



PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS DE POLI(ACETATO DE VINILA) (PVAc) E
POLI(ACETATO DE VINILA-co-METACRILATO DE METILA) (PVAc-co-PMMA)
PARA IMOBILIZAÇÃO DE L-ASPARAGINASE, BSA E LISOZIMA

Dirceu Pereira dos Santos

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

Orientador(es): José Carlos Costa da Silva Pinto
Tito Lívio Moitinho Alves

Rio de Janeiro
Setembro de 2014

PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS DE POLI(ACETATO DE VINILA) (PVAc) E
POLI(ACETATO DE VINILA-co-METACRILATO DE METILA) (PVAc-co-PMMA)
PARA IMOBILIZAÇÃO DE L-ASPARAGINASE, BSA E LIPOZIMA

Dirceu Pereira dos Santos

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

Examinada por:

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

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D. Sc.

Prof. Cristina Tristão de Andrade, D. Sc.

Prof. Helen Conceição Ferraz, D. Sc.

Prof. Kátia Cécilia de Souza Figueiredo, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

SETEMBRO DE 2014

Santos, Dirceu Pereira dos

Produção de Partículas de Poli(acetato de vinila) (PVAc) e Poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila) (PVAc-co-PMMA) para imobilização de L-asparaginase, BSA e Lisozima / Dirceu Pereira dos Santos. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2014.

XVIII, 201 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: José Carlos Costa da Silva Pinto

Tito Lívio Moitinho Alves

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2014.

Referências Bibliográficas: p. 177-194.

1. Polímeros. 2. Enzimas. 3. Fármacos. I. Pinto, José Carlos Costa da Silva *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Agradecimentos

Este é um momento de vitória para mim e minha família. Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus, a meus pais, Conceição e Joaquim, minhas irmãs, Ângela e Solange, minha afilhada Mayara e meu afilhado do coração Guilherme.

Quero agradecer o apoio e amizade do Carlos Eduardo e de sua família. Quero agradecer às pessoas que me acolheram na chegada ao Rio, Prof. Fabio Toniolo e André.

Desejo também agradecer ao Rafael e sua família pela ajuda. Agradeço ainda a meu amigo Leonardo e a Dona Josinas.

A meu grande orientador Zé Carlos, quero dizer um muito obrigado por todas as oportunidades e ensinamento; ele que tem a minha admiração. A meu orientador Tito, também quero dizer meu obrigado pelos ensinamentos e pela paciência que teve comigo.

Não posso deixar de agradecer a meus amigos do LMSCP e da COPPE. Como foi bom dividir este tempo com vocês! Quero agradecer de coração às pessoas maravilhosas que estiveram ao meu lado: Juliana Guimarães (com quem dividi a mesa do almoço várias vezes), Ana Peixoto, Débora, Martina, Simoni, Aline F., Marina, Tailane, Bárbara, Prof. Soninha.

À equipe de técnicos do LMSCP, Rhana, Larissa, Grazi e Aline, obrigado pela amizade e análises. Ao Ricardo, obrigado pela paciência. Agradeço também a meus alunos de iniciação científica, Mauro, Renan, Leonardo, Bernardo, Leilane, Tayana e Juan. Vocês são brilhantes!

Por último, agradeço ao CNPQ e à Capes, à Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Programa de Engenharia Química da COPPE

Obrigado a todos.

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

PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS DE POLI(ACETATO DE VINILA) (PVAc) E
POLI(ACETATO DE VINILA-co-METACRILATO DE METILA) (PVAc-co-PMMA)
PARA IMOBILIZAÇÃO DE L-ASPARAGINASE, BSA E LISOZIMA

Dirceu Pereira dos Santos

Setembro/2014

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Tito Lívio Moitinho Alves

Programa: Engenharia Química

Neste trabalho foi realizada a produção de partículas poliméricas de poli(acetato de vinila) (PVAc) e de poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila) (PVAc-co-PMMA), de tamanho micrométrico por polimerização em suspensão, para uso como carregador de fármacos e como agente de embolização. No desenvolvimento deste trabalho foram empregadas L-asparaginase (enzima utilizada no tratamento da leucemia), albumina do soro bovino (BSA) e lisozima como moléculas alvos, por serem muito utilizadas em carregadores de fármacos e como medicamentos. Ao longo do estudo, observou-se que os polímeros analisados possuem pequenas áreas específicas com superfícies lisas e sem presença de poros. As maiores quantidades de moléculas imobilizadas nas melhores condições chegaram a 1 mg de BSA e a 0,5 mg de lisozima por grama de polímero, respectivamente. Essas condições foram alcançadas a 30 °C e 250 rpm em tampão de fosfato de sódio, 0,05M, próximo ao ponto isoelétrico das biomoléculas. As análises das partículas de polímero com lisozima imobilizada mostraram que a enzima mantém sua atividade após o processo de adsorção, permitindo a modificação da partícula para uso médico futuro.

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

PRODUCTION OF POLY(VINYL ACETATE) (PVAc) AND POLY(VINYL ACETATE-co-METHYL METHACRYLATE) (PVAc-co-PMMA) PARTICLES FOR IMMOBILIZATION OF L-ASPARAGINASE, BSA AND LYSOZYME

Dirceu Pereira dos Santos

September/2014

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto

Tito Lívio Moitinho Alves

Department: Chemical Engineering

This work reports the production of poly(vinyl acetate) (PVAc) and poly(vinylacetate-co-methyl methacrylate) (PVAc-co-PMMA) particles by suspension polymerization for use as drug delivery systems and embolization agents. L-asparaginase, an enzyme used for treatment of leukemia, and the biomolecules bovine serum albumin (BSA) and lysozyme were used as targets because they are very well known in the scientific literature. Besides, BSA is used for drug delivery applications and lysozyme is used as a medicine. Throughout the study, it was observed that the polymer particles presented very small specific areas because they present smooth surfaces and do not contain pores. The quantities of molecules immobilized at the best conditions reached 1 mg of BSA and 0.5 mg of lysozyme per gram of polymer, respectively. The best operation conditions were achieved at 30 °C and 250 rpm in sodium phosphate buffer, 0.05M, near the isoelectric point of the biomolecules. The analyses performed with immobilized polymer particles containing lysozyme showed that the enzyme retained its activity after the adsorption process, allowing for modification of the superficial particle properties for future medical use.

ÍNDICE

Introdução.....	1
1.1 Polímeros e Enzimas	1
1.2 Objetivo geral da Proposta de Tese.....	4
1.3 Estrutura da Tese.....	4
Capítulo 2	6
Revisão Bibliográfica - Polímeros, Enzimas e Imobilização	6
2.1 Polimerização em Suspensão.....	6
2.1.1 Polimerização em Suspensão do Tipo Pérola	7
2.1.2 Polimerização em Suspensão do Tipo Granular	7
2.1.3 Polimerização em Massa-Suspensão ou Semi-Suspensão.....	8
2.1.4 Polimerização em Suspensão Inversa.....	8
2.1.5 Polimerização em Micro-Suspensão	8
2.2 Agentes de Suspensão	8
2.3 Agitação Mecânica.....	9
2.4 Iniciadores.....	10
2.5 Efeito Gel e Vítreo	10
2.6 Vantagens e Desvantagens da Polimerização em Suspensão	11
2.7 Polímeros e Medicamentos.....	12
2.8 Agentes Embolizantes	19
2.8.1 Poli(Álcool Vinílico) (PVA) como Agente Embólico	22
2.9 Poli(Acetato de Vinila) (PVAc).....	22
2.10 Enzimas	23
2.10.1 Mercado	29
2.10.2 Principais Tipos e Usos Industriais	29
2.10.3 Ação de Inibidores.....	30
2.10.4 Imobilização de Enzimas.....	31
2.10.4.1 Métodos de Imobilização	34
2.11 Fatores Adicionais que Influenciam as Reações Enzimáticas	39
2.12 Definição da Atividade Enzimática.....	40

2.13 L-asparaginase	40
2.14 Albumina do soro bovino (BSA)	44
2.15 Lisozima	46
2.17 Leucemia Linfóide Aguda (LLA)	49
2.18 Comentários Finais.....	50
Capítulo 3	52
Objetivos do Trabalho.....	52
3.1 Objetivo Geral.....	52
3.2 Objetivos Específicos.....	52
3.3 Relevância e Justificativa	53
Capítulo 4	55
Materiais e Métodos.....	55
4.0 Metodologia Experimental	55
4.1 Unidade Experimental.....	55
4.2 Reagentes Utilizados	56
4.3 Materiais e Equipamentos	59
4.4 Reações de Polimerização em Suspensão	61
4.5 Reações de Polimerização em Suspensão no Mini-Reator.....	62
4.6 Reação de Saponificação	63
4.7 Polimerização em Miniemulsão do Acetato de Vinila.....	64
4.8 Técnica de Imobilização Enzimática.....	65
4.8.1 Imobilização de L-asparaginase.....	65
4.8.2 Imobilização de BSA.....	66
4.8.3 Imobilização de Lisozima.....	67
4.9 Método de determinação de proteína	68
4.9.1 Método de Bradford	68
4.9.2 Análise de BSA por UV	69
4.10 Atividade Enzimática	69
4.10.1 Método Fenol-Hipoclorito para Atividade da L-asparaginase.....	69
4.10.2 Medida de Atividade Enzimática de L-Asparaginase Utilizando Kit Enzimático	71
4.10.3 Medida de Atividade Enzimática da Lisozima	73
4.11 Curva de Calibração para a L-Asparaginase.....	74
4.12 Técnicas de Caracterização do Polímero.....	76

4.12.1 Microscopia Óptica	76
4.12.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	76
4.12.3 Cromatografia de Permeação a Gel (GPC).....	77
4.12.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	78
4.12.5 Análise de Tamanhos de Partículas.....	79
4.12.6 Análise Gravimétrica para Determinação de Sólidos Suspensos no Sobrenadante – Curva de Conversão	80
4.12.7 Análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	81
4.12.8 Potencial Zeta das partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA.....	82
4.12.9 Ângulo de Contato.....	84
4.12.10 Área Específica	87
Capítulo 5	88
Resultados e Discussão	88
Caracterização das Partículas de PVAc e de PVAc-co-PMMA.....	88
5.1 Reações de Polimerização em Suspensão e Emulsão para a Produção de PVAc e PVAc-co-PMMA	88
5.2 Estudo da Conversão.....	91
5.3 Microscopia Óptica	94
5.4 Resultados das Análises de GPC	98
5.5 Resultados das Análises de DSC	100
5.6 Análise da Distribuição dos Tamanhos de Partículas (DTP).....	101
5.7 Potencial Zeta das Partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA	106
5.8 Ângulo de Contato	107
5.9 Resultado das Análises de Área Específica por BET.....	109
5.10 Resultado da Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	110
5.11 Comentários Finais.....	113
Capítulo 6	114
Resultados e Discussão	114
Imobilização de L-asparaginase, BSA e Lisozima nas Partículas de PVAc e de PVAc-co-PMMA.....	114
6.1 Avaliação dos Métodos de Detecção de Proteínas.....	114
6.1.1 Avaliação do Método de Bradford.....	114
6.1.2 Avaliação do Método de Ultravioleta para determinação de BSA	116

6.2 Teste da Atividade Enzimática da L-asparaginase	117
6.3 Imobilização de L-asparaginase.....	125
6.4 Imobilização de BSA.....	128
6.4.1 Imobilização de BSA sobre Micropartícula de PVAc.....	128
6.4.2 Imobilização de BSA sobre Micropartículas de PVAc e o Efeito da Temperatura	136
6.4.3 Imobilização de BSA sobre Micropartículas de PVAc-co-PMMA	138
6.5 Estudo da Imobilização de Lisozima	141
6.5.1 Análise da Atividade Enzimática da Lisozima em Função do pH.....	141
6.5.2 Efeito do Acetato de Vinila sobre a Atividade Enzimática da Lisozima	142
6.5.3 Imobilização de Lisozima sobre as Micropartículas de PVAc	144
6.5.4 Imobilização de Lisozima em Suporte de PVAc-co-PMMA	151
6.5.5 Imobilização de BSA e Lisozima em Partículas Poliméricas Produzidas por Polimerização em Miniemulsão	158_Toc400922528
6.5.6 Cinética de Imobilização de Lisozima em Partículas Poliméricas Produzidas por Polimerização em Suspensão.....	165
6.6 Resultados das Análises de FTIR das Partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA	167
Capítulo 7	173
Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros.....	173
7.1 Trabalhos futuros	175
Bibliografia.....	177
Anexo A	195
Anexo B	198
Resultados das análises de DSC para o PVAc	198
Resultados das análises de DSC para o PVAc-co-PMMA	200

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1: Sistema complexo formado por uma cadeia polimérica e um fármaco. Adaptado de OUCH e OHYA (2006).....	13
Figura 2. 2: Rota de incorporação do medicamento pela célula. Adaptado de OUCH e OHYA (2006).....	14
Figura 2. 3: Medida da variação de atividade do consumo de asparagina com o pH para uma solução de L-asparaginase. Adaptado de ABRAHÃO et al. (1999).....	40
Figura 4. 1: Esquema simplificado da unidade experimental.	56
Figura 4. 2: Unidade experimental.	57
Figura 4. 3: Unidade experimental do mini-reator.	63
Figura 4. 4: Curva de calibração da concentração de BSA pelo método de análise por UV.....	70
Figura 4. 5: Medidas da absorvância em 450 nm de uma solução de <i>Micrococcus lysodeikticus</i> contendo lisozima.	75
Figura 4. 6: Curva de calibração para análise de solução de L-asparaginase com o método fenol-hipoclorito.....	75
Figura 4. 7: Curva de calibração para o método de Bradford, utilizando solução padrão de BSA.	76
Figura 4. 8: Equipamento usado para medida do potencial zeta.	83
Figura 4. 9: Procedimento de encaixe do tubo de acrílico ao suporte do equipamento usado para medida de potencial zeta.....	84
Figura 4. 10: Formato de uma gota sobre uma superfície, mostrando as tensões entre os três meios sólido, líquido e gasoso (YUAN e LEE., 2013).	85
Figura 4. 11: Goniômetro usado para medir o ângulo de contato.	85
Figura 4. 12: Moldes de teflon para a produção dos filmes de PVAc e PVAc-co-PMMA.....	86
Figura 4. 13: Filmes de PVAc-co-PMMA e de PVAc.	86
Figura 5. 1: Variação da conversão com o tempo para a reação de polimerização em suspensão conduzida com acetato de vinila, reação de PVAc	92
Figura 5. 2: Variação da conversão com o tempo para a reação de polimerização em suspensão conduzida com acetato de vinila e metacrilato de metila para produzir o PVAc-co-PMMA.....	93

Figura 5. 3: Variação da conversão versus com o tempo para a reação de polimerização em emulsão conduzida com acetato de vínica.	94
Figura 5. 4: Micrografia óptica das partículas de PVAc-co-PMMA obtidas com monômero destilado no ensaio R-1-PVAc-PMMA.	95
Figura 5. 5: Micrografia óptica das partículas de PVAc-co-PMMA obtidas com monômero de VAc destilado no ensaio R-2-PVAc-PMMA.	96
Figura 5. 6: Micrografia óptica das partículas de PVAc-co-PMMA obtidas com monômero de VAc destilado no ensaio R-3-PVAc-PMMA.	97
Figura 5. 7: Micrografia óptica das partículas de PVAc obtidas com monômero de VAc não destilado no ensaio R-4-PVAc.	97
Figura 5. 8: Micrografia óptica das partículas de PVAc obtida com monômero de VAc não destilado depois da etapa de saponificação no ensaio R-4-PVAc _{sap}	98
Figura 5. 9: Distribuições de tamanhos das partículas para amostras dos produtos finais dos ensaios (a) R-1-PVAc-PMMA. (b) R-2-PVAc-PMMA.	102
Figura 5. 10: Distribuições de tamanhos de partícula para amostras dos produtos finais dos ensaios (a) R-3-PVAc-PMMA. (b) R-4-PVAc.	103
Figura 5. 11: Distribuições de tamanhos de partícula para amostras do produto final do ensaio R-6-PVAc no mini-reator.	104
Figura 5. 12: Distribuições de tamanhos de partícula para amostras do produto final do ensaio R-5-PVAc.	105
Figura 5. 13: Distribuições de tamanhos de partícula para amostras do produto final do ensaio R-5-PVAc.	105
Figura 5. 14: Potencial zeta de amostra das partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA.	107
Figura 5. 15: Forma da gota de água sobre uma membrana de PVAc.	108
Figura 5. 16: Forma da gota de água sobre uma membranas de PVAc-co-PMMA.	109
Figura 5. 17: Espectro de ¹ H RMN para o PVAc.	111
Figura 5. 18: Espectro de ¹³ C RMN para o PVAc.	111
Figura 5. 19: Espectro de ¹ H RMN para uma amostra de PVAc-co-PMMA.	112
Figura 5. 20: Espectro de ¹³ C RMN para uma amostra de PVAc-co-PMMA.	113
Figura 6. 1: Avaliação da precisão das análises de Bradford para duas soluções de L-asparaginase diferentes, na concentração nominal de 0,07 g.L ⁻¹	115

Figura 6. 2: Presença de interferentes durante medidas por ultravioleta a 280 nm de uma solução tampão, sem a presença de BSA, em contato com partículas de PVAc. Experimento realizado em duplicata.....	117
Figura 6. 3: Cinética da reação enzimática da L-asparaginase em tampão tris/HCl 50 mM, pH 8,6 e T = 37°C: (a) dados completos e (b) zoom da parte linear.	119
Figura 6. 4: Evolução da concentração de amônia nos ensaios enzimáticos com L-asparaginase: (a) concentrações de amônia e (b) média das concentrações de amônia e respectivas barras de erros.....	120
Figura 6. 5: (a) Atividade de L-asparaginase em acetato de vínila puro. (b) Atividade de L-asparaginase em mistura contendo 32,35% (m/m) de acetato de vínila em dispersão aquosa.....	121
Figura 6. 6: (a) Atividade de L-asparaginase em tampão tris/HCl a 70 °C durante duas horas. (b) Atividade enzimática na mistura contendo 32,25% (m/m) de acetato de vínila e 67,75% (v/v) de tampão tris/HCl a 70 °C por duas horas.	121
Figura 6. 7: Avaliação da atividade de L-asparaginase em tampão tris/HCl 50 mM e pH 8,6 por um período de 11 dias armazenada em geladeira.	123
Figura 6. 8: Dados de concentração de L-asparaginase no sobrenadante na presença de partículas de PVAc para dois sistemas: (a) duas amostras de PVAc em diferentes temperaturas a 200 rpm (b) e réplicas de duas amostras de PVAc a 4 °C e 200 rpm. .	125
Figura 6. 9: Dados de concentração de L-asparaginase no sobrenadante na presença de partículas de PVAc-co-PMMA (a) e PVAc-PVA (b) na temperatura de 4 °C e a 200 rpm.	126
Figura 6. 10: Concentração de BSA no sobrenadante em contato com as partículas de PVAc, em diferentes pH's, na agitação de 250 rpm e temperatura de 30 °C.	129
Figura 6. 11: Cinética da concentração da BSA nos sobrenadante em contato com as partículas de PVAc no pH 3,00, na temperatura de 30 °C e 250 rpm.	131
Figura 6. 12: Cinética da concentração da BSA nos sobrenadantes em contato com as partículas de PVAc no pH 5,00, na temperatura de 30°C e 250 rpm.	131
Figura 6. 13: Cinética da concentração da BSA nos sobrenadantes em contato com as partículas de PVAc no pH 6,80, na temperatura de 30°C e 250 rpm.	132
Figura 6. 14: Cinética da concentração da BSA nos sobrenadantes em contato com as partículas de PVAc no pH 8,60, na temperatura de 30°C e 250 rpm.	133
Figura 6. 15: Cinética da concentração de BSA nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc no pH 5,00, temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.....	134

Figura 6. 16: Cinética da concentração de BSA nos sobrenadantes em contato com as partículas de PVAc no pH 6,80, temperatura de 30°C e agitação de 250 rpm.....	135
Figura 6. 17: Cinética da concentração de BSA nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc, na temperatura de 10°C e agitação de 250 rpm, em diferentes pH's.	137
Figura 6. 18: Concentração de BSA no sobrenadante em contato com as partículas de PVAc-co-PMMA, em diferentes condições de pH's, na agitação de 250 rpm e temperatura de 30 °C.....	139
Figura 6. 19: Cinética de concentração de BSA nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc-co-PMMA a 30 °C e 250 rpm, em diferentes pH's como função do tempo.....	140
Figura 6. 20: Atividade enzimática da lisozima como função do pH em solução de fosfato de sódio 0,05 M, na temperatura de 25 °C.....	142
Figura 6. 21: Efeito da concentração de acetato de vinila sobre a atividade da lisozima, na temperatura de 25 °C.....	143
Figura 6. 22: Cinética de concentração de lisozima nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc, no pH 3,00, na temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.	144
Figura 6. 23: Cinética da concentração de lisozima nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc, no pH 5,00, na temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.	145
Figura 6. 24: Cinética da concentração de lisozima nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc, no pH 6,80, na temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.	146
Figura 6. 25: Cinética da concentração de lisozima nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc, no pH 8,60, na temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.	146
Figura 6. 26: Cinética da concentração de lisozima nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc, no pH 10,80, na temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm. ...	147
Figura 6. 27: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc, no pH 3,00, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.	148
Figura 6. 28: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc, no pH 5,00, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.	149
Figura 6. 29: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc, no pH 6,80, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.	149
Figura 6. 30: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc, no pH 8,60, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.	150

Figura 6. 31: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc, no pH 10,80, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.	150
Figura 6. 32: Cinética da concentração de lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 3,0, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.....	152
Figura 6. 33: Cinética da concentração de lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 5,0, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.....	153
Figura 6. 34: Cinética da concentração de lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 6,8, a temperatura de 30°C e agitação de 250 rpm.....	154
Figura 6. 35: Cinética da concentração de lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 8,6, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.....	154
Figura 6. 36: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 3,0 a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.....	155
Figura 6. 37: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 5,0, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.....	156
Figura 6. 38: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 6,8, a temperatura de 30°C e agitação de 250 rpm.....	156
Figura 6. 39: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 8,6, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.....	157
Figura 6. 40: Coagulação da emulsão de PVAc com a solução de lisozima em pH 8,60. (a) emulsão de PVAc e (b) emulsão de PVAc em solução de lisozima 0,1 g.L ⁻¹	160
Figura 6. 41: Coagulação da emulsão de PVAc com a solução tampão fosfato em pH 8,60.....	160
Figura 6. 42: Coagulação do látex de PVAc com a solução tampão fosfato 0,05 M no pH8,60, com a concentração de 0,1 g.L ⁻¹ de BSA, e solução tampão fosfato 0,05 M no pH 5,00, com concentração de 0,1 g.L ⁻¹ de lisozima.....	161

