ADSORÇÃO COM A BSA	47
3.5	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	50
4	RESULTADOS.....	52
4.1	COPOLIMERIZAÇÕES E FUNCIONALIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS	52
4.1.1	<i>Homopolímero PMMA</i>	54
4.1.2	<i>P(MMA-co-AA)</i>	61
4.1.3	<i>P(MMA-co-AMA)</i>	67
4.1.4	<i>P(MMA-co-HEMA)</i>	72
4.1.5	<i>P(MMA-co-MAM)</i>	78
4.1.6	<i>P(MMA-co-DMAEMA)</i>	83

4.1.7	<i>Comentários finais</i>	87
4.2	ADSORÇÃO E DESSORÇÃO	91
4.2.1	<i>Comentários finais</i>	100
4.3	ESTUDO SOBRE A COMPOSIÇÃO DA SUPERFÍCIE	102
4.3.1	<i>Comentários finais</i>	112
4.4	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> COM HSA ADSORVIDA	113
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	116
5.1	CONCLUSÕES.....	116
5.2	SUGESTÕES	118
6	REFERÊNCIAS	120
	APÊNDICE I – EQUACIONAMENTO PARA CÁLCULOS TEÓRICOS	130
	CÁLCULO DA MASSA DE SURFACTANTE LIVRE PARA FORMAÇÃO DE MICELAS	130
	CÁLCULO DA TG DOS COPOLÍMEROS	131
	CÁLCULO DO % DE COMONÔMERO INCORPORADO	132
	CÁLCULO DA ÁREA ESPECÍFICA MÉDIA E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA PARA ADSORÇÃO DE UMA MONOCAMADA	133
	APÊNDICE II – GRÁFICOS COMPLEMENTARES	134
	ESPECTROS DE INFRAVERMELHO	134
	ESPECTROS DE RMN	143
	DINÂMICA DAS DISTRIBUIÇÕES DE DIÂMETRO DE PARTÍCULA PARA AS REAÇÕES DO PLANO EM CRUZ	155
	DISTRIBUIÇÕES DE MASSAS MOLARES PARA OS COPOLÍMEROS PRODUZIDOS	161
	CURVAS DE DSC	167

Lista de Figuras

Figura 2-1 Figura representativa das administrações convencional com liberação controlada de fármacos.....	6
Figura 2-2 Ilustração de uma partícula polimérica carregada com fármaco e com vetores (biomoléculas) na superfície.....	9
Figura 2-3 Sistema típico de polimerização em emulsão e miniemulsão.....	26
Figura 2-4 Principais interações na interface entre polímero/proteína (adaptado de KIM e YOON, 2002).	33
Figura 3-1 Unidade de polimerização (Mini-reator).	41
Figura 3-2 Ilustração dos diferentes grupos funcionais e rotas dos experimentos realizados.	45
Figura 3-3 Ilustração do plano experimental em cruz.	46
Figura 3-4 Esquema da metodologia utilizada para os ensaios de adsorção.	48
Figura 3-5 Exemplo de curva de calibração da absorbância como função da concentração de proteína BSA.	49
Figura 4-1 Evolução dinâmica da reação para o PMMA conduzida com os iniciadores PBO e PP: a) diâmetro médio de partículas; b) taxa de reação; c) conversão; d) massa molar ponderal média.	55
Figura 4-2 Distribuição de diâmetro de partículas ao longo do tempo para homopolímero de PMMA utilizando PBO como iniciador.....	57
Figura 4-4 Distribuições de diâmetro inicial e final para reações de homopolimerização de MMA conduzidas com PP e PBO como iniciadores.	58
Figura 4-3 Dinâmica da distribuição de tamanho de partículas para o PMMA durante a reação com PP.	58
Figura 4-5 Propriedades do PMMA final obtido: a) Tg; b) Mw	59
Figura 4-6 Fórmula estrutural do copolímero P(MMA-co-AA), com a marcação dos hidrogênios usados para análise de H-RMN.	61
Figura 4-7 Análises da dinâmica da reação de copolimerização do P(MMA-co-AA): a) diâmetro médio; b) conversão; c) massa molar ponderal média; d) taxa de reação.....	62
Figura 4-8 Dinâmica de distribuição de tamanho médio de partículas ao longo da reação de polimerização do MMA com o AA iniciada por PP.....	64

Figura 4-9 Dinâmica de distribuição de tamanho médio de partículas ao longo da reação de polimerização do MMA com o AA iniciada por PBO.	64
Figura 4-10 Espectros de H-RMN para o P(MMA-co-AA) obtido pela polimerização iniciada com PP.	65
Figura 4-11 Análise térmica (a) e distribuição de massa molar (b) dos polímeros de P(MMA-co-AA) obtidos.	66
Figura 4-12 Fórmula estrutural do copolímero P(MMA-co-AMA), com a marcação dos hidrogênios usados para análise de H-RMN.	67
Figura 4-13 Análises da dinâmica da reação de copolimerização do P(MMA-co-AMA): a) diâmetro médio; b) conversão; c) massa molar ponderal média; d) taxa de reação... 68	68
Figura 4-14 Dinâmica de distribuição de tamanho de partícula ao longo da reação de polimerização do MMA com o AMA pela rota iniciada por PP.	69
Figura 4-15 Dinâmica de distribuição de tamanho de partícula ao longo da reação de polimerização do MMA com o AMA pela rota iniciada por PBO.	69
Figura 4-16 Espectro de H-RMN do PMMA-co-PAMA (rota 01).	70
Figura 4-17 Análise térmica (a) e distribuição de massas molares (b) do P(MMA-co-AMA) obtido.	71
Figura 4-18 Fórmula estrutural do copolímero P(MMA-co-HEMA), com a marcação dos hidrogênios usados para análise de H-RMN.	72
Figura 4-19 Análises da dinâmica da reação de copolimerização do P(MMA-co-HEMA) a) diâmetro médio de partícula; b) conversão; c) massa molar ponderal média; d) taxa de reação.	73
Figura 4-20 Dinâmica de distribuição de tamanho de partícula ao longo da reação de polimerização do MMA com o HEMA pela rota 01.	74
Figura 4-21 Dinâmica de distribuição de tamanho de partículas ao longo da reação de polimerização do MMA com o HEMA pela rota 02.	75
Figura 4-22 Espectro de H-RMN para P(MMA-co-HEMA) (rota 01)	76
Figura 4-23 Análise térmica (a) e distribuição de massas molares (b) dos P(MMA-co-HEMA) obtidos.	77
Figura 4-24 Fórmula estrutural do copolímero P(MMA-co-MAM) com a marcação dos hidrogênios usados para análise de H-RMN.	78
Figura 4-25 Análises da dinâmica da reação de copolimerização do P(MMA-co-MAM): a) diâmetro médio de partículas; b) conversão; c) massa molar ponderal média; d) taxa de reação.	79

Figura 4-26 Dinâmica de distribuição de tamanho de partículas ao longo da reação de polimerização do MMA com o MAM iniciada com PBO.	80
Figura 4-27 Espectros de H-RMN do P(MMA-co-MAM) obtido com iniciação por PBO.	81
Figura 4-28 Análise Térmica (a) e distribuição de massa molar (b) do (PMMA-co-MAM).	82
Figura 4-29 Fórmula estrutural do copolímero P(MMA-co-DMAEMA) com a marcação dos hidrogênios usados para análise de H-RMN.	83
Figura 4-30 Análises da dinâmica da reação de copolimerização do P(MMA-co-DMAEMA): a) diâmetro médio de partículas; b) conversão; c) massa molar ponderal média; d) taxa de reação.	84
Figura 4-31 Dinâmica de distribuição de tamanho de partículas ao longo da reação de polimerização do MMA com o DMAEMA iniciada por PP.	85
Figura 4-32 Espectros de H-RMN do P(MMA-co-DMAEMA) obtido por iniciação com PBO.	86
Figura 4-33 Análise térmica do P(MMA-co-DMAEMA) obtido por iniciação com PP e com PBO.	86
Figura 4-34 Distribuição de massa molar final para o copolímero de MMA e DMAEMA.	87
Figura 4-35 Micrografias (MEV) das partículas após procedimentos de secagem por métodos tradicionais. a) liofilização; b) centrifugação; c) ressuspensão em vortex; d) ressuspensão em ultrassom.	92
Figura 4-36 Quantidades de BSA adsorvida para os diferentes copolímeros.	94
Figura 4-37 Comportamento das réplicas na adsorção de BSA para os diferentes copolímeros.	95
Figura 4-38 Potencial Zeta das partículas poliméricas antes e depois da adsorção de BSA.	96
Figura 4-39 Tamanho médio das partículas poliméricas antes e depois da adsorção de BSA.	96
Figura 4-40 Isotermas de adsorção e respectivos ajustes para os modelos de Langmuir-Freundlich e Freundlich para as amostras dos polímeros: a) PMMA iniciado com PP; b) P(MMA-co-AMA) iniciado com PP ; c) P(MMA-co-AMA) iniciado com PBO.	99
Figura 4-41 Dinâmica das reações do plano em cruz. Efeito das concentrações de SDS e PP sobre os tamanhos médios de partícula.	102

Figura 4-42 Comparação entre o uso do turrax e ultrassom para preparação da miniemulsão.	103
Figura 4-43 Comparação entre as distribuição de massas molares para os polímeros resultantes da polimerização em miniemulsão preparada com Turrax e com sonicador.	104
Figura 4-44 Distribuições de massas molares para com diferentes polímeros produzidos pelas reações do plano em cruz	105
Figura 4-45 Dinâmica das reações do plano em cruz. Taxas de polimerização para diferentes concentrações de SDS e PP.	105
Figura 4-46 Dinâmica das reações do plano em cruz. Conversão de monômero para diferentes concentrações de SDS e PP.	106
Figura 4-47 Relação entre conversão e diâmetro médio de gotas para os experimentos do plano em cruz.....	107
Figura 4-48 Quantidades de BSA adsorvidas pelos diferentes polímeros produzidos no plano em cruz.....	108
Figura 4-49 Carga de BSA nas partículas produzidas no plano em cruz após a dessorção em H ₂ O e pH 7,0.	110
Figura 4-50 Potencial Zeta das partículas produzidas antes e depois dos processos de adsorção e dessorção.	110
Figura 4-51 Espectros de infravermelho das partículas produzidas no plano em cruz com e sem proteína adsorvida.	111
Figura 4-52 Resultados dos ensaios de MTT realizados com HSA e partículas poliméricas produzidas no ponto central do plano em cruz.	114
Figura 4-53 Resultados dos ensaios de LDH extravasado realizados com HSA e partículas poliméricas produzidas no ponto central do plano em cruz.....	115

Lista de Tabelas

Tabela 3-1 Reações de polimerização para incorporação de grupos funcionais.	44
Tabela 3-2 Reações de polimerização para verificação de propriedades da superfície..	47
Tabela 3-3 Diferentes concentrações utilizadas para obter as isotermas de adsorção....	49
Tabela 4-1 Propriedades dos Momômeros	60
Tabela 4-2 Cálculo da porcentagem de comonômero incorporado	89
Tabela 4-3 Propriedades dos polímeros.....	89
Tabela 4-4 Sumário das medidas de adsorção de BSA para os diferentes polímeros	93
Tabela 4-5 Matriz de correlação PZ e % Adsorvida	97
Tabela 4-6 Percentual de dessorção em diferentes meios.	98
Tabela 4-7 Parâmetros e R ² dos modelos ajustados para as isotermas de adsorção.....	100
Tabela 4-8 Propriedades medidas para as nanopartículas poliméricas fabricadas seguindo o plano em cruz.	107
Tabela 4-9 Dessorção nos diferentes polímeros	108
Tabela 4-10 Dados de adsorção da HSA e BSA sobre as partículas poliméricas produzidas no ponto central do plano em cruz	113
Tabela 4-11 Potencial Zeta das partículas poliméricas produzidas no ponto central do plano em cruz antes e pós adsorção com HSA e BSA.	114

Nomenclatura

Símbolo	Nomenclatura	Unidade
---------	--------------	---------

Grandezas

$[m_i] =$	Concentração molar do monômero i.	mol/mol
a_s	Área ocupada pelo surfactante/ eficiência de cobertura	m^2/g_{surf}
A_{total}	Área total das gotículas de monômero	m^2
C	Concentração de proteína no equilíbrio.	g/L
C_{sds}	Razão de SDS em massa do total	Adimensional
D	Diâmetro médio de gota	nm
d	Diâmetro	nm
k	Fator de correlação que leva em conta a concentração dissolvida no meio contínuo	Adimensional
K	Taxa de adsorção-dessorção ou constante de equilíbrio para equação de Langmuir.	L/g
K_F	Capacidade de adsorção para a equação de Freundlich.	$(L/g)^{n-1}$
K_{ij}	Constante cinética da reação	$mol^{-1}s^{-1}$
K_{LF}	Taxa de adsorção-dessorção ou constante de equilíbrio para a equação de Langmuir-Freundlich.	$(L/g)^{n-1}$
M	Massa de monômero alimentada	g
M'_s	Massa de surfactante livre para formar micela	g
m_i	Concentração molar do mero i no copolímero	mol/mol
m_{MMA}^1	Massa de MMA no meio reacional no instante de tempo i	G
MM	Massa molar	g/gmol
M^o_s	Massa de surfactante alimentada	g
M_s^{ads}	Massa de surfactante adsorvido na interface	g
Mw	Massa Molar Ponderal Média	g/gmol
N	Expoente da equação de Freundlich	Adimensional
PZ	Potencial Zeta	mV
R	Taxa de reação	g/min
r	Razão de reatividade	Adimensional

T_g	Temperatura de transição vítrea	°C
$T_{g_{cop}}$	Temperatura de transição vítrea do copolímero	
T_{g_1}	Temperatura de transição vítrea do PMMA	
T_{g_2}	Temperatura de transição vítrea do homopolímero do comonômero	
t^i	Instante de tempo i	Min
Vol_{H_2O}	Volume de H ₂ O	mL
W_i	Fração em massa do monômero	Adimensional
X_{conver}	Conversão	%
ΔMMA	Quantidade de monômero consumida	G
Δt	Intervalo de tempo	Min

Símbolos Gregos

φ	Fração da fase orgânica	Adimensional
ρ	Massa específica do monômero	g/cm ³
γ	Tensão superficial	mN/m
$\gamma^i_{H_2O}$	Tensão interfacial com a água	mN/m
Γ	Quantidade adsorvida por unidade de área	ug/cm ²
Γ_m	Valor máximo adsorvido (cobertura completa ou saturação da superfície)	ug/cm ²
$\chi_{3,2}$	Diâmetro médio de Sauter	Nm
ω	Fração de comonômero incorporada	Adimensional

Abreviaturas

_M1.	Cadeia em crescimento cujo último monômero incorporado foi o monômero 1.
_M2.	Cadeia em crescimento cujo último monômero incorporado foi o monômero 2.
AA	Ácido acrílico
ADV N	Iniciador 2, 2'-Azobis- (2, 4-dimethylvaleronitrile)
AEMH	Aminoetil metacrilato hidrocloreto
AMA	Ácido metacrílico
ASGPR	Receptor asialoglicoproteína
ATRP	Polimerização radicalar controlada por transferência de átoos

BSA	Albumina de soro bovina
CDCI13	Clorofórmio deuterado
CMC	Concentração micelar crítica
C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
DMAEMA	2-dimetilamino etil metacrilato
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorubicina
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
EPR	Efeito de evidenciada permeabilidade e retenção
FDA	Administração para alimentos e drogas
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HEMA	2-hidroxietil metacrilato
H-RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
HSA	Albumina de sêrum humano
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada
LDH	Enzima Lactato desidrogenase
mAb	Anticorpos monoclonais
MAM	Metacrilamida
MMA	Metacrilato de metila
MTT	Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium ou nome dado ao ensaio de viabilidade celular que utiliza este sal como referência
NP	Nanopartícula
PAA	Poli(ácido acrílico)
PAEMH	Poli(aminoetil metacrilato hidrocloreto)
PAMA	Poli(ácido metacrílico)
PBO	Peróxido de benzoíla
PBS	Tampão fosfato salino
PCL	Policaprolactona
PDMAEMA	Poli(2-dimetilamino etil metacrilato)
PEG	Poli(etileno glicol)
PHEMA	Poli(2-hidroxietil metacrilato)
PI	Ponto isoelétrico

PLA	Poli (ácido láctico)
PMAM	Poli(metacrilamida)
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
PP	Persulfato de potássio
PPE	Polifosfoéster
RGD	Cadeia peptídica do tipo arginina-glicino-ácido aspártico
RNA	Ácido ribonucleico
ROP	Polimerização por abertura de anel
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBHP	Hidroperóxido de terc-butila
V59	Iniciador 2,2'-Azobis-(2-methylbutyronitrile)(AMBN)
VEGF	Fator de crescimento endotelial

1 Introdução

A nanotecnologia constitui uma das bases para o surgimento e aperfeiçoamento de produtos e processos. Dentre os fins mais nobres almejados pela nanotecnologia estão as aplicações médicas e biomédicas. Dispositivos biomédicos vêm sendo aprimorados a cada dia, tornando possível alguns tratamentos e melhorando métodos existentes. Para atender esta demanda, vários materiais nanoestruturados vêm sendo desenvolvidos. Neste campo, os materiais poliméricos ocupam posição de destaque, dada a sua versatilidade estrutural, que permite adequação de propriedades para cada aplicação. A possibilidade de alterar os grupamentos químicos presentes na arquitetura macromolecular das cadeias e modificar a superfície de peças e partículas pode viabilizar, por exemplo, o estabelecimento de interações específicas entre o polímero e o meio biológico (PICHOT, 2004).

Dentre as muitas aplicações possíveis de polímeros na área médica, pode-se citar especialmente a liberação controlada de fármacos, dada a grande contribuição que estes sistemas podem trazer para aumentar a eficiência dos sistemas de medicação e reduzir efeitos colaterais adversos. O objetivo de controlar a liberação é prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, mantendo as quantidades terapêuticas requeridas. Adicionalmente ao controle e programação, a liberação do fármaco no local específico constitui outra importante vantagem dos sistemas de liberação controlada (KIM *et al.*, 2010). Usualmente, este tipo de sistema pode ser produzido com uso de estratégias de direcionamento a um alvo, chamadas vetorizações. A vetorização ocorre quando as partículas poliméricas carregadoras do fármaco são associadas (bioconjugação) a biomoléculas que podem ser reconhecidas por receptores nas células ou tecidos alvo. Desta forma, evita-se que a administração do fármaco seja não-específica e aja também sobre as células/tecidos saudáveis.

A composição e o tamanho dos veículos carregadores de fármacos podem ser manipulados para obtenção de partículas com as propriedades físico-químicas almejadas para cada aplicação. Estas propriedades influenciam a estabilidade das partículas em fluidos biológicos e, conseqüentemente, nas taxas de liberação do fármaco. O tamanho é um parâmetro muito importante e sofre restrições diferenciadas para cada aplicação.

Para que as partículas possam, por exemplo, penetrar nos interstícios entre células tumorais, eles devem possuir diâmetro entre 50 nm e 150 nm (MARCUCCI e LEFOULON, 2004). Por todas essas razões, o presente trabalho pretende desenvolver nanopartículas poliméricas funcionalizadas com capacidade de interação com biomoléculas, para serem usadas em liberação sítio-dirigida de fármacos.

Na literatura, já foram descritas algumas estratégias para a funcionalização da superfície de partículas de polímero. TIAN *et al.* (2011) descrevem as seguintes técnicas como as principais estratégias de funcionalização: (a) introdução de grupos funcionais através dos próprios monômeros (muitas vezes protegidos antes da polimerização, para serem expostos após a reação); (b) introdução de grupos funcionais nas cadeias poliméricas com auxílio de reações químicas adicionais, após a etapa de polimerização. Dentre as técnicas que podem ser utilizadas para incorporar monômeros funcionais diretamente na etapa de polimerização, pode-se citar a técnica de polimerização em miniemulsão, que favorece modificações específicas na superfície de partículas de polímero, tendo em vista a existência de uma interface com o meio dispersante (HOLZAPFEL *et al.* 2005). Aplicações biomédicas importantes, como desenvolvimento de exames para diagnósticos e de sistemas de liberação controlada de fármacos, são possíveis e estão em constante evolução graças à possibilidade de controle dos mecanismos de encapsulamento fornecidos por essa técnica (HOLZAPFEL *et al.* 2005).

1.1 Objetivo

O objetivo principal deste estudo foi a obtenção de nanopartículas poliméricas funcionalizadas e capazes de interagir com biomoléculas, para fins de liberação de fármacos diretamente na célula alvo. Para tanto, foram feitas copolimerizações via miniemulsão do MMA com comonômeros funcionalizados. Foram também conduzidos estudos sobre a cinética das reações e da incorporação dos comonômeros, sobre a influência de cada formulação na adsorção, e sobre a toxicidade das partículas poliméricas produzidas.

1.2 Apresentação dos capítulos

Os capítulos foram organizados em conformidade com a cronologia dos experimentos realizados e, portanto, seguindo uma ordem lógica de pesquisa, planejamento, apresentação de resultados, questionamentos, proposição de hipóteses, validações e certificação das hipóteses feitas.

Após esta introdução, apresenta-se uma revisão da literatura no Capítulo 2 para contextualização, motivação e justificativa do trabalho. Em seguida, no Capítulo 3, são descritos os materiais, os equipamentos e as metodologias utilizadas para realização dos experimentos.

No Capítulo 4 faz-se a descrição e a discussão dos resultados. O Capítulo 4 está dividido em quatro seções. Na Seção 4-1, descrevem-se as copolimerizações via miniemulsão do metacrilato de metila (MMA) com os comonômeros: ácido acrílico (AA), ácido metacrílico (AMA), hidroxietil metacrilato (HEMA), dimetilaminoetil metacrilato (DMAEMA) e metacrilamida (MAM). Apresenta-se uma investigação extensa sobre a reação, sua estabilidade, a velocidade de reação, conversão e algumas propriedades finais do polímero, como massas molares médias, temperatura de transição vítrea (T_g) e tamanho médio de partículas.

Na Seção 4-2, descrevem-se os estudos de adsorção de BSA (albumina de soro bovina) nas partículas fabricadas e descritas na seção anterior. Nesse capítulo, além da quantificação da adsorção, são apresentadas caracterizações das partículas antes e depois da adsorção, por meio da análise do potencial zeta e dos tamanhos de partícula, de forma a elucidar o processo de adsorção. Isotermas de adsorção também são discutidas nesta seção.

Na Seção 4-3 propõe-se um estudo de validação dos ensaios de adsorção. Neste caso a composição das partículas de polímero é variada com manipulação das quantidades de surfactante e de iniciador, investigando a influência destes fatores na adsorção. Caracterizações adicionais são realizadas para comprovar as hipóteses levantadas.

Na Seção 4-4 são apresentados e discutidos os resultados dos ensaios *in vitro* de viabilidade celular conduzidos com as partículas fabricadas, visto que estas devem ser testadas para uso em aplicações biomédicas.

Finalmente, apresentam-se, no Capítulo 5, as principais contribuições do trabalho com apresentação das principais conclusões obtidas e apresentação de algumas sugestões para realização de estudos posteriores. A bibliografia consultada é apresentada no Capítulo 6. Os Apêndices I e II incluídos no final do documento apresentam o detalhamento dos equacionamentos e cálculos propostos, alguns dados experimentais brutos usados na análise e ilustrações extras como gráficos e espectros.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Liberação controlada de fármacos

Em formulações convencionais, as concentrações plasmáticas de fármacos são diretamente proporcionais à dose administrada (KIM *et al.*, 2009). Tais sistemas resultam em dificuldade de manutenção da dose terapêutica mínima no corpo por períodos de tempo prolongados e variam significativamente ao longo do tempo por conta dos mecanismos metabólicos e funcionais do organismo. Desta forma, para atingir os efeitos terapêuticos necessários, múltiplas administrações são usualmente empregadas, aumentando a possibilidade de efeitos colaterais adversos (KIM *et al.*, 2009), por conta dos picos de concentração que podem superar o limite aceitável (Figura 2-1). Além disso, a pequena solubilidade de fármacos hidrofóbicos nos fluidos orgânicos e a toxicidade sistêmica de medicamentos são dois dos problemas adicionais que comprometem a eficiência terapêutica de fármacos convencionais (SIEGWART *et al.*, 2011). Por isso, existe um grande estímulo para o desenvolvimento de novas tecnologias que tornem mais eficientes os sistemas de liberação de fármacos. Parte essencial do desenvolvimento destas novas tecnologias é a preparação de materiais capazes de proteger e controlar a liberação de fármacos e de outros compostos terapêuticos, como proteínas e genes. A liberação controlada tem o objetivo de prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, mantendo as quantidades terapêuticas mínimas requeridas como mostra a Figura 2-1. Desta forma, com o intuito de estender o tempo de circulação do fármaco no sangue, estes vêm sendo encapsulados em nano ou micropartículas, que servem como meio de proteção, transporte e controle da liberação.

Os mecanismos de liberação controlada são sistemas fundamentados normalmente no controle por difusão, do grau de inchamento, erosão ou estímulos como pH, temperatura e presença de biomoléculas (WANG e VON RECUM, 2011). A conjugação entre o material (normalmente polimérico) e o fármaco também pode resultar em sistemas que aumentam o tempo de circulação e a estabilidade do fármaco na corrente sanguínea. Neste caso, a ativação do fármaco pode ocorrer quando há

degradação do material ou das ligações entre polímero e o fármaco conjugados quimicamente em sítios específicos (KIM, 2009).

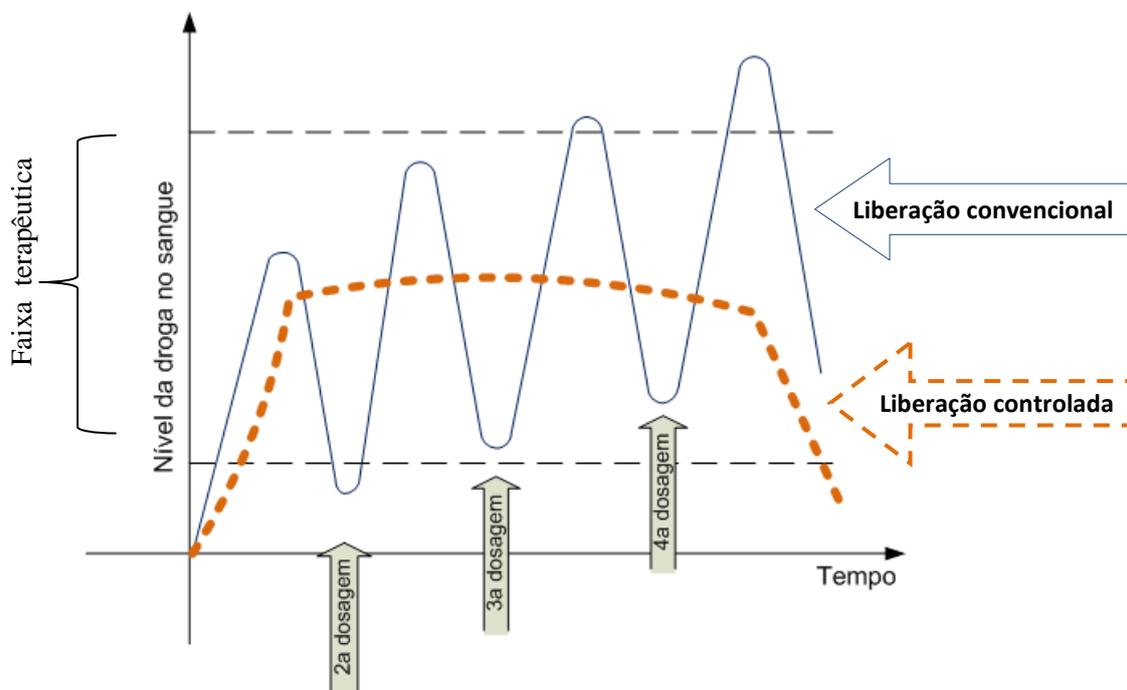


Figura 2-1 Figura representativa das administrações convencional com liberação controlada de fármacos.

2.1.1 Encapsulamento

As pesquisas relacionadas ao encapsulamento foram iniciadas com o trabalho de Würster, por volta de 1950, com o processo patenteado de encapsulamento de finas partículas sólidas em leito fluidizado (AZEVEDO, 2002). Hoje, o encapsulamento de princípios ativos com polímeros constitui um conjunto de técnicas largamente empregadas nas indústrias de produtos cosméticos, farmacêuticos, agrícolas e de revestimentos (JANSSEN, 1995). Muitas vezes, este processo é utilizado para minimizar efeitos de toxicidade, para mascarar gosto e odor ou para facilitar a estocagem e o transporte do produto encapsulado (JANSSEN, 1995). Como exemplos de materiais que têm sido encapsulados com polímeros, é possível citar o carbonato de cálcio, a sílica, o grafite (aplicações elétricas e catalíticas), a magnetita (cromatografia de afinidade), trióxido de di-alumina, o dióxido de titânio (para tintas e plásticos de alto desempenho), bloqueadores solares e fármacos (AZEVEDO, 2002).

As técnicas de encapsulamento são vastamente utilizadas para incorporação de pigmentos com o objetivo principal de promover uma melhor interação entre a matriz polimérica e o material inorgânico (pigmento) (CARIS, 1990). Quando se melhora a distribuição do pigmento no filme polimérico final, a durabilidade e as propriedades mecânicas do filme também são melhoradas (CARIS, 1990). Além disso, segundo CARIS (1990), por intermédio do encapsulamento do pigmento com um polímero que apresente caráter semelhante ao do agente ligante empregado na formulação da tinta, problemas de aglomeração podem ser sanados. Segundo LANDFESTER (2001), para o encapsulamento de pigmentos por polimerização em miniemulsão, é necessário fazer o ajuste cuidadoso de ambas as interfaces polímero/água e polímero/pigmento, dado que o pigmento é usualmente hidrofílico. Para tanto, dois sistemas surfactantes são normalmente necessários.

Um campo de aplicação que está ganhando cada vez mais espaço é o de encapsulamento de fármacos. A necessidade de encapsulamento está muitas vezes associada à tecnologia de liberação controlada, que representa uma das fronteiras da ciência e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana (AZEVEDO, 2002). Um dos dispositivos mais usados para encapsular fármacos as nanopartículas poliméricas, que tem o papel dual de protegê-lo dos meios corpóreos adversos e controlar a sua liberação. O fármaco pode ser mantido confinado em uma cavidade envolta por uma membrana de polímero (nanocápsulas) ou pode estar uniformemente disperso na matriz polimérica (nanoesferas) (MARCUCCI e LEFOULON, 2004). Nas nanoesferas, forma-se um sistema monolítico, em que não é possível identificar um núcleo diferenciado. As nanocápsulas, ao contrário, constituem os chamados sistemas do tipo reservatórios, em que é possível se identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido.

2.1.2 Liberação controlada *in situ*

Adicionalmente ao controle e programação da liberação do fármaco, capaz de prolongar sua concentração plasmática na dose terapêutica ótima, a liberação no local específico é outra importante vantagem dos sistemas de liberação controlada (KIM *et al.*, 2009). Usualmente, este tipo de sistema pode ser alcançado com auxílio de

estratégias de direcionamento a um alvo (vetorização), aumentam a eficiência do sistema de liberação e reduzindo os efeitos colaterais.

Segundo KIM *et al.* (2009), as estratégias de sistemas de direcionamento a um alvo são basicamente duas: 1) sinalização passiva, que age em consonância com o efeito de evidenciada permeabilidade e retenção (EPR) e 2) sinalização ativa, que emprega vetores ou ligantes direcionais.

O EPR é evidenciado em certas circunstâncias como, por exemplo, na presença de tumores. CHO *et al.* (2008) discutem que, tumores são usualmente circundados por novas vascularizações para garantir suprimento de oxigênio e nutrientes para o crescimento acelerado das células. Além disso, os vasos sanguíneos são reorganizados, tornando-se desalinhados com as células endoteliais defeituosas e sendo dilatados pelo desbalanceamento de reguladores angiogênicos, formando espaços que possibilitam a drenagem de macromoléculas para o interior dos tecidos (efeito EPR). Como resultado do aumento da permeabilidade vascular, partículas poliméricas, micelas ou lipossomos com tamanhos característicos na faixa de 10 a 500 nm e carregados com fármacos anticancerígenos podem levar tais fármacos ao interior dos tecidos afetados. A eficiência destes sistemas é tão maior quanto maior for a capacidade da partícula de prolongar os períodos de circulação sanguínea. TIAN *et al.* (2011), exemplificam alguns sistemas que exploram o efeito EPR, na maior parte baseados em copolímeros em bloco com poli(etileno glicol), ou em polímeros biodegradáveis associados a polímeros hidrofílicos, hidrofóbicos ou sensíveis a temperatura e pH, o que melhora sua permeabilidade e a retenção.

Os sistemas baseados somente no efeito EPR não são, contudo, completamente eficientes, segundo CHO *et al.* (2011). Estes sistemas interagem com dificuldade com as células tumorais mais profundas, além de requererem expressivas quantidades de fármacos para atingir a dose terapêutica. Devido à rápida proliferação, células tumorais superexpõem diferentes receptores, tais como o ácido fólico, vitaminas e açúcares, para aumentar a taxa de absorção de nutrientes. Portanto, para aumentar a eficiência dos sistemas de liberação, ligantes alvo podem ser associados às nanopartículas carregadoras do fármaco (que deve ter como característica um prolongado tempo de circulação sanguínea) (CHO *et al.*, 2011). Tais ligantes incluem anticorpos,

carboidratos, aptâmeros¹, e outras pequenas moléculas (MARCUCCI e LEFOULON, 2004). Vetorizações específicas podem ser alcançadas com a conjugação de ligantes alvo à superfície de micelas, por exemplo, que interagem facilmente com células tumorais (TIAN *et al.*, 2011). A incorporação de ligantes ativos na superfície de nanopartículas (vide ilustração da Figura 2-2) pode prover o direcionamento e o reconhecimento de tumores ou revascularizações, melhorando significativamente o índice terapêutico pela redução da toxicidade (MURPHY *et al.*, 2011). Entretanto, apesar dos desenvolvimentos promissores nessa área, os efeitos sobre a farmacocinética, a biodistribuição e o acúmulo no tecido de partículas com sinalização ativa têm levantado algumas controvérsias. Alguns estudos mostram aumento da acumulação nos tumores, enquanto outros estudos mostram que, o grau de acumulação permanece constante, levando alguns a questionar se o fenômeno de EPR não seria o fator preponderante na localização dos tumores (HAMIDI *et al.*, 2011).

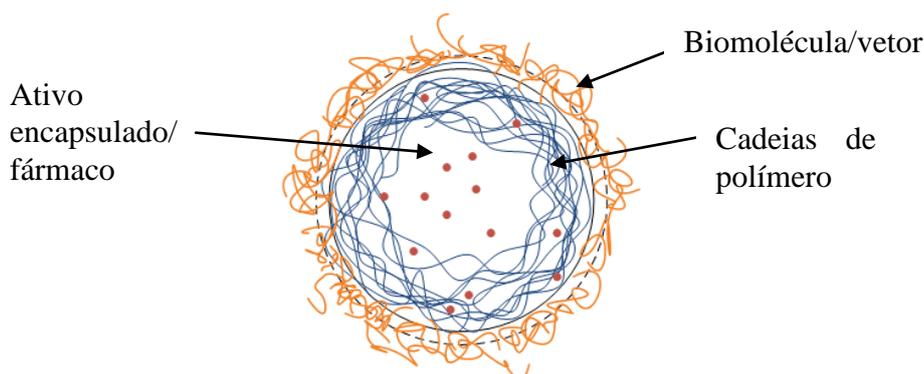


Figura 2-2 Ilustração de uma partícula polimérica carregada com fármaco e com vetores (biomoléculas) na superfície.

Segundo WANG e THANOU (2010), nanopartículas com sistemas de direcionamento a um alvo mostram acúmulo mais rápido e maior concentração em tumores, quando comparadas com sistemas não direcionados. Acredita-se que, a introdução de ligantes específicos pode não aumentar o acúmulo de nanopartículas em tumores, mas podem melhorar a eficácia, aumentando as taxas de internalização em

¹ Aptâmeros são pequenos oligonucleotídeos de cadeia simples, que têm sido desenvolvidos nos últimos 15 anos para diversos alvos e com várias aplicações. Essas incluem a inibição de receptores e enzimas, para a identificação de pequenas moléculas "sensoras" e o desenvolvimento de alvos terapêuticos para diagnóstico e imagem (FERREIRA e MISSAILIDIS, 2007).

células tumorais (WANG e THANOU, 2010). No entanto, quando anticorpos e folatos foram usados como ligantes-alvo, a acumulação de nanopartículas em tumores foi mais rápida do que quando as nanopartículas não foram sinalizadas.

Muitas são as biomoléculas que podem ser usadas como ligantes (vetores). Dentre elas, estão os anticorpos monoclonais² (mAb) que vêm sendo usados com muita frequência em sistemas de carregamento de fármacos. Segundo KIM *et al.* (2010), micelas que contém mAb são capazes de reconhecer e se ligar a várias células cancerosas *in vitro* e aumentar o acúmulo nos tumores, quando comparadas a micelas que não contém mAb verificado em experimentos realizados com camundongos. Como exemplo de mAb utilizados estão os anticorpos Herceptin®, usado contra o fator Her-2, e o Avastin® que é um anticorpo monoclonal que se liga ao fator de crescimento endotelial (VEGF).

Carboidratos como galactose, lactose e manose também podem ser usados como ligantes específicos em sistemas de carregamento de fármacos para o tratamento de doenças do fígado, pois podem se ligar a receptores de asialoglicoproteína³ (ASGPR) (TIAN *et al.*, 2011). Alternativamente, podem ser usados aptâmeros, que são oligonucleotídeos de DNA ou RNA, ou moléculas de peptídeo que podem se ligar com um antígeno alvo específico. O uso de aptâmeros oferece muitas vantagens, tais como não-imunogenicidade, estabilidade em faixas amplas de pH e de temperatura e especificidade tumoral (KIM *et al.*, 2010)

Células cancerosas normalmente expõem receptores integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$ por causa da elevada vascularização. Estes receptores específicos não são apresentados em células normais e interagem especificamente com as cadeias peptídicas de pequenas sequências de aminoácidos (5 a 10) do tipo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). Como exemplo, copolímeros de poli(etilenoglicol)-poli(3-caprolactama) funcionalizados com grupos terminais maleimídeos vêm sendo usados para vetorização com RGD (TIAN *et al.*, 2011).

² Anticorpos monoclonais são proteínas produzidas para detectar ou combater antígenos (microorganismos que causam doenças) específicos do organismo (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Biomanguinhos website, 2013).

³ Receptores de asialoglicoproteína são as proteínas mais encontradas na superfícies de células hepáticas de mamíferos. Este receptor medeia as ligações e internalizações de glicoproteínas séricas (DEVIRGILIIS *et al.*, 1989).

Vetores à base de folatos são, também, muito usados, pois receptores específicos são encontrados em muitas células tumorais dos pulmões, rins, ovário, mamas, cérebro, útero e testículos. MOGHIMI *et al.* (2001) enfatizam que os folatos oferecem muitas vantagens sobre os anticorpos quando usados como ligantes, pois são não-imunogênicos por causa do pequeno tamanho, apresentam boa estabilidade e excelente especificidade para tumores. Na forma de vitamina B, o ácido fólico é uma pequena molécula capaz de se ligar a receptores de folatos expressos muitas vezes mais em células de tumores epiteliais que em tecidos normais (TIAN *et al.*, 2011).

Um método introduzido recentemente para vetorização em sistemas de liberação de fármacos é o sistema biotina-avidina, que pode ser usado como reagente pré-alvo em tratamentos com quimioterapia, portanto, a administração do medicamento é feita em duas etapas (HAMIDI *et al.*, 2011). Nesse sistema, para evitar possível desnaturação dos ligantes durante a síntese das partículas por conta do contato com solventes orgânicos, primeiramente são administradas as moléculas reconhecedoras (anticorpos monoclonais, por exemplo) conjugados com avidina, que se localizam e se concentram no tumor. Posteriormente, administram-se as partículas conjugadas com biotina, carregadoras dos produtos terapêuticos que irão se fixar aos tecidos doentes devido a grande afinidade entre a biotina e a avidin (HAMIDI *et al.*, 2011).

2.2 Sistemas poliméricos usados para liberação controlada de fármacos

Nos últimos anos, rápidos avanços foram feitos na área de liberação controlada de fármacos. Neste campo, os materiais mais versáteis e capazes de atender a demandas específicas são geralmente poliméricos. Os materiais poliméricos colocam-se em posição de destaque por causa da versatilidade estrutural que permite adequação em termos de propriedades para cada aplicação. A possibilidade de alterar os grupamentos químicos pertencentes à arquitetura macromolecular das cadeias e modificar a superfície das partículas pode viabilizar o estabelecimento de algumas interações específicas entre o polímero e o meio biológico (PICHOT, 2004). A imobilização na superfície da partícula polimérica de camadas de compostos hidrofílicos, ou que respondam a estímulos, ou que sejam ligantes específicos, abre caminho para novas e atrativas

potencialidades (PICHOT, 2004). Tais avanços podem resultar em polímeros com propriedades únicas, com características e estruturas bem definidas para a formulação de sistemas “inteligentes” que podem ser aplicados à liberação controlada de fármacos (SUNGWON, 2009).

Os polímeros usados como biomateriais são comumente chamados de biopolímeros e podem ser de origem natural ou sintética, biodegradáveis ou não. Os biopolímeros apresentam propriedades específicas para aplicações *in vivo*, sendo compatíveis com a diversidade e complexidade destes ambientes. Biopolímeros são biomateriais e, por isso, têm função de interagir com sistemas biológicos para permitir avaliação, tratamento, aumento ou substituição de órgãos ou funções do corpo (TIAN *et al.*, 2011). Segundo TIAN *et al.* (2011), biopolímeros sintéticos são mais atrativos que aqueles de origem biológica para fins biomédicos pois: (1) evitam o encadeamento de reações imunes do corpo; (2) apresentam maior facilidade de modificação química e; (3) tornam mais fácil a manipulação das propriedades na superfície da partícula do polímero, sem que se alterem as propriedades do polímero como um todo (*bulk*). Além disso, os polímeros sintéticos podem ser feitos de maneira mais reprodutível, apresentando desempenho mais previsível e homogêneo que materiais naturais.

Propriedades específicas são quase sempre necessárias para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, como a correta solubilização do fármaco, a existência de respostas a estímulos específicos e a possibilidade de sinalização das partículas poliméricas para liberação diretamente no local/tecido. Neste contexto, os biopolímeros que possuem grupos funcionais reativos são componentes essenciais para o desenvolvimento de uma ampla variedade de aplicações biológicas e biomédicas, incluindo sistemas de liberação controlada (SIEGWART *et al.*, 2011). Nesta aplicação, a presença de grupos funcionais reativos possibilita a ocorrência de reações de reticulação e bioconjugação. Reticulações são bastante utilizadas para o aprisionamento do fármaco dentro das partículas e a bioconjugação é a reação de incorporação do fármaco ou ligantes sinalizadores diretamente na cadeia polimérica (SIEGWART *et al.*, 2011).

A liberação de fármacos diretamente no local específico tem sido extensivamente explorada como meio efetivo para liberação de terapêuticos para as células doentes. Dentre a variedade de sistemas poliméricos usados para esse fim, exemplos típicos são

os conjugados de polímero-proteína, os conjugados de polímero-fármaco, as micelas e vesículas (copolímeros em bloco de caráter anfifílicos), os dendrímeros, as nanopartículas e, os micro e nanogéis reticulados (SIEGWART *et al.*, 2011; HAMIDI *et al.*, 2011). Cientistas têm citado estes novos sistemas de liberação de fármacos como fatores chaves para futuros avanços em eficácia e segurança dos procedimentos terapêuticos, além de melhoramentos das características físico-químicas dos fármacos e os respectivos perfis farmacocinéticos (HAMIDI *et al.*, 2011).

Recentemente, sistemas copoliméricos têm alavancado progressos significativos nessa área, contrapondo-se às limitações dos sistemas convencionais de liberação de fármacos, uma vez que são os principais componentes usados como veículos carregadores em sistemas de liberação controlada. Por exemplo, muitos são os trabalhos que relatam o uso de copolímeros em bloco anfifílicos. Esses materiais são constituídos por blocos hidrofílicos e hidrofóbicos ligados covalentemente, que, por causa da diferença de solubilidade de cada bloco, se rearranjam em meio aquoso formando micelas ou vesículas (SIEGWART *et al.*, 2011). A combinação de diferentes unidades químicas promove o desenvolvimento de novos materiais com inúmeras novas propriedades e diferentes arranjos nanoestruturais (HAMIDI *et al.*, 2011). O uso de diferentes monômeros garante flexibilidade à formulação desses polímeros. Assim sendo, o caráter hidrofílico, a temperatura de transição vítrea (T_g), as propriedades mecânicas e outros aspectos podem ser manipulados pela escolha de um monômero específico ou pela copolimerização de diferentes tipos de monômeros (ORÉFICE, 2006).

O presente trabalho estuda especificamente os dispositivos poliméricos chamados de nanopartículas. Nanopartículas poliméricas podem ser fabricadas a partir de um número grande de diferentes monômeros ou combinações copoliméricas. Dentre os polímeros mais comuns, estão incluídos o poliestireno e seus copolímeros com divinilbenzeno, com butadieno, com vinil tolueno e com acrilatos (PMMA principalmente), o poli(metil metacrilato)(PMMA) e o poli(hidroxietil metacrilato) (pHEMA) (HERMANSON, 2008).

A composição e o tamanho de partículas poliméricas são importantes parâmetros para o desenvolvimento de respostas imunes do organismo. Segundo MARCUCCI e LEFOULON (2004), para cada classe de veículos transportadores de fármacos, estes

parâmetros podem ser manipulados para obtenção de partículas com as propriedades físico-químicas almejadas. Estas propriedades influenciam a estabilidade das partículas nos fluidos biológicos e, conseqüentemente, as taxas de liberação do fármaco. A maioria das partículas poliméricas apresenta superfície hidrofóbica por causa da composição baseada em compostos orgânicos, o que pode ser responsável por interações não-específicas de proteínas (ligações por interações hidrofóbicas) e reações imunes. Segundo HERMANSON (2008), para evitar este efeito da hidrofobicidade, modificações na superfície da partícula são necessárias, adicionando grupos ionizáveis ou aumentando a hidrofilicidade. Algumas construções deste tipo provêm uma superfície hidrofílica enxertada, formando uma partícula com maior biocompatibilidade. Outras partículas poliméricas, entretanto, são fabricadas a partir de monômeros hidrofílicos, como HEMA, e possuem propriedades biocompatíveis sem necessidade de modificações adicionais. O tamanho é um parâmetro também importante para a aplicação de liberação controlada, pois influencia diretamente a penetração das partículas nos interstícios dos tumores, EPR, e nas taxas de depuração. O tamanho das partículas deve estar usualmente na faixa entre 50-150nm de forma a ser grande o suficiente para evitar a entrada em tecidos saudáveis e pequena o suficiente para adentrar nos interstícios dos vasos sanguíneos tumorais (MARCUCCI e LEFOULON , 2004).

2.2.1 Polímeros mais utilizados

Os critérios gerais que podem ser considerados para que um material polimérico seja utilizado em dispositivos médicos incluem as propriedades mecânicas e o tempo de degradação apropriado para cada uso. Além disso, as partículas não devem induzir reações tóxicas ou imunológicas. No campo de liberação controlada, polímeros biodegradáveis com grupos reativos ou que possuam resposta a estímulos vêm sendo vastamente estudados (TIAN *et al.*, 2011). Além de serem funcionalmente ativos e cumprirem com sucesso suas funções dentro do corpo, os polímeros usados como biomateriais devem ser biocompatíveis (ORÉFICE, 2006). Segundo ORÉFICE (2006), a biocompatibilidade está associada a quatro fenômenos não necessariamente simultâneos: a) a concentração de biomacromoléculas junto à superfície dos materiais (adsorção), após a implantação no corpo; b) resposta local do tecido à presença do biomaterial, observada na forma de respostas inflamatórias e imunológicas (por

exemplo, na embolização); c) ação do ambiente corpóreo sobre o material como no estabelecimento de processo de degradação do polímero; d) ausência de resposta do corpo como um todo à presença do biomaterial, percebida através do aparecimento de tumores, alergias, infecções generalizadas, etc. A seguir são descritos os polímeros mais utilizados para aplicações biomédicas de origem natural, sintética, biodegradáveis ou não, de acordo com a literatura:

- Poliésteres alifáticos:

Poliésteres alifáticos, tais como o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(ácido glicólico), a poli(3-caprolactana) (PCL) e seus copolímeros, têm sido largamente investigados para aplicações biomédicas por causa das suas características intrínsecas de biodegradabilidade, bioreabsorção e biocompatibilidade (TIAN *et al.*, 2011). Tais poliésteres podem ser funcionalizados para ajustar as propriedades desejáveis nos biopolímeros, tais como hidrofiliabilidade, as taxas de biodegradação, a bioadesão e a vetorização em sistemas de liberação de fármacos. Em especial, biomateriais poliméricos com propriedades ajustáveis por intermédio de grupos funcionais como carboxilas, hidroxilas, aminas, acetais, brometos, cloretos e ligações duplas ou triplas de carbono são demandados (TIAN *et al.*, 2011).

Segundo HAMIDI *et al.* (2011), copolímeros baseados em poliésteres são biodegradáveis, biocompatíveis e hidrofóbicos, se hidrolisando de forma não enzimática no corpo. O processo de degradação produz principalmente dióxido de carbono e água, que podem ser excretados pelo rim. A alta resistência mecânica desacelera as taxas de degradação e, portanto, promove uma liberação bastante lenta do fármaco.

Os poliésteres alifáticos contendo grupos reativos podem ser preparados por homopolimerização ou copolimerização de monômeros cíclicos com grupos funcionais protegidos (TIAN *et al.*, 2011). Segundo TIAN *et al.* (2011), o poli (α -ácido maleico) com grupos substituintes reativos do tipo carboxila pode se conjugar ao fármacos (via ligações éster ou amina) para formar uma macromolécula biodegradável capaz de reduzir os efeitos colaterais do fármaco. Neste caso, o fármaco é liberado pela degradação do polímero biodegradável em aplicação de transporte e liberação controlada de fármaco. Copolímeros em bloco de poli(etileno glicol) e poli(ácido láctico) foram conjugados ao fármaco Docetaxel, oferecendo maior atividade citotóxica contra células cancerosas HeLa. Arranjos micelares deste copolímero contendo doxorubicina

(DOX) podem ser vetorizados com folatos, levando a uma maior seletividade à células cancerosas (YOO, 2004).

- Polímeros com base em Poli(etileno glicol)- PEG:

Segundo HAMIDI *et al.* (2011), os PEGs exercem uma função importante no controle do processo de inchamento da partícula carregadora pelo ajuste da hidrofilicidade. Além disso, o PEG contribui com o ajuste da compatibilidade com o fármaco e minimiza a agregação das partículas. Outra potencialidade do PEG hidrofílico é promover o aumento da biocompatibilidade da partícula. ORÉFICE (2006) salienta que polímeros bastante hidrófilos como o PEG têm a capacidade de reduzir a adsorção de proteínas, evitando reações corpóreas que ocorrem quando a camada adsorvida não é reconhecida como integrante dos tecidos, além de outros eventos ligados à coagulação.

Segundo PASUT (2007), o PEG vem sendo usado durante muito tempo em aplicações farmacêuticas e cosméticas devido a propriedades únicas, como não gerar reações imunes, antigênicas ou toxicológicas, ter alta solubilidade em água e em muitos solventes e, apresentar alta hidratação e flexibilidade, além de ser aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para uso humano. Os grupos hidroxila do PEG podem ainda ser modificados para ficarem reativos através de inúmeras estratégias de ativação por diferentes grupos químicos. Prioritariamente, esses grupos são do tipo aminas, pois podem ser facilmente modificados e estão presentes em proteínas. Polímeros reativos podem também ser preparados com grupos como tiol ou cisteína (PASUT, 2007).

- Policarbonatos:

Policarbonatos alifáticos também são bons materiais, pois possuem grupos laterais funcionalizáveis, como grupamentos carbonila, amina e hidroxila, que podem facilmente atender as demandas de funcionalização dos biomateriais. Além disso, policarbonatos alifáticos possuem boa biocompatibilidade, pouca toxicidade e boa biodegradabilidade. Policarbonatos de alta massa molar podem ser preparados pela polimerização por abertura de anel (ROP), usando monômeros cíclicos. Um número grande de monômeros cíclicos funcionalizados tem sido usado com sucesso em homo e copolimerizações do tipo ROP (TIAN *et al.*, 2011).

Grupos funcionais enxertados em poli(éster-carbonatos) facilitam modificações adicionais, como a adição de moléculas de fármacos ou pequenos peptídeos nos grupos

funcionalizados do polímero. HE *et al.* (2011) adicionaram os fármacos antitumorais Paclitaxel e Docetaxel, biotina e oligopeptídeo RGD à grupos enxertados às cadeias de copolímeros, provando o uso promissor de policarbonatos em sistemas de liberação controlada.

- Polifosfoésteres (PPE):

PPEs com a unidades repetitivas do tipo fosfoésteres na cadeia principal são materiais biocompatíveis e biodegradáveis particularmente atrativos por causa da estrutura similar à de ácidos nucléicos naturais e facilidade de funcionalização, quando comparados a poliésteres convencionais. PPEs com diferentes propriedades, tais como resposta a estímulos, foto-reticulação e reatividade, podem facilmente ser produzidos somente modificando os grupos radicais que modificam a cadeia (TIAN *et al.*, 2011). Estes polímeros são usados para diversas aplicações biomédicas, dentre as quais a síntese de vesículas e micelas para liberação de fármacos e genes terapêuticos. A pentavalência dos átomos de fósforo torna os PPEs mais favoráveis à funcionalização dos substituintes laterais (TIAN *et al.*, 2011). WANG *et al.* (2008) apud TIAN *et al.* (2011) desenvolveram copolímeros em bloco de poli(etil etileno fostato) e poli (3-caprolactama) em arranjo micelar contendo Paclitaxel, com superfície conjugada à galactosamina (galactose é ligante do ASGP-R), e usaram, com sucesso o material em aplicações para redução da proliferação de células HepG2 (carcinoma hepatocelular humano).

- Poliaminoácidos:

Segundo HAMIDI *et al.*(2011), apesar de originados a partir de proteínas naturais e serem, portanto, biocompatíveis, copolímeros baseados em poliaminoácidos possuem propriedades de imunogeração e fracas propriedades mecânicas, que explicam porque esses compostos não são considerados como biomateriais em potencial. Entretanto, cientistas têm vislumbrado resolver estas deficiências por meio da enxertia de cadeias laterais de aminoácidos às cadeias principais de polímeros sintéticos.

Segundo DEMING (2007), copolipetídeos de α -amino ácido-N-carboxyanhídridos (NCAs) apresentam particular potencial para uso biomédico. Particularmente na liberação controlada de fármacos, membranas polipeptídicas podem ser bastante úteis, visto que a estrutura de dibloco pode ser arranjada na forma vesicular estável,

apresentando vantagens em relação a vesículas lipídicas (por exemplo, maior estabilidade e ajustável funcionalidade e permeabilidade). Entretanto, as aplicações de poliaminoácidos são limitadas por sua baixa solubilidade em fluidos orgânicos e carência de grupos funcionais, o que vem sendo corrigido pela modificação funcional deste polímero (TIAN *et al.*, 2011).

TIAN *et al.* (2011) cita muitos estudos que foram capazes de incorporar biomoléculas, como RGD e galactose, em copolímeros baseados em poliaminoácidos. Na liberação de fármacos, poliaminoácidos tais como poli(ácido glutamóico) e poli(L-lisina) têm uma alta densidade de grupos substituintes reativos (carboxila ou amino) disponíveis para reações de acoplamento. P poli(ácido glutamóico) foi conjugado ao fármaco Paclitaxel, já vem sendo usado para o tratamento de câncer de pulmão (O'BRIEN, 2008 apud TIAN *et al.*, 2011).

- Poli(acrílicos/acrilatos):

Segundo HAMIDI (2011), os grupos carboxila pendentos na estrutura de copolímeros baseados em ácidos acrílicos podem se agregar e formar arranjos supramoleculares em faixas específicas de pH, aumentando a biodisponibilidade oral de componentes muito lipofílicos. A agregação ocorre geralmente em pH inferior a 7, enquanto em pHs mais altos esses materiais se dissociam parcialmente ou completamente, como resultado da ionização dos grupos carboxila. Uma série de monômeros da família dos acrilatos já é usada em aplicações biomédicas. Os poliacrilatos são polímeros produzidos usualmente por poliadicação via radicais livres. No presente trabalho, são estudados especificamente polímeros derivados de acrilatos e que possuem grupos funcionais reativos.

O poli(metacrilato de metila) (PMMA) é o mais importante dos polímeros da família dos acrilatos. O PMMA é classificado como um polímero termoplástico, obtido usualmente através da reação de adição via radicais livres do metacrilato de metila (MMA), sendo largamente utilizado em dispositivos biomédicos. Segundo MENDES *et al.* (2012), as partículas de PMMA constituem sistemas com boa biocompatibilidade e podem ser produzidos por polimerizações em emulsão, miniemulsão ou suspensão e já foram testadas em dispositivos para tratamento de câncer e administrações orais com bons resultados (MENDES *et al.*, 2012). O PMMA possui um grupo éster na sua cadeia, tornando-o um polímero mais polar.

O poli(ácido acrílico) (PAA) e o poli(ácido metacrílico) (PAMA) podem ser obtidos a partir dos respectivos monômeros ácido acrílico e ácido metacrílico para produção de polímeros solúveis em água. Segundo GOKEL (2004), estes monômeros fornecem um meio para a introdução de grupos carboxila em copolímeros. A presença desses comonômeros pode melhorar as propriedades de aderência e estabilidade mecânica das dispersões, fornecer estabilidade a compostos básicos (incluindo amônia), aumentar a resistência ao ataque de óleos e fornecer centros reativos para reticulação posterior por íons metálicos bivalentes, diaminas, ou epóxidos. O ácido acrílico é usado principalmente como espessante e agente de suspensão para a recuperação de petróleo, dispersante de pigmentos em tintas, fabricação de resinas de troca iônica (com ligações cruzadas), agentes de floculação para as partículas em suspensão na água e adesivos (MARK, 1999). O Poli (ácido metacrílico) encontra aplicações muito semelhantes, incluindo também aplicações na área têxtil, de mineração e de cosméticos (MARK, 1999). O PAMA tem como características especiais ser um ácido fraco, formar sólidos frágeis que não podem ser moldados, reticular com o aquecimento, se decompor sem amolecimento a altas temperaturas, apresentar tixotropia⁴ em baixas concentrações na água e fazer interações com contra-íons ou partículas carregadas (MARK, 1999).

O uso de metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) como monômero permite a introdução de grupos hidroxila reativos em copolímeros, permitindo a posterior reticulação com um agente bifuncional reativo como o diisocianato, um diepóxido, ou resina melaminaformaldeído (GOKEL, 2004). Grupos hidroxila também podem promover a adesão de substratos polares (GOKEL, 2004). Segundo MARK (1999), as maiores aplicações desses materiais estão relacionadas à fabricação de lentes de contato, de sistemas de liberação controlada de fármacos, preparação de colunas cromatográficas e produção de agentes floculantes, e possuindo como propriedades especiais a hidrofiliçidade e o bom inchamento em água e em soluções eletrolíticas.

A utilização de metacrilato de dimetilaminoetila (DMAEMA) como monômero permite a introdução de grupos amino independentes, que podem servir como sítios para reticulação secundária, tornar os copolímeros solúveis em ácido e favorecer a ancoragem de corantes e pigmentos (GOKEL, 2004). OLIVEIRA *et al.* (2011), fizeram

⁴ A tixotropia é a capacidade de um gel se liquefazer, à medida que se aplica uma determinada quantidade de calor ou uma força mecânica, como cisalhamento ou vibrações. Após a cessação do calor ou da força aplicada, esse mesmo gel, então liquefeito, possui a capacidade de voltar à forma original (COSTA, 2006).

uma pesquisa ampla sobre este monômero, explicitando que ele pode ser usado para preparação de polímeros que respondem a estímulos térmicos e de pH, polímeros que tenham afinidade especial com DNA e si-RNA (formando um complexo plasmídico capaz de ser fagocitado por células) e polímeros com carregados positivamente que podem ser utilizados para os mais diversos fins, como fabricação de resinas de troca iônica.

Poli(metacrilamida) não é um polímero da família dos acrilatos; entretanto, este polímero contém o grupo funcional amida e pode ser utilizado em dispositivos poliméricos biomédicos. WOLF *et al.* testaram alguns polímeros catiônicos biodegradáveis de metacrilamida como carregadores de genes para o tratamento de câncer de ovário. LUTEN *et al.* (2006) utilizaram este polímero também para fabricação de dispositivos para carregamento de genes por serem sensíveis à hidrólise e possuir grupos catiônicos laterais. Copolímeros de metacrilato de metila (MMA) com metacrilamida (MAA) (PMMA-co-PMAA) podem ser considerados como copolímeros de elevada temperatura de transição vítrea. As boas propriedades térmicas são devido às interações de ligação de hidrogênio fortes entre estes dois tipos de monômero (SLOBODIAN *et al.*, 2012). Estes copolímeros também apresentam elevado grau de homogeneidade, causada por uma boa miscibilidade (SLOBODIAN *et al.*, 2012).

2.2.2 Biocompatibilidade versus Biodegradabilidade

Uma ampla discussão ainda é travada nos dias de hoje sobre a real necessidade de um polímero apresentar a propriedade de biodegradação para serem utilizados para fins biomédicos. Segundo ORÉFICE (2006), até recentemente, os polímeros usados em aplicações biomédicas eram escolhidos visando provocar o mínimo possível de reação por parte do tecido hospedeiro. O conceito de biocompatibilidade estava ligado fortemente à ideia de inerticidade, ilustrada pelo enclausuramento do material pelo corpo através de uma fina cápsula fibrosa. Atualmente, e certamente no futuro, os biopolímeros deverão interagir com as entidades biológicas, no sentido de guiar o curso dos processos inflamatório- imunológicos no organismo e restabelecer a funcionalidade, a morfologia e a saúde dos tecidos inicialmente afetados. HOLZAPFEL *et al.* (2005) citam que a não-biodegradabilidade pode constituir um ponto muito positivo quando se

deseja que as nanopartículas circulem por longos períodos de tempo no sangue. Além disso, é importante ressaltar que a excreção de partículas pequenas pelos rins constitui um mecanismo viável de remoção do organismo em muitos casos.

Segundo ORÉFICE (2006), as seguintes ressalvas devem ser consideradas quanto aos biopolímeros:

- 1- Eles devem degradar quando necessário: a cinética de biodegradação deve ser compatível com a cinética de recuperação dos tecidos atingidos. Além disso, o processo de biodegradação não deve resultar em queda brusca de propriedades mecânicas.
- 2- A biodegradação, se desejada, deve resultar na produção de produtos de degradação não tóxicos, que possam ser metabolizados e que não alterem drasticamente as condições do ambiente corpóreo, como o pH.

Segundo PASUT *et al.* (2007), dentre as características almejadas em polímeros usados para fins de liberação de fármacos está a biodegradabilidade ou, em casos de polímeros não biodegradáveis, este deve possuir uma massa molar adequada que permita eliminação pelo corpo e evite acumulação no organismo. Portanto, a massa molar do polímero deve estar abaixo do limite usual de filtração pelos rins, que é de 40 a 50×10^3 g/gmol (PASUT *et al.*, 2007).

2.2.3 Toxicidade e viabilidade celular de nanopartículas poliméricas

A despeito do rápido desenvolvimento de pesquisas com materiais funcionais nanoparticulados, ainda existe um conhecimento muito limitado acerca dos riscos relativos a saúde e ao meio ambiente decorrentes do uso de nanopartículas e nanomateriais (MAHMOUDI *et al.*, 2011). Uma questão relevante está associada ao fato de que materiais biocompatíveis largamente utilizados e testados em dimensões convencionais podem provocar reações completamente diferentes quando utilizados em escala nano. Isso ocorre porque, nesta escala, a superfície, as forças de repulsão e atração e as especificidades químicas, estão muito mais pronunciadas. Segundo MAHMOUDI *et al.* (2011), a possível mudança de carga das partículas no organismo

deve ser considerada, pois cargas podem afetar o ciclo normal de células por provocar interações diretas ou indiretas com o DNA. Além disso, as partículas com dimensões nano podem atingir células e organelas que as partículas de maior tamanho não podem, de maneira que não é possível afirmar que um material seguro nas macrodimensões continuará seguro na escala nano.

Para verificação da toxicidade das nanopartículas, muitos trabalhos fazem ensaios de viabilidade celular *in vitro* e, em muitos casos, as respostas são positivas quanto a não-toxicidade. Um dos ensaios mais utilizados na literatura para avaliar a toxicidade de nanopartículas poliméricas é o MTT. O ensaio de MTT baseia-se na medida do dano induzido pelo composto em estudo no metabolismo celular de glicídeos por meio da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e consequentemente a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT (o sal tetrazolium 3-4,5 dimetiliazol-2,5 difenil tetrazolium brometo, de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade daquelas enzimas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (TWENTYMAN e LUSCOMBR, 1987).

2.3 Polímeros funcionalizados

De acordo com a União internacional de química pura e aplicada - IUPAC (HORIE *et al.*, 2004), a definição de polímeros funcionais é:

- 1) Um polímero que carrega grupos funcionais específicos (tais como grupos hidroxila, carboxila ou amino) e que tornam o polímero reativo, ou;
- 2) Um polímero que exerce uma função específica pela qual é produzido e utilizado. A função pode ser tanto uma função química como uma função física, como condutividade elétrica.

Um polímero funcional, ainda de acordo com a IUPAC, é aquele que possui reatividade química específica ou usos físico, químico, biológico, farmacológico, dentre outros usos que dependem de grupos químicos específicos existentes. Exemplos de polímeros funcionais são aqueles que possuem atividade catalítica, que se ligam seletivamente a espécies, que capturam ou transportam portadores de carga ou energia,

que transportam fármacos para um órgão característico no qual o fármaco é liberada, que convertem luz em portadores de carga, etc.

Segundo TIAN *et al.* (2011), a funcionalização dos polímeros é muito desejável em aplicações de liberação controlada, favorecendo o melhoramento das propriedades dos polímeros tradicionais. HERMANSON (2008) afirma que grupos reativos ou funcionais podem ser criados na superfície das partículas para o subsequente acoplamento de ligantes com auxílio da mistura de monômeros funcionais na reação de polimerização.

2.3.1 Técnicas para funcionalizar a superfície de polímeros

A funcionalização da superfície com grupos reativos apropriados pode constituir um pré-requisito para uso de partículas poliméricas em aplicações biotecnológicas (PICHOT, 2004). Um grande número de pesquisadores vem se dedicando ao projeto e preparação de polímeros com propriedades apropriadas para interação com moléculas biológicas, sem afetar a estabilidade coloidal no caso das partículas nem a atividade biológica das biomoléculas.

Na literatura, já foram descritas algumas estratégias para a funcionalização da superfície de polímero. TIAN *et al.* (2011), citam duas estratégias principais: (a) introdução de grupos funcionais por meio dos monômeros polimerizados (muitas vezes de forma protegida antes da polimerização, para exposição após a reação); (b) introdução de grupos funcionais nas cadeias poliméricas com auxílio de reações químicas adicionais, após a polimerização.