Figura 6. 43: Coagulação da emulsão de PVAc com a solução tampão fosfato em diferentes pHs com a concentração de 0,1 g.L ⁻¹ de BSA ou de lisozima.	161
Figura 6. 44: Isoterma de adsorção de lisozima no tempo inicial.	163
Figura 6. 45: Isoterma de adsorção de lisozima após 24 horas.	163
Figura 6. 46: Isoterma de adsorção de lisozima após 24 horas.	164
Figura 6. 47: Análise da atividade enzimática da partículas de PVAc em emulsão após processo de imobilização de 24 horas.	164
Figura 6. 48: Cinética de concentração da lisozima no sobrenadante em contato com as partículas de PVAc, medida pelo método de Bradford.	165
Figura 6. 49: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc.	166
Figura 6. 50: Cinética de concentração de lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, medida pelo método de Bradford.	167
Figura 6. 51: Atividade enzimática da lisozima em sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA.	168
Figura 6. 52: Espectrograma de FTIR de partículas de PVAc.	168
Figura 6. 53: Espectrograma de FTIR de partículas de PVAc-co-PMMA.	169
Figura 6. 54: Espectrograma de FTIR da BSA.	170
Figura 6. 55: Espectrograma de FTIR da lisozima.	171
Figura 6. 56: Espectrograma de FTIR da adsorção da lisozima sobre o suporte de PVAc.	172
Figura 6. 57: Espectrograma de FTIR da adsorção da lisozima e BSA sobre o suporte de PVAc-co-PMMA.	172
Figura B. 1: Curva de DSC do produto da reação R-11- PVAc.	198
Figura B. 2: Curva de DSC do produto da reação R-10- PVAc.	198
Figura B. 3: Curva de DSC do produto da reação R-7- PVAc.	199
Figura B. 4: Curva de DSC do produto da reação R-6- PVAc.	199
Figura B. 5: Curva de DSC de uma das reações de PVAc-co-PMMA.	200
Figura B. 6: Curva de DSC de uma das reações de PVAc-co-PMMA.	200
Figura B. 7: Curva de DSC da amostra de PVAc em emulsão.	201

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2. 1: Relação de algumas enzimas utilizadas como medicamentos. Adaptado de VELLARD, (2003).	27
Tabela 2. 2: Relação de enzimas empregadas na área médica. Adaptado de VELLARD, (2003).	28
Tabela 4. 1: Quantidades de reagentes utilizadas nas reações de polimerização.	61
Tabela 4. 2: Condições da polimerização em suspensão.	62
Tabela 4.3: Quantidade de reagentes utilizadas nas reações de polimerização no sistema do mini-reator.	64
Tabela 4. 4: Reagentes e quantidades usadas na preparação da solução de Bradford.	68
Tabela 4. 5: Resumo das quantidades em volume para aplicação do kit enzimático.	73
Tabela 4. 6: Relação da área superficial específica de alguns materiais comerciais e poliméricos produzidos no LMSCP.	87
Tabela 5. 1: Reações de polimerização em suspensão.	90
Tabela 5. 2: Massas molares médias e índices de polidispersão de amostras obtidas nos ensaios de polimerização.	99
Tabela 5. 3: Resumo das análises de DSC de amostras obtidas em diferentes ensaios.	101
Tabela 5. 4: Diâmetros ponderais médios das partículas poliméricas produzidas nos diferentes ensaios.	106
Tabela 5. 5: Áreas específicas das partículas poliméricas com diâmetro padronizado.	110
Tabela 6. 1: Quadruplicatas medidas com o kit enzimático para a detecção de amônia produzida pela ação da L-asparaginase.	119
Tabela 6. 2: Caracterização estatística dos dados de concentração de amônia coletados nos ensaios enzimáticos com L-asparaginase.	120
Tabela 6. 3: Resumo das atividades enzimáticas medidas em diferentes condições.	124
Tabela 6. 4: Adsorção de BSA em micropartículas de PVAc.	136
Tabela 6. 5: Adsorção de BSA em micropartículas de PVAc-co-PMMA.	141
Tabela 6. 6: Adsorção de lisozima em micropartículas de PVAc.	151

Tabela 6. 7: Adsorção de lisozima em micropartículas de PVAc-co-PMMA.	157
Tabela 6. 8: Taxa de adsorção de lisozima sobre os suportes de PVAc e PVAc-co-PMMA produzidos por polimerização em suspensão.	167

Capítulo 1

Introdução

1.1 Polímeros e Enzimas

Polímeros são materiais utilizados em vasta gama de aplicações em nosso cotidiano, nas mais diferentes áreas, como na engenharia mecânica, engenharia civil, engenharia aeroespacial, engenharia biomédica, entre outras. Os materiais poliméricos possuem várias propriedades úteis, como dureza, flexibilidade, cristalinidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, resistência a reagentes, permeabilidade (parcial e seletiva a certos produtos) que tornam esses materiais importantes matérias-primas para diferentes processos e aplicações. Em geral, pode ser encontrado ao menos um polímero com as propriedades adequadas para a maior parte das aplicações (RODRIGUEZ *et al.*, 2003).

Devido ao grande número de polímeros distintos produzidos atualmente e às diferentes características que podem ser apresentadas por estes materiais, polímeros ocupam uma posição importante na indústria química. A cada ano, a produção de materiais poliméricos tem aumentado de forma contínua, levando também ao aumento de pesquisas na área e ao aperfeiçoamento dos profissionais que atuam nesse setor.

Os benefícios trazidos pelos materiais poliméricos não podem ser resumidos em apenas dois parágrafos, sendo necessário um estudo extenso para traduzir de forma fiel as muitas possíveis aplicações desses materiais. Para um estudo mais abrangente sobre as aplicações desses materiais, recomenda-se o trabalho de PINTO *et al.*, (2012), em que os autores relatam de forma ampla a importância e as muitas aplicações dos materiais plásticos. Para que se tenha uma ideia sobre o tamanho do setor dos materiais poliméricos, a produção de materiais plásticos em 2010 foi igual a 265 milhões de

toneladas (PINTO *et al.*, 2012). Ainda segundo PINTO *et al.*, (2012), o maior produtor mundial de plásticos é a China, ficando em segundo e terceiro lugares a União Europeia e a América do Norte, respectivamente. O Brasil responde por cerca de 12% do mercado mundial de materiais plásticos.

No presente trabalho, os objetivos perseguidos estão relacionados a aplicações nas áreas biomédicas e biotecnológicas. Os polímeros vêm sendo aplicados em diversas áreas da medicina e da farmacologia há bastante tempo (HAMIDI *et al.*, 2008). Foram desenvolvidas aplicações desses materiais na área da engenharia tissular (BARBANTI, *et al.*, 2005), como enxerto (KATO *et al.*, 2003), como veículos de medicamento (KOPELMAN *et al.*, 2008), para a construção de válvulas e órgãos do sistema animal e muitas outras. A flexibilidade desses materiais é o ponto chave do sucesso da utilização dos polímeros na área médica. A cada ano, novos polímeros são inventados com novas propriedades e outros polímeros já existentes são aperfeiçoados, tornando a ciência que estuda os polímeros um vasto e dinâmico campo de atuação. Um estudo abrangente sobre o assunto foi realizado por ORÉFICE *et al.* (2012). Os autores descrevem de forma detalhada a aplicação de diferentes materiais nas áreas biomédicas como biomateriais.

Outro setor que tem crescido de forma expressiva é aquele relacionado ao estudo das enzimas. Enzimas são catalisadores naturais que possuem seletividade específica para certas reações químicas, agindo sobre determinados substratos e produzindo produtos com alta pureza. Esses catalisadores biológicos são ativos em condições brandas e vêm sendo usados pelo o homem há séculos. É difícil saber ao certo quando as enzimas começaram a ser empregadas, mas sabe-se que estes catalisadores já eram empregados na Antiguidade para a produção de bebidas fermentadas (COELHO *et al.*, 2008).

A ciência que estuda as enzimas é a Enzimologia, que hoje se encontra dividida em várias subáreas. Na atualidade as enzimas são empregadas em diversos setores industriais, principalmente no segmento alimentício. Para citar algumas aplicações das enzimas, é possível mencionar a produção de detergentes, de isômeros ópticos ativos e de medicamentos. Muitas drogas disponíveis nas prateleiras das farmácias para combate de doenças, como enfarte e câncer, são compostas por enzimas (CABRAL *et al.*, 2003).

Uma propriedade importante das enzimas é a capacidade de interagir com diversos suportes orgânicos e inorgânicos por intermédio de diferentes tipos de ligações, para produzir catalisadores enzimáticos suportados e imobilizados. A imobilização das

enzimas pode aumentar a estabilidade em relação a modificações da temperatura e pH do meio da reação e a resistência a solventes, permitindo também a reutilização. As enzimas geralmente são caras; portanto, recuperar e reutilizar enzimas em um processo industrial constitui um fato de extrema importância (BORZANI *et al.*, 2005).

Uma enzima utilizada como medicamento é a L-asparaginase. Descoberta no começo da década de 70, essa enzima é produzida por vários micro-organismos e possui características anti-tumorais, podendo ser utilizada no combate ao câncer. É importante enfatizar que nem toda L-asparaginase produzida por micro-organismo possui atividade anti-tumoral, sendo esta atividade encontrada nas enzimas produzidas por *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora*, entre outras. A L-asparaginase é utilizada principalmente no combate da leucemia linfóide aguda (LLA), um câncer que ataca as células brancas da corrente sanguínea, afetando o sistema imunológico do indivíduo (LABROU *et al.*, 2005).

Atualmente a administração da L-asparaginase é realizada por doses diárias de injeções parenterais de 10 a 200 U/kg/dia. Essa alta dose ocorre porque a inativação da enzima na corrente sanguínea acontece de maneira rápida. Assim, é necessário fazer frequentes injeções para manter os níveis terapêuticos nos tecidos tratados. A L-asparaginase também causa alguns efeitos tóxicos, como hiperglicemia, queda da albumina sérica, de lipoproteínas e de fibrinogênio, além de poder causar hipersensibilidade. A utilização de um complexo PEG¹-asparaginase pode resultar em algumas vantagens em relação ao método de administração direta do medicamento, como prolongamento da atuação do fármaco, estabilização do medicamento, controle de taxa de liberação da droga, controle do local de liberação do fármaco, bioconjugação, dentre outras (LOWE *et al.*, 2005).

Outras enzimas muito usadas são a albumina de soro bovino (BSA) e a lisozima. A BSA e a lisozima são usadas como moléculas para avaliar suportes. A BSA também é aplicada no processo de transporte de medicamento e a lisozima é usada em processos de lise celular e como medicamento e antibiótico. A BSA e a lisozima são muito usadas para diferentes fins na literatura, elas constituem excelentes moléculas alvos para estudos de adsorção.

¹ Poli(etileno glicol)

1.2 Objetivo geral da Proposta de Tese

O objetivo fundamental do presente trabalho é avaliar o uso de alguns materiais poliméricos como suportes para a imobilização de enzimas com propriedades farmacológicas, como a L-asparaginase, a BSA e a lisozima. Eventualmente, pretende-se usar os suportes também como agentes embolizantes. Dessa forma, agentes embólicos dopados com L-asparaginase podem ser futuramente introduzidos até o tecido doente por catéter, combinando o efeito mecânico de bloqueio do fluxo de sangue para o tumor com a ação anti-tumoral da enzima. Por essa razão, os suportes poliméricos usados nesse trabalho são micropartículas de poli(acetato de vinila) (PVAc) e poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila) (PVAc-co-PMMA), já usados com sucesso em estudos de embolização (PEIXOTO, 2007; OLIVEIRA, 2011) para tratamento de tumores. Não existem hoje estudos sobre como essas micropartículas poliméricas interagem com enzimas potencialmente úteis para a futura produção de quimio-embolizantes.

1.3 Estrutura da Tese

Este trabalho está dividido em seis capítulos, incluindo esta Introdução. No Capítulo 2, é realizada uma revisão bibliográfica sobre os métodos de polimerização em suspensão, usados para produzir os suportes (micropartículas ou agentes embolizantes). Apresentam-se também os agentes embólicos aplicados para o tratamento do câncer. Faz-se ainda uma discussão sobre as principais características, atuação e aplicações das enzimas. As vantagens e desvantagens da utilização de catalisadores biológicos como medicamento são apresentadas, discutindo-se também o problema de imobilização. Será descrita a utilização da BSA e da lisozima como moléculas alvos para estudos do processo de adsorção. Finalmente, é realizada uma discussão sobre a enzima L-asparaginase e a leucemia linfóide aguda. No Capítulo 3, apresenta-se a proposta geral do trabalho. São discutidos o objetivo geral e os objetivos específicos perseguidos, assim como é feita uma descrição sobre a importância e as justificativas para realização do presente trabalho. No Capítulo 4, é feita a apresentação e a descrição da metodologia experimental utilizada. O Capítulo 5 apresenta então os resultados de caracterização dos suportes poliméricos produzidos e, no Capítulo 6, são apresentados os resultados relacionados à imobilização das moléculas biológicas estudadas no presente trabalho. Finalmente, o Capítulo 7 apresenta as principais conclusões obtidas e algumas

perspectivas futuras. No final do trabalho, apresentam-se as referências bibliográficas consultadas para a realização desta tese.

O presente trabalho foi realizado no EngePol (Laboratório de Engenharia de Polímeros do Programa de Engenharia Química da COPPE da Universidade Federal do Rio de Janeiro), no LMSCP (Laboratório de Modelagem, Simulação e Controle de Processo) e no Laboratório de Bioprocessos. Algumas análises foram realizadas no IMA (Instituto de Macromolécula) e no LADEQ (Laboratório de Engenharia Química, da Escola de Química).

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica - Polímeros, Enzimas e Imobilização

Este capítulo trata da técnica utilizada para a produção de partículas poliméricas por meio do processo de polimerização em suspensão. É discutida a utilização de materiais poliméricos na área de farmacologia, como suporte para imobilização de biomoléculas e para o transporte de fármacos. Além disso, é apresentada uma breve discussão a respeito das enzimas e seu uso como medicamentos. Finalmente, é apresentada uma discussão sobre a técnica de imobilização de enzimas.

2.1 Polimerização em Suspensão

A polimerização em suspensão é um processo heterogêneo de reação, que consiste na suspensão inicial de um monômero na forma de gotas em uma fase contínua, que geralmente é a água. As gotas do monômero são mantidas em suspensão e impedidas de aglomerar por intermédio da combinação de agitação vigorosa do meio e da adição de um ou mais agentes estabilizantes. Os agentes estabilizantes podem ser um polímero solúvel em água, como o poli(álcool vinílico) (PVA), ou compostos inorgânicos insolúveis em água, como o fosfato de cálcio (ODIAN, 2004). Neste tipo de polimerização, o iniciador sempre é solúvel no monômero, como a maior parte dos peróxidos orgânicos. Em geral, admite-se que cada gota do monômero em suspensão se

comporta como um micro-reator, onde ocorre uma polimerização em massa. Por isso, admite-se que a cinética da polimerização em suspensão seja similar à cinética da polimerização em massa.

A polimerização em suspensão pode ser entendida como uma sequência de três etapas. Inicialmente, o que existe é uma dispersão do monômero líquido em pequenas gotas, que são estabilizadas pela ação do agente de suspensão e da agitação do sistema. Na segunda etapa, à medida que a conversão aumenta, desenvolve-se um equilíbrio dinâmico, usualmente reportado como equilíbrio de quebra-coalescência. Os fenômenos de quebra e coalescência das gotas determinam o tamanho final das partículas. Ao entrar em contato com o agitador (zona de alta tensão de cisalhamento), as gotas se quebram, enquanto longe do impelidor as gotas tendem a coalescer por causa das viscosidades crescentes. Na terceira etapa do processo, as gotas atingem uma viscosidade tão alta que se tornam partículas poliméricas sólidas, não ocorrendo mais nem a quebra nem a coalescência, fazendo com que as partículas mantenham o tamanho constante. Os diâmetros característicos das partículas normalmente se encontram na faixa de 50 μm a 1000 μm (ODIAN, 2004).

2.1.1 Polimerização em Suspensão do Tipo Pérola

A polimerização em suspensão do tipo pérola é caracterizada pela solubilidade do polímero formado no seu próprio monômero. A distribuição de tamanhos de partículas da resina obtida depende da distribuição de tamanhos das gotas de monômeros no início da reação e da política de operação do processo. O produto final obtido apresenta formato esférico. Um exemplo típico desse processo é a produção de poliestireno.

2.1.2 Polimerização em Suspensão do Tipo Granular

No caso da polimerização em suspensão granular, o polímero final é insolúvel no monômero e, por isso, precipita, levando à formação de partículas irregulares e opacas. Como a fase dispersa é constituída por uma suspensão de polímeros em monômero, o aumento de viscosidade nas gotas ocorre de forma muito mais lenta. As partículas finais obtidas têm a aparência de cachos de uvas, formados por aglomerados de partículas menores. Um exemplo típico desse processo é a produção de poli(cloreto de vinila) (PVC).

2.1.3 Polimerização em Massa-Suspensão ou Semi-Suspensão

A semi-suspensão é conduzida em duas etapas. A primeira etapa consiste em dissolver um determinado iniciador em um monômero e deixar a polimerização em massa ocorrer, até atingir uma conversão na faixa de 25-35%. Em seguida, a mistura é colocada em um reator, que contém estabilizante e o meio dispersante (água), dando início a uma polimerização em suspensão clássica, que prossegue até a conversão desejada. Essa técnica é usada para produzir poliestireno de alto impacto.

2.1.4 Polimerização em Suspensão Inversa

A polimerização em suspensão inversa é caracterizada pela solubilidade do monômero na fase aquosa. Dessa forma, a fase contínua não pode ser aquosa, devendo ser constituída por um solvente no qual o monômero seja insolúvel. A produção de poli(ácido acrílico) e de poli(acrilamida) pode ser realizada por esse processo.

2.1.5 Polimerização em Micro-Suspensão

A polimerização em micro-suspensão permite a obtenção de partículas muito pequenas, com tamanhos médios inferiores a 1 μm , diferentemente dos processos clássicos de suspensão. Nesse caso, a mistura reacional é agitada vigorosamente, empregando-se taxas de cisalhamento decorrentes de velocidades de agitação que podem chegar até a 10000 rpm, na presença de coquetéis de agentes estabilizantes. Não existem ainda processos industriais comercialmente relevantes de micro-suspensão.

2.2 Agentes de Suspensão

O agente de suspensão (ou estabilizante) é um ingrediente indispensável na polimerização em suspensão, atuando diretamente na morfologia e distribuição final de tamanhos de partícula da resina. O agente em suspensão atua na interface água/monômero, promovendo a dispersão das gotas de monômero pela redução da tensão superficial e produzindo uma fina camada, que previne a coalescência descontrolada (YUAN *et al.*, 1991). Consequentemente, os agentes de suspensão afetam o equilíbrio entre as taxas de quebra e coalescência ao longo de todo o processo, deslocando os tamanhos de partículas para valores menores.

Três tipos principais de estabilizantes são empregados nas polimerizações em suspensão: os polímeros parcialmente solúveis em água, os compostos inorgânicos insolúveis em água e as respectivas misturas (contendo, por exemplo, polímeros orgânicos e sais inorgânicos). No primeiro tipo, os exemplos mais comuns são o poli(álcool vinílico), a hidroxipropil celulose e o poliestireno sulfonato de sódio. Os compostos inorgânicos usados mais comumente incluem hidroxiapatita, sulfato de bário, caolin, carbonato de magnésio e hidróxido de magnésio. Os sais inorgânicos usados como agentes de suspensão apresentam algumas vantagens, frente aos estabilizantes poliméricos. Dentre essas, destacam-se os fatos de serem mais baratos, causarem menor impacto ambiental e não formarem um filme permanente sobre a superfície das partículas, de maneira que os sais podem ser facilmente retirados do produto final por lavagem (YUAN *et al.*, 1991). A quantidade de estabilizantes usada corresponde a cerca de 0,1% da quantidade total de água empregada, embora quantidades maiores possam ser usadas. O agente em suspensão não deve formar micelas no meio aquoso, como acontece no processo de polimerização em emulsão, para evitar a formação de finos quando as micelas absorvem monômero do meio.

2.3 Agitação Mecânica

A agitação mecânica também é uma variável muito importante para o processo de polimerização em suspensão, causando efeitos conflitantes sobre a distribuição final de tamanhos de partículas (ODIAN, 2004). Um aumento na agitação melhora a mistura de componentes e a transferência de calor; porém, causa um aumento na taxa de quebra das gotas de monômeros, o que leva à diminuição do tamanho médio das partículas. Ao mesmo tempo, o aumento da agitação diminui a camada protetora formada pelo agente de suspensão. Como a energia das colisões aumenta, as partículas tendem a se aglomerar. Assim, o aumento da velocidade de agitação provoca o aparecimento de um ponto de mínimo na curva de tamanho médio de partículas (ODIAN, 2004). Nas velocidades menores, os tamanhos médios são maiores por causa das menores taxas de quebramento; nas velocidades muito maiores, os tamanhos médios são maiores por causa das maiores taxas de coalescência.

2.4 Iniciadores

Quando a polimerização está baseada em monômeros vinílicos, a polimerização ocorre usualmente por intermédio do mecanismo de radicais livres. Neste tipo de polimerização, é necessário gerar radicais livres para que a reação ocorra. A geração desses radicais pode ocorrer por vários mecanismos, com auxílios de métodos térmicos, métodos fotoquímicos e métodos de oxirredução (ODIAN, 2004). Uma espécie química que possui a capacidade de formar radicais livres por um desses métodos é usada para iniciar a reação, sendo chamada de iniciador. Usualmente, o método usado é o de decomposição térmica, pela facilidade de emprego e pelos menores custos. Nesse caso, a temperatura do meio reacional é ajustada ao tempo de meia-vida do iniciador utilizado (o tempo de meia-vida é o tempo necessário para que 50% do iniciador alimentado decomponham-se na temperatura especificada) (ODIAN, 2004).

Na polimerização em suspensão, o iniciador empregado é solúvel na fase orgânica, sendo denominado de iniciador solúvel em óleo. A alimentação do iniciador é normalmente feita por meio da completa dissolução na carga do monômero. A quantidade empregada fica usualmente na faixa de 0,1 a 0,5% em massa de monômero (BILLMEYER, 1975).

Os iniciadores mais empregados são o peróxido de benzoíla (BPO), que tem a vantagem de ser barato, e os azocompostos, importantes quando se pretende minimizar o conteúdo de ramificações. Os iniciadores geram radicais livres quando se decompõem. Por serem espécies extremamente reativas e pouco específicas, os radicais livres se mantêm estáveis por muito pouco tempo no solvente, monômero ou polímero. Se o meio apresenta resistência à difusão dessas espécies, elas podem se combinar ou sofrer terminação antes de iniciarem as moléculas de monômeros. Com isso, a eficiência do iniciador é reduzida, caracterizando o efeito gaiola (ou *cage effect*) (ODIAN, 2004).

2.5 Efeito Gel e Vítreo

O efeito gel, também conhecido como efeito Trommsdorf ou efeito Norrish-Smith, é relacionado à queda apreciável das taxas de terminação, ocasionada pela diminuição da mobilidade das cadeias, devido ao aumento da viscosidade do meio. Uma consequência do efeito gel é o aumento das taxas de reação por causa do aumento da

concentração de radicais (STEVENS, 1999), provocando dessa maneira uma auto-aceleração da reação. Esse fenômeno pode resultar em descontrole térmico do processo.

Normalmente, numa batelada espera-se que a taxa de reação diminua com o tempo, principalmente por causa do consumo dos reagentes. Na presença do efeito gel pode ocorrer o oposto, observando-se a aceleração da cinética de reação quando as conversões atingem faixas de 20-40% (ODIAN, 2004). Esse fenômeno influencia as propriedades finais do produto, gerando distribuições de tamanhos de partícula e de massas molares mais amplas.