PICHOT (2004) especifica os métodos mais usados para fabricação de partículas funcionalizadas:

- i) polimerização em meio heterogêneo (usualmente em meio aquoso e com iniciação via radicais livres, embora o uso de iniciadores iônicos seja promissor, levando a dispersões de partículas com uma larga faixa de tamanho (entre 10 nm e alguns micrômetros, dependendo da técnica);

- ii) modificação química da partícula pré-formada por meio de reações químicas complementares;
- iii) modificação de polímeros pré-existentes com estratégias físico-químicas que dependem da natureza do polímero;
- iv) auto-organização de copolímeros em bloco ou enxertados, por meio de interações moleculares ou eletrostáticas específicas;
- v) formação de complexos produzidos por polieletrólitos ou surfactantes de cargas opostas;
- vi) síntese de dendrímeros, gerando partículas monodispersas e multifuncionais na faixa de 1-10 nm.

Segundo PICHOT (2004), a técnica de polimerização em meio heterogêneo é particularmente apropriada para simultaneamente obter um látex monodisperso e controlar as propriedades da superfície das partículas. No presente trabalho, utiliza-se a técnica de polimerização em meio heterogêneo por miniemulsão para obtenção das nanopartículas como descrito a seguir.

2.4 Polimerizações via radicais livres pela técnica de miniemulsão

A síntese de polímeros funcionalizados por miniemulsão pode acontecer de duas formas: básicas 1) polimerização de um ou mais monômeros funcionais; 2) modificação do polímero disperso em miniemulsão por reação química ou associação com moléculas pequenas, por enxerto ou degradação controlada do polímero (CRESPY e LANDFESTER, 2010). Alternativamente, iniciadores funcionais também podem ser utilizados para funcionalizar as partículas (GONZÁLEZ, *et al.*, 1995).

A fim de descrever as particularidades de técnica de polimerização em miniemulsão, é importante discutir um pouco as técnicas de polimerização em meio disperso, em especial a polimerização em emulsão. Muitos trabalhos possuem boas revisões sobre o assunto, como em OLIVEIRA (2011), ANTONIETTI e LANDFESTER (2001) e ASUA (2002); por isso este tema não será aprofundado nesta seção.

As polimerizações em emulsão são realizadas em um meio disperso, como descreve CORTINA (2007). O sistema é formado inicialmente por uma dispersão de gotas de monômero estabilizadas por um emulsificante, por micelas formadas pelo agente surfactante contendo monômero dissolvido em seu interior e pela fase aquosa (fase contínua). Adicionando-se um iniciador solúvel na fase aquosa, a polimerização é iniciada quando radicais livres são capturados pelas micelas inchadas com monômero (nucleação micelar). Neste caso, surge uma nova fase: as partículas de polímero inchadas com monômeros e estabilizadas por emulsificante. A polimerização ocorre prevalentemente nas partículas de polímero por causa de sua maior abundância e área superficial, uma vez que estas têm menor tamanho que as gotas de monômero (ver Figura 2-3). No entanto, a polimerização fica limitada pela taxa de difusão do monômero contido nas gotas através da fase aquosa para abastecimento das partículas de polímero. Nas miniemulsões são formadas nanogotas de monômero com tamanho consideravelmente menor e, portanto, maior superfície específica. Desta forma, as gotículas de monômero também podem ser nucleadas (ASUA, 2002), dispensando a formação de micelas de surfactante.

A grande maioria das reações de polimerização em emulsão e miniemulsão é realizada via radicais livres. Neste caso, as etapas básicas do mecanismo de reação são a iniciação, a propagação e a terminação, que estão bem descritas nos livros de polimerização. O iniciador é normalmente solubilizado na fase aquosa (contínua) e este pode induzir três tipos de nucleação (ANTONIETTI e LANDFERTER, 2002). A nucleação micelar é prevalente em sistemas em emulsão (e microemulsão) e ocorre quando o radical, proveniente da decomposição do iniciador, é capturado pelas micelas que estão inchadas com monômeros (as gotas atuam como reservatório de monômero) (ANTONIETTI e LANDFERTER, 2002). A nucleação homogênea é mais comum nas chamadas emulsões livres de surfactante, mas também podem ocorrer em sistemas em miniemulsão, dependendo da solubilidade do monômero e da concentração de iniciador. (ANTONIETTI e LANDFERTER, 2002). Neste caso, a polimerização ocorre inicialmente na fase aquosa e as partículas são formadas pela agregação ou precipitação dos oligômeros (as gotas também atuam como reservatório do monômero). A nucleação das gotas é a mais pronunciada em sistemas em miniemulsão e acontece quando a polimerização ocorre diretamente nas gotas de monômero dispersas inicialmente na fase contínua, possibilitando a utilização de iniciadores solúveis na fase orgânica (dentro das

gotas) (ANTONIETTI e LANDFERTER, 2002). Neste caso, é fundamental a aplicação de uma técnica apropriada para conduzir a dispersão inicial do monômero no meio contínuo até a escala manométrica característica das emulsões.

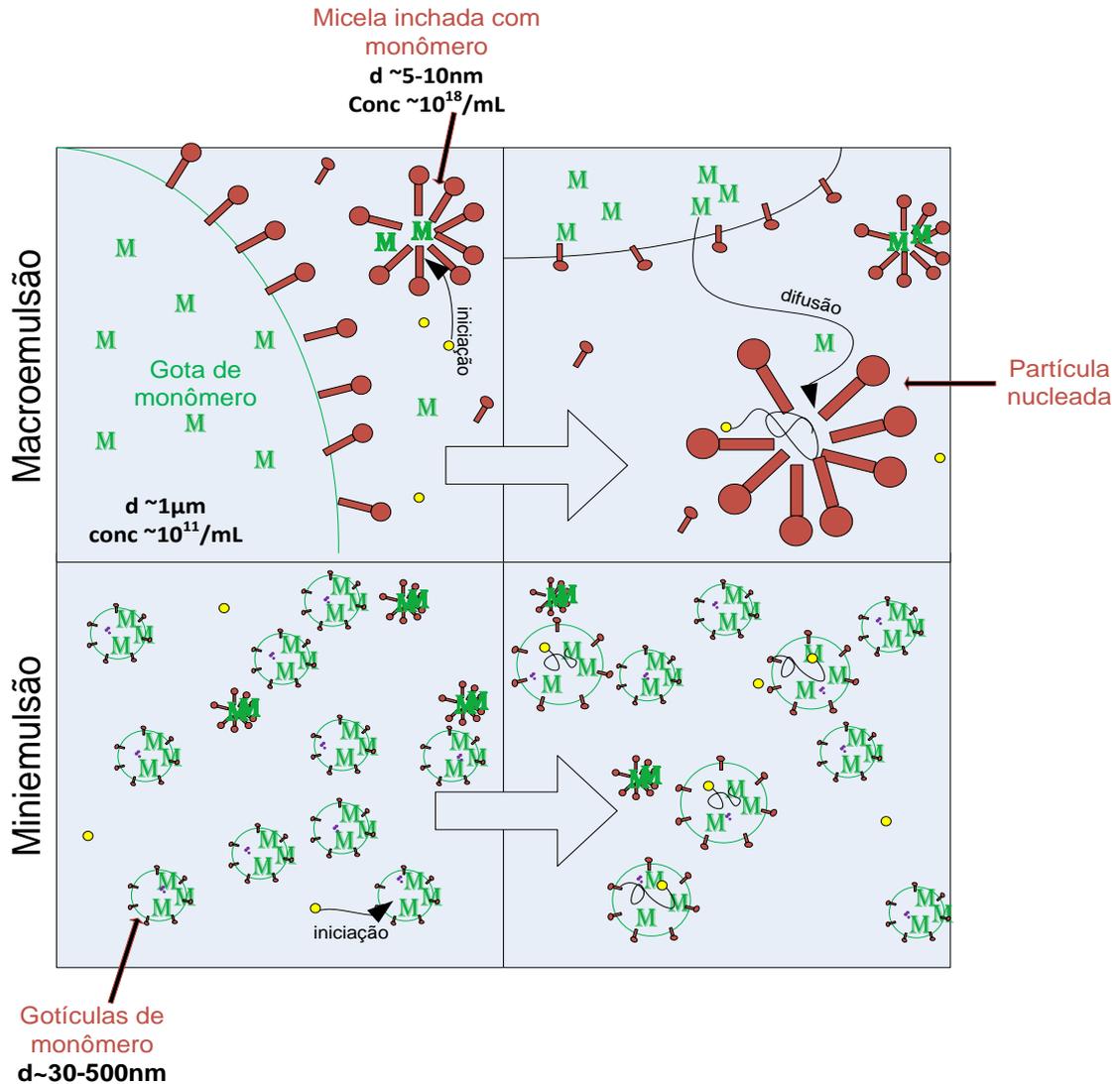


Figura 2-3 Sistema típico de polimerização em emulsão e miniemulsão.

Como discutido por ASUA (2002), as polimerizações em miniemulsão têm sido alvo de muitas pesquisas e desenvolvimento de uma vasta gama de materiais que somente podem ser produzidos através desta técnica. A miniemulsão é uma técnica de polimerização que tem permitido muitos avanços na área biomédica, destacando-se das demais técnicas que permitem a obtenção de produtos nanométricos por apresentar uma

larga série de vantagens, como a redução da quantidade de surfactante na formulação, resultar em produtos que apresentam maior estabilidade e principalmente porque possibilita a obtenção do produto final encapsulado em apenas uma única etapa de reação.

Polimerizações em miniemulsão são consideradas principalmente quando se deseja sintetizar partículas com tamanho nanométrico e quando existe o objetivo de incorporar substâncias nas partículas. Apesar do apelo ambiental associado à redução da utilização de solventes orgânicos, a técnica de polimerização em miniemulsão não é amplamente utilizada em processos convencionais, já que o tamanho final reduzido das partículas poliméricas confere uma dificuldade operacional considerável para separação. Por isso, o produto final é comercializado preferencialmente na forma de latex.

É importante destacar que, as polimerizações em emulsão e miniemulsão, de um modo geral, proporcionam polímeros de alta massa molar, visto que as taxas de propagação são altas e as taxas de terminação são reduzidas por causa do bem conhecido efeito de compartimentação. A taxa de terminação é baixa por causa da baixa probabilidade de existência de dois radicais na mesma gota. Quando dois radicais se encontram em uma partícula que possui dimensões tão pequenas, a terminação é praticamente instantânea. Então, em uma partícula polimérica, existe um ou nenhum radical em propagação, que causa o aumento da massa molar, visto que a propagação continua até que um segundo radical penetre a partícula.

O principal mecanismo de nucleação em miniemulsão é a nucleação das gotas e esta é a razão fundamental para as aplicações desta técnica (ASUA, 2002; ANTONIETTE e LANDFESTER, 2002). Neste caso, cada gota funciona como um nanoreator batelada e não existe uma variação grande entre o tamanho das gotas iniciais e o tamanho das partículas finais, não havendo a necessidade de difusão do monômero pela fase contínua. Como descrito por LUCENTE (2008), a gotícula de monômero inicial é o local da polimerização ao invés da micela, como é o caso da emulsão convencional. Essa é a principal característica que favorece a incorporação de pigmentos, fármacos entre outras substâncias diretamente nas gotas durante a polimerização.

A miniemulsão não é termodinamicamente estável e está sujeita a dois principais mecanismos de desestabilização, que podem alterar o número e o tamanho das

partículas da dispersão original: a degradação difusional (“Ostwald ripening”) e a coalescência entre as gotas (LUCENTE, 2008). Para minimizar estes efeitos, o sistema é cineticamente estabilizado com o uso de surfactante e de um agente hidrofóbico, também chamado de co-estabilizante, que aumenta a barreira para difusão do monômero para o meio aquoso e dificulta a perda de estabilidade (LUCENTE, 2008). Como descrito por CORTINA (2007), este co-estabilizante impede a degradação difusional das gotas menores com a criação de uma pressão osmótica interna. Por isso, a escolha do co-estabilizante é um fator importante, pois este permanece no produto final.

HOLZAPFEL *et al.* (2005) salienta que a técnica de polimerização em miniemulsão favorece modificações específicas na superfície do polímero por intermédio da adição de grupos funcionais, que são de grande importância para muitas aplicações, como por exemplo, na incorporação de biomoléculas por ligações covalentes com as nanopartículas. PICHOT (2004) ressalta alguns critérios normalmente necessários para as nanopartículas funcionalizadas fabricadas via polimerização em miniemulsão atenderem as exigências para aplicações biomédicas: i) tamanho de partícula (que controla a superfície exposta) e a distribuição de tamanhos (monodispersão é usualmente exigida por causa da maior uniformidade do produto final); ii) densidade de carga na superfície; iii) polaridade da interface das partículas; iv) presença de grupos biorreativos (quando enxertos covalentes são desejáveis); v) biodegradabilidade; vi) biorreabsorção; vii) não toxicidade.

PICHOT (2004) salienta que a propriedade mais importante e essencial para a maior parte das aplicações é a estabilidade coloidal do látex, devido ao uso em condições de salinidade, temperatura e estresse mecânico que podem ser drásticas para algumas aplicações (como na liberação controlada em sistemas vivos, por exemplo). Desta forma, o autor sugere que a estabilização deve ser controlada cuidadosamente ou durante a síntese, ajustando a formulação, ou com auxílio de um protocolo de estabilização posterior.

LANDFESTER (2003) usou esta técnica de polimerização em miniemulsão para copolimerizar o ácido acrílico com estireno e obteve partículas funcionalizadas, usadas para permitir a formação de ligações com anticorpos. A fim de evitar a polimerização do ácido acrílico na fase aquosa, foi usado um iniciador solúvel em óleo, o 2, 2'-Azobis-(2, 4-dimetil valeronitrila) (ADVN). Devido ao caráter hidrofílico do ácido acrílico,

existe a tendência de que este monômero fique na superfície da partícula. Para a síntese, foram usados de 0 e 6% de ácido acrílico em estireno. A miniemulsão foi conduzida com 1,2% em massa de SDS, gerando partículas com diâmetro médio na ordem de 90nm, independente da quantidade de ácido acrílico usada. Observou-se que a quantidade de 3% de ácido acrílico era ótima para reações com anticorpos.

GAUTIER *et al.* (2001) sintetizaram o copolímero anfifílico de Poli(metacrilato de metila-co-ácido metacrílico) em duas etapas. Inicialmente, realizou-se a polimerização radicalar controlada por transferência de átomos (ATRP) do metacrilato de metila com o metacrilato de trimetil silila, seguida pela clivagem do grupo silila. Na segunda etapa, foi feito um tratamento do polímero em metanol, para exposição do grupo ácido.

HOLZAPFEL *et al.* (2005) sintetizaram nanopartículas de estireno-co-ácido acrílico com incorporação de corante fluorescente através da técnica de polimerização em miniemulsão. Para a preparação, os autores usaram uma mistura de ácido acrílico e estireno, iniciador (V59), agente hidrófobo (hexadecano) e o corante foi adicionado na fase aquosa, compreendida pelo surfactante SDS e por água desmineralizada. Neste mesmo trabalho foram sintetizadas também, nanopartículas de poli(estireno-co-aminoetil metacrilato hidrocloreto) (PS-co-PAEMH). O monômero aminado foi dissolvido na fase aquosa que era composta por água e surfactante não-iônico Lutensol. Após 1h de pré-emulsificação, a mistura foi sonicada em banho de gelo por 120 segundos à 90% de amplitude (em equipamento Branson sonifier W450 digital, ½” tip). A copolimerização aconteceu por 20 h à 72°C com velocidade de agitação de 500 rpm. Os autores mostraram que, no caso do co-monômero ácido acrílico, o tamanho das partículas manteve-se constante quando o comonômero era misturado em até 10% em massa; acima disso, o tamanho das partículas aumentava significativamente. A explicação para este fenômeno foi a alta velocidade de reação do AA em baixos pHs (quantidades grandes de AA), formando longos blocos de PAA hidrofílico na interface com o meio aquoso que apresentam-se inchados com água, aumentando o tamanho. Já no caso do comonômero aminado, presente na forma de um sal bastante hidrofílico, o comonômero funcionava como um mecanismo surfactante adicional, ajudando a estabilizar a emulsão eletrostaticamente. Por isso, foi verificada sempre a diminuição do tamanho das partículas com o aumento da porcentagem em massa do AEMH.

LI *et al.* (2002) sintetizaram látexes funcionalizados de partículas, constituídas por um núcleo de PMMA e uma casca de polímero aminado solúvel em água, preparada por copolimerização direta por enxerto induzida pela adição de pequenas quantidades de hidroperóxido de terc-butila (TBHP) à 80 °C por 2 h. O trabalho investigou o efeito dos enxertos solúveis (poli(etileno imina) e poli(alil amina)) contendo diferentes grupos amina, da temperatura de reação, da concentração de TBHP, da massa molar do núcleo de PMMA, do pH, da eficiência de enxertagem e do tamanho das partículas. O trabalho validou este método para obtenção de látexes funcionalizados com teor de sólido de até 22% em massa, provando a obtenção de partículas com estrutura casca-núcleo bem definidas.

2.5 Adsorção de proteínas em polímeros

Existe um interesse muito grande no estudo da adsorção de proteínas em partículas poliméricas por causa da importância desses materiais em aplicações biomédicas, como no caso da liberação controlada de fármacos. Segundo ORÉFICE (2006), por causa da flexibilidade química elevada, polímeros podem ser modificados com macromoléculas biológicas, permitindo a aplicação desses materiais para produção de biorreatores, biossensores, *kits* de diagnósticos, sistemas de liberação controlada de fármacos, órgãos artificiais, suportes para o crescimento de tecidos e suportes para terapia genética. Vários tipos de moléculas com atividade biológicas podem ser imobilizadas em polímeros, tais como proteínas, enzimas, segmentos peptídicos, dentre muitas outras.

Muitos estudos se dedicam ao entendimento do comportamento físico, químico e biológico dos sistemas constituídos por partículas poliméricas que contêm compostos orgânicos adsorvidos sobre a superfície, inclusive porque polímeros interagem com proteínas do corpo quando são usados em aplicações *in vivo*. Estes sistemas têm sido estudados por vários pontos de vista, mas, segundo KIM e YOON (2002), os resultados ainda são inconsistentes devido à complexidade intrínseca, visto que proteínas não podem ser tratadas como pequenas moléculas de soluto e partículas poliméricas não são necessariamente esféricas e possuem superfície muitas vezes heterogêneas.

Vários métodos de imobilização de biomacromoléculas têm sido propostos na literatura. A maioria dos métodos parte de uma superfície considerada ativada para acoplamento; ou seja, admite-se que a superfície do material possui grupos químicos reativos como hidroxilas (-OH), aminas (-NH₂) e ácidos carboxílicos (-COOH) (TIAN *et al.*, 2011). Segundo PICHOT (2004), a presença dos grupos biorreativos favorece a imobilização de biomoléculas por adsorção física (através de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas), mas preferencialmente por ligações covalentes ou quelação. Segundo PICHOT (2004), o controle da polaridade na interface da partícula deve ser apurado, principalmente para evitar a desnaturação das proteínas (por interações hidrofóbicas). Para tanto, copolimerizações com monômeros mais polares ou hidrossolúveis vêm sendo praticadas.

Nos ensaios de adsorção de proteínas em polímeros, as proteínas são os adsorvatos e os polímeros são os adsorventes. Segundo LI, *et al.* (2005), as interações envolvidas são normalmente do tipo eletrostática, hidrofóbica ou pontes de hidrogênio. Os autores explicam que era comum admitir que as interações hidrofóbicas eram mais pronunciadas, embora atualmente, existam controvérsias sobre o comportamento específico e os mecanismos de adsorção, sugerindo que ainda há bastante trabalho a ser feito nesta área.

Segundo KIM e YOON (2002), se o mecanismo exato de adsorção de proteínas em partículas poliméricas fosse bem conhecido, então as ligações de hidrogênio, as ligações iônicas e as interações hidrofóbicas poderiam ser exploradas para funcionalização, o que poderia promover uma enorme redução de tempo e esforço requeridos para imobilizar proteínas por meio de ligações covalentes produzidas com auxílio de reações complicadas.

2.5.1 Adsorção física

A adsorção pode ser um processo de natureza física ou química. A adsorção física (fisissorção) é originada principalmente por forças de Van der Waals ou forças eletrostáticas entre moléculas do adsorvato e os átomos que compõem a superfície do adsorvente; ou seja, as moléculas encontram-se fracamente ligadas à superfície e os calores de adsorção são baixos (COELHO, 2006). Neste caso, pode existir a formação

de multicamadas adsorvidas, uma vez que as forças envolvidas são de longo alcance e não é necessário o contato direto com a superfície. Assim, as camadas posteriores podem ser adsorvidas por interações com as camadas anteriores.

De forma geral, diz-se que as proteínas são capazes de adsorver sobre a maioria das superfícies, visto seu caráter complexo no que diz respeito à cargas e estrutura. Segundo HERMANSON (2008), um dos métodos mais simples para agregar biomoléculas às partículas poliméricas hidrofóbicas é usar adsorção passiva. A adsorção de proteínas sobre partículas hidrofóbicas pode ocorrer por meio de interações fortes de aminoácidos apolares ou aromáticos com a superfície das partículas poliméricas, com concomitante exclusão de moléculas de água. Segundo KIM e YOON (2002), a fração de cobertura da superfície da partícula pelas proteínas é extremamente dependente da concentração de proteínas no seio da fase. Desta forma, estabelece-se um equilíbrio entre as proteínas adsorvidas e livres na solução. A adsorção de proteínas em microesferas poliméricas é considerada um processo complexo e frequentemente envolve muitas etapas desde a ligação inicial das proteínas nas partículas até o equilíbrio final. Adicionalmente, a conformação das proteínas pode variar, passando por certo grau de deformação ou mudança estrutural devido à grande área de interação (LI, *et al.*, 2004).

As forças de interação entre moléculas de proteína e partículas poliméricas podem ser classificadas como hidrofóbicas, iônicas (ou eletrostáticas), ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals (KIM e YOON, 2002), como mostra a Figura 2-4. Interações hidrofóbicas normalmente são apresentadas como as principais interações envolvidas, desde que a superfície do polímero seja hidrofóbica. Neste caso, a máxima adsorção é favorecida por pH próximo ao ponto isoelétrico da proteína (KIM e YOON, 2002). BAGCHI e BIRNBUAM (1981) observaram em seus experimentos com adsorção de anticorpos que estes possuem ponto ótimo de adsorção em pH próximo ao do ponto isoelétrico da proteína, indicando que as interações eram inteiramente hidrofóbicas e não dependiam de interações de cargas.

Alguns monômeros ou iniciadores podem proporcionar ao polímero cargas negativas, capazes de formar ligações iônicas com as cargas positivas das moléculas de proteína. Estas cargas são normalmente agregadas aos polímeros por grupos carboxila, provindos dos monômeros, ou grupos sulfatos, de iniciadores. Alguns monômeros

também podem inserir grupos hidroxila e amino, que juntamente com o grupo carboxila são passíveis de interagir via pontes de hidrogênio com proteínas KIM e YOON (2002).

Acredita-se que as propriedades particulares das superfícies, juntamente com as propriedades específicas das proteínas, determinam a organização das camadas de proteína adsorvida (NOGUEIRA, 1999). As proteínas têm tendência de formar multicamadas em superfícies hidrofóbicas. Por isso, HERMANSON (2008) sugere que se limite o excesso de proteína durante o processo de adsorção. Se grandes excessos de proteína são adicionados à partícula, podem ser formadas estruturas muito instáveis, que resultam em possíveis perdas contínuas da proteína adsorvida durante a aplicação. A maioria dos protocolos recomenda uma concentração de 3 a 10 vezes de excesso, em relação à concentração para formação de uma monocamada. Como exemplo, a conhecida proteína albumina de soro bovina (BSA) (M_w 67000 g/gmol) tem uma capacidade de adsorção de aproximadamente 3 mg/m² de superfície. Desta forma, 1 g de microesferas de poliestireno com 1 µm de diâmetro, por exemplo, é capaz de adsorver aproximadamente 18 mg de BSA.

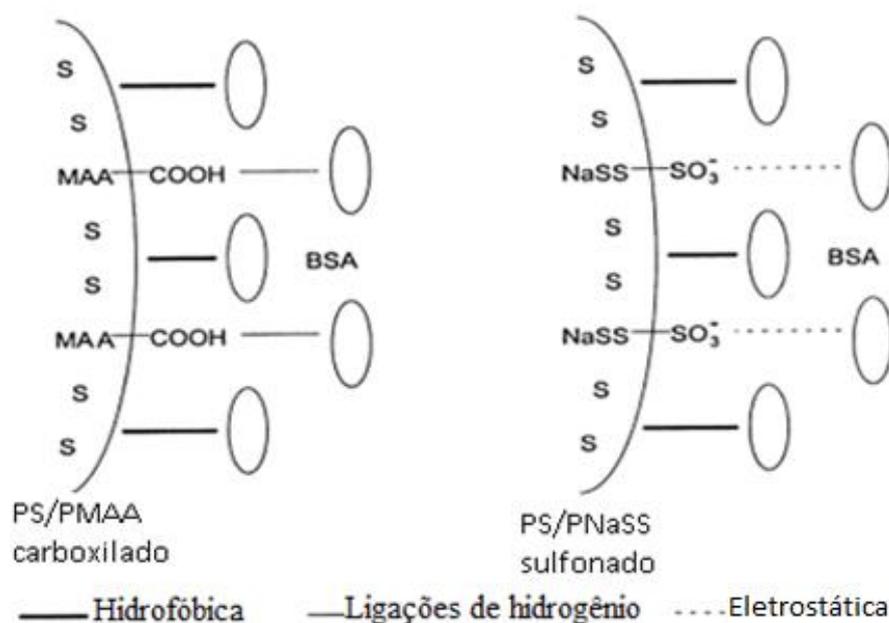


Figura 2-4 Principais interações na interface entre polímero/proteína (adaptado de KIM e YOON, 2002).

A adsorção passiva pode resultar em efeitos prejudiciais pronunciados às biomoléculas, quando adsorvidas em superfícies hidrofóbicas. BUTLER *et al.* (1992) verificaram que 90% dos anticorpos monoclonais e 70% dos anticorpos policlonais eram desnaturados após adsorção em superfície de poliestireno. Proteínas possuem predominantemente núcleos hidrofóbicos e superfícies hidrofílicas; por isso, interações hidrofóbicas com partículas podem acarretar mudanças conformacionais da proteína, para aumentar a interação entre o adsorvato e o adsorvente. Tais mudanças conformacionais podem resultar na completa desnaturação da primeira camada de proteína adsorvida nas partículas. As camadas subsequentes estão ligadas à camada inicial de proteínas por meio de ligações entre as moléculas de proteína ou simplesmente formam agregados nos quais as camadas mais externas possuem conformação e atividade mais preservadas (HERMANSON, 2008).

Segundo NOGUEIRA (1999), as propriedades do meio, tais como pH, temperatura e força iônica são determinantes na adsorção. BAGCHI e BIRNBUAM (1981) mostraram que, após a adsorção de anticorpos, estes continuavam fortemente ligados à superfície enquanto era mantido o pH inicial da adsorção. Observaram ainda que, com as mudanças de pH decorrentes das etapas de lavagem, por exemplo, havia uma tendência de remoção dos anticorpos adsorvidos. Portanto, sugere-se que a adsorção de proteína em partículas poliméricas hidrofóbicas seja conduzida em pH próximo ao ponto isoelétrico da proteína, para assegurar maior eficiência de adsorção, e que este pH seja mantido tanto quanto possível nas etapas de processamento e uso do material.

A composição da partícula polimérica constitui um fator muito importante para explicar a quantidade de proteína adsorvida e sua estabilidade e atividade após a imobilização. Geralmente, copolímeros entre um monômero hidrofóbico e monômeros polares (tais como ácido acrílico ou metacrílico) criam uma superfície que possui caráter hidrofóbico e apresenta simultaneamente áreas carregadas (HERMANSON, 2008). A adsorção de proteínas na superfície das partículas copoliméricas ocorre então por ambas as interações hidrofóbicas e de cargas opostas. Como resultado, obtém-se menor desnaturação de proteínas e melhor preservação da atividade após a imobilização (HERMANSON, 2008).

Polímeros puramente hidrofóbicos adsorvem proteínas muito fortemente, mas possuem forte tendência de desnaturação da primeira camada adsorvida. Copolímeros que apresentam alguma polaridade ou são negativamente carregados, se ligam a proteínas menos avidamente, porém resultam em melhor preservação da atividade (HERMANSON, 2008).

2.5.2 Adsorção química / ligação covalente

Na adsorção química, ocorre a formação de interações químicas entre a espécie adsorvida e o sólido adsorvente, havendo a transferência de elétrons e a formação de ligações químicas entre o adsorvato e a superfície do sólido. Neste caso, pode-se formar apenas uma camada molecular adsorvida, visto que é necessária a interação direta entre a superfície e a proteína (ou adsorvente) (PORPINO, 2009).

Muitas partículas poliméricas possuem grupos funcionais na estrutura da cadeia que podem estar expostos na superfície. As quantidades destes grupos dependem do tipo e da proporção de monômeros usados no processo de polimerização ou do grau de modificações secundárias realizadas na superfície (HERMANSON, 2008). Estes grupos funcionais expostos podem ser usados para formar ligações covalentes com biomoléculas a partir de condições de reação apropriadas (HERMANSON, 2008). Dependendo do tipo de grupo funcional e da biomolécula que se quer conjugar, algumas reações podem utilizar várias etapas intermediárias. A bioconjugação através de ligação covalente requer maior esforço que a adsorção passiva, mas pode resultar em conjugados com melhor especificidade e que perduram ativos por mais tempo.

GIBANEL *et al.* (2001) prepararam coloides poliméricos contendo as funcionalidades aldeído e acetal por um processo de polimerização em emulsão em duas etapas. As suspensões poliméricas formadas foram usadas como suportes para realização de ligações covalentes com anticorpos e proteínas e testaram o complexo formado como dispositivos para diagnósticos. Os autores verificaram uma forte manutenção (maior que 45%) das biomoléculas fixadas sobre as partículas.

ORTEGA-VINUESA *et al.* (1995) fizeram uma comparação entre os métodos de adsorção física e química (ligação covalente) para imobilização de anticorpos na

superfície de partículas em suspensão contendo grupos funcionais carboxila. Os autores mostraram que os comportamentos eletrocinéticos dos complexos formados entre proteína e polímero dependem do tipo de acoplamento, sendo as ligações covalentes mais propícias à manutenção da estabilidade da biomolécula e à promoção de melhores respostas imunes.

2.5.3 Isotermas de Adsorção

Isotermas de adsorção são relações de equilíbrio estabelecidas entre as quantidades disponíveis para adsorção e aquelas efetivamente adsorvidas, sendo normalmente utilizadas para avaliar a capacidade de adsorção de uma determinada molécula sobre um adsorvente específico. As isotermas de adsorção constituem uma ferramenta muito usada para discriminação de diferentes adsorventes para uma determinada aplicação (MORENO-CASTILHA, 2004). Como descrito por PORPINO (2009), as isotermas fornecem informações relacionadas à quantidade máxima de soluto adsorvido, à força da interação, ao número de camadas adsorvidas e à presença e tamanho de poros.

Como descrito por MORENO-CASTILHA (2004), o formato da isoterma de adsorção é a primeira ferramenta experimental para diagnóstico da natureza do fenômeno de adsorção, possibilitando a classificação em modelos comuns com base fenomenológica. A isoterma mais estudada é a isoterma de Langmuir, relacionada a superfícies homogêneas e derivada do fenômeno de adsorção de gases em monocamada. A Equação de Lagmuir tem a forma:

$$\frac{\Gamma}{\Gamma_m} = \frac{K.C}{1+K.C} \quad \text{Equação 2-1}$$

em que Γ é a quantidade adsorvida por unidade de área, Γ_m é a quantidade máxima que pode ser adsorvida (cobertura completa ou saturação da superfície) e C é a concentração de proteína no equilíbrio na solução em contato com o adsorvente. K é a constante de equilíbrio de adsorção-dessorção.

A isoterma de Freundlich (Equação 2-2) é típica de superfícies heterogêneas e prevê a formação de multicamadas, sendo provavelmente a mais comum (MORENO-CASTILHA, 2004). Neste caso, K_F relaciona-se com a capacidade de adsorção e n é uma constante que indica se a adsorção é favorável ou não. Segundo PORPINO (2009), o fenômeno de adsorção é favorecido se n está na faixa entre 0 e 10.

$$\frac{\Gamma}{\Gamma_m} = K_F \cdot C^n \quad \text{Equação 2-2}$$

Além destes modelos, existem muitos outros tipos de isotermas propostas e estudadas como a linear, a sigmoideal e a de alta-afinidade. Mas, segundo KIM e YOON (2002), embora existam muitos modelos matemáticos para adsorção de proteínas, não existe nenhum modelo universal uniparamétrico que possa ser usado como referência absoluta.

Segundo KIM e YOON (2002), os formatos de isotermas experimentais de sistemas constituídos por proteínas e polímeros são bastante semelhantes àquela de Langmuir. Contudo, é questionável se proteínas e polímeros, como estruturas complexas que são, promovam uma adsorção em um único sítio ativo. Por isso, os autores sugerem o uso da equação Langmuir-Freundlich (Equação 2-3), em que um segundo parâmetro n é fixado como uma constante que depende do tipo de proteína.

$$\frac{\Gamma}{\Gamma_m} = \frac{K_{LF} \cdot C^n}{1 + K_{LF} \cdot C^n} \quad \text{Equação 2-3}$$

2.6 Comentários finais

Foi possível verificar, por intermédio da revisão da literatura, a existência de muitos trabalhos envolvendo biopolímeros, suas aplicações e interações com o corpo humano, demonstrando o interesse expressivo no desenvolvimento de tecnologia nesta

área. Especialmente, a liberação controlada e direcionada a um alvo específico tem demonstrado aprimorar sistemas de administração de medicamentos, tornando-os mais “inteligentes” e eficientes. Entretanto, são poucos os trabalhos que estudam a utilização direta da técnica de adsorção de proteínas em polímeros para imobilização de moléculas na superfície de nanopartículas poliméricas para direcionamento de medicamentos a um alvo. O presente trabalho faz uma comparação entre diferentes copolímeros fabricados pela técnica de miniemulsão para obtenção de nanopartículas funcionalizadas, verificando a influência de cada grupo na adsorção. Não foram encontrados trabalhos semelhantes para os copolímeros estudados no presente trabalho, como o P(MMA-co-DMAEMA) e o P(MMA-co-MAM). Para os outros copolímeros, foram encontrados alguns trabalhos, porém utilizando técnicas de polimerização e formulações diferentes. Diversos trabalhos na literatura constituíram bases para fundamentação da metodologia experimental e interpretação dos resultados do presente estudo, destacando-se HERMANSON (2008), ANTONIETTI e LANDFESTER (2001), HOLZAPFEL *et al.* (2005), KIM e YOON (2002) e LI *et al.* (2005).

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Todos os reagentes foram utilizados conforme recebidos e estão apresentados abaixo com as respectivas especificações.

- Para as reações de polimerização foram utilizados:
 - Metacrilato de metila (MMA) 99,5%, estabilizado –VETEC química fina.
 - Metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) 97%, contendo de 200-220 ppm de inibidor hidroquinona monoetil éter – Sigma-Aldrich.
 - Ácido acrílico (AA) 99% P.A.– VETEC química fina.
 - Ácido metacrílico (AMA)- Doação das Indústrias Químicas Taubaté IQT. Lote F09266.
 - Metacrilato de 2-dimetilamino etil (DMAEMA) 98%, contendo 700-1000 ppm de inibidor hidroquinona monoetil éter – Sigma-Aldrich.
 - Metacrilamida (MAM)- 100%. Doação da BASF.
 - Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 90% – VETEC Química Fina.
 - N-Hexadecano – P.A. VETEC Química Fina.
 - Bicarbonato de sódio PA - Proquimios.
 - Água Destilada.
 - Persulfato de Potássio (PP) - $\geq 99.0\%$ Sigma-Aldrich.
 - Peróxido de Benzoíla (PBO) P.S.72-77%, contendo no máximo 25% de água –VETEC.
 - Hidroquinona 99% – VETEC.

- Para os ensaios de adsorção foram utilizados:
 - Albumina de Soro Bovina (BSA) - pó liofilizado 96% Sigma-Aldrich.
 - Albumina de Serum Humana – (HSA) – pó liofilizado, 97% Sigma-Aldrich
 - Água Milli-Q.

- Azul de Coomassie – VETEC.
 - Etanol (95%) – VETEC.
 - Ácido fosfórico (85%) – VETEC.
- } Para preparação do reagente Bradford.
- Tampões fosfatos de potássio 0,1M com pHs 6, 7 e 8 preparados com:
 - Fosfato de potássio dibásico anidro P.A. ACS – VETEC química fina;
 - Fosfato de potássio monobásico P.A ACS anidro – VETEC química fina.
 - Tampão ácido acético-acetato 2M com pH 4,5 preparado conforme formulação descrita em MORITA e ASSUMPÇÃO (2007) com:
 - Acetato de sódio anidro P.A. – QUIMIS (licenciada Mallinckrodt);
 - Ácido acético glacial 99,8% supra puro – VETEC química fina.
 - Membrana 0,22 µm de poro e 33 mm de diâmetro para acoplamento em seringa (Sterile Millex Filter Unit-Millipore, éster de celulose; Millex GP não estéril de poli(éter sulfona), Millipore slgp033nb).

➤ Para os ensaios *in vitro* foram utilizados:

- A linhagem celular de câncer de mama não metastática MCF-7 obtida do Banco de Células do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ.
- Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e soro fetal bovino e equino obtidos da Gibco-Invitrogen Corporation (N.Y., USA).
- PBS: solução salina tamponada com fosfato preparada com:
 - 8,0g NaCl - Merck
 - 0,2g KCl - Merck
 - 1,15g NaH₂PO₄ 99% - Merck
 - 0,2g Na₂HPO₄.7H₂O - Merck
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 99.5% GC - Sigma-Aldrich
- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) 97.5% HPLC - Sigma-Aldrich.

3.2 Equipamentos

- Para preparação da miniemulsão, caracterização e polimerização:
 - Sonicador Vibra Cell VCX 750 da Sonics, para fabricação da miniemulsão.
 - Dispersor ULTRA TURRAX IKA T18 Basic de alto desempenho, para fabricação da miniemulsão.

 - Mini-reator de vidro Mettler Toledo, modelo EasyMax 102 (100 mL) encamisado, com controle automático da temperatura, equipado com termopar, agitador e condensador, onde foram realizadas todas as reações de polimerização (Figura 3-1).

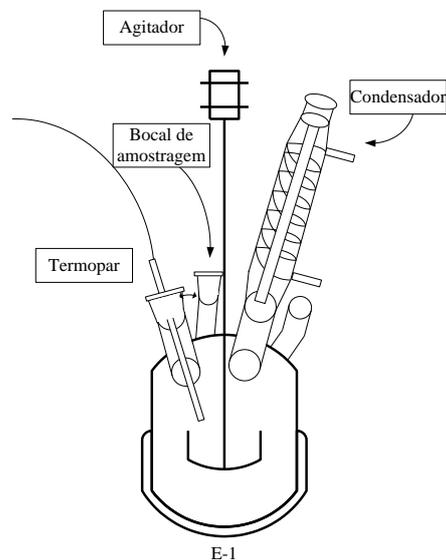


Figura 3-1 Unidade de polimerização (Mini-reator).

- Tensiômetro de anel Sigma 70 – KSV Instruments, para medidas de tensão superficial e interfacial.

- Para caracterização do polímero:
 - Malvern Instruments Zeta Size-Nano, modelo Nano-ZS, para as análises de tamanho de partícula por espalhamento de luz e potencial zeta.
 - Calorímetro DSC- 8500 Perkin-Elmer, EUA, para determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) dos polímeros.

- Cromatógrafo Viscotek (VE2001) equipado com detector de refração Viscotek VE3580 e quatro colunas Phenomenex com géis de porosidade 500, 10^3 , 10^5 e 10^6 Å, para determinação das massas molares.
 - RMN (UFSCar) - Equipamento Bruker Avance-III-400, equipado com um magneto Oxford de 9,4T de campo magnético, cuja frequência relacionada ao núcleo de hidrogênio-1 é de 400 MHz. Sonda de detecção direta de banda larga para tubos de 10 mm.
 - FTIR Thermo, modelo Nicolet 6700. Acessório para amostras sólidas SMART ORBIT com diamante na área de leitura. Análises em reflexão total (Resolução 4, n° de scans = 128, n° de scans de background = 64, amplitude do interferograma = 3,0-9,8).
 - MEV -Microscópio Eletrônico de Varredura Fei Company, modelo Quanta 200, com tensão máxima de 30 kV, em alto vácuo e em SE (elétrons secundários). As fotomicrografias foram processadas em um analisador de imagens da Fei Company e as amostras eram metalizadas no metalizador JFC 1500, Jeol LTDA.
- Para os ensaios de adsorção:
- Espectrofotômetro UV-Vis de Shimadzu, modelo UV mini 1240; UV-Vis Analyst, modelo UV1803.
 - PHmetro e condutivímetro SCHOTT® Instruments ProLab 2000.
 - Centrífuga Eppendorf, modelo centrifuge 5810R com máxima rotação de Max.4000 rpm, com rotâmetro adaptador para 12000 rpm (F34-638).
 - Agitador Roto-Shake Genie de 5 a 20 rpm, da Scientific Industries.

3.3 Polimerização em miniemulsão

As reações de polimerização neste trabalho foram realizadas pela técnica de polimerização em miniemulsão, fazendo a dispersão do monômero em água. A seguir estão descritas as metodologias usadas para realização dos experimentos.

3.3.1 Testes de copolimerização e funcionalização das partículas

Para concepção dos sistemas emulsionados, preparam-se as soluções aquosa e orgânica separadamente, para depois misturá-las. A preparação da fase aquosa (64,5% da massa total reacional) consistia na solubilização do surfactante (1% em massa, em relação à fase orgânica) e do bicarbonato de sódio (0,01g de NaHCO_3) em água. O NaHCO_3 é o agente tamponante da solução. A fase orgânica (FO) compunha 35,5% da massa total reacional e era preparada misturando-se primeiramente o MMA com o comonômero (quando foi utilizado comonômero, a quantidade adicionada foi sempre igual a 7,0% em massa) e o coestabilizante hexadecano (3% em massa referente ao monômero). O quantidade de comonômero utilizada (7%) está dentro da faixa sugerida por HOLZAPFEL *et al.* (2005). No caso em que foi utilizado o iniciador organossolúvel PBO, o iniciador foi adicionado à mistura da FO antes da emulsificação. A mistura das duas fases foi feita primeiramente com um agitador magnético durante 5 minutos, formando uma pré-emulsão. No caso em que o comonômero era a metacrilamida (MAM), devido a baixa solubilidade do monômero em MMA, o MAM era misturado à fase aquosa para formação da pré-emulsão inicial. Posteriormente, era feita a homogeneização em agitador aparelho Turrax, usando uma velocidade de 8000 rpm durante 5 min. O uso deste aparelho possibilita a redução do tamanho das gotículas para aproximadamente 300 nm. No caso em que o iniciador solúvel na fase orgânica estava presente, usou-se um banho de gelo durante o procedimento de emulsificação. A Tabela 3-1 mostra detalhadamente a composição das fases para as reações.

Os comonômeros utilizados com o objetivo de adicionar os grupos funcionais foram ácidos acrílico (AA) e metacrílico (AMA), o metacrilato de 2-hidroxietil (HEMA), o metacrilato de dimetilaminoetil (DMAEMA) e a metacrilamida (MAM). A Figura 3-2 apresenta um esquema das reações realizadas, especificando os grupo funcionais que se quer incorporar em cada copolimerização com o metacrilato de metila (MMA).

Antes da realização das reações de polimerização, foram realizadas algumas medidas de tensão superficial e tensão interfacial para verificação da estabilidade das interfaces entre as substâncias utilizadas. As medidas foram realizadas por intermédio de um tensiômetro de anel simulando as interfaces presentes nas dispersões usadas para as reações de polimerização. Nas medidas de tensão interfacial, uma das fases era

composta pela mistura dos comonômeros e a outra por uma mistura de água destilada, SDS e bicarbonato de sódio (em proporções iguais aquelas usadas para as reações de polimerização). Foram realizadas também medidas de tensão superficial de cada monômero com o ar. Excepcionalmente, como a metacrilamida (MAM) não possui boa solubilidade em MMA, as medidas de tensão interfacial e superficial com este monômero foram realizadas solubilizando a MAM em água, assim como é composto o meio reacional para a copolimerização com este monômero.

Tabela 3-1 Reações de polimerização para incorporação de grupos funcionais.

Comonômero	Iniciador 0,5% em massa ⁽¹⁾	Temperatura de reação (°C)
-	Persulfato de Potássio	70
-	Peróxido de Benzoíla	80
HEMA	Persulfato de Potássio	70
HEMA	Peróxido de Benzoíla	80
DMAEMA	Persulfato de Potássio	70
DMAEMA	Peróxido de Benzoíla	80
AMA	Persulfato de Potássio	70
AMA	Peróxido de Benzoíla	80
AA	Persulfato de Potássio	70
AA	Peróxido de Benzoíla	80
MAM	Peróxido de Benzoíla	80

⁽¹⁾ Em relação à fase orgânica

Como visto na (Figura 3-2), as reações foram realizadas por duas diferentes rotas, usando iniciador hidrossolúvel ou organossolúvel, de forma a verificar a influência destes na copolimerização e disposição dos grupos funcionais nas partículas. Além disso, desejava-se observar os efeitos da polimerização na fase aquosa, visto que os comonômeros são bastante solúveis em água. Ambas reações foram realizadas em mini-reator de vidro de 100 mL com agitação e temperatura controladas.

As reações de polimerização que usavam persulfato como iniciador foram realizadas a 70°C, adicionando-se 0,5% em massa (em relação à FO) de iniciador persulfato de potássio à mistura emulsionada dentro do mini-reator para um tempo de reação de 2 h e agitação de 500 rpm. Para as reações conduzidas com o Peróxido de Benzoíla, o iniciador já se encontrava dentro das gotas, como descrito na fase de preparação da miniemulsão. As reações com PBO ocorrem a 80 °C pelo mesmo período de tempo e usando a mesma agitação que as reações conduzidas com persulfato.

Foi feito o acompanhamento da dinâmica da reação através de amostragens sequenciais, para verificação da conversão (gravimetria), massa molar e tamanho de partículas ao longo da reação. As alíquotas foram retiradas a cada 5 min durante os 30 primeiros minutos e depois com 40, 50, 60, 90 e 120 minutos de reação. Para análise da conversão e massa molar, às amostras era adicionado um inibidor de reação (solução hidroquinona 0,01g/mL), estas são secas em placa de aquecimento (100 °C) e posteriormente em estufa à vácuo (730 mmHg) mantida na temperatura ambiente. Para análise do tamanho, as amostras (em suspensão) eram conservadas em banho de gelo e analisadas posteriormente por espalhamento de luz em instrumento ZetaSizer.

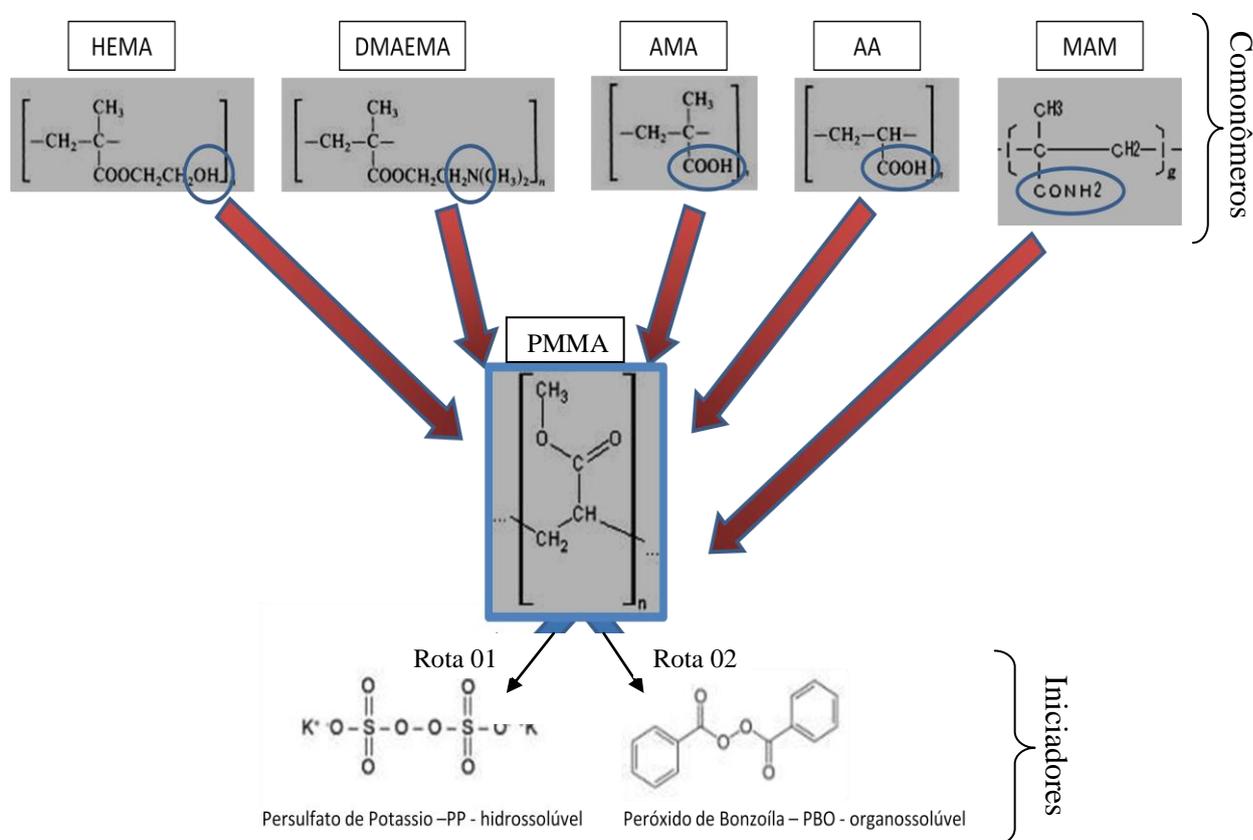


Figura 3-2 Ilustração dos diferentes grupos funcionais e rotas dos experimentos realizados.

Para o polímero final (seco em placa de aquecimento e estufa a vacuo e macerado), além destas análises, foram feitas análise de RMN e FTIR, para verificar a incorporação do comonômero e, conseqüentemente, do grupo funcional. Também foi feita a verificação do potencial zeta das partículas em suspensão e da temperatura de transição vítrea do polímero seco por DSC. As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFSCar-SP. As amostras foram dissolvidas em 2,5 mL de clorofórmio deuterado (CDCl₃). Espectros de hidrogênio foram obtidos com 16 varreduras, janela espectral de 8KHz, tempo de aquisição de 4,7 s e tempo de espera de 1 s. Os espectros de carbono-13 foram adquiridos em condição de total desacoplamento, com uma média de 30000 varreduras, tempo de aquisição de 0,8 s, tempo de espera de 0,1 s e janela espectral de 22000 Hz.

3.3.2 Avaliação da composição da superfície

Visando verificar a influência do iniciador e do surfactante presentes na superfície das partículas sobre as propriedades de adsorção, montou-se um plano experimental em cruz, como mostrado na Figura 3-3.

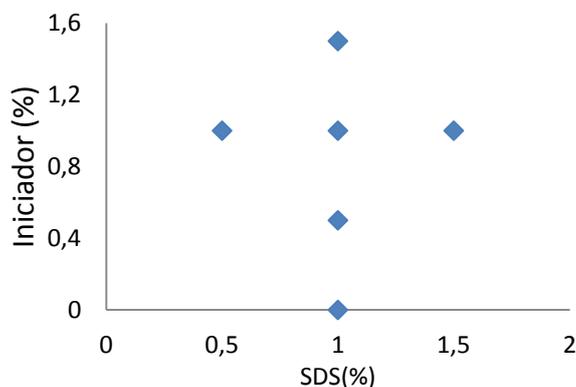


Figura 3-3 Ilustração do plano experimental em cruz.

Estas reações foram realizadas de forma muito semelhantes àquelas estudadas para a funcionalização da superfície. Contudo, variaram-se as quantidades de iniciador e surfactante, mantendo-se a composição do polímero constante somente com o PMMA. Além disso, utilizou-se como mecanismo para fabricação da miniemulsão o equipamento de ultrassom com frequência central de 20 kHz e amplitude de 20%, ao

invés do Turrax. A Tabela 3-2 mostra as reações realizadas nesse bloco de experimentos.

Tabela 3-2 Reações de polimerização para verificação de propriedades da superfície.

Número da reação	Iniciador / % em massa em relação à FO	% de Surfactante
Reações 01+	Peróxido de Benzoíla 1,0	1,0
Reações 02+	Persulfato de Potássio 0,5	1,0
Reação 03+	Persulfato de Potássio 1,0	1,0
Reação 04+	Persulfato de Potássio 0,5	0,5
Reação 05+	Persulfato de Potássio 1,0	1,5
Reação 06+	Persulfato de Potássio 1,5	1,0

Como nos outros testes de copolimerização, a dinâmica da reação foi acompanhada com retirada de alíquotas durante a reação. Entretanto, foram feitas análises de tamanho de partícula nos tempos 0, 20, 60 e 120 minutos e de conversão nos tempos 5, 10, 15, 20, 35, 60 e 120 minutos, deixando a análise de massa molar apenas para o polímero final. O polímero final também foi caracterizado por infravermelho e potencial zeta.

3.4 Ensaios de adsorção com a BSA

Para todos os polímeros fabricados, além das caracterizações padrões das propriedades de polímeros, foram feitos ensaios de adsorção com o objetivo de verificar a influência da composição do polímero sobre o desempenho da adsorção de BSA na superfície. A Figura 3-4 apresenta um esquema da metodologia utilizada para realização dos testes de adsorção de proteína. Esta metodologia foi adaptada de HERMANSON (2008) e REVILLA et al. (1995). Foram colocados em contato 5 mL de suspensão polimérica diluída à 5 g/L e 5 mL de solução de BSA 2 g/L em tampão acetato de pH 4,5 durante 24 h sob agitação constante (20 rpm) em *shaker* e na temperatura de 23°C. A concentração inicial de proteína foi baseada em cálculo de 5 vezes a saturação (monocamada) da superfície, baseado em HERMANSON (2008) e disponível no Apêndice I. Posteriormente, a suspensão foi filtrada em membrana de 0,22 µm de diâmetro. Para os ensaios de copolimerização (Secção 3.3.1) foram utilizados filtros de

éster de celulose, enquanto que para os ensaios descritos na secção 3.1.2 utilizou-se poli(éter sulfona) como meio filtrante. O filtrado era diluído dez vezes e dosado com auxílio da metodologia de BRADFORD (1976). Os resultados foram monitorados por absorção de luz no comprimento de onda 595 nm. A absorbância era convertida em concentração por intermédio de uma curva de calibração constituída com padrões contendo diferentes concentrações de solução de BSA (Figura 3-5). Por fim, a massa adsorvida de proteína era quantificada pelo balanço de massa, subtraindo-se a massa inicial da massa dosada no filtrado. Com o objetivo de verificar a natureza da adsorção e a permanência da proteína adsorvida, foram feitos ensaios de dessorção em meios adversos. As amostras pós-adsorção foram centrifugadas e ressuspensas três vezes em água e em soluções aquosas. de tampão fosfato com pHs 6, 7 e 8. A última ressuspensão foi deixada sob agitação durante 24 h a 37 °C, simulando a temperatura corpórea. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4000 rpm e ressuspensas nos respectivos meios. Este ensaio foi realizado para a primeira série de reações. Para as reações seguintes, fez-se necessária somente a verificação da dessorção em água e pH 7 para a primeira solução de lavagem.

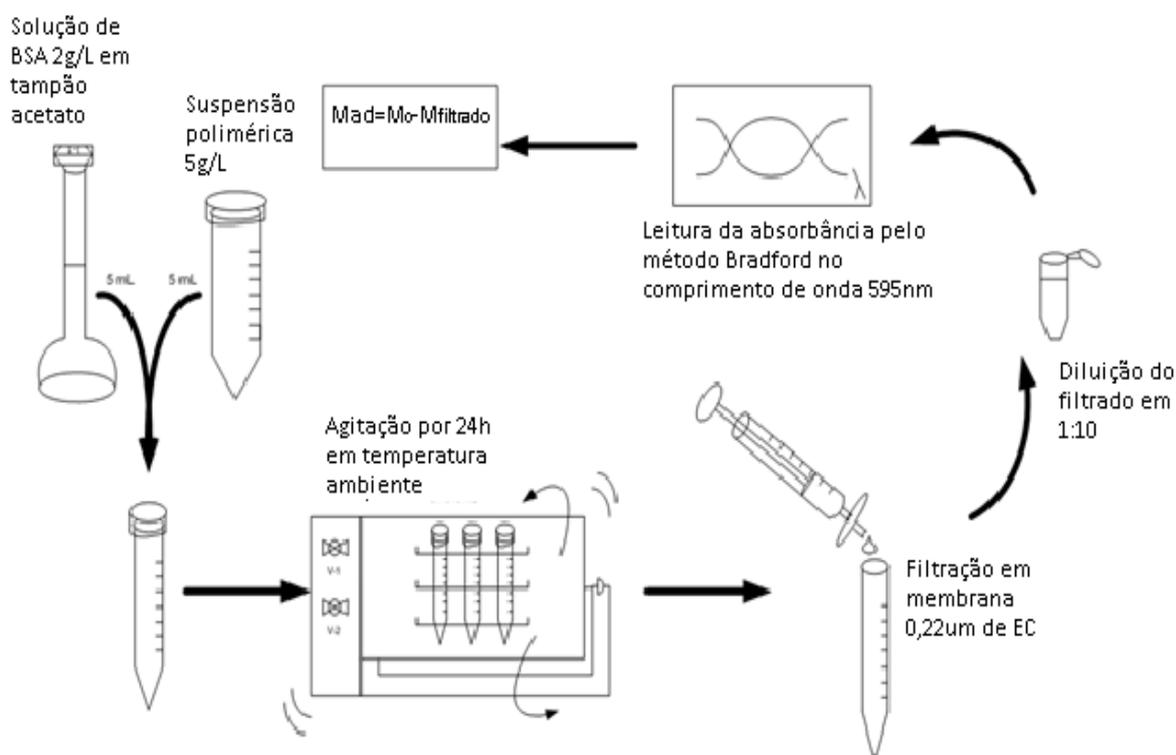


Figura 3-4 Esquema da metodologia utilizada para os ensaios de adsorção.

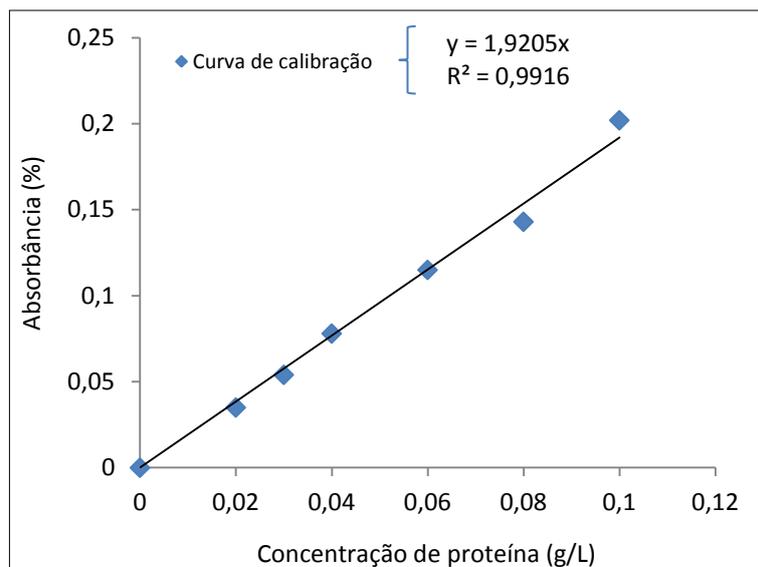


Figura 3-5 Exemplo de curva de calibração da absorvância como função da concentração de proteína BSA.

Foram também construídas as isotermas para os polímeros das reações 01, 13 e 16, de forma a verificar como o tipo de interação variava para as diferentes rotas na presença ou ausência de comonômero. Para tal, manteve-se a solução padrão de proteína de 2 g/L e adicionaram-se diferentes volumes de suspensão polimérica, como mostra a Tabela 3-3. Admitiu-se que o equilíbrio era atingido após 24 h e mediu-se a quantidade adsorvida com a mesma metodologia já descrita. O período de 24 h foi extrapolado com base em dados da literatura (LI *et al.*, 2005; YOON, *et al.*, 1998), na qual experimentos semelhantes atingem o equilíbrio sempre em período inferior a este (entre 3h e 12h).

Tabela 3-3 Diferentes concentrações utilizadas para obter as isotermas de adsorção

Pontos da isoterma	volume de sol. polimérica (mL)	concentração de polímero (mg/ml)	massa de polímero (g)
A	1,00	0,83	0,005
B	2,00	1,43	0,010
C	4,00	2,22	0,020
D	5,00	2,50	0,025
F	8,00	3,08	0,040
G	10,00	3,33	0,050

Volume de solução de proteína em contato= 5 mL.

Concentração inicial da solução de proteína= 2 g/L.

3.5 Ensaios *in vitro*

Os ensaios de viabilidade celular *in vitro* foram realizados no Laboratório de Oncobiologia Molecular - LabOMol - do departamento de Fármacos, na Faculdade de Farmácia da UFRJ, sob responsabilidade da Professora Patricia Zancan. Para os ensaios *in vitro*, utilizaram-se partículas formadas pela reação “3+” e contendo albumina de soro humana (HSA) adsorvida. Primeiramente foi feita a cultura das células. As células de carcinoma mamário humano da linhagem MCF-7 foram mantidas em frascos de cultura e acondicionadas em estufa com CO₂. A linhagem celular MCF-7 foi cultivada em meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco) e foi suplementada com 10% de soro fetal bovino, glutamina (0,29 g/l) e bicarbonato de sódio (3,7 g/l), sendo mantida em pH 7,4. O inóculo inicial foi de 50000 células/ml, que foram subcultivadas a cada dois dias e mantidas em fase log de crescimento celular, como descrito por ZANCAN *et al.* (2010).

Na sequência, foram feitos experimentos para avaliação da toxicidade com auxílio de ensaios de viabilidade celular, avaliada por intermédio de dois métodos: (1) MTT e (2) integridade membranar pela quantificação da atividade LDH extravasada para meio de cultura. Células (10000 células/ml) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio de cultura apropriado para cada linhagem dispostos em no trabalho de FURTADO *et al.* (2012). Após 48 horas, o meio de cultura em contato com as células foi removido e substituído. Diferentes concentrações (0 - 1750 µg/mL) de nanopartículas de PMMA adsorvida ou não com albumina sérica humana (HSA) foram adicionadas. Após 24 h, a viabilidade foi determinada pelo método de MOSMANN (1983) com adição de 5 mg/ml de MTT (Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium) dissolvido em tampão PBS. As placas de cultura contendo essa solução foram deixadas por 4 horas a 37 °C. Ao final da fase de incubação, descartou-se o sobrenadante e os cristais de formazam produzidos foram dissolvidos em 200 µl de DMSO. A absorvância do corante foi medida no comprimento de onda de 570 nm com a subtração do sinal de fundo em 650 nm, utilizando-se o Espectrofotômetro Victor 3 (PerkinElmer, USA) (FURTADO *et al.*, 2012).

A viabilidade celular também foi avaliada através da quantificação da atividade da enzima lactato-desidrogenase (LDH) presente no meio de cultura. Após 24 h de incubação das células com as soluções de nanopartículas, a atividade da LDH foi

avaliada em um meio reacional contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM NAD⁺ e 44,6 mM lactato de sódio. A redução do NAD⁺ foi avaliada pela medida da absorvância em 340 nm no espectrofotômetro Victor 3 (PerkinElmer, EUA) (FURTADO *et al.*, 2012).

Em ambos os ensaios fizeram-se medidas de absorvância que foram convertidas em medidas normalizadas em relação à situação do meio de cultura (100%) para apresentação nos gráficos. Para todos os ensaios foram feitos controles em iguais condições com a HSA pura e as nanopartículas sem HSA adsorvida.

4 Resultados

Na forma concebida originalmente, o presente trabalho tinha a pretensão de realizar bioconjugações por adsorção e também por reações químicas covalentes de proteínas com os grupos funcionais adicionados. Entretanto, os resultados obtidos com ensaios de adsorção física foram considerados bastante satisfatórios e intrigantes, de maneira que se optou por investigar este tipo de interação mais profundamente. Juntamente com os resultados preliminares, encontramos motivação especial com as exposições de KIM e YOON (2002), que incentivam este tipo de investigação. Eles declaram que, se o mecanismo exato de adsorção de proteínas em partículas poliméricas fosse bem conhecido, então pontes de hidrogênio, ligações iônicas e interações hidrofóbicas poderiam ser usadas para promover uma enorme redução de tempo e esforço requeridos para realização de ligações covalentes entre proteínas e polímeros com auxílio de reações muitas vezes complicadas.

A fim de esclarecer a nomenclatura adotada, sabe-se que a ASTM (2012) sugere que sejam consideradas como nanopartículas aquelas estruturas que apresentam duas ou três dimensões entre 1 nm e 100 nm. As partículas aqui fabricadas não são monodispersas e, muitas vezes, não apresentam média de tamanho nesta faixa. Porém, quando considerada a distribuição de tamanhos, certa parcela das partículas encontra-se dentro desta faixa. Desta forma, adotou-se neste trabalho a classificação publicada pelo comitê científico europeu no documento sobre a base científica para a definição do termo "nanomaterial" (SCENIHR, 2010), enquadrando as partículas aqui obtidas como nanopartículas (NPs).

4.1 Copolimerizações e funcionalização das partículas

São apresentados a seguir os efeitos relativos à adição dos comonômeros na polimerização. Como descrito no Capítulo 3, os comonômeros HEMA, DMAEMA, AMA, AA e MAM foram usados em proporção de 7% em massa na copolimerização

com o metacrilato de metila. Todos estes comonômeros têm forte afinidade com a água e, para fins de avaliação da metodologia, foram estudadas duas rotas de reação: com iniciador hidrossolúvel (rota 01) e com iniciador organossolúvel (rota 02). O objetivo foi verificar a influência do iniciador sobre a etapa de nucleação e de formação de polímero na fase aquosa.

Com o intuito de verificar a ocorrência da copolimerização, foram feitas análises de DSC, GPC, FTIR e RMN mostradas a seguir. Com as análises de RMN, pretendeu-se estimar quantitativamente a proporção de cada monômero incorporado na cadeia polimérica. A análise do comportamento dinâmico da reação foi realizada com auxílio do monitoramento do diâmetro de gota e de partícula, análise de massa molar do polímero e de conversão (gravimétrica).

Os cálculos das quantidades incorporadas de cada monômero no polímero final foram realizados a partir de espectros de RMN, verificando a área dos picos referentes a determinados átomos de hidrogênio/carbono presentes na estrutura. Para os cálculos, foram usados como referência os autores SILVA (2009) e BRANDOLINI e HILLS (2000). Devido à grande semelhança estrutural existente entre os monômeros utilizados, houve significativa dificuldade para realizar os cálculos. Por isso, foram utilizados preferencialmente espectros de H-RMN em lugar de espectros de C-RMN, tornando melhor a visualização. Os espectros de RMN completos para os copolímeros estão apresentados no Apêndice II, enquanto no interior das próximas seções será mostrada apenas uma parte ampliada dos espectros de H-RMN. Da mesma forma, no decorrer desta seção, a apresentação das T_{gs} será feita com auxílio de múltiplas curvas de DSC em um único gráfico. As curvas de DSC completas e as respectivas marcações usadas para os cálculos das temperaturas de transição vítrea podem ser visualizadas no Apêndice II. Estão também dispostas no Apêndice II as evoluções das distribuições de massa molar para cada reação.