Outro efeito bastante comum na polimerização radicalar é o efeito vítreo, que ocorre quando as taxas de propagação são também afetadas pelas resistências difusionais. Este efeito ocorre em conversões muito elevadas, uma vez que as moléculas de monômeros não têm alta mobilidade. A ocorrência do efeito vítreo está associada também à temperatura do meio reacional. A temperatura de transição vítrea (T_g) do meio reacional tende a aumentar com a conversão de monômero. A polimerização cessa (ou a velocidade de reação se reduz dramaticamente) se a T_g da mistura polimérica formada excede a temperatura da reação, pois a mobilidade molecular do meio fica muito baixa (ODIAN, 2004). À medida que a conversão aumenta, a fração da fase polimérica também aumenta, fazendo com que esta passe gradualmente para o estado sólido (vítreo). Assim, quando a polimerização é realizada a uma temperatura inferior à temperatura de transição vítrea do material, observa-se a diminuição brusca da constante de propagação da reação a partir de certa conversão crítica, influenciada pela menor mobilidade das moléculas de monômero na fase dispersa do sistema (MELO, 2009).

2.6 Vantagens e Desvantagens da Polimerização em Suspensão

As principais vantagens dos processos de polimerização em suspensão são:

- facilidade de remoção de calor e baixas viscosidades, por causa da baixa viscosidade da fase dispersa;
- baixos níveis de impurezas e baixo custos de separação dos produtos, por causa dos poucos componentes da receita e alta velocidade de decantação das partículas;
- as partículas obtidas têm formato bem definido, porque é possível controlar o tamanho médio final, por meio de manipulação de variáveis operacionais, como velocidade de agitação e a concentração de agente de suspensão;

- as distribuições de tamanho das partículas podem ser manipuladas e ajustadas na faixa de 20 a 2000 μm , intervalo bastante grande para acomodar a maior parte das aplicações de interesse;

As principais desvantagens dos processos de polimerização em suspensão são:

- acúmulo de material nas paredes do reator (*fouling*), ocasionando perdas e incrustações, que prejudicam o desempenho térmico do processo;
- processos contínuos ainda não estão disponíveis em escala industrial, principalmente por causa do “*fouling*”;
- não é possível a produção de copolímeros homogêneos, a não ser que um dos monômeros seja solúvel em água, por causa das diferentes reatividades dos diferentes monômeros (MACHADO *et al.*, 2007);
- em comparação com a polimerização em massa, promove decréscimo de produtividade, já que o agente dispersante (água) ocupa pelo menos cerca de 50 a 60% do volume útil do reator.

2.7 Polímeros e Medicamentos

Por volta de 1950, os químicos começaram a encapsular medicamentos em partículas de polímeros para melhorar o desempenho do fármaco (SHERWOOD *et al.*, 1996). Os métodos convencionais para administração de medicação, como pílulas, pomadas e soluções injetáveis, têm sido substituídos progressivamente por métodos que utilizam partículas poliméricas como veículos, melhorando assim sua atuação no organismo (FIGUEROLA *et al.*, 2010).

Os sistemas polímeros-fármacos podem ter a forma de um disco, bastão, pellets ou microesferas. Vários produtos comerciais são baseados em microesferas, tal como o Lupron Depot e Nutropin Depot (KIM *et al.*, 2009).

O poli(etileno glicol) (PEG) é usado extensivamente como carregador de medicamento em diversos dispositivos medicamentosos, como o complexo PEG-uricase (usado em paciente com hiperuricemia e com gota aguda), o complexo PEG-asparaginase (usado para o tratamento de pacientes com leucemia) e o complexo PEG-adenosina deaminase (usado em pacientes com imunodeficiência) (LANGER, 2007). Na Figura 2.1 é apresentado um esquema ilustrativo da formação de um complexo que contém um polímero e um fármaco ligado a ele. Na figura, a cadeia polimérica forma

uma base (suporte) que se liga à droga por intermédio de algum tipo de ligação química. Em muitas aplicações é conveniente que a ligação seja biodegradável, para que o fármaco possa ser liberado. O grupo alvo ilustra o grupo químico existente na cadeia polimérica e que é usado para interagir química ou fisicamente com o fármaco.

Os benefícios de usar dispositivos poliméricos para o transporte e liberação controlada de medicamentos são (HUANG e GUO, 2014);

- atuação mais eficiente do medicamento e redução de efeitos colaterais, já que é possível usar menores quantidades do fármaco no tecido vivo;
- o nível do medicamento pode ser mantido na corrente sanguínea, se a liberação for controlada pela difusão na partícula;
- as dosagens de medicação no paciente podem ser realizadas em um período de tempo mais longo, por conta da redução da degradação do fármaco nos tecidos e órgãos;
- proteção do princípio ativo do medicamento contra a rápida eliminação ou metabolização, já que a partícula protege a molécula bioativa pela combinação de efeitos físicos e químicos.

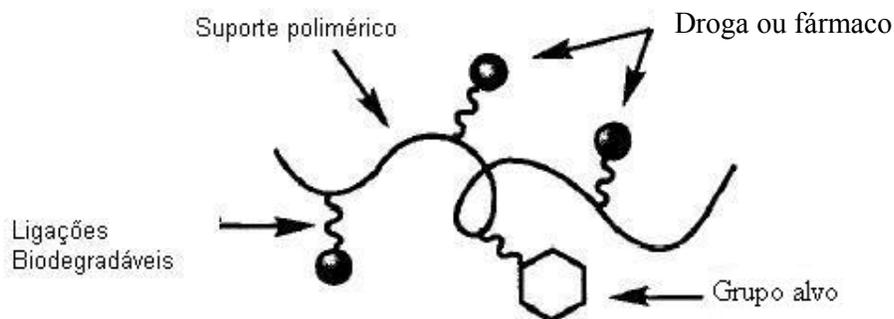


Figura 2. 1: Sistema complexo formado por uma cadeia polimérica e um fármaco.

Adaptado de OUCH e OHYA (2006).

Os sistemas de liberação de medicamentos envolvem dois aspectos fundamentais: a liberação controlada e a atuação específica. Tipicamente as drogas são ligadas covalentemente ao suporte polimérico, o que pode modificar as propriedades químicas do material (OUCH e OHYA, 2006; HUANG e GUO, 2014).

Os fármacos suportados por polímeros podem entrar nas células por duas formas: difusão do medicamento liberado até a célula ou endocitose, quando o suporte e

a medicação são englobados pela a célula. A Figura 2.2 ilustra essas duas rotas de incorporação do medicamento pela célula. Uma das finalidades de usar um suporte polimérico para o carregamento de fármacos é o fato de que os medicamentos são usualmente constituídos por moléculas de baixa massa molar. Por isso, o transporte dos fármacos através da membrana plasmática ocorre de forma rápida por processo de difusão. Por outro lado, as macromoléculas normalmente não passam através da membrana plasmática por difusão, de maneira que a captura pela célula é realizada por endocitose, como apresentado na Figura 2.2.

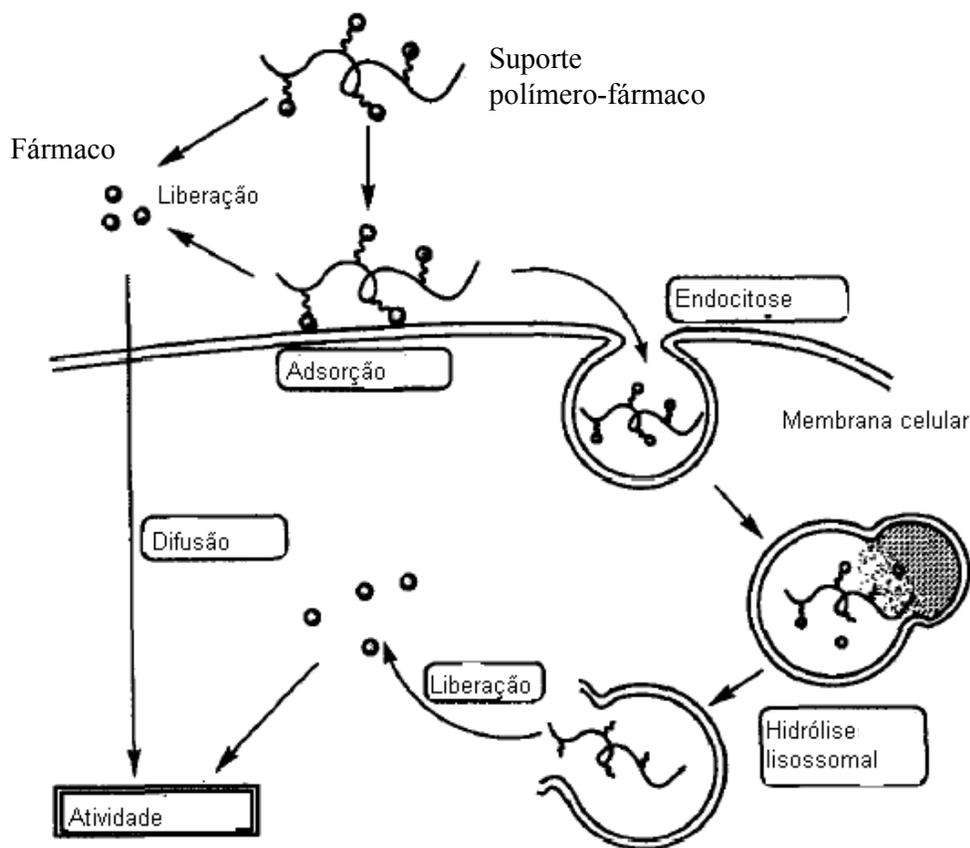


Figura 2. 2: Rota de incorporação do medicamento pela célula. Adaptado de OUCH e OHYA (2006).

A seleção de um polímero como veículo de um medicamento deve atender a alguns requerimentos: (i) ter grupos funcionais disponíveis para realizar ligações covalentes com o medicamento; (ii) apresentar boa biocompatibilidade; (iii) ser atóxico e não-imunogênico; (iv) apresentar biodegradabilidade ou massa molar baixa, para que possa ser excretado através da urina ou ser degradado através de hidrólises química ou enzimática; (v) constituir uma matriz que facilite a incorporação do medicamento, sem

introduzir modificações químicas nos fármacos (UCHEGBU e SCHÄTZLEIN, 2006). O tamanho das partículas poliméricas tem ainda que ser regulado, para que as partículas não sejam capturadas por macrófagos² (KOPELMAN *et al.*, 2008).

A liberação de drogas por dispositivos poliméricos pode ser controlada por vários métodos. Os mecanismos mais amplamente utilizados são a difusão, a dissolução, a osmose e a troca iônica (UCHEGBU e SCHÄTZLEIN, 2006). Os dispositivos de liberação de medicamento que utilizam estas formas de liberação de fármacos permitem a liberação contínua com taxa pré-determinada. Algumas drogas devem ser liberadas de forma não-contínua ou pulsante, como a insulina. Neste caso, o suporte deve reconhecer a mudança nas condições no ambiente, para realizar a liberação do fármaco. Este tipo de polímero é conhecido como polímero inteligente (ou “*smart polymer*”) (LOWE e HUANG, 2005; LIU, J., *et al.*, 2014).

Hidrogéis poliméricos têm sido empregados para muitas aplicações no campo da farmácia, especialmente para transporte e liberação controlada de drogas, em função de sua boa compatibilidade e propriedades de permeação em água. A taxa de inchamento desses hidrogéis em água depende da densidade de reticulação e da hidrofobicidade dos hidrogéis. Foi verificado que a liberação de drogas dos hidrogéis depende do grau de reticulação, da quantidade de drogas carregadas, da hidrofiliabilidade do material e do pH do meio. Foi verificado ainda que a taxa de liberação aumenta quando o grau de reticulação e o pH aumentam, mas que diminui quando a natureza hidrofóbica dos hidrogéis aumenta (REDDY e ARUN, 2004).

Hidrogéis têm atraído amplo interesse de pesquisadores devido a suas propriedades químicas particulares e estrutura física tridimensional resultante de reticulação. Além disso, o alto conteúdo de água, as boas propriedades mecânicas e a biocompatibilidade estimulam o uso desses materiais na área biomédica. Finalmente, hidrogéis podem liberar fármacos como resposta a estímulos do meio ambiente (bio-resposta inteligente) por inchamento ou desinchamento (LOWE e HUANG, 2005).

Hidrogéis são geralmente preparados a partir de uma matriz polimérica hidrofílica, que é reticulada por diferentes métodos. A reticulação dos hidrogéis pode ocorrer de forma física ou química. A reticulação física é realizada principalmente por ligações do tipo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e estereocomplexação (LANDFESTER *et al.*, 2008). Os hidrogéis podem ser preparados para apresentar

² Macrófagos são células que se movimentam continuamente entre os tecidos, onde ingerem, por fagocitose, micro-organismos, restos de células, etc.

propriedades de bio-resposta inteligente, respondendo a mudanças de temperatura, pH, luz e a presença de moléculas específicas, como a glicose. Microgéis e nanogéis têm sido muito usados como veículos de medicamentos hidrofílicos (MATYJASZEWSKI *et al.*, 2008).

Além dos microgéis e nanogéis, muitos outros polímeros sintéticos, como o poli(etileno glicol), poli(cianoacrilato de alquila), poli(ácido lático), poli(ácido glicólico), poli(ϵ -caprolactona) e poli(ácido lático-co-ácido glicólico), têm sido usados para a preparação de nanopartículas para aplicações biotecnológicas e biomédicas, por possuírem propriedades biocompatíveis e biodegradáveis (MATYJASZEWSKI *et al.*, 2008). Da mesma forma, polímeros naturais, como quitosana, dextrana e gelatina, vêm sendo extensivamente explorados por suas propriedades atóxicas e biodegradáveis (MATYJASZEWSKI *et al.*, 2008). Aplicações biomédicas e biotecnológicas requerem um alto grau de controle das propriedades do material, incluindo estabilidade para a circulação na corrente sanguínea, funcionalidade química, tamanho das partículas, morfologia e biodegradabilidade, para liberação do fármaco e remoção do dispositivo polimérico. Materiais com essas características podem ser empregados na engenharia tissular, como implantes biomédicos, como veículos de fármacos e na bionanotecnologia. Uma das principais propriedades dos microgéis é a estabilidade prolongada para circulação na corrente sanguínea. Outra importante propriedade dos microgéis é a funcionalidade, que permite a bioconjugação com ligantes específicos, que podem reconhecer receptores de células doentes (HAMIDI *et al.*, 2008). A bioconjugação permite que os microgéis/nanogéis identifiquem células alvo, como as células cancerosas. A pequena dimensão das partículas, de até 200 nm de diâmetro, favorece a captação dos nanogéis pelas células, por intermédio de mediadores-receptores de endocitose (LANDFESTER *et al.*, 2008).

A aplicação de carregadores de fármacos pode melhorar a solubilidade em água de medicamentos hidrofílicos (HUANG *et al.*, 2014). Convencionalmente os carregadores de fármacos são usados para o aprisionamento de um único agente terapêutico, mas em aplicações práticas, combinações de fármacos também podem ser encontradas (HUANG *et al.*, 2014).

Os principais tipos de partículas utilizadas como suporte para fixação e transporte de fármacos, segundo a classificação proposta por WIPF e FARAJI (2009), são apresentadas a seguir.

(i) *Nanopartículas inorgânicas*: Nanopartículas inorgânicas são normalmente constituídas de sílica ou alumina, embora outros materiais também sejam usados, como óxidos metálicos, fosfato de cálcio, ouro, derivados de carbono e sulfitos, apresentando vários tamanhos, formas e porosidades. As nanopartículas inorgânicas apresentam baixa toxicidade, podem ser usadas para a liberação controlada de medicamento, possuem ampla disponibilidade, funcionalidade e boa compatibilidade (BING YU *et al.*, 2005; HUANG e GUO, 2014). Por exemplo, nanopartículas de ouro foram usadas para o transporte de DNA, RNA e de outras biomoléculas (ROTELLO *et al.*, 2008).

(ii) *Nanopartículas poliméricas*: Muitas nanopartículas poliméricas que são biodegradáveis e biocompatíveis têm sido adotadas para a produção de dispositivos para o transporte e liberação de fármacos. Essas partículas também exibem um bom potencial para a modificação superficial por transformação química, podendo ser funcionalizadas para aplicações que requerem controle farmacocinético. Como desvantagem principal, pode-se citar a pequena capacidade de armazenar o medicamento, dependendo do número de grupos funcionais em que o medicamento pode ser ligado. A formulação usual das nanopartículas poliméricas envolve gelatinas, quitosana, poli(ácido lático-co-ácido glicólico), poli(ácido lático), poli(ácido glicólico), poli(metacrilato de metila) e poli(cianoalquilato de butila) (MATYJASZEWSKI, *et al.*, 2008; HUANG e GUO, 2014; ELDAR-BOOCK *et al.*, 2013). O poli(etileno glicol) é um polímero biologicamente inerte, muito usado por causa das ligações covalentes que podem ser estabelecidas na superfície das nanopartículas. O revestimento polimérico é também usado para reduzir a imunogenicidade e limitar a fagocitose de nanopartículas pelo sistema reticuloendotelial, resultando em níveis maiores de fármaco na corrente sanguínea. A principal vantagem de sistemas à base de polímeros para formular medicamentos é que o condutor polimérico pode proteger o ingrediente ativo de uma degradação prematura (ULIJN *et al.*, 2007).

(iii) *Nanopartículas lipídicas*: Nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas como uma alternativa farmacêutica para lipossomas e emulsões. Em geral, essas partículas são mais estáveis do que as lipossomas em sistemas biológicos, devido à relativa rigidez do núcleo, formado por lipídeos hidrofóbicos, que são sólidos na temperatura ambiente e no corpo humano. São normalmente menos tóxicos do que as nanopartículas de polímeros ou as cerâmicas (WIPF e FARAJI, 2009; HUANG e GUO, 2014).

(iv) *Lipossomas*: As lipossomas são vesículas formadas por camadas de lipídeos concêntricas, envoltas por uma membrana de fosfolipídeos. A superfície das lipossomas pode ser modificada com facilidade e possui uma boa compatibilidade. Hoje em dia, são extensivamente empregados em produtos cosméticos (FRENKEL e HALEY, 2008; HUANG e GUO, 2014; ELDAR-BOOCK *et al.*, 2013).

(v) *Nanocristais*: Os nanocristais são agregados de moléculas organizadas na forma cristalina, envolvidos por uma fina camada de surfactante. Um nanocristal pode ser preparado por um composto hidrofóbico, revestido por uma fina camada hidrofílica. Um inconveniente importante é que estes compostos possuem baixa estabilidade. Além disso, a técnica usada para a produção de nanocristais requer a cristalização e alguns fármacos não cristalizam com facilidade (WIPF e FARAJI, 2009; HUANG e GUO, 2014).

(vi) *Nanotubos*: Os nanotubos são folhas auto-montáveis de átomos arranjados em tubos. Nanotubos podem ser compostos por substâncias orgânicas ou inorgânicas. Os nanotubos normalmente apresentam uma superfície externa que pode ser funcionalizada. Os dados disponíveis a respeito da toxicidade desses compostos são conflitantes, de maneira que extensas pesquisas sobre a biocompatibilidade e toxicidade dos nanotubos estão em andamento (FRENKEL e HALEY, 2008).

(vii) *Dendrímeros*: Dendrímeros são materiais que apresentam estrutura hiper-ramificada, quase sempre organizada espacialmente do centro para a periferia. Dendrímeros podem ser funcionalizados para transporte de moléculas (FRENKEL e HALEY, 2008).

Nanopartículas com dimensões de cerca de 120 nm circulam por longo tempo na corrente sanguínea com baixo extravasamento. Nanopartículas com diâmetro na faixa de 30-100 nm de diâmetro são suficientemente pequenas para evitar o aprisionamento reticuloendotelial e a fagocitose (WIPF e FARAJI, 2009). O tempo de circulação de uma nanopartícula na corrente sanguínea pode ser alterado por meio de uma modificação hidrofílica com PEG. As nanopartículas também podem gerar fenômenos indesejados, quando se alojam em tecidos, podendo causar embolia pulmonar, infarto do miocárdio e outros microenfartes (WIPF e FARAJI, 2009).

Hidroxipropil celulose, poli(ϵ -caprolactona), poli(ácido lático), quitosana e colágeno foram utilizados para a produção de microesferas para o carregamento de fármacos (KIM *et al.*, 2009). Na literatura científica é possível encontrar aplicações de microesferas de polímeros para a entrega de fármacos, vacinas, encapsulamento de

DNA. Particularmente, os carregadores formados por polímeros ajudam a diminuir os efeitos colaterais (VENDITTO e SZOKA, 2013). Deve-se observar que o número de publicações citadas quando se usa o *SciFinder Scholar*, usando os termos polímeros, lipossomos e anticorpos monoclonais em conjunto com os termos carregadores de drogas para o tratamento do câncer chega a aproximadamente 3 milhões. Por isso, não se justifica a revisão detalhada dessa área no presente texto.

No LMSCP (Laboratório de Modelagem, Simulação e Controle de Processo) já foram realizados diversos estudos sobre a aplicação de partículas poliméricas para carregamento de medicamentos. LORCA *et al.*, (2012), estudou a produção de nanopartículas de poli(metacrilato de metila) (PMMA) por polimerização em miniemulsão, carregada com benzofenona, para a formulação de foto-protetores. FONSECA *et al.*, (2013) estudou a preparação de nanopartículas de PMMA carregadas com praziquantel *in situ* por polimerização em miniemulsão. Os pesquisadores observaram que o praziquantel aparentemente não afeta a taxa de reação e que sua incorporação atinge eficiência de aproximadamente 100%. Esses estudos, contudo, não guardam relação direta com a presente tese.

2.8 Agentes Embolizantes

A embolização vascular constitui um importante procedimento clínico, usado muito frequentemente para reduzir o tamanho do tumor, para facilitar a remoção do tumor durante a cirurgia e para definir o tratamento de malformação tumoral. Esta técnica consiste em injetar partículas sólidas finas (dispersas em um meio aquoso e com a ajuda de catéter) nos vasos sanguíneos que estão localizados próximos da região tumoral para interromper o fornecimento de nutrientes na área lesionada. Assim, a região tumoral tende a encolher e eventualmente morrer, permitindo a recuperação do tecido após um período de tempo (PEIXOTO *et al.*, 2009). O procedimento de embolização utiliza partículas biocompatíveis e atóxicas para obstruir os vasos sanguíneos. Esta técnica vem sendo utilizada com sucesso para o tratamento de grande variedade de doenças, como na remoção de tumores vasculares, estancamento de hemorragias, procedimentos pré-operatórios, remoção de meningiomas (tumor benigno no cérebro) e miomas uterinos e para evitar a perda de sangue durante uma cirurgia.

O interesse por novos agentes embolizantes vem estimulando vários estudos nessa área, com a finalidade de aumentar a eficiência dos tratamentos e o surgimento de

novos agentes de embolização. Diferentes tipos de materiais têm sido usados, desenvolvidos e testados para uso em procedimento de embolização, tal como borracha de silicone, microesferas de carbono, partículas de dextrana, esponjas de gelatina e partículas de poli(álcool vinílico) (PVA). Dentre estes, o PVA é o material mais utilizado, devido a suas propriedades mecânicas e físico-químicas e ao fato de ser biocompatível. No entanto, as partículas de PVA produzidas de forma convencional possuem algumas características indesejadas, tal como a morfologia irregular e a tendência de aglomerar, que dificultam o fluxo das partículas em suspensão através do catéter (PEIXOTO *et al.*, 2009).