As taxas de reação (R) foram calculadas como a razão entre a massa de monômero (ou monômero mais comonômero) consumida (ΔM_{mon}) no intervalo de tempo Δt , de acordo com a Equação 4.1. Nesta equação, $m_{M_{\text{mon}}}^i$ é a massa de monômero (ou monômero mais comonômero) presente no instante t^i correspondente.

$$R = \frac{\Delta M_{mon}}{\Delta t} = \frac{m_{M_{mon}}^i - m_{M_{mon}}^{i-1}}{t^i - t^{i-1}} \quad \text{Equação 4-1}$$

A equação de FOX (1956) também foi utilizada para o cálculo da quantidade de comonômero incorporada no copolímero. Esta equação é baseada em uma ponderação entre as Tgs dos homopolímeros e do copolímero formado como mostra a Equação 4-2.

$$\frac{1}{Tg_{cop}} = \frac{(1-\omega)}{Tg_1} + \frac{\omega}{Tg_2} \quad \text{Equação 4-2}$$

Nesta equação, ω é a fração de comonômero incorporado no copolímero, Tg_{cop} , Tg_1 e Tg_2 são as temperaturas de transição vítrea para os copolímeros, para o PMMA (homopolímero 1) e para os homopolímeros dos respectivos comonômeros. Tg_{cop} e Tg_1 foram medidas por análise de DSC, enquanto as temperaturas de transição vítrea dos homopolímeros dos comonômeros foram extraídas da literatura (BRANDRUP, 1999).

4.1.1 Homopolímero PMMA

Observou-se que as diferentes rotas utilizadas para a polimerização interferem na dinâmica da reação e nas propriedades finais do polímero obtido, o que se explica pelos diferentes mecanismos de reação. Os gráficos da Figura 4-1 evidenciam esta diferença. Pode ser observado que o uso do iniciador organossolúvel (PBO) resulta em um diâmetro médio de partículas maior, como observado na Figura 4-1 (a), e massas molares um pouco menores para o polímero, como verificado na Figura 4-1 (c), quando comparados aos resultados obtidos utilizando iniciador hidrossolúvel. Além disso, o uso deste iniciador retarda a dinâmica da reação e é responsável por conversões mais baixas. Segundo ANTONIETTI e LANDFESTER (2002), quando o iniciador organossolúvel é utilizado para realização de reações de polimerização em miniemulsão, eles estão presentes inicialmente no interior das gotas e se decompõem com o aquecimento em dois radicais. Entretanto, cadeias poliméricas de tamanho consideravelmente grande só podem ser formadas quando apenas um radical (dentre os dois formados a partir da decomposição do iniciador) está presente dentro das gotas. Isso se deve ao fato de que a gota é muito pequena e a concentração local de radicais é muito alta, resultando em terminação precoce das cadeias. Portanto, para que a reação realmente se desenvolva, faz-se necessário que um dos radicais formados desorva em direção à fase aquosa

(ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002). Este mecanismo é provavelmente a explicação para o retardamento da dinâmica da reação, para a formação de cadeias com massas molares mais baixas e para reações com conversões mais baixas. Esta explicação é fundamentada nas altas taxas de terminação resultante da presença de dois radicais simultaneamente dentro das gotas. Adicionalmente, ANTONIETTI e LANDFESTER (2002) relatam que o PBO não é o iniciador mais eficiente para utilização em polimerizações conduzidas em miniemulsão, pois possui baixa hidrofiliicidade, o que limita a dessorção para a fase aquosa.

Apesar de existirem na literatura (PASUT *et al.*, 2007) referências a um limite superior (50000 g/gmol) de massa molar para que o polímero possa ser eliminado pelos rins, ainda existe muita controvérsia sobre este tema. Por isso, o foco nessa etapa do trabalho não foi a obtenção de partículas com massa molar pré-estabelecida. Foram concentrados esforços na manutenção da estabilidade coloidal e na regularização do tamanho de partículas, de maneira que nas próximas etapas os diâmetros se encontrassem na faixa requerida de 50 a 150 nm descrita por MARCUCCI e LEFOULON (2004) como ideal para o acesso (via EPR) a células e tecidos doentes.

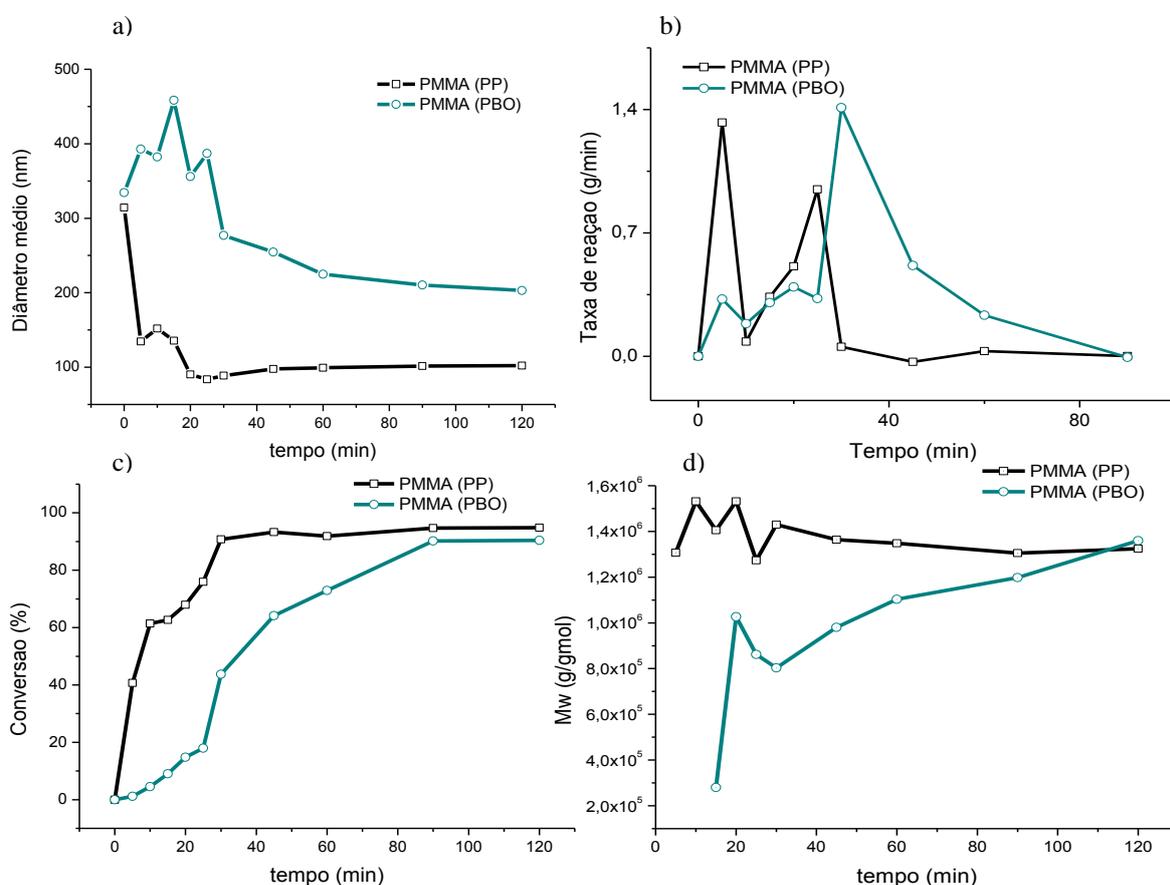


Figura 4-1 Evolução dinâmica da reação para o PMMA conduzida com os iniciadores PBO e PP: a) diâmetro médio de partículas; b) taxa de reação; c) conversão; d) massa molar ponderal média.

Para ambos iniciadores, existe uma redução sistemática do diâmetro com o tempo. Este comportamento não é típico de uma reação de polimerização em miniemulsão, em que a nucleação das gotas prevalece. No caso padrão, o diâmetro das gotas permanece essencialmente constante. O resultado tem provável explicação na existência de mecanismos de nucleação micelar ou homogênea, intensificados pela presença do iniciador solúvel na fase aquosa. A interpretação é reforçada pela existência de múltiplas modas nas distribuições de tamanho de partícula. Como mostrado nas Figura 4-2 e Figura 4-3, formam-se modas posicionadas em diâmetros inferiores aos diâmetros iniciais, cujas intensidades aumentam continuamente com o tempo. As hipóteses de coexistência de nucleações micelar ou homogênea foram investigadas e observou-se que a nucleação homogênea tem maior probabilidade de estar ocorrendo. Para que ocorra nucleação micelar, é necessário que existam micelas no meio; ou seja, a concentração de surfactante deve estar acima da concentração micelar crítica (CMC). Os cálculos para quantificação do percentual de surfactante livre mostrados no APÊNDICE I indicam que não devem existir micelas por excesso de surfactante nas condições de reação, de maneira que pode ser descartada a hipótese de nucleação micelar.

A nucleação homogênea é mais evidenciada quando são usados monômeros com afinidade pela fase aquosa (polares ou hidrossolúveis), como é o caso do MMA. ZIEGLER *et al.*, (2009) chegaram à conclusão de que tanto a nucleação homogênea quanto a nucleação das gotas coexistiam, quando realizaram a polimerização do PMMA com ácido vinil fosfônico, que é também um monômero com alta solubilidade em água. Quando foi utilizado o PP como iniciador, a nucleação homogênea foi preponderante e as partículas formadas possuíam distribuição de diâmetros final em torno de uma única moda. Quando utilizado PBO como iniciador, a distribuição final de tamanho de partículas apresentou duas modas distintas, sugerindo que a nucleação homogênea era apenas parcial e concomitante à nucleação das gotas.

Observa-se na Figura 4-2, com o uso de PBO como iniciador, que a distribuição de tamanho de partículas se desloca inicialmente para valores mais altos e se alarga, provavelmente por conta da coalescência e possível degradação difusional. No entanto, após 30 minutos, quando a conversão atinge cerca de 30%, ocorre forte nucleação de partículas pequenas, causando redução de diâmetros médios, aumento das taxas de reação e das massas molares médias, como esperado pela cinética clássica

(ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002; ASUA, 2002). Observa-se na Figura 4-3, no entanto, que o uso do PP favorece a formação de partículas pequenas desde o início da reação, por conta da formação de radicais na fase aquosa diretamente.

A ocorrência da nucleação homogênea limita a aplicação das partículas para encapsulamento, visto que o produto encapsulado, originalmente dentro das gotas, não pode ser transferido para as novas partículas formadas. O fator aparentemente preponderante para existência da nucleação homogênea neste trabalho foi o uso do homogeneizador do tipo Turrax para preparação da miniemulsão inicial nesta primeira bateria de experimentos. Isto pode ser verificado quando se comparam os resultados obtidos nesta bateria de experimentos com aqueles mostrados pelos experimentos do plano em cruz (discutido na Secção 4.3) para a mesma formulação e mesmas condições experimentais, porém utilizando o sonicador. Como nem o sonicador nem o Turrax afetam a solubilidade do MMA na água nem a taxa de dessorção de radicais nas gotas, o efeito observado pode ser decorrente da distribuição de tamanho de partículas, que é mais larga quando o Turrax é utilizado (ver Figura 4-4). Para a mesma formulação, a formação de partículas maiores corresponde a uma diminuição da quantidade de partículas e da área disponível para que o iniciador encontre e nucleie preferencialmente as gotas, o que favorece a formação de novas partículas por conta do aumento relativo das taxas de polimerização na fase aquosa.

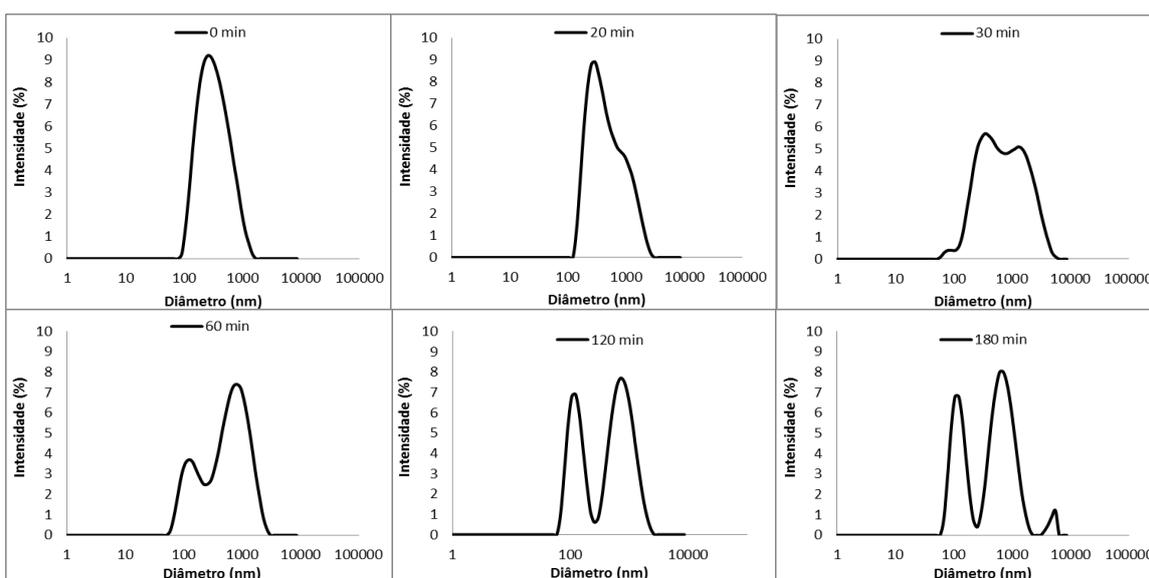


Figura 4-2 Distribuição de diâmetro de partículas ao longo do tempo para homopolímero de PMMA utilizando PBO como iniciador.

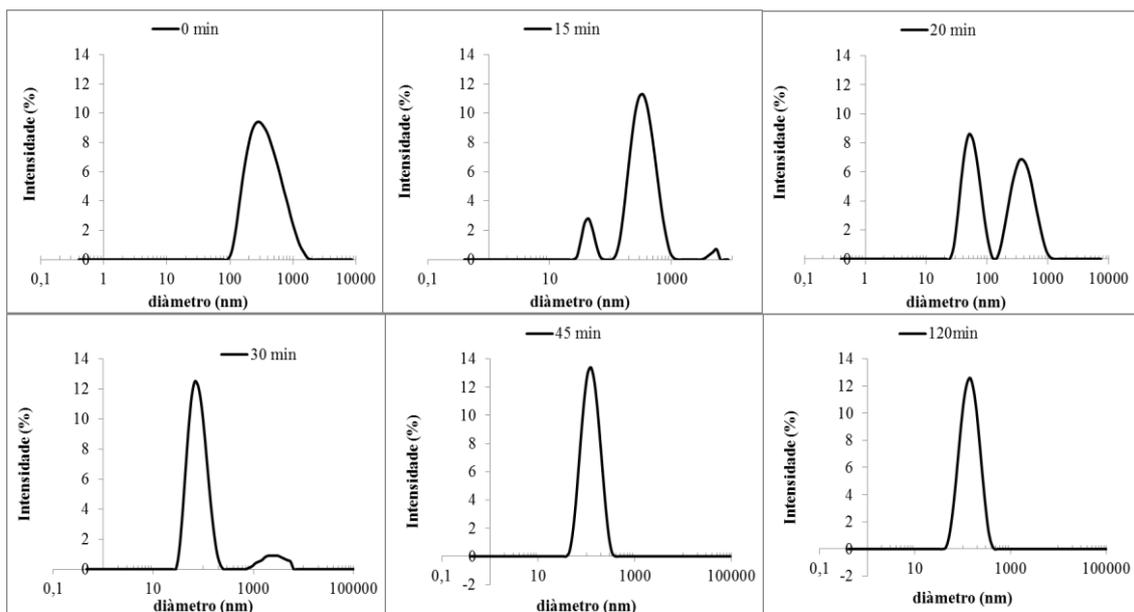


Figura 4-3 Dinâmica da distribuição de tamanho de partículas para o PMMA durante a reação com PP.

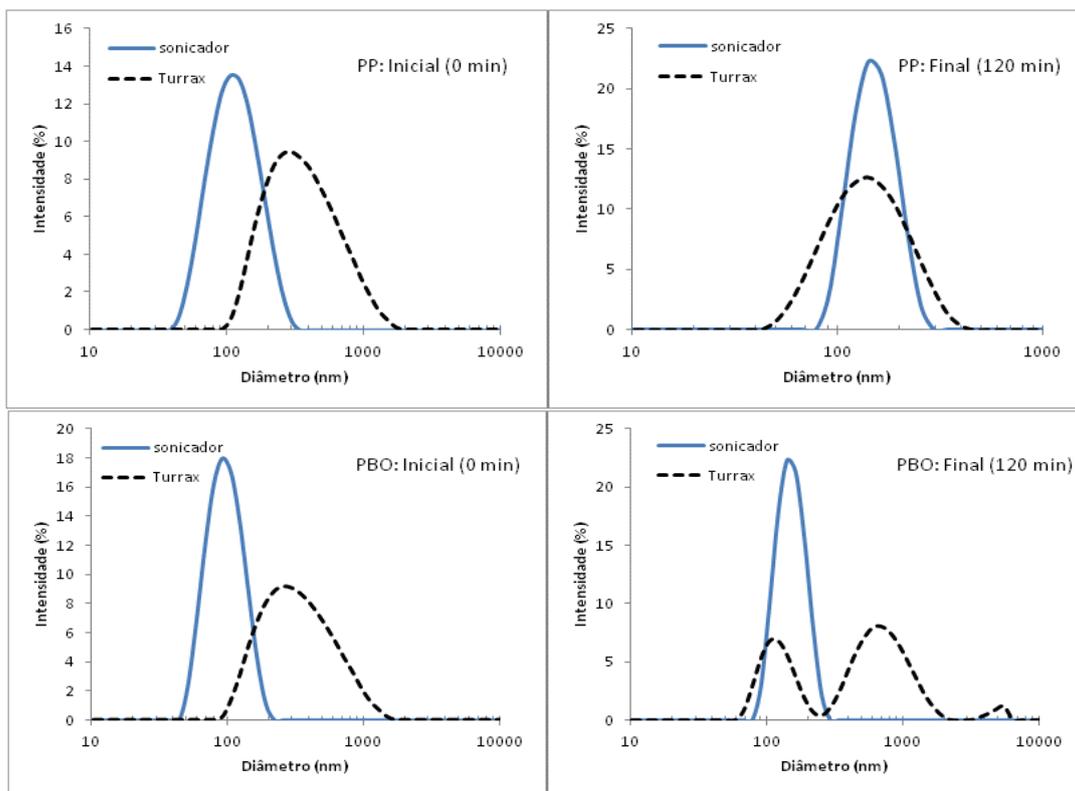


Figura 4-4 Distribuições de diâmetro inicial e final para reações de homopolimerização de MMA conduzidas com PP e PBO como iniciadores.

Observou-se também que, com o decorrer do tempo, as suspensões poliméricas obtidas a partir de polimerizações com o peróxido de benzoíla decantavam. Apesar de parecerem estáveis logo após a polimerização, a suspensão era desestabilizada com o decorrer do tempo. Este efeito de desestabilização pode ser decorrente da menor concentração de cargas na superfície, quando se usa o PBO como iniciador, ou também pode ser resultado das distribuições de tamanho mais largas obtidas com o Turrax e com o PBO.

A Figura 4-5 mostra as propriedades finais medidas para os homopolímeros de PMMA. Observa-se que há uma leve redução na temperatura de transição vítrea, decorrente da distribuição mais larga da massa molar, quando é utilizado o iniciador PBO. A redução da massa molar e, por conseguinte, da Tg são reflexos do mecanismo de polimerização dependente da dessorção de radicais já explicados nesta seção. Também foram realizadas análises de RMN para os homopolímeros de MMA, que serão mostrados nas próximas seções comparativamente aos copolímeros fabricados.

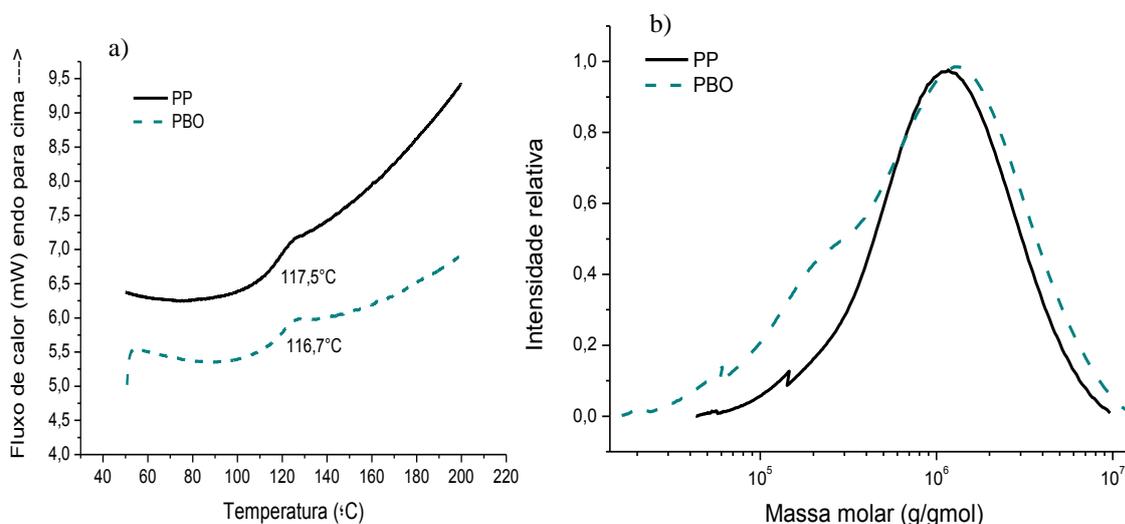


Figura 4-5 Propriedades do PMMA final obtido: a) Tg; b) Mw

O principal resultado obtido nesta etapa do trabalho foi a obtenção de um “benchmark” para comparação com as demais reações. Os homopolímeros “benchmarks” foram produzidos em réplicas e as reações foram bastante reprodutíveis. Nas seções seguintes serão estudadas caso a caso as copolimerizações do MMA com os comônômeros funcionais e, nestes casos, foram produzidas réplicas únicas de cada

experimento, embasado na grande reprodutibilidade de reações de polimerização como estas. A Tabela 4-1 resume as propriedades dos monômeros utilizados que ajudam na interpretação dos resultados que serão mostrados posteriormente. Com base nos dados de tensão interfacial da Tabela 4-1, por exemplo, pode-se justificar a desestabilização coloidal observada quando foi usado o comonômero DMAEMA, visto que o uso deste monômero leva a uma tensão interfacial mais alta. A Tabela 4-1 mostra que as razões de reatividade não são muito diferentes de um e, por isso, prevê-se uma boa incorporação de comonômeros em todos os casos. É possível também observar a solubilidade dos monômeros em água, que pode justificar o aumento das taxas de nucleação homogênea nos casos em que foi utilizado PP como iniciador e a formação de polímero rico em comonômero na interface com a água. Após os estudos de cada caso, a Seção 4.1.7, resume as propriedades e os mecanismos propostos para explicar cada copolimerização.

Tabela 4-1 Propriedades dos Monômeros

Monômero	Solubilidade em H ₂ O (g/L) ⁽¹⁾	Massa molar do monômero ⁽¹⁾	Razão de reatividade ⁽¹⁾		Propriedades de superfície/interface ⁽²⁾	
			r _I	r _{II}	γ (mN/m)	γ _{H₂O} ^I (mN/m)
MMA (I)	16	100,12	-	-	25,65	6,8
HEMA	miscível	130,14	0,75	1,5	26,4	13,90
DMAEMA	miscível	157,21	0,699	1,2	25,99	15,38
AMA	miscível	86,0892	0,63	0,25	26,06	5,71
AA	miscível	72,06	0,418	1,73	26,372	2,53
MAM	200	85,11	1,27	1,57	37,084 ⁽³⁾	-

(1) A 25°C. Retirados de BRANDRUP, J.; IMMERGUT, E.H.; GRULKE E.A (1999);

(2) Medidas em tensiômetro de anel, com soluções e interfaces similares àquelas preparadas para as reações.

(3) Solubilizada em água, como no experimento, visto que não é solúvel em MMA.

4.1.2 P(MMA-co-AA)

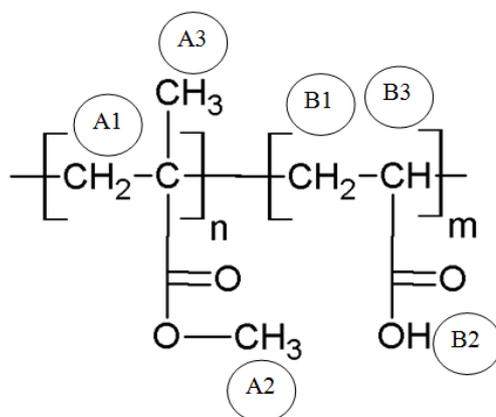


Figura 4-6 Fórmula estrutural do copolímero P(MMA-co-AA), com a marcação dos hidrogênios usados para análise de H-RMN.

Os comonômeros utilizados neste trabalho foram escolhidos não somente de acordo com os grupos funcionais presentes, mas também pela semelhança com o monômero principal, o MMA. Como pode ser visualizado na Figura 4-6, a estrutura do poli(ácido acrílico) é bastante semelhante à do PMMA. Dentre os monômeros utilizados, o AA é aquele que possui a estrutura mais simples, sendo o único cuja molécula é significativamente menor que a do MMA, devido à inexistência de grupamentos metila laterais.

A adição do ácido acrílico modifica muito a dinâmica da reação, como pode ser visto na Figura 4-7. A presença do AA provoca uma desaceleração da reação, quando utilizados ambos os iniciadores. Observa-se que, quando se utiliza o iniciador PP, os efeitos de retardamento da dinâmica existem; porém, o copolímero final possui massas molares e diâmetro médio de partículas muito semelhantes àqueles do PMMA homopolímero. Além disso, a reação atinge conversões levemente mais altas que no caso do PMMA. Neste caso, assim como na reação com MMA puro, pode-se inferir que existe um mecanismo de nucleação homogênea bastante pronunciado, provocando a redução do diâmetro médio com o tempo de reação (como pode ser visto na Figura 4-7(a)). Diferentemente, quando se utilizou PBO como iniciador, o efeito sobre as propriedades finais do polímero são bastante distintos do PMMA. Apesar de atingir uma conversão de 87%, as taxas de reação observadas foram muito baixas e praticamente

não se observa o efeito pronunciado de aceleração da reação, como visto na Figura 4-7(d). Além disso, o polímero final produzido possui massa molar ponderal média muito mais baixa que no caso do PMMA, quando foi utilizado o PP. O formato das curvas de conversão (87% ao final) e de taxa sugerem que a reação não se processou completamente. A presença do AA parece desacelerar tão fortemente a polimerização pela rota 02 que o tempo estimado de 2 h não foi suficiente para que a reação se completasse. Por causa da altíssima afinidade do AA pela água, este monômero encontra-se particionado nas duas fases (aquosa e orgânica). Uma hipótese provável é a de que uma parcela do AA solubilizada na fase aquosa não estivesse participando da polimerização por causa da baixa hidrofiliçidade do iniciador PBO, levando à redução da conversão. No entanto, esta hipótese não é sustentada, quando se verificam as Tgs dos copolímeros formados, uma vez que as Tgs de ambos os copolímeros fabricados com PP e com PBO são muito próximas (108,7 °C e 109,7 °C respectivamente), indicando que a incorporação de AA é aproximadamente a mesma nos dois casos.

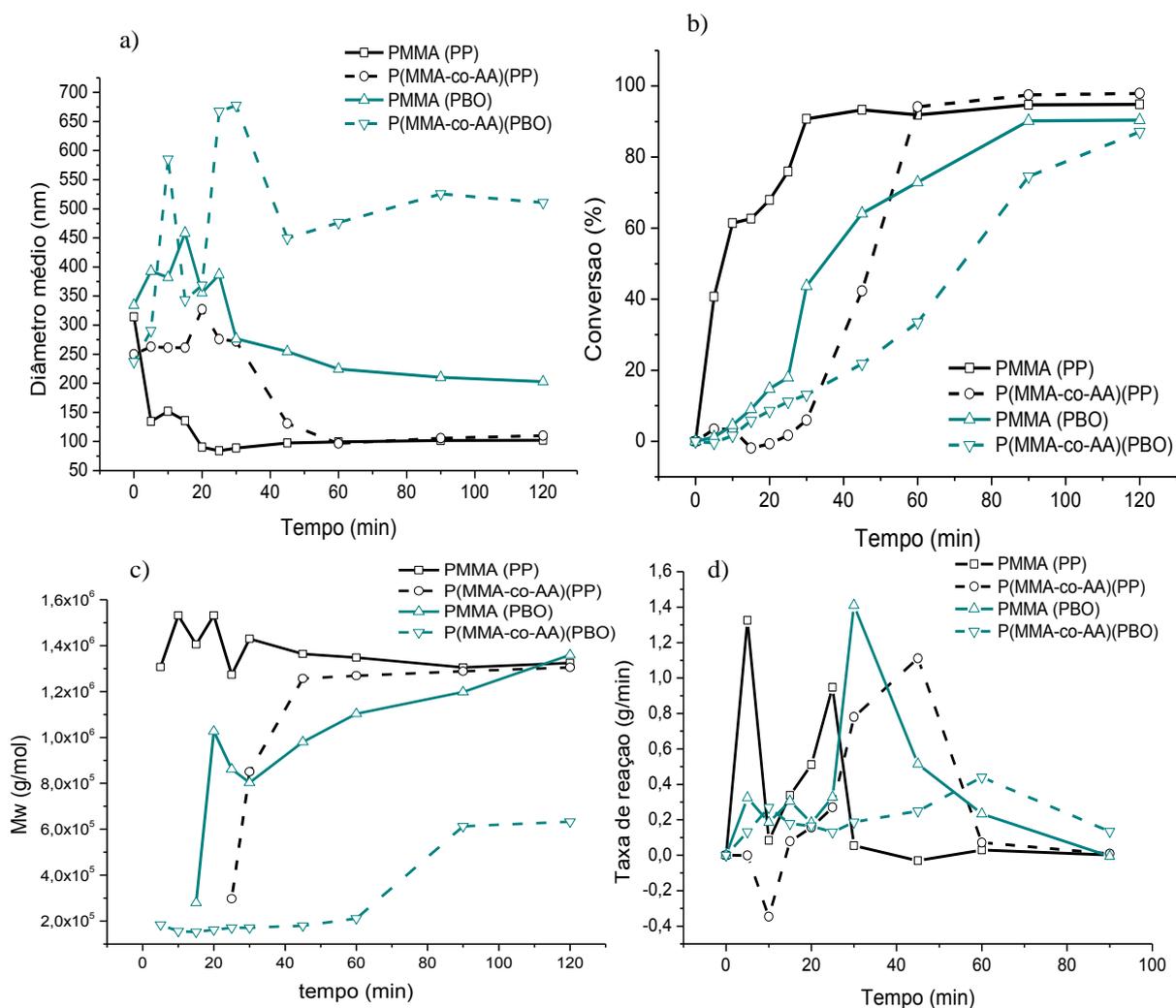


Figura 4-7 Análises da dinâmica da reação de copolimerização do P(MMA-co-AA): a) diâmetro médio; b) conversão; c) massa molar ponderal média; d) taxa de reação.

Verifica-se na Figura 4-8 uma vez mais a existência do mecanismo de nucleação homogênea quando utilizado o iniciador PP. Já no caso em que se utiliza o PBO, não parece existir nucleação homogênea, uma vez que as distribuições de tamanho de partícula são deslocadas continuamente para diâmetros maiores com o decorrer da reação (ver Figura 4-9). A hipótese mais provável para explicar o aumento do tamanho de partículas é o acúmulo de blocos ricos em AA na interface com a água, formando “penugens” hidrofílicas, como explicam HOLZAPFEL *et al.* (2005) em trabalho que estuda a copolimerização do AA com estireno. Estas “penugens” podem ser responsáveis por uma maior atração entre as partículas, promovendo aglomeração e aumentando o tamanho das partículas. Esta hipótese fundamenta também o efeito na redução da massa molar, uma vez que, essa camada de AA na superfície das partículas oferece impedimento à dessorção de radicais, favorecendo a terminação, reduzindo a massa molar final e impedindo o aumento das taxas de polimerização na fase aquosa que levam à nucleação homogênea.

As Figura 4-7 (a) e Figura 4-8 mostram ainda que a etapa de nucleação homogênea é significativamente afetada pela presença do AA, mesmo quando a reação é iniciada com PP. Pode-se observar que a redução do diâmetro médio das partículas, característica da nucleação homogênea, é retardada para aproximadamente 45 minutos decorridos de reação, enquanto que para o PMMA o fenômeno acontece por volta dos 5 minutos de reação. Esse efeito é proveniente da solubilidade muito maior do PAA em água, o que certamente desfavorece a coagulação e precipitação de novas partículas poliméricas. Portanto, sob este ponto de vista, a adição de pequenas quantidades de AA à mistura reacional pode ser extremamente benéfica ao processo de encapsulamento de ativos com polímeros a base de MMA.

Como na copolimerização com ácido metacrílico, a semelhança entre os compostos e a sobreposição dos picos dificultou o cálculo preciso da quantidade do comonômero incorporado por H-RMN e C-RMN, apesar de notar-se claramente as modificações no espectro na Figura 4-10. Resultados semelhantes foram encontrados por STRANDMAN *et al.*, 2006. Foi realizado um cálculo aproximado tomando como base a integração do pico para o hidrogênio B3 do AA em proporção ao pico referente aos quatro hidrogênios A1 e B1 ($2 \times A1$ e $2 \times A2$). Foi encontrada uma proporção de 11,8% de AA no copolímero produzido com PP como iniciador, o que confirma a incorporação apreciável do comonômero no produto final.

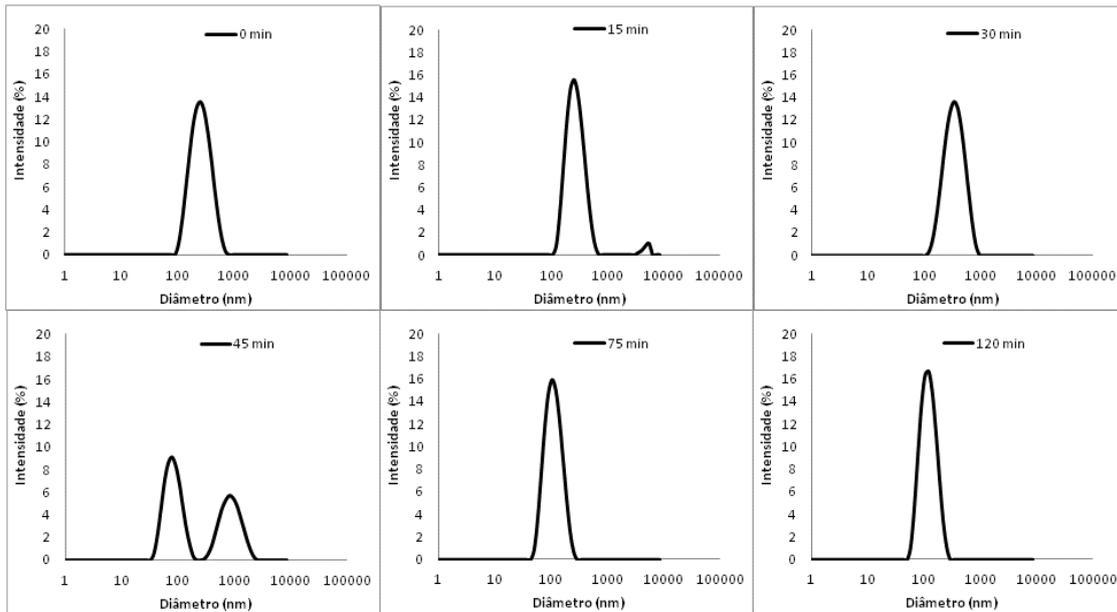


Figura 4-8 Dinâmica de distribuição de tamanho médio de partículas ao longo da reação de polimerização do MMA com o AA iniciada por PP.

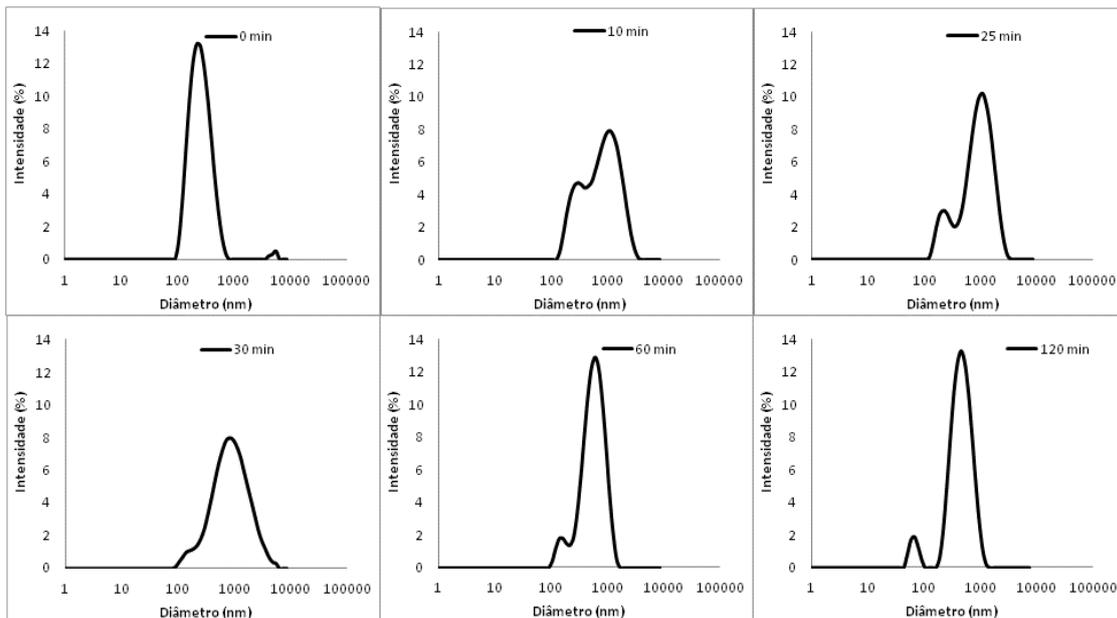


Figura 4-9 Dinâmica de distribuição de tamanho médio de partículas ao longo da reação de polimerização do MMA com o AA iniciada por PBO.

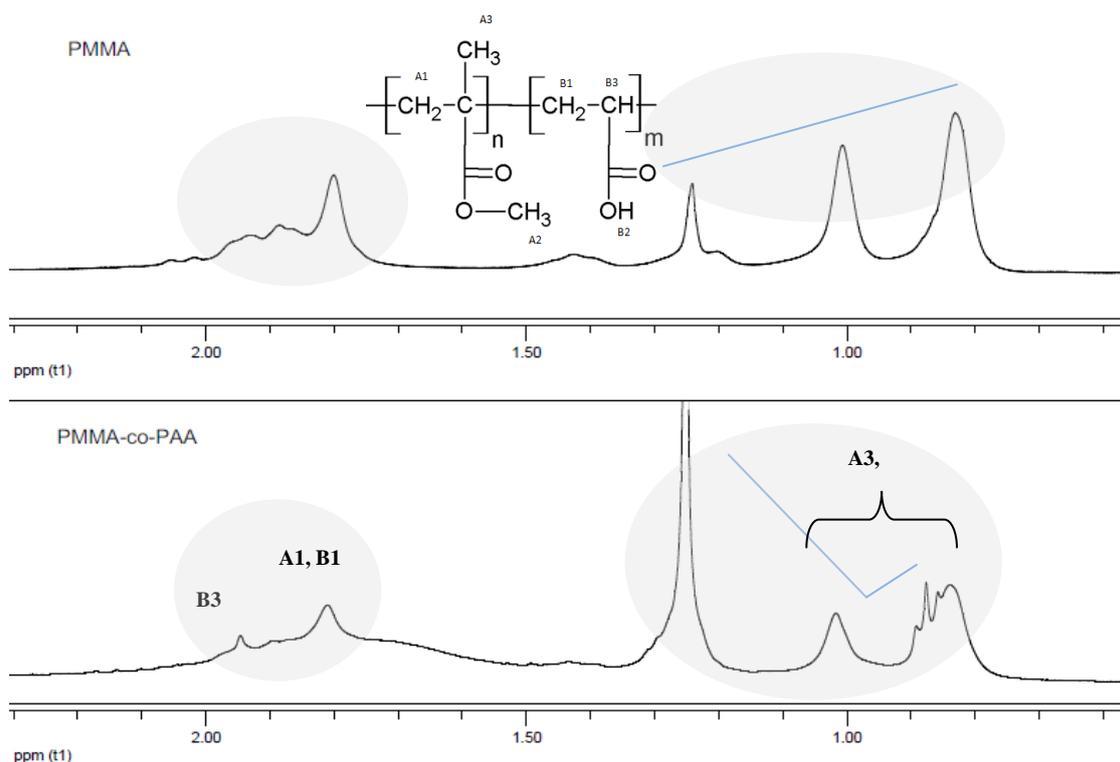


Figura 4-10 Espectros de H-RMN para o P(MMA-co-AA) obtido pela polimerização iniciada com PP.

As análises de DSCs também comprovaram que houve incorporação significativa dos comonômeros, já que houve abaixamento significativo das Tgs, como pode ser visualizado na Figura 4-11. Isto se deve à presença do AA, cuja Tg do homopolímero PAA (entre 75 °C e 106 °C) é significativamente mais baixa que a do PMMA (117,2 °C, quando usado PP, e 116,7 °C, quando usado PBO). Havendo copolimerização, a Tg do copolímero tende então a assumir um valor intermediário entre as Tgs dos homopolímeros. Pode-se aferir o percentual de comonômero incorporado no copolímero utilizando as Tgs medidas por DSC, mediante a Equação 4-2 (FOX, 1956). Os cálculos permitem estimar que as cadeias poliméricas são compostas por aproximadamente 13,9 % de AA, quando utilizado o iniciador hidrossolúvel, e 12,35% de AA, quando utilizado iniciador organossolúvel. Ambos os valores são bastante próximos daquele encontrado com base no espectro de H-RMN e corroboram para a conclusão de que o AA encontra-se em proporções maiores que a proporção alimentada, indicando uma maior reatividade deste monômero com relação ao MMA.

As Figura 4-11 (a) e (b) mostram as curvas de DSC e DMM, respectivamente para os copolímeros finais, comparativamente às dos homopolímeros de MMA. Verifica-se novamente que o efeito do AA sobre a massa molar foi muito mais pronunciado quando foi utilizado PBO como iniciador e que a incorporação do AA foi aproximadamente a mesmas utilizando ambos os iniciadores, visto que as Tgs são muito próximas. O efeito de alargamento das massas molares na presença do comonômero resulta provavelmente da mudança das condições reacionais ao longo do tempo, por causa das diferentes reatividades do MA e do AA.

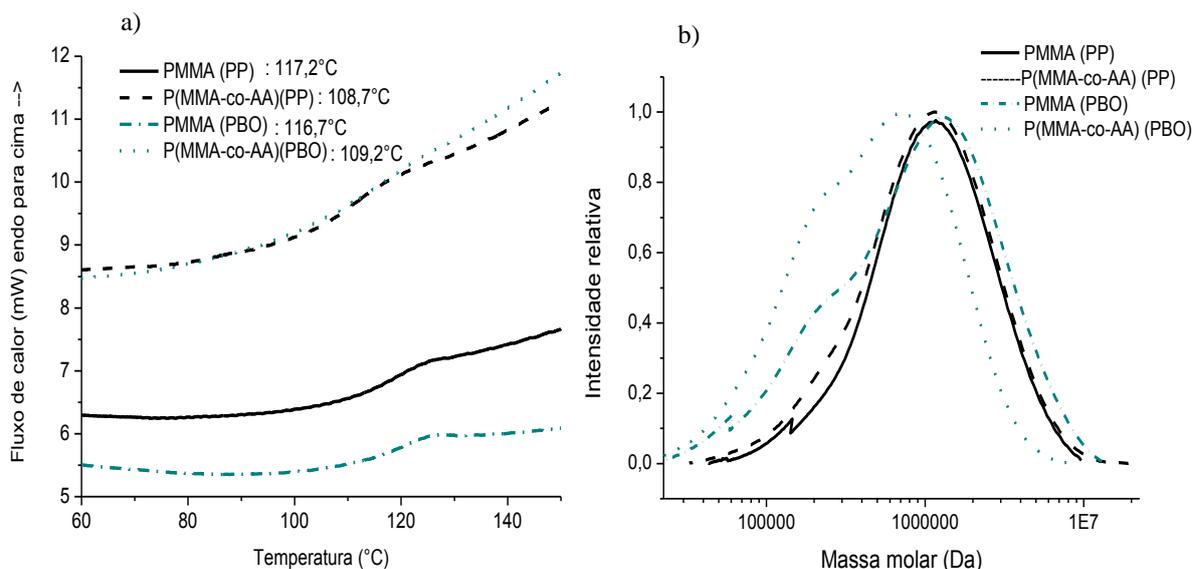


Figura 4-11 Análise térmica (a) e distribuição de massa molar (b) dos polímeros de P(MMA-co-AA) obtidos.

Conclui-se nesta seção que o AA afeta diferentemente o andamento da reação e as propriedades finais do polímero, quando são utilizadas a rota de iniciação por iniciador hidrossolúvel e a rota de iniciação por iniciador organossolúvel. Quando PP foi utilizado, observou-se a presença de nucleação homogênea e propriedades finais muito semelhantes às do PMMA, embora tenha sido observado atraso pronunciado da etapa de nucleação. Quando PBO foi utilizado, observou-se a formação de partículas maiores e massas molares reduzidas em relação ao PMMA, provavelmente por causa da formação de “penugens” hidrofílicas de PAA na interface com a água, que podem ser responsáveis por aglomerações. O AA possui uma boa inserção no copolímero (em torno de 12%), que é um pouco maior que a proporção alimentada (10,45 % em mol), o que se deve à alta reatividade do monômero, inclusive com preferência pela copolimerização ($r < 1$) que pela homopolimerização.

4.1.3 P(MMA-co-AMA)

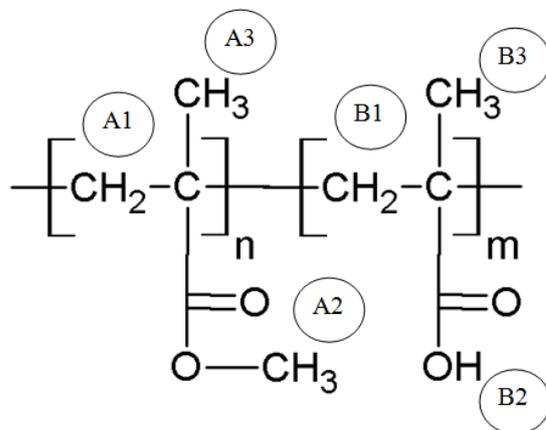


Figura 4-12 Fórmula estrutural do copolímero P(MMA-co-AMA), com a marcação dos hidrogênios usados para análise de H-RMN.

Como pode ser visto na Figura 4-12, os monômeros metacrilato de metila e ácido metacrílico são extremamente semelhantes e diferem apenas por um grupo metila (no MMA), posicionado no lugar de um átomo de hidrogênio (no AMA). Esta semelhança dificulta muito a caracterização do copolímero. Análises realizadas durante a reação (Figura 4-13) revelaram que as reações com o comonômero ácido metacrílico proporcionaram conversões finais iguais estatisticamente (97,7%) àsquelas do PMMA homopolímero (94,8%), quando utilizada a rota por iniciador hidrossolúvel. Já quando se utilizou o PBO como iniciador, a conversão final foi menor (86,2%) do que a do PMMA homopolímero (90,4%). Pode ser observada uma cinética de reação muito similar àquela resultante da adição do ácido acrílico, em que a presença do comonômero retarda a reação. A semelhança com o AA pode ser visualizada também na massa molar menor para as reações com PBO e na dinâmica do tamanho médio de partículas. Devido à grande semelhança existente entre os resultados obtidos com o AA e o AMA, acredita-se na ocorrência dos mesmos fenômenos de nucleação homogênea (quando utilizado o PP) e formação de “penugens” de polímero rico em PAMA na superfície, quando utilizado o PBO. Isso reforça a ideia de que a adição do monômero solúvel em água pode ser benéfica ao processo de encapsulamento de ativos por polímeros baseados em MMA. Observou-se também a desestabilização da emulsão quando utilizada a rota de reação iniciada por PP; contudo, como a reação já havia se

completado neste momento (após 1 h de reação), as análises posteriores puderam ser realizadas com sucesso.

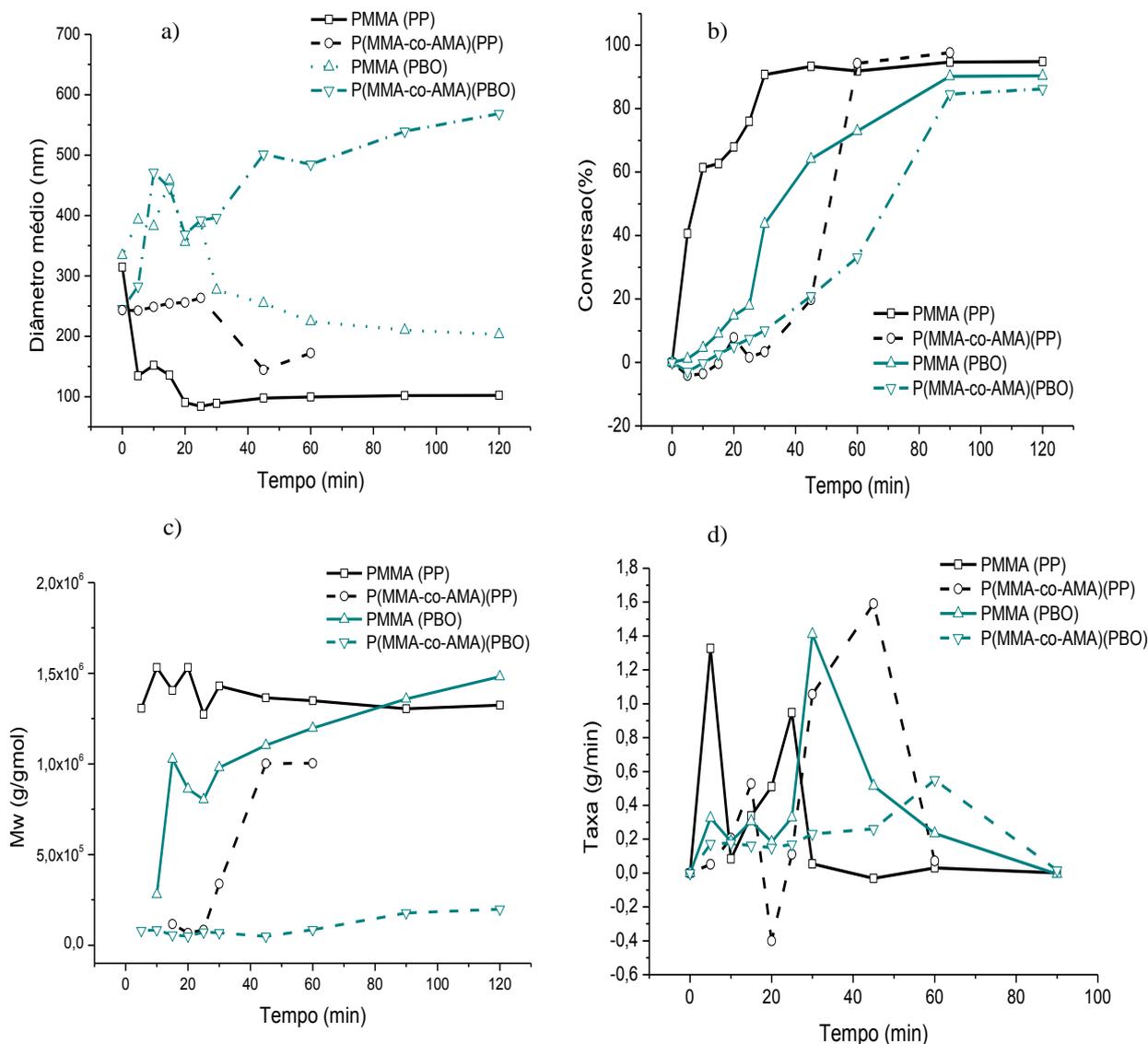


Figura 4-13 Análises da dinâmica da reação de copolimerização do P(MMA-co-AMA): a) diâmetro médio; b) conversão; c) massa molar ponderal média; d) taxa de reação.

As Figura 4-14 e Figura 4-15 mostram a evolução das distribuições de tamanho de partícula durante a reação para as duas rotas empregadas. Vê-se claramente a ocorrência de nucleação homogênea, quando utilizado o PP, pela formação de modas de diâmetros menores que aumentam de intensidade com o tempo, reduzindo o diâmetro médio de partículas final. Observa-se que, com o uso do PBO, o comportamento é muito distinto. Neste caso, surgem modas maiores que vão aumentando de intensidade ao decorrer da

reação, até constituírem uma média de tamanho final maior que o diâmetro inicial. Observa-se, em particular, o significativo atraso da ocorrência da nucleação homogênea quando é adicionado AMA ao meio, por causa da expressiva solubilidade do PAMA no meio aquoso.

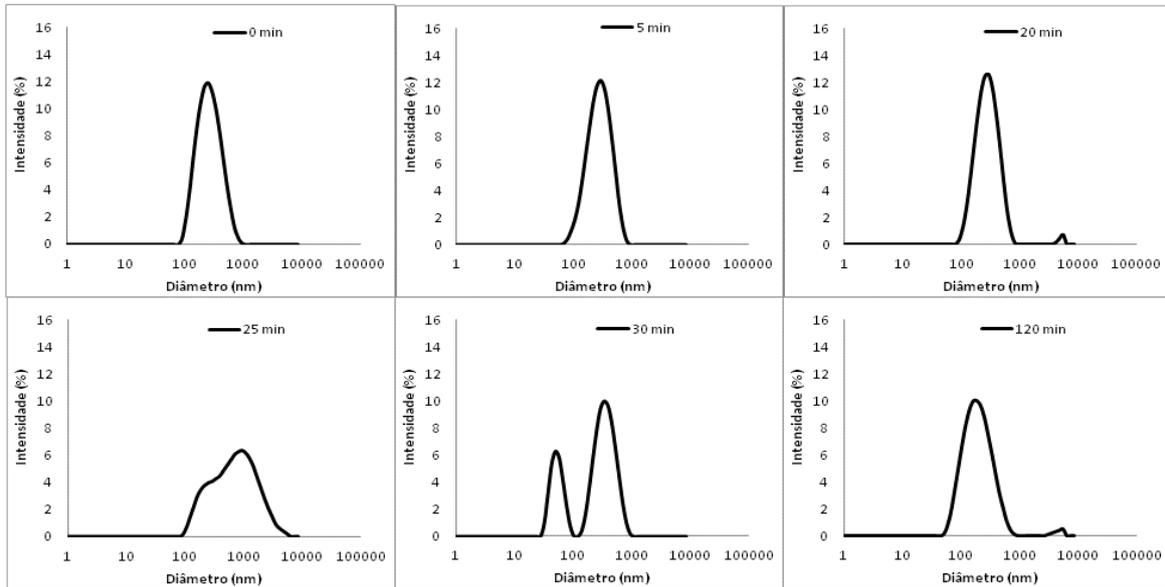


Figura 4-14 Dinâmica de distribuição de tamanho de partícula ao longo da reação de polimerização do MMA com o AMA pela rota iniciada por PP.

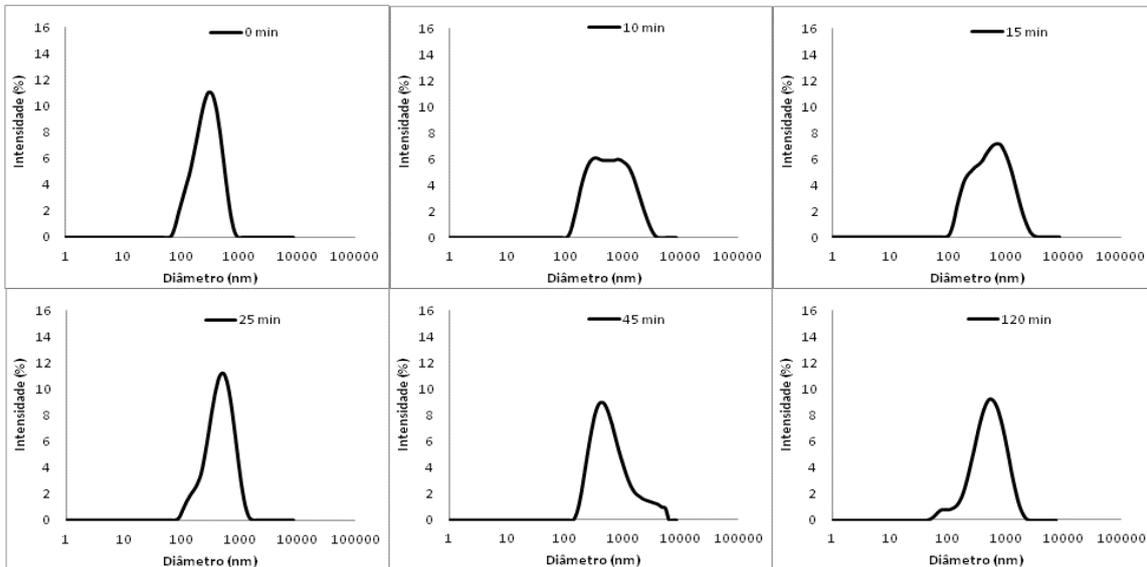


Figura 4-15 Dinâmica de distribuição de tamanho de partícula ao longo da reação de polimerização do MMA com o AMA pela rota iniciada por PBO.

Os espectros de H-RMN e as curvas de DSC (Figura 4-16 e Figura 4-17) comprovam a incorporação do comonômero. As análises de DSC mostram que ocorreram grandes mudanças na Tg, que passou de 116,7 °C no PMMA para 125,59 °C no copolímero, quando foi usado o PBO como iniciador, e de 117,25 °C no PMMA para 130,23 °C no copolímero, quando foi utilizado PP como iniciador. A elevação da Tg é devido à maior Tg do homopolímero de PAMA (228 °C).

Os espectros de H-RMN mostraram mudanças significativas com a adição de AMA ao meio reacional; entretanto, devido à grande semelhança existente entre os compostos, muitos picos são sobrepostos, tornando difícil a quantificação do comonômero incorporado. SOUTO-MAIOR *et al.* (2005) estudaram copolímeros de MMA com AMA e encontraram os mesmos deslocamentos químicos para copolímeros e homopolímeros analisados por ¹³C-RMN em estado sólido, mostrando que a análise de constante de tempo de relaxação no sistema de eixos rotatório (T₁^H_ρ) era mais eficiente para discriminação dos copolímeros. GIORDANENGO *et al.* (2009) também investigaram copolímeros P(MMA-co-AMA) e verificaram a sobreposição dos picos. O cálculo aproximado resultante da integração do pico referente ao hidrogênio B2 do AMA em proporção ao pico dos 4 hidrogênios A1 e B1 permite inferir uma proporção de 7,5 % molar de comonômero inserida no copolímero, bastante similar à quantidade alimentada.

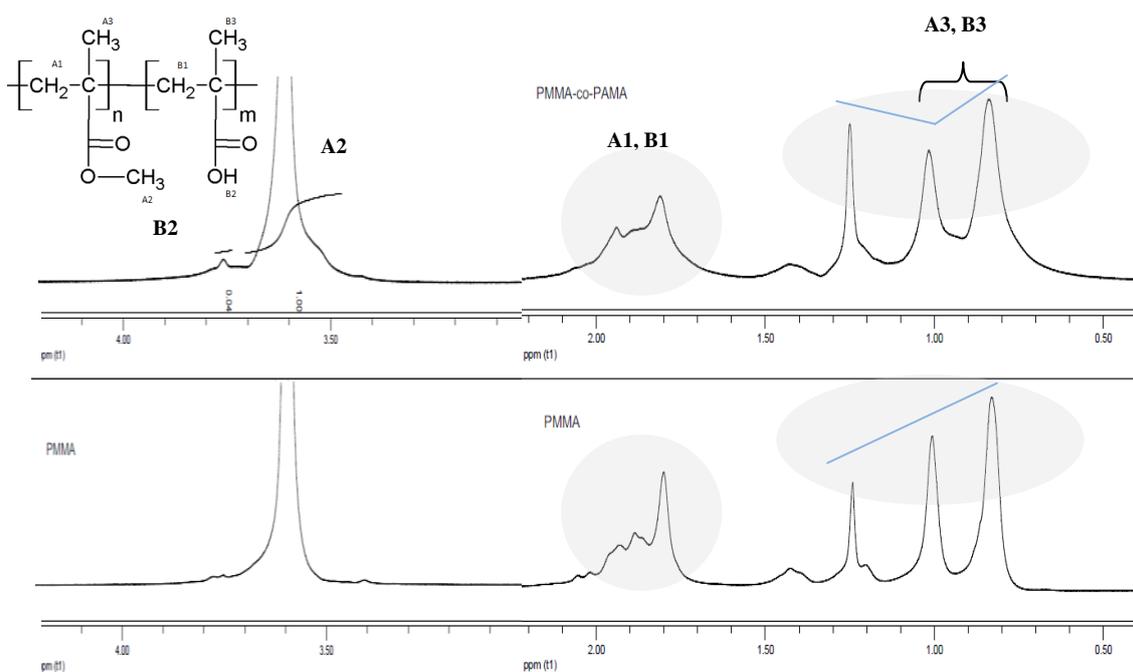


Figura 4-16 Espectro de H-RMN do PMMA-co-PAMA (rota 01).

O uso da Equação de 4-2 permite estimar o percentual de 20,5 % molar de AMA no copolímero final, quando foi utilizada a rota 01, e de 14,5 % molar de AMA no copolímero final, quando foi utilizado PBO. Essa proporção calculada é bastante superior àquela encontrada por RMN e à porcentagem alimentada (8,2 % em mol), podendo ser devido ao uso inapropriado da Equação de Fox neste sistema particular. A Figura 4-17 (b) mostra a distribuição de massas molares para os copolímeros de MMA com AMA em comparação com o PMMA homopolímero. Observa-se que ambas as rotas produziram distribuições mais largas, deslocadas para massas molares mais baixas para o copolímero em relação ao PMMA. Este efeito foi muito mais pronunciado quando foi usado o PBO como iniciador, uma vez que, como já explicado, existe uma maior tendência de terminação das cadeias quando o iniciador está inicialmente dentro das gotas. Como no caso da copolimerização com AA, o alargamento das distribuições de massa molar na presença do AMA se deve provavelmente às mudanças nas condições de reação ao longo do tempo, por causa das diferentes reatividades de cada monômero.

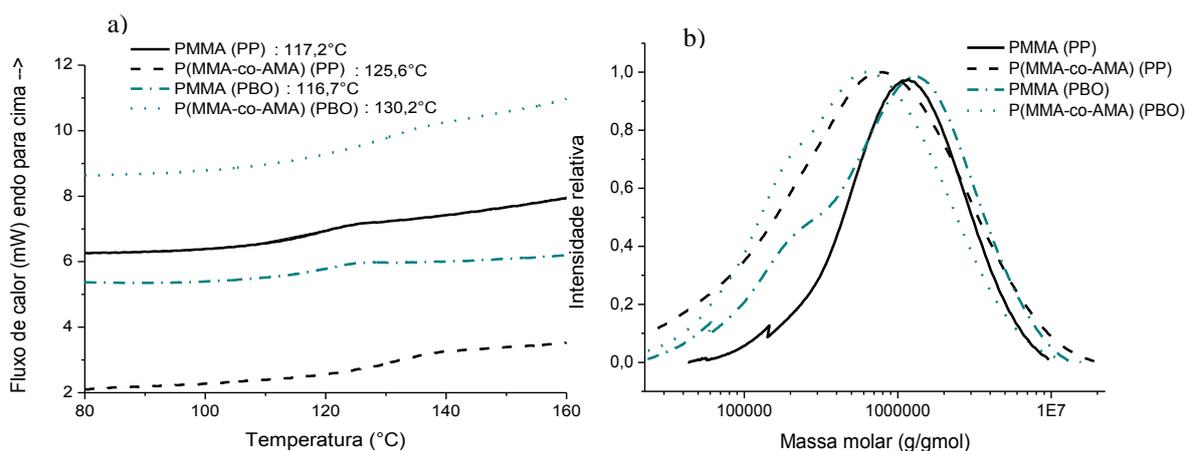


Figura 4-17 Análise térmica (a) e distribuição de massas molares (b) do P(MMA-co-AMA) obtido.

Esta seção reflete a grande semelhança existente entre os resultados obtidos com o AA e o AMA, com diferença significativa somente na largura das curvas de massas molares, que foram mais amplas (índices de polidispersão mais altos) quando foi utilizado o AMA, provavelmente por causa das diferentes razões de reatividade, como mostrado na Tabela 4-1. As mesmas hipóteses válidas para explicar os resultados obtidos com o AA, de nucleação homogênea ocorrendo nas reações iniciadas com PP e a formação de camadas ou “penugens” de copolímero rico em PAMA nas reações conduzidas com PBO, parecem ser também válidas para o AMA.

4.1.4 P(MMA-co-HEMA)

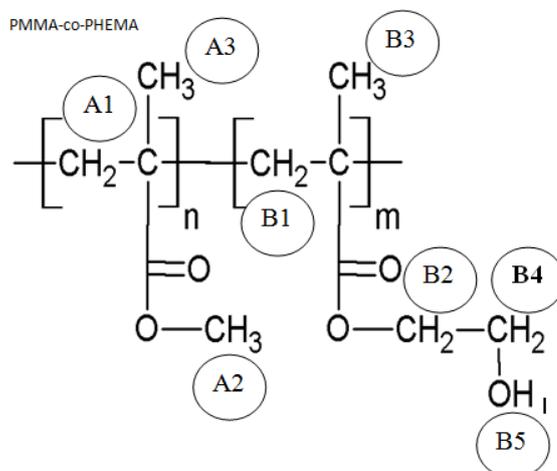


Figura 4-18 Fórmula estrutural do copolímero P(MMA-co-HEMA), com a marcação dos hidrogênios usados para análise de H-RMN.

Assim como observado com os outros comonômeros utilizados, o HEMA tem uma estrutura semelhante à do metacrilato de metila, apresentando um carbono e uma hidroxila a mais como grupos laterais, o que aumenta bastante sua hidrofiliidade (Figura 4-18).

O acompanhamento da dinâmica da reação mostrou que a presença do HEMA afeta a reação de forma diferente dos outros comonômeros, como mostrado na Figura 4-19. Pode-se observar que a presença do HEMA não retarda a reação e, no caso da utilização da reação iniciada por PP, a presença do HEMA até acelera a reação (ver Figura 4-19 (b) e (d)). A aceleração da reação é provavelmente decorrente do aumento pronunciado das taxas de nucleação homogênea, já que o polímero de HEMA não é solúvel em água. Entretanto, os comportamentos dinâmicos para diâmetros médios de partícula (verificar Figura 4-19 (a)) sofrem influência similar à observada com os outros comonômeros, demonstrando a ocorrência de nucleação homogênea pronunciada quando se utiliza PP como iniciador e formação de camadas de PHEMA na interface com a água, aumentando o diâmetro médio de partículas quando foi utilizado o PBO. A adição do HEMA influencia consideravelmente a massa molar do produto final e de maneira bastante diferente da observada com os monômeros AA e AMA. Observam-se massas molares maiores que as do PMMA pela rota hidrossolúvel e menores que a do

PMMA pela rota de iniciador organossolúvel. As massas molares mais altas podem encontrar explicação na possibilidade do HEMA promover reticulações. Como não há agente reticulante no meio, pode ocorrer reticulação por intermédio de transferência de cadeia para o polímero, com remoção de hidrogênio da hidroxila. QIE (2011) também estudou o HEMA como comonômero e verificou aumento do conteúdo de gel com o aumento da concentração alimentada de HEMA. Provavelmente pelo mesmo motivo, as massas molares do copolímero final foram similares à do PMMA para a reação conduzida com PBO. Pode-se observar na Figura 4-19 (c) que após 40 minutos de reação, o M_w de ambos os copolímeros cresce rapidamente e este fenômeno é independente da conversão observada na Figura 4-19 (b). As altas conversões obtidas com PP e o aumento continuado das massas molares nesse caso são evidências de que existe um mecanismo de reticulação na presença do HEMA.