Para um material ser utilizado como agente embolizante, ele precisa apresentar algumas características específicas: ser inerte, biocompatível, inabsorvível pelos tecidos, ter a superfície deformável, apresentar tamanho homogêneo, ter morfologia esférica, passar facilmente pelo catéter e apresentar alta eficiência de oclusão vascular (HUBBEL *et al.*, 1998). Microesferas de dextrana e de poliestireno foram testadas experimentalmente em cachorros e apresentaram desempenhos superiores aos de partículas irregulares de PVA e aos de microesferas de silicone, porque permaneceram em suspensão por mais tempo, não se aglomeraram nem se fragmentaram durante a aplicação e produziram uma embolização mais distal (WRIGHT *et al.*, 1982). Testes *in vivo* e *in vitro* também foram realizados com as microesferas de dextrana, que apresentaram facilidade de manipulação e de injeção, permanecendo longo tempo em suspensão, reduzindo a possibilidade de obstruir o catéter (DION *et al.*, 1986). Porém, essas partículas possuem uma séria desvantagem: elas aumentam o risco de embolização excessiva e de refluxo, já que elas podem ser facilmente arrastadas pela corrente sanguínea.

Partículas esféricas de celulose e partículas ovais de hidroxiapatita foram desenvolvidas e usadas como agentes embolizantes. Elas apresentaram sedimentação lenta e facilidade de passagem pelo catéter, produzindo bons resultados para oclusão dos vasos (KOPELMAN *et al.*, 2008).

Os agentes de embolização para o tratamento de aneurismas desenvolvidos em 1990 são menos invasivos do que a intervenção cirúrgica (BRENNECKA *et al.*, 2012). Outro agente embolizante comum é a gelatina absorvível, comercializada com o nome de Gelfoam[®], fabricada por Upjohn. O Gelfoam[®] é um material hemostático, que provoca a coagulação do sangue, é insolúvel em água e é preparado a partir de esponja estéril de gelatina, podendo ser completamente absorvida pelo organismo

(BERENSTEIN e RUSSEL, 1981). Partículas de gelatina foram usadas pela primeira vez para controlar uma hemorragia durante um processo neurocirúrgico em 1945 (LIGHT e PRENTICE, 1945). Desde então, o Gelfoam[®] vem sendo empregado com sucesso como agente de embolização para tratamento de uma grande variedade de doenças.

O Gelfoam[®] esta disponível na forma de pó, contendo partículas com 40 – 60 µm de diâmetro, ou como lâminas, cujos pedaços de variados tamanhos podem ser cortados a partir de filmes finos. Este material vem sendo utilizado há muitos anos nos EUA como agente de embolização no tratamento de miomas, para mulheres que desejam preservar a fertilidade. Apesar de ser um material de baixo custo, fácil disponibilidade e seguro, apresenta morfologia irregular e tendência a fragmentar. Sua maior desvantagem é a biodegradabilidade, que pode causar a recanalização de artérias embolizadas e provocar a necessidade de uma nova embolização (BERENSTEIN e RUSSEL, 1981).

Na Europa, microesferas de gelatina trisacrílica são preparadas a partir de um polímero trisacrílico impregnado e recoberto com gelatina e comercializadas como agente embolizante com o nome de Embospheres[®] (fabricado por Biosphere Medical). Esse composto constitui uma nova classe de agentes embólicos, por ser esférico e precisamente calibrado. Partículas de gelatina trisacrílica não são absorvíveis pelo organismo. Por serem hidrofílicas, fluem com facilidade pelo catéter, o que leva a uma oclusão mais efetiva da artéria (LAURENT *et al.*, 1996).

O LMSCP desenvolveu vários trabalhos sobre a produção de partículas embolizantes. OLIVEIRA *et al.*, (2012) estudaram a incorporação *in-situ* de doxorrubicina durante a produção de micropartículas de PVAc e PVAc-co-PMMA em polimerização em suspensão. Os pesquisadores observaram que a presença da doxorrubicina no meio reacional influencia o comportamento cinético e a massa molar média do produto final obtido.

A produção de micropartículas de PVAc/PVAc-co-PMMA para uso como agente de embolização, com amoxicilina incorporada *in-situ* em reação de polimerização em suspensão, foi também realizada por OLIVEIRA *et al.*, (2011). Os pesquisadores observaram alterações nas propriedades do polímero, incluindo a morfologia, a distribuição de massas molares e as propriedades térmicas. A influência do fármaco sobre o andamento da reação é devido ao grande número de grupos funcionais

polares que os medicamentos usualmente apresentam, que facilitam a interação com as espécies reagentes.

2.8.1 Poli(Álcool Vinílico) (PVA) como Agente Embólico

GRINDLAY e CLAGGETT (1949) foram os responsáveis pela primeira aplicação médica do PVA, usando este material para enchimento da cavidade torácica após a pneumectomia (remoção cirúrgica de um pulmão). A autópsia revelou que o PVA é inerte e causa fibrose tecidual com mínima quantidade de células inflamatórias. Depois disso, o PVA foi usado como enxerto, passando a ser utilizado como substituto de pele em pacientes com queimaduras na década de 60. O PVA também foi usado no tratamento de pacientes com prolapso retal e em cirurgias cardíacas (PORSTMANN *et al.*, 1974). TADARVARTHY *et al.* (1975) apresentaram o primeiro uso bem sucedido do PVA como agente de embolização arterial. Os autores mostraram que o PVA promove a oclusão completa do vaso, causando hemostasia permanente e trombose. Sendo assim, o PVA pode ser empregado para a embolização de vasos em pacientes com diferentes doenças (HANY e HOSAM, 2014; ASHOUR e AZIZ-SULTAN, 2014).

O PVA é um excelente agente embolizante porque apresenta características úteis, como biocompatibilidade, resistência à ação de ácidos, bases e detergentes e boa compressibilidade e elasticidade (ASHOUR e AZIZ-SULTAN, 2014). Além disso, o PVA é hidrofílico, apresenta estabilidade química (inerte no sangue) e estabilidade mecânica e tem baixo custo (TADARVARTHY *et al.*, 1975). Quando produzido em solução, este material possui como desvantagem principal a morfologia irregular, que pode causar a aglutinação e agregação de partículas, promovendo uma difícil passagem pelo catéter e uma ineficiente oclusão. O PVA também pode aderir às paredes dos vasos (devido ao alto coeficiente de fricção), ao invés de penetrar mais distalmente nos vasos. A suscetibilidade do PVA à degradação facilita a posterior recanalização do leito vascular tratado, o que é uma característica indesejada (PEIXOTO, 2007).

2.9 Poli(Acetato de Vinila) (PVAc)

O poli(acetato) de vinila (PVAc) é conhecido por suas propriedades adesivas, sendo utilizado como cola para madeira e cola escolar. O PVAc é um polímero sintético borrachoso, que possui a fórmula molecular $(C_4H_6O_2)_n$. O PVAc pertence à família dos

poliésteres vinílicos, tendo sido descoberto na Alemanha em 1912 pelo o Dr. Fritz Klatte (SANDLER *et al.*, 1998).

Os grupos ésteres do PVAc são sensíveis a soluções alcalinas. Por isso, quando o PVAc está na presença de bases fortes, ocorre uma reação conhecida como reação de saponificação, que converte o PVAc em PVA e ácido acético. Sob condições alcalinas, compostos que possuem boro, tal como ácido bórico ou bórax, promovem a reticulação no polímero (SANDLER *et al.*, 1998).

O LMSCP desenvolveu um processo para a produção de partículas de PVAc e PVA e é proprietário da patente registrada no INPI sob N° PI0404952-7, intitulada “Processo de síntese de poli(álcool vinílico) e/ou poli(acetato de vinila) com morfologia esférica e estrutura casca-núcleo e seu uso na embolização vascular” (PINTO *et al.*, 2004). O processo consiste inicialmente na produção de partículas de PVAc por meio da polimerização em suspensão. Em uma segunda etapa, estas partículas são saponificadas com hidróxido de sódio para a produção de uma fina camada de PVA. As partículas finais têm estrutura casca-núcleo, com um núcleo de PVAc recoberto por uma fina camada de PVA. Posteriormente o processo foi modificado para permitir o controle da densidade e o carregamento das partículas com antibióticos. O processo será apresentado com maiores detalhes no Capítulo 3.

2.10 Enzimas

As enzimas têm sido amplamente utilizadas em diversos processos pelo homem há vários séculos, para a produção de cerveja, vinhos e queijos, antes mesmo de conhecer a natureza química ou física e as suas propriedades (CARVALHO *et al.*, 2006). As enzimas são proteínas que podem apresentar de 62 a 2500 resíduos de aminoácidos, especializadas na catálise de reações biológicas. Essas biomoléculas apresentam extraordinária especificidade e poder catalítico, muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem, tornando possíveis as reações que ocorrem no metabolismo celular (BORZANI *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2008). A especificidade das enzimas se deve ao fato de apresentarem sítio ativo de ligação ao substrato, com estrutura geralmente complementar à da molécula do substrato, tornando possível distinguir isômeros ópticos (NELSON e COX, 2008).

Cada enzima é formada por uma sequência específica de aminoácidos, que constitui a estrutura primária da enzima. A estrutura secundária corresponde ao arranjo

especial da cadeia de aminoácidos, formando regiões com estrutura espacial regular por meio da formação de ligações de hidrogênio. A estrutura terciária é gerada pelo enovelamento das estruturas secundárias. Quando a enzima é formada por mais de uma cadeia peptídica, o arranjo espacial e as interações entre essas cadeias correspondem à estrutura quaternária (BORZANI *et al.*, 2005).

O sítio ativo de uma enzima é uma estrutura geométrica tridimensional, formada por grupamentos de diferentes partes da estrutura primária da enzima. Algumas enzimas necessitam da presença de outras espécies químicas, genericamente denominadas cofatores, para efetuar a catálise. O sítio ativo se liga ao substrato e a cofatores, para promover a quebra ou geração de ligações. Estas ligações entre as enzimas e o substrato são do tipo eletrostático, por interações hidrofóbicas, por força de van der Waals ou por ligação de hidrogênio. A natureza dos cofatores é muito diversa: os cofatores são usualmente subdivididos em metais, como o Mg^{+2} , o Zn^{+} ou o Fe^{2+} e coenzimas, que são pequenas moléculas orgânicas derivadas de vitaminas, como a flavina adenina dinucleotídeos, que é derivada da vitamina B2 (riboflavina) (VOET e VOET, 1995).

Há dois modelos básicos que tentam explicar a ação da enzima sobre o substrato. O primeiro modelo foi postulado por Emil Fischer em 1890, em que se admite que o sítio ativo da enzima tem forma complementar à do substrato. O modelo é conhecido como modelo chave-fechadura e valoriza os aspectos geométricos da estrutura molecular. O segundo modelo foi postulado por Daniel E. Koshland Jr. em 1958 e é chamado de encaixe induzido. Nesse caso, o sítio ativo da enzima é flexível e pode se modificar para se ligar ao substrato. Esse modelo valoriza aspectos dinâmicos da conformação molecular (COELHO *et al.*, 2008).

Dentre as enzimas não-protéicas, podem ser citadas as ribozimas, descobertas em 1980 por Cech e Altman, constituídas por moléculas de RNA que catalisam a quebra de ligações fosfodiéster de moléculas de RNA seletivamente (BURT *et al.*, 2002).

As enzimas apresentam características notáveis do ponto de vista industrial, pois podem ser utilizadas como catalisadores químicos, específicos a substratos e a determinadas reações bioquímicas. Essa característica permite a síntese de um produto específico, sem a formação de subprodutos, o que torna a utilização de enzimas em processos industriais muito vantajosa (BORZANI *et al.*, 2005). Além disso, um processo enzimático requer condições suaves de reação (temperatura baixa e pH próximo de 7), o que minimiza o gasto de energia e reduz problemas ambientais e

toxicológicos. Em geral, são usadas baixas concentrações de enzima, o que também faz das enzimas importantes catalisadores para as indústrias químicas.

Enzimas, e em especial as proteases, exercem papéis importantes em grande número de processos bioquímicos. Enzimas proteolíticas têm sido empregadas em terapias, como no tratamento da AIDS, do mal de Alzheimer, da hepatite C, da candidíase, de pancreatite, da osteoporose e do câncer (VELLARD, 2003). Outras terapias também exploram a ação seletiva dessas enzimas.

Vários critérios devem ser aplicados para a seleção de uma enzima para uso como medicamento:

- promover reação não reversível, para não haver produção do substrato que se pretende eliminar;
- apresentar alta especificidade, para não haver consumo de outros substratos, que não devem ser eliminados;
- ser ativa próximo ao pH neutro, porque esse é o pH aproximado dos tecidos vivos;
- apresentar baixo valor de K_M (formação privilegiada do complexo enzima-substrato) e alto valor de k_{cat} (taxa de reação elevada) para o substrato, de maneira que haja maior afinidade da enzima pelo substrato;
- ser estável a 37 °C, porque esta é a temperatura do corpo;
- preferivelmente não precisar de cofator, para que não seja necessária a combinação com outros compostos.

Muitas enzimas são imobilizadas sobre suportes de variadas características para uso posterior. Os diferentes materiais usados como suporte para enzimas possuem características distintas, que influenciam de maneira diferenciada a interação com as enzimas. Sendo assim, as características finais dos sistemas imobilizados dependem tanto do suporte como da enzima (DOKTYCS *et al.*, 1999). Os materiais poliméricos constituem materiais atrativos para uso como suporte, pois são baratos, de fácil preparação e apresentam morfologia diversificada. As enzimas imobilizadas devem preservar a atividade catalítica para que possam ser reutilizadas repetidamente.

As características principais que um suporte deve apresentar são: (i) ser insolúvel em água; (ii) apresentar elevada capacidade de interagir com as enzimas; (iii) não influenciar de modo prejudicial a atividade da enzima; (iv) apresentar resistência mecânica e térmica; (v) ser atóxico e (vi) apresentar resistência à ação de micro-organismos (BORZANI *et al.*, 2005). A imobilização das enzimas é sempre

acompanhada de alguma modificação da vizinhança ou das conformações estruturais. Assim, deve-se avaliar as condições que levam às condições de atividade ótima, como temperatura, pH e concentração de substrato; ou seja, a operação do complexo enzimático imobilizado deve ser reotimizada.

Várias técnicas podem ser usadas para imobilização de enzimas, como a imobilização por adsorção, por ligação covalente e por oclusão (ou encapsulamento). As técnicas de imobilização certamente influenciam a atividade final do biocatalisador (BORZANI *et al.*, 2005). A imobilização por adsorção física é uma técnica barata e simples, em que as interações entre as enzimas e o suporte ocorrem por meio de forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênios ou uma combinação dessas (CARVALHO *et al.*, 2006). Uma grande desvantagem desse método é a facilidade com que as enzimas se desorvem do suporte, por causa das interações fracas entre enzimas e suporte. O processo de imobilização usualmente segue as isotermas de Langmuir e Freundlich (CASTELLAN, 1986). A imobilização por ligação covalente envolve a ligação química entre segmentos de aminoácidos das cadeias laterais das enzimas, como lisina e ácido aspártico, e grupos específicos do suporte, como hidroxilas e carbonilas. A formação de ligações químicas entre a enzima e o suporte pode modificar a atividade enzimática, de maneira que essa técnica deve sempre ser avaliada com cuidado.

A Tabela 2.1 apresenta um resumo das principais enzimas aplicadas na indústria farmacêutica, incluindo a principal fonte de produção, a massa molar, o nome do medicamento e os valores das constantes cinéticas do modelo de Monod. A Tabela 2.2 apresenta os nomes dos principais medicamentos que utilizam enzimas para o tratamento de doenças, incluindo o ano em que o projeto começou, o ano de sua aprovação e a indicação terapêutica (VELLARD, 2003).

Tabela 2. 1: Relação de algumas enzimas utilizadas como medicamentos. Adaptado de VELLARD, (2003).

Enzima	Fonte	Massa molar (kDa)	Medicamento	Km (μM)	kcat (s^{-1})
Carboxipeptidase G ₂	<i>Pseudomonas SP. RS-16</i>	83 (D)	Bis(chloroethylamino)-benzoylglutamate	3	700
Fosfatase alcalina	Intestino degado	140 (D)	Etoposide phosphate	-	144
Deaminase citosina	<i>Saccharomces cerevisiae</i>	34 (D)	5-Fluorocitosina	1500	38
β -Lactamase	<i>Enterobacter cloacae</i>	43 (M)	Cephalosporinvinca alkaloids	9	3300
Penicilina V amidase	<i>Fusarium oxysporum</i>	70 (M)	Doxorubicin phenoxyacetamide	-	0,3
Penicilina G amidase	<i>Escherichia coli</i>	71 (M)	Aminophenylacetyldoxorubicin	-	0,15
Nitroreductase	<i>Escherichia coli B</i>	24 (M)	(Aziridinyldinitrobenzamide	800	6
Carboxipeptidase A	Pâncreas Bovino	34 (M)	Methotrexate- α -alanine	-	0,37
β -Glucuronidase	Humano	70 (M)	Epirubicin-glucuronide	10	0,045

(M) = monomérica; (D) = dimérica.

Tabela 2. 2: Relação de enzimas empregadas na área médica. Adaptado de VELLARD, (2003).

Nome comercial	Nome genérico	Ano do projeto	Ano de aprovação	Indicação
Adagen [®]	Bovino Pegademase	1984	1990	Tratamento de imunodeficiência combinada severa SCID
Ceredase [®]	Injeção Alglucerase	1985	1991	Doença de Gaucher tipo I
Pulmozyme [®]	Dornase α	1991	1993	Para reduzir a viscosidade na mucosa em pacientes com fibrose cística CF
Cerezyme [®]	Imiglucerase	1991	1994	Para o tratamento de pacientes com doença de Gacher tipo I, II e III
Oscaspar [®]	Pegasparaginase	1989	1994	Tratamento de leucemia linfócita aguda (LLA)
Elitek [®]	Rasburicase	2000	2002	Tratamento de hiperuricemia
Sucreid	Sacrosidase	1993	1998	Tratamento da deficiência congênita de sucrase-isomaltase
Fabrazyme [®]	Agalsidase beta	1988	2003	Tratamento da doença de Fabry

2.10.1 Mercado

O número de enzimas identificadas e integrantes da lista da Comissão Internacional de Enzimas (E.C.) era de cerca de 3000. Contudo, somente um pequeno número destas enzimas, cerca de 60, encontra aplicações industriais (COELHO *et al.*, 2008). Contudo, o mercado das enzimas continua a crescer ano a ano. Segundo COMYNS (2011), a taxa de crescimento global anual do mercado de enzimas é de 15-20%; porém, um crescimento ainda mais significativo ocorre em relação à produção de materiais de alto valor agregado e pequeno volume, como os materiais utilizados na área médica.

O mercado de aplicação de enzimas é mais expressivo na indústria de detergentes e bebidas. Desse mercado, 90% das enzimas empregadas são extracelulares e de origem microbiana (COELHO *et al.*, 2008). A revista FOCUS ON CATALYSTS (2012), divulgou em sua edição de novembro de 2012 que o mercado mundial de enzimas foi calculado em 2,7 bilhões de dólares em 2012. As projeções para o ano de 2016 são de 6 bilhões de dólares. Os setores dominantes serão de alimentos e bebidas. Vale lembrar que três grandes empresas dominam o mercado de produção de enzimas: a Novozymes, com sede localizada na Dinamarca; a Genencor International Inc., com sede nos EUA; e a DSM NV, com sede na Holanda (COMYNS, 2011).

2.10.2 Principais Tipos e Usos Industriais

A enzimologia industrial estuda o uso de diferentes preparações enzimáticas em processos industriais e outras atividades econômicas. O uso das enzimas tem se estendido a vários campos, tais como na produção de alimentos, fabricação de detergentes, indústria têxtil e indústria médico-farmacêutica. As enzimas intracelulares são empregadas comumente como reagentes de diagnóstico clínico, em engenharia genética e na biotransformação de produtos químicos e farmacêuticos (BEILEN e LI, 2002). As enzimas não microbianas mais notáveis são a papaína, extraída do mamão papaia, e a quimosina, extraída do estômago dos novilhos em aleitamento (COELHO *et al.*, 2008).

As recentes técnicas do DNA recombinante, de engenharia de proteínas e de engenharia metabólica têm permitido o melhoramento dos processos fermentativos e da produção de enzimas com atividade e estabilidade melhoradas. Além disso, estas

técnicas têm permitido o desenvolvimento de enzimas com características adequadas para uso nas condições operacionais dos diferentes processos (MOTHERWELL *et al.*, 2001).

2.10.3 Ação de Inibidores

A ação de uma enzima pode ser alterada pela presença de outros compostos diferentes do substrato, que são chamados reguladores (BORZANI *et al.*, 2005). Reguladores podem agir de forma positiva, aumentando a velocidade de reação, ou de forma negativa, diminuindo a velocidade de reação. Neste caso, os reguladores são chamados inibidores. Os inibidores podem agir de forma reversível ou de forma irreversível, sendo chamados de inativadores.

A inibição competitiva ocorre quando o inibidor é uma molécula de estrutura química e espacial similar à do substrato e se liga ao sítio ativo da enzima, impedindo a formação do complexo ES (BORZANI *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2008). Esta inibição afeta o valor de K_M , mas não afeta a velocidade máxima (k_{cat}) da reação. Essa inibição pode ser minimizada se são usadas altas concentrações de substrato.

A inibição não-competitiva ocorre quando uma molécula se liga a um local diferente do sítio ativo. Neste caso, a afinidade da enzima com o substrato não é afetada; contudo, o complexo ESI formado não gera produto ou apresenta velocidade enzimática muito menor (BORZANI *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2008).

A inibição acompetitiva ocorre quando a enzima tem dois sítios ativos: um para ligação com o substrato e outro para o inibidor, sendo que este último só se torna ativo quando o complexo ES é formado. O complexo ESI normalmente não gera produtos (COELHO *et al.*, 2008).

A inibição mista é um modelo mais geral que combina dois ou mais dos modelos anteriores. Nesse caso, a inibição afeta tanto a afinidade da enzima pelo substrato quanto a velocidade máxima enzimática (BORZANI *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2008).

2.10.4 Imobilização de Enzimas

A imobilização equivale ao confinamento da enzima com auxílio de métodos químicos ou físicos em uma região definida do espaço, com retenção de sua atividade enzimática. O suporte geralmente é sólido, insolúvel em água e inerte. A principal vantagem da imobilização é permitir a reutilização da enzima repetidas vezes ou continuamente, podendo também aumentar sua estabilidade (KATCHALSKI e KRAEMER, 2000).

Em 1916, descreveu-se a primeira utilização de uma enzima imobilizada (invertase em carvão vegetal), por Nelson e Griffin, mostrando que a enzima se mantinha viável e sem perda de sua atividade catalítica inicial. A partir dos anos 60, as pesquisas se intensificaram no sentido de estabelecer métodos eficientes para imobilizar as enzimas. Deve-se a Katchalski a introdução dos primeiros suportes úteis para a preparação das enzimas imobilizadas. Contudo, somente na década de 70 as enzimas imobilizadas começaram a ser empregadas em processos industriais. O primeiro uso reportado foi o da produção comercial de L-aminoácidos para uso médico e alimentar, por meio da aminoacilase imobilizada em DEAE-Sephadex. Este processo trouxe uma vantagem importante sobre o processo químico de produção de aminoácidos, por não produzir uma mistura racêmica (COELHO *et al.*, 2008).

O suporte contém em sua superfície grupos ativos que podem atrair não somente a enzima, mas também contaminantes, como íons e macromoléculas. Se moléculas contaminantes são adsorvidas no sítio ativo da enzima durante a preparação do processo de imobilização, a atividade enzimática pode ser reduzida. Íons metálicos são inibidores, quando absorvidos nos sítios enzimáticos, acarretando em diminuição da atividade enzimática. Para impedir esse problema durante o processo de imobilização, contaminantes devem ser removidos. A remoção de íons metálicos pode ser realizada por agentes quelantes. Quando a inibição é causada por macromoléculas, estas podem ser removidas por lavagem com detergentes ou tratamentos enzimáticos. Em alguns estudos, foi reportado que a atividade enzimática de uma enzima imobilizada pode aumentar entre 20-45% em relação a sua atividade inicial (COELHO *et al.*, 2008).

É bem conhecido pela literatura científica que as interações que promovem a adsorção de proteínas podem ser classificadas em hidrofóbicas, eletrostática e pontes de hidrogênio. As interações hidrofóbicas governam a adsorção com suportes hidrofóbicos, tal como as micropartículas de poliestirenos, e as pontes de hidrogênios governam a

adsorção em materiais hidrofílicos, como as micropartículas carboxiladas (HU *et al.*, 2005). As duas ligações mais comuns durante um processo de adsorção são as ligações eletrostática e de van der Waals (SMITH *et al.*, 2014).

Estudos sistemáticos do processo de adsorção de proteínas em diferentes substratos têm mostrado que nas superfícies com características hidrofílicas, o processo de adsorção é governado principalmente por interações eletrostáticas entre a proteína e a superfície. Em alguns casos, a adsorção é controlada pelo processo de desidratação hidrofóbica da superfície do substrato e da proteína. A adsorção de proteínas em suportes hidrofóbicos é normalmente independente das interações eletrostáticas (LEE *et al.*, 2005).

Os principais subprocessos que ocorrem durante o processo de adsorção de proteínas incluem mudanças no estado de hidratação do substrato e da superfície da proteína, rearranjos na estrutura da proteína e difusão de íons, entrando e saindo da camada adsorvente. Cada subprocesso contribui de forma distinta para o valor da entalpia ou entropia global do processo de adsorção (LEE *et al.*, 2005).

A produção de xarope de frutose utiliza com grande sucesso a glicose-isomerase imobilizada para a produção de açúcar, sendo muito utilizada na fabricação de refrigerantes. A produção de açúcar invertido pode ser conduzida por vias ácidas ou enzimáticas, por intermédio da enzima invertase imobilizada, em um reator contínuo (BORZANI *et al.*, 2005).

As principais vantagens resultantes do processo de imobilização são citadas por diversos autores (BENJAMIN e PANDEY, 1998; VILLENEUVE *et al.*, 2000; GUISÁN *et al.*, 2001):

- desenvolvimento de processos contínuos, uma vez que as enzimas não são carregadas pelas linhas de remoção do produto;
- aumento da estabilidade da enzima, por causa da proteção que o suporte oferece à manutenção da estrutura enzimática;
- a enzima pode ser reutilizada, diminuindo gastos;
- flexibilidade no projeto de reatores, uma vez que as enzimas podem ser fornecidas na forma de pellets;
- obtenção de efluentes livres de catalisadores, pela fixação da enzima ao suporte;
- obtenção de maior eficiência no processo de separação, que pode ser obtido por decantação do biocatalisador;

- facilidade na implementação de automação e controle, uma vez que a operação do processo é mais simples.

As principais desvantagens resultantes do processo de imobilização são:

- custo adicional de suportes, reagentes e da operação de imobilização;
- possível perda de atividade enzimática durante o processo de imobilização;
- a imobilização é uma técnica pouco adequada a substratos insolúveis ou de alta massa molar;
- aumento de risco de contaminação durante o processo contínuo;
- restrições difusionais e impedimento estérico, associados à estrutura particulada do biocatalisador.

As proteínas são polímeros biológicos que possuem fortes forças de coesão interna, fazendo com que as proteínas tenham uma taxa de relaxação menor do que a apresentada por polímeros sintéticos. As proteínas também diferem dos polímeros sintéticos por causa da conformação ativa única, da heterogeneidade superficial ao potencial eletrostático e das propriedades de doador-aceptor de elétrons (CALONDER *et al.*, 2001).

O diâmetro das partículas é importante fator para materiais que devem ser usados como suportes. Partículas muito pequenas têm grande razão área por volume e grande capacidade para adsorver substâncias em sua superfície. Além do mais, o composto a ser adsorvido está sujeito a menor restrição difusional (WANG *et al.*, 2008).

O processo de adsorção de proteínas em microesferas frequentemente compreende várias etapas: transporte da proteína presente na solução até a região de interface, ligação da proteína à superfície do adsorvente e relaxação da proteína na superfície. Dependendo do mecanismo de relaxação a molécula pode se ligar mais ou menos fortemente ao substrato (HU *et al.*, 2005). Como já informado é interessante notar que a adsorção de proteína sobre superfície hidrofílica é predominantemente realizada por interações eletrostática (ZHOU *et al.*, 2012). No entanto, LI *et al.*, (2005) discutem que as interações hidrofóbicas são o principal fator que afeta a adsorção de proteínas sobre os suportes orgânicos, e que o aumento da hidrofobicidade resulta em um aumento da concentração de material adsorvido. Nesse caso, a adsorção de proteínas sobre microesferas orgânicas pode ser considerada como um processo muito complexo e frequentemente envolve muitas etapas. Sobre o suporte, a conformação da proteína provavelmente muda e ocorre certo grau de deformação ou de mudança estrutural (LI *et al.*, 2005).

O processo de adsorção de proteínas sobre materiais adsorventes depende ainda de muitos outros fatores, tais como o tipo de proteína, as condições experimentais e as características químicas do suporte (ANIRUDHAN e RAUF, 2013). Proteínas com alta estabilidade interna podem ser adsorvidas sobre superfícies hidrofílicas somente com a ajuda de interações eletrostáticas. Já as proteínas que apresentam pouca estabilidade tendem a adsorver sobre qualquer superfície, independentemente de qualquer interação eletrostática.

BESTETI *et al.*, (2013), estudaram a produção de partículas poliméricas do tipo casca núcleo, produzida por polimerização combinada em suspensão e emulsão de estireno e de metacrilato de metila. Os produtos finais apresentaram alta área específica e larga distribuição de diâmetros de poros. Os materiais foram utilizados para a imobilização de lipase com sucesso, retendo a atividade de enzima quando aplicados em reação de hidrólise. Esse trabalho ilustra a linha de pesquisa do EngePol, associada à produção de suportes poliméricos para a imobilização de enzimas.

2.10.4.1 Métodos de Imobilização

Não se pode aqui definir uma técnica ou um suporte ideal e genérico para todos os processos enzimáticos, devido à grande especificidade das reações enzimáticas. Existem quatro princípios básicos para a imobilização de biocatalisadores: ligação à superfície, aprisionamento em matrizes porosas, contenção por membranas e auto-agregação (GERBSCH e BUCHHOLZ, 1995). A escolha do suporte e do método de imobilização depende das características peculiares da enzima e das condições de uso da enzima imobilizada

Os suportes podem ser orgânicos ou inorgânicos, sintéticos ou naturais. Alguns suportes podem ser modificados pela inclusão de grupos reativos, para que a enzima possa ser imobilizada com maior eficiência, o que é conhecido como ativação do suporte (BORZANI *et al.*, 2005). Na literatura podem ser encontrados inúmeros materiais utilizados como suporte.

A retenção da atividade enzimática é um parâmetro de grande importância no processo de imobilização, uma vez que se sabe que os processos de imobilização promovem pequenas alterações conformacionais da molécula enzimática por intermédio de ligações de hidrogênio, forças de van der Waals ou interações hidrofóbicas (CARVALHO *et al.*, 2006). Polímeros naturais são citados como compostos vantajosos

para uso como suporte enzimático, devido a uma pronunciada característica hidrofílica e a uma conformação que possibilita a formação de micro-sistemas favoráveis à atividade das enzimas, principalmente das hidrolases. Como exemplo de suporte natural, podem ser citados a quitina e a quitosana (KRAJEWSKA *et al.*, 2004).

Características importantes do suporte são a porosidade e o diâmetro característico de poro. É sabido que cada enzima reconhece um tamanho de poro ótimo para a imobilização, que corresponde a cerca de 4 a 6 vezes o tamanho do diâmetro de giro da molécula (CABRAL *et al.*, 2003).

A avaliação do sistema enzima-suporte deve ser feita com base em vários fatores. A estabilidade de fixação é fundamental, pois as enzimas devem estar fixas ao suporte, para que não sejam observados problemas de dessorção (porém, mudanças no pH ou na força iônica podem acarretar em perdas). A manutenção da estabilidade enzimática também é muito importante, pois a enzima suportada não deve sofrer alteração de atividade ou especificidade durante o processo de imobilização, devendo-se evitar a desnaturação ou a oclusão de sítios ativos. Além disso, a resistência mecânica do suporte deve ser suficiente para resistir às forças de cisalhamento do meio em que é usado. Finalmente, a capacidade de carga do suporte deve ser elevada, para permitir a fixação de quantidade elevada de enzima (CABRAL *et al.*, 2003).

Muitos métodos de imobilização podem ser usados para preparar biocatalisadores. A oclusão ou aprisionamento em matrizes é a técnica em que as enzimas são aprisionadas nos espaços intersticiais da rede polimérica (géis) ou nas micro-cavidades de fibras. Os géis mais usados são preparados com uma solução de amido, borracha, nylon, poli(acrilamida), alginato de cálcio, agarose ou poli(etileno glicol). O aprisionamento da enzima é realizado em uma rede tridimensional, sendo mantida no seu estado natural, sem risco de bloqueio dos sítios ativos, grupos ou moléculas da ligação química, mantendo sua estabilidade por um período variável de tempo (JACOBSON *et al.*, 1999). O aprisionamento da enzima gera duas preocupações adicionais: se os poros da matriz são muito grandes, a enzima pode difundir e dessorver; se os poros da matriz são pequenos, a passagem dos substratos e produtos pelos poros da matriz pode ser dificultada e limitada por difusão. O sistema de aprisionamento de enzima em uma matriz se diferencia do processo de reticulação e do processo de copolimerização de enzima, porque neste sistema a enzima não faz parte do suporte (CABRAL *et al.*, 2003).

Na técnica de microencapsulamento, a enzima é oclusa em membranas poliméricas semi-permeáveis esféricas de pequenos diâmetros. Essas membranas são inertes e possuem poros de cerca de 300 nm, podendo ser constituídas de celulose, policarbonato, colágeno, poliésteres, dentre outros polímeros. As limitações difusionais neste caso são menores, devido à pequena espessura do filme. O suporte mais empregado para o encapsulamento de enzima tem sido a poli(acrilamida) (JACOBSON *et al.*, 1999). A técnica de microencapsulamento pode ser diferenciada da imobilização por aprisionamento porque a solução de enzima é separada da solução do meio por uma membrana, enquanto no aprisionamento a enzima está entrelaçada à matriz. A grande desvantagem desse método é que as moléculas de substrato devem ser suficientemente pequenas pra atravessar a membrana. Este método de imobilização não tem sido aplicado na indústria de processos, mas vem sendo aplicado com resultados promissores no combate de doenças. A utilização da membrana de nitrato de celulose e nylon para o microencapsulamento foi reportado em 1977. Células vermelhas também já foram utilizadas como dispositivo de encapsulação em 1973. Lipossomos foram utilizados em sistemas de encapsulação por GREGORIADIAS *et al.*, (1977).

A imobilização pode ser feita por ligação química, com a formação de ligações covalentes ou cruzadas entre a enzima e o suporte (BORZANI *et al.*, 2005). Agentes bifuncionais ou multifuncionais, em geral diaminas alifáticas ou glutaraldeído, induzem a auto-reticulação das enzimas, resultando assim na formação de estruturas tridimensionais. Estas substâncias podem até formar aglomerados insolúveis. As desvantagens principais desse método são o custo e a possível perda de enzimas, visto que parte das enzimas é modificada pela reação química. As ligações covalentes entre a enzima e o suporte podem também ser feitas por nucleófilos presentes nas cadeias laterais de aminoácidos, que formam a enzima e que não são essencialmente parte do sítio ativo (COELHO *et al.*, 2008). A imobilização da enzima por ligações covalentes oferece como vantagem a maior resistência à variação de pH e da força iônica (BORZANI *et al.*, 2005). A maior desvantagem deste tipo de imobilização está relacionada ao fato de que geralmente o processo de imobilização da enzima exige um número maior de etapas, principalmente quando o suporte tem de ser ativado.

O suporte pode conter diversos grupos funcionais que reagem com os grupos funcionais presentes nas enzimas, formando uma ligação covalente. A imobilização é quase sempre realizada em condições fisiológicas brandas, de baixa temperatura, baixa força iônica, pH controlado e muitas vezes na presença de substrato, a fim de proteger o

sítio ativo. A ligação covalente garante que dificilmente a enzima se desprenderá do suporte durante o uso, caracterizando a não reversibilidade do método pela ação do pH, força iônica ou substrato. A grande desvantagem verificada neste método é a possibilidade da enzima se tornar inativa, em parte ou totalmente, quando a ligação se dá nos sítios ativos da mesma.

A imobilização também pode ser feita por adsorção (COELHO *et al.*, 2008; BORZANI *et al.*, 2005). Por exemplo, a ligação metálica forma quelatos pela ativação da superfície do suporte por meio do metal ou por seu óxido. A adsorção física sobre superfícies sólidas de alumina, carvão, argila, sílica gel, colágeno e vidro pode ser realizada por ligações iônicas polares ou de van der Waals, geralmente sem modificações apreciáveis das enzimas. No entanto, este método é pouco suscetível a mudanças ambientais, tais como pH, temperatura, força iônica ou mesmo a presença do substrato, resultando normalmente em complexos enzima-suporte com baixa estabilidade. A ligação iônica resulta de interações entre grupos com cargas opostas, por meio de forças eletrostáticas, constituindo um processo suave e não deletério para a maioria das enzimas.

Outra forma de imobilização que interessa muito à indústria farmacêutica é a imobilização do medicamento *in-situ*. Neste caso, o fármaco está presente no meio reacional em quantidade pequena durante o processo de preparação do suporte (se for polímero, durante a polimerização). O medicamento é incorporado à cadeia polimérica, sendo liberado em condições favoráveis. Este processo só é eficaz quando as condições da reação de polimerização não causam degradação do fármaco.

A interação suporte-enzima, por mais branda que seja, provoca algum tipo de efeito sobre a atividade catalítica, estando intimamente relacionada com a estrutura da macromolécula. Quando as enzimas são imobilizadas por encapsulamento, algumas moléculas podem ser desnaturadas ou inativadas por reagentes ou produtos envolvidos na formação da matriz encapsulante. Além disso, a enzima pode se ligar ao suporte numa configuração que impede completamente o acesso do substrato ao centro ativo. O grupo ativo do centro ativo pode também estar envolvido na ligação do suporte. Para impedir este tipo de ligação, pode-se usar a proteção do sítio ativo por um inibidor reversível ou ser feita a adição de um substrato durante a ligação com o suporte (COELHO *et al.*, 2008).

Quando a enzima está imobilizada, o substrato deve chegar até ela através de uma solução. Dessa maneira, o substrato deve difundir até a enzima, passando por um

filme líquido estacionário presente na superfície do suporte. Se o suporte é poroso, o substrato deve difundir através dos poros, até alcançar o sítio ativo da enzima. Se a enzima imobilizada é suficientemente ativa, o problema difusional pode restringir a taxa de reação. As condições de escoamento nas vizinhanças da partícula que contém a enzima imobilizada também influenciam esta taxa (COELHO *et al.*, 2008).

Ao ser imobilizada, a enzima passa a ser circundada por um meio ambiente diferente daquele existente quando estava livre, especialmente se o suporte ou a matriz possui carga. Os efeitos de circunvizinhanças, que dependem da natureza física e química do suporte, podem acarretar numa distribuição desigual do substrato, produtos e cofatores entre a região vizinha ao sistema imobilizado e o resto da solução (COELHO *et al.*, 2008). Exemplos desta influência são os efeitos relacionados às interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas entre o suporte e as espécies químicas de baixa massa molar, o que torna os parâmetros cinéticos dependentes da concentração dessas espécies (COELHO *et al.*, 2008).

Durante o processo de imobilização de uma enzima, a enzima pode sofrer impedimento estérico. Este fator é mais evidenciado quando os substratos apresentam elevadas massas molares. Em alguns casos, a enzima, ao se ligar ao suporte, pode sofrer mudança de conformação, o que pode abalar a atividade catalítica. Estes efeitos são de difícil quantificação. Para minimizá-los, o único modo é padronizar da melhor forma possível os procedimentos de imobilização (COELHO *et al.*, 2008).

Existem indícios de que as enzimas, durante a imobilização, estão sujeitas a mudanças na estabilidade térmica. Apesar de ocorrer um aumento na estabilidade térmica na maior parte das vezes, existem exemplos em que se observa decréscimo da estabilidade térmica, mostrando que a imobilização não necessariamente confere aumento na estabilidade (BORZANI *et al.*, 2005).

A conjugação de cadeias de poli(etileno glicol) (PEG), é comumente referido como PEGilação (PEGylation), é um método para estabilizar e melhorar as propriedades terapêuticas. A PEGylation pode melhorar a farmacocinética e farmacodinâmica prolongando o tempo de vida e reduzindo a imunogenicidade (CARTA e ZHU, 2014).

Hidrogéis à base de celulose são atrativos para aplicação na imobilização de enzimas, devido a suas propriedades biocompatíveis e biodegradáveis, podendo ser usados para a fabricação de fármacos (ANIRUDHAN e REJEENA, 2013).

2.11 Fatores Adicionais que Influenciam as Reações Enzimáticas

As reações enzimáticas são influenciadas por muitos fatores. Por exemplo, no modelo de Michaelis-Menten a curva de velocidade de reação em função da concentração do substrato tem regiões características. Pode ser observada uma cinética aparente de primeira ordem, quando a concentração de substrato é baixa. Nesta região, fatores como inativação enzimática, reversão de reação, inibição por produtos e saturação por substrato não influenciam muito a reação. Na presença de uma quantidade expressiva de substrato, a reação tem o equilíbrio deslocado no sentido da formação do complexo ativado (ES), de maneira que a velocidade da reação é máxima e constante. Quanto menor o valor de K_M , maior a afinidade da enzima pelo o substrato.

A concentração enzimática é outro fator que influencia as reações enzimáticas, como pode ser observado no modelo de Michaelis-Menten. A velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração de enzima.

O pH exerce grande efeito sobre as reações enzimáticas, porque as enzimas possuem em seu sítio ativo grupos químicos sensíveis ao pH. No pH ótimo, a ionização destes grupos ocorre de maneira a produzir a melhor atividade enzimática (COELHO *et al.*, 2008). Para que o pH seja mantido durante a reação, o meio deve ser tamponado. A concentração do tampão e do pH devem ser os mais adequados à catalise. É bom lembrar que nos dois extremos do ponto ótimo de pH pode ocorrer a desnaturação da enzima. A Figura 2.3 apresenta um gráfico do comportamento da L-asparaginase frente ao pH, como reportado por ABRAHÃO *et al.* (1999).

A temperatura também influencia de forma marcante a reação enzimática. O aumento da temperatura causa a elevação da produção do complexo ativado (ES) e, por outro lado, aumenta a velocidade de inativação da enzima, devido a alterações de sua estrutura tridimensional. Por isso, quase sempre existe uma temperatura ótima para utilização do complexo enzimático.

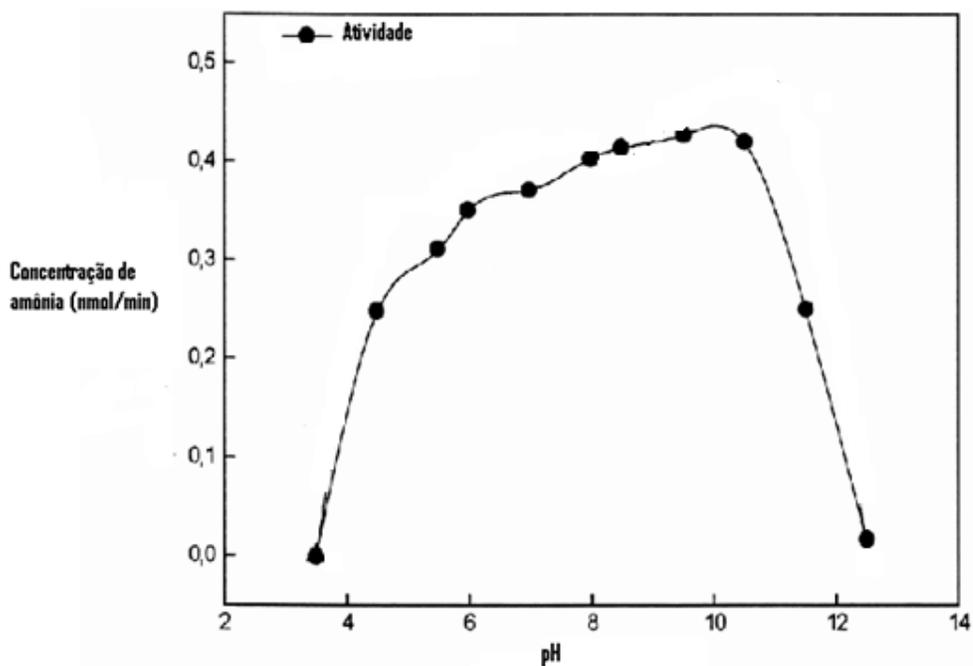


Figura 2. 3: Medida da variação de atividade do consumo de asparagina (e de produção de amônia) com o pH para uma solução de L-asparaginase. Adaptado de ABRAHÃO et al. (1999).

2.12 Definição da Atividade Enzimática

A atividade enzimática é expressa em UI (Unidade Internacional), que é definida como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato por minuto sob condições ótimas de operação ou a produção de um determinado produto a uma taxa de 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ (COELHO *et al.*, 2008). A atividade enzimática específica é definida como o número de unidades internacionais (UI) de atividades por miligrama de proteína. A atividade molar ou molecular é definida como o número de unidades de atividade por micromol (μmol) de enzima.

2.13 L-asparaginase

A L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase E.C. 3.5.1.1) é uma enzima geralmente extraída de *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora* (TIZZOT *et al.*, 2005) e que possui a capacidade de hidrolisar a L-asparagina e L-glutamina. A massa molar da subunidade da enzima é aproximadamente de 30 kDaltons e a massa molar da enzima

nativa é de 120 - 140 kDaltons (SCOTTI *et al.*, 2008). A L-asparaginase (L-Asnase) é uma enzima tetramérica (GREGORIADIS e FERNANDES, 1997) que catalisa a hidrólise do grupo amino do aminoácido L-asparagina, produzindo ácido aspártico e amônia. Essa enzima é raramente encontrada em mamíferos e aves. Em animais como macacos, coelhos, ratos e determinados pássaros e galinhas, a enzima é localizada no fígado e rins (TIZZOT *et al.*, 2005).

Em 1953 foi constatado que o soro normal de cobaia (porquinho da Índia) (PHILLIPS *et al.*, 1970) possuía atividade anti-tumoral contra vários tipos de linfomas transplantados em ratos e camundongos (KIDD, 1953). Somente em 1963 descobriu-se que esta atividade era devida à presença de uma enzima, a L-asparaginase (BROOME, 1963). Em 1967, a L-asparaginase foi isolada em quantidade suficiente para uso clínico e teve sua atividade antineoplásica comprovada. Desde então, a comunidade acadêmica vem demonstrando grande interesse no estudo dessa enzima (WRISTON e WHELAN, 1969). A L-asparaginase é uma das primeiras drogas usadas no tratamento da leucemia linfóide aguda (LLA), produzida pela *E. coli* desde o ano de 1967 (YANG *et al.*, 2009).