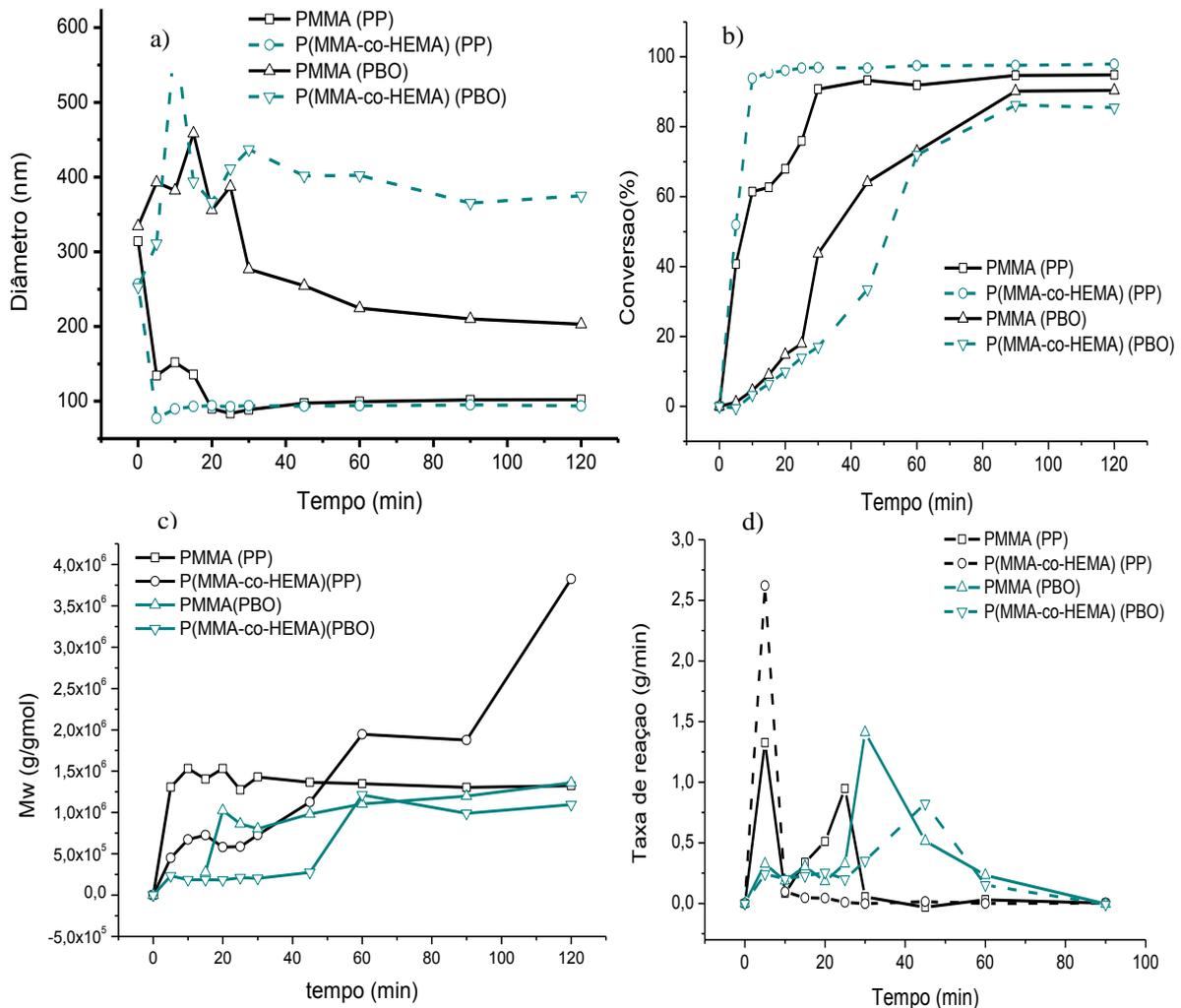


Figura 4-19 Análises da dinâmica da reação de copolimerização do P(MMA-co-HEMA) a) diâmetro médio de partícula; b) conversão; c) massa molar ponderal média; d) taxa de reação.

Pode-se verificar na Figura 4-20 a ocorrência de nucleação homogênea (quando usado PP) já no início da reação, visto o decaimento pronunciado do diâmetro médio de partículas com o tempo. Porém, devido às altas taxas de polimerização logo no início da reação, não foi possível visualizar a formação e intensificação gradual da moda em diâmetros menores. Portanto, a adição de monômero solúvel ao meio de reação só parece ser adequada para a operação de encapsulamento se o polímero também for solúvel no meio aquoso, o que não é o caso do HEMA.

A Figura 4-21 mostra a formação de modas de diâmetro maiores, quando foi utilizado o PBO. Assim como nos casos de uso de AA e AMA, uma possível explicação é a formação de camadas (ou “penugens”) de copolímero hidrofílico rico em PHEMA, que promovem a aglomeração das partículas. Esses blocos de HEMA posicionam-se na superfície das partículas, na interface com a água, devido à intensa hidrofilicidade do monômero.

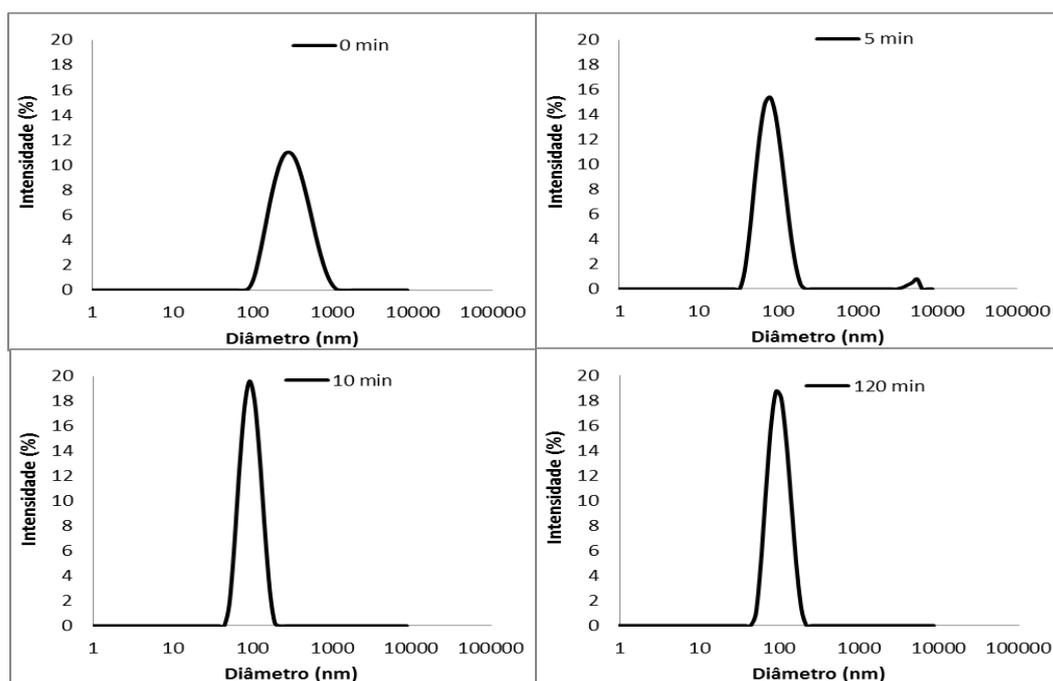


Figura 4-20 Dinâmica de distribuição de tamanho de partícula ao longo da reação de polimerização do MMA com o HEMA pela rota 01.

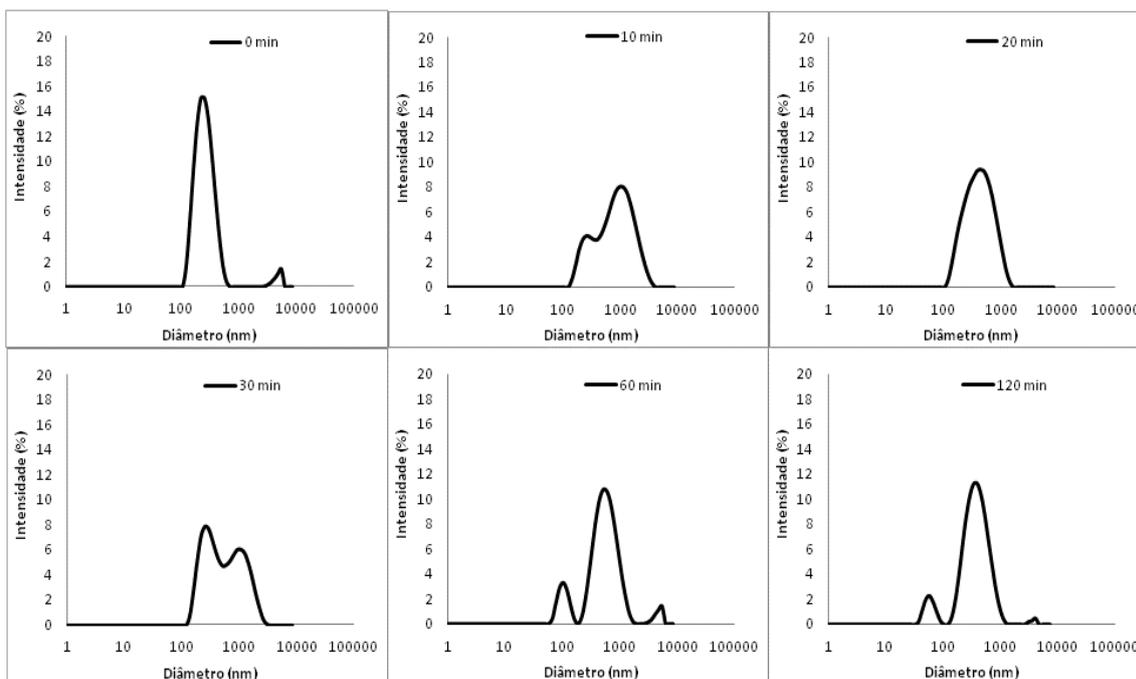


Figura 4-21 Dinâmica de distribuição de tamanho de partículas ao longo da reação de polimerização do MMA com o HEMA pela rota 02.

As análises do polímero final confirmam que ocorreu a incorporação do comonômero. Com auxílio das análises de H-RMN (Figura 4-22), pôde-se calcular uma inserção de 8,17% em base molar do monômero HEMA na cadeia. O cálculo para o HEMA baseou-se no maior pico referente aos hidrogênios A2 e B2 e, portanto, o valor da integral deste pico foi dividida pelos 5 hidrogênios a que se refere (3x A2 do MMA e 2x B2 do HEMA), fornecendo a proporção de HEMA incorporado. O menor pico, tomado como referência, está associado ao hidrogênio da hidroxila (B5) do HEMA. A Figura 4-22 mostra uma ampliação nos espectros H-RMN, comparando os polímeros obtidos com e sem adição do comonômero. Pode-se observar que as diferenças entre os espectros são sutis, muitas vezes com sobreposição dos picos. A incorporação do comonômero é similar à composição de alimentação, o que pode ser justificado pelas elevadas conversões obtidas

A Figura 4-23 mostra que não houve mudança muito expressiva nas T_gs após a copolimerização, tendo em vista a pequena porcentagem do comonômero inserida e as massas molares bastante elevadas dos copolímeros. A presença de reticulações aumenta a massas molares e reduz a mobilidade das cadeias, aumentando a temperatura de transição vítrea, como confirma QIE (2011).

Utilizando a equação de Equação 4-2 (FOX, 1956) verificou-se uma quantidade incorporada de 7,3%, muito próxima daquela calculada por RMN (8,17%) e maior que a percentagem alimentada na receita (5,8 % em mol), quando utilizado PP como iniciador. Quando se utilizou PBO, a equação de FOX estima um percentual de apenas 2,3% de monômero incorporado. Os cálculos com base nas Tgs podem não ser propriamente aplicáveis ao caso do copolímero com HEMA, haja vista a provável presença de reticulações que afetam diretamente as Tgs. Além disso, a menor incorporação no caso em que se utiliza PBO como iniciador pode ser explicada pela alta solubilidade do HEMA na água.

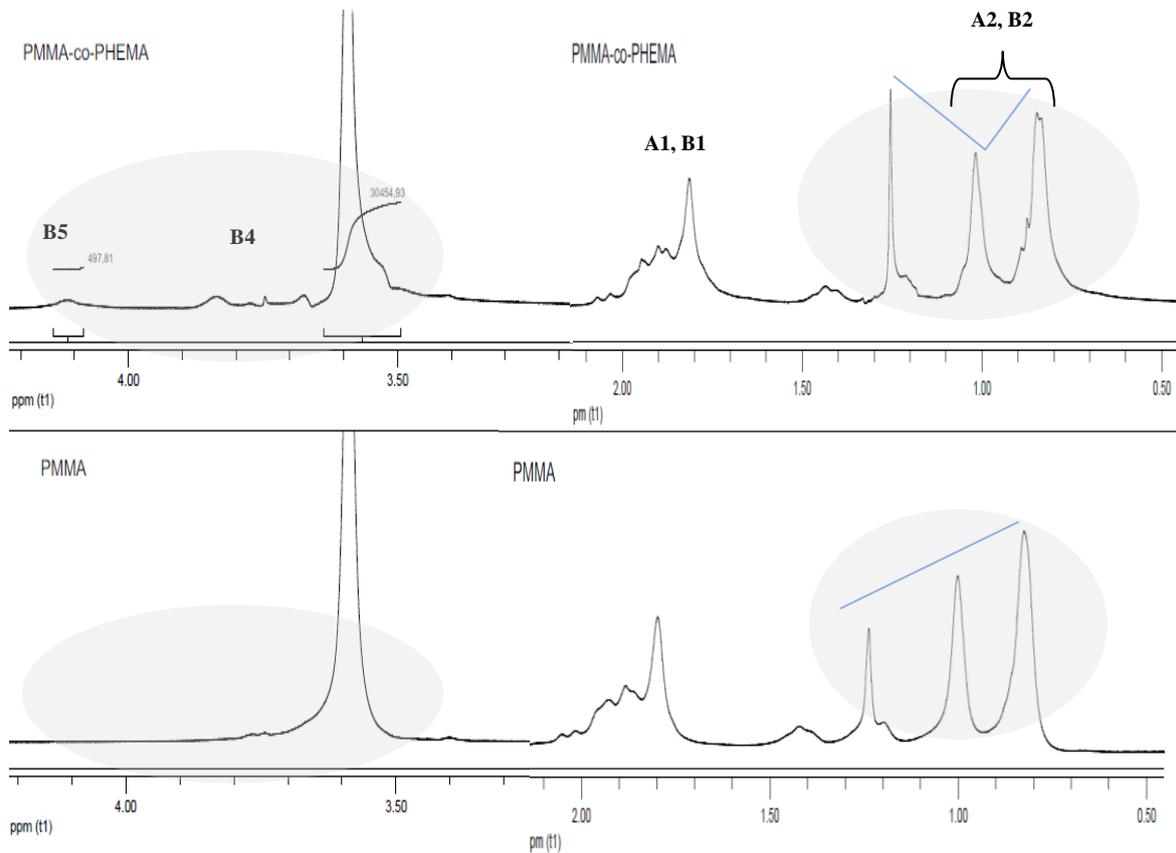


Figura 4-22 Espectro de H-RMN para P(MMA-co-HEMA) (rota 01)

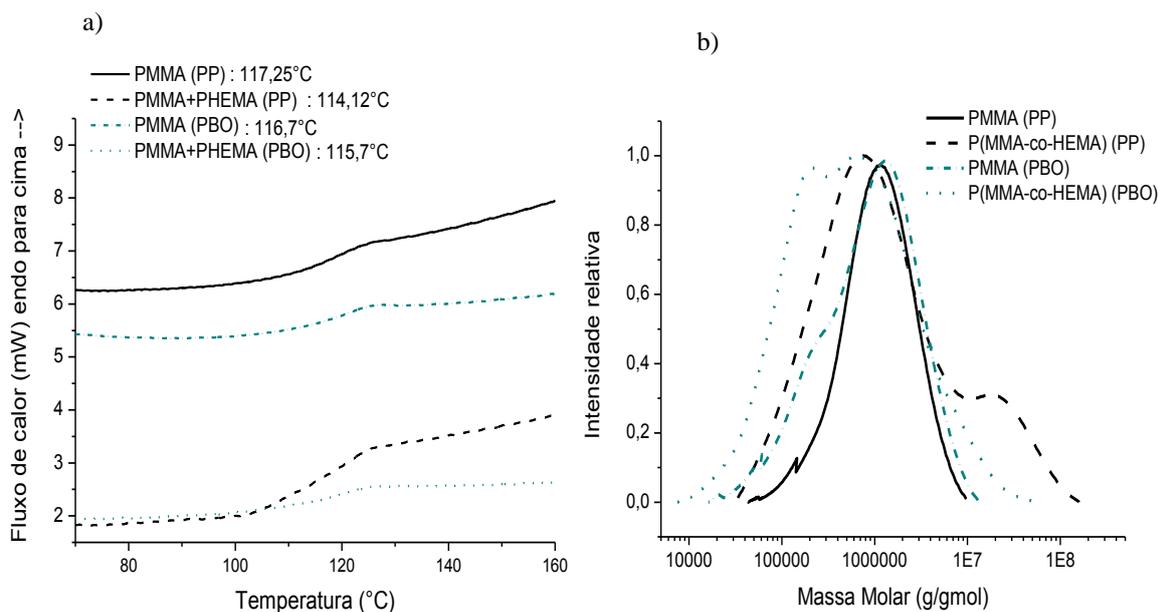


Figura 4-23 Análise térmica (a) e distribuição de massas molares (b) dos P(MMA-co-HEMA) obtidos.

Portanto, conclui-se que o HEMA participa da polimerização, sendo incorporado em proporções semelhantes àquela alimentada. A presença do HEMA na alimentação afeta significativamente o andamento da reação e as propriedades finais do polímero. Acredita-se que o HEMA favoreceu a formação de reticulações por meio de reações de transferência de cadeia para o polímero, levando a um aumento significativo das massas molares. A inserção do comonômero no copolímero foi muito maior quando utilizado PP (em torno de 8%) que quando utilizado PBO (2,4%), por causa da grande solubilidade em água. Esse fato causa nucleação homogênea expressiva de partículas em reações iniciadas por PP, já que o PHEMA não é solúvel na água.

4.1.5 P(MMA-co-MAM)

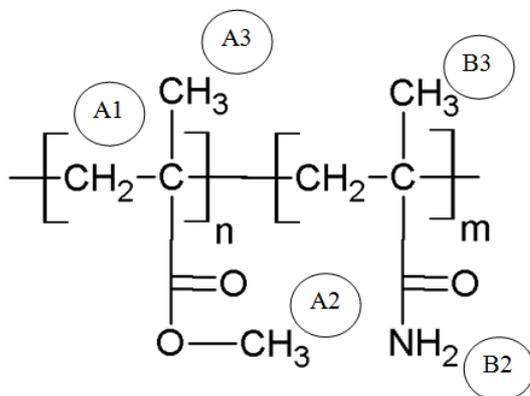


Figura 4-24 Fórmula estrutural do copolímero P(MMA-co-MAM) com a marcação dos hidrogênios usados para análise de H-RMN.

A metacrilamida possui um átomo de nitrogênio primário (Figura 4-24); ou seja, o nitrogênio está ligado a dois hidrogênios, o que facilita a disponibilidade deste nitrogênio para realização de reações químicas e interações adicionais, funcionando como um grupo funcional reativo. Apesar do grupo amida, a estrutura deste monômero ainda é bastante semelhante à do MMA.

No caso da copolimerização com metacrilamida, a reação foi realizada somente pela rota iniciada por PBO, pelo fato deste monômero não ser solúvel no MMA. Como a metacrilamida (um sólido de cor branca) foi solubilizada diretamente na fase aquosa, e com o objetivo de evitar a polimerização em água, o iniciador PBO foi solubilizado na fase orgânica.

Com relação à conversão, a adição da metacrilamida não afeta fortemente o andamento da reação e a reação se completa de forma muito semelhante à das reações de metacrilato de metila puro, o que pode ser facilmente justificado pela baixa solubilidade da MAM na fase orgânica. Obtêm-se também diâmetros médios de partícula muito próximos daqueles encontrados na homopolimerização; no entanto, a presença do comonômero gera massas molares menores, pois as partículas são um pouco maiores (Figura 4-25). Os deslocamentos dos tamanhos de partículas para valores maiores deve-se ao atraso da etapa de nucleação, por conta da elevada solubilidade do PMAM na água. Esse efeito, como já observado, é benéfico para a incorporação de ativos. A presença da MAM influencia menos significativamente o diâmetro médio de

partículas que os outros monômeros, inclusive quando se observa a distribuição de diâmetros ao longo da reação (ver Figura 4-26) em comparação com aquela do homopolímero de PMMA (Figura 4-2). Este comportamento pode ser devido à alta solubilidade do PMAM na água, que reduz o depósito de polímero na interface entre as fases orgânica e aquosa.

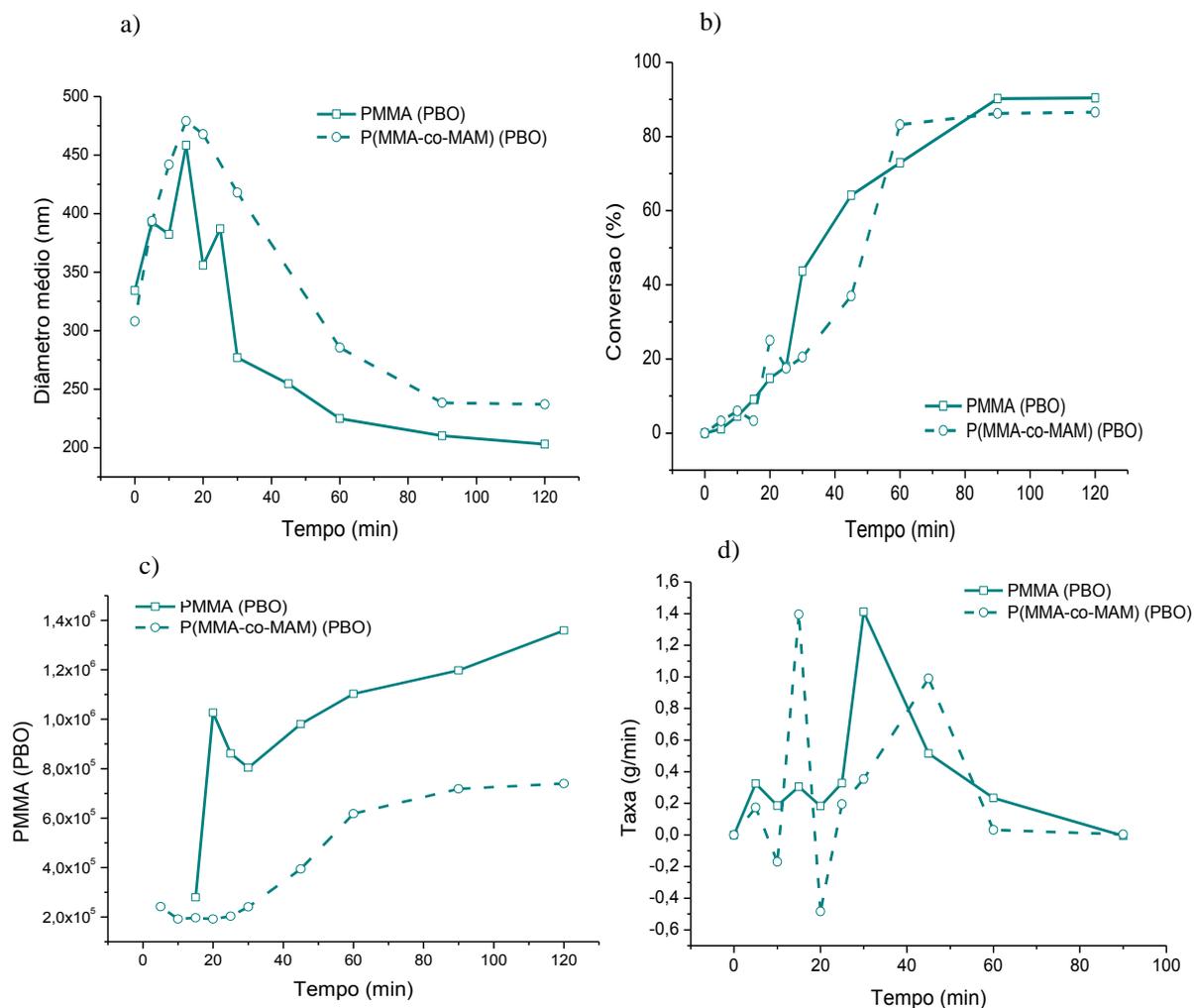


Figura 4-25 Análises da dinâmica da reação de copolimerização do P(MMA-co-MAM): a) diâmetro médio de partículas; b) conversão; c) massa molar ponderal média; d) taxa de reação.

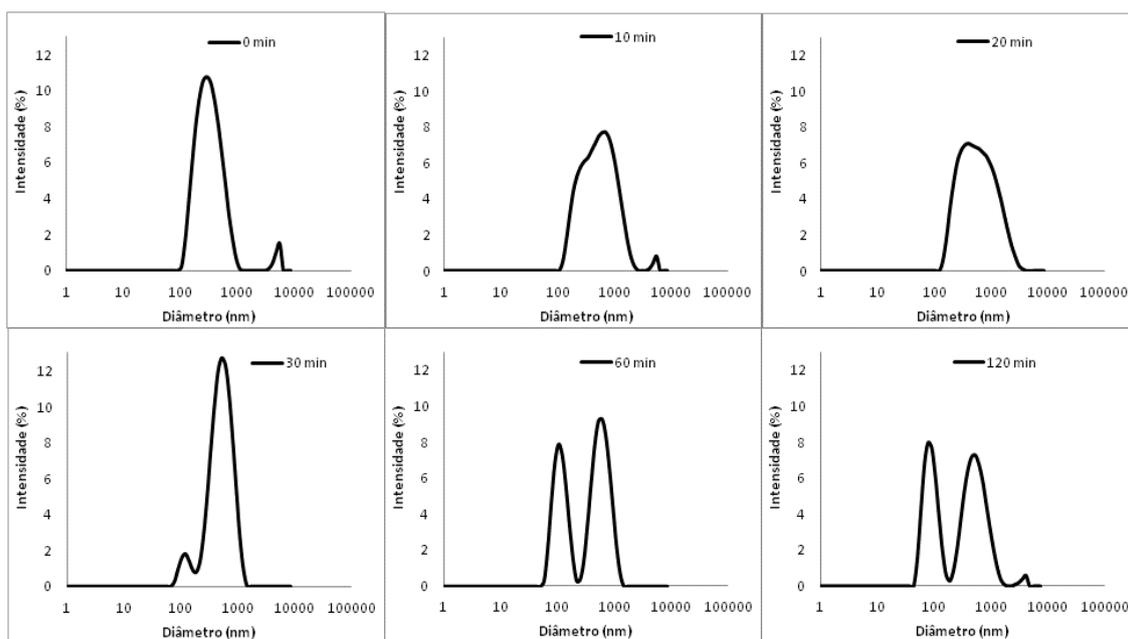


Figura 4-26 Dinâmica de distribuição de tamanho de partículas ao longo da reação de polimerização do MMA com o MAM iniciada com PBO.

No caso da metacrilamida, sua similaridade com o MMA também dificulta o cálculo preciso da quantidade de MAM incorporada no copolímero. Com base na área dos picos do espectro de H-RMN (Figura 4-27), infere-se que existe aproximadamente uma proporção de 19,12% de PMAM no polímero final. O cálculo baseou-se no maior pico referente aos hidrogênios A2 e B2 e, portanto, o valor da integral foi dividido por 5 (3x A2 do MMA e 2x B2 do PMAM). Um menor pico está associado aos hidrogênios do CH2 (B1) do PMAM. Esse valor, no entanto, parece ser excessivo e pode ser resultante da identificação inadequada das áreas dos diferentes picos por causa de sobreposição.

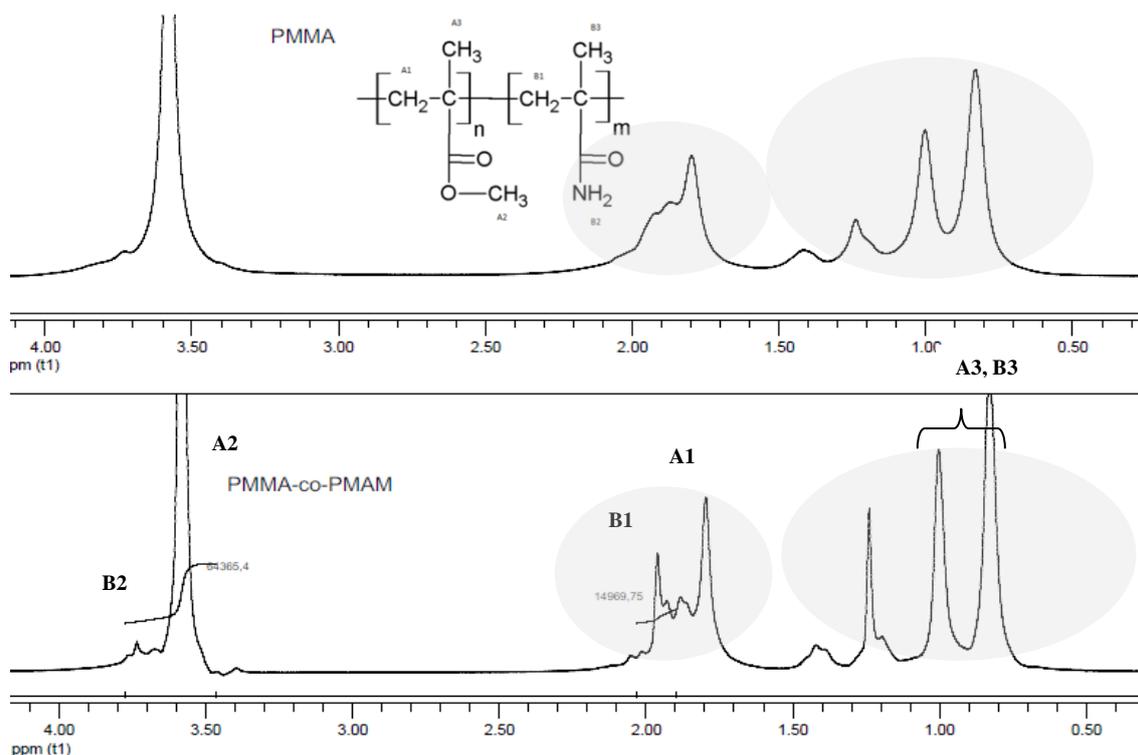


Figura 4-27 Espectros de H-RMN do P(MMA-co-MAM) obtido com iniciação por PBO.

A presença da metacrilamida provoca um abaixamento da T_g, como pode ser visto na Figura 4-28, uma vez que a T_g do PMAM é bastante baixa (38,5°C) e a quantidade incorporada deste comonômero produz um copolímero com T_g intermediária entre a T_g dos homopolímeros. Pela equação de Fox, calcula-se uma quantidade de 3,57 % de MAM no copolímero, muito diferente do valor calculado por RMN (19,2 %). Provavelmente, o cálculo baseado em RMN está superestimado, visto que os picos para os hidrogênios A¹ e B¹ possuem certa sobreposição, como já comentado.

A Figura 4-28 apresenta as curvas de DSC e as distribuições de massas molares para o copolímero final. O P(MMA-co-MAM) possui T_gs e massas molares um pouco deslocadas para valores mais baixos em relação ao homopolímero de MMA, facilmente explicados pela incorporação de comonômero e pelo menor número de partículas no meio de reação.

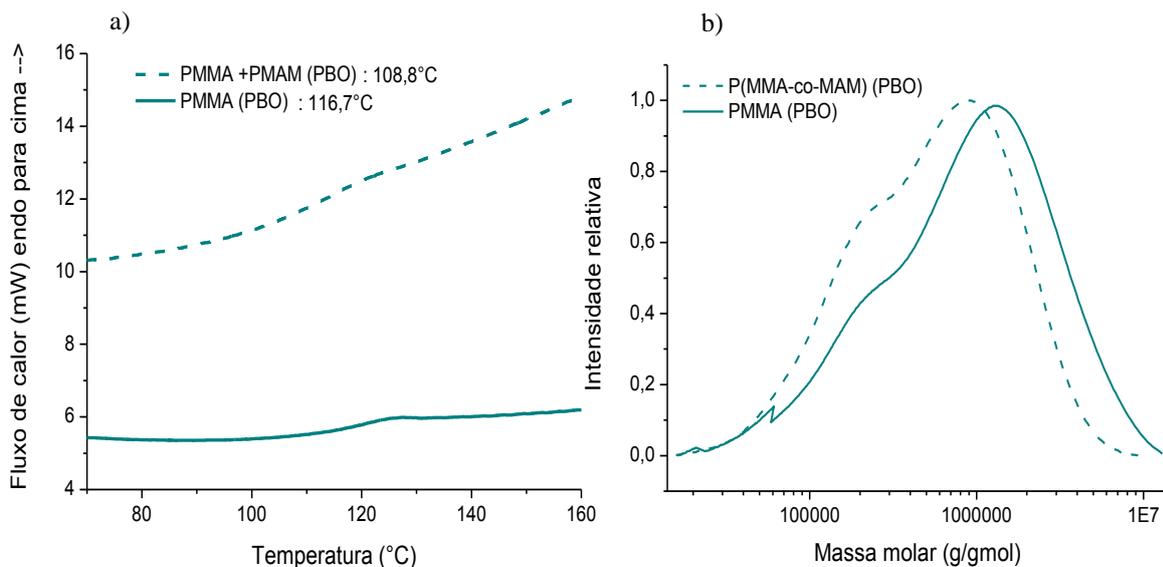


Figura 4-28 Análise Térmica (a) e distribuição de massa molar (b) do (PMMA-co-MAM).

Conclui-se, portanto, que a adição da MAM diretamente na fase aquosa induz a reduzida adição deste comonômero na cadeia polimérica. Este fato é sustentado pela baixa porcentagem de comonômero incorporada (cálculo pela Equação de Fox) e na baixa influência da presença da MAM sobre a cinética de reação e a evolução dos diâmetros de partículas com o tempo de reação. O cálculo pela equação de Fox estima um percentual de inserção do monômero (3,6%), menor do que o percentual alimentado (8,85%), o que corrobora a hipótese de baixa reatividade deste monômero na copolimerização com o PMMA. A MAM é o único comonômero utilizado que possui razão de reatividade maior que 1 ($r = 1,57$), mostrando uma menor afinidade com o MMA. Além disso, a reação ocorre essencialmente no meio orgânico, embora o MAM esteja principalmente na fase aquosa.

4.1.6 P(MMA-co-DMAEMA)

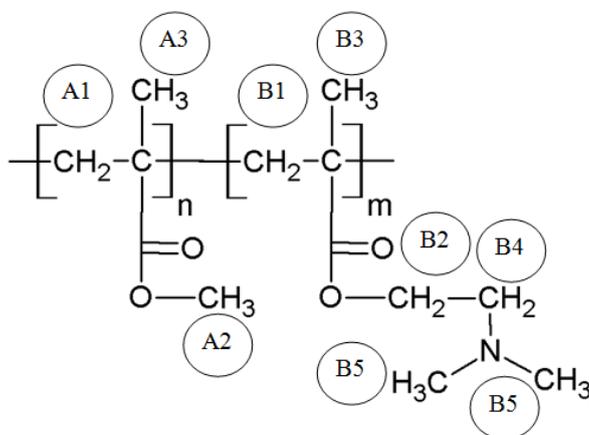


Figura 4-29 Fórmula estrutural do copolímero P(MMA-co-DMAEMA) com a marcação dos hidrogênios usados para análise de H-RMN.

Apesar das semelhanças que ainda podem ser observadas com o MMA (Figura 4-29), dentre os monômeros utilizados a DMAEMA é o mais diferente do MMA, pois possui um grupo lateral muito mais volumoso, apresentando três carbonos e um átomo de nitrogênio a mais.

Observou-se que a DMAEMA afeta a estabilidade coloidal da miniemulsão quando a reação se processa. Isto é devido à atividade interfacial do monômero, já estudada por HOLZAPFEL *et al.* (2005) e OLIVEIRA (2011) e comprovada neste estudo pelos valores de tensão interfacial (ver Tabela 4-1). Monômeros aminados possuem tendência de aquisição de cargas positivas e interagem com os tensoativos aniônicos na superfície das gotas, desestabilizando a emulsão. Como as reações não se completaram e não foi obtida uma suspensão final estável na forma de látex, as amostragens durante a reação e as análises posteriores ficaram comprometidas.

A reação conduzida com iniciador PP desestabilizou após 15 min de reação, enquanto no caso do iniciador PBO, a reação procedeu-se durante 1 h e 30 minutos. Desta forma, os resultados das análises a seguir são mais significativos para a segunda reação. Para a reação conduzida com iniciador hidrossolúvel não foi possível a realização da análise de massa molar, pois o polímero formado não era solúvel. Um dos fatores que podem ser somados para a ocorrência da desestabilização da emulsão no caso da rota 01 foi a taxa de reação extremamente elevada logo no início da

polimerização (Figura 4-30-(d)). Como no caso do HEMA, as altas taxas de reação foram decorrentes da expressiva formação de partículas por nucleação homogênea, por conta da alta solubilidade do DMAEMA na água e baixa solubilidade do PDMAEMA em meio aquoso.

A miniemulsão formada inicialmente para a copolimerização com o DMAEMA não possuía estabilidade muito grande, visto os diâmetros iniciais de 450 nm (para rota com PP) e superiores a 1 μm (quando o PBO estava presente) eram muito maiores que os diâmetros iniciais das demais miniemulsões produzidas com os outros monômeros. A Figura 4-30 apresenta o acompanhamento das reações ao longo do tempo para diâmetro médio de partículas, conversão, massas molares médias e taxa de reação, mostrando que a reação foi comprometida pela desestabilização coloidal. Os grandes diâmetros de gotas iniciais foram responsáveis por conversões e massas molares reduzidas, embora as baixíssimas massas molares sugerirem a existência de fenômenos mecânicos mais complexos.

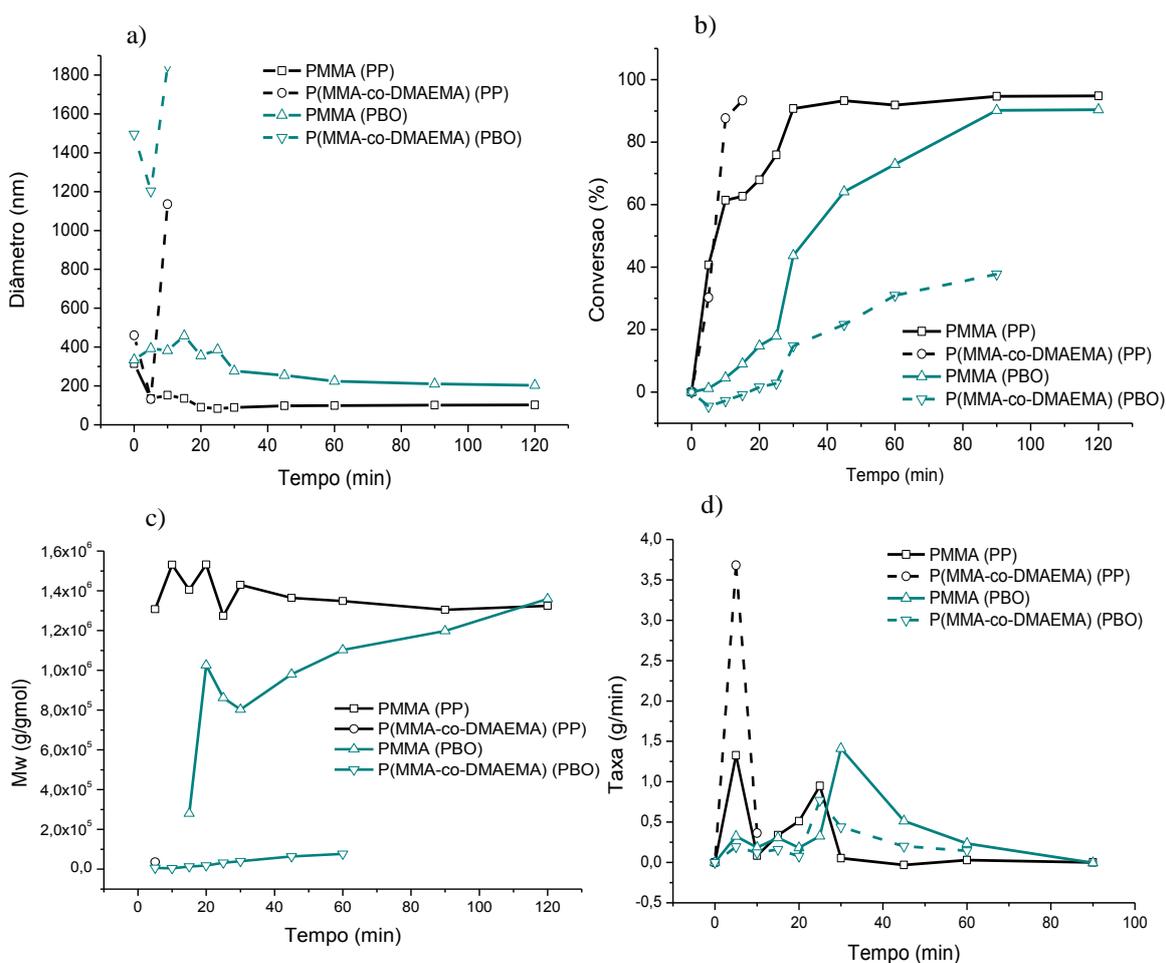


Figura 4-30 Análises da dinâmica da reação de copolimerização do P(MMA-co-DMAEMA): a) diâmetro médio de partículas; b) conversão; c) massa molar ponderal média; d) taxa de reação.

Foi possível acompanhar a distribuição de diâmetro de partículas apenas para a reação com PP, pois as distribuições das reações com PBO apresentaram qualidade baixa de detecção no equipamento (diâmetros muito grandes) por conta da expressiva coagulação. A Figura 4-31 mostra que a miniemulsão sofre variações iniciais muito grandes de diâmetro médio em apenas 15 minutos de reação, por conta da nucleação expressiva de novas partículas poliméricas nos instantes iniciais de reação.

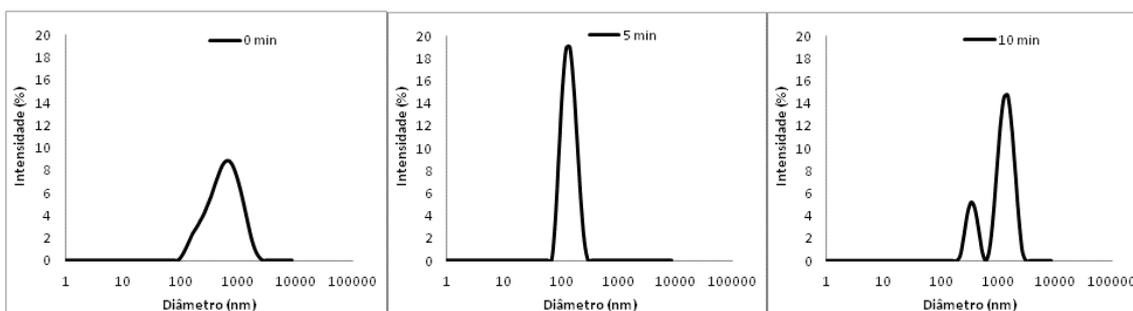


Figura 4-31 Dinâmica de distribuição de tamanho de partículas ao longo da reação de polimerização do MMA com o DMAEMA iniciada por PP.

Apesar da reação não ter completado as 2h horas programadas devido à desestabilização coloidal, observou-se com auxílio da técnica de H-RMN (Figura 4-32) que em torno de 12,4% do comonômero foi incorporado na reação iniciada com PBO. Entretanto, quando se analisam as curvas de DSC, constata-se a existência de múltiplas Tgs (Figura 4-33), indicando que existe uma mistura complexa de diferentes materiais pouco compatíveis. O cálculo da quantidade incorporada por H-RMN baseou-se na área do maior pico referente aos hidrogênios A2 e B2 e, portanto, o valor da integral foi dividido por 5 (3x A2 do MMA e 2x B2 do DMAEMA). O menor pico em dupletos está associado aos hidrogênios das metilas (B5) ligadas diretamente ao nitrogênio do DMAEMA.

A Figura 4-33 mostra a comparação entre as curvas de DSC para os copolímeros e o PMMA, evidenciando a multiplicidade de Tgs no copolímero. A presença de três Tgs distintas indica que se formam três fases distintas que não se misturam: a primeira constituída por PDMAEMA (Tg igual a 19,8 °C), a segunda constituída por copolímero (Tg igual a 74,9 °C) e uma terceira fase rica em PMMA (Tg igual a 114,19°C). O cálculo pela equação de Fox baseado na Tg intermediária (copolímero) infere que há em torno de 11% de DMAEMA no copolímero (fabricado pela rota 02), confirmando o cálculo conduzido por H-RMN. O mesmo cálculo para o copolímero fabricado pela rota

01 mostra que praticamente não houve copolimerização (apenas 0,23% de DMAEMA incorporado) decorrente da desestabilização no início da reação.

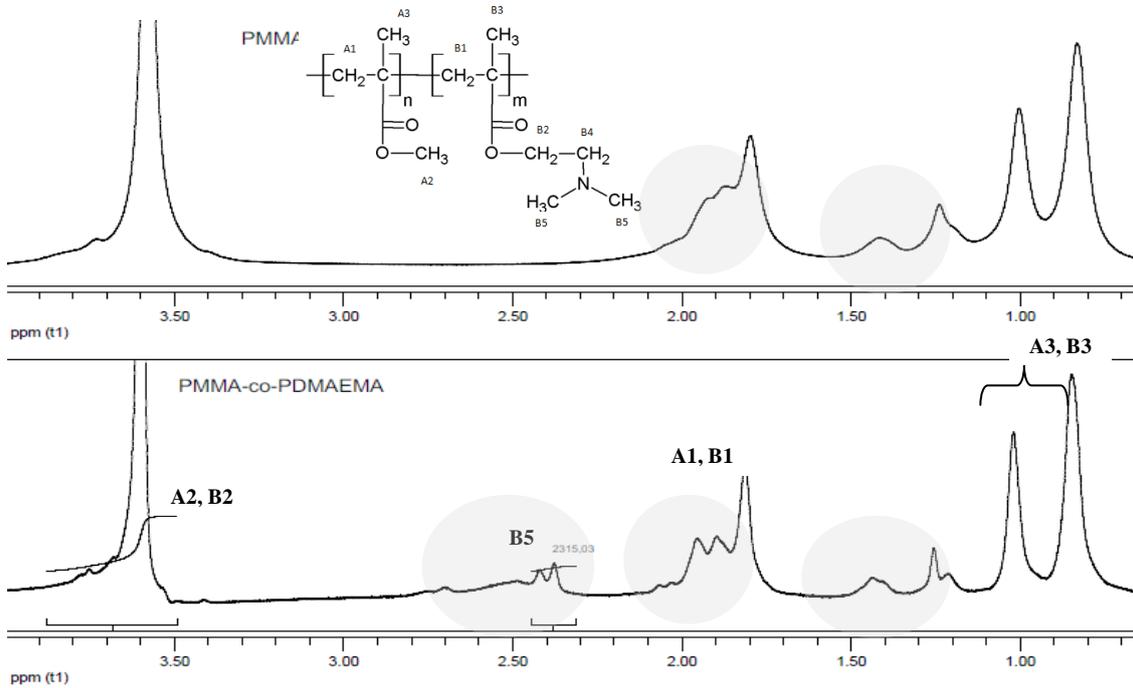


Figura 4-32 Espectros de H-RMN do P(MMA-co-DMAEMA) obtido por iniciação com PBO.

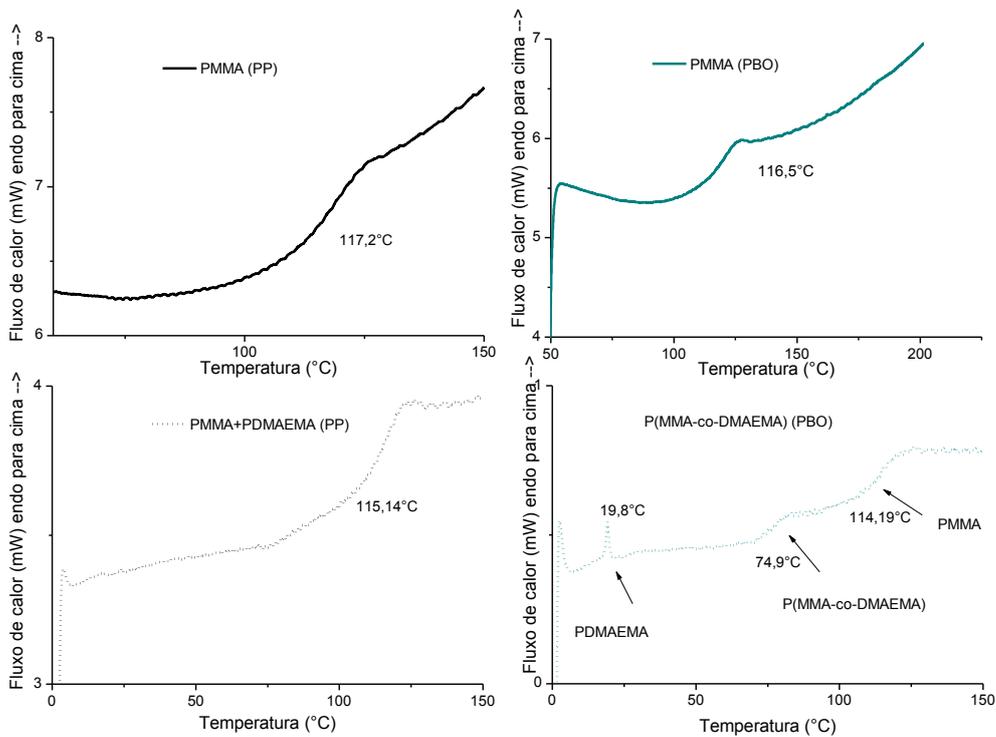


Figura 4-33 Análise térmica do P(MMA-co-DMAEMA) obtido por iniciação com PP e com PBO.

A Figura 4-34 mostra a distribuição de massas molares para o copolímero de MMA e DMAEMA produzido com PBO, comprovando que a reação enfrentou dificuldades para se completar. As massas molares muito baixas são resultados dos maiores diâmetros médios de partícula, mas provavelmente indiquem também um efeito inibitório sobre a reação ainda não investigado.

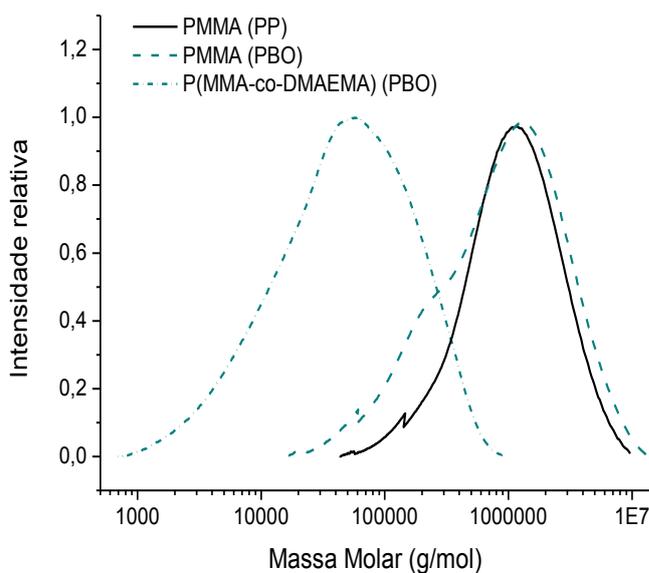


Figura 4-34 Distribuição de massa molar final para o copolímero de MMA e DMAEMA.

Devido aos problemas de estabilidade da emulsão, o uso do DMAEA como comonômero foi descartado para as etapas seguintes de estudo, visto que, para sua manutenção seriam necessárias mudanças na formulação (uso de tensoativo não iônico) e na metodologia da reação que estariam fora do escopo deste trabalho.

4.1.7 Comentários finais

Nesta seção são sintetizadas as propriedades e principais observações feitas em relação aos dos copolímeros produzidos. As Tabela 4-2 e Tabela 4-3 resumem as propriedades medidas para os polímeros fabricados, fazendo-se também uma comparação com os seus respectivos homopolímeros. Na Tabela 4-2 estão apresentadas as Tgs previstas (calculadas como mostra o Apêndice I, para a formulação alimentada e

100% de conversão) e medidas para os copolímeros, indicando quando houve copolimerização. Verifica-se que as tensões superficiais não sofrem grande mudança com a presença dos comonômeros, embora as tensões interfaciais sejam bastante diferentes.

O cálculo da quantidade de monômero incorporado no copolímero foi realizado a partir de cálculos teóricos baseados na razão de reatividade (demonstrados no Apêndice I), por integração dos picos do espectro de H-RMN (quando possível) e pela equação de FOX (1956). É possível observar na Tabela 4-2 que os cálculos teóricos podem resultar em valores bastante distantes daqueles feitos com auxílio dos espectros de H-RMN e por ponderação das Tgs. Os cálculos baseados na razão de reatividade são uma estimativa para o tempo inicial de reação e, portanto, à medida que os monômeros são consumidos, o percentual de cada monômero na cadeia se modifica. Além disso, os valores de razão de reatividade foram retirados da literatura (BRANDRUP *et al.*, 1999) e nem sempre reproduzem as condições experimentais e a técnica utilizada para o presente trabalho. Os cálculos foram realizados para reação em massa, o que pode acarretar possíveis diferenças para meios dispersos de polimerização. Contudo, como as razões de reatividade são próximas de 1, a incorporação é quase sempre similar à composição de alimentação, com exceção do AA.

Comparando os valores encontrados pela equação de Fox e por H-RMN, observa-se que, para o HEMA e para o DMAEMA o percentual destes comonômeros no copolímero encontrados pelas duas técnicas foi muito próximo. No caso da MAM, os valores encontrados foram bastante distintos para as duas técnicas, mas, como já foi dito, provavelmente a área de integração da curva por H-RMN foi superestimada devido à sobreposição dos picos. Pela Tabela 4-3 pode-se comparar os diferentes copolímeros. Verifica-se que o P(MMA-co-HEMA) apresenta massas molares e índice de polidispersão muito maiores do que os outros copolímeros, demonstrando o efeito da reticulação. No que se refere às conversões finais, pode ser visto que todos os copolímeros (exceto aquele com DMAEMA) promovem conversões mais altas (em torno de 97%), quando se utiliza o PP como iniciador, e mais baixas (em torno de 85%), quando se utiliza o PBO. Esse efeito é devido principalmente às mais altas taxas de nucleação homogênea na presença de PP.

Tabela 4-2 Cálculo da porcentagem de comonômero incorporado

Polímero	% alimentado em mol	% comonômero incorporado			
		Cálculo teórico ⁽¹⁾ baseado nas razões de reatividade	Cálculo baseado em espectro de RMN	Cálculo baseado nas Tgs dos homo e copolímeros ²	
				Iniciador PBO	Iniciador PP
P(MMA-co-HEMA)	5,80%	7,80%	8,17%	2,32%	7,28%
P(MMA-co-DMAEMA)	4,79%	6,80%	12,38%	10,85%	0,36%
P(MMA-co-AMA)	8,19%	12,70%	7,5%	14,52%	20,48%
P(MMA-co-AA)	10,45%	23,60%	11,8%	12,35%	13,96%
P(MMA-co-MAM)	8,85%	7,40%	19,12%	3,57%	-

⁽¹⁾ Cálculo de acordo com equacionamento mostrado no APÊNDICE I.

⁽²⁾ Cálculo baseado na Equação 4-2 (FOX, 1956).

Tabela 4-3 Propriedades dos polímeros

Propriedade Polímero	Área total ⁽¹⁾ (m ² /g)		Transição vítrea - Tg (°C)					Massa Molar final				Conversão (%)	
	PBO	PP	Tg homopolímero literatura ⁽²⁾	Tg copolímero calculada ⁽³⁾		Tg copolímero medida por DSC		Mw (Da) x 10 ⁻⁵		Polidispersão			
				PP	PBO	PP	PBO	PP	PBO	PP	PBO	PP	PBO
PMMA	27,49	51,48	105-150			117,25	116,7	13	14	2,0	3,8	94,8	90,4
P(MMA-co-HEMA)	19,91	69,43	85	115,08	113,91	114,1	115,7	38	11	11,9	7,3	97,9	85,5
P(MMA-co-DMAEMA)	-	-	19	91,881	91,05	115,1	74,9/114,19	0,2	0,8	1,43	4,0	93,3	37,7
P(MMA-co-AMA)	13,01	37,96	228	123,11	121,81	130,2	125,6	10	7,9	6,7	4,0	97,7	86,2
P(MMA-co-AA)	14,35	56,53	75-106	115,68	114,50	108,7	109,2	13	6,3	2,7	3,2	97,9	87,1
P(MMA-co-MAM)	31,13	-	38,5	105,09	104,09	-	108,8	-	7,3	-	3,2	-	85,6

⁽¹⁾ Área calculada utilizando os diâmetros médios medidos e conforme equacionamento do APÊNDICE I;

⁽²⁾ BRANDRUP, J.; IMMERGUT, E.H.; GRULKE E.A (1999);

⁽³⁾ Média entre resultados de quatro diferentes cálculos teóricos baseados na formulação alimentada. (APÊNDICE I).

Para as etapas de adsorção da seção seguinte, calculou-se a área superficial disponível para realizar as adsorções de acordo com o equacionamento apresentado no APÊNDICE I. Os valores encontrados para as áreas (ver Tabela 4-3) mostram que os copolímeros fabricados com PP têm maior área disponível, visto o diâmetro menor das partículas formadas, como resultado de ocorrência de nucleação homogênea. Dentre os copolímeros, aquele com maior área superficial é o P(MMA-co-HEMA).

Conclui-se nesta seção que, com exceção da DMAEMA, foi possível realizar a copolimerização entre o MMA e os comonômeros por meio da técnica de miniemulsão, inserindo assim, grupos funcionais importantes nas cadeias que podem ser usados posteriormente para reações secundárias e que serão estudados em relação a sua influência na adsorção na seção 4.2. Foi feito um estudo minucioso das reações e de como a inserção do comonômero afeta a dinâmica da reação e as propriedades finais do polímero. Cada monômero afeta diferentemente as massas molares e a Tg do copolímero final, o diâmetro médio de partículas e a conversão do monômero. As rotas aplicadas (via iniciador hidrossolúvel e via iniciador organossolúvel) também são de fundamental importância para determinação das propriedades finais como a massa molar e o tamanho de partículas, bem como afetam diretamente a conversão dos monômeros. O uso do iniciador PBO provoca uma sistemática redução da conversão, aumento de tamanho médio de partículas e massas molares mais baixas do produto final. O uso de PP promove uma acentuada taxa de nucleação homogênea, observada pela dinâmica de redução no tamanho de partículas. Para incorporação de ativos, observou-se que a adição de AA e AMA ao meio reacional pode ser bastante benéfica, evitando ou atrasando consideravelmente a formação de novas partículas por nucleação homogênea.

4.2 Adsorção e Dessorção

Esta seção apresenta e discute os resultados dos experimentos de adsorção conduzidos com os diferentes copolímeros fabricados, com o intuito de verificar a influência dos grupos funcionais adicionados sobre as forças e interações que regulam o processo de adsorção. O primeiro resultado desta seção de experimentos foi o desenvolvimento da metodologia para adsorção usando diretamente a suspensão polimérica. A maior parte da literatura realiza o procedimento de secagem das partículas antes de efetivar os ensaios de adsorção; entretanto, não foi possível neste trabalho secar as partículas sem que houvesse aglomeração ou grande perda de área (ver Figura 4-35). Resultados similares foram reportados por FONSECA (2012) e LORCA (2012). Portanto, para os estudos de adsorção, desenvolveu-se uma metodologia que utiliza diretamente a suspensão polimérica, como descrito na Seção 3.4. Utilizando-se a técnica de liofilização para secagem, foram obtidas partículas bastante aglomeradas, como mostra a Figura 4-35 (a). Quando a técnica de centrifugação foi empregada para concentrar a suspensão, as partículas mantiveram sua individualidade; porém, a ressuspensão com vórtex ou sonicador, novamente resultou em aglomeração (Figura 4-35 (c) e (d)). Por conta desses resultados, e com o objetivo de não alterar a morfologia das partículas poliméricas produzidas, os testes de adsorção foram conduzidos diretamente na suspensão polimérica resultante do sistema de reação.

Os testes de retenção de proteínas em membranas de poli(óxido de etileno) apontaram uma retenção moderada em torno de 15% de proteína. Este valor foi descontado para a realização dos cálculos das quantidades adsorvidas. A Tabela 4-4 resume as medidas de adsorção para cada copolímero. Aparentemente, a escolha do iniciador interfere diretamente nas taxas de adsorção. Quando são analisadas as quantidades adsorvidas (% ou mássica), conclui-se que o iniciador hidrossolúvel promove um aumento na adsorção; porém, em termos da razão entre a massa adsorvida e a área das partículas, a relação é invertida visto que todas as reações com PBO produzem partículas maiores que aquelas produzidas com PP. A influência do iniciador sobre as taxas de adsorção, no entanto, será mais profundamente estudada na seção seguinte.

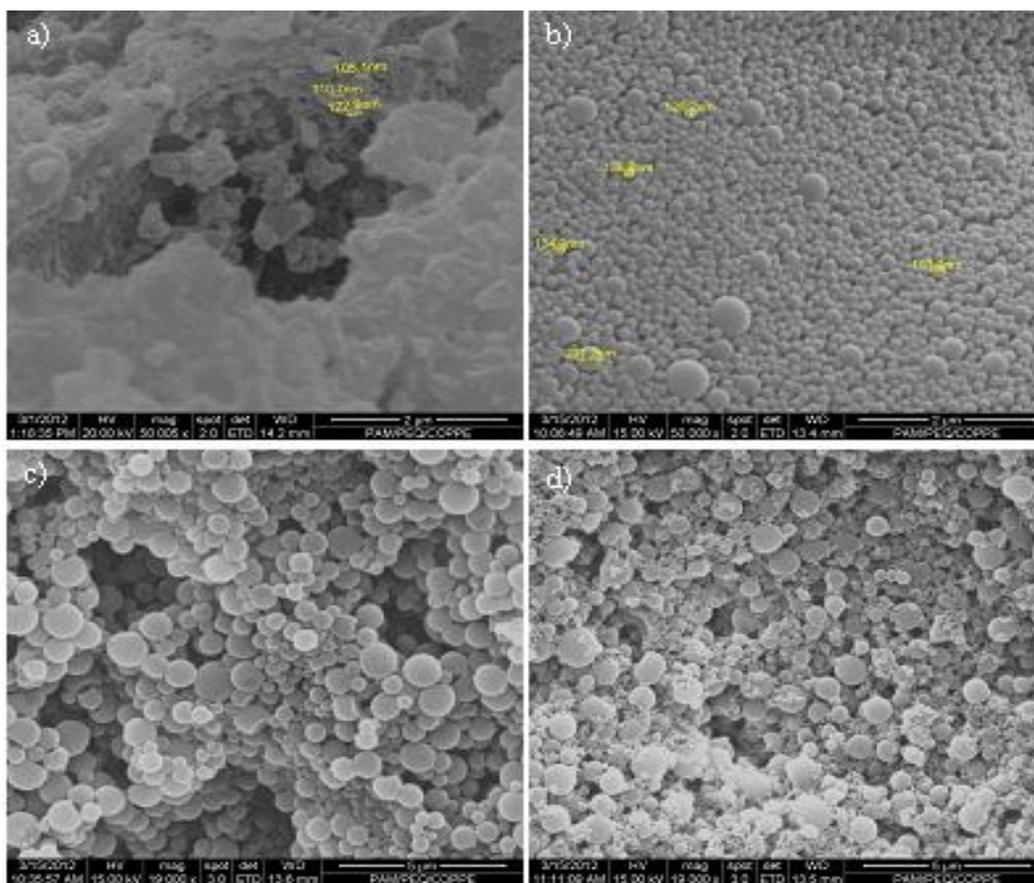


Figura 4-35 Micrografias (MEV) das partículas após procedimentos de secagem por métodos tradicionais. a) liofilização; b) centrifugação; c) ressuspensão em vortex; d) ressuspensão em ultrassom.

Tomando como base para análise a quantidade adsorvida por área disponível ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pode-se afirmar que, utilizando o iniciador hidrossolúvel, as diferenças entre o desempenho do polímero de PMMA e os dos seus copolímeros funcionais é muito pequena, sugerindo que, por essa rota, a funcionalização da superfície não parece ser determinante para a imobilização de BSA por adsorção. Quando se utiliza a rota 02, no entanto, observa-se significativa mudança, principalmente quando os materiais são funcionalizados com ácidos carboxílicos (ácidos acrílico e metacrílico), promovendo um aumento em torno de 50% das quantidades adsorvidas.

Estes resultados indicam que a funcionalização da superfície resulta em melhor desempenho quando a reação é conduzida na presença de PBO, pela rota 02. Dois podem ser os principais motivos: 1) O iniciador PP compete com os grupos funcionais dos comonômeros pela permanência na superfície, visto que ambos têm afinidade grande pela água. Entretanto, a quantidade de iniciador na formulação é muito menor (quatorze vezes menor) que a quantidade de comonômero, o que reduz o efeito desta

competição. 2) A ocorrência de nucleação homogênea, pode ter contribuído com a redução da quantidade de grupos ativos na superfície das partículas. Deve-se observar que o iniciador é inserido na cadeia polimérica como grupo terminal, sendo por isso mais facilmente posicionado na superfície da partícula polimérica que os monômeros sujeitos a restrições estéricas e configuracionais. Adicionalmente, como concluído na seção anterior, o uso da rota iniciada por PBO promove o surgimento de “penugens” de copolímero hidrofílico rico em comonômero funcional na superfície das partículas, contribuindo para a interação polímero-proteína.

Tabela 4-4 Sumário das medidas de adsorção de BSA para os diferentes polímeros

Polímero	% incorporada ⁽¹⁾	Área específica (m ² /g)		Quantidade adsorvida (%)		Quantidade adsorvida (mg/g)		Quantidade adsorvida (µg/cm ²)	
		PBO	PP	PBO	PP	PBO	PP	PBO	PP
PMMA	-	27,49	51,48	28,10	34,98	133,35	165,99	0,49	0,32
P(MMA-co-HEMA)	8,17%	19,91	69,43	26,37	31,24	125,12	148,25	0,63	0,21
P(MMA-co-AMA)	7,5%	13,01	37,96	15,81	27,91	93,75	132,45	0,72	0,35
P(MMA-co-AA)	11,8%	14,35	56,53	23,27	31,40	110,42	186,22	0,77	0,33
P(MMA-co-MAM)	3,57% ⁽²⁾	31,13	-	28,57	-	135,56	-	0,44	-

(1) Calculada pelo espectro de H-RMN.