A produção de L-asparaginase pela bactéria *Escherichia coli* foi reportada em 1967 (WRISTON e WHELAN, 1969). A produção de enzima com atividade antineoplásica foi reportada em 1970, usando a bactéria *Serratia marcescens* (PHILLIPS *et al.*, 1970). Vários microrganismos são reportados na literatura como produtores de L-asparaginase. As bactérias gram-positivas que produzem L-asparaginase incluem *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium glutamicum*. Nos fungos, a enzima foi encontrada em *Aspergillus sp.* e *Cylindrocarpon obtusisporum*. Sua presença também foi reportada em leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus coagulans*, porém não apresentaram atividade anti-tumoral (PHILLIPS *et al.*, 1970). Algumas dessas enzimas apresentam atividade antineoplásica, embora poucas possam ser utilizadas como quimioterápicos. No cenário atual, apenas as L-asparaginase produzidas por *E. coli* e *Erwinia carotovora* são usadas no tratamento de LLA (GREGORIADIS e FERNANDES, 1997).

Algumas bactérias, como a *E. coli*, apresentam duas proteínas independentes. Uma delas está localizada no citoplasma, conhecida como L-asparaginase I, enquanto a outra está presente no espaço periplasmático, chamada de L-asparaginase II. Somente a L-asparaginase do tipo II apresenta atividade antineoplásica (PHILLIPS *et al.*, 1970).

Na célula animal normal, a asparagina não é um aminoácido essencial para a manutenção da viabilidade celular. Assim, a célula supre a falta deste aminoácido por

meio da ação da enzima asparagina sintetase. A asparagina sintetase é uma enzima intracelular, indutível (sua expressão varia com as necessidades celulares) e responsável pela síntese de asparagina por intermédio do aminoácido L-glutamina (YANG *et al.*, 2009). As células neoplásicas não são capazes de induzir a síntese da asparagina sintetase e, portanto, são dependentes do nível extracelular de asparagina para realizar sua síntese protéica (GREGORIADIS e FERNANDES, 1997). Quando a L-asparaginase é introduzida na corrente sanguínea de um indivíduo portador de LLA, a asparagina é retirada do meio por ação da enzima, de maneira que as células neoplásicas entram em colapso metabólico e morrem. Células normais, por outro lado, produzem a asparagina sintetase e, portanto, não são afetadas durante o tratamento. Sendo assim, este método de tratamento é altamente seletivo (GREGORIADIS e FERNANDES, 1997).

A atividade anti-tumoral da L-asparaginase é função de sua afinidade com o substrato. Como a asparagina está presente na corrente sanguínea, a atividade anti-tumoral também é função da meia-vida de circulação (GREGORIADIS e FERNANDES, 1997).

A L-asparaginase se mostrou eficiente no tratamento de leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia mielóide aguda, linfomas, câncer pancreático e linfoma de Hodgkin (GREGORIADIS e FERNANDES, 1997). Nos tratamentos com a L-asparaginase, a taxa de regressão de tumores é de 75 a 95%.

Uma das desvantagens do uso da L-asparaginase é a necessidade de doses diárias de injeções parenterais de 10 a 200 UI/kg/dia, por um período de tempo que pode durar 21 dias. Esse fator ocorre porque na corrente sanguínea a inativação ocorre de maneira rápida. Assim, são necessárias frequentes injeções para manter os níveis terapêuticos. A L-asparaginase também apresenta alguns efeitos tóxicos, podendo causar hiperglicemia, queda da albumina sérica e queda dos teores de lipoproteína e fibrinogênio. Além disso, já foram reportados aumento de gordura no fígado e algumas disfunções cerebrais leves. No entanto, o fator limitante mais importante é o desenvolvimento de hipersensibilidade ao tratamento (YANG *et al.*, 2009), observado entre 5 a 50% dos pacientes tratados. Esta hipersensibilidade varia desde pequenas reações alérgicas nas regiões de injeções, até broncospasmos e choque anafilático.

Com o objetivo de amenizar o problema da hipersensibilidade, são desenvolvidos estudos com a finalidade de modificar a estrutura e de conjugar a L-asparaginase com compostos orgânicos, como poli(etileno glicol), dextrana, albumina e

heparina. Busca-se também o melhoramento genético da bactéria produtora da enzima. Essas modificações visam a obter vantagens, como aumento do tempo de circulação, melhora da resistência à inativação por enzimas proteolíticas, mudança na característica da superfície, diminuição da capacidade antigênica, aumento da afinidade pela célula alvo e manutenção da atividade enzimática (YANG *et al.*, 2009). A forma de L-asparaginase conjugada mais conhecida para uso clínico é a do tipo II de *E. coli* com poli(etileno glicol). A meia vida do conjugado PEG-asparaginase é de mais ou menos 6 dias, contra aproximadamente um dia da L-asparaginase nativa; porém, sua eficiência não pode ser comparada à da L-asparaginase livre de *E. coli*. Contudo, devido aos benefícios apresentados, como a redução do número de pacientes com reações alérgicas e a pouca influência nos níveis de lipoproteínas e albumina, o complexo PEG-asparaginase é utilizado com frequência (YANG *et al.*, 2009). O encapsulamento de L-asparaginase em lipossomas (GREGORIADIS e FERNANDES, 1997), microcápsulas e eritrócitos também têm sido estudados na literatura; contudo, os resultados ainda não são satisfatórios para que sejam empregados como medicamento.

Outra maneira estudada para reduzir a hipersensibilidade à L-asparaginase é a mudança na forma de administração, de intravenosa para intramuscular ou injeção subcutânea. Outra possibilidade é usar enzimas produzidas por outros microrganismos (YANG *et al.*, 2009). Com a função de aumentar a meia-vida da L-asparaginase na corrente sanguínea, ácido colomínico, tem sido usado com sucesso (GREGORIADIS e FERNANDES, 1997).

ZHANG *et al.*, (2003) imobilizaram L-asparaginase em micropartículas da proteína sericina por meio de ligações covalentes, utilizando glutaraldeído. Foi observado que a atividade enzimática inicial se manteve em 62,5%. Os pesquisadores também observaram aumento na estabilidade e resistência à enzima digestiva tripsina.

Um extenso estudo sobre a produção de L-asparaginase foi realizado por ABUD (2005), utilizando a bactéria *Zymomonas mobilis*, no programa de Engenharia Química da COPPE, resultando na patente registrada no INPI sob o N° PI0404994-2 (PINTO *et al.*, 2004). A patente trata do processo de produção de L-asparaginase em meios fermentativos, pela a bactéria *Zymomonas mobilis*.

2.14 Albumina do soro bovino (BSA)

A albumina do soro bovino, mais conhecida como BSA, é uma proteína que foi empregada neste trabalho como sonda, para avaliar a capacidade do suporte polimérico em adsorver moléculas biológicas. A BSA é a proteína mais abundante no soro bovino, com uma concentração de aproximadamente 50 mg.mL^{-1} . Isso equivale a dizer que a BSA está presente no plasma sanguíneo em uma fração mássica de 52 - 62%, sendo sintetizada no fígado (MINOR *et al.*, 2012). A BSA é certamente uma das proteínas mais estudadas na literatura (CHITRA *et al.*, 2004).

A BSA é uma proteína globular com a forma de um esferóide de dimensão de 4 nm x 4 nm x 14 nm, apresentando ótima adaptação conformacional (KOPAC, *et al.*, 2008). Segundo GALLIER *et al.*, (1986) os eixos da BSA têm de 40 a 150 Å.

A albumina do soro foi descoberta como um dos principais componentes do sangue em 1839 por Ansell (CARTER e HO, 1994), mas a sequência de aminoácidos só foi identificada por Brown em 1975 e o modelo tridimensional foi proposto em 1977 por Brown (WAHN *et al.*, 1980). Hoje são conhecidos diferentes tipos de albuminas e uma das principais motivações pelo estudo da BSA é a capacidade da albumina de se ligar de forma eficiente com compostos farmacêuticos, realizando assim o transporte de fármacos (SULKOWSKA, 2002; SEVILHA *et al.*, 2007; PENG *et al.*, 2012). A massa molar da BSA é de 66462 Da (HIRAYAMA, 1990), com estrutura de um polipeptídeo com 583 resíduos de aminoácidos. O ponto isoelétrico da BSA encontra-se entre 4,60 - 5,70 (GOLDBERG, 1952).

A BSA tem a função no organismo de carregar compostos endógenos e exógenos, como ácidos graxos, metais, esteróides e drogas. Também é responsável pela eliminação de radicais livres de oxigênio e a desativação de metabólitos lipofílicos tóxicos, como a bilirrubina (EMERSON, 1989). Porém, a principal função da albumina é a manutenção da pressão osmótica e do pH do sangue. A albumina tem uma alta afinidade por ácidos graxos, hematinas, bilirrubina e uma grande afinidade por compostos aromáticos de baixa massa molar e carregados negativamente. A BSA pode formar ligações covalentes com diversos compostos, como o fosfato de piridoxilas, cisteína e íons metálicos, tais como Cu^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+2} e Au^{+} (GOLDBERG, 1952).

WANG *et al.*, (2008) prepararam e utilizaram nanopartículas de quitosana magnética com diâmetro de 10 a 20 nm para realizar a imobilização de BSA. Os pesquisadores mostraram que a concentração de BSA adsorvida foi de 110 mg/g de

adsorvente, quando o pH da solução era igual a 4. O processo de imobilização era alcançado em 10 min. Outros estudos conduzidos com microesferas de quitosanas com diâmetro de 150-250 μm mostraram que o equilíbrio só era alcançado em aproximadamente 4 h. Os autores atribuíram esse fato às limitações difusionais da macromolécula nos microporos.

WANGKAM *et al.*, (2012) estudaram a adsorção de BSA em poliestireno e no copolímero de poli(estireno-co-ácido maleico) (PSMA) com 7 e 50% de ácido maleico no pH de 7,4. Foi observado que o aumento da hidrofiliabilidade da superfície do adsorvente favoreceu ao aumento da quantidade de BSA adsorvida. Também observou que a BSA sofre mudança de conformação durante o processo de adsorção. A área ocupada pela molécula de BSA no poliestireno era de 34,8 nm^2 . No caso do polímero com 7% de ácido maleico era de 27,8 nm^2 , enquanto era igual a 18,0 nm^2 para o copolímero com 50% de ácido maleico.

HU *et al.*, (2005) estudaram a adsorção de BSA em micropartículas de PMMA sulfonadas. Os pesquisadores, utilizando partículas com diâmetro médio de 3,4 μm , também observaram que a maior taxa de adsorção ocorreu no pH 4,3 próximo ao ponto isoelétrico. Os autores atribuíram a diminuição da adsorção no pH 2,2 e 7,4 ao aumento do tamanho conformacional da proteína e à repulsão eletrostática entre a molécula de BSA e o adsorvente.

Muitos estudos são conduzidos na literatura usando a BSA como molécula modelo para estudar a adsorção de proteína sobre membranas, para avaliar a produção de *fouling* sobre a superfície. ZHOU *et al.* (2012) estudou a formação de *biofouling* em membranas de PVDF. Foi observado que o pH e a força iônica influenciam a adsorção da BSA na superfície da membrana. Foi observado que a influência do pH e força iônica é devida à interação eletrostática, mudança de conformação da proteína, arranjo estrutural da molécula de proteína e reações de desidratação.

LI *et al.*, (2005) estudou o uso de BSA para investigar a adsorção em microesferas sulfonadas de poli(metacrilato de metila) (PMMA). Foi observado que a adsorção parece ser influenciada pelo tempo, pH e força iônica. A presença dos grupos sulfonatos foi de grande importância no processo de adsorção. A quantidade máxima de BSA foi alcançada próxima ao ponto isoelétrico (PI), devido à conformação mais compacta no PI do que em outros pH. Estudos realizados por LI *et al.*, (2005) mostraram que a conformação da BSA é dependente do pH. Análise de ultravioleta de

soluções de BSA em diferentes pH's mostraram que as soluções de BSA exibem espectro de UV em diferentes pH's.

2. 15 Liozima

A liozima é uma enzima utilizada no meio farmacêutico devido a suas propriedades antibióticas e capacidade de destruição de bactérias. A liozima foi descoberta acidentalmente por Alexander Fleming em 1922. A enzima pode ser encontrada nas lágrimas, saliva, mucosa nasal e outras secreções do corpo do homem (CABRAL *et al.*, 2003). No entanto, a liozima é encontrada também em bactérias, fungos, plantas e animais (STRELKOV *et al.*, 2011). Além de atuar na defesa contra micro-organismos, alguns insetos que se alimentam de bactérias utilizam a liozima durante o processo de digestão (CANÇADO *et al.*, 2007).

A liozima é uma enzima pequena, com massa molar média de 14400 Da, e dimensões de 3,0 x 3,0 x 4,5 nm. É um enzima globular com atividade antibactericida, com seu ponto isoelétrico igual a 11,00 (LEE *et al.*, 2005). Em solução, a liozima possui boa estabilidade estrutural (SCAMAN *et al.*, 2005)

A importância comercial da liozima está relacionada a sua utilização como agente de ruptura da parede celular para a extração de produtos intracelulares, ao uso como aditivo alimentar em produtos lácteos, como agente anti-bacteriano na produção de vinho e à produção de fármacos para o tratamento de úlceras e infecções (SARAVANAN *et al.*, 2007).

A atuação da liozima como antibiótico ocorre por meio do processo de destruição dos polissacarídeos presentes na parede celular das bactérias; ou seja, a quebra da ligação β -glicosídica. As bactérias gram-positivas são muito suscetíveis à liozima porque a parede celular é composta por 90% de polissacarídeos. Já no caso das bactérias gram-negativas, o conteúdo de polissacarídeos é de 5 a 10% da parede celular, encontrando-se na camada abaixo da membrana externa celular. No entanto, a liozima pode ser eficiente contra bactérias gram-negativas na presença de um desestabilizador de membrana, como detergentes e EDTA (ROLLINI *et al.*, 2012). Neste caso, é lícito concluir que a liozima pura somente exerce efeito sobre as bactérias classificadas como gram-positivas. Na literatura científica existem esforços para a produção de embalagens antimicrobianas com incorporação de liozima e um agente desestabilizante da membrana bacteriana. A ação da liozima ocorre ao catalisar a inserção de água na

cadeia de polissacarídeos, de maneira que a lisozima é classificada como uma enzima do tipo hidrolase, abundante na clara de ovo. A lisozima pode danificar a parede das células, catalisando a hidrólise dos mucopolissacarídeos (LI *et al.*, 2014).

A lisozima é composta por uma única cadeia polipeptídica constituída por 129 aminoácidos. Ao longo da cadeia são encontrados 4 pares de cisteínas, aminoácidos hidrofóbicos que contêm um grupo tiol (-SH) ligados por uma ponte dissulfídica, ligação covalente que liga pontos distantes da estrutura primária da proteína. Devido à presença dessas ligações, a flexibilidade da lisozima é restrita. Outro fator verificado é que a lisozima é altamente estável em solução ácida, mantendo sua atividade mesmo depois de exposta a 100 °C durante 1-2 min (SARAVANAN *et al.*, 2007). A lisozima é uma enzima globular, com forma elipsóide, que apresenta uma fenda profunda ao longo de parte de sua superfície, à qual se ligam seis hexoses dos substratos (SCAMAN *et al.*, 2005).

A lisozima é uma enzima hidrofílica que tem sido empregada como biopreservativo natural em embalagens (CORRADINI *et al.*, 2013). Recentemente foi estudado o desenvolvimento de embalagens de PVA com lisozima incorporada (MASTROMATTEO *et al.*, 2011). A imobilização de lisozima para a produção de embalagens com capacidade antimicrobiana não se restringe ao PVA, sendo possível encontrar estudos com diferentes materiais plásticos, como o acetato de celulose, nylon e biopolímeros, como a quitosana e o alginato (ARCAN e YEMENICIOGLU, 2013). A produção de embalagens antimicrobianas pode ser uma solução atrativa para evitar o desenvolvimento de micro-organismos em alimentos

Além da lisozima ser empregada no desenvolvimento de embalagens ativas, ela também encontra ampla aplicação como medicamento e no auxílio ao diagnóstico de doenças. Na literatura científica podem ser encontrados estudos que empregam a enzima no tratamento de algumas doenças, como no tratamento de infecções por HIV, do câncer, de infecções oftálmicas e de úlceras (SARAVANAN *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2014).

Dois tipos de lisozima foram descobertos. A lisozima de clara de ovo é a mais estudada. Ela é empregada na prevenção de crescimento de bactérias em alimentos de origem animal e também pode ser aplicada como conservante em alimentos (JOHNSON e HUGHEY, 1987). Estudos de WHITE e WHITE (1997) mostraram que o dodecil sulfato de sódio, álcoois, N-acetil-D-glucosamina e agentes oxidantes são inibidores da lisozima.

A lisozima foi utilizada como molécula modelo no trabalho de SMITH *et al.*, (2014), para avaliar a utilização de grafeno, óxido de grafeno e nanotubos de carbonos como material adsorvente, para investigar a capacidade de adsorção de substâncias orgânicas presentes em água residuais por esses materiais. Foi observado que o adsorvente óxido de grafeno adsorveu 500 mg de lisozima por grama de óxido de grafeno.

Estudo da imobilização de lisozima em nanopartículas magnéticas revestidas com polímero termosensível, poli(N-isopropilacrilamida), foi realizado por SHAMIM *et al.* (2008). Foi obtido para 25 °C uma adsorção de 1,3 mg.m⁻², alcançado 2,4 mg.m⁻² a 45 °C. O estudo realizado para avaliar o efeito do pH mostrou que a melhor adsorção era encontrada nas proximidades do ponto isoelétrico da lisozima.

Micropartículas magnéticas de quitosana foram preparadas por LI *et al.*, (2014) utilizando um ligante chamado *reactive Red* 120 para aumentar a adsorção de lisozima e, assim, conseguir um método de separação e purificação menos complexo do que os existentes atualmente. Foi observado pelos pesquisadores que as micropartículas de quitosana sem o ligante eram capazes de imobilizar 24,6 mg.g⁻¹; com o ligante foi possível alcançar uma adsorção de 116,9 mg.g⁻¹. Este resultado foi alcançado no pH 7,0, em que a lisozima possui carga positiva.

Um copolímero funcionalizado com ácido sulfônico e enxertado com silano foi desenvolvido por ANIRUDHAN e RAUF, (2013), com área específica de 71,2 m². g⁻¹ e 0,096 mm de diâmetro, para ser aplicado na imobilização de lisozima. Foi observado que no pH 7,0 foi onde ocorreu a maior adsorção da lisozima, aproximadamente igual a 37,68 mg.g⁻¹. Nesta condição, o suporte com PI igual a 4,0 estava com carga negativa e a lisozima tinha carga positiva. Os pesquisadores atribuíram a diminuição da quantidade adsorvida entre os pH's 8,0 e 11,0 ao possível processo de desnaturação do suporte em meio básico. O efeito da temperatura também foi avaliado pelos pesquisadores e foi observado que o aumento da temperatura conduz a uma diminuição na quantidade adsorvida. Segundo os pesquisadores, esta diminuição indica que o processo de adsorção é exotérmico.

A adsorção de lisozimas em membranas de ácido acrílico foi estudado por HIROTSU e TAGAKI, (2004). O melhor resultado alcançado foi de 1000 - 1500 ng.cm⁻². ANIRUDHAN e REJEENA, 2013 desenvolveu um copolímero de poli(acido acrílico) e poli(metacrilato de glicidila) para ser aplicado na recuperação de lisozima em solução aquosa. O melhor resultado foi alcançado no pH 6,0, com adsorção de 148,42 mg.g⁻¹ em

30 °C. Os pesquisadores mostraram que o aumento da temperatura influencia o aumento da imobilização de lisozima, levando-os a concluir que o processo de adsorção é endotérmico.

BALDURSDOTTIR e JORGENSEN, (2011), estudaram a influência de surfactantes na adsorção da lisozima em uma solução aquosa e orgânica. Foi observado que o tamanho do suporte, a característica hidrofílica do suporte e a massa molar do surfactante influenciam o processo de adsorção. Surfactantes hidrofílicos interagem com a lisozima formando um complexo. Também foi observada uma diminuição na adsorção de lisozima em diferentes concentrações de surfactantes.

LEE *et al.* (2005) descreveram que a lisozima pode sofrer deamidação dos resíduos de asparagina e glutamina em condições alcalinas. Esta alteração conduz ao abaixamento da carga positiva. Segundo os pesquisadores, em condições alcalinas as pontes de dissulfetos podem se rearranjar, sendo inconveniente trabalhar com lisozima em pH básico.

2.17 Leucemia Linfóide Aguda (LLA)

A leucemia linfóide aguda (LLA), que pode ser medicada com o uso de L-asparaginase, é um tipo de câncer que ataca as células brancas do sangue. Estas células são as responsáveis por defender o organismo contra infecções (KUN, 1997). A medula óssea, responsável pela produção de células brancas, realiza esta função em excesso, produzindo células imaturas, chamadas de linfoblastos. Essas células são incapazes de realizar ação de defesa no organismo. Neste tipo de câncer também é verificada a deficiência de células vermelhas e de plaquetas. Assim, um paciente com LLA sofre frequentemente infecções, anemia e sangramentos.

Dois terços dos casos de LLA diagnosticados nos Estados Unidos ocorrem em crianças, o que torna a LLA o câncer mais frequente entre os adolescentes (KUN, 1997; YANG *et al.*, 2009). A taxa de cura entre os adolescentes é de aproximadamente 80%; já em adultos, esta taxa raramente excede 40% (YANG *et al.*, 2009).

O fator mais importante para o prognóstico clínico da LLA é a idade e quantidade de células brancas no sangue. Lactantes (menores do que um ano de idade) e adolescentes (maiores do que 10 anos de idade) são menos favoráveis ao quadro clínico de LLA, comparado com pacientes entre 1 a 9 anos (KUN, 1997). Os sintomas

associados com a LLA são febre, sangramento e dor nos ossos, sendo que meninos são afetados mais do que meninas (KUN, 1997).

2.18 Comentários Finais

Como foi descrito neste capítulo, os materiais poliméricos estão sendo extensamente utilizados na área biomédica. Os polímeros são utilizados como tecido artificial, enxerto, na substituição de ossos, válvulas e órgãos humanos, como agentes de embolização e veículos para transporte e liberação de medicamentos. Com certeza novos mercados e aplicações irão surgir, à medida que os estudos sobre estes materiais se intensificam.

Os benefícios trazidos por complexos polímeros-fármacos em várias aplicações também foram comentados neste capítulo. Particularmente, novas formas de assimilação de medicamentos estão surgindo e esta maneira de administração de um fármaco constitui um avanço para várias áreas da medicina.

As enzimas também vêm sendo utilizadas na medicina como medicamentos, como foi apresentado neste capítulo. Novos estudos estão sendo realizados e espera-se que novas aplicações surgirão com o avanço da enzimologia. O fato de as enzimas serem catalisadores biológicos específicos torna essas moléculas muito eficientes em tratamentos farmacológicos.

A L-asparaginase é um importante medicamento para o tratamento de vários cânceres, em especial a leucemia linfóide aguda. O tratamento com essa enzima na maioria das vezes produz efeitos colaterais no paciente, devido às altas doses de L-asparaginase a que é submetido. Uma nova forma de administração desse fármaco pode mudar este cenário. O complexo PEG-L-asparaginase já existe no mercado e é utilizado em pacientes com LLA de forma mais eficiente do que a L-asparaginase, diminuindo os efeitos colaterais. De forma similar, a BSA e a lisozima também são proteínas muito utilizadas em aplicações médicas, constituindo por isso boas moléculas sondas para o estudo de processo de imobilização em suportes poliméricos

As técnicas de embolização permitem o tratamento de alguns tipos de tumores com a imposição de restrições físicas à chegada de alimentos a células doentes. As técnicas de embolização podem ser bastante valorizadas com a combinação de efeitos químicos, resultantes do encapsulamento de fármacos nas partículas embolizantes (quimioembolização). Como a COPPE é detentora de patentes e tecnologias nas áreas de produção de agentes embólicos e de L-asparaginase, o desenvolvimento de partículas

embólicas dopadas com L-asparaginase ou outras biomoléculas, como a BSA e a lisozima, soa bastante útil e natural. Aparentemente não há estudos disponíveis a respeito do uso de enzimas em partículas embolizantes nem sobre as interações de biomoléculas com o suporte particulados à base de PVAc ou PVAc-co-PMMA.

Capítulo 3

Objetivos do Trabalho

Neste capítulo, descrevem-se os objetivos perseguidos no trabalho e discutem-se as razões que justificam a apresentação da tese.

3.1 Objetivo Geral

O principal objetivo perseguido nesse trabalho é a produção de partículas poliméricas por intermédio do processo de polimerização em suspensão, com a finalidade de produzir partículas com morfologia esférica para uso como suporte para imobilização de enzimas (L-asparaginase, BSA e lisozima) e como agentes embolizantes. A incorporação de enzimas com propriedades farmacológicas nas partículas poliméricas tem como objetivo combinar o efeito mecânico do procedimento de embolização com o procedimento quimioterápico dos medicamentos (quimioembolização). Isso pode permitir o aumento da eficiência de ambos os processos de tratamento. Ao mesmo tempo em que a partícula polimérica obstrui os vasos sanguíneos que alimentam o tumor, a carga de uma enzima ou medicamento, como a L-asparaginase, contribui com a eliminação das células cancerígenas.

3.2 Objetivos Específicos

- Foi produzido micropartículas de PVAc e PVAc-co-PMMA por polimerização em suspensão para ser utilizado como suporte;

- Imobilização da L-asparaginase nas partículas poliméricas de poli(acetato de vinila) (PVAc) para ser utilizadas como agentes embólicos; foram testadas técnicas de incorporação da enzima durante o processo de polimerização. Dessa maneira, foi testada a técnica de aprisionamento do medicamento em uma única etapa, que pode tornar o processo mais simples e barato;
- Como a adição de L-asparaginase ao meio de reação pode alterar a atividade enzimática, foi analisada a atividade enzimática nas condições do processo de reação;
- Devido ao alto valor da L-asparaginase, foram também utilizadas neste trabalho a albumina do soro bovino (BSA) e a lisozima como modelos para estudos de imobilização, em que foram variadas a temperatura e pH no processo de adsorção das proteínas sobre os suportes poliméricos. Dessa forma, foi possível compreender melhor os efeitos que as condições de operação causam sobre o processo de imobilização de enzimas sobre as micropartículas poliméricas.
- Foi realizado a produção de nanopartículas de PVAc por polimerização em emulsão, para avaliar a capacidade das nanopartículas em adsorver a lisozima;
- As micropartículas e nanopartículas produzidas neste trabalho foram caracterizadas pelas técnicas discutidas no Capítulo 4.

3.3 Relevância e Justificativa

No Capítulo 2 foi discutido o uso de partículas poliméricas na indústria farmacêutica. A literatura mostra que a utilização de polímeros como agentes carregadores de medicamentos pode trazer para o indivíduo uma série de benefícios, como o uso de menores doses de medicamentos, o que pode resultar consequentemente numa diminuição dos efeitos colaterais (YANG *et al.*, 2009).

As partículas poliméricas podem ser usadas como agentes embolizantes, obstruindo os vasos sanguíneos que levam nutrientes até o tumor. Neste caso, a incorporação de um medicamento, como a L-asparaginase, que hidrolisa o aminoácido L-asparagina presente na corrente sanguínea, pode levar à depreciação do tumor canceroso, potencializando o tratamento local.

O uso de um sistema de polimerização em suspensão para produzir partículas é justificado pelo fácil controle, a baixa viscosidade do sistema e a facilidade de recuperação do produto, sendo necessária apenas a filtração e a lavagem das partículas

poliméricas a vácuo. As partículas poliméricas produzidas por este processo têm a vantagem de apresentar a morfologia esférica e apresentar o diâmetro útil para uso como agentes de embolização.

Na literatura são encontrados diferentes estudos sobre a incorporação de medicamentos em partículas poliméricas. Esses estudos na maior parte são desenvolvidos com partículas preparadas em sistemas em emulsão, quase sempre usando monômeros derivados de acrilatos, com o objetivo de produzir polímeros biodegradáveis (ARIAS *et al.*, 2008). Porém, podem ser encontrados alguns estudos também a respeito de materiais preparados por polimerização em suspensão (INCONOMOPOULOU *et al.*, 2005).

Os estudos realizados sobre a incorporação de fármacos na matriz polimérica geralmente utilizam fármacos pertencentes à classe dos antibióticos (INCONOMOPOULOU *et al.*, 2005), embora medicamentos pertencente à classe dos anticancerígenos também tenham sido estudados em diversos trabalhos na literatura (MATYJASZEWSKI *et al.*, 2008). Esses estudos geralmente avaliam a cinética de liberação. No presente trabalho, estudam-se as influências causadas pela incorporação *in situ* do fármaco durante o processo de polimerização e também as características das partículas produzidas na presença do medicamento, além da atividade do medicamento após a reação. Também é estudada a incorporação do fármaco por intermédio de processos de adsorção por contato com soluções de L-asparaginase, BSA e lisozima.

Como já discutido, o tempo de meia vida da L-asparaginase na corrente sanguínea é de aproximadamente 26 h (YANG *et al.*, 2009). Por este motivo, o paciente tem de tomar doses diárias elevadas do medicamento, o que aumenta os efeitos colaterais. Estudos mostram que a incorporação da L-asparaginase em uma matriz polimérica pode aumentar a meia vida da L-asparaginase, como verificado no complexo PEG-asparaginase, em que um tempo de meia-vida de 15 dias foi alcançado.

Por todas as razões apresentadas, o estudo aqui proposto e realizado parece plenamente justificado.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4.0 Metodologia Experimental

Neste capítulo descrevem-se os métodos experimentais utilizados para realizar as reações de polimerização e os métodos de caracterização usados. Descrevem-se também os métodos de imobilização e caracterização da atividade enzimática.

4.1 Unidade Experimental

A Figura 4.1 apresenta o esquema da unidade experimental empregada durante as polimerizações em suspensão. Esta unidade experimental está localizada no LMSCP. A unidade experimental é constituída pelos seguintes componentes:

- 1 – Agitador mecânico de aço inox e impelidor do tipo hélice, mostrado na Figura 4.2;
- 2 – Reator de vidro borossilicato encamisado com volume de trabalho de 1 L (FGG Equipamentos Científicos LTDA). A tampa do reator é de aço inox e possui orifícios para a alimentação de monômero, introdução do agitador e do condensador de refluxo. Uma braçadeira de aço é utilizada para fixar a tampa junto ao reator e um anel de viton é colocado entre a tampa e o reator para um perfeito vedamento;
- 3 – Condensador de refluxo com serpentina, usado para recuperar o monômero;

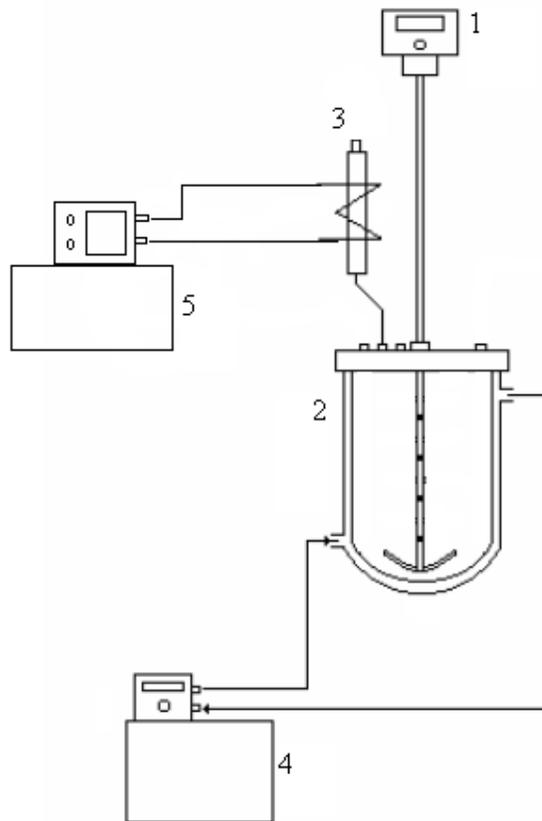


Figura 4. 1: Esquema simplificado da unidade experimental.

4 – Banho térmico com temperatura programada (HAAKE C25P), com fluido de circulação constituído por uma mistura de água destilada e etileno glicol (proporção 1:1);

5 – Banho térmico (FISHER SCIENTIFIC: ISOTEMP 2028P) acoplado a uma bomba de recirculação com controlador de temperatura (POLYSCIENCE KR-30A) para manter a temperatura no condensador no valor desejado. O fluido de circulação utilizado é água destilada.

4.2 Reagentes Utilizados

- Acetato de Vínila (VAc), adquirido da VETEC Química Fina com pureza de 99,5%, foi utilizado como monômero nas reações de polimerização em suspensão;
- Metacrilato de metila (MMA), comprado da VETEC Química Fina, com pureza de 99,5%, foi usado como monômero nas reações de polimerização em suspensão para a produção de copolímeros;

- Peróxido de benzoíla (BPO), comprado da VETEC Química Fina com pureza de 97% e contendo 25% de água co-cristalizada, foi usado como iniciador na polimerização em suspensão;

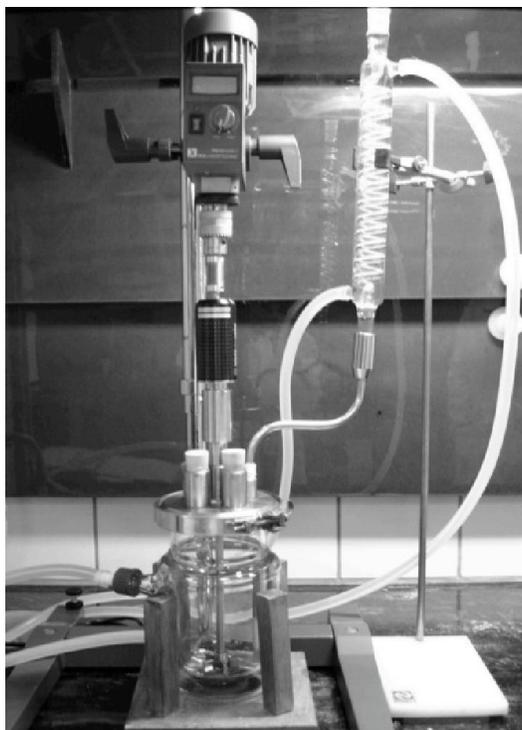


Figura 4. 2: Unidade experimental.

- Poli(álcool vinílico) (PVA), fornecido pela VETEC Química Fina com 98% de pureza, grau de hidrólise de 88% e massa molar ponderal média (M_w) de $78000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, foi usado como agente de suspensão da polimerização em suspensão;
- Tetrahidrofurano (THF) grau HPLC/Spectro, comprado da TEDIA Company Inc. com pureza de 99,90%, foi usado na análise de GPC como fase móvel e na solubilização das amostras;
- Clorofórmio deuterado (CID), fornecido pela CAMBRIDGE Isotope Laboratories Inc. com grau de pureza de 99,80%, foi empregado na solubilização de amostras para as análises de RMN;
- Água microfiltrada e desmineralizada ou mili-Q, foi usada para a preparação das soluções, enquanto água destilada foi usada para a lavagem do polímero durante a filtração;
- Acetona P.A., comprada da VETEC Química Fina com 99,5% de pureza, foi usada para limpeza do reator e impelidor após a utilização;

- Metil-etil-cetona, adquirido da VETEC Química Fina com 99% de pureza, também foi usado para limpeza dos materiais após as reações de polimerização;
- Ácido Clorídrico, adquirido da REAGEN, com pureza de 36,5-38%;
- Persulfato de potássio, adquirido da VETEC Química Fina com 99% de pureza, usado como iniciador nas reações de polimerização em miniemulsão;
- Lauril sulfato de sódio, adquirido da VETEC Química Fina com 90% de pureza, usado como surfactante nas reações de polimerização em suspensão;
- Hexadecano, adquirido da VETEC Química Fina com 99% de pureza, usado como estabilizante nas reações de polimerização em miniemulsão;
- Bicarbonato de sódio, adquirido da VETEC Química Pura, pureza 99,7%, usado para controlar o pH das reações de miniemulsão;
- Tris(hidroximetil)aminometano ácido clorídrico (tris-HCl), adquirido da USB, com pureza de 99%, usado para a produção do tampão tris-HCl pH 8,60;
- L-asparaginase adquirida da SIGMA-ALDRICH com pureza de 60% de proteína, usada como biomolécula nos experimentos de imobilização em partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA;
- Albumina de soro bovino, adquirida da SIGMA-ALDRICH com 98% de pureza, usada como biomolécula nos experimentos de imobilização em partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA;
- Lisozima, adquirida da SIGMA-ALDRICH, com pureza de 90%, usada como biomolécula nos experimentos de imobilização em partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA;
- Elspar[®], adquirida da BAGÓ, usada como biomolécula nos experimentos de imobilização em partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA;
- Fosfato de sódio monobásico, adquirido da VETEC Química Pura, com pureza de 99%, usado na preparação das soluções tampões;
- Carbonato de sódio anidro, adquirido da VETEC Química Pura, com pureza de 99,5%, usado na preparação da solução para parar a reação enzimática da L-asparaginase;
- Azul de coomassie (Brillant Blue G), SIGMA-ALDRICH, com pureza de 98%, usado na preparação das soluções de Bradford;
- Etanol 95%, adquirido da VETEC Química Pura, com pureza de 95%, usado na preparação das soluções de Bradford;

- Ácido fosfórico, adquirido da VETEC Química Pura, com pureza de 85%, usado na preparação das soluções de Bradford;
- Fenol, adquirido da VETEC Química Pura, com pureza de 99%, usado na preparação das soluções para medir a atividade enzimática da L-asparaginase;
- Nitroprussiato de sódio, adquirido da VETEC Química Pura, usado na preparação das soluções para medir a atividade enzimática da L-asparaginase;
- Hidróxido de sódio, adquirido da VETEC Química Pura, com pureza de 98%, usado na preparação das soluções para medir a atividade enzimática da L-asparaginase;
- Hipoclorito de sódio, adquirido da VETEC Química Pura, com pureza de 99%, usado na produção das soluções para medir a atividade enzimática da L-asparaginase;
- Asparagina monohidratada, adquirido da VETEC Química Pura, com pureza de 98,5%, usado como substrato para medir a atividade enzimática da L-asparaginase;
- Ácido tricloro acético, adquirido da VETEC Química Pura, com pureza de 99%, usado para parar a reação enzimática da L-asparaginase;
- Sulfato de amônia, adquirido da VETEC Química Pura, com pureza de 99%, usado na construção da curva de calibração padrão durante a análise da atividade enzimática da L-asparaginase;
- Fosfato de potássio monobásico, adquirido da VETEC Química Pura, com pureza de 98%, usado na preparação das soluções tampões;
- Fosfato de sódio dibásico anidro, adquirido da VETEC Química Pura, com pureza de 98%, usado na preparação das soluções tampões;
- Micrococcus liofilizados, adquirido da SIGMA-ALDRICH, usado como substrato para medir a atividade enzimática da lisozima;
- Cloreto de potássio, adquirido da VETEC Química Pura, com pureza de 99%, usado para preparar solução tampão.

4.3 Materiais e Equipamentos

Os materiais e os equipamentos empregados durante as reações de polimerização são descritos a seguir:

- Béqueres, com capacidade entre 30 a 2000 mL, para pesagens dos reagentes e preparo das soluções;
- Funil de vidro, usado para a alimentação das soluções reagentes e dos monômeros no reator;

- Bastão de vidro, usado para misturar e transferir líquidos entre vasos;
- Espátulas, para manipulação de reagentes e produtos sólidos;
- Kitassato, com capacidade de 1000 mL, utilizado na etapa de filtração do polímero;
- Funil de Bücher, utilizado para filtração do polímero;
- Placa de agitação (IKA C-MAG HS 7), usada para homogeneização das soluções utilizadas;
- Balanças (GEHAKA BG-400 e BELMARK 210A) com precisão de 0,001 g, usadas durante o preparo das soluções ou análise do sobrenadante;
- Papel de filtro (QUALY, gramatura 80, com diâmetro de poros de 14 μm), utilizado na etapa de filtração.
- Bomba de vácuo (QUIMIS Q35SD2), usada na etapa de filtração;
- Estufa a vácuo (PRECISION Modelo 29), usada para secagem das amostras, quando necessário;
- Microscópio óptico binocular (NIKON SZ800, com capacidade de ampliação de 50 vezes), com câmera digital (NIKON COOLPIX 995) acoplada, que permite a ampliação e digitalização de imagem, empregado para visualizar a morfologia das partículas obtidas nas polimerizações;
- Cromatógrafo (WATERS 600E, equipado com três colunas ULTRASTYRAGEL e detector refratométrico WATERS 2414), usado para a determinação da distribuição de massas molares das partículas produzidas. A calibração do equipamento foi feita com padrões de poliestireno, com massas molares na faixa de 500 a 3×10^6 Da;
- Calorímetro (DSC7 PERKIN ELMER), usado para a determinação do comportamento térmico das partículas produzidas;
- Analisador de tamanho de partículas (BECKMAN COLUTER, modelo LS 13 320), usado para determinação da distribuição de tamanhos das partículas por espalhamento de luz.
- Agitador orbital ou shaker da NOVA ETICA, usado durante o processo de imobilização das biomoléculas sob as partículas de polímeros;
- Tubos falcons, recipiente utilizado para realizar o processo de adsorção;
- Geladeira da marca Consul, para guardar reagentes e soluções;
- Espectrofotômetro UV, da marca SHIMADZU, usado para medir a absorbância das reações enzimáticas;

- Banho térmico, da marca IKA, usado para controlar a temperatura das reações enzimáticas;
- Balões volumétricos de 25 mL a 1000 mL, usado para a preparação das soluções;
- Pipeta semi-automática, da marca Eppendorf e ponteiras, para a pipetagem de soluções.

4.4 Reações de Polimerização em Suspensão

A metodologia empregada no presente trabalho está baseada nos trabalhos de PEIXOTO (2007) e OLIVEIRA (2011). As quantidades de reagentes utilizadas nas reações de polimerização estão descritas na Tabela 4.1. As condições usadas para a condução das reações de polimerização encontram-se resumidas na Tabela 4.2. Todas as condições foram mantidas constantes, exceto se mencionado em contrário.

Tabela 4. 1: Quantidades de reagentes utilizadas nas reações de polimerização.

Reagentes	Função	Massa (g)
Acetato de vínila (VAc)	Monômero	160-200
Metacrilato de metila (MMA)	Monômero	0-60
Peróxido de Benzoíla (BPO)	Iniciador	2-4
Poli(álcool vinílico) (PVA)	Agente de suspensão	0,2
Água desmineralizada e microfiltrada	Meio dispersante	420

Preparava-se uma solução de PVA, dissolvendo 0,2 g PVA em 420 g de água microfiltrada e desmineralizada, mantida sob agitação por 8 horas em um agitador magnético na temperatura ambiente. Essa solução era alimentada ao reator e esperava-se que a temperatura da solução se estabilizasse na temperatura estipulada para a reação de polimerização. Pesavam-se entre 160 ou 200 g de monômero (acetato de vínila), dependendo se era preparado um homopolímero de PVAc ou um copolímero de PVAc-co-PMMA. Para a produção de PVAc, a quantidade de VAc utilizado era de 200 g. Na produção do copolímero, utilizavam-se 20% em massa de MMA. Eram pesados 4 g de iniciador (peróxido de benzoíla), que eram solubilizados no monômero e adicionados ao

reator. A agitação era mantida a 1000 rpm por 4 horas. Após o tempo decorrido, a temperatura do banho térmico de aquecimento do vaso do reator era reduzida para 40 °C. Quando o sistema atingia esta temperatura, o reator era esvaziado.

Tabela 4. 2: Condições da polimerização em suspensão.

Agitação	1000 rpm
Temperatura	75 – 85 °C
Tempo de reação	4 horas

O polímero obtido era filtrado em um sistema a vácuo e lavado com água destilada fria. Após a filtração, o material era colocado para secar em estufa a vácuo ou na temperatura ambiente por um dia ou até observar a estabilização de massa de sólido. O polímero era processado em gral de porcelana para a desaglomeração de gumos de partículas, antes de ser armazenado. É importante enfatizar que a adição de MMA tinha o propósito principal de elevar a temperatura da transição vítrea (T_g) do material final, tornando-o menos susceptível à aglomeração. A manipulação da velocidade de agitação permitia ajustar o tamanho final das partículas produzidas, enquanto a manipulação da temperatura de reação permitia controlar a velocidade da reação.

4.5 Reações de Polimerização em Suspensão no Mini-Reator

Foi utilizado um segundo sistema de polimerização para produzir pequenas quantidades de partículas poliméricas. Nesse caso, o vaso do reator tem um volume útil de 100 mL e o sistema é automatizado (METTLER TOLEDO, modelo EASYMAX 102). O sistema possui um termopar acoplado, usado para controlar a temperatura do meio reacional, um agitador e um condensador, como apresentado na Figura 4.3. O sistema é todo automático, sendo controlado por um computador programado que manipula e monitora o início da reação, o tempo final, a velocidade de agitação e a temperatura do sistema. Após serem programados os valores pré-determinados das variáveis de operação, o sistema era posto em funcionamento com uma solução inicial de agente em suspensão. As demais soluções eram adicionadas após o sistema atingir a temperatura de reação. O sistema era então deixado sob agitação durante o tempo estipulado (4 horas).

A metodologia empregada no presente trabalho para uso em min-reatores está também baseada no trabalho de PEIXOTO (2007) e de OLIVEIRA (2011). As quantidades de reagentes utilizados nas reações de polimerização no mini-reator estão descritas na Tabela 4.3. A agitação do sistema foi mantida em 900 rpm. Todas as condições foram mantidas constantes, exceto se mencionado em contrário.

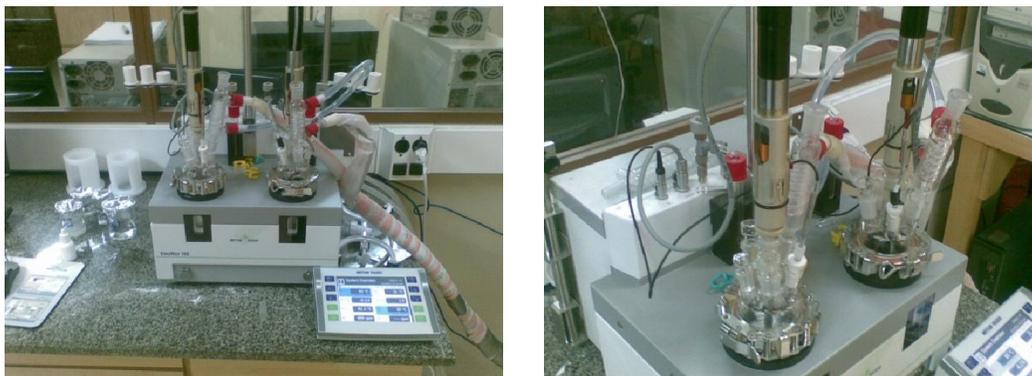


Figura 4. 3: Unidade experimental do mini-reator.