(2) Cálculo baseado na Equação 4-2 (FOX, 1956)

A técnica de Bradford utilizada para realização das medidas de concentração de proteínas pode introduzir erros significativos nas medidas de quantidades adsorvidas, como pode ser observado pelas barras de erro da Figura 4-36. Por outro lado, análises não paramétricas (Figura 4-37) não deixam dúvida quanto à discriminação dos polímeros no que diz respeito à adsorção. Pode ser verificado claramente que o erro está associado aos ensaios de adsorção, pois, embora o valor absoluto da quantidade adsorvida varie de uma réplica para outra em cada polímero, observa-se um conjunto de materiais que consistentemente levam a maiores quantidades adsorvidas do que outros. Dentre eles, inclui-se o próprio PMMA homopolímero, capaz de imobilizar cerca de 30% da solução proteica posta inicialmente em contato com as partículas poliméricas. Os copolímeros que contêm grupos funcionais carboxila (P(MMA-co-AA) e P(MMA-co-AMA)) e hidroxila (P(MMA-co-HEMA) conduzem a desempenhos ainda melhores.

Desta forma, surge a hipótese de que ligações de hidrogênio possam controlar o processo de adsorção. Segundo YOON *et al.* (1998), quando grupos carboxilados estão presentes, as interações por ligações de hidrogênio são mais expressivas em pH 4,5 (quando a dissociação de grupos carboxila é baixa) e proporcionais à quantidade destes grupos presente, podendo até suprimir as interações hidrofóbicas. O PMMA também é capaz de realizar ligações de hidrogênio (NOGUEIRA, 1999). O artigo de YOON *et al.* (1998) ainda ressalta que podem existir, em menor quantidade, a interação eletrostática proveniente dos fragmentos de iniciador nas cadeias.

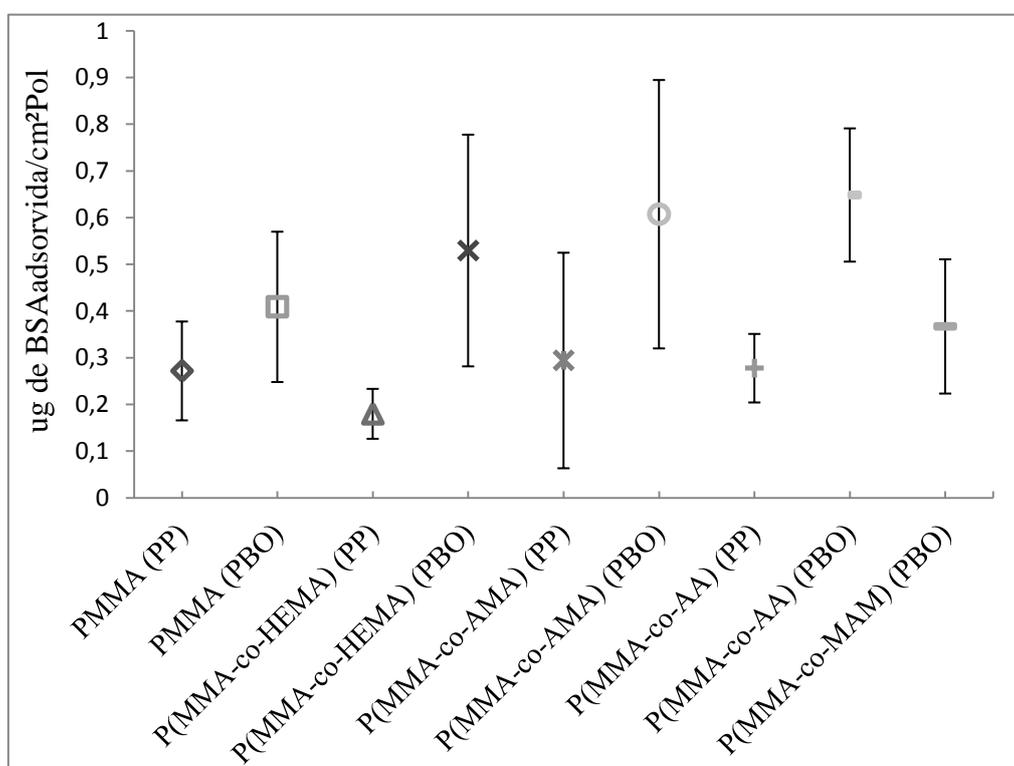


Figura 4-36 Quantidades de BSA adsorvida para os diferentes copolímeros.

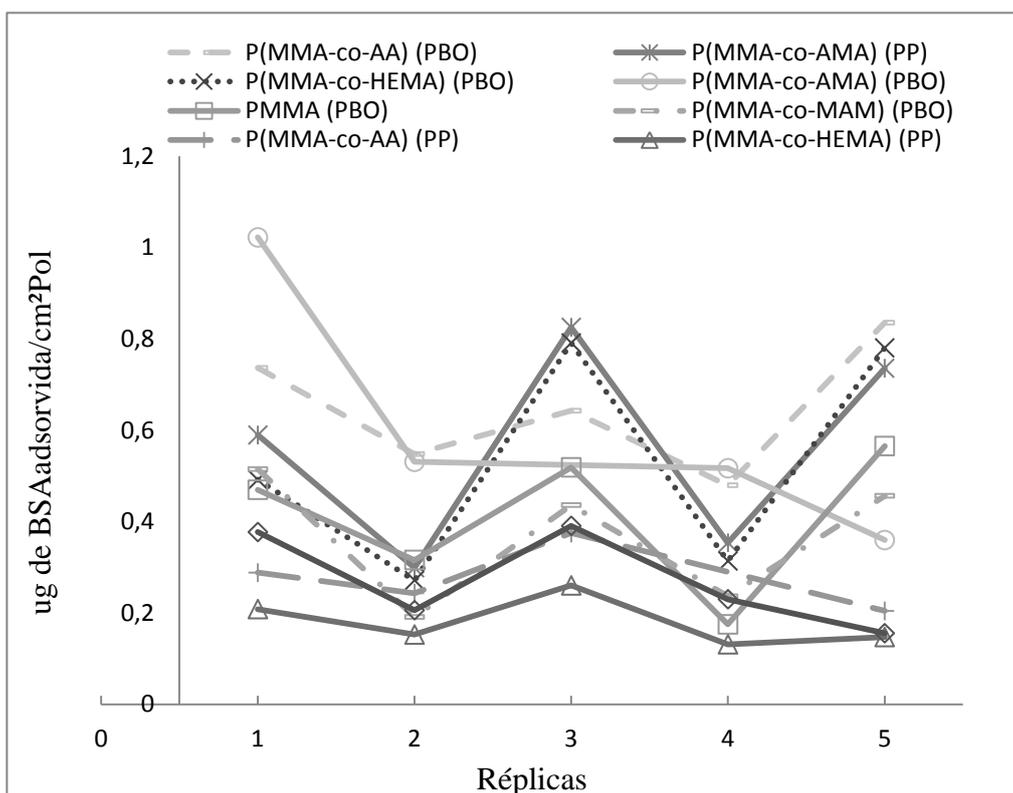


Figura 4-37 Comportamento das réplicas na adsorção de BSA para os diferentes copolímeros.

Visando avaliar o efeito do processo de adsorção sobre as propriedades elétricas das partículas, procedeu-se a determinação do potencial eletrocinético (potencial zeta). Observa-se na Figura 4-38, que todos os materiais inicialmente apresentam uma superfície negativamente carregada, com potencial zeta em torno de -60mV. Após o processo de adsorção ocorre sempre uma significativa redução da magnitude das cargas, que se tornam aproximadamente neutras. O ponto isoelétrico da BSA situa-se em pH igual a 4,7 (LI, HU e LIU, 2005; PEULA-GARCIA *et al.* 1997). Portanto, no pH investigado, igual a 4,5, a proteína encontra-se com carga líquida levemente positiva (PZ= +9,8). A albumina é considerada uma proteína flexível e tende a mudar sua conformação durante o processo de adsorção, orientando suas cargas de forma a favorecer a interação com o substrato. Esta flexibilidade de conformação é melhor estabelecida no ponto isoelétrico (LI, HU e LIU, 2005).

Esses resultados mostram que houve neutralização das cargas negativas dos suportes durante o processo de adsorção de BSA, possivelmente orientada com seus resíduos positivos em direção à superfície. A formação de multicamadas de proteína

resultou em uma carga líquida neutra. A hipótese de formação de multicamadas também é suportada pelo aumento do tamanho das partículas após adsorção, como mostra a Figura 4-39. Portanto, não parece haver dúvidas sobre a efetiva adsorção de moléculas de BSA sobre a superfície das partículas poliméricas produzidas.

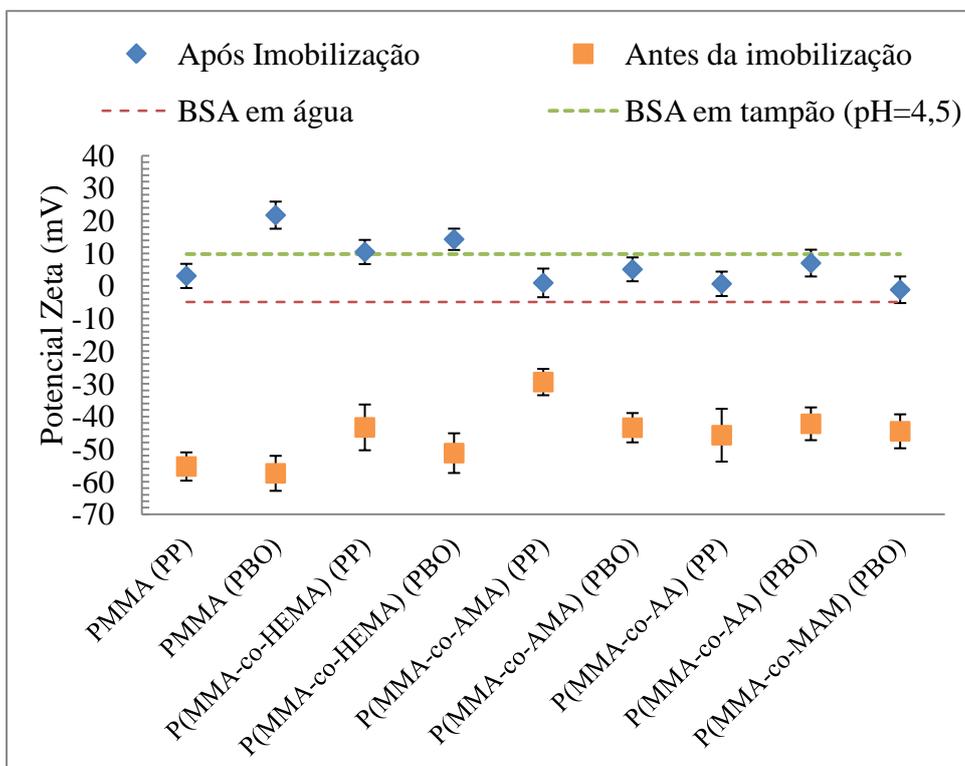


Figura 4-38 Potencial Zeta das partículas poliméricas antes e depois da adsorção de BSA.

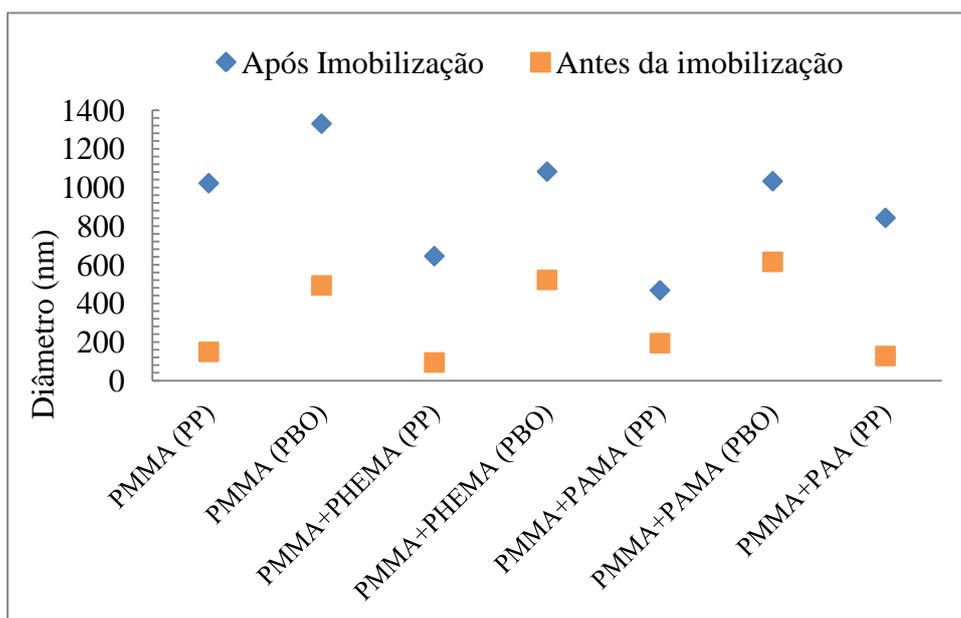


Figura 4-39 Tamanho médio das partículas poliméricas antes e depois da adsorção de BSA.

Apesar da mudança na carga inicial da partícula durante o processo de adsorção, não foi possível correlacionar esta variação com a quantidade adsorvida (Tabela 4-5). A baixa correlação entre o potencial zeta e a quantidade adsorvida permite especular que a interação predominante não é de natureza eletrostática ou iônica, mas provavelmente uma interação hidrofóbica ou de outra natureza não eletrostática. O aumento da quantidade adsorvida com a área específica, independentemente do material, corrobora a inespecificidade da ligação. Entretanto, como foi visto anteriormente, a presença dos grupos funcionais, principalmente carboxílicos, favorece o aumento da quantidade adsorvida. Desta forma, parece haver concomitância entre diferentes interações, porém a formação de multicamadas atenua o efeito da carga e dos grupos funcionais na visualização pelo potencial zeta.

Tabela 4-5 Matriz de correlação PZ e % Adsorvida

Variáveis	Pot. Zeta inicial	Potencial Zeta pós-adsorção	Delta de Pot. Zeta
% Adsorvida	-0,27	-0,09	0,30
Adsorção ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	-0,05	0,22	-0,14

Experimentos de dessorção foram realizados para todas as amostras em água e tampão fosfato (pH 6,0, pH 7,0 e pH 8,0) em temperatura de 23°C e em 37 °C. As medidas de percentual dessorvido foram feitas após 24 h e não foi observada dessorção significativa para nenhum dos casos. Esse resultado é muito significativo pois mostra que o processo de adsorção leva à preparação de sistemas estáveis. Para duas das amostras, avaliou-se a concentração de proteínas também no sobrenadante após cada etapa de centrifugação, para troca de meio e observou-se que havia proteína dessorvida apenas no primeiro fluido (meio) de ressuspensão e que as porcentagens de dessorção dependem da rota de reação (PBO ou PP) e do pH do meio em contato, como mostra a

Tabela 4-6. Muitos estudos afirmam que a adsorção é mais intensa em pH próximo ao do ponto isoelétrico. LI, HU e LIU (2005) relatam que acima ou abaixo deste pH a proteína possui cargas que induzem repulsão eletrostática, reduzindo bastante a adsorção. Para o sistema estudado, a BSA possui PI em pH-4,7; logo, quanto mais afastado deste pH, maior sua carga líquida, facilitando a dessorção. Esse resultado é corroborado pelos dados apresentados na Tabela 4-6, em que se observa maior

dessorção em pHs mais afastados do PI. O processo de dessorção será, no entanto, melhor estudada na secção 4.3 deste trabalho.

Tabela 4-6 Percentual de dessorção em diferentes meios.

Dessorção (%)		
Meio	P(MMA-co-HEMA) (PP)	P(MMA-co-HEMA) (PBO)
H ₂ O	15,62	9,97
pH6	3,12	4,78
pH7	23,23	6,80
pH8	23,39	11,10

Isotermas de adsorção foram obtidas a fim de verificar a natureza das forças que controlam o processo de adsorções nos polímeros. Devido a grande similaridade entre as primeiras isotermas obtidas e o laborioso processo de obtenção dos pontos para construir as isotermas, foram construídas apenas as isotermas de adsorção para o PMMA e o P(MMA-co-AMA). A Figura 4-40 mostra as isotermas. Foram testados os modelos de adsorção de Langmuir, Langmuir-Freundlich e Freundlich (LI *et al.*, 2005) e o melhor ajuste foi sempre obtido para este último modelo. Para o ajuste das isotermas, foram utilizados artifícios de reparametrização propostos por SCHWAAB e PINTO (2008).

As isotermas de adsorção revelaram que o processo de adsorção é favorecido em relação ao de dessorção ($\frac{1}{n} < 1$). Quando baixas concentrações de proteína estão presentes, há uma baixa interação entre proteína e polímero; contudo na presença das primeiras moléculas adsorvidas, a interação se torna mais forte. O bom ajuste propiciado pelo modelo de Freundlich também indica uma não uniformidade nos sítios de adsorção e a formação de multicamadas. Estes resultados confirmam as interpretações propostas anteriormente. A Tabela 4-7 apresenta os valores dos parâmetros e da variância para os ajustes das isotermas pelos modelos de Langmuir (L), Freundlich (F) e Langmuir-Freundlich (L-F), mostrando que este último modelo forneceu o melhor ajuste. As equações para estes modelos estão descritas na Seção 2.5.1 (Equação 2.1, Equação 2.2 e Equação 2.3).

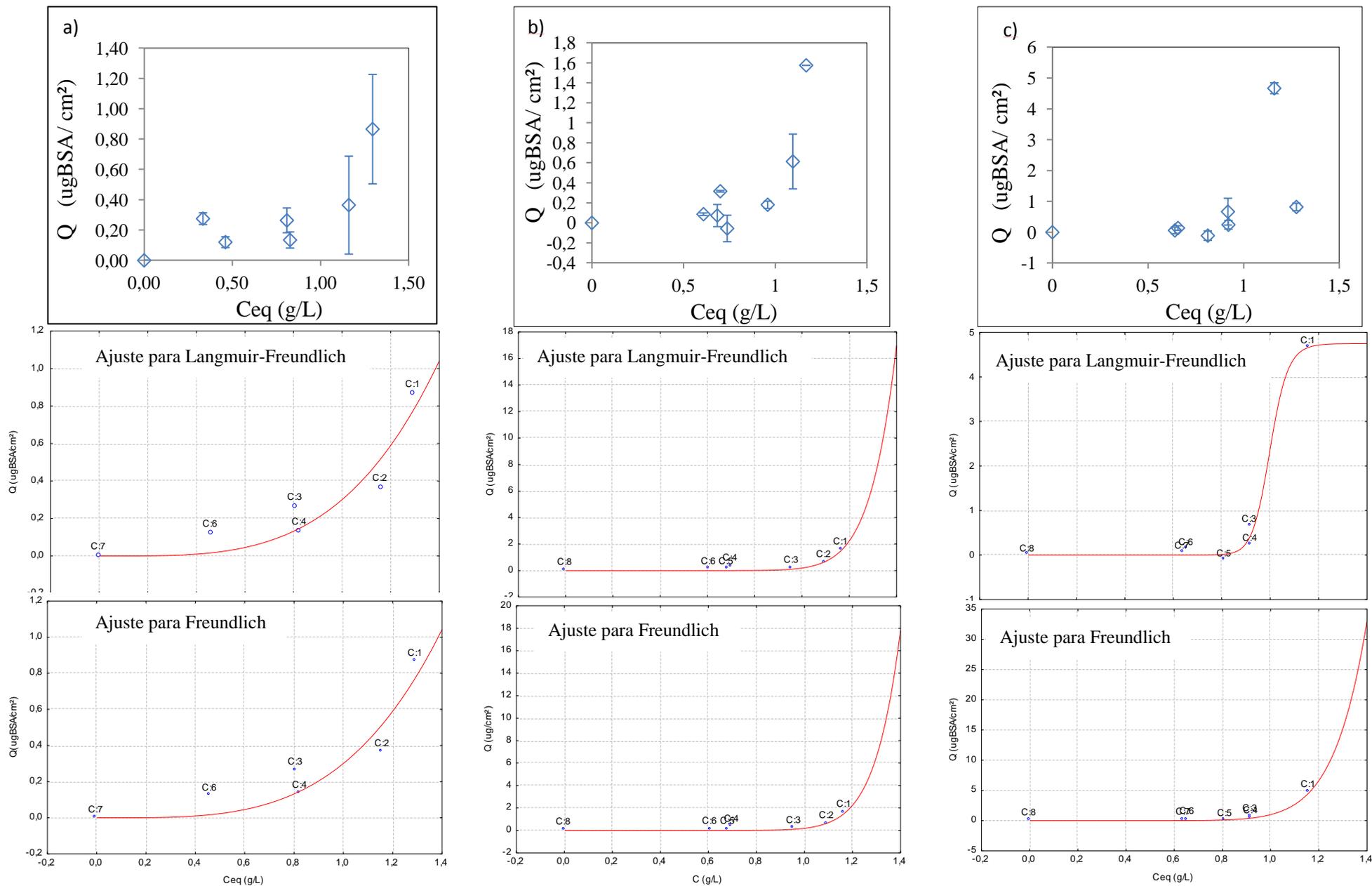


Figura 4-40 Isothermas de adsorção e respectivos ajustes para os modelos de Langmuir-Freundlich e Freundlich para as amostras dos polímeros: a) PMMA iniciado com PP; b) P(MMA-co-AMA) iniciado com PP ; c) P(MMA-co-AMA) iniciado com PBO.

Tabela 4-7 Parâmetros e R² dos modelos ajustados para as isotermas de adsorção.

Polímero	K(x10 ⁻⁴)			Γ _m		N		R ² (%)		
	L	L-F	F	L	L-F	L-F	F	L	L-F	F
PMMA (PP)	8,5	15,5	4278	507,8	257,2	3,7	3,7	59,38	87,7	87,7
P(MMA-co-AMA) (PP)	28,3	36	9943	6,7	289,9	13,5	13,5	31,5	93,5	93,6
P(MMA-co-AMA) (PBO)	27	401872	42493	520,3	4,7	27,2	10,4	48,2	99,2	99,1

Observa-se por intermédio da Tabela 4-7 que, apesar dos ajustes para todos os casos terem sido melhores para o modelo de Freundlich e Langmuir-Freundlich, os parâmetros estimados são bastante distintos quando existe a presença dos grupos carboxílicos. Os valores para n e K_F são muito maiores para os copolímeros com AMA que para o PMMA homopolímero, mostrando que os grupos funcionais carboxílicos agem positivamente, favorecendo a adsorção. Os parâmetros K_F e n estão diretamente relacionados com a capacidade e a favorabilidade da adsorção, respectivamente, portanto, valores maiores para ambos os casos são indícios de que o AMA tem papel fundamental no processo de adsorção.

LI *et al.* (2005) também encontraram o melhor ajuste das isotermas de adsorção para BSA em microesferas sulfonadas de PMMA com auxílio da equação de Freundlich. Eles concluíram que a adsorção de BSA em PMMA era mais complicada que em um sistema ideal (Langmuir), envolvendo interações intermoleculares entre as moléculas de proteína, por um processo dinâmico que é diretamente afetado pelos grupos sulfonados. Da mesma forma, observa-se aqui que parecem existir interações intermoleculares entre as proteínas que se adsorvem na superfície das partículas. Contudo, a influência dos diferentes grupos funcionais sobre este processo não pôde ser percebida nos experimentos realizados.

4.2.1 Comentários finais

A principal conclusão deste capítulo é que as nanopartículas fabricadas se comportam como bons adsorventes e que, apesar das medidas apresentarem erros significativos, a análise para cada réplica (visualizando um comportamento que se repete) não deixa dúvidas quanto aos polímeros que adsorvem melhor. Os copolímeros

produzidos na presença de ácidos carboxílicos em reações iniciadas com PBO apresentaram-se como melhores adsorventes. As séries de experimentos discutidos nas próximas seções têm também a intenção de reduzir os erros que podem estar associados às operações de diluição, manipulação entre outros, com auxílio da realização de experimentos controle.

Apesar de o iniciador PBO promover melhor funcionalização e adsorção, as suspensões finais dos copolímeros produzidos com PBO só são estáveis a curto prazo, desestabilizando e decantando com o decorrer do tempo. Desta forma, preferiu-se utilizar o iniciador hidrossolúvel para a condução da sequência de experimentos. Surpreendentemente, o homopolímero de PMMA pode ser considerado como um bom adsorvente de BSA, de acordo com os resultados obtidos. Como o PMMA constitui um padrão de mais fácil obtenção e reprodutibilidade, ele será utilizado para a condução das próximas etapas deste trabalho, usando PP como iniciador. Apesar disso, deve ficar claro que os copolímeros produzidos com PBO na presença de AA e AMA podem apresentar melhor desempenho no processo de adsorção, embora sejam menos estáveis a longo prazo.

4.3 Estudo sobre a composição da superfície

Esta seção apresenta os resultados obtidos para o plano em cruz de experimentos, cujo objetivo foi investigar a interferência das quantidades de surfactante e de iniciador no processo de adsorção de BSA na superfície das partículas. O surfactante utilizado nos testes foi o SDS, molécula tensoativa que se posicionam na superfície das partículas e assim estabilizam a suspensão. O mesmo ocorre com os fragmentos de iniciador persulfato de potássio que, apesar de fazerem parte da cadeia polimérica (encontrando-se na sua extremidade), tendem a posicionar-se na interface, devido à significativa polaridade e afinidade com meio dispersante água.

Pode-se verificar na Figura 4-41 que a quantidade de surfactante afeta diretamente o tamanho médio de partículas inicial e final. Como já se podia esperar, a redução da quantidade de surfactante reduz a eficiência tensoativa, provocando um aumento do tamanho médio de partícula. Verifica-se, portanto, que, para obtenção de partículas com diâmetro médio abaixo de 150 nm, deve-se utilizar um montante de surfactante igual ou superior a 1,0 % em massa referente à quantidade de monômero. A quantidade de iniciador, por outro lado, não influencia expressivamente a dinâmica dos tamanhos médios de partículas, mostrando que o SDS exerce o fator preponderante sobre a estabilidade da miniemulsão.

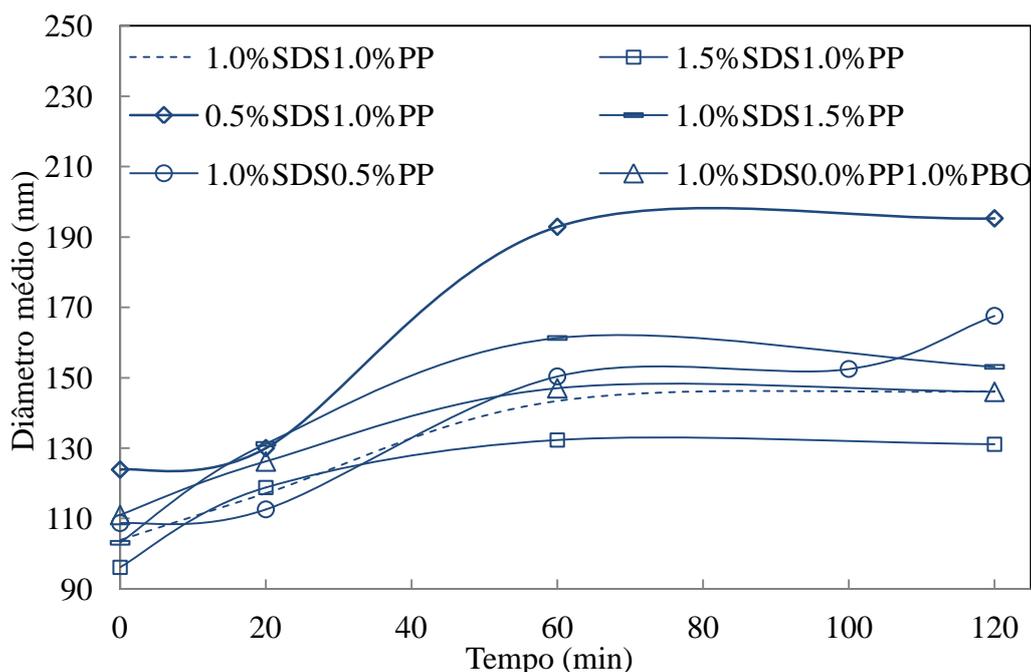


Figura 4-41 Dinâmica das reações do plano em cruz. Efeito das concentrações de SDS e PP sobre os tamanhos médios de partícula.

É conveniente também fazer uma comparação entre as reações em que a miniemulsão foi preparada com o Turrax e o sonicador. O sonicador promove a manutenção aproximada do diâmetro inicial de gota, como deve ocorrer para a miniemulsão quando a nucleação dominante é aquela no interior das gotas. Já quando o Turrax é utilizado, coexiste a nucleação homogênea (efeito já discutido na Seção 4.1) que não é desejada. A Figura 4-42 mostra claramente que a dinâmica de tamanhos é bastante diferente para as duas técnicas, comprovando que, nas condições empregadas, o uso do sonicador é muito mais eficiente para fabricação das nanopartículas via miniemulsão. A diferença de comportamento é devida principalmente às largas distribuições de tamanhos obtidos (Figura 4-4) com o Turrax, que reduz o número de partículas em suspensão e favorece a ocorrência de nucleação homogênea, como discutido na Seção 4. Pode-se verificar também que o uso do sonicador provê a formação de cadeias de menor massa molar, como pode ser observado na Figura 4-43, e conversões mais altas (97% para o sonicador e 94% para o Turrax), ambos fatores são diretamente decorrentes da diminuição no tamanho médio de partículas. O menor diâmetro médio de partículas gerado pelo sonicador aumenta as taxas de reação e conversão pela presença de maior número de gotas, e favorece as terminações, devido ao aumento da concentração de radicais em partículas menores. A dinâmica das distribuições de tamanho de partículas (apresentadas no APÊNDICE II) mostra que não ocorreu nucleação homogênea para nenhuma das reações do plano em cruz.

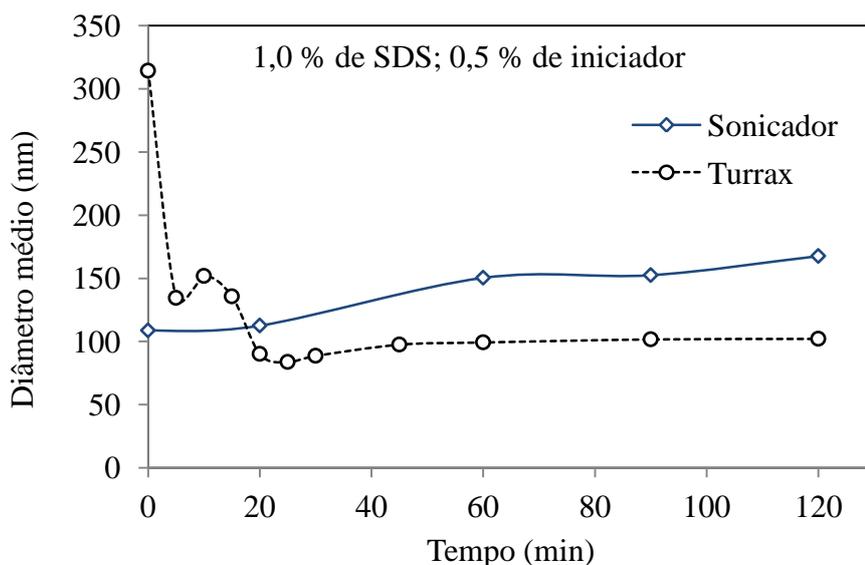


Figura 4-42 Comparação entre o uso do turrax e ultrassom para preparação da miniemulsão.

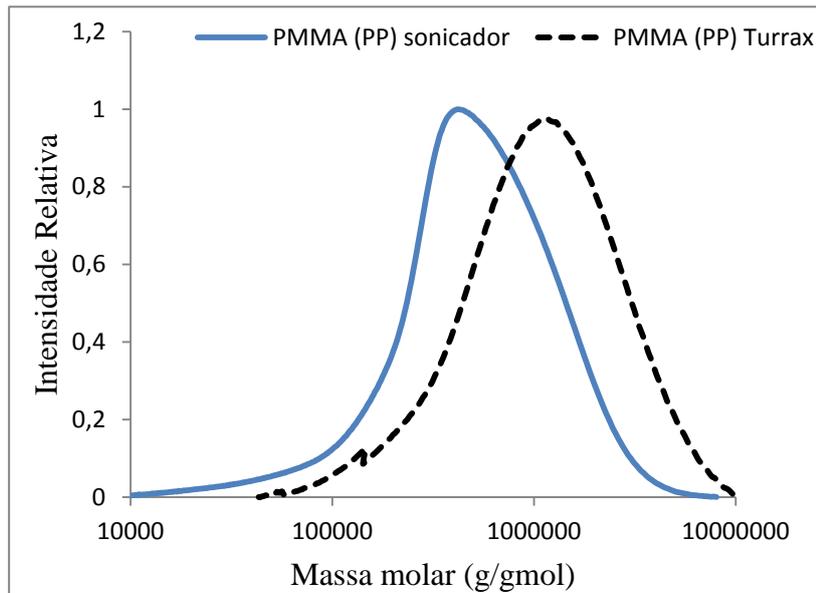


Figura 4-43 Comparação entre as distribuição de massas molares para os polímeros resultantes da polimerização em miniemulsão preparada com Turrax e com sonificador.

A Figura 4-44 mostra que não houve variações significativas nas massas molares obtidas para as reações do plano em cruz, com exceção do caso em que foi utilizado PBO (0% de PP), devido as altas taxas de terminação decorrentes da dissociação do iniciador dentro das gotas, como explicado da Seção 4-1. As Figura 4-45 e Figura 4-46 mostram que a dinâmica da reação é bastante diferente da formulação. Pode-se verificar que a quantidade de surfactante influencia bastante a taxa de reação por causa da influência sobre o tamanho médio das gotas e, conseqüentemente, sobre o número médio de partículas presentes no meio de reação. Quanto maior a quantidade de surfactante, menores são as gotas formadas e mais rápida é a reação, visto que a nucleação é facilitada com maiores área e população de gotas. Igualmente importante é o percentual de iniciador, pois taxas de reação mais altas são observadas quando se emprega mais iniciador. Neste caso, há efeitos adicionais que devem ser considerados, como a nucleação homogênea, já que, as maiores taxas de reação na fase aquosa podem produzir novas partículas.

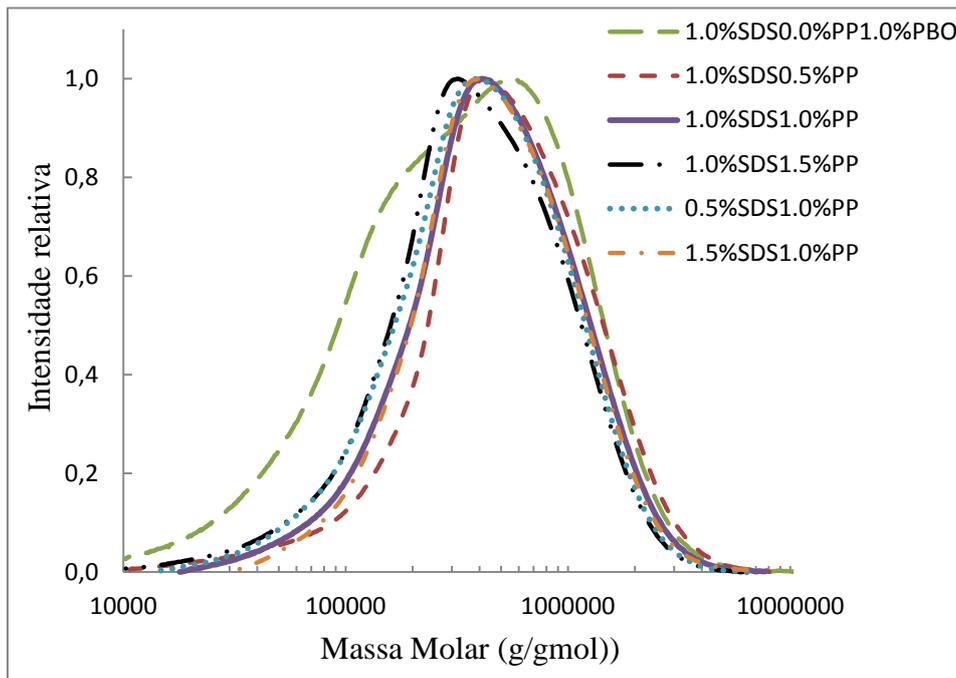


Figura 4-44 Distribuições de massas molares para com diferentes polímeros produzidos pelas reações do plano em cruz

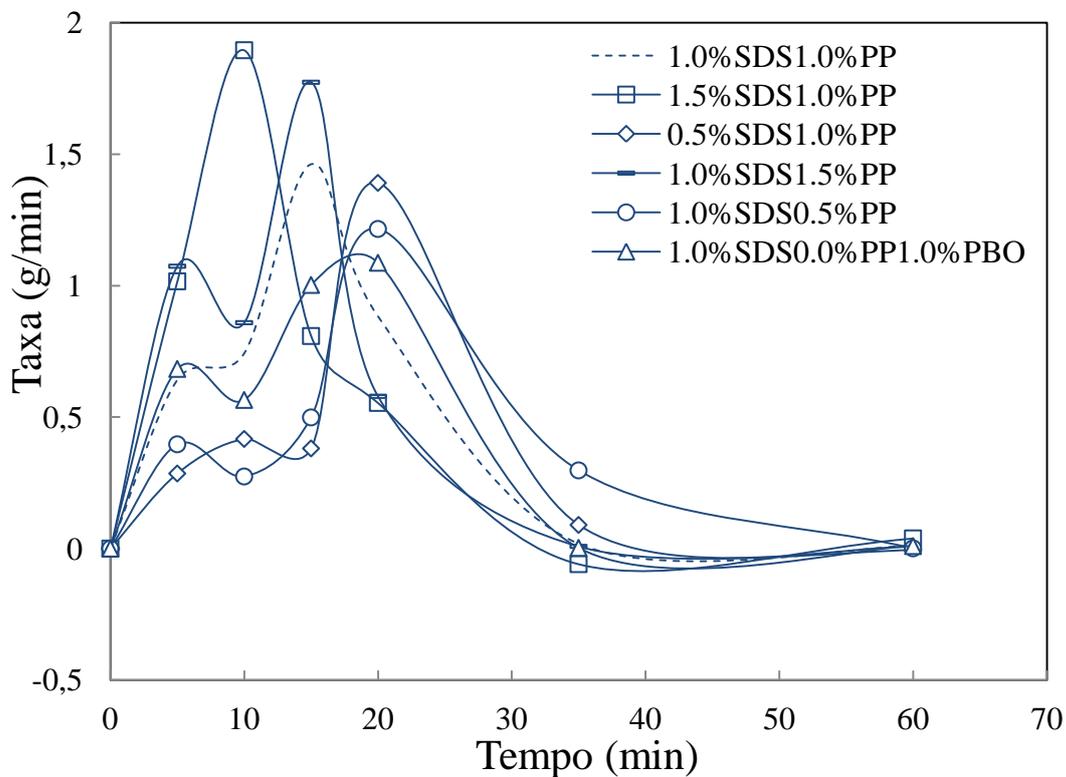


Figura 4-45 Dinâmica das reações do plano em cruz. Taxas de polimerização para diferentes concentrações de SDS e PP.

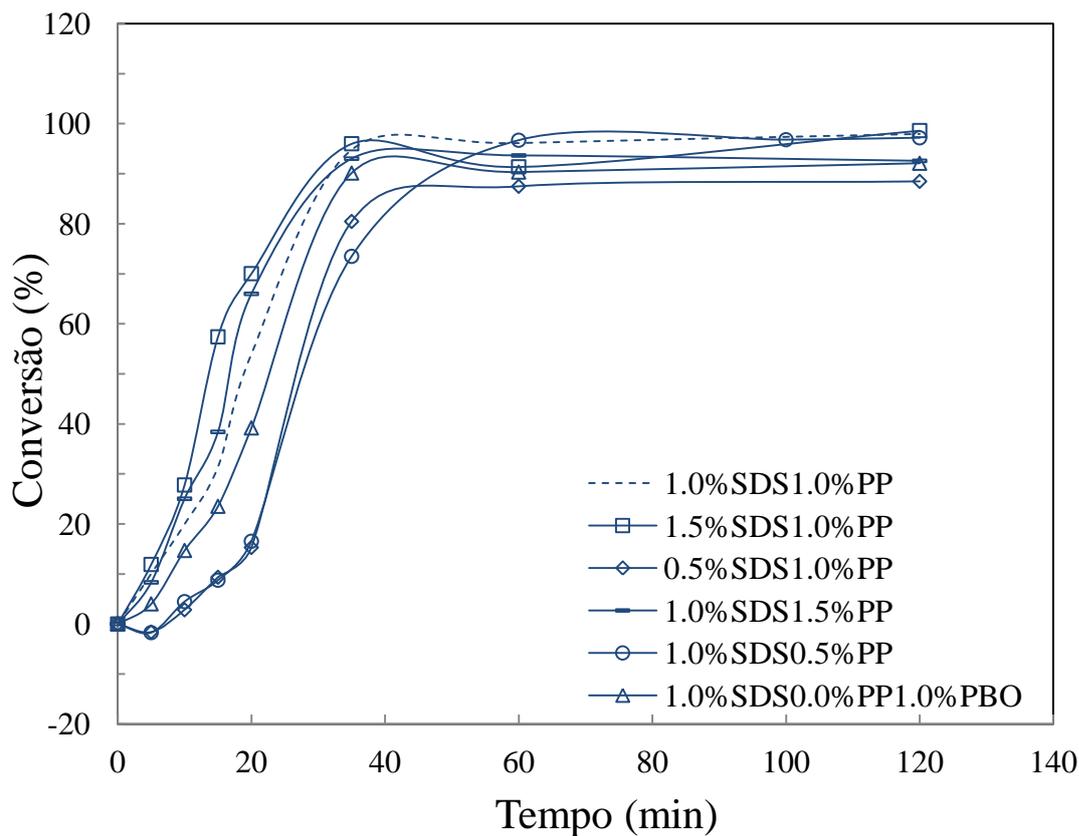


Figura 4-46 Dinâmica das reações do plano em cruz. Conversão de monômero para diferentes concentrações de SDS e PP.

É importante salientar que a conversão final é função principalmente da quantidade de surfactante usada na formulação. Pode-se verificar (Figura 4-47) que existe uma correlação direta e alta entre a quantidade de surfactante e a conversão final, ou seja, quanto maior a quantidade de surfactante, maior a conversão, por causa dos menores tamanhos médios de partículas e maior concentração de partículas formadas. Porém, não existe uma relação semelhante com o percentual de iniciador. A Tabela 4-8 resume as propriedades medidas para cada reação do plano em cruz.

Com relação às adsorções, pode-se verificar que não existe uma relação linear entre as quantidade de surfactante ou iniciador com as quantidades de BSA adsorvida. Entretanto, verifica-se que a presença de ambos em alta quantidade promove um aumento na quantidade de BSA adsorvida. Na série relacionada ao SDS (em cinza na Figura 4-48), vê-se que acima de 1,0% , não há mais um aumento significativo na quantidade adsorvida, sugerindo a saturação da superfície. O efeito é o mesmo quando

igual quando se representam os valores adsorvidos em grama de BSA por grama de polímero, mostrando que este efeito não é devido a área, mas sim ao surfactante em si. Já na série relacionada ao iniciador (em preto), pode-se perceber que há um aumento da quantidade adsorvida quando se aumenta de 0,5% para 1,0%; porém, para maiores adições de PP, observa-se nova redução na quantidade adsorvida. Esses resultados sugerem que a natureza da superfície da partícula polimérica exerce influência preponderante sobre o processo de adsorção

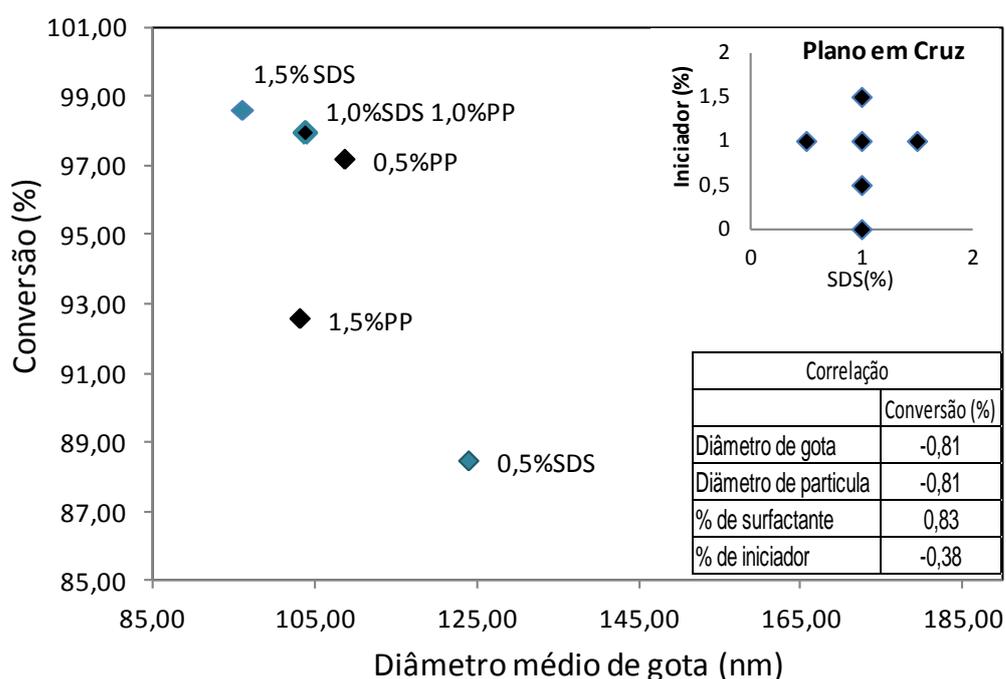


Figura 4-47 Relação entre conversão e diâmetro médio de gotas para os experimentos do plano em cruz.

Tabela 4-8 Propriedades medidas para as nanopartículas poliméricas fabricadas seguindo o plano em cruz.

FORMULAÇÃO	D (nm)		X _{conver} (%)	Pot. Zeta (mV)		Adsorção (ugBSA/cm ²)
	Inicial	Final		Suspensão inicial	Pós - adsorção	
1.0%SDS0.0%PP1.0%PBO	111,0	146,0	92,09	-23,40	14,37	0,095
1.0%SDS0.5%PP	108,7	167,6	97,17	-14,70	12,19	0,097
1.0%SDS1.0%PP	103,9	146,2	97,93	-38,60	12,74	0,190
0.5%SDS1.0%PP	123,9	195,3	88,47	-43,00	10,36	0,119
1.5%SDS1.0%PP	96,1	131,1	98,62	-37,30	11,23	0,177
1.0%SDS1.5%PP	103,1	153,1	92,56	-46,00	11,50	0,140

Foi verificada também a influência da formulação sobre o processo de dessorção. A Tabela 4-9 mostra o percentual dessorvido e o que restou de proteína na partícula como função da formulação. Observou-se que a dessorção é maior em pH 7,0 do que em água. Como a adsorção foi realizada em pH 4,5, a mudança do pH do meio muda a carga da proteína, afastando-a do seu ponto isoelétrico e promovendo a inserção de cargas negativas, aumentando a repulsão e conseqüentemente a dessorção. Além disso, o tampão fosfato (pH 7,0) possui íons que podem interagir com as proteínas, levando à sua dessorção.

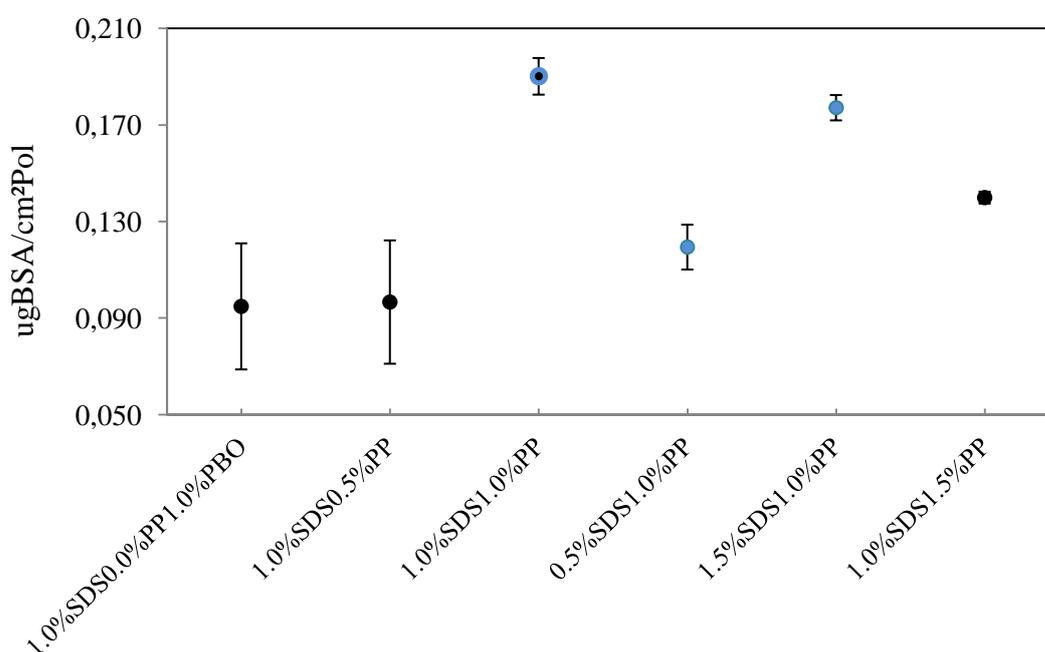


Figura 4-48 Quantidades de BSA adsorvidas pelos diferentes polímeros produzidos no plano em cruz.

Tabela 4-9 Dessorção nos diferentes polímeros

Composição do polímero	% Dessorvida		Restou adsorvido			
	em H2O	em pH 7,0	(mg/gPol)		(ugBSA/cm²)	
			em H2O	em pH 7,0	em H2O	em pH 7,0
1.0%SDS0.0%PP1.0%PBO	20,11	45,41	36,10	25,50	0,08	0,05
1.0%SDS0.5%PP	22,95	54,97	29,45	17,69	0,08	0,05
1.0%SDS1.0%PP	13,53	28,50	73,31	60,65	0,16	0,14
0.5%SDS1.0%PP	21,30	56,49	34,72	19,26	0,09	0,05
1.5%SDS1.0%PP	16,40	34,42	73,17	57,42	0,15	0,12
1.0%SDS1.5%PP	13,64	37,13	54,41	39,61	0,12	0,09

Verifica-se que os polímeros produzidos com menores quantidades de SDS ou Persulfato levaram a uma dessorção mais acentuada, sendo que a menor dessorção foi observada no ponto central. Além disso, as dessorções em água e em pH 7,0 são proporcionais, apresentando correlação 93%, o que sugere que, independentemente do meio, a composição (surfactante e iniciador) é determinante no processo de adsorção. A Figura 4-49 mostra as quantidades de proteína retidos nas partículas após dessorção em meio aquoso e em pH 7,0. Constata-se que o polímero que mais retém proteína adsorvida é aquele que menos dessorve, produzido no ponto central do plano experimental. Em seguida, os polímeros mais eficientes são aqueles produzidos com os maiores percentuais de surfactante e de iniciador, respectivamente. Desta forma, é notório que iniciador e surfactante exercem um papel fundamental na manutenção da proteína adsorvida.

O potencial zeta fornece uma medida importante e qualitativa sobre os processos de adsorção. Pode-se constatar, por meio da Figura 4-50 e de maneira similar ao efeito discutido na Seção 4.2, que após o processo de adsorção ocorre uma mudança expressiva da carga nas partículas, comprovando que existem proteínas ali adsorvidas, as quais apresentam uma pequena carga positiva ($\text{pH } 4,5 < \text{PI}_{\text{BSA}}=4,7$). Após a dessorção em H_2O , observa-se que, com a perda de uma parcela das proteínas adsorvidas, o potencial zeta é reduzido e volta a ser negativo, ainda que menos negativo que antes da adsorção, devido à proteína remanescente. No caso das partículas que foram submetidas ao processo de dessorção em pH 7,0, o potencial zeta torna-se bastante negativo, sendo que em alguns casos são mais negativos do que na suspensão inicial. Isto só é possível devido ao percentual de proteínas que resta adsorvido, pois estas encontram-se acima do seu ponto isoelétrico e, por isso, carregadas negativamente ($\text{pH } 7,0 < \text{PI}_{\text{BSA}}=4,7$).

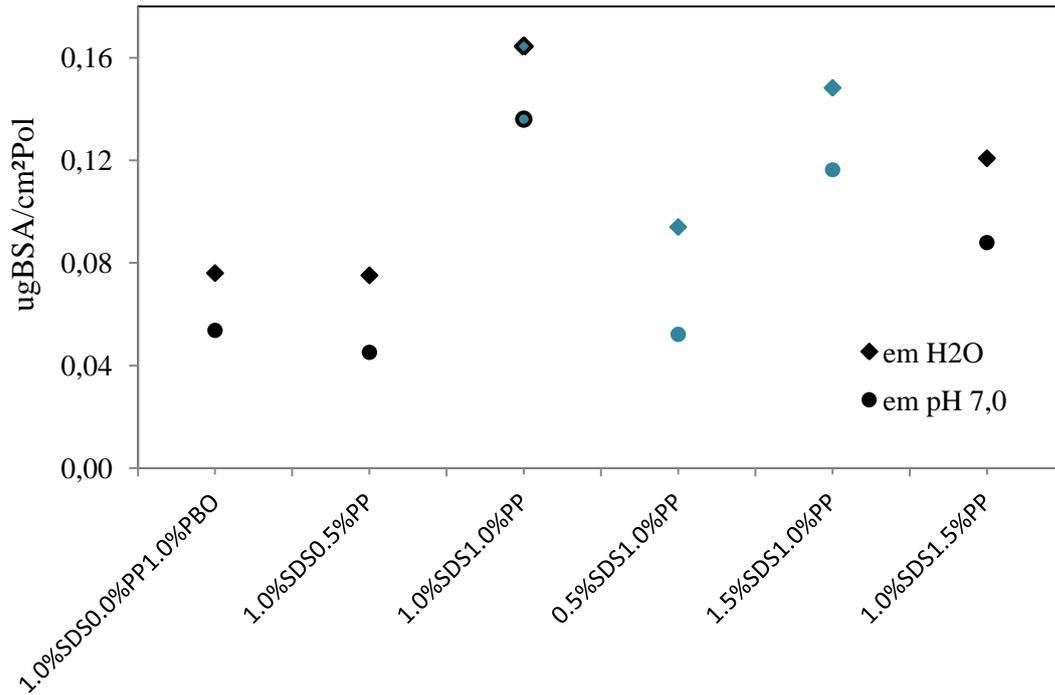


Figura 4-49 Carga de BSA nas partículas produzidas no plano em cruz após a dessorção em H₂O e pH 7,0.

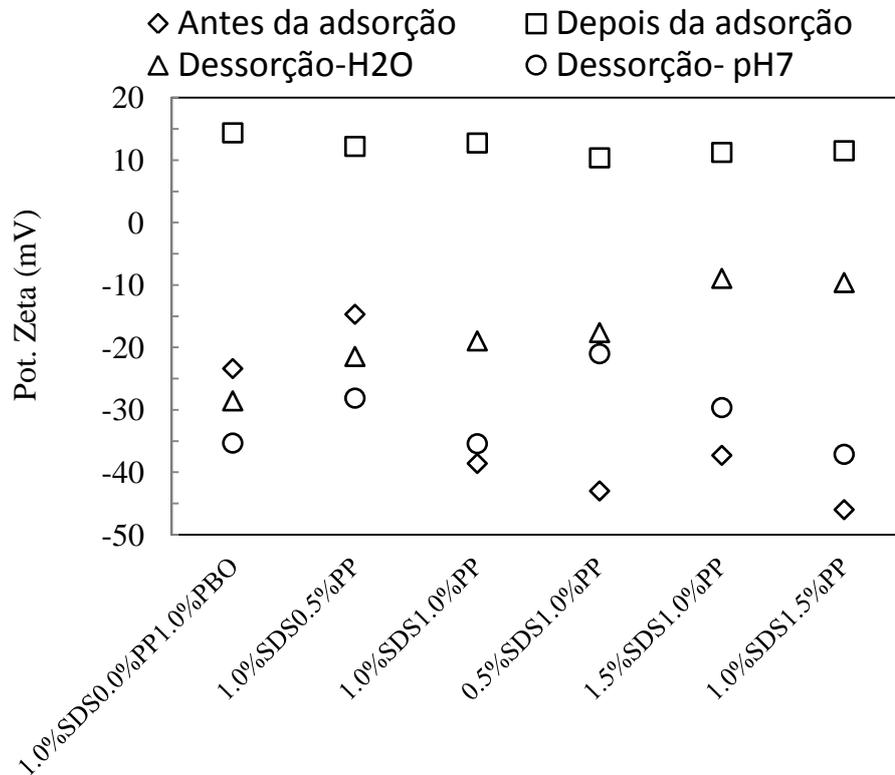


Figura 4-50 Potencial Zeta das partículas produzidas antes e depois dos processos de adsorção e dessorção.

Os espectros de infravermelho (Figura 4-51) também demonstram que há uma adsorção significativa de proteína nas partículas. As análises e identificação dos grupos foram baseadas nos artigos de GRDADOLNIK e MARÉCHAL (2000) e DUAN *et al.*(2008) e no banco de dados publicado por YAMAJI *et al* (2013). São apresentados os espectros de infravermelho para os produtos das duas primeiras reações; entretanto, os demais espectros de infravermelho são muito semelhantes e encontram-se para consulta no APÊNDICE II.

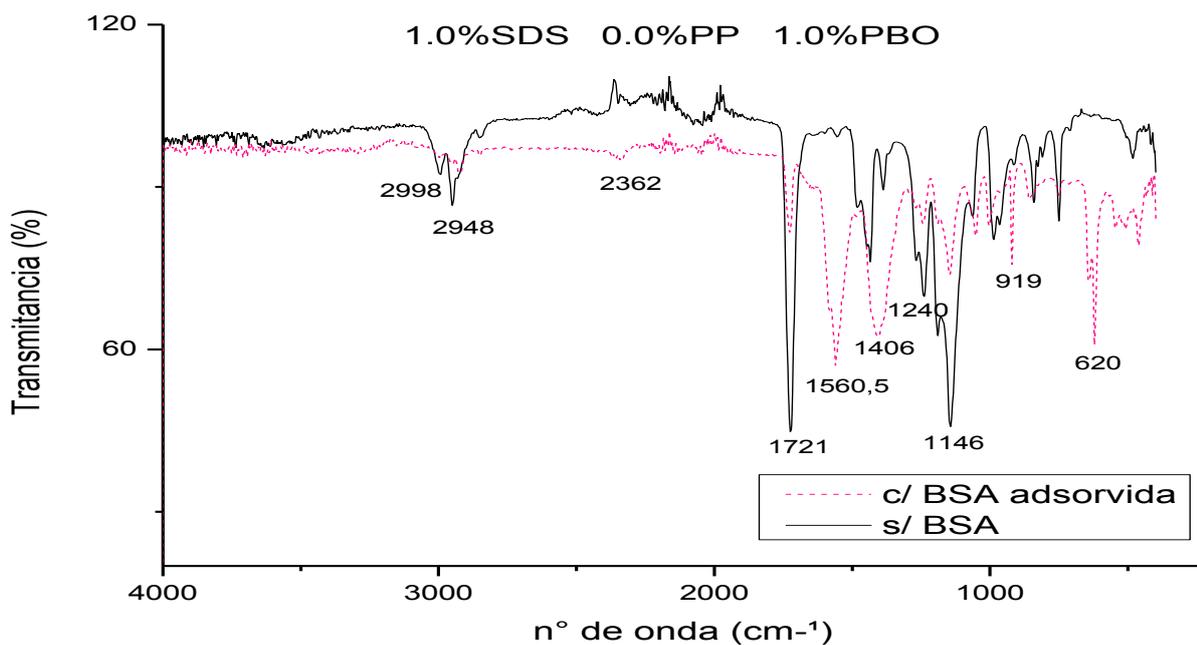
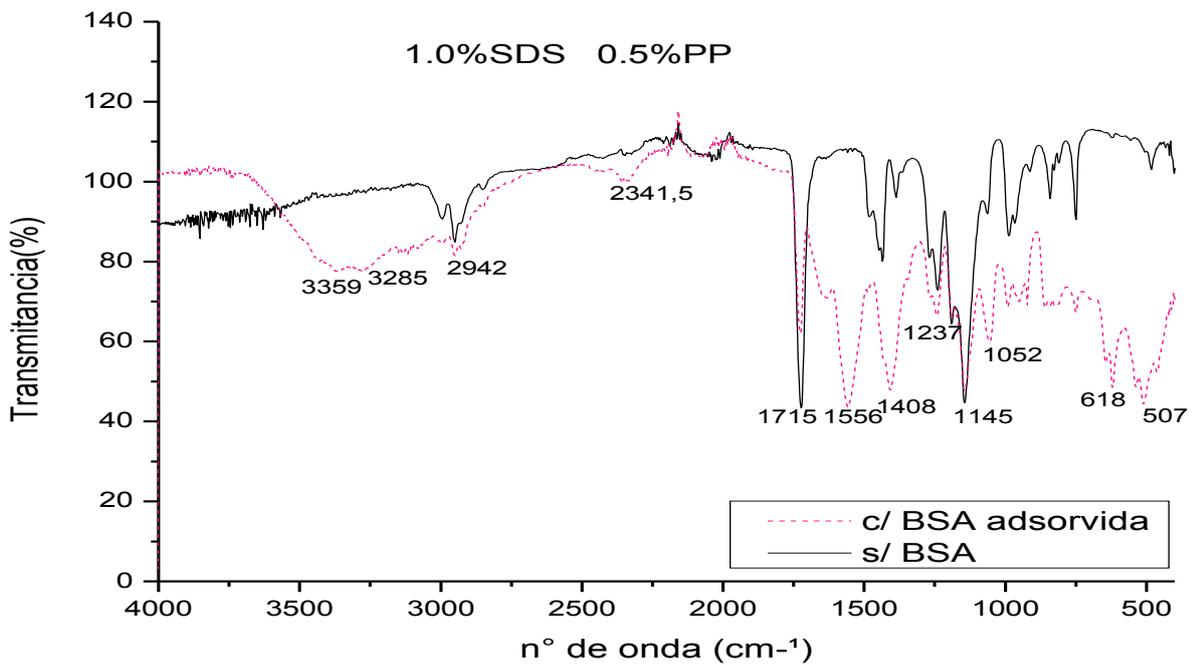


Figura 4-51 Espectros de infravermelho das partículas produzidas no plano em cruz com e sem proteína adsorvida.

De acordo com DUAN *et al.* (2008), o grupo C=O do PMMA está representado na banda 1715/1720 cm^{-1} e o grupo C-O-C possui banda de absorção entre 1150 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} . Além disto, bandas de absorção características das vibrações do PMMA estão posicionadas em 980 cm^{-1} , 1062 cm^{-1} e 843 cm^{-1} . Quando o polímero possui proteína adsorvida, pode-se verificar o surgimento de alguns novos picos associado à atenuação de picos característicos do polímero, principalmente o pico referente ao grupo C=O, que era bem pronunciado antes da adsorção. As bandas posicionadas em 3400 cm^{-1} , normalmente associadas à umidade pela presença de grupos OH, podem também ser associadas aos grupos N-H. Quando estas bandas estão deslocadas à direita, podem representar (segundo GRDADOLNIK e MARÉCHAL, 2000) grupos N-H das proteínas formando pontes de hidrogênio (em 3359 cm^{-1} e 3285 cm^{-1}). Bandas que também evidenciam estas ligações de hidrogênio são as bandas do grupo N-H que são normalmente posicionadas em 1500 cm^{-1} e que, neste caso, estão deslocadas à esquerda (1556/1560 cm^{-1}). O mesmo autor sugere que o deslocamento da banda do grupo COO⁻, normalmente posicionada em 1390 cm^{-1} , para 1405 cm^{-1} significa que este grupo também está formando ligações de hidrogênio. Portanto, a presença destas bandas deslocadas e a atenuação do pico de C=O do polímero indicam a ocorrência e interações polímero-proteína (ou mesmo proteína-proteína) via ligações de hidrogênio.

4.3.1 Comentários finais

Experimentos conduzidos na presença de quantidades variáveis de SDS e PP mostraram que as quantidades adsorvidas de BSA dependem das quantidades de surfactante e de iniciador usadas. De forma geral, o aumento das cargas resulta em aumento das quantidades adsorvidas. Além disso, ensaios de infravermelho sugerem a formação de ligações de hidrogênio entre a proteína e o polímero. Esses resultados ajudam a explicar por que a inserção de comônmeros carboxílicos afetam positivamente o processo de adsorção de BSA, quando o PBO foi usado como iniciador na seção 4.2. A redução das quantidades adsorvidas quando o PBO foi trocado pelo PP como iniciador pode ser explicado pelo deslocamento dos grupos funcionais da superfície pelos resíduos iônicos do PP.

4.4 Ensaios *in vitro* com HSA adsorvida

Para verificação da toxicidade das nanopartículas foram realizados ensaios *in vitro* utilizando a proteína de soro humano (HSA) adsorvida na superfície das partículas. Como controle, os mesmos ensaios também foram realizados para as nanopartículas sem proteína adsorvida (suspensão original) e para HSA pura. As nanopartículas escolhidas para realização dos ensaios foram aquelas do ponto central do plano em cruz (Seção 4.3), visto que resultaram nos melhores desempenhos para adsorção e dessorção. A formulação usada para preparação destas partículas foi 1.0% de SDS, 1.0% de Persulfato de potássio e 35% de PMMA, com diâmetro final de 146,20 nm.

Devido à grande semelhança existente entre as estruturas da HSA e da BSA, não houve diferenças muito grandes nos processos de adsorção dessas duas proteínas. A Tabela 4-10 apresenta os dados comparativos de adsorção e dessorção das duas proteínas. Pode-se verificar que a HSA resulta em melhores desempenhos nos processos de adsorção que a BSA, adsorvendo um pouco mais e dessorvendo menos. Isto também pode ser visualizado a partir das medidas de potencial zeta, em que as partículas com HSA adsorvida atingem a uma carga final mais positiva (Tabela 4-11), visto que a HSA tem um ponto isoelétrico (dado do fornecedor: PI=5,2) maior que o da BSA (PI=4,7). Portanto, em pH 4,5 a HSA possui carga líquida mais positiva.

Tabela 4-10 Dados de adsorção da HSA e BSA sobre as partículas poliméricas produzidas no ponto central do plano em cruz

Proteína	Adsorção			Dessorção	
	%	mg/g	ug/cm ²	em H ₂ O (%)	em pH 7,0 (%)
HSA	19,09	70,02	0,157	13,08	18,11
BSA	14,43	74,17	0,166	14,01	31,72

* A concentrações iniciais medidas para as proteínas em solução foram $C_{HSA}^0 = 1,07$ g/L, $C_{BSA}^0 = 0,94$ g/L.

Tabela 4-11 Potencial Zeta das partículas poliméricas produzidas no ponto central do plano em cruz antes e pós adsorção com HSA e BSA.

Pot. Zeta - (mV)	
Amostras	PZ
PI BSA	+ 4,7
NPs com BSA adsorvida =	+ 16,77
PI HSA	+ 5,2
NPs com HSA adsorvida =	+ 22,7

As Figura 4-52 e Figura 4-53 apresentam os resultados para os ensaios de MTT e LDH extravasado, respectivamente. O ensaio de MTT baseia-se na medida do dano induzido pelo composto/extrato em estudo no metabolismo celular de glicídeos, avaliando-se as atividades de desidrogenases mitocondriais. Pode-se verificar que, para todos os sistemas testados e variadas concentrações, nem as partículas de PMMA puro, nem aquelas com proteína adsorvida provocaram perda de viabilidade celular; ou seja, não são tóxicas para as células testadas.

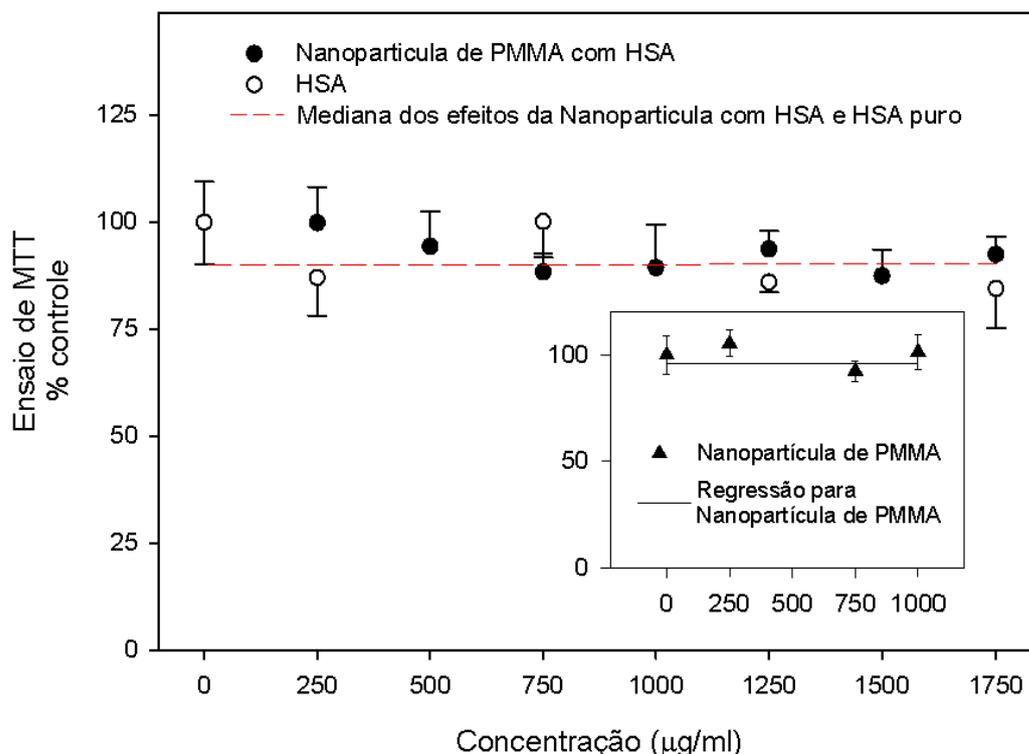


Figura 4-52 Resultados dos ensaios de MTT realizados com HSA e partículas poliméricas produzidas no ponto central do plano em cruz.

A mesma reposta de não-toxicidade foi encontrada pelo ensaio de LDH extravasado. Neste ensaio, quanto maior a atividade da LDH, maior é o dano à célula, pois esta é uma enzima intracelular (citoplasmática). Se fosse observado um aumento da sua atividade no meio de cultura, este estaria diretamente associado à perda de integridade membranar da célula, que deixaria esta enzima ser extravasada para o meio de cultura, perdendo viabilidade. A regressão linear mostrada para as nanopartículas de PMMA sem HSA apresentam um efeito benéfico protetor; ou seja, houve uma redução do nível basal de extravasamento da enzima devido à uma proteção realizada pelas partículas. Portanto, pode-se afirmar que as nanopartículas de PMMA não reduzem a viabilidade celular; ou seja, não são tóxicas para as células testadas. Resultados semelhantes foram encontrados por MENDES *et al.* (2012), atestando que o PMMA é bastante biocompatível.

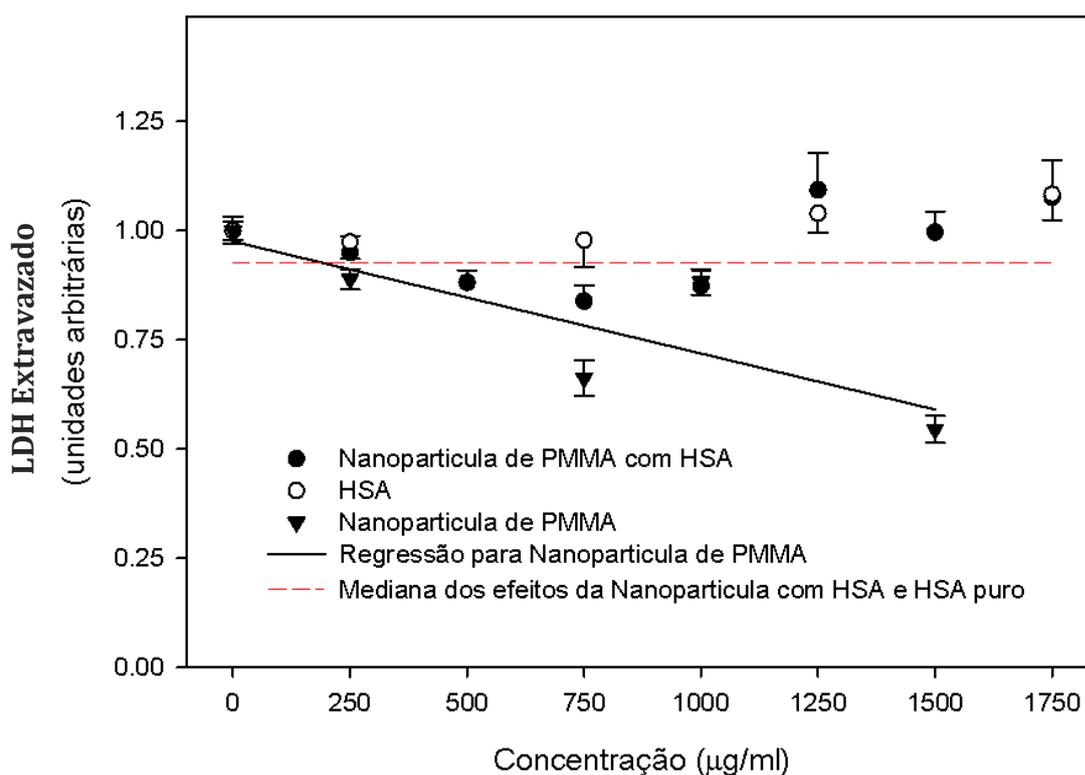


Figura 4-53 Resultados dos ensaios de LDH extravasado realizados com HSA e partículas poliméricas produzidas no ponto central do plano em cruz.

5 Conclusões e Sugestões

Este capítulo tem o objetivo de sintetizar as conclusões expostas ao longo dos capítulos e fazer sugestões para trabalhos futuros que tenham a pretensão de estudar o assunto.

5.1 Conclusões

A técnica de polimerização em miniemulsão permitiu realizar com sucesso as copolimerizações com a maioria dos comonômeros utilizados, promovendo a funcionalização das partículas com modificações apreciáveis na evolução dinâmica das reações. Entretanto, quando foi utilizado o iniciador hidrossolúvel, houve concomitância entre os mecanismos de nucleação das gotas e nucleação homogênea. Este comportamento não desejável pode ser minimizado com a modificação da técnica de preparação da miniemulsão de Turrax para sonicador. O uso do iniciador PBO promove melhor a funcionalização, pois evita a nucleação homogênea e promove a formação de camadas de copolímero rico em comonômero funcional na superfície das partículas; no entanto, a suspensão final só é estável a curto prazo, desestabilizando-se e decantando com o decorrer do tempo. Observou-se também que a adição de comonômeros solúveis em água e que formem polímeros solúveis em água pode ser muito benéfica ao processo de encapsulamento de ativos, por reduzir as taxas de nucleação homogênea.

Verificou-se também que, para obtenção de partículas com diâmetro abaixo de 150 nm requeridos para aplicações por efeito EPR, faz-se necessário o simples ajuste da formulação e das quantidades de surfactante. Para o caso em questão, um montante de surfactante igual ou superior a 1,0% foi capaz de atender a este requisito.

A conhecida dificuldade de secagem e separação dos sólidos da suspensão polimérica resultante de reações em miniemulsão foi aqui contornada utilizando-se a suspensão (látex) diretamente para os ensaios de adsorção, evitando-se agregações e perdas de área. Este tipo de manipulação das amostras proporcionou bons resultados e resultou numa solução alternativa aos métodos que usam a secagem do material.

Apesar dos erros de medição decorrentes da técnica utilizada, as análises não paramétricas não deixam dúvida quanto aos diferentes desempenhos dos copolímeros nos ensaios de adsorção. Verificou-se que os copolímeros produzidos na presença de ácidos carboxílicos e o próprio PMMA homopolímero produzido com PBO como iniciador foram os melhores adsorventes dentre os polímeros testados, para adsorção de BSA.

Ensaio de adsorção foram realizados com polímeros produzidos na presença de diferentes quantidades de surfactante e iniciador, verificando-se que não existe uma relação linear entre quantidade de surfactante ou iniciador com a quantidade adsorvida. Entretanto, verificou-se que a presença de ambos em alta quantidade (1,0% e 1,5%) promove um aumento nas quantidades adsorvidas. Adicionalmente, constatou-se que o polímero que mais retém proteína é aquele que resulta em menores quantidades desorvidas, sendo produzido no ponto central do plano experimental (1% de SDS e 1% de PP). Desta forma, é notório que as quantidades de iniciador e surfactante usados na formulação exercem papel fundamental na manutenção da proteína adsorvida.

As isotermas de adsorção revelaram que o processo de adsorção é favorável e melhor ajustada pelo modelo de Freundlich, indicando a não uniformidade nos sítios de adsorção e a formação de multicamadas. O processo de adsorção se mostra complexo, onde a interação proteína-proteína se faz presente e é provavelmente o responsável pelo formato da isoterma. Para baixas concentrações de proteína ocorre uma reduzida interação entre proteína e polímero; contudo, na presença das primeiras moléculas adsorvidas, a interação se torna mais forte. Por meio das isotermas também pode-se concluir que os grupos carboxílicos presentes nos copolímeros promovem aumento na capacidade de adsorção e tornam a adsorção mais favorável, fundamentado nos valores maiores dos parâmetros estimados K_L e n .

A baixa correlação existente entre o potencial zeta e a eficiência da adsorção sugere que a interação predominante não é de natureza eletrostática, mas provavelmente hidrofóbica. Por outro lado, a presença de grupos funcionais como carboxílico, bem como o surfactante e fragmentos de iniciador afetam expressivamente as quantidades adsorvidas. De acordo com a literatura estudada e analisando os resultados de infravermelho e as isotermas de adsorção, pode-se afirmar que estão presentes interações de hidrogênio e que há formação de multicamadas de proteína adsorvida. Os

mecanismos de adsorção observados são capazes de fixar as proteínas na superfície das partículas, como visualizado nos vários experimentos de dessorção realizados, podendo ser utilizados como alternativas aos processos baseados em reações covalentes mais complexas na confecção de partículas sinalizadas com biomoléculas.

Os ensaios *in vitro* de viabilidade celular comprovaram que as nanopartículas de PMMA não reduzem a viabilidade celular; ou seja, não são tóxicas às células testadas.

5.2 Sugestões

Neste trabalho foi revelada a natureza complexa das forças de interação na adsorção polímero-proteína; porém vislumbrando o domínio e manipulação de cada uma das forças envolvidas, mais experimentos são necessários. Sugere-se para os trabalhos posteriores que se façam manipulação das variáveis percentual de comonômero carboxilado (e, portanto, do grupo funcional carregado), para verificar a importância das interações do tipo ponte de hidrogênio no processo de adsorção e o pH do meio, visto que interações eletrostáticas podem ser mais pronunciadas fora do ponto isoelétrico da proteína.

Adicionalmente, visando ao objetivo final da aplicação, que é a liberação de fármacos em células alvo específicas, sugere-se que sejam feitos testes de encapsulamento do fármaco e que seja verificada a influência do fármaco na estabilidade coloidal da emulsão, no tamanho de partícula obtido e nas propriedades de superfície e adsorção.

Para averiguação da capacidade de interação das partículas fabricadas (com e sem proteína adsorvida) com as células e a possibilidade destas serem captadas para o interior das células, sugere-se a realização de testes *in vitro* adicionais, com as partículas marcadas com corante encapsulado, para visualização da captação. Seria interessante proceder os testes de interação e toxicidade das partículas tanto em células normais quanto em células cancerosas

É também instigante a investigação sobre o efeito dos comonômeros que formam polímeros solúveis no meio aquoso como inibidores da nucleação homogênea. Desta forma, sugere-se que pesquisas posteriores investiguem este fenômeno mais a fundo,

verificando a relação entre a eficiência na inibição da nucleação homogênea e a quantidade de comonômero usado na formulação.

Uma investigação sobre a cinética de adsorção das proteínas nas partículas poliméricas pode fornecer informações importantes e possibilitar a redução dos tempos dos experimentos, extrapolados neste trabalho para 24h. Além disso, mais isothermas de adsorção são imprescindíveis para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas adsorções nos diferentes copolímeros.

6 Referências Bibliográficas

ANTONIETTI, Markus; LANDFESTER, Katharina. “Polyreactions in miniemulsions”. **Progress in Polymer Science**, Sci.27, p.1283-1346, 2002.

ASTM. “Standard Terminology Relating to Nanotechnology”. **ASTM E2456 - 06(2012)**. 2012.

ASUA, J.M. “Miniemulsion polymerization”. **Progress in Polymer Science**, Sci.27, p.689-757, 2002.

AZEVEDO, M. M. M. 2002. **Nanoesferas e a Liberação Controlada de Fármacos**. Monografia. Instituto de Química – UNICAMP.

BAGCHI, P.; BIRNBAUM, S.M. (1981) “Effect of pH on the adsorption of immunoglobulin G on anionic poly(vinyltoluene) model latex particles”. **J. Colloid Interface Sci.**, 83. Pg. 460 – 478.

BASTOS-GONZÁLEZ, D.; ORTEGA-VINUESA, J.L.; LASNIEVES, DE F.J.; HIDALGO-ÁLVAREZ, R.. “Carboxylated latexes for covalent coupling antibodies, I”. **journal of Colloid and Interface Science**, 176, 232-239 (1995).

BOVEY. F. A.; MIRAU, P. A. **NMR of Polymers**. Academic Press, 1996.

BRADFORD, M. M. “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye binding”. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY** 72, 248-254 (1976).

BRANDOLINI, A. J.; HILLS, D. D.. **NMR Spectra of Polymers and Polymer Additives**. Marcel Dekker, Inc. NY, USA. 2000.

BRANDRUP, J.; IMMERGUT, E.H.; GRULKE E.A. **Polymer Handbook**. 4ª Edição. John Wiley & Sons 1999;2005.

BUTLER , J.E.; NI, L.; NESSLER , R.; JOSHI , K.S.; SUTER , M.; ROSENBERG , B.; CHANG , J.; BROWN , W.R.; CANTARERO , L.A. 1992. “The physical and

functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene”. **J. Immunol. Meth**, 150. Pg. 77– 90.

CARIS C. H. M.. (1990). **Polymer encapsulation of inorganic submicron particles in aqueous dispersion**. Tese de Ph.D. Eindhoven University of Technology, NE.

CHO, K.; WANG, X.; NIE, S.; CHEN, Z.; SHIN, D. M.. “Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer”. **AACR, Clinical cancer Research**. 2008. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-1441.

COELHO, T. L., 2006. **Estudos de adsorção de Cobre (II) em microesferas de quitosana reticuladas com epiclorigrina e impregnadas com heparina**. Msc Dissertação. Curso de Pós – graduação em Química, Florianópolis.

CORTINA, F. V.; 2007. **Modelagem Matemática da polimerização em miniemulsão utilizando iniciador hidrossolúvel e organo-solúvel**. Msc. Dissertação. Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COSTA, M. “Entenda o que é a tixotropia – Artigo técnico”. 2006. **Website do Conselho Regional de Química- 4ª Região**. Disponível em: http://www.crq4.org.br/default.php?p=informativo_mat.php&id=285. Acessado em: fevereiro de 2013.

CRESPY, D.; LANDFESTER, K. “Miniemulsion as a versatile tool for the synthesis of functionalized polymers”. **Beilstein Journal os Organic Chemistry**. 2010, 6, 1132-148.

DEMING, T. J. “Synthetic polypeptides for biomedical applications”. **Progress in Polymer Science** Volume 32, Issues 8-9, August-September 2007, Pages 858-875.

DEVIRGILIIS, L. C., BRUSCALUPI, G. E DINI, L.. “Modulation of asialoglycoprotein binding activity in livers of pregnant or estrogen-treated rats”. **Bioscience Reports**. 1989, Volume 9, pag. 701-707.

DUAN, G.; Zhang, C.; Li, A.; Yang, X.; Lu, L.; Wang, X.. “Preparation and Characterization of Mesoporous Zirconia Made by Using a Poly (methyl methacrylate) Template”. **Nanoscale Res Lett** (2008) 3:118–122. DOI 10.1007/s11671-008-9123-7.

FERREIRA, C. S. M. e MISSAILIDIS, S. “Aptamer-based therapeutics and their potential in radiopharmaceutical design.” **Braz. arch. biol. Technol.** 2007, vol.50, n.spe, pp. 63-76.

FONSECA, L. B.. 2012. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo Praziquantel para o tratamento da esquistossomose.** Tese de Dsc. PEQ-COPPE, UFRJ. Rio de Janeiro-BR.

FOX, T. G. “Influence of Diluent and of Copolymer Composition on the Glass Temperature of a Polymer System”. **Bull. Am. Phys. Soc.** 1956, 1, 123.

FURTADO, C.M., MARCONDES, M.C., SOLA-PENNA, M., DE SOUZA, M.L.S., ZANCAN, P. “Clotrimazole Preferentially Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation, Viability and Glycolysis”. **PLoS One.** 2012. 7: e30462

GAUTIER, S.; GRUDZIELSKI, N.; GOFFINET, G.; DE HASSONVILLE, S.H.; DELATTRE, L.; JÉRÔME, R... “Preparation of poly (D-L-lactide) nanoparticles assisted by amphiphilic poly(methyl methacrylate-co-methacrylic acid) copolymers”. **Journal of biomaterial science – polymer edition** (2001), vol. 12, iss. 4, pp. 429-450.

GIBANEL, S.; HEROGUEZ, V.; GNANOU, Y.; ARAMENDIA, E.; BUCSI, J.; FORCADA, A..”Monodispersed Polystyrene Latex Functionalized by the Macromonomer Technique. II. Application in Immunodiagnosis. **Polym. Adv. Technol.** 2001, 12, 494.

GIORDANENGO, R.; VIEL, S.; HIDALGO, M.; ALLARD-BRETON, B.; THÉVAND, A.; CHARLES, L.. “Structural characterization of a poly(methacrylic acid)–poly(methyl methacrylate) copolymer by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry”.2009. **Analytica Chimica Acta**, 654. Pg. 49–5.

GODDARD, J.M. AND HOTCHKISS, J.H.. “Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds”. **Progress in Polymer Science.** 32 (2007) 698–725.

GOKEL, G. W.. **Dean Handbook of organic chemistry.** 2nd edition. Washington, McGraw-Hill Handbooks. 2004.

GRDADOLNIK, J.; MARÉCHAL, Y.. “Bovine Serum Albumin Observed by Infrared Spectrometry. I. Methodology, Structural Investigation, and Water Uptake”. **Biopolymers (Biospectroscopy)**, Vol. 62, 40-53 (2001).

HAMIDI, M., SHAHBAZI, M-A., ROSTAMIZADEH, K. “Copolymers: Efficient Carriers for Intelligent Nanoparticulate Drug Targeting and Gene Therapy”. **Macromolecular Journal –Macromolecular Bioscience Review**. 2011. DOI: 10.1002/mabi.201100193.

HE, F.; WANG, Y.-P.; LIU, G.; JIA, H.-L.; FENG, J.; ZHUO, R.-X.. “Synthesis, characterization and ring-opening polymerization of a novel six-membered cyclic carbonate bearing pendent allyl ether group”. 2008. **Polymer**, 49. Pg. 1185-1190.

HECHT, L. L. *et al.* “Surfactant Concentration Regime in Miniemulsion Polymerization for the formation of MMA Nanodroplets by High-Pressure Homogenization”. **Langmuir**. 2011, 27, 2279-2285.

HERMANSON, GREG T. . **Bioconjugate Techniques**. 2nd Edition. Rockford, Illinois, USA. Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific. Elsevier Inc., 2008.

HOLZAPFEL, V.; MUSYANOVYCH1, A.; LANDFESTER1, K.; LORENZ, M. R.; MAILÄNDER, V.. “Preparation of Fluorescent Carboxyl and Amino Functionalized Polystyrene Particles by Miniemulsion Polymerization as Markers for Cells”. **Macromolecular Chemistry and Physics**, 2005. DOI: 10.1002/macp.200500372.

HORIE, K.; BARÓN, M.; FOX, R. B.; HE, J.; HESS, M.; *et al.* **Definitions of terms relating to reactions of polymers and to functional polymeric Materials**. IUPAC Recommendations, 2003. Pure Appl. Chem., Vol. 76, No. 4, pp. 889–906, 2004.

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Biomanguinhos. Website disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/perguntas-frequentes/227-o-que-sao-anticorpos-monoclonais>. Acessado em: fevereiro de 2013.

JANSSEN, R.Q.F.. **Polymer encapsulation of titanium dioxide: efficiency, stability and compatibility**. Ph.D. Dissertation, Eindhoven University of Technology. Holanda. 1995.

KANG, J. H.; TOITA, R.; TOMIYAMA, T.; OISHI, J.; ASAI, D.; MORI, T.; NIIDOME, T.; KATAYAMA, Y.. “Cellular signal-specific peptide substrate is essential for the gene delivery system responding to cellular signals”. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 2009. Doi: 10.1016/j.bmcl. 2009.09.034.

KIM, J.-H. & YOON, J.-Y. “Protein Adsorption on Polymer Particles”. **Encyclopedia of surface and colloid science**. 2002. pp. 4373-4381.

KIM, S.; KIM, J. H.; JEON, O.; KWON, I.C.; PARK, K.. “Engineered Polymers for Advanced Drug Delivery”. **NIH Public Access Author Manuscript. Eur J Pharm Biopharm**. Março, 2009.

LANDFERTER, K.. “Preparation of polymer and hybrid colloids by miniemulsion for biomedical applications” in: Elaïssari (Ed.). **Colloidal Polymers. Synthesis and Characterization**, Cap. 9. Surfactants Series, col. 115, Dekker, New York, 2003, pp. 225-243.

LAURENT, S.. “Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle”. *Chem. Rev.* 2011, 111, 3407–3432.

LI, P.; ZHU, J.; SUNINTABOON, P.; HARRIS, F. W.. “New Route to Amphiphilic Core–Shell Polymer Nanospheres: Graft Copolymerization of Methyl Methacrylate from Water-Soluble Polymer Chains Containing Amino Groups”. **Langmuir**. 2002, 18, 8641-8646.

LI, S.; HU, J.; LIU, B.. “A study on the adsorption behavior of protein onto functional microspheres”. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 80. 2005. 531-536.

LINDMAN, S.; LYNCH, I.; THULIN, E.; NILSSON, H.; DAWSON, K. A.; LINSE, S.. “Systematic Investigation of the Thermodynamics of HAS Adsorption to N-isopropylacrylamide/N-tert-Butylacrylamide Copolymer Nanoparticles. Effects of Particle Size and Hydrophobicity”. **Nano Letters**, 2007. Vol. 7, No.4, 914-920.

LORCA, B. S. D. 2012. **Desenvolvimento de Formulação Fotoprotetora contendo Nanopartículas Poliméricas com Filtro Solar**. Tese de Dsc. PEQ-COPPE, UFRJ. Rio de Janeiro-BR.

LUCENTE, A. G. B. 2008. **Estudo da copolimerização em mini emulsão de metacrilato de metila/metacrilato de etila**. Dissertação Msc. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas- SP.

MAHMOUDI. M.; AZADMANESH, K.; SHOKRGOZAR, M. A.; JOURNEYAY, W. S.. "Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle". 2011. **Chemical reviews**. 111(5): 3407-32.

MARCUCCI, F. ; LEFOULON, F.. "Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress". **Research focus – Reviews**. DDT Vol. 9, No. 5 Maech 2004.

MARK, J. E. **Polymer data handbook**. The Online Version. UK. Oxford university press. 1999. http://www.qmc.ufsc.br/~minatti/docs/20061/polymer_data_handbook.pdf .

MENDES, A. N. HUBBER, I., SIQUEIRA, M.; BARBOSA, G. M.; MOREIRA, D. L.; HOLANDINO, C.; PINTO, J. C.; NELE, M.. "Preparation and Cytotoxicity of Poly(Methyl Methacrylate) Nanoparticles for Drug Encapsulation". **Macromolecule Symposium**. 2012, 319, 34-40. "

microspheres

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURAY, J. C.. "Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Proctice". **Pharmacol Rev.** vol.53, Nº2, 2001.

MORENO-CASTILLA, C., "Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials". **Carbon**, 42: 83, 2004.

MORITA, T e ASSUMPÇÃO R. M. V.. Manual de soluções, reagentes e solventes. Editora Blucher. Segunda edição – 2007. Pg.302.

MOSSMAN, B.T.. "In vitro approaches for determining mechanisms of toxicity and carcinogenicity by asbestos in the gastrointestinal and respiratory tracts". **Environ Health Perspect**. 1983. 53:155-61.

MURPHY, E. A.; MAJETI, B. K.; MUKTHAVARAM, R.; ACEVEDO, L. M.; BARNES, L. A.; CHERESH, D. A.. "Targeted Nanogels: A Versatile Platform for Drug Delivery to Tumors". **Molecular Cancer Therapeutics** 10(6), Junho de 2011.

NOGUEIRA, D. de A. R.. 1999. **Adsorção de proteínas na superfície de biomateriais poliméricos**. Msc. Dissertação. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas-SP.

OLIVEIRA, M. A. M. 2011. **Produção de Micropartículas e Nanopartículas Poliméricas para Aplicações Biomédicas em Sistemas Heterogêneos de Polimerização**. Tese de Dsc. PEQ-COPPE, UFRJ. Rio de Janeiro-BR.

OLIVEIRA, M. A. M.; BOYER, C.; NELE, M.; PINTO, J. C.; ZETTERLUND, P. B.; DAVIS, T. P.. “Synthesis of Biodegradable Hydrogel Nanoparticles for Bioapplications Using Inverse Miniemulsion RAFT Polymerization”. **Macromolecules**. 2011, 44, 7167–7175.

OLIVIER, A.; MEYER, F.; RAQUEZ, J-M.; DAMMAN, P.; DUBOIS, P.. “Surface-initiated controlled polymerization as a convenient method for designing functional polymer brushes: From self-assembled monolayers to patterned surfaces”. **Progress in Polymer Science**. 2011.

ORÉFICE, Rodrigo Lambert . “Materiais Poliméricos: Ciência e Aplicação como Biomateriais”. In: Rodrigo Oréfice; Marivalda Pereira; Herman Mansur. (Org.). **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006, v. 1, p. 83-156.

ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZALEZ, D.; HIDALGO-À LVAREZ, R. “Comparative Studies on Physically Adsorbed and Chemically Bound IgG to Carboxylated Latexes, II”. **Colloid Interface Sci**. 1995, 176, 240.

PASUT, G., VERONESE, F.M. “Polymer–drug conjugation, recent achievements and general strategies”. **Progress in Polymer Science**. 32 (2007) 933–961.

PEULA-GARCIA, J.M.; HIDALDO-ALVAREZ R.; NIEVES, F.J. de las. “Protein coadsorption on different polystyrene latexes: electrokinetic characterization and colloidal stability”. **Colloid Polym. Sci**. 275 (1997) 198–202.

PICHOT, C.. “Surface-functionalized latexes for biotechnological applications.” **Current Opinion in COLLOID and INTERFACE SCIENCE**. 9, 2004; Pg 213-221.

PORPINO, K. K. P.. 2009. **Biossorção de Ferro (II) por casca de caranguejo *Ucides Cordatus***. Msc. Dissertação. UFPB, Paraíba, Brasil.

QIE, L.. 2011. **Performance Improvement of Latex-Based PSAs using Polymer Microstructure Control**. Dsc. Tese. Department of Chemical and Biological Engineering. University of Ottawa. Ottawa, Canada.

REVILLA, J.; ELAISSARI, A.; CARRIERE, P.; PICHOT, C. “Adsorption of Bovine Serum Albumin onto Polystyrene Latex Particles Bearing Saccharidic Moieties”. **Journal of colloid and interface science** 180, 405–412 (1996).

SCENIHR. “Base científica para a definição do termo "nanomaterial””. 2010. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_032.pdf. Acessado em: fevereiro de 2013.

SCHWAAB, M. E PINTO, J. C. “Optimum reparameterization of power function models.” **Chemical Engineering Science**. 63, 2008, pp. 4631 – 4635.

SIEGWART, D. J.; JUNG KWON, O.; MATYJASZEWSKI, K.. “ATRP in design of functional materials for biomedical applications.” **Progress in Polymers Science**. 2011. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.08.001.

SILVA, A. L. B. T.. **Estudo da dinâmica molecular em copolímeros em bloco compostos de poli(metacrilato de metila), poli(ácido acrílico) e poli(acrilato de chumbo) por técnicas de ressonância magnética nuclear e análise térmica**. 2009. Tese de Dsc. Pós-graduação Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo-BR.

SLOBODIAN, P.; SVOBODA, P.; RIHA, P.; BORUTA, R.; SAHA, P.. “Synthesis of PMMA-co-PMAA Copolymer Brush on Multi-Wall Carbon Nanotubes”. 2012. **Journal of Surface Engineered Materials and Advanced Technology**, 2. Pg. 221-226.

SOUTO-MAIOR, R. M.; TAVARES, M. I. B.; MONTEIRO, E.E.C.. “Solid State ¹³C NMR Study of Methyl Methacrylate-Methacrylic Acid Copolymers”. **Ann. Magn. Reson.** Vol. 4, Issue 3, 69-72, 2005.

STRANDMAN, S. "Supramolecular assemblies of amphiphilic PMMA-block-PAA stars in aqueous solutions". 2006. *Polymer*, 47. Pgs. 6524-6535.

TIAN, H.; TANG, Z.; ZHUANG, X.; CHEN, X.; JING, X.. "Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application". **Progress in Polymer Science**. 2011. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004.

TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. "A study of some variables in tetrazolium dye (MTT) based assay for growth and chemosensitivity". **Br. J. Cancer** (1987), 56, 279-285.

WANG, N.X.; VON RECUM, H.A.. "Affinity-Based Drug Delivery", **Macromolecular Bioscience** – Review. 2011,11, pg.321-332. DOI: 10.1002/mabi.201000206.

WANGA M., THANOUA, M. B. "Targeting nanoparticles to cancer: Review". 2010. **Pharmacological Research**, 62. Pg. 90–99.

WOLF, H. K. de; WOLF, H.K.; LUTEN, J.; SNEL, C. J.; STORM, G.; HENNINK, W. E.. "Biodegradable, Cationic Methacrylamide-Based Polymers for Gene Delivery to Ovarian Cancer Cells in Mice". **Mol. Pharmaceutics**, 2008, 5 (2), pp 349–357.DOI: 10.1021/mp700108r.

YAMAJI, T. *et al.* **Spectral Database for Organic Compounds, SDDBS**. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan. Disponível em: <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/>. Acessado em 15-01-2013.

YOO H. S.; PARK T. G.. "Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles". **J Controlled Release** 2004;96:273-83.

YOON, J.Y.; KIM, J.H.; KIM, W.S.."Interpretation of protein adsorption phenomena onto functional". 1998. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 12, 15–22.

ZANCAN, P., SOLA-PENNA, M.,FURTADO, C.M., SILVA, D.D. "Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells". **Molecular Genetic and Metabolism**, 2010. 100: 372-378.

ZIEGLER, A., LANDFESTER, K; MUSYANOVYCH, A.. “Synthesis of phosphonate-functionalized polystyrene and poly(methyl methacrylate) particles and their kinetic behavior in miniemulsion polymerization”. **Colloid Polym Sci** (2009) 287:1261–1271.

APÊNDICE I – Equacionamento para cálculos teóricos

Cálculo da massa de surfactante livre para formação de micelas

$$M'_s = M_s^0 - M_s^{ad} \quad \text{Equação 0-1}$$

$$M_s^{ad} = \frac{A_{total}}{a_s} = \frac{6 \cdot M}{\rho \cdot d \cdot a_s} \quad \text{Equação 0-2}$$

$$a_s^* = \frac{6 \cdot \varphi}{\chi_{3,2} \cdot \rho_{MMA} \cdot C_{sds} \cdot k} \quad \text{Equação 0-3}$$

$$a_s = \frac{6 \cdot 0,35}{324,18 \cdot 0,94 \cdot 0,0035 \cdot 0,8} = 2,46 \cdot 10^3 \frac{m^2}{g}$$

$$M_s^{ad} = \frac{6 \cdot 32}{94 \cdot 10^4 \cdot 324,18 \cdot 10^{-9} \cdot 2,46 \cdot 10^3} = 0,2561 \text{ g de SDS}$$

$$M'_s = 0,32 - 0,2561 = 0,0639 \text{ g}$$

$$C'_s = \frac{M'_s}{Vol_{\text{água}}} = \frac{0,0639}{58} = 1,10 \cdot 10^{-3} \frac{g}{ml} < CMC_{SDS} = 2,36 \cdot 10^{-3} \frac{g}{ml}$$

onde: M'_s = Massa de surfactante disponível para formar micela; M_s^0 = Massa de surfactante alimentada = 0,32g; M_s^{ads} = Massa de surfactante adsorvido na interface; A_{total} = Área total das gotículas de monômero; M = Massa de monômero alimentada = 32g; ρ = Volume específico do monômero = 0,94 g/cm³; d = diâmetro médio de gota = 324,18 nm; a_s = área ocupada pelo surfactante/ eficiência de cobertura [m²/gsurf]; φ = fração da fase orgânica = 0,35; $\chi_{3,2}$ = diâmetro médio de Sauter = 324,18 nm; C_{sds} = concentração de SDS em massa do total = 0,0035; k = fator de correlação que leva em conta a concentração dissolvida no meio contínuo = 0,8*; Vol_{H_2O} = volume de água = 58mL

* Hecht, L. L. *et al.* (2011)

Cálculo da Tg dos copolímeros

Média 01: $Tg = (1 - \omega) \times Tg1 + \omega \times Tg2$

Média 02: $\ln\left(\frac{Tg}{Tg2}\right) = \frac{(1-\omega) \times \ln\left(\frac{Tg1}{Tg2}\right)}{\omega \times \left(\frac{Tg1}{Tg2}\right) + (1-\omega)}$

Média 03: $\frac{1}{Tg} = \frac{(1-\omega)}{Tg1} + \frac{\omega}{Tg2}$

Média 04: $\ln(Tg) = \omega \times \ln(Tg1) + (1 - \omega) \times \ln(Tg2)$

ω_i = fração em massa do monômero;
 Tg = temperatura de transição vítrea do copolímero;
 Tgi = temperatura de transição vítrea do homopolímero i.

Polímero	Tg copolímero calculada (°C)									
	Eq. 01		Eq. 02		Eq. 03		Eq. 04		Média	
	PP	PBO	PP	PBO	PP	PBO	PP	PBO	PP	PBO
PMMA-co-PHEMA	116,2	114,5	113,1	113,3	115,3	113,7	115,8	114,1	115,1	113,9
PMMA-co-PDMAEMA	111,5	109,9	65,0	65,7	86,7	85,8	104,2	102,8	91,9	91,0
PMMA-co-PAMA	126,2	124,5	119,6	119,6	122,6	120,8	124,1	122,3	123,1	121,8
PMMA-co-PAA	116,5	114,9	113,9	114,1	116,0	114,4	116,3	114,6	115,7	114,5
PMMA-co-PMAM	112,9	111,2	94,5	95,0	103,5	102,2	109,5	108,0	105,1	104,1
PMMA-co-PMAM	112,9	111,2	94,5	95,0	103,5	102,2	109,5	108,0	105,1	104,1

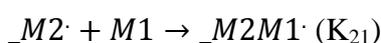
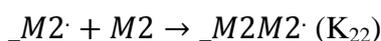
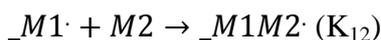
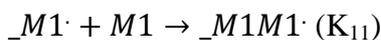
Polímero		Tg ⁽²⁾ homopolímero (°C)
PMMA ⁽¹⁾	PBO	117,25
	PP	116,7
PMMA-co-PHEMA		85
PMMA-co-PDMAEMA		19
PMMA-co-PAMA		228
PMMA-co-PAA		75-106
PMMA-co-PMAM		38,5

(1) Calculada por ensaio em DSC.

(2) BRANDRUP, IMMERGUT e GRULKE (2005).

Cálculo do % de comonômero incorporado

Modelo:



Equações:

$$r_1 = \frac{K_{11}}{K_{12}} \quad r_2 = \frac{K_{22}}{K_{21}} \quad F_0 = \frac{d[m_1]}{d[m_2]} = \frac{[m_1] \times (r_1 \times [m_1] + [m_2])}{[m_2] \times (r_2 \times [m_2] + [m_1])} = \frac{m_1}{m_2}$$

Onde: 1=MMA; 2= comonômero; M=monômero; $_M1\cdot$ = Cadeia em crescimento cujo último monômero incorporado foi 1; $_M2\cdot$ = Cadeia em crescimento cujo último monômero incorporado foi 2; K_{ij} = constante cinética da reação; r = razão de reatividade = preferência entre homopolimerização e copolimerização; F_0 = razão de inserção dos monômeros no tempo zero estacionário; $[m_i]$ = concentração molar do monômero i ; m_i = concentração molar do mero i no copolímero.

Monômero	Razão de Reatividade		[mi] mol/L		% comonômero incorporado
	r_I	r_{II}	[m1]	[m2]	
MMA (I)	-	-	-	-	-
HEMA	0,75	1,5	8,77	0,513	7,80%
DMAEMA	0,699	1,2	8,77	0,42	6,80%
AMA	0,63	0,25	8,83	0,72	12,70%
AA	0,418	1,73	8,84	0,924	23,60%
MAM	1,27	1,57	8,87	0,79	7,40%

Cálculo da área específica média e concentração de proteína para adsorção de uma monocamada

Supondo que as partículas fabricadas sejam esféricas e usando o diâmetro (d) médio de gotas medido por espalhamento de luz, os cálculos de área seguiram o seguinte equacionamento:

$$\text{Área da esfera} = \pi \times d^2$$

$$\text{Volume da esfera} = \pi \times \frac{d^3}{6}$$

$$A_{\text{total}} = n^{\circ} \text{ partículas} \times \text{área de uma partícula}$$

$$n^{\circ} \text{ de partículas} = \frac{\text{volume total de monômero}}{\text{volume de uma esfera (gota)}} = \frac{\text{massa de monômero}}{\rho_{\text{monômero}}} \times \frac{6}{\pi \times d^3}$$

$$A_{\text{total}} = \frac{6 \times \text{massa de monômero}}{\rho_{\text{monômero}} \times \pi \times d^3} \times \pi \times d^2 = \frac{6 \times \text{massa de monômero}}{\rho_{\text{monômero}} \times d}$$

Para o cálculo da concentração de BSA utilizada baseada na saturação da superfície (monocamada), foi utilizada a área calculada acima conforme os cálculos abaixo, supondo uma conformação esférica da proteína:

$$\text{diâmetro}_{BSA} = 7\text{nm}$$

$$\text{Área}_{BSA} = 3,85 \times 10^{-17} \text{m}^2$$

$$n^{\circ}_{BSA} = n^{\circ} \text{ de moléculas de BSA para monocamada} = \frac{A_{\text{total}}}{\text{Área}_{BSA}}$$

$$\text{Concentração}_{BSA} = \frac{n^{\circ}_{BSA} \cdot \text{Massa Molar}_{BSA}}{n^{\circ} \text{ de Avogadro} \cdot \text{Volume da solução}}$$

APÊNDICE II – Gráficos complementares

Espectros de Infravermelho

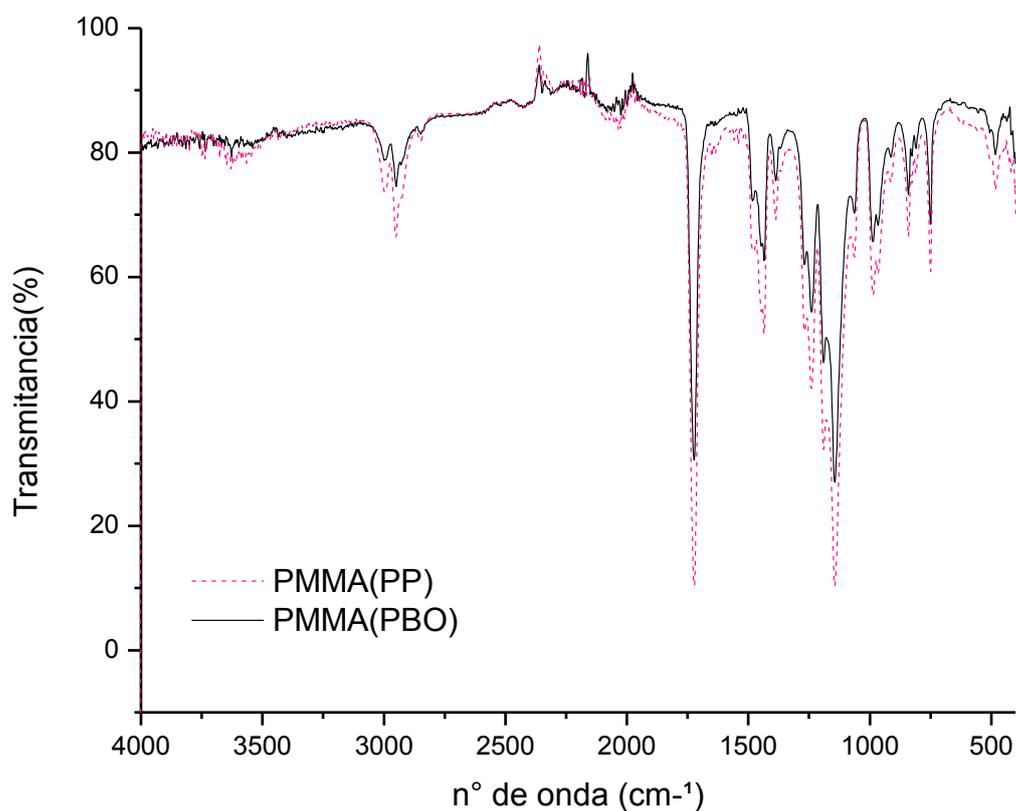


Figura AII.1 – Espectros de infravermelho comparativos para homopolímero de PMMA para diferentes iniciadores.

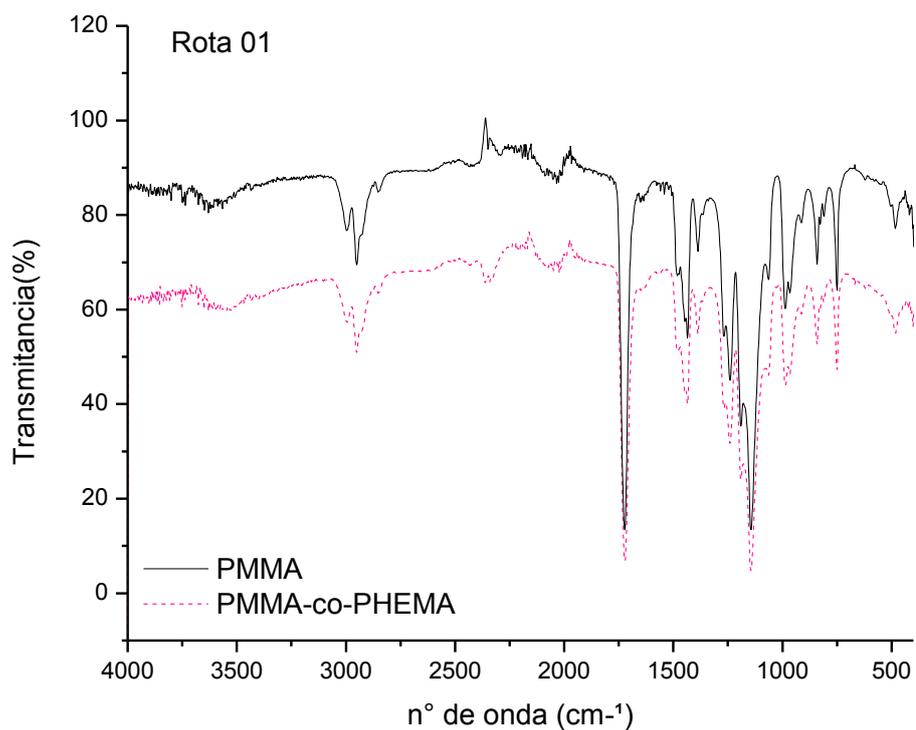


Figura AII.2 – Espectros de infravermelho comparativos entre o PMMA e o copolímero com PHEMA, com iniciador PP.

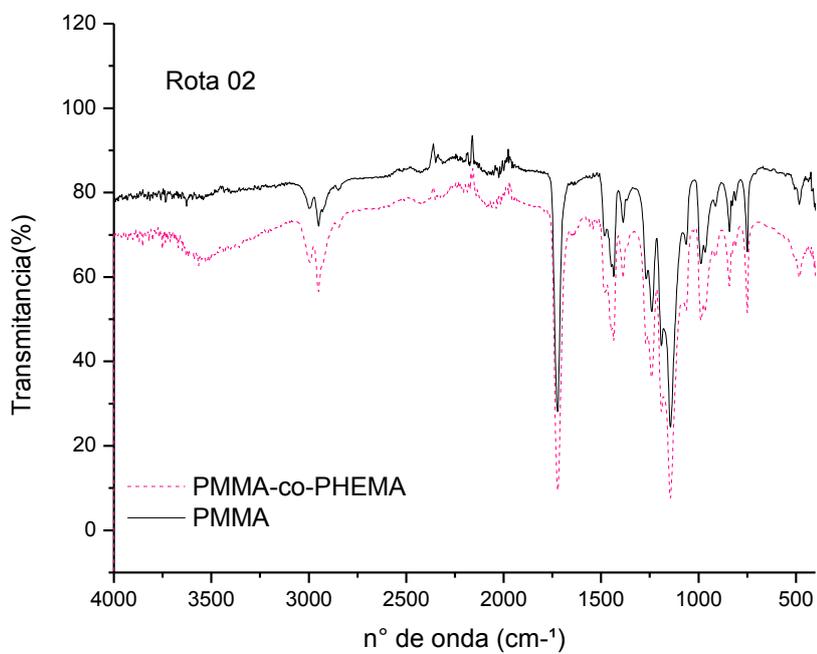


Figura AII.3 – Espectros de infravermelho comparativos entre o PMMA e o copolímero com PHEMA, com iniciador PBO.

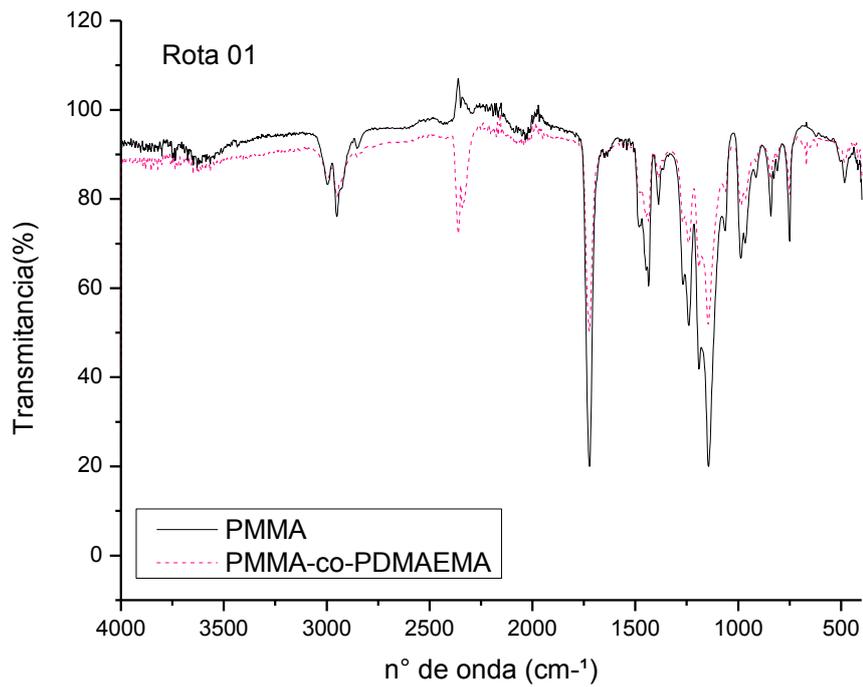


Figura AII.4 – Espectros de infravermelho comparativos entre o PMMA e o copolímero com PDMAEMA, com iniciador PP.

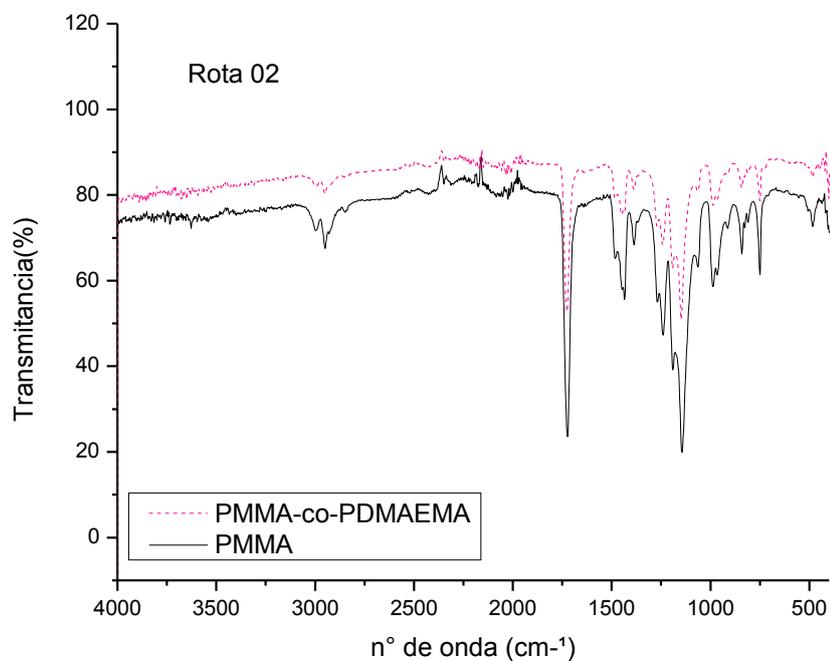


Figura AII.5 – Espectros de infravermelho comparativos entre o PMMA e o copolímero com PDMAEMA, com iniciador PBO.

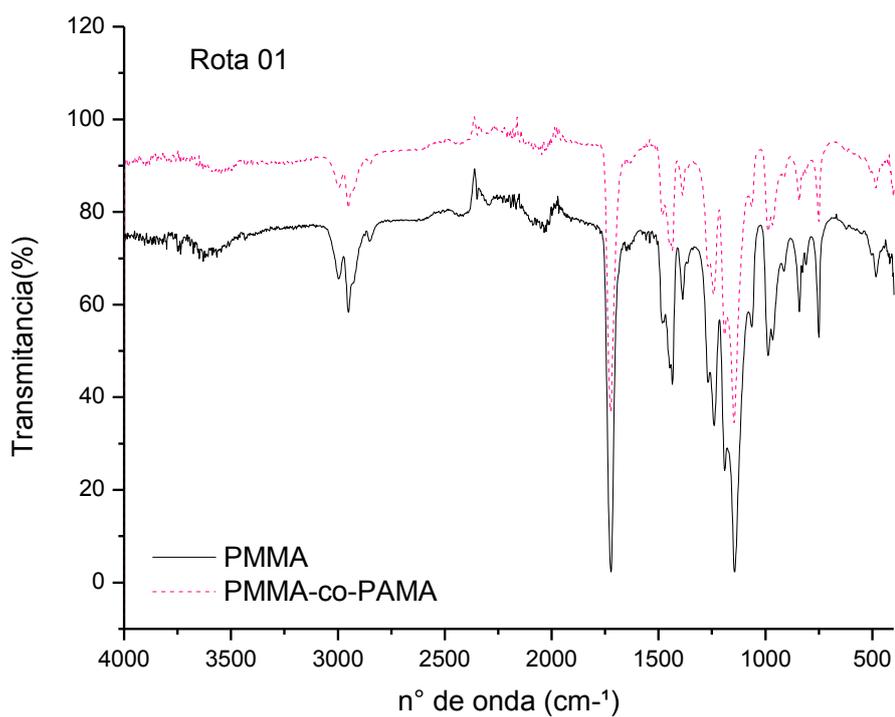


Figura AII.6 – Espectros de infravermelho comparativos entre o PMMA e o copolímero com PAMA, com iniciador PP.

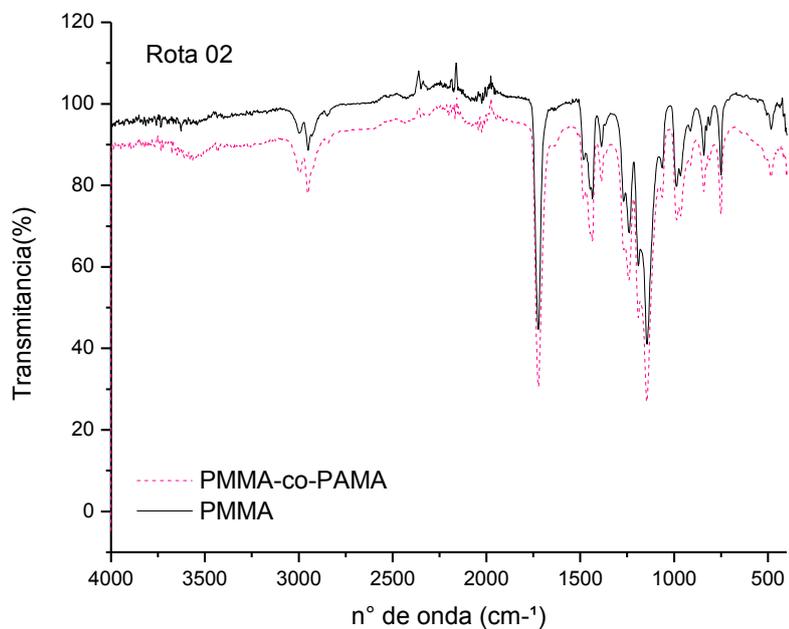


Figura AII.7 – Espectros de infravermelho comparativos entre o PMMA e o copolímero com PAMA, com iniciador PBO.

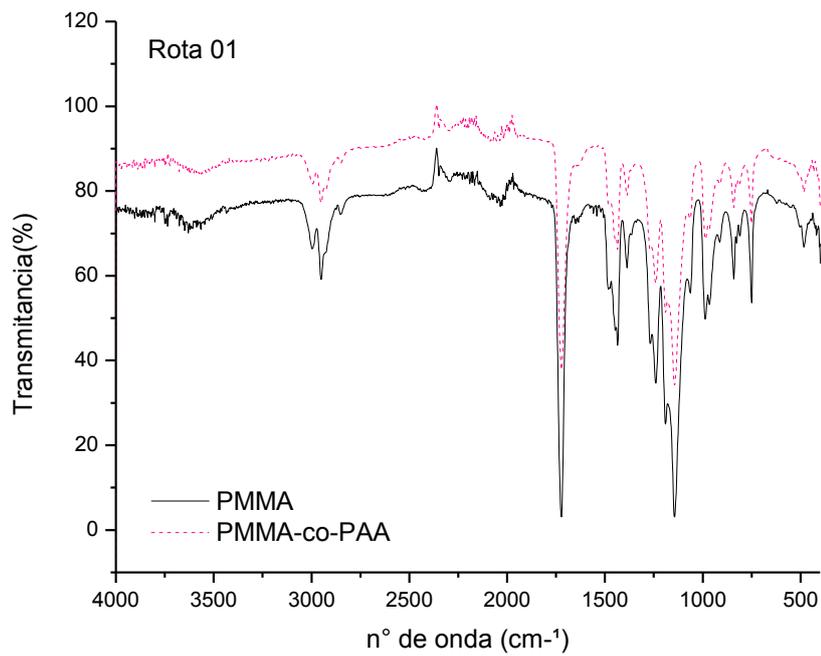


Figura AII.8 – Espectros de infravermelho comparativos entre o PMMA e o copolímero com PAA, com iniciador PP.

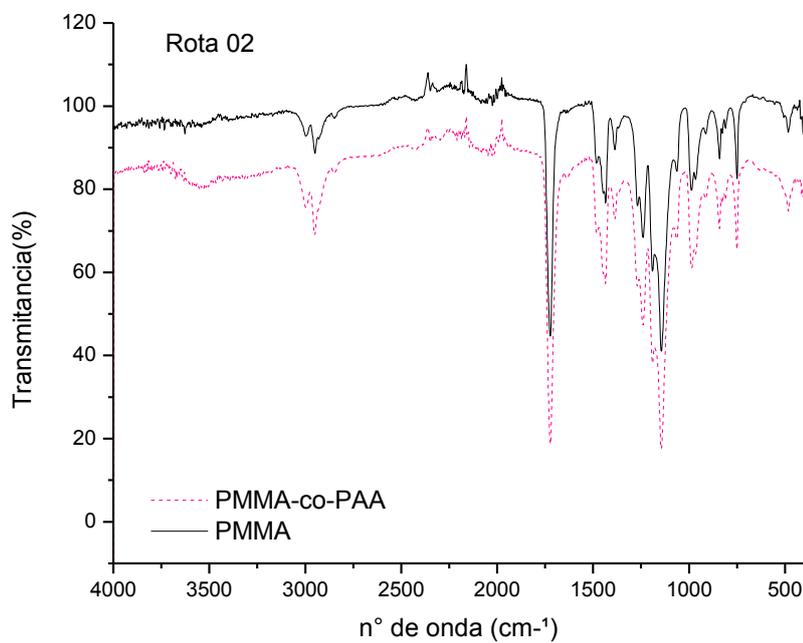


Figura AII.9 – Espectros de infravermelho comparativos entre o PMMA e o copolímero com PAA, com iniciador PBO.

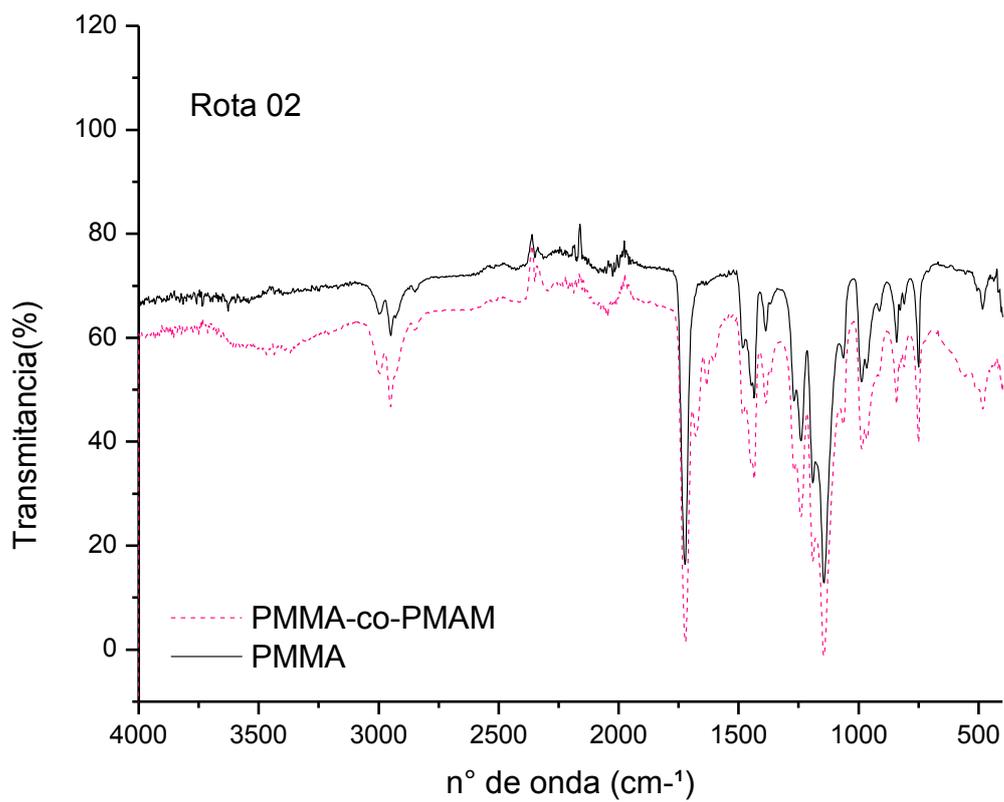


Figura AII.10 – Espectros de infravermelho comparativos entre o PMMA e o copolímero com PMAM, com iniciador PBO.

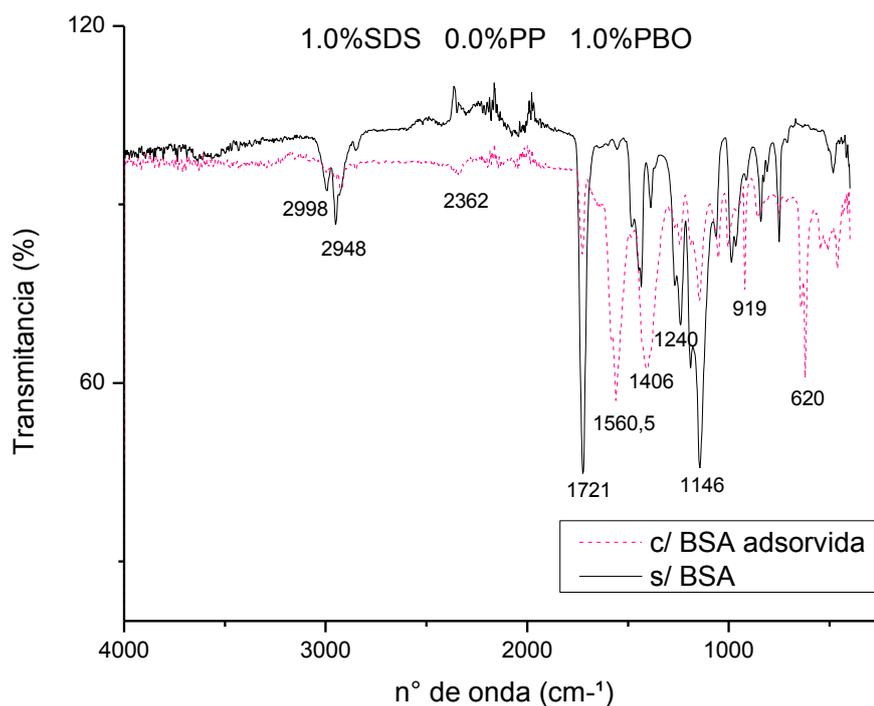


Figura AII.11 – Espectros de infravermelho comparativos para nanopartícula de PMMA antes e após adsorção (composição: 1,0%SDS,0,0%PP,1,0%PBO).

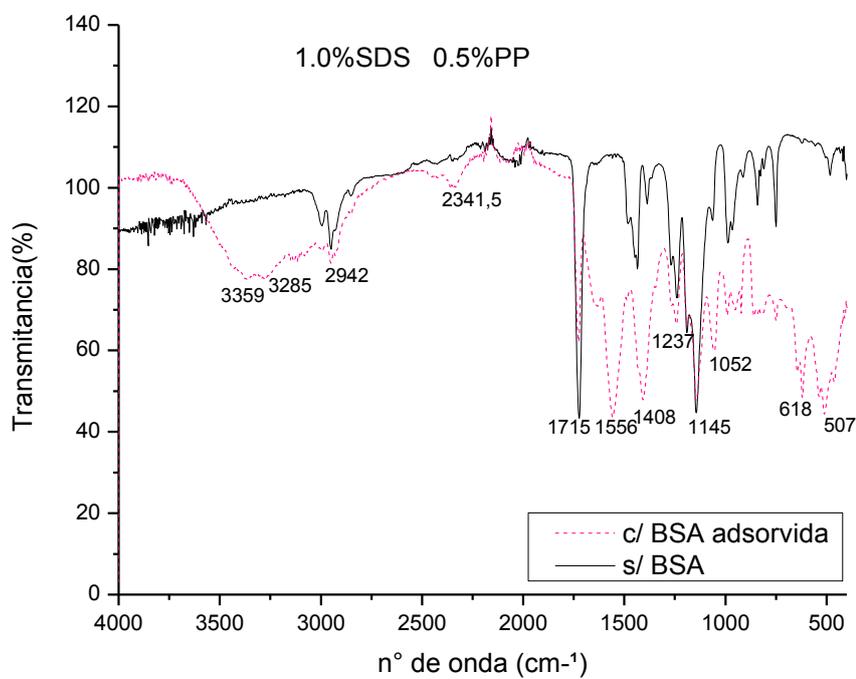


Figura AII.12 – Espectros de infravermelho comparativos para nanopartícula de PMMA antes e após adsorção (composição: 1,0%SDS,0,5%PP).

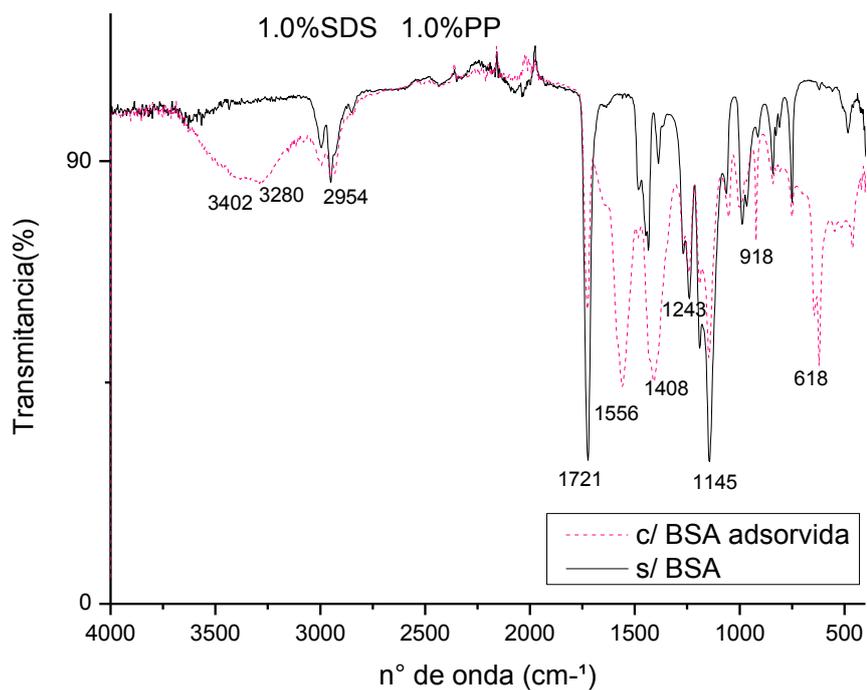


Figura AII.13 – Espectros de infravermelho comparativos para nanopartícula de PMMA antes e após adsorção (composição: 1,0%SDS,1,5%PP).

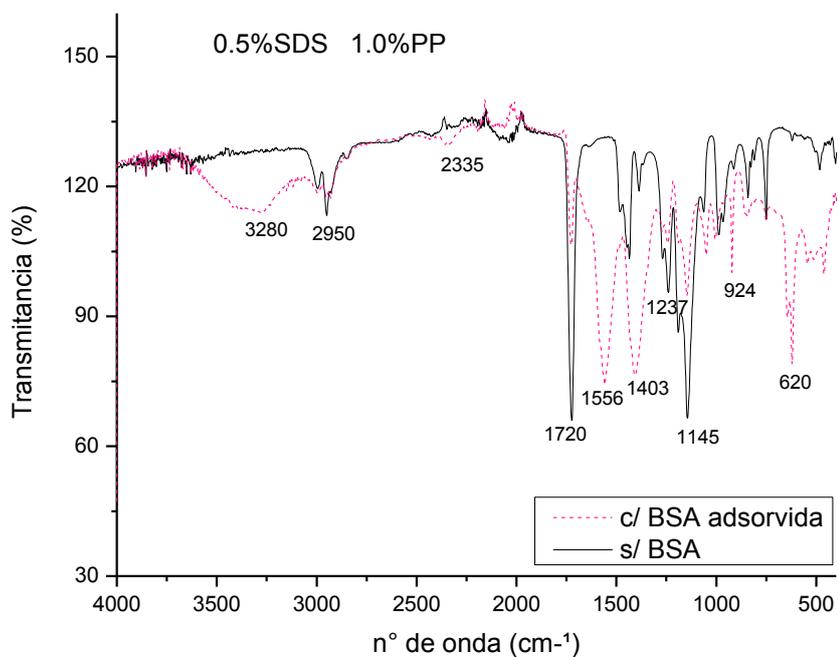


Figura AII.14 – Espectros de infravermelho comparativos para nanopartícula de PMMA antes e após adsorção (composição: 0,5%SDS,1,0%PP).

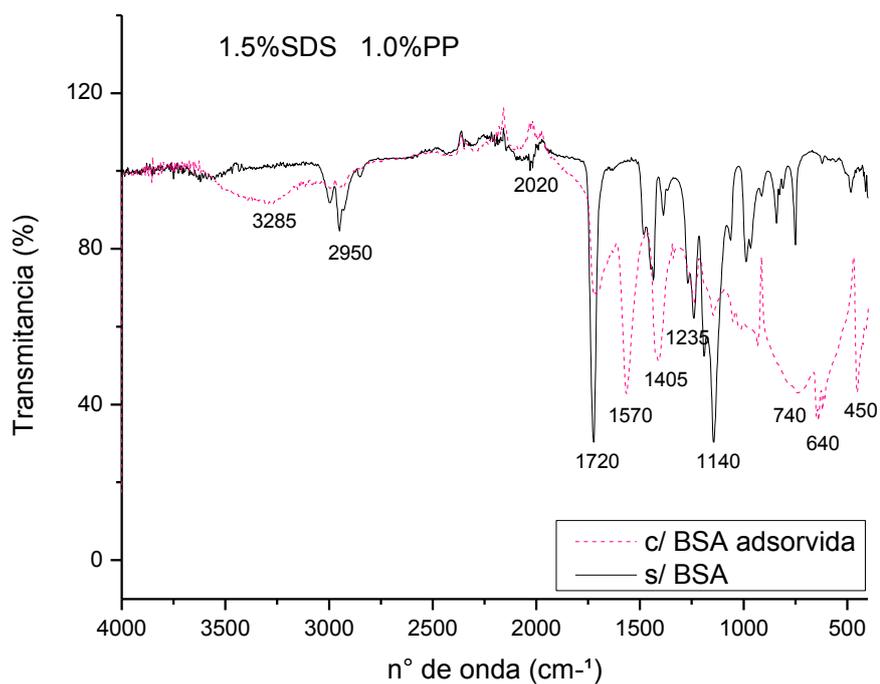


Figura AII.15 – Espectros de infravermelho comparativos para nanopartícula de PMMA antes e após adsorção (composição: 1,5%SDS,1,0%PP).

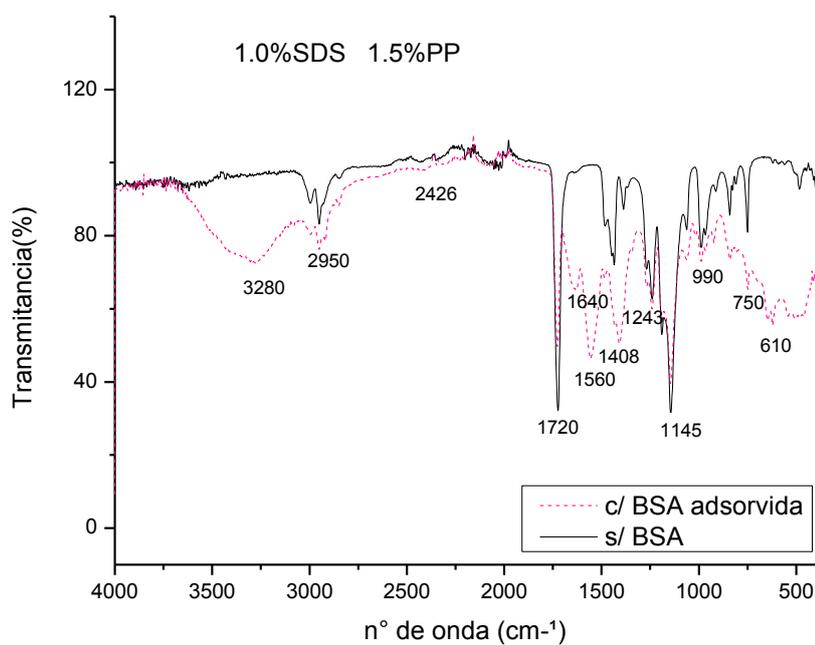


Figura AII.16 – Espectros de infravermelho comparativos para nanopartícula de PMMA antes e após adsorção (composição: 1,0%SDS,1,5%PP).

Espectros de RMN

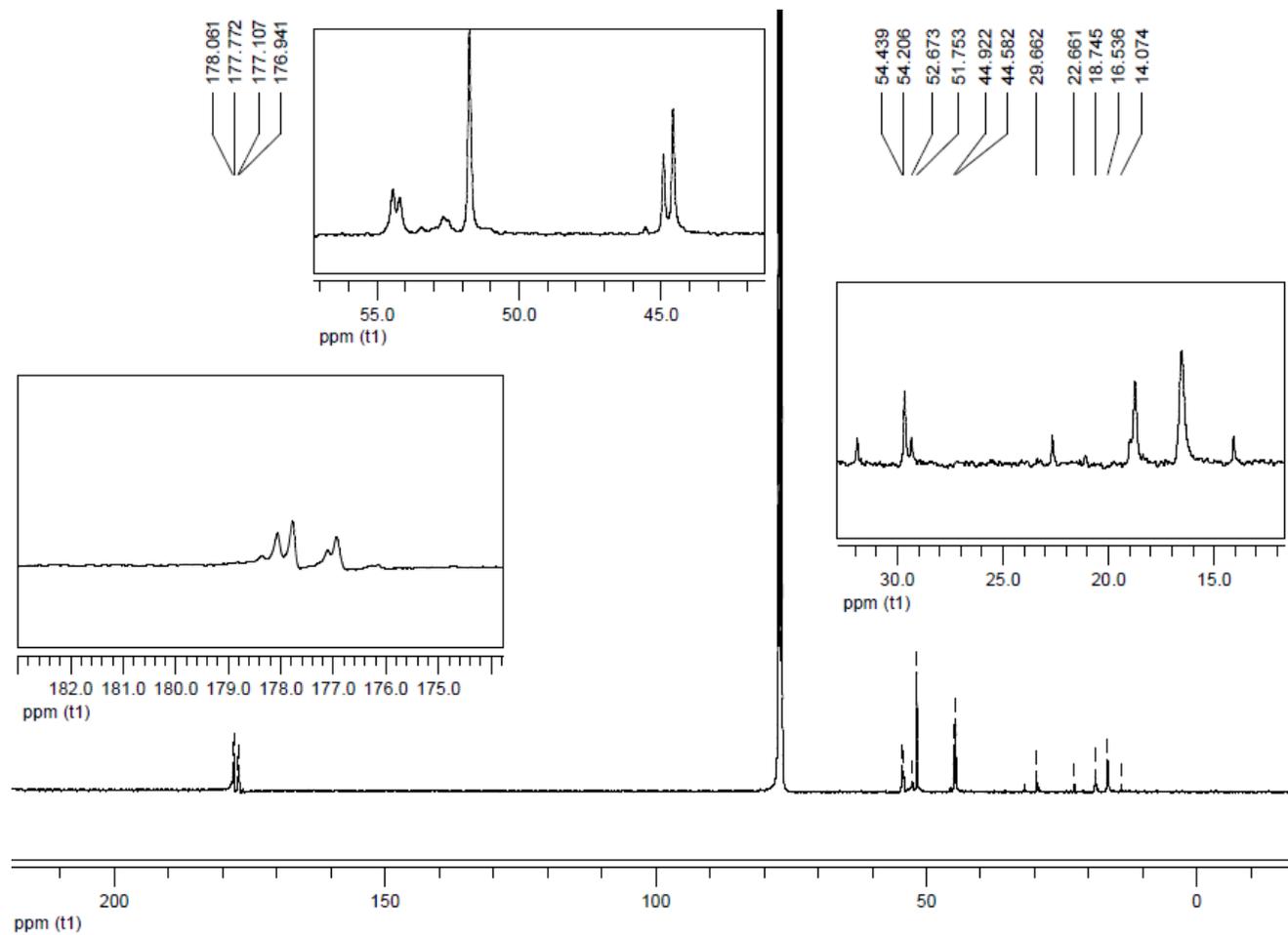


Figura AII.17 – Espectros de C-RMN do PMMA

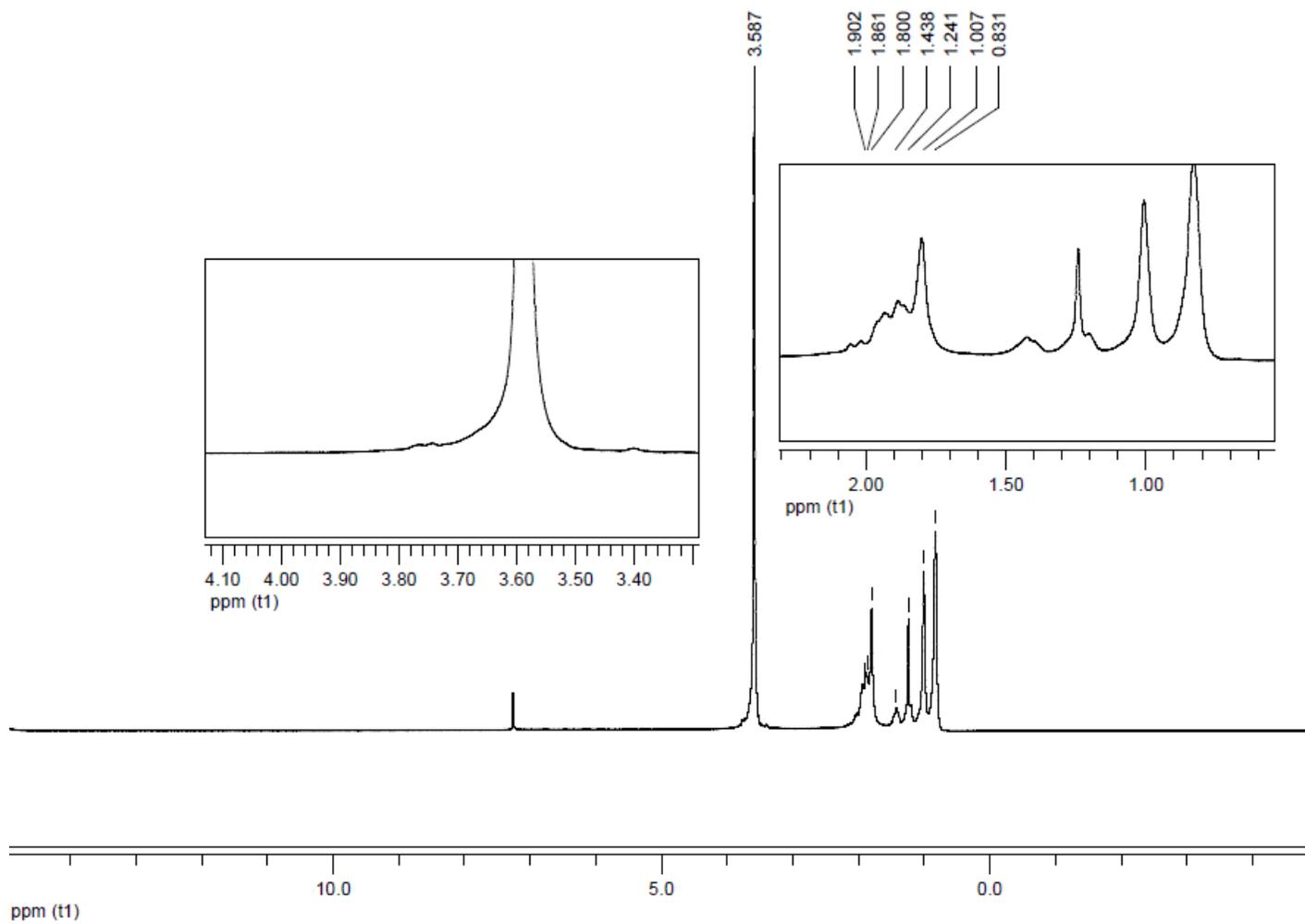


Figura AII.18 – Espectros de H-RMN do PMMA

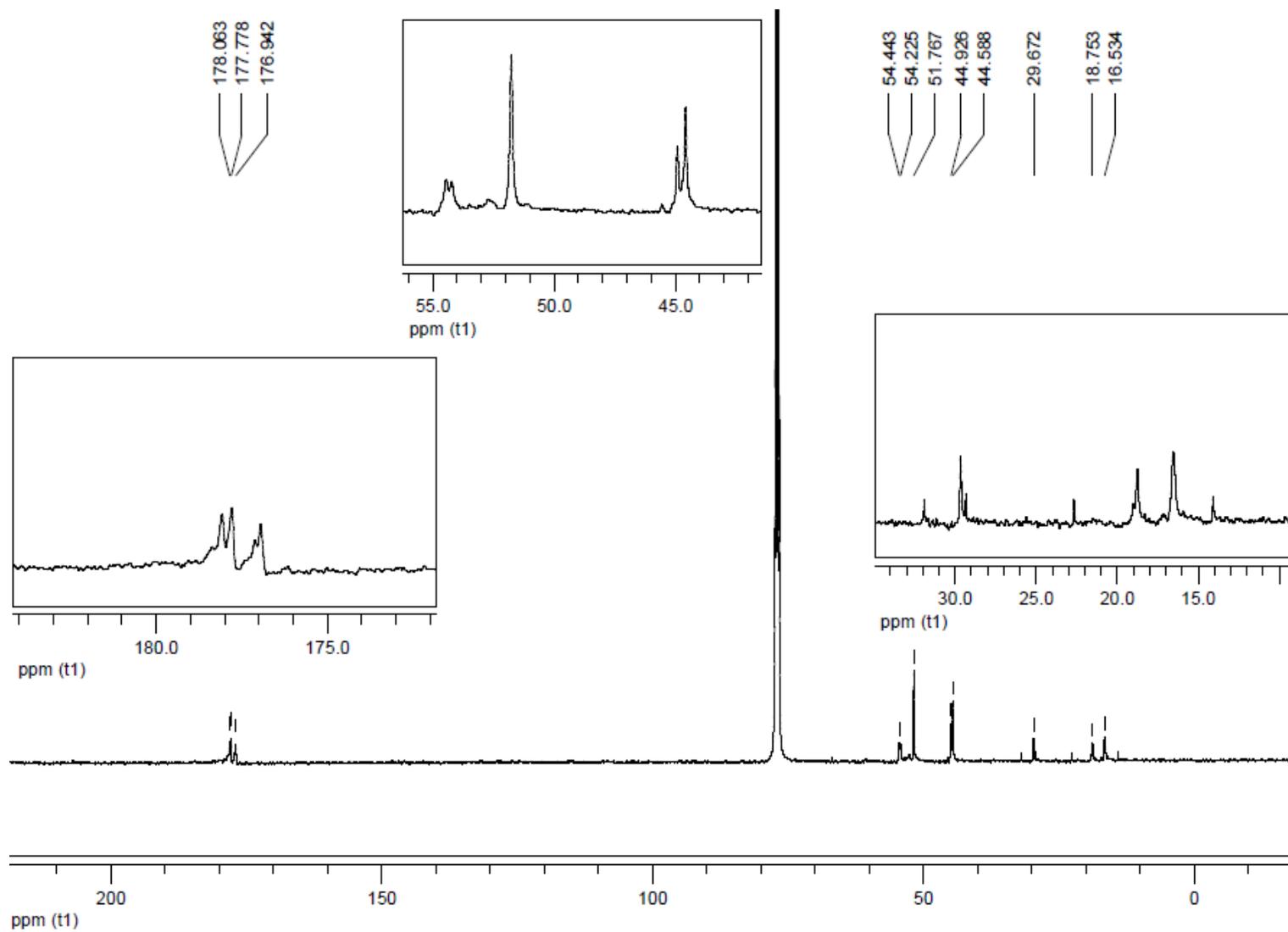


Figura AII.19 – Espectros de C-RMN do PMMA-co-PHEMA.

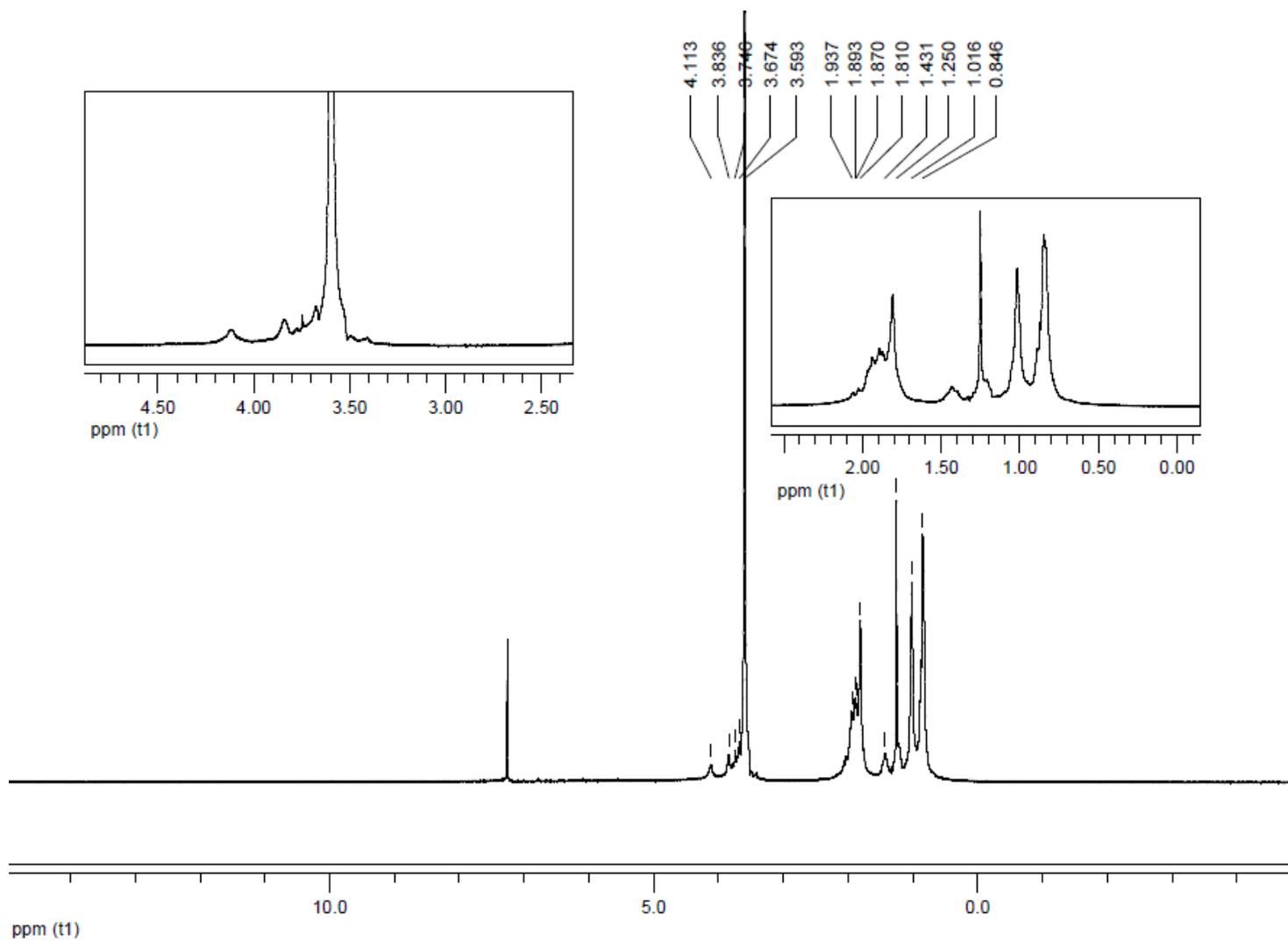


Figura AII.20 – Espectros de H-RMN do PMMA-co-PHEMA.

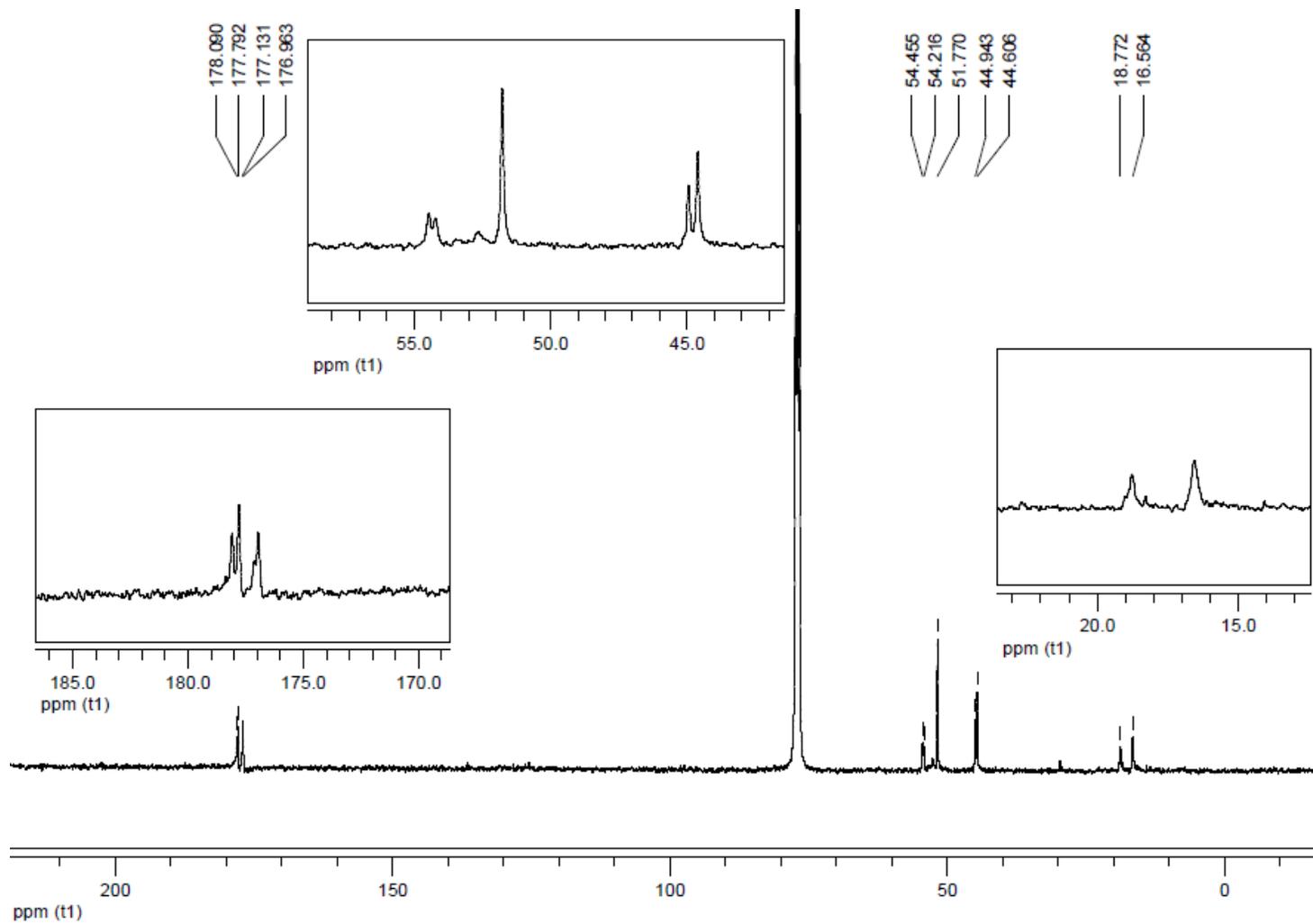


Figura AII.21 – Espectros de C-RMN do PMMA-co-PDMAEMA.

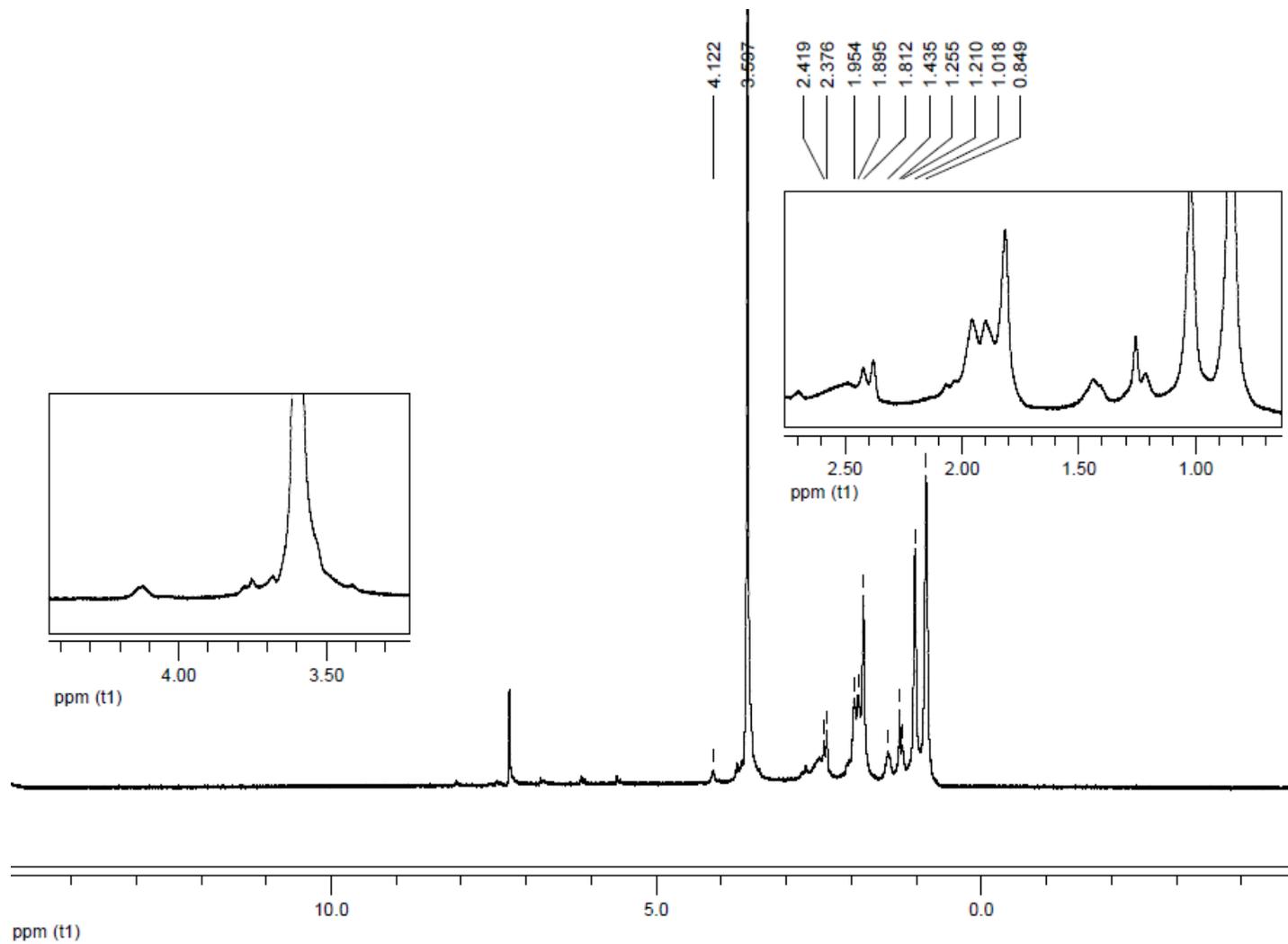


Figura AII.22 – Espectros de H-RMN do PMMA-co-PDMAEMA.

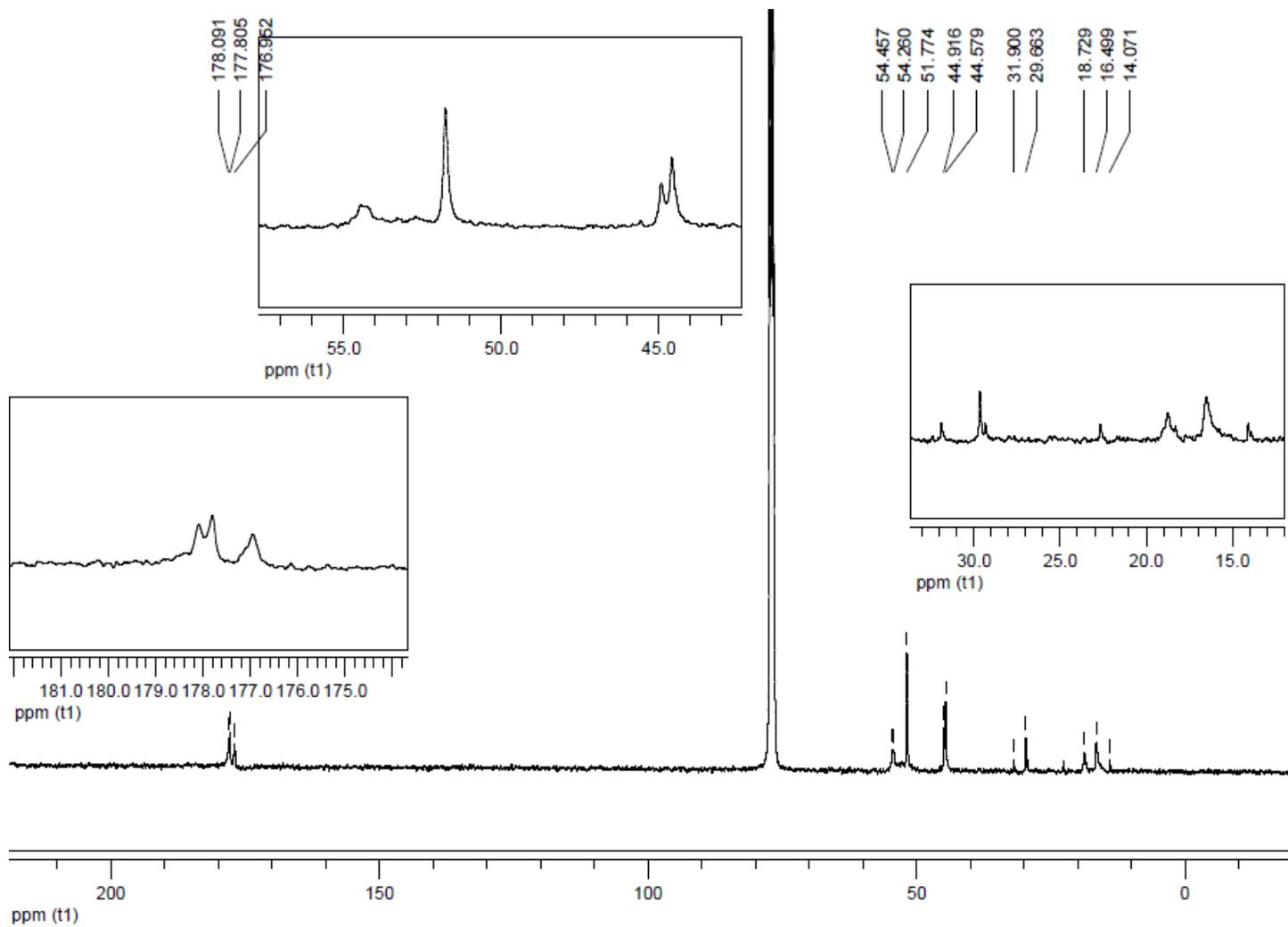


Figura AII.23 – Espectros de C-RMN do PMMA-co-PMAM.

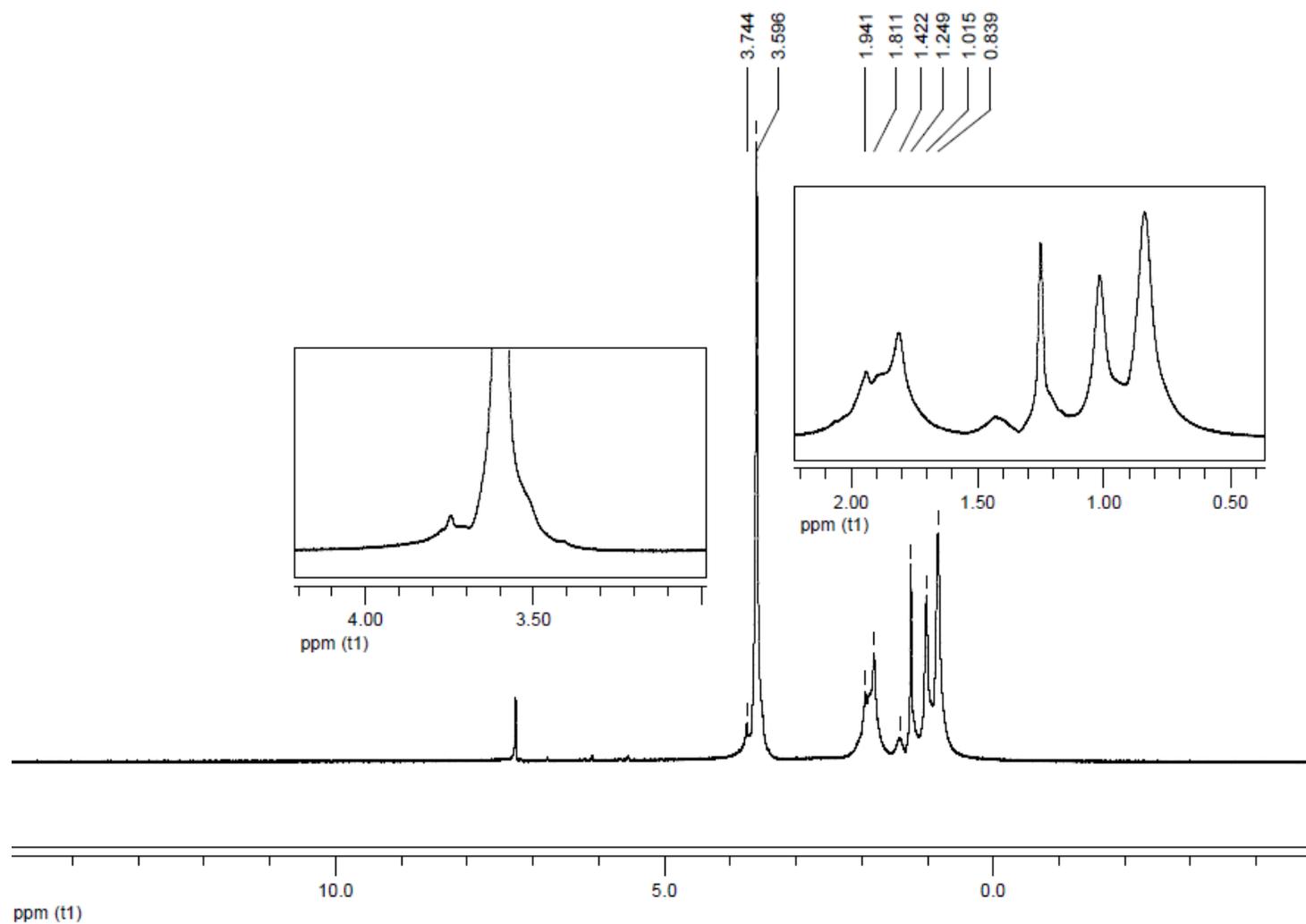


Figura AII.24 – Espectros de H-RMN do PMMA-co-PMAM.

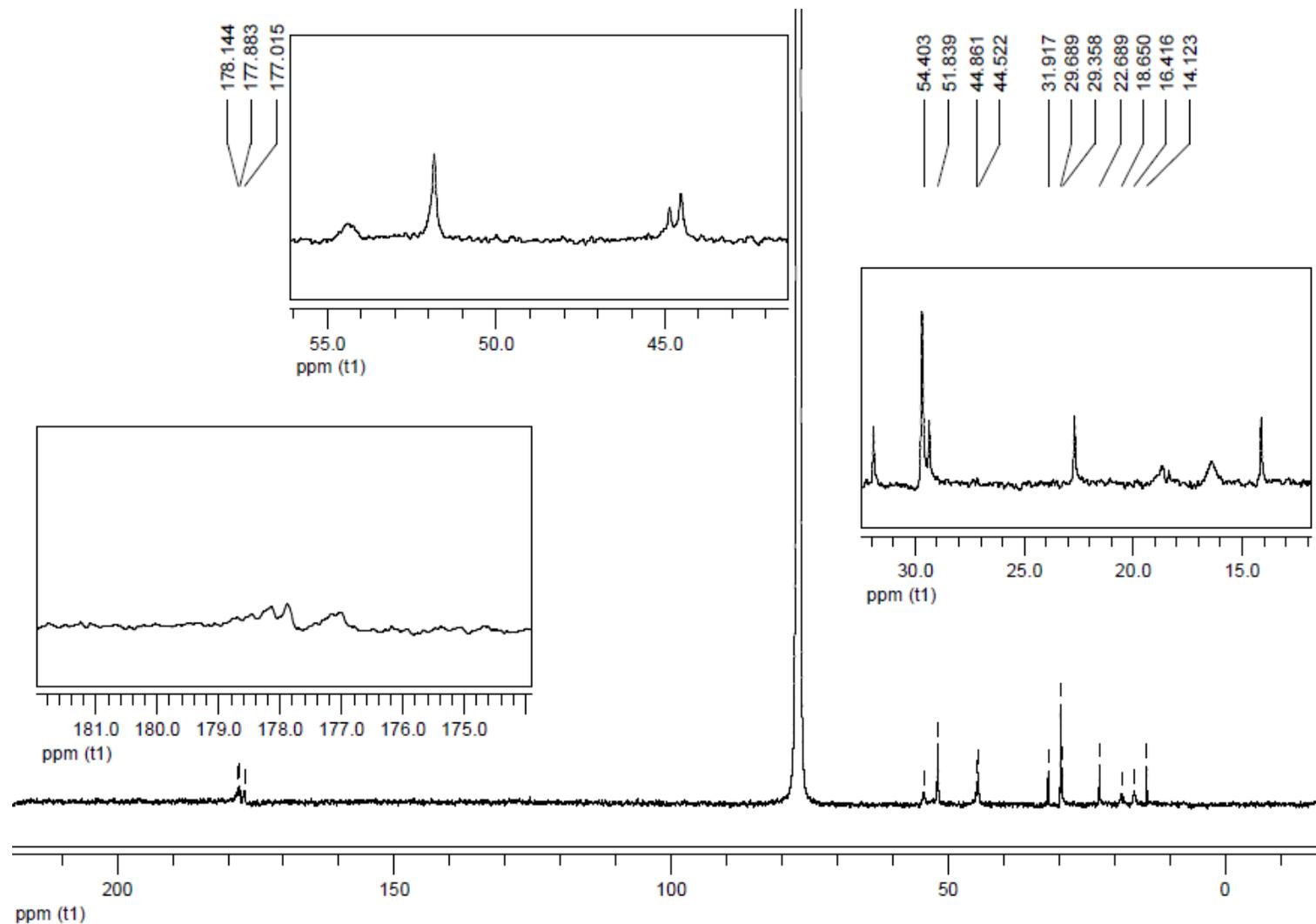


Figura AII.25 – Espectros de C-RMN do PMMA-co-PAA.

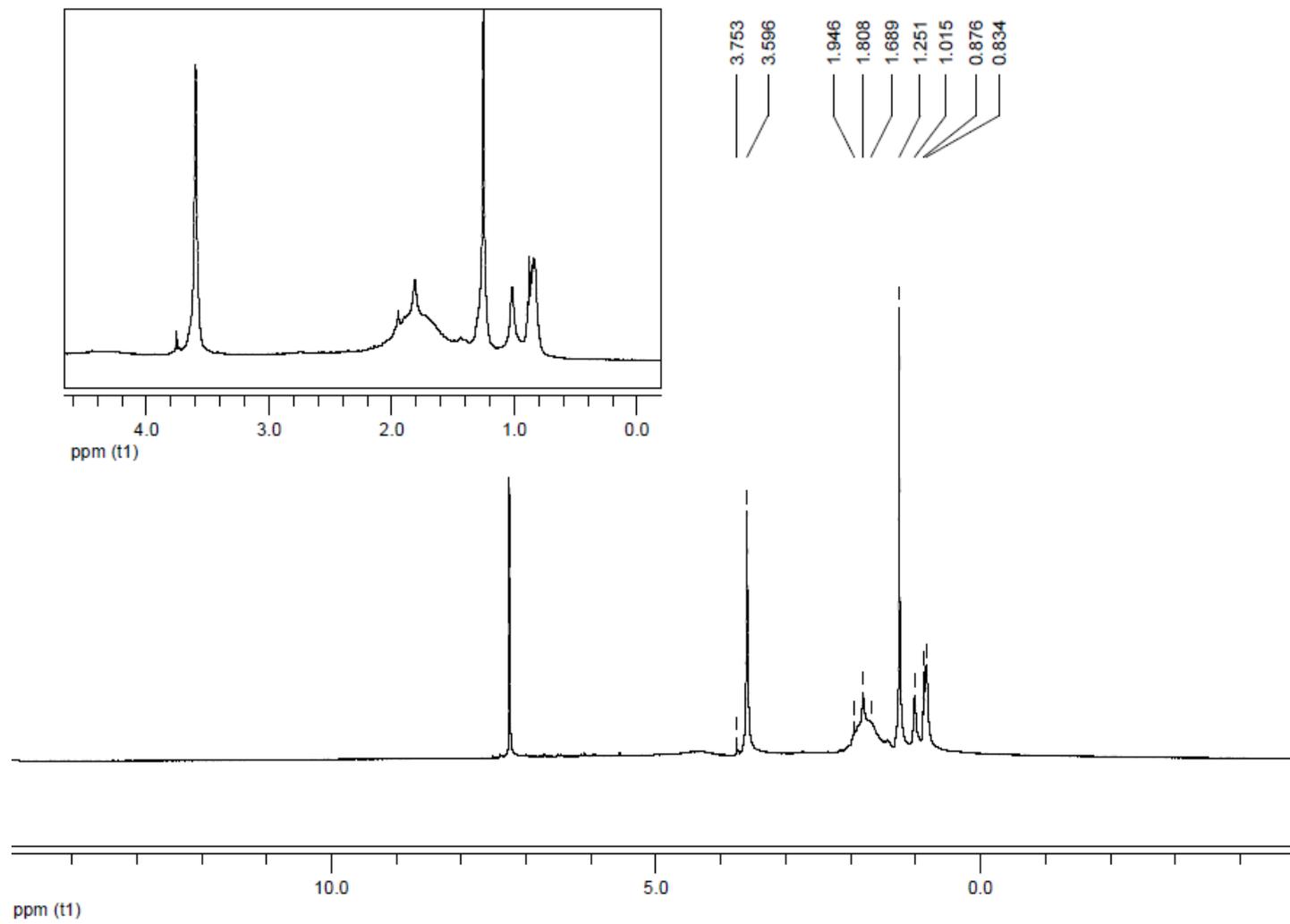


Figura AII.26 – Espectros de H-RMN do PMMA-co-PAA.

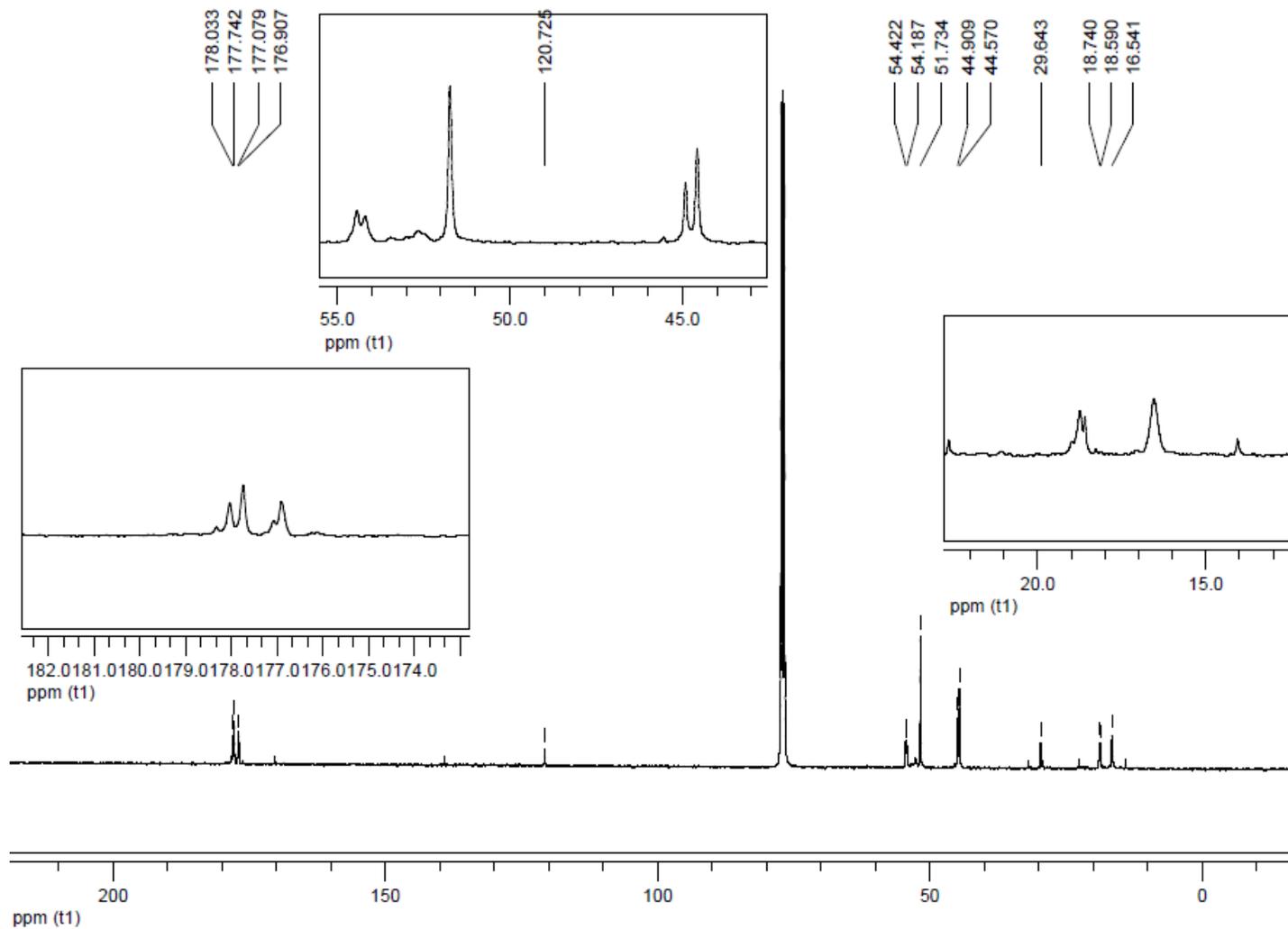


Figura AII.27 – Espectros de C-RMN do PMMA-co-PMAM.

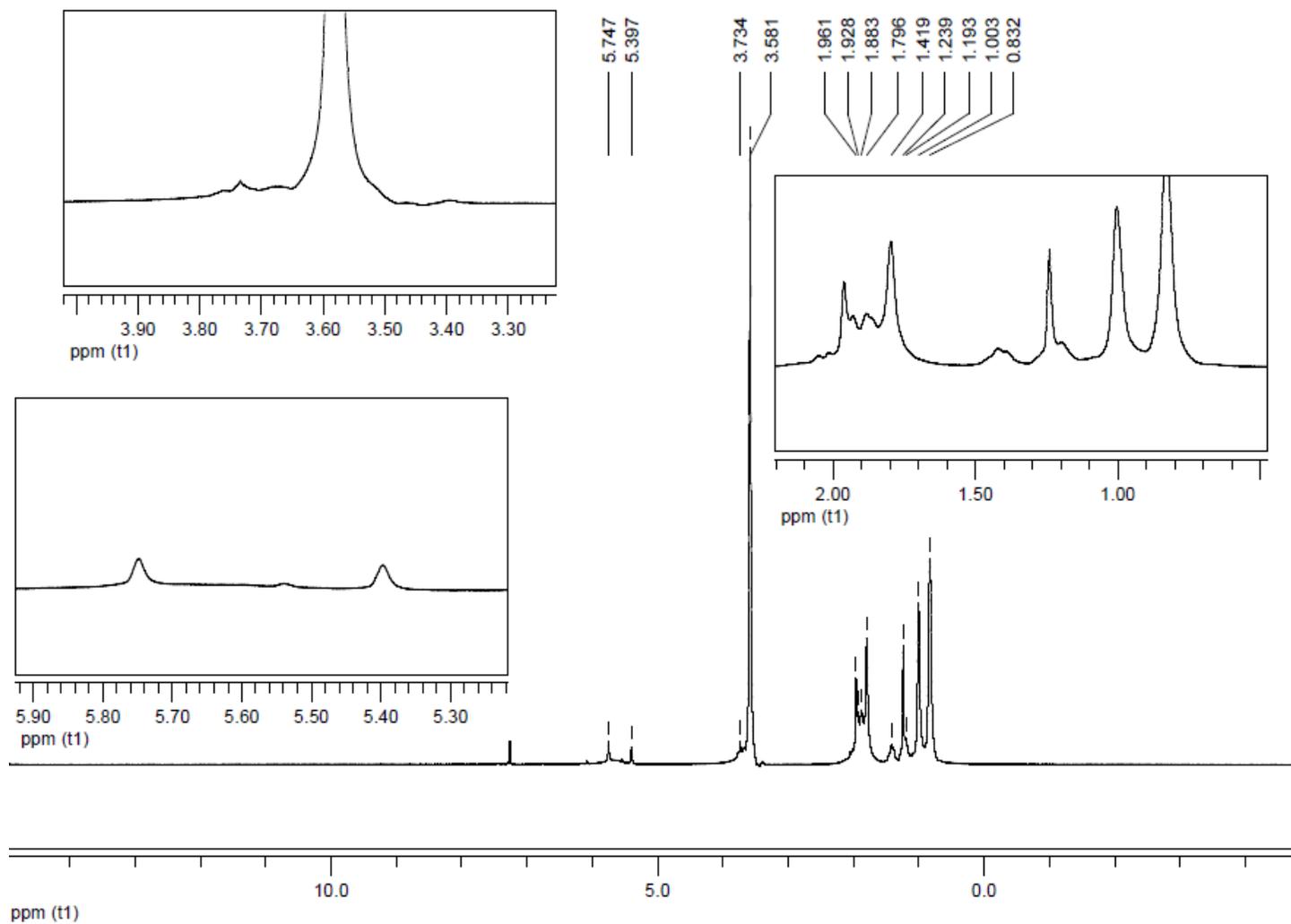


Figura AII.28 – Espectros de H-RMN do PMMA-co-PMAM.

Dinâmica das distribuições de diâmetro de partícula para as reações do plano em cruz

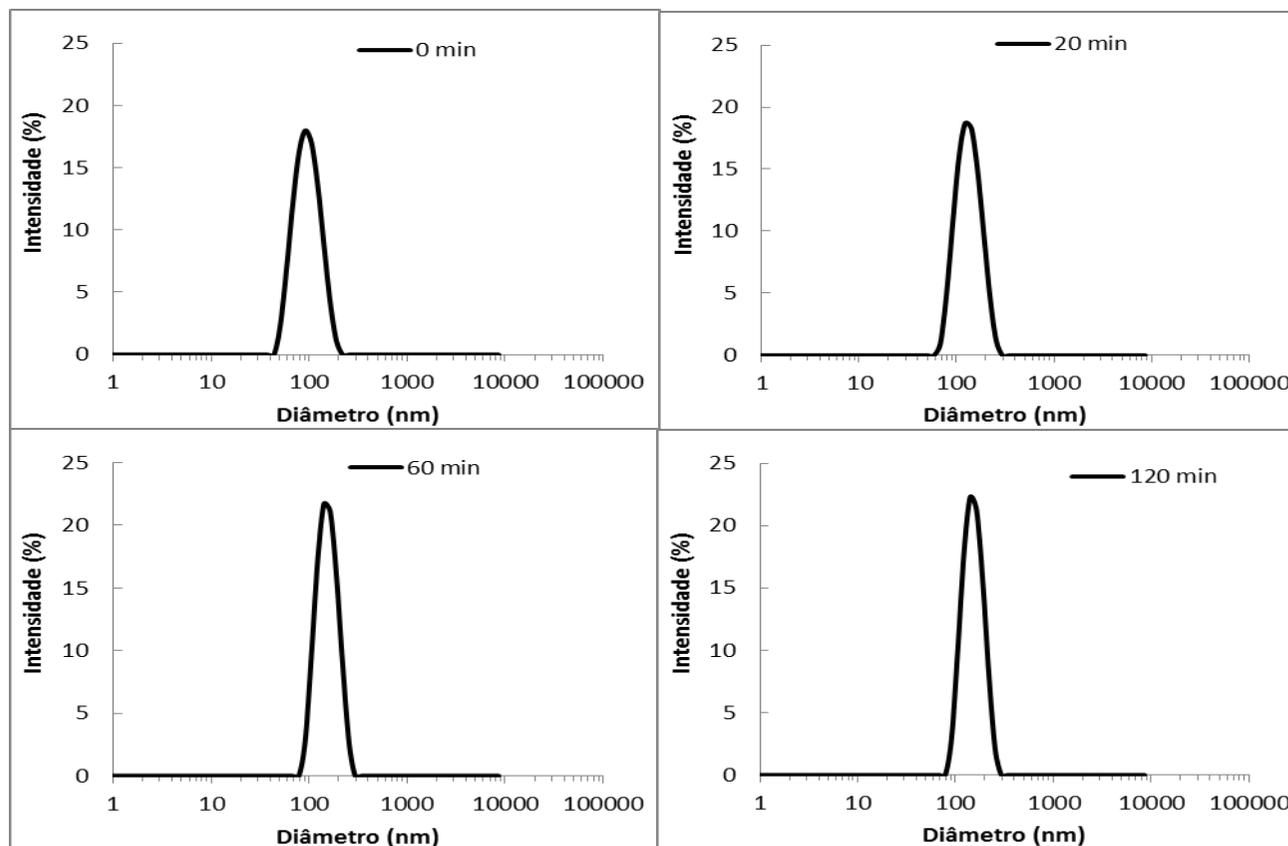


Figura AII.29 – Dinâmica para a distribuição de diâmetro de partículas para o polímero de composição: 1.0%SDS0.0%PP1.0%PBO.

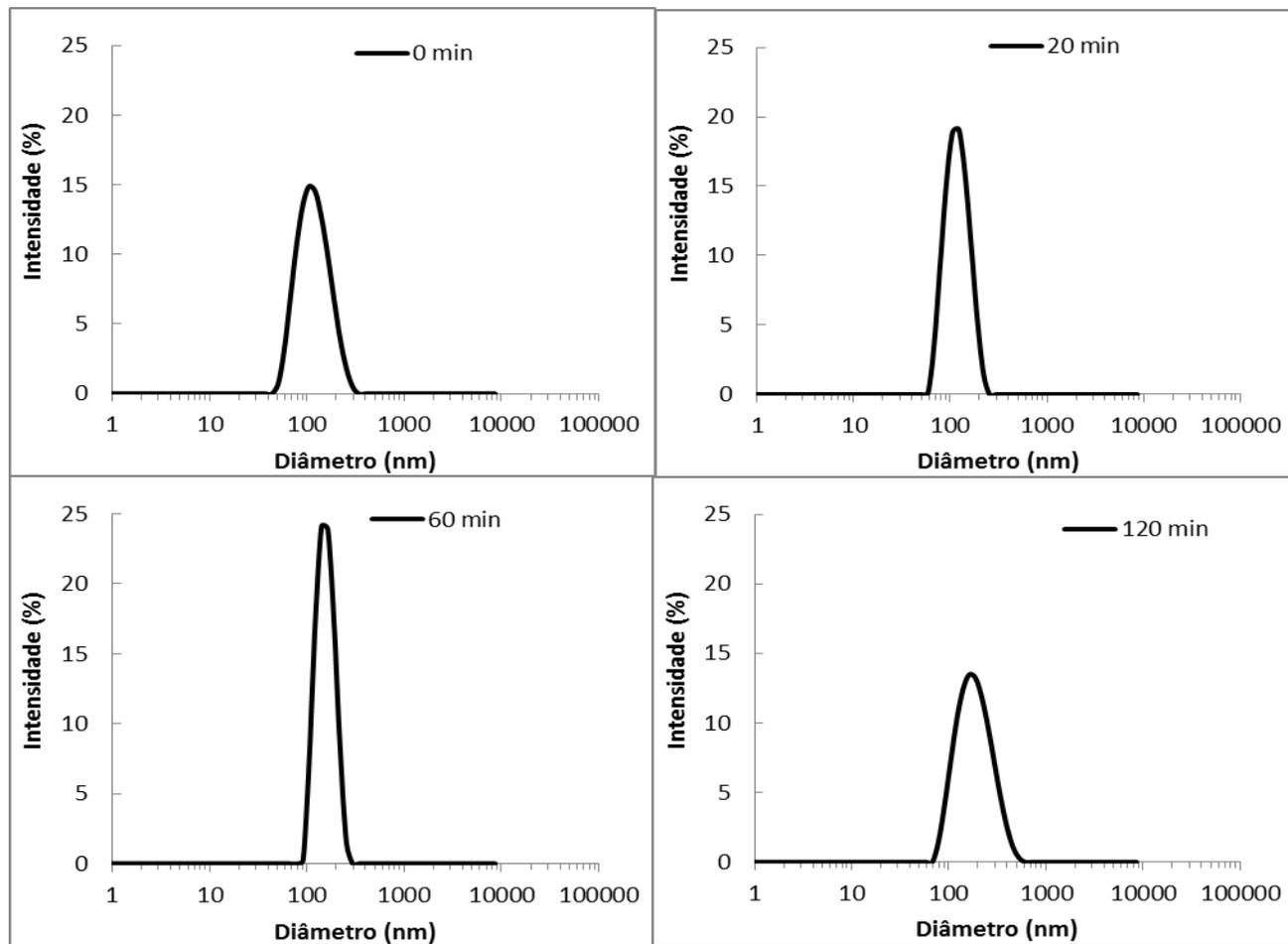


Figura AII.30 – Dinâmica para a distribuição de diâmetro de partículas para o polímero de composição: 1.0%SDS0.5%PP.

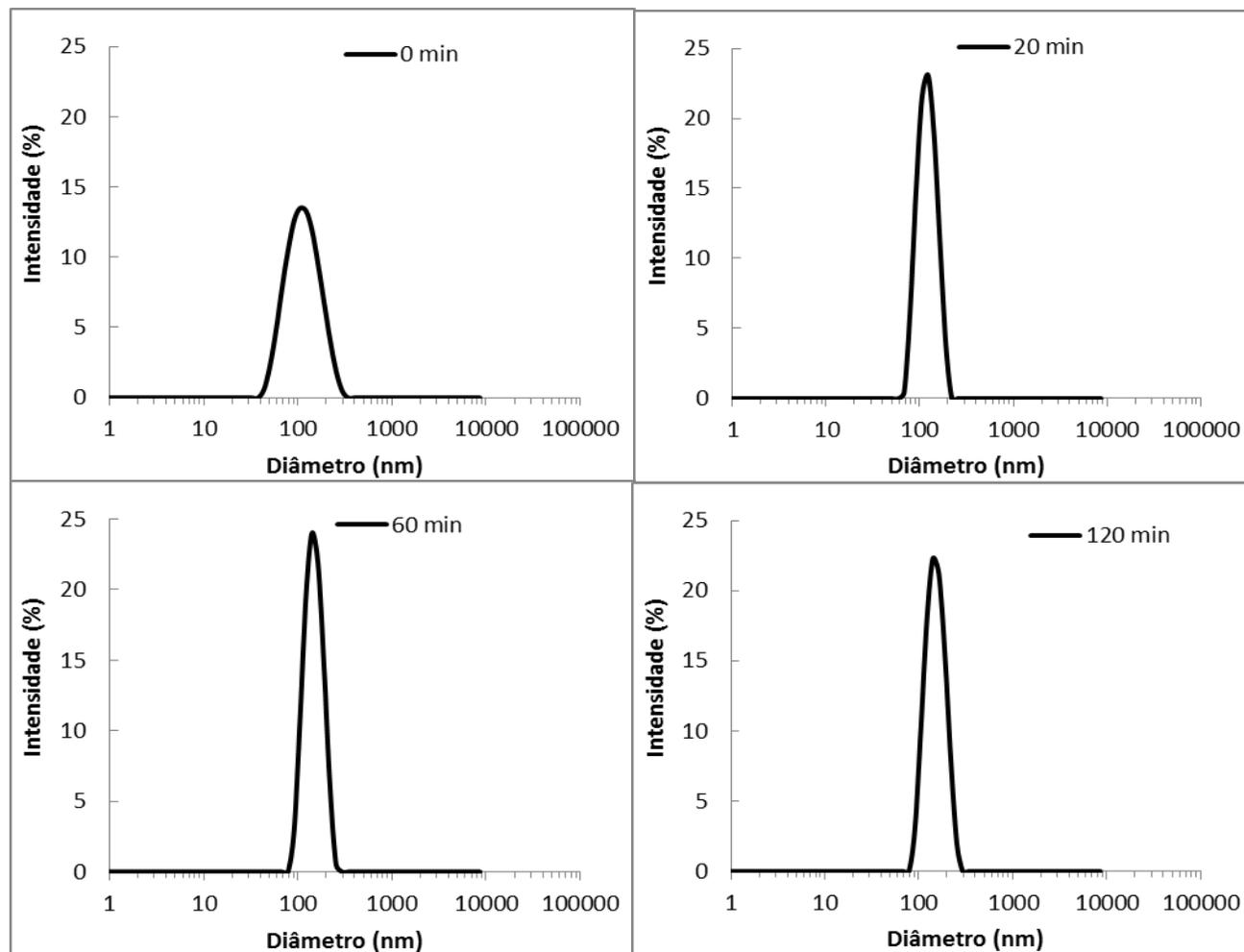


Figura AII.31 – Dinâmica para a distribuição de diâmetro de partículas para o polímero de composição:1.0%SDS1.0%PP.

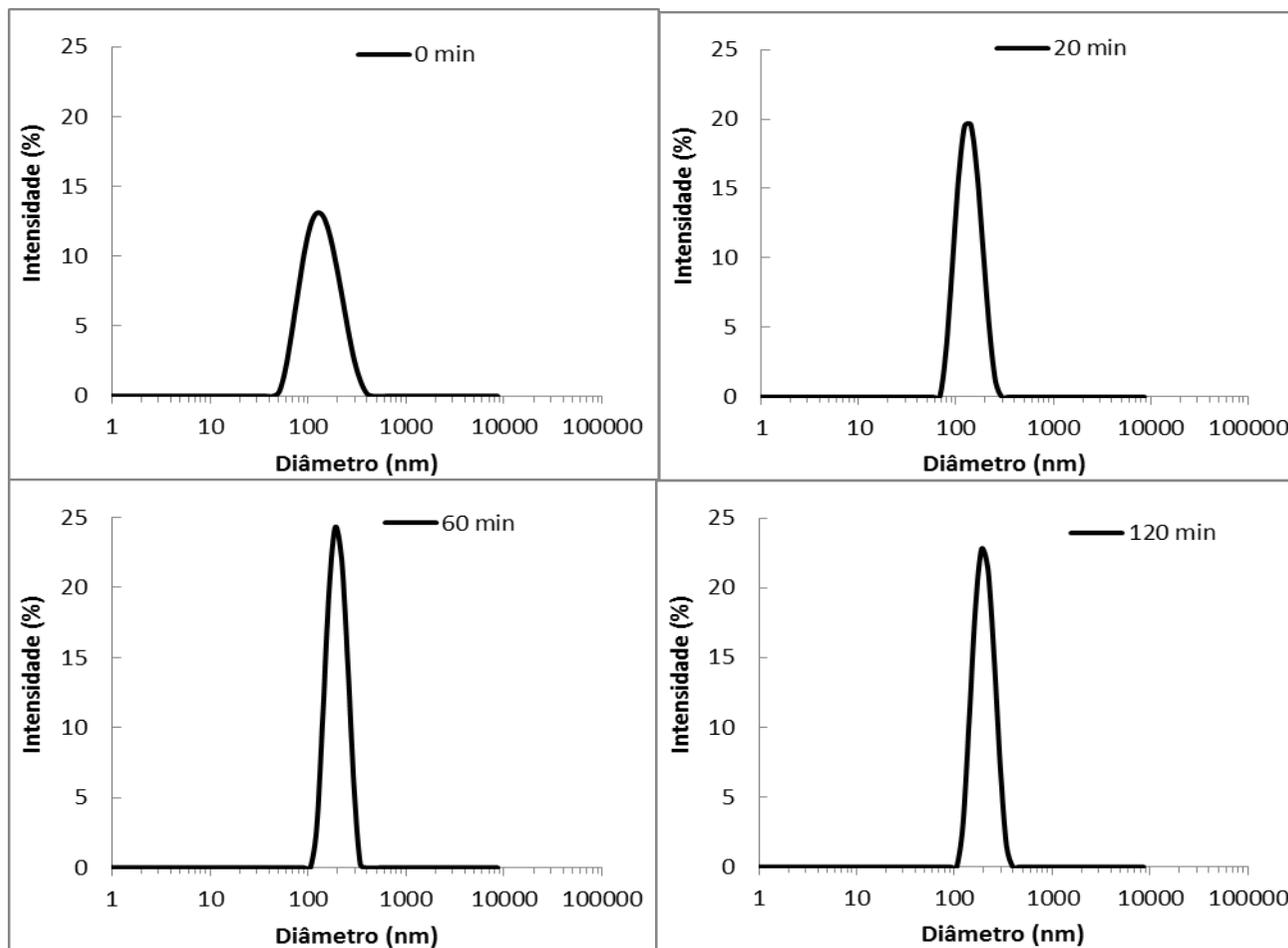


Figura AII.32 – Dinâmica para a distribuição de diâmetro de partículas para o polímero de composição: 0.5%SDS1.0%PP

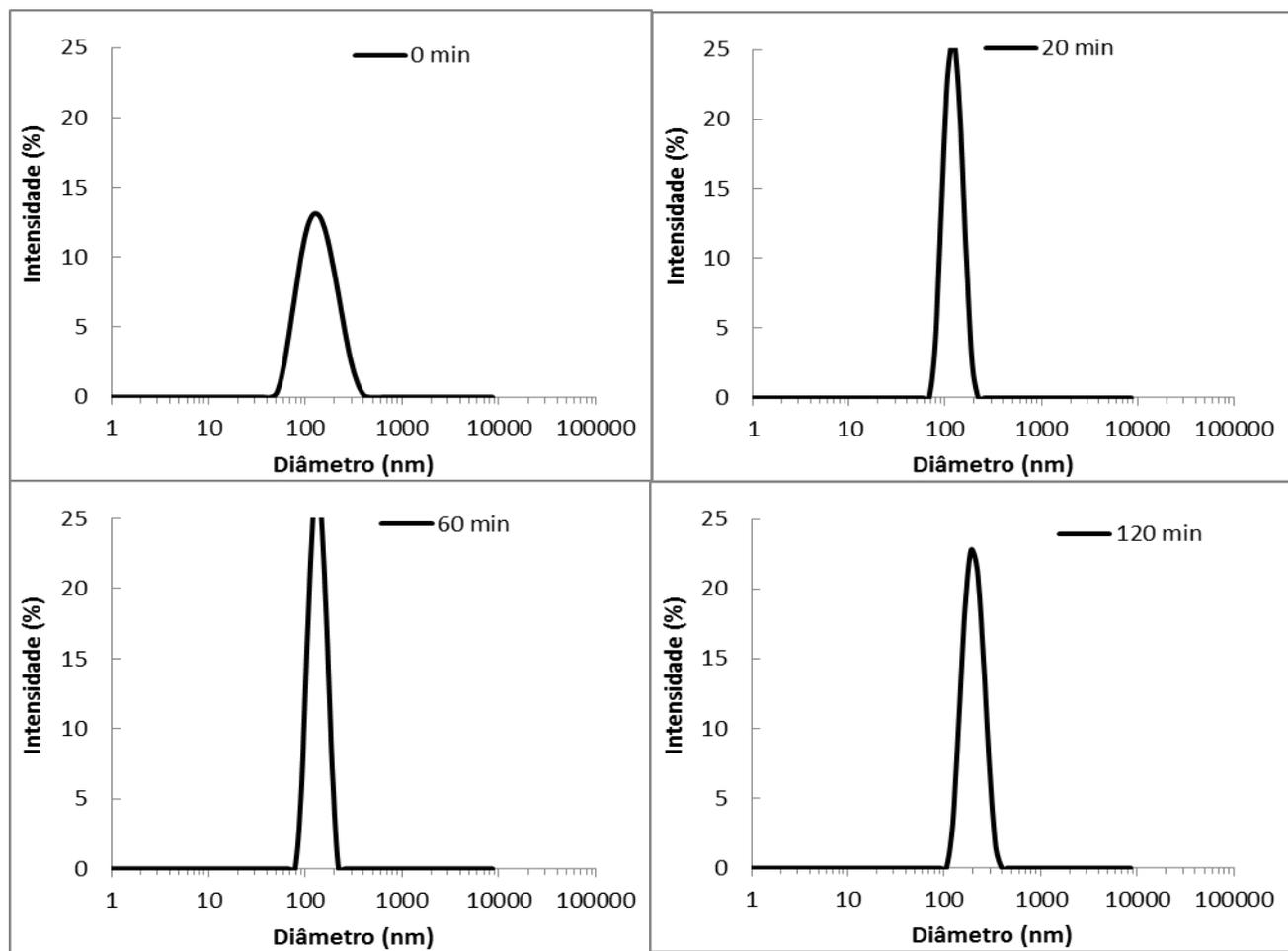


Figura AII.33 – Dinâmica para a distribuição de diâmetro de partículas para o polímero de composição: 1.5%SDS1.0%PP.

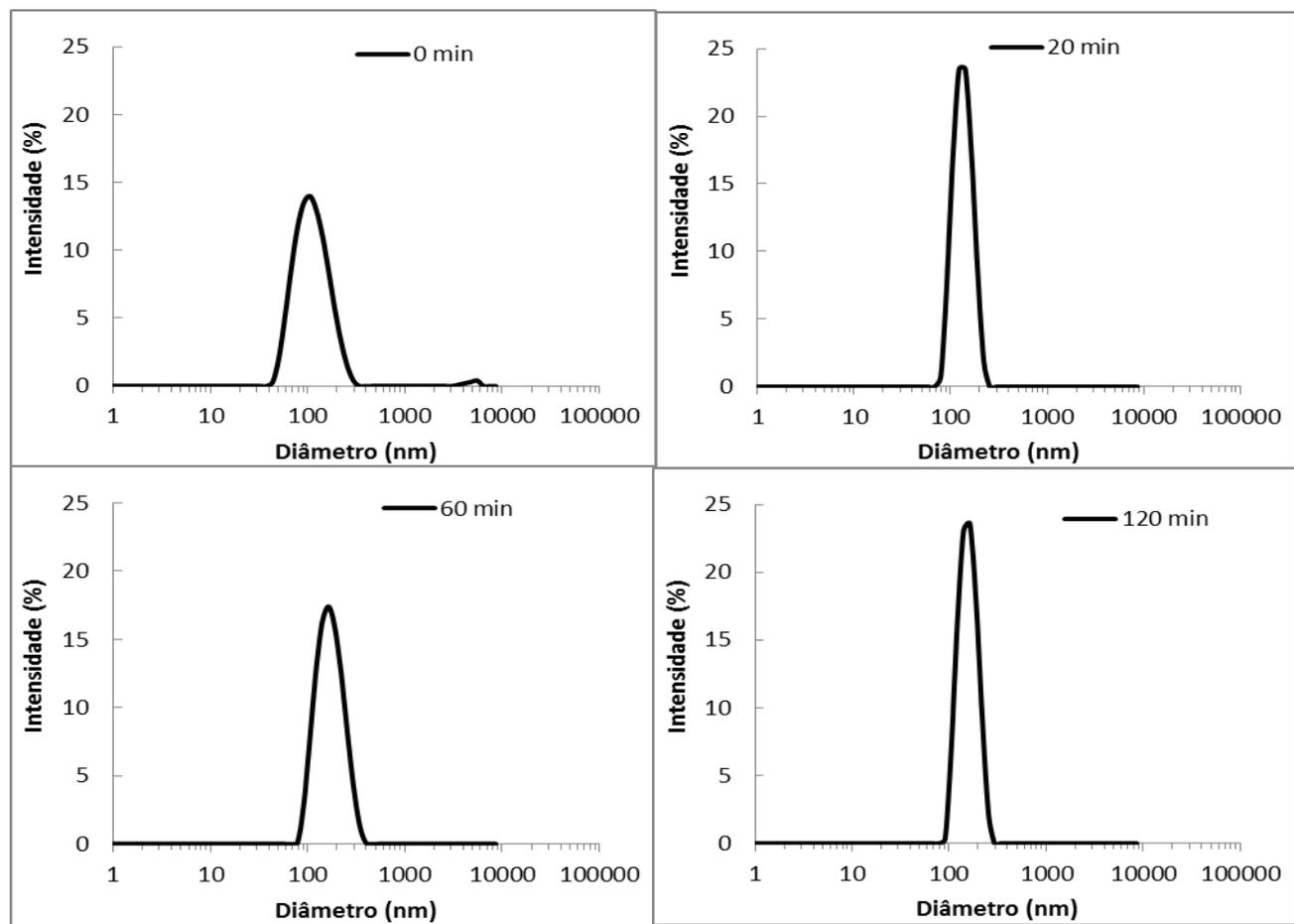


Figura AII.34 – Dinâmica para a distribuição de diâmetro de partículas para o polímero de composição: 1.0%SDS1.5%PP.

Distribuições de massas molares para os copolímeros produzidos

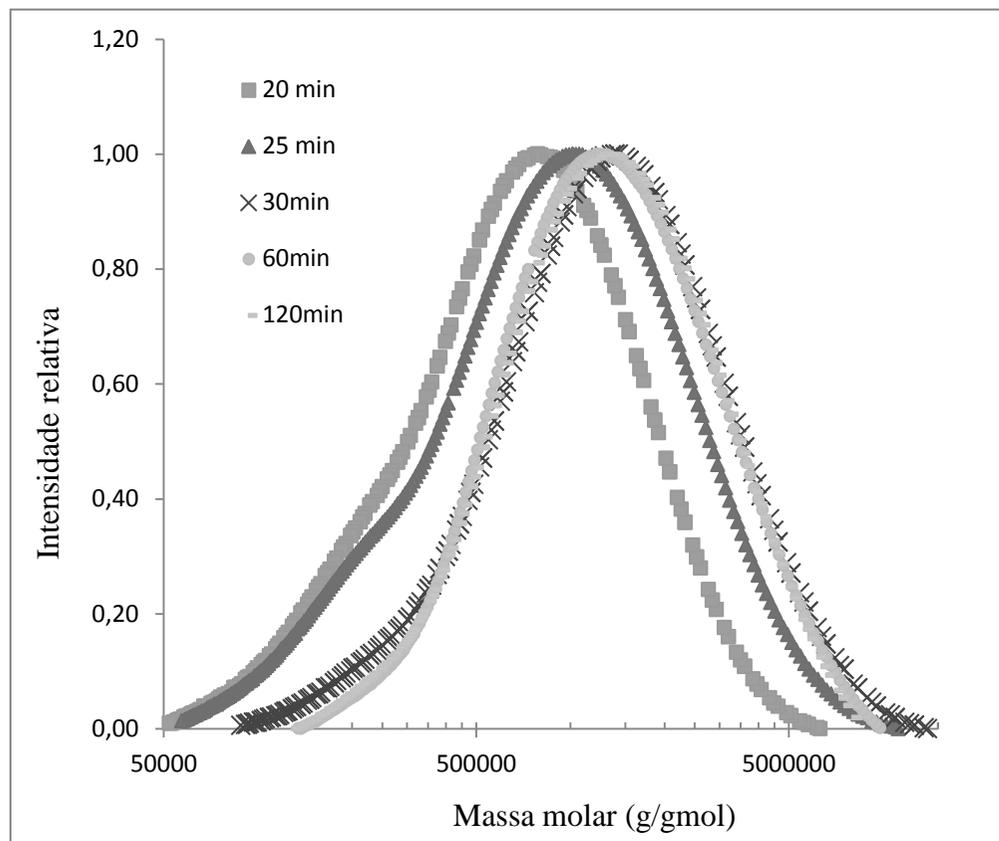


Figura AII.35 – Dinâmica das distribuições de massas molares para o homopolímero de PMMA utilizando PP como iniciador.

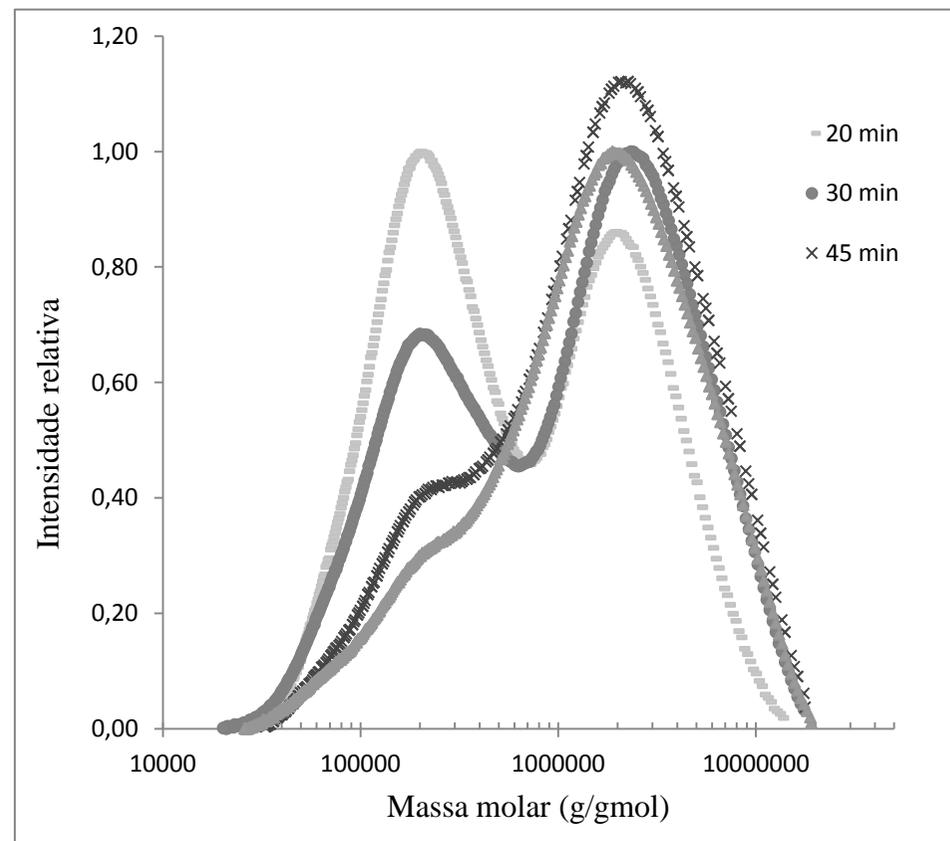


Figura AII.36 – Dinâmica das distribuições de massas molares para o homopolímero de PMMA utilizando PBO como iniciador.

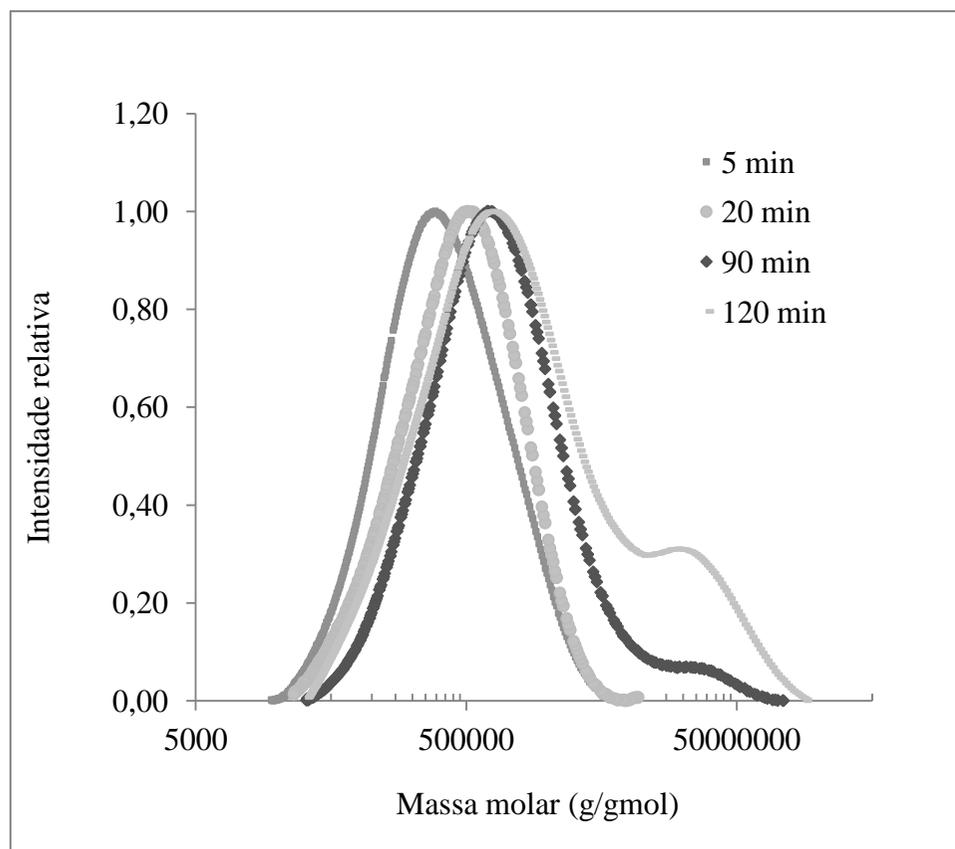


Figura AII.37 – Dinâmica das distribuições de massas molares para o copolímero de P(MMA-co-HEMA) utilizando PP como iniciador.

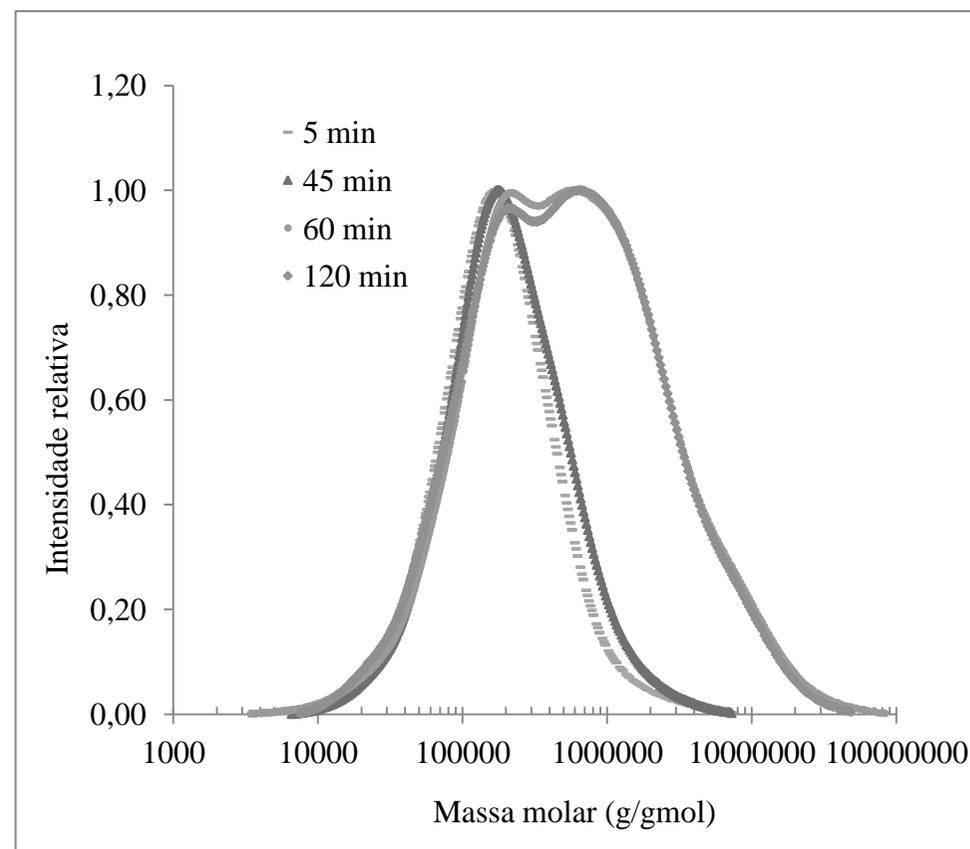


Figura AII.38 – Dinâmica das distribuições de massas molares para o copolímero de P(MMA-co-HEMA) utilizando PBO como iniciador.

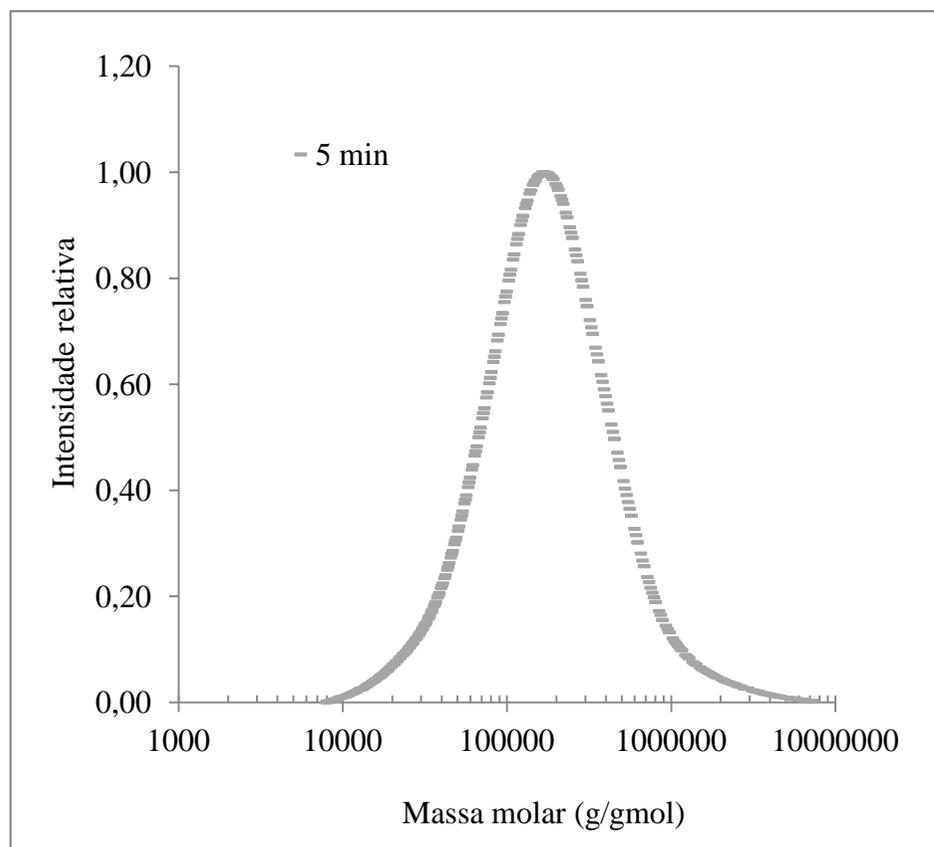


Figura AII.39 – Dinâmica das distribuições de massas molares para o copolímero de P(MMA-co-DMAEMA) utilizando PP como iniciador.

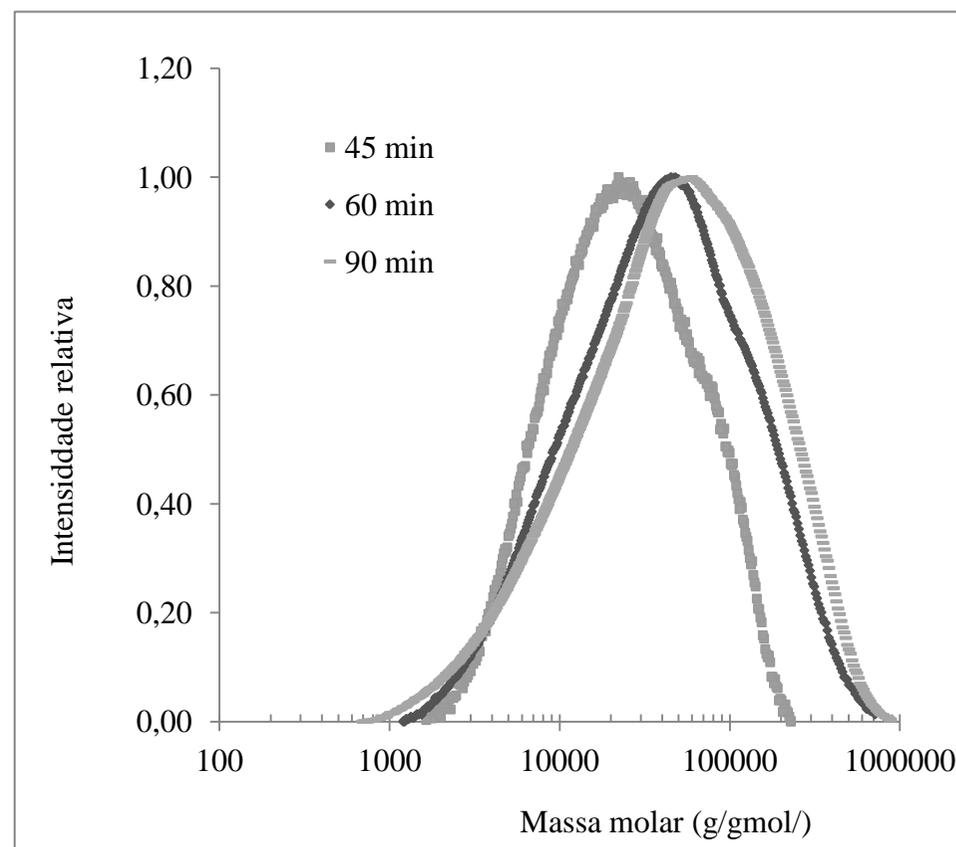


Figura AII.40 – Dinâmica das distribuições de massas molares para o copolímero de P(MMA-co-DMAEMA) utilizando PBO como iniciador.

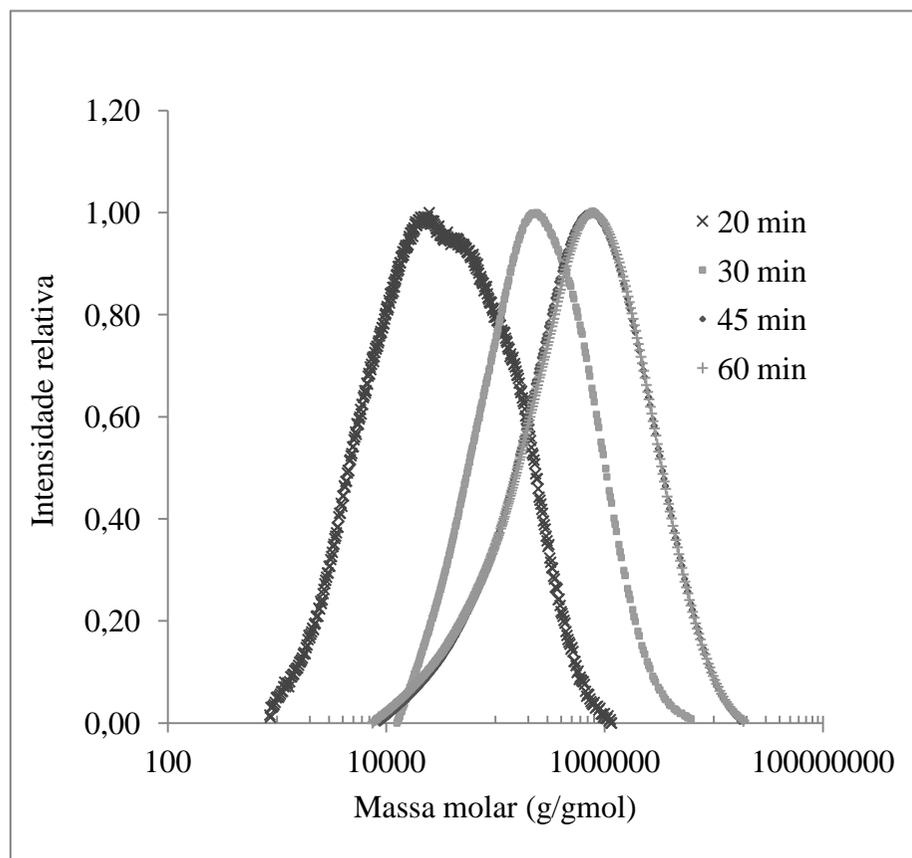


Figura AII.41 – Dinâmica das distribuições de massas molares para o copolímero de P(MMA-co-AMA) utilizando PP como iniciador.

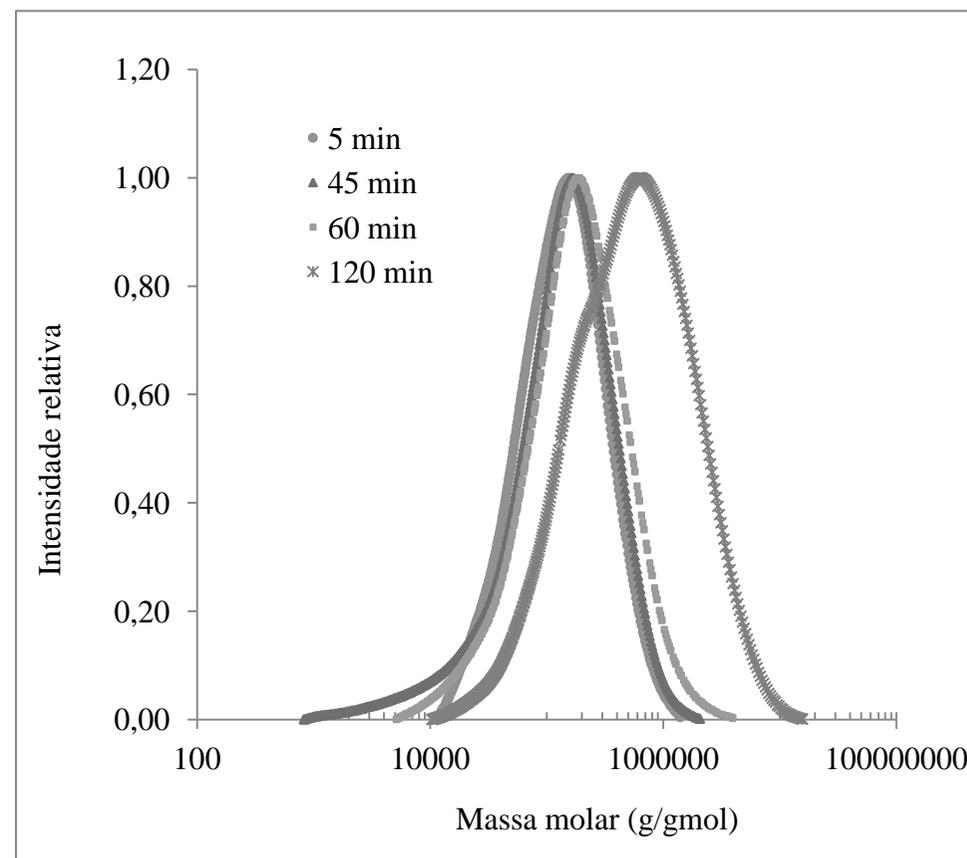


Figura AII.42 – Dinâmica das distribuições de massas molares para o copolímero de P(MMA-co-AMA) utilizando PBO como iniciador.

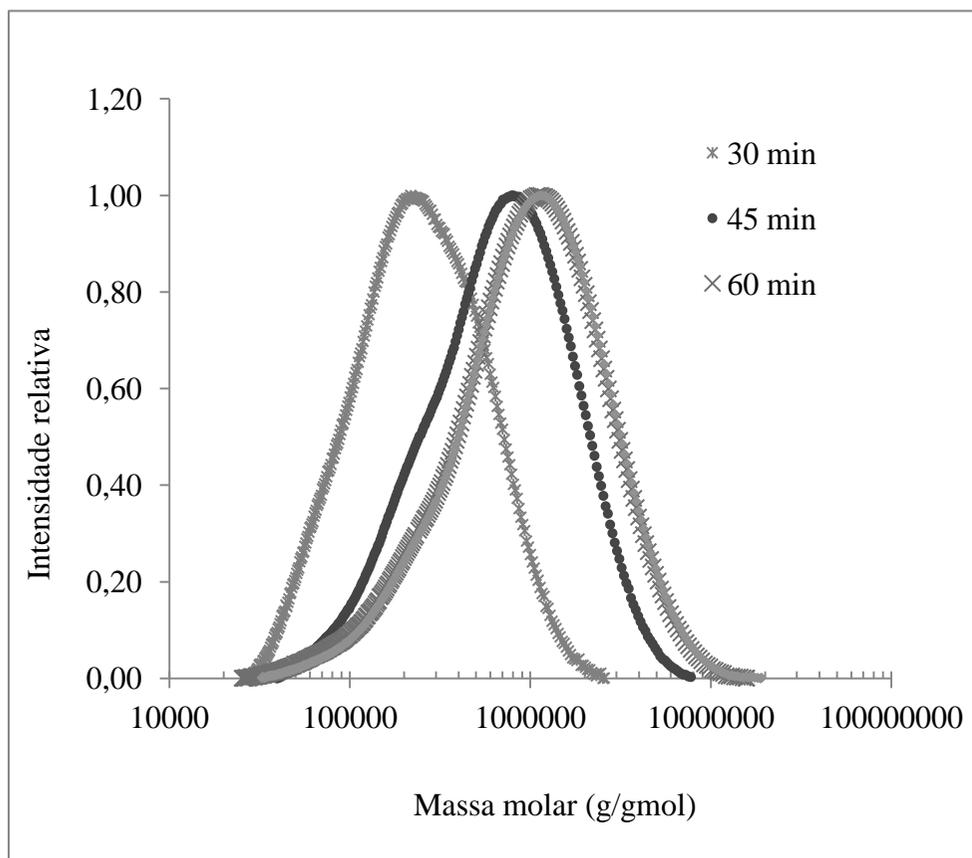


Figura AII.43 – Dinâmica das distribuições de massas molares para o copolímero de P(MMA-co-AA) utilizando PP como iniciador.

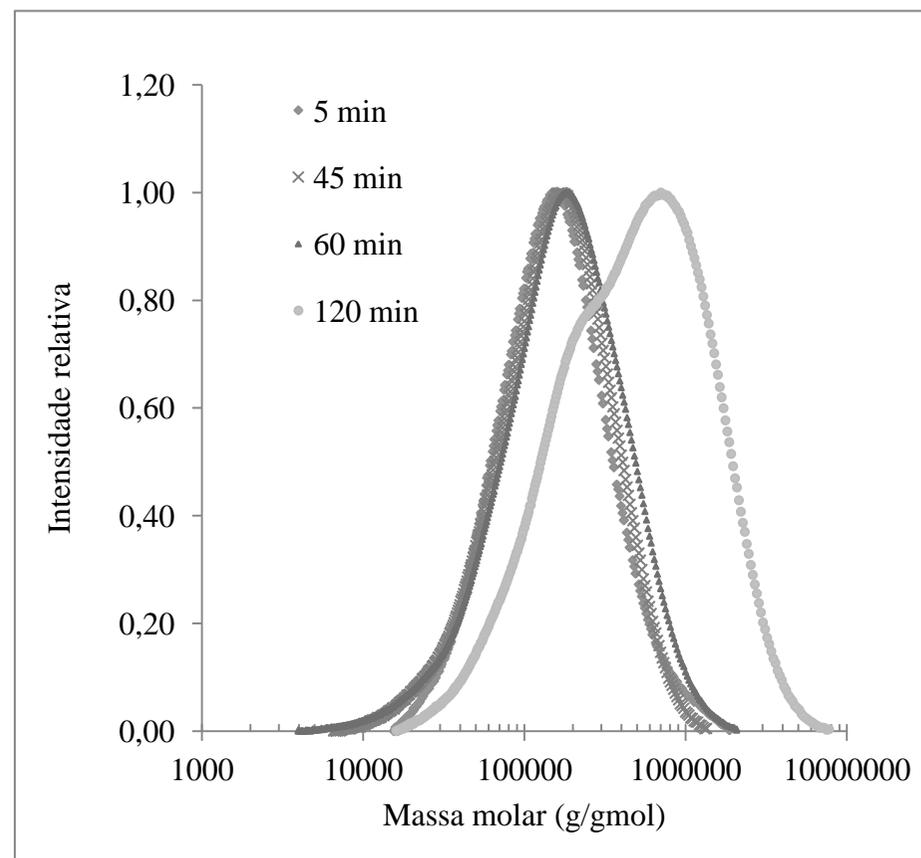


Figura AII.44 – Dinâmica das distribuições de massas molares para o copolímero de P(MMA-co-AA) utilizando PBO como iniciador.

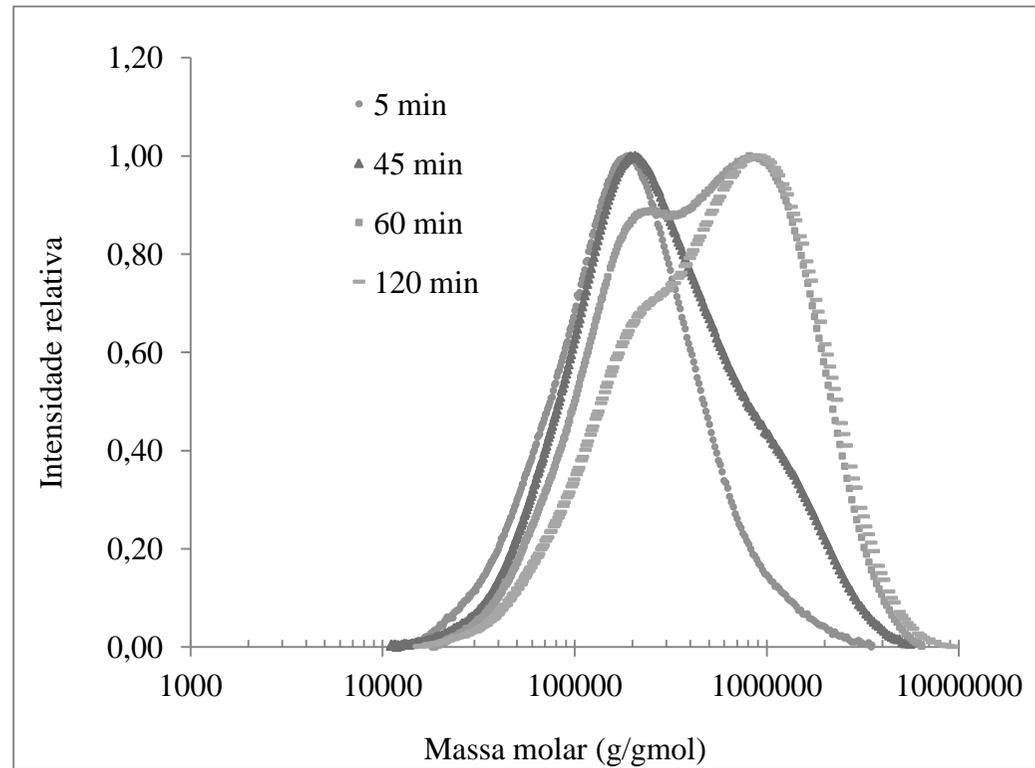


Figura AII.45 – Dinâmica das distribuições de massas molares para o copolímero de P(MMA-co-MAM) utilizando PBO como iniciador.

Curvas de DSC

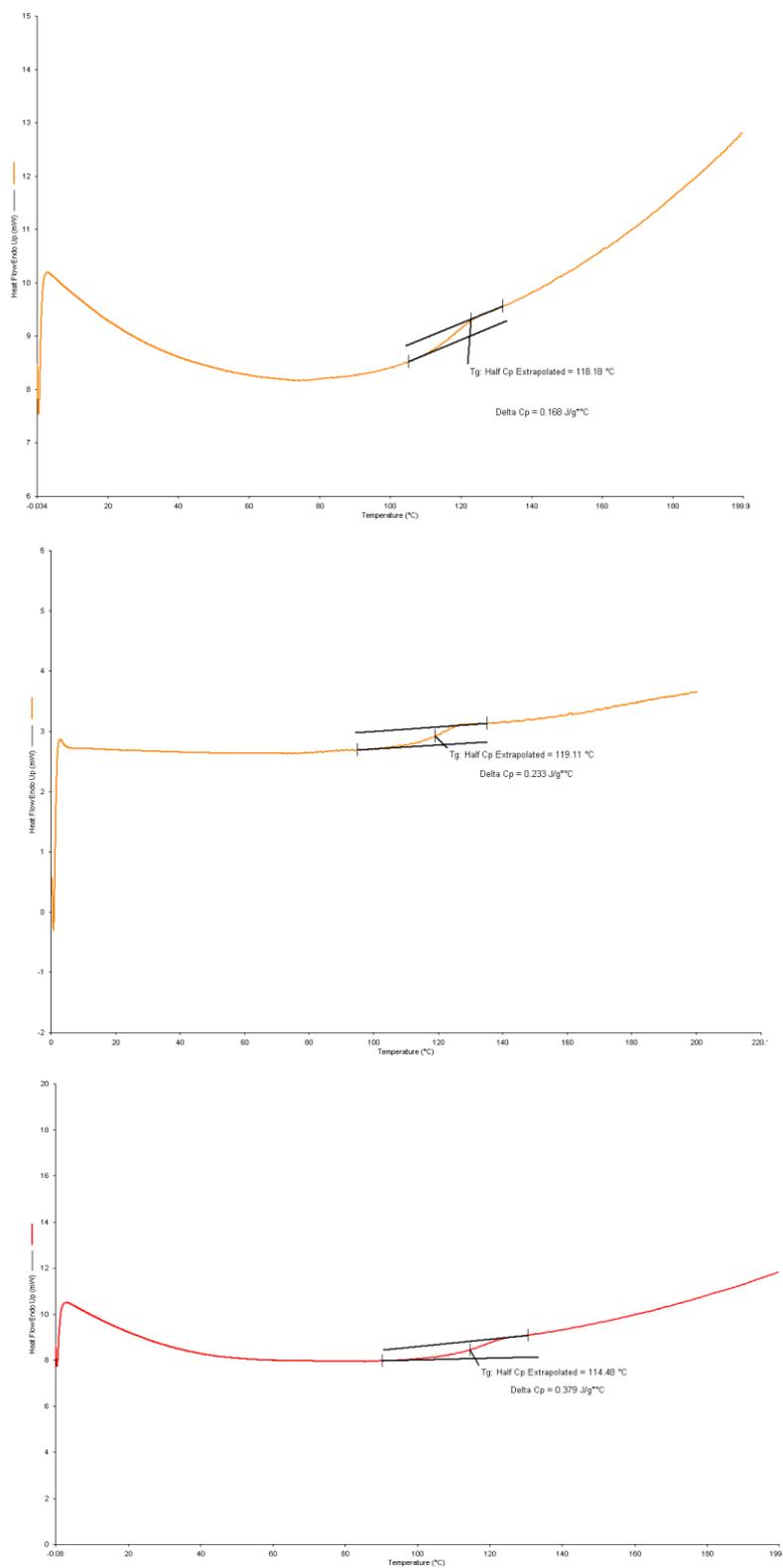


Figura AII.46 – Curvas de DSC para o PMMA homopolímero iniciado com PP (reações realizadas em réplica).

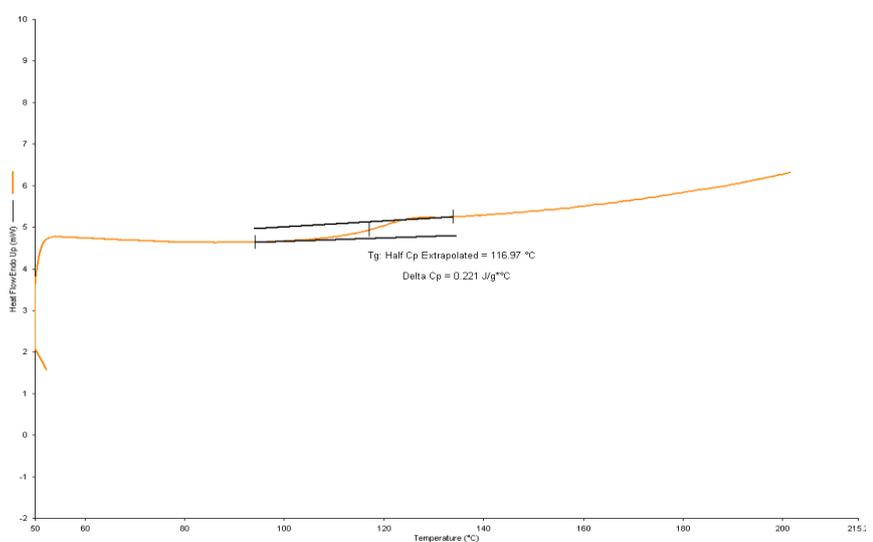
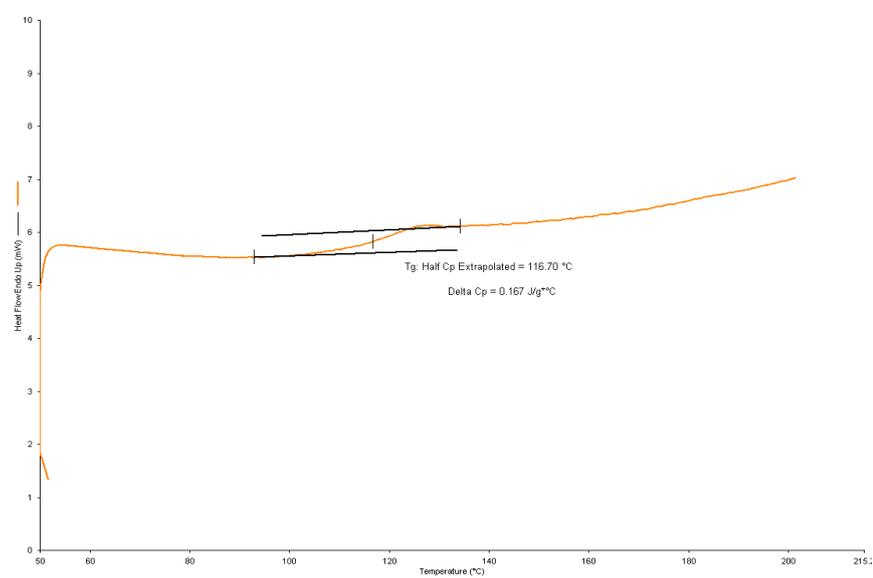
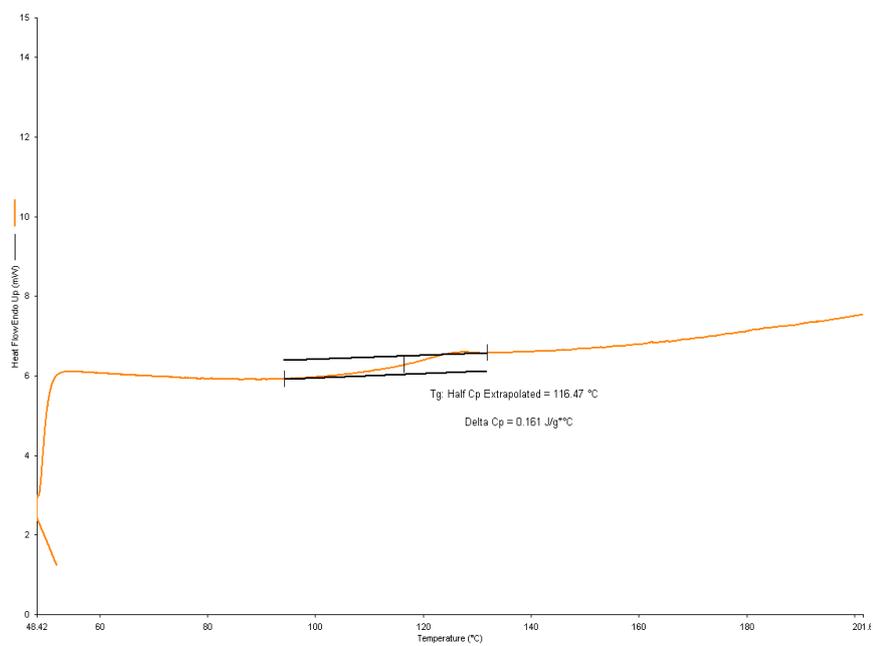


Figura AII.47 – Curvas de DSC para o PMMA homopolímero iniciado com PBO (reações realizadas em réplica).

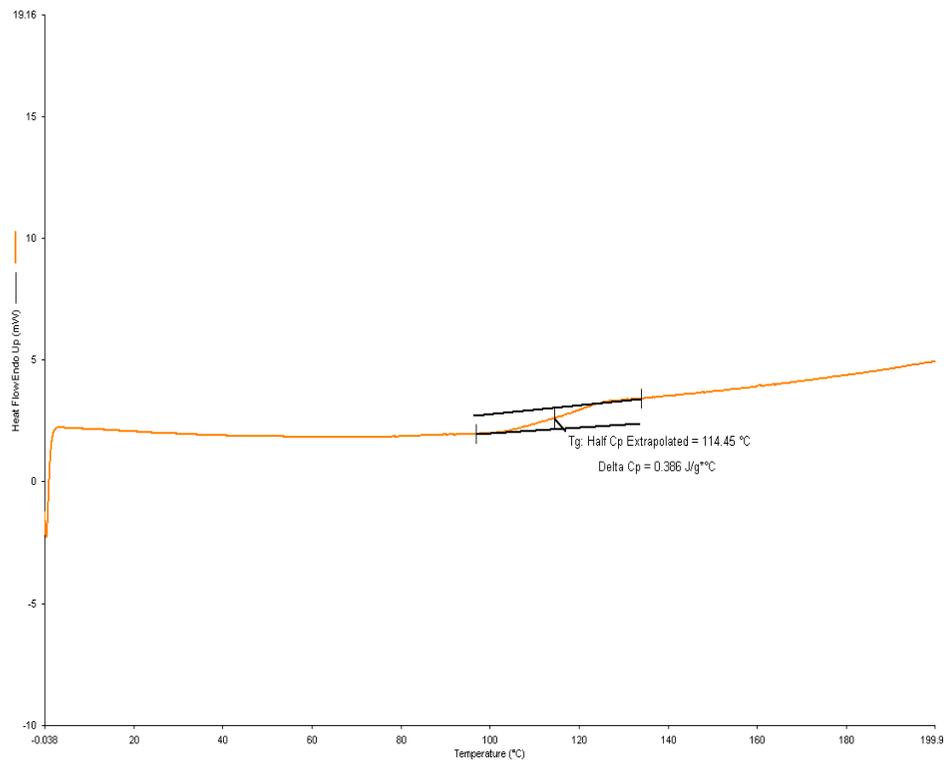


Figura AII.48 – Curva de DSC para o copolímero P(MMA-co-HEMA) iniciado com PP.

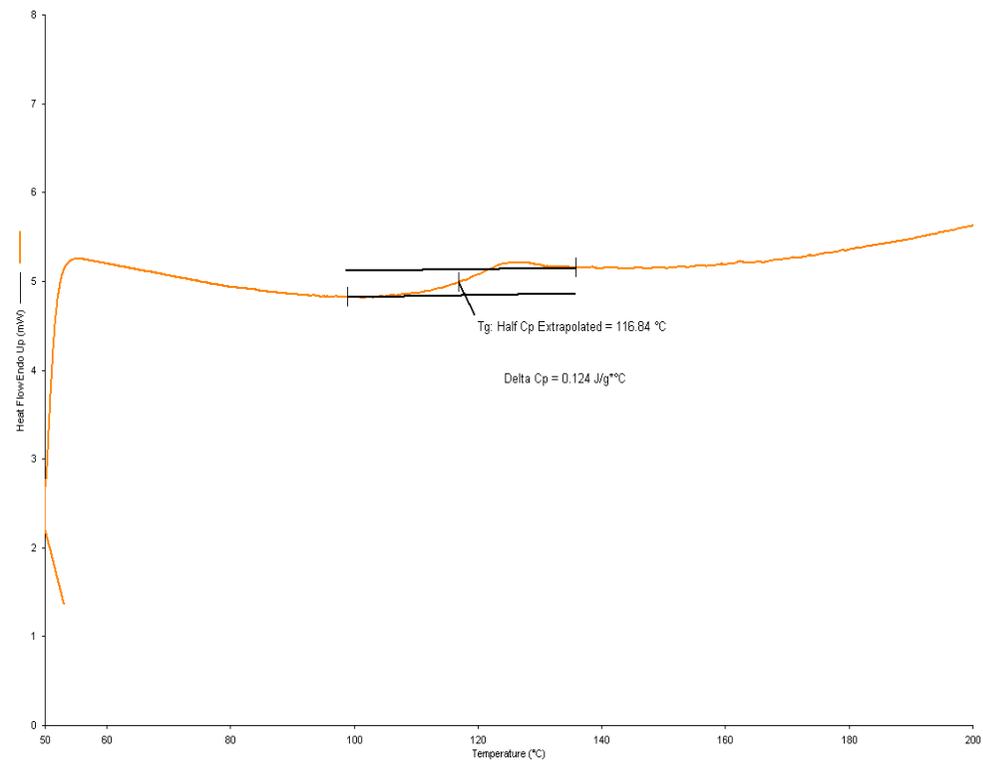


Figura AII.49 – Curva de DSC para o copolímero P(MMA-co-HEMA) iniciado com PBO.

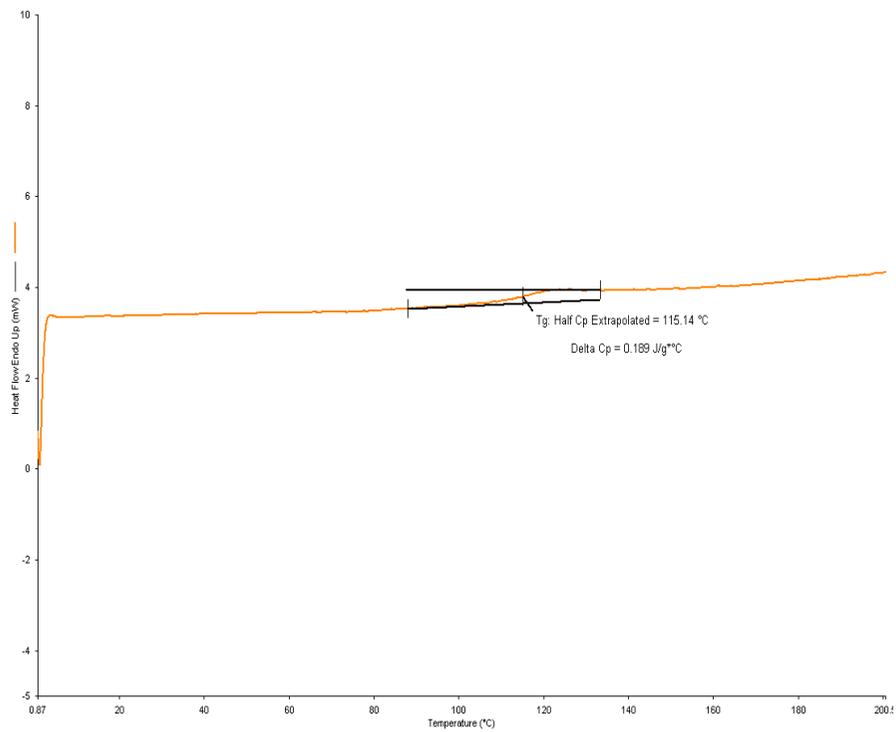


Figura AII.50 – Curva de DSC para o copolímero P(MMA-co-DMAEMA) iniciado com PP.

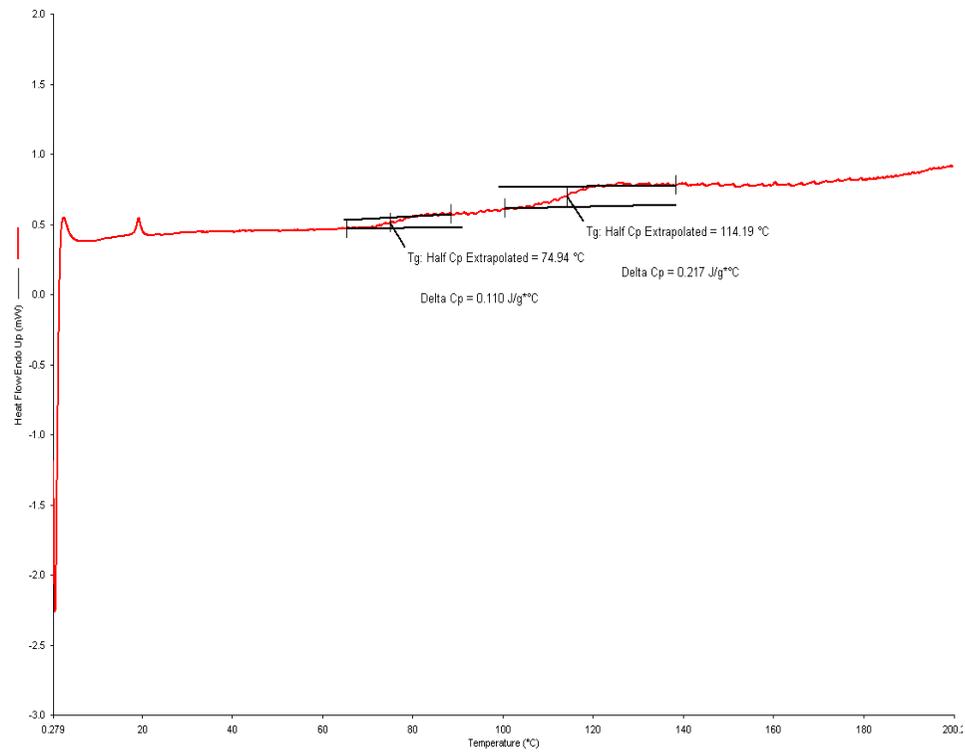


Figura AII.51– Curva de DSC para o copolímero P(MMA-co-DMAEMA) iniciado com PBO.

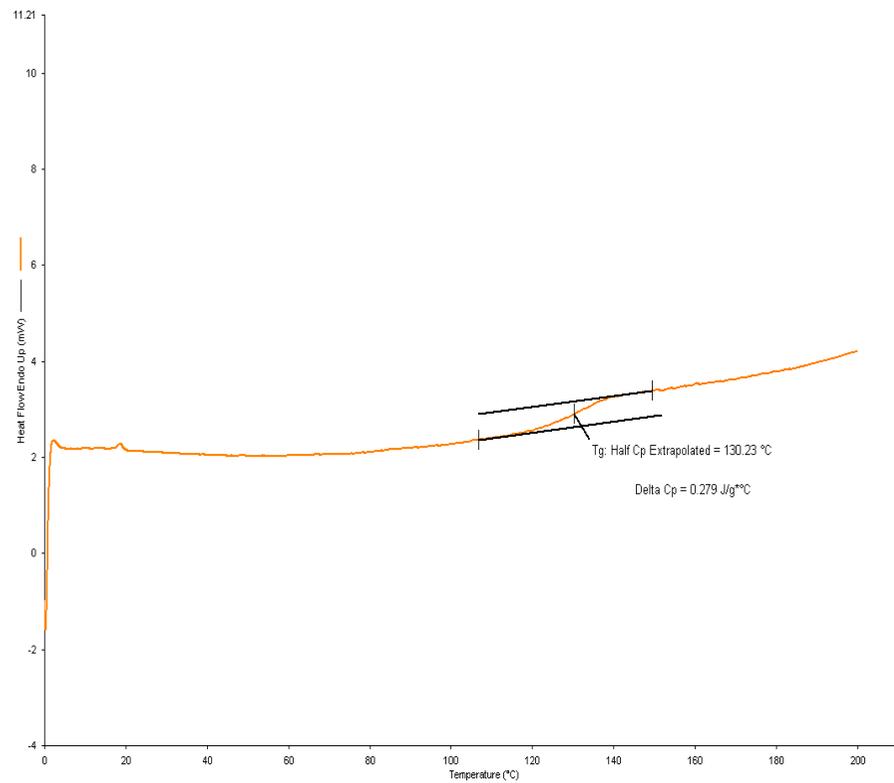


Figura AII.52 – Curva de DSC para o copolímero P(MMA-co-AMA) iniciado com PP.

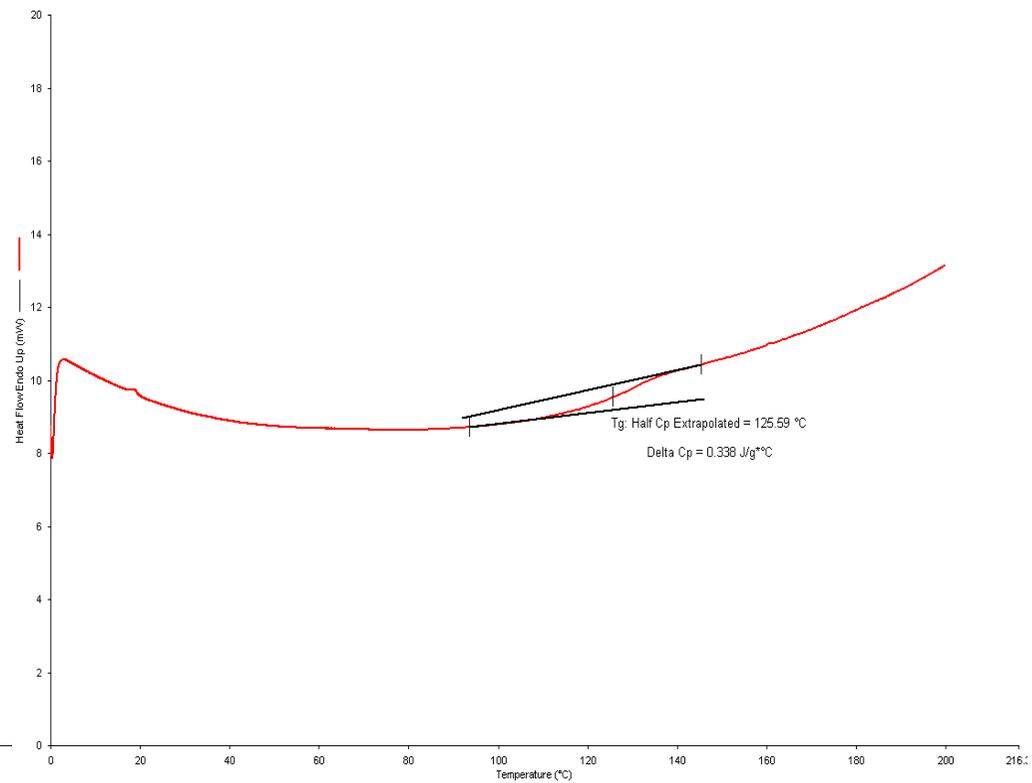


Figura AII.53– Curva de DSC para o copolímero P(MMA-co-AMA) iniciado com PBO.

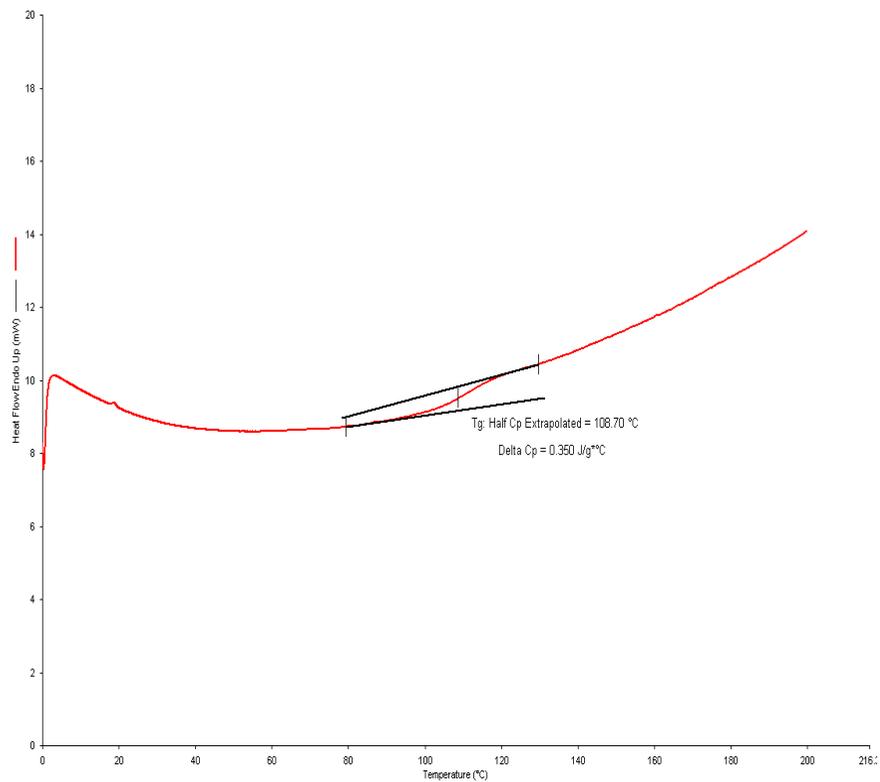


Figura AII.54 – Curva de DSC para o copolímero P(MMA-co-AA) iniciado com PP.

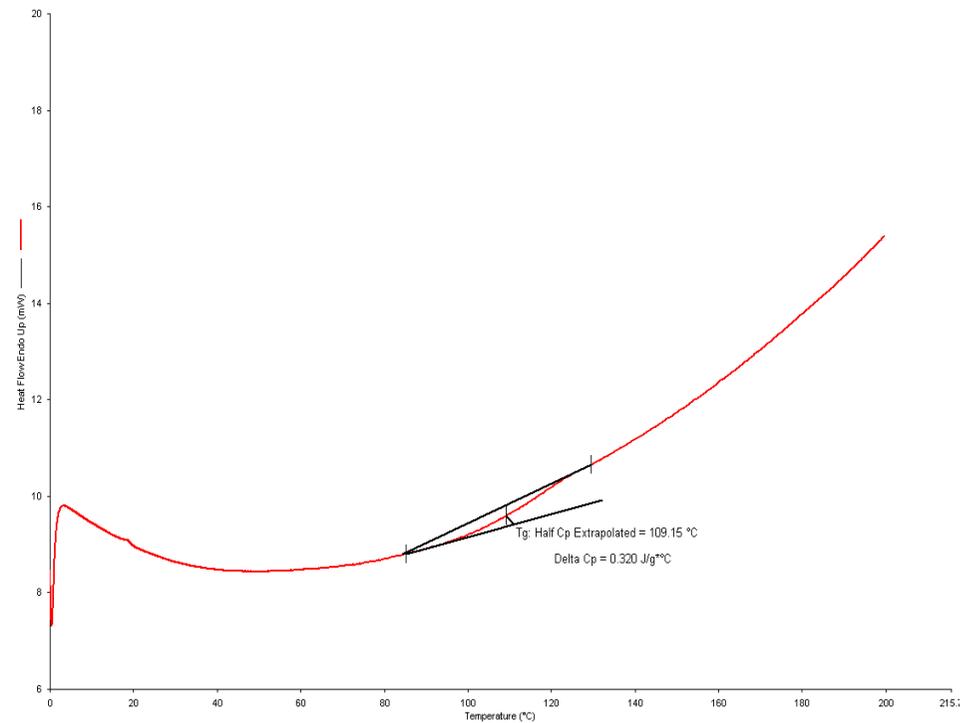


Figura AII.55– Curva de DSC para o copolímero P(MMA-co-AA) iniciado com PBO.

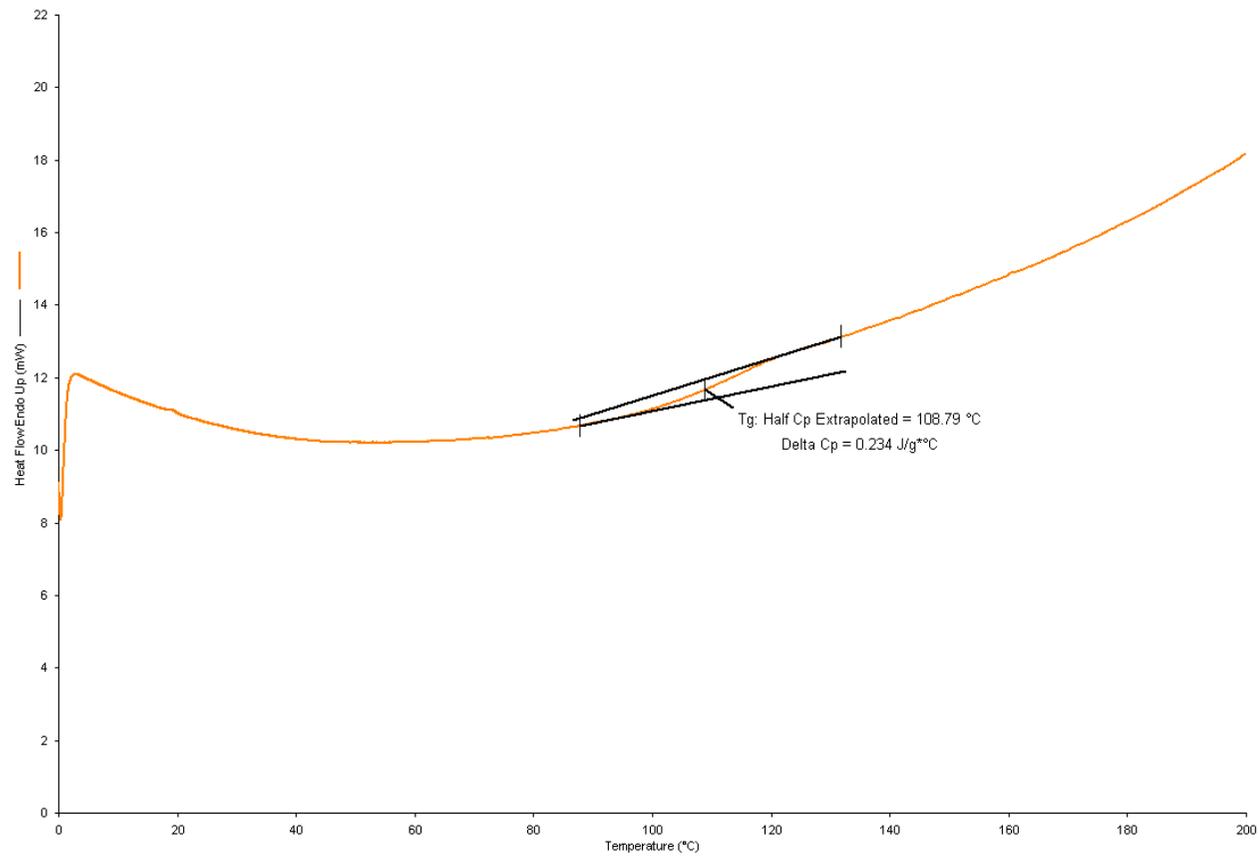


Figura AII.56 – Curva de DSC para o copolímero P(MMA-co-MAM) iniciado com PBO.