4.6 Reação de Saponificação

Com a finalidade de produzir sobre a superfície das partículas de polímero uma camada de PVA, as partículas de PVAc eram submetidas a uma reação de saponificação, segundo as recomendações descritas por PEIXOTO (2007). A produção de PVA não pode ser obtida por polimerização direta, pois seu monômero (álcool vinílico) não existe no estado livre. O álcool vinílico é instável e, quando é produzido, instantaneamente se rearranja, formando o seu tautômero (o acetaldeído), que predomina no equilíbrio. Por isso, a obtenção do PVA ocorre pela saponificação de um poli(éster vinílico), como o poli(pivalato de vínila) (PVPi) ou o PVAc (SANDLER *et al.*, 1998).

Utilizando os mesmos sistemas usados para a produção das partículas de PVAc, uma quantidade específica de partículas poliméricas era adicionada ao sistema depois de secas, junto com uma solução de 40% em massa de hidróxido de sódio NaOH. A água utilizada para preparar esta solução era microfiltrada e desmineralizada. O sistema era mantido em contato por 2 horas, a uma temperatura e uma agitação constante de 30 °C e 700 rpm, respectivamente. As quantidades de reagentes e as condições de operação foram definidas conforme os estudos desenvolvidos por PEIXOTO (2007). Para cada

100 g de polímeros utilizados, eram utilizado um volume de 400 mL de NaOH 40% (m/m).

Tabela 4. 3: Quantidade de reagentes utilizadas nas reações de polimerização no sistema do mini-reator.

Reagentes	Função	Massa (g)
Acetato de vinila (VAc)	Monômero	32,25
Peróxido de benzoila (BPO)	Iniciador	0,645
Poli(álcool vinílico) (PVA)	Agente de suspensão	0,03223
Água desmineralizada e microfiltrada	Meio dispersante	67,7

4.7 Polimerização em Miniemulsão do Acetato de Vinila

Com a finalidade de produzir partículas com diâmetro na escala nanométrica, para avaliar o efeito da área específica sobre o processo de adsorção das biomoléculas, foram conduzidas reações de polimerização em miniemulsão. Neste caso, só foram produzidas partículas do homopolímero, já que a intenção era apenas avaliar o efeito induzido pela área específica.

As reações de polimerização em miniemulsão foram conduzidas no mini-reator, com temperatura de 80 °C e agitação de 500 rpm. Foram usados como agente iniciador o persulfato de potássio (0,08 g), como monômero o acetato de vinila (16 g), como meio dispersante a água destilada (64 g), como emulsificante o lauril sulfato de sódio (LSS) (0,16 g), como coestabilizante o hexadecano (0,064) e bicarbonato de sódio para controle do pH (0,064 g). A reação em miniemulsão era iniciada com a mistura de duas soluções, uma aquosa e outra orgânica. A fase aquosa era composta pela água, LSS e bicarbonato. Um pouco de água era reservada para solubilizar o iniciador, persulfato de potássio, solúvel na fase aquosa. A fase orgânica era formada pelo monômero e hexadecano. A fase orgânica era colocada no sonicador modelo BRANSON, por 5 minutos com amplitude de 20% (para promover a homogeneização). A fase orgânica era

adicionada à fase aquosa no vaso do reator e processo era mantido por 4 horas a 80 °C e 500 rpm.

4.8 Técnica de Imobilização Enzimática

4.8.1 Imobilização de L-asparaginase

No Capítulo 2 foram descritas diversas técnicas e processos para imobilização de enzimas. Baseando-se no processo mais utilizado e barato, optou-se inicialmente por realizar a imobilização por adsorção.

As partículas poliméricas eram primeiramente tratadas, com a finalidade de remover monômero residual e outros compostos que pudessem interferir no processo de imobilização. O tratamento consistia em colocar as partículas poliméricas mergulhadas na solução tampão tris/HCl com pH 8,6 a 50 mM por um tempo de 10 minutos sob agitação de 250 rpm em um agitador orbital (NOVA ÉTICA, Modelo. 430), mantida na temperatura ambiente. Após o término dessa etapa, as partículas poliméricas eram filtradas em um sistema a vácuo. O material polimérico era coletado e armazenado.

Os primeiros testes conduzidos para avaliar o processo de imobilização de moléculas biológicas sobre as partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA foram realizadas utilizando a enzima L-asparaginase proveniente do medicamento Elspar[®], produzido pela indústria farmacêutica Bagó. Este medicamento consiste em uma mistura de L-asparaginase com manitol. Estes experimentos foram realizados em pH 8,60 em tampão tris/HCl, já que este é o pH em que a enzima apresenta maior atividade.

Uma solução de enzima (L-asparaginase) foi preparada usando tampão tris/HCl com pH 8,6 a 50 mM. Esta solução continha 0,2 g.L⁻¹ de material liofilizado a partir do medicamento Elspar[®]. A aplicação do método de Bradford (ver Seção 4.9) revelou que a concentração de enzima era aproximadamente igual a 70 mg.L⁻¹; ou seja, 35% da massa do medicamento era formada por L-asparaginase. A solução era colocada em contato com as partículas poliméricas pré-tratadas e amostras do sobrenadante eram retiradas em intervalos pré-determinados. O método de Bradford foi utilizado para analisar a concentração total de proteínas do sobrenadante em contato com o suporte polimérico.

Estudos similares em outros pHs não foram conduzidos porque a indústria farmacêutica Bagó parou de fornecer o medicamento Elspar[®] para as farmácias em 2011, pois teve que mudar o processo de produção para se adequar a novas normas da

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Por causa desse problema, a produção de Elspar[®] realizada em uma unidade de produção em Bangu, Rio de Janeiro, caiu drasticamente e o medicamento passou a ser fornecido apenas para hospitais.

Devido à limitação na produção do Elspar[®], os experimentos passaram a ser conduzidos com L-asparaginase fornecida pela Sigma-Aldrich. A ampola com a enzima continha de L-asparaginase uma massa de aproximadamente 5 mg ou 10000 UI, quantidade muito pequena para realizar os muitos estudos de adsorção. Além disso, o preço desse reagente é demasiadamente caro (cerca de R\$ 3.500,00 por ampola), de forma que o uso de L-asparaginase foi minimizado, sempre que possível.

4.8.2 Imobilização de BSA

Foram realizados testes para avaliar o processo de imobilização de BSA sobre os suportes poliméricos. A BSA foi aplicada nos testes por ser um reagente barato, fácil de ser comprado e possuir grande volume de dados disponível na literatura.

Inicialmente os experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar a cinética do processo de imobilização de BSA sobre o polímero. Os estudos foram realizados em tampão fosfato de sódio com pH 8,60 e força iônica de 0,05 M. A concentração das soluções de BSA foi inicialmente de 70 mg/L. Em seguida os testes foram realizados utilizando solução de BSA em diferentes pH's. Os pH's estudados foram iguais a 3,00; 5,00; 6,80 e 8,60, para avaliar o comportamento do processo de imobilização da BSA nas diferentes condições. Os experimentos foram realizados de forma a medir a evolução da concentração de BSA presente no sobrenadante ao longo do tempo. Para isso, era medida como referência a quantidade de proteína presente na fase aquosa no tempo zero, no momento em que a solução era colocada em contato com os suportes poliméricos. Após 24 horas, era retirada outra alíquota de sobrenadante e aplicado o método de Bradford, para avaliar a quantidade de BSA que permaneceu na solução. Os experimentos foram realizados com 1 g de material adsorvente e 10 mL da solução de BSA.

Foram também conduzidos experimentos para avaliar a cinética de imobilização de BSA com concentrações de proteína de 80 a 100 mg.L⁻¹, utilizando tampão fosfato a 0,05 M em pH's de 3,00; 5,00; 6,80 e 8,60.

Na etapa de acondicionamento foram utilizados 1 ou 2 g de polímeros, acondicionados em um tubo falcon com volume total de 50 mL. Foram utilizados 10 mL de tampão para a etapa de tratamento da superfície das partículas. Os tubos falcon

com as partículas imersas em tampão foram deixados em um shaker por 24 horas a 30 °C e com agitação de 250 rpm. Este primeiro processo tinha por objetivo remover impurezas e bolhas de ar e deixar a superfície das partículas dos polímeros no pH desejado. Após o processo de acondicionamento, os adsorventes eram filtrados, utilizando um sistema de filtração da Millipore, com membranas de 0,22 µm. As partículas foram novamente armazenadas em tubos falcon com capacidade de 50 mL. Neste momento do experimento os tubos podiam ser guardados em geladeira ou seguir para a segunda etapa.

Na segunda etapa, as partículas eram colocadas em tubo falcon em contato com a solução de BSA devidamente preparada no tampão de interesse. Foram sempre utilizados 10 mL da solução de BSA. Os tubos falcon foram colocados em um shaker, a 30 °C e sob agitação de 250 rpm por 24 horas. Eram então retiradas alíquotas em tempos pré-fixados, que eram armazenadas em geladeira para análise posterior por um período máximo 24 horas.

Na terceira etapa do experimento, as alíquotas armazenadas em geladeira eram analisadas. A análise empregada foi o método de Bradford, para medir os teores de proteína presentes no sobrenadante. Os resultados foram registrados em gráficos como funções do tempo.

4.8.3 Imobilização de Lisozima

Foram condizidos estudos da imobilização de lisozima sobre os dois materiais estudados neste trabalho, PVAc e PVAc-co-PMMA, com a finalidade de aprimorar o entendimento sobre o processo de adsorção de enzimas sobre as partículas poliméricas. As soluções de lisozima foram preparadas em tampão fosfato de sódio ou carbonato de sódio com força iônica de 0,05 M, utilizando a concentração de enzima na faixa de 80 a 100 mg.L⁻¹. Essa faixa foi definida através de experimentos preliminares. Os tampões foram preparados em pH's de 3,00; 5,00; 6,80; 8,60 e 10,80. O objetivo desses experimentos era avaliar a influência do pH sobre o processo de adsorção da enzima.

O processo de imobilização de lisozima foi realizado de forma similar ao usado no estudo da adsorção de BSA. A única modificação introduzida no processo de imobilização de lisozima foi feito durante a segunda etapa, quando as partículas poliméricas eram colocadas em contato com a solução de lisozima, e não de BSA. Além disso foi medida também a atividade enzimática do meio sobrenadante e do sistema que continha a enzima imobilizada.

4.9 Método de determinação de proteína

4.9.1 Método de Bradford

O método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizado neste trabalho teve o objetivo determinar a concentração de proteína presente nas soluções de L-asparaginase, BSA e lisozima e, conseqüentemente, a massa de proteína restante no sobrenadante da solução de imobilização. O método de Bradford procura determinar as ligações peptídicas existente nas moléculas de proteína. Este método está baseado na preparação de uma solução de Azul de coomassie G, conhecido como solução de Bradford. A Tabela 4.5 mostra os reagentes e quantidades usadas para preparar a solução de Bradford.

Tabela 4. 4: Reagentes e quantidades usadas na preparação da solução de Bradford.

Reagente	Quantidade
Azul de coomassie G	50 mg
Etanol 95%	25 mL
Ácido fosfórico 85%	50 mL

Os três reagentes reportados na Tabela 4.5 eram colocados em um frasco, sob agitação por 1 hora. Após este período, eram acrescentados 500 mL de água destilada. A solução era filtrada em papel de filtro de gramatura 80 e armazenada em vidro âmbar a frio. Toda vez que era necessário realizar uma análise de Bradford, a solução era filtrada e era construída uma nova curva de calibração, utilizando para isso uma solução de BSA com concentração conhecida.

O processo de análise consistia em adicionar em um Eppendorf 1 mL da solução de Bradford e 0,1 mL da amostra ou da solução padrão (para a construção da curva de calibração). Após 10 minutos na temperatura ambiente, era feita a leitura da absorção em espectrômetro (UVMINI 1240, SHIMADZU) no comprimento de onda de 600 nm. Admite-se que a intensidade da leitura (medida como fração de luz absorvida) é proporcional ao teor de proteína.

4.9.2 Análise de BSA por UV

Uma forma rápida e fácil de analisar a presença de BSA em uma amostra é avaliar a absorção de luz no comprimento de onda de 280 nm, mais conhecida como análise de BSA por ultravioleta (UV). Nesta região a detecção de BSA é sensível. Como pode ser visto na Figura 4.4, a curva de calibração obtida por esta análise resulta em correlação linear muito boa, diferentemente dos casos em que se utiliza apenas o método de Bradford para a detecção de proteína. Outra importante vantagem do método de detecção de BSA por ultravioleta é a maior sensibilidade e o intervalo de medida maior.

No método baseado em UV não é necessário preparar soluções de reagentes, como no caso do método de Bradford. Para medir a concentração de BSA em uma solução de concentração desconhecida, é necessário apenas realizar a leitura da absorção da alíquota em 280 nm e correlacionar o dado obtido com a curva de calibração.

Pode-se concluir que o método de análise baseado no UV é um método fácil e rápido de ser realizado. No entanto, a grande desvantagem desse método é a possível influência externa de interferentes. Dessa forma, para aplicação do método, é necessário realizar experimentos para avaliar a interferência de possíveis resíduos químicos presentes nos suportes poliméricos e que podem difundir para as soluções postas em contato com as partículas de polímeros, afetando a qualidade de medida.

4.10 Atividade Enzimática

4.10.1 Método Fenol-Hipoclorito para Atividade da L-asparaginase

Para a medida de atividade enzimática, usou-se o método conhecido como fenol-hipoclorito, desenvolvido por WEATHERBURN (1967). Para aplicar o método, é necessário preparar dois reagentes: os reagentes A e B. O reagente A é constituído por uma mistura de fenol e nitroprussiato de sódio em água. Para preparar 500 mL de solução do reagente A, são necessários 5 g de fenol e 25 mg de nitroprussiato de sódio. O reagente B é composto de hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio em água mili-Q. Devem ser utilizados 2,5 g de hidróxido de sódio (NaOH) e 4,2 mL de hipoclorito de sódio, completando-se o volume para 500 mL, usando água mili-Q. As soluções

preparadas devem ser conservadas em frascos de cor âmbar em geladeira por no máximo 1 mês (WEATHERBURN, 1967).

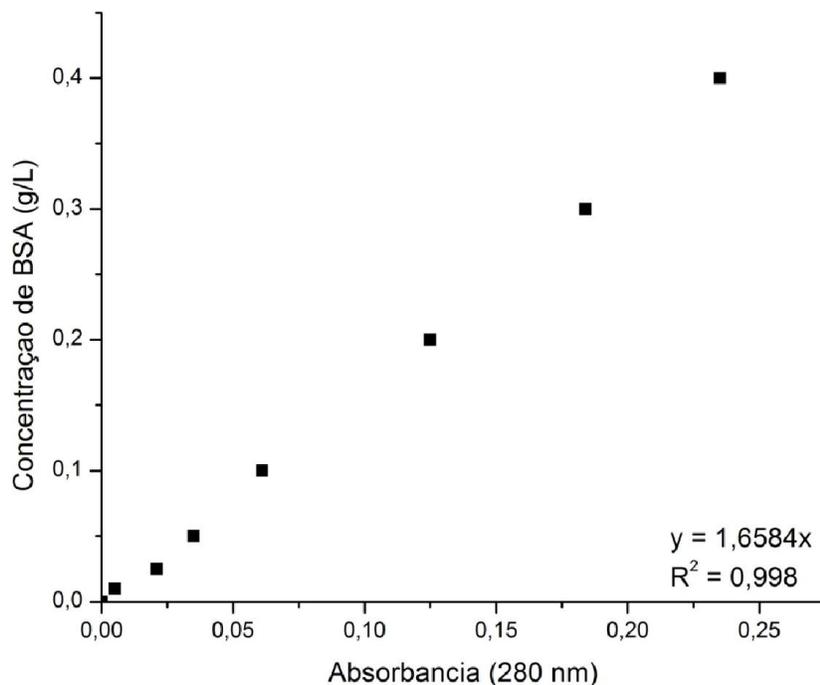


Figura 4. 4: Curva de calibração da concentração de BSA pelo método de análise por UV.

Após o preparo das soluções, as análises de atividade enzimática podem ser realizadas. Para isso, preparava-se uma solução de enzima de L-asparaginase, utilizando o medicamento Elspar[®], em tampão Tris/HCl pH 8,6 com 50mM. A concentração do medicamento utilizado era de 0,2 g.L⁻¹. Esta solução era armazenada em geladeira por no máximo uma semana. Uma segunda solução de asparagina também era preparada, na concentração de 2 g.L⁻¹ no mesmo tampão Tris-HCl. A solução de ácido tricloroacético 1,5 M era utilizada para interromper a reação enzimática.

A reação enzimática era realizada em um tubo falcon de 50 mL. Neste tubo eram adicionados 10 mL da solução de asparagina 2 g.L⁻¹. Retirava-se uma amostra, para ser analisada pelo método fenol-hipoclorito. A primeira amostra retirada equivalia ao tempo zero. Logo em seguida, adicionavam-se 0,5 mL da solução de L-asparaginase e iniciava-se a marcação do tempo. O meio reacional era colocado em um banho térmico mantido na temperatura de 37 °C. Depois de 5 minutos, era retirada mais uma amostra.

As amostras eram armazenadas em um tubo eppendorf com 3 gotas da solução de ácido tricloroacético 1,5 M, para interromper a reação. Os tempos escolhidos para tirar alíquotas do meio reacional eram de 0, 5, 10, 20, 40 e 60 minutos. Com estes tempos, era possível observar a cinética da atividade da enzima.

O método fenol-hipoclorito baseia-se na determinação do nitrogênio presente nas amostras. Durante a reação enzimática da L-asparaginase com asparagina, a enzima transforma o substrato em ácido aspártico e amônia. Com a utilização do método, pode-se determinar a quantidade de amônia presente nas alíquotas recolhidas. As amostras retiradas do meio reacional eram submetidas à análise para a determinação da amônia presente. Para isso, em um tubo de ensaio com 20 µL de amostra, eram adicionados 5 mL do reagente A e 5 mL do reagente B. O tubo era tampado, homogeneizado e deixado em banho térmico a 37 °C por 20 minutos. As amostras eram lidas em espectrômetro (UVmini 1240, marca SHIMADZU), no comprimento de onda de 625 nm. O branco usado para zerar o equipamento correspondia à primeira alíquota retirada do sistema no tempo zero. A sensibilidade do método é boa no intervalo de 0,025 a 0,3 g.L⁻¹ de nitrogênio. Uma curva de calibração construída com soluções padrões de sulfato de amônio era usada para correlacionar absorbância com a concentração de amônia durante as análises.

O método fenol-hipoclorito só foi aplicado nos primeiros resultados apresentados neste trabalho, por ser um método que usa fenol, um reagente cancerígeno. O teste foi abandonado depois que kits enzimáticos foram adquiridos pelo laboratório. A seguir é descrita a utilização do kit enzimática para medir a atividade enzimática da L-asparaginase.

4.10.2 Medida de Atividade Enzimática de L-Asparaginase Utilizando Kit Enzimático

Encontra-se disponível no mercado brasileiro um kit enzimático conhecido pelo nome comercial UREIA 500, produzido pelo laboratório Doles, localizado em Goiânia (GO), que tem a finalidade de dosar a ureia no soro, plasma e urina. Este kit possui o mesmo funcionamento do método fenol-hipoclorito descrito anteriormente; porém, em lugar do fenol, este kit utiliza o salicilato de sódio e a enzima urease para quebrar a ureia, produzindo gás carbônico e amônia, que é dosada por um espectrofotômetro. Na reação enzimática entre a L-asparaginase e a asparagina, os produtos da reação são o

ácido aspártico e a amônia. A atividade da L-asparaginase pode ser medida pela dosagem de amônia. Assim, em meio alcalino e na presença de salicilato, nitroprussiato de sódio e hipoclorito, os íons de amônia reagem, dando origem a um composto cromógeno azul esverdeado. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração da amônia na amostra analisada, produzida pela reação enzimática.

O kit enzimático possui quatro frascos de reagentes. O frasco com urease não foi utilizado durante o procedimento analítico, porque a produção de amônia ocorre por meio da reação de L-asparaginase com asparagina. Um segundo frasco, conhecido como Reagente 1, é formado por uma mistura de salicilato de sódio 60 mMol, nitroprussiato de sódio na concentração de 3,4 mMol e EDTA dissódico na concentração de 1,35 mMol. O Reagente 2 contém hipoclorito de sódio 0,120 mol.L⁻¹ e hidróxido de sódio 3,75 mol.L⁻¹. O quarto frasco contém uma solução padrão de 80 mg.dL⁻¹ de ureia. Apenas os reagentes identificados como Reagente 1 e Reagente 2 foram utilizados.

O reagente identificado no kit enzimático como Reagente 1 era diluído em um balão volumétrico de 500 mL com água deionizada. A mistura era homogeneizada e armazenada em frasco âmbar rotulado, ao abrigo da luz, na temperatura de 2-8 °C. A solução permanece estável por 2 anos após sua reconstituição.

O Reagente 2 era transferido para um balão volumétrico e diluído até 500 mL com água deionizada. A mistura era homogeneizada, armazenada em frasco plástico e rotulada, sendo mantida ao abrigo da luz na temperatura de 2-8 °C.

Os tubos de ensaios eram identificados e o procedimento analítico era realizado como resumido na Tabela 4.5. A coluna chamada de Branco equivale ao tubo de ensaio utilizado para zerar o equipamento. A terceira coluna mostra as quantidades utilizadas no tubo de ensaios para analisar a amônia produzida nas amostras de interesse. Na última coluna são mostradas as quantidades necessárias para analisar as soluções padrões utilizadas para a construção da curva de calibração. Os tubos de ensaios eram homogeneizados e incubados a 37 °C por 10 minutos. As absorbâncias eram então medidas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm, definindo o zero como o branco. A cor final permanece estável por 60 minutos.

Tabela 4. 5: Resumo das quantidades em volume para aplicação do kit enzimático.

	Branco (mL)	Amostra (µL)	Padrão (µL)
Reagente 1	2	2	2
Solução Padrão	-	-	20
Amostra	-	20	-
Reagente 2	2	2	2

Durante os experimentos foi observado o efeito do tampão tris/HCl sobre as análises de amônia. O tampão tris/HCl possui em sua fórmula molecular o nitrogênio ($C_4H_{11}NO_3$), que pode ser detectado pelos dois métodos empregados neste trabalho. Com a finalidade de reduzir a influência do tampão, o branco era realizado com uma alíquota de 20 µL da solução de tampão tris/HCl. Outra forma de eliminar a influência do tampão tris/HCl foi substituir este tampão por um outro tampão fosfato. ABUD (2005) reportou que a atividade enzimática verificada no tampão de fosfato é menor do que a atividade verificada no tampão de tris/HCl.

4.10.3 Medida de Atividade Enzimática da Lisozima

A análise de atividade enzimática da lisozima seguiu o protocolo proposto pela Sigma-Aldrich. De acordo com este protocolo, deve se inicialmente preparada uma solução tampão de fosfato de potássio com força iônica de 66 mM e pH 6,2. O substrato utilizado para medir a atividade enzimática é o *micrococcus* liofilizado adquirido da Sigma-Aldrich. Foi preparada uma solução no tampão fosfato de potássio utilizando 0,01% de massa de *micrococcus*. Esta solução deve ter densidade óptica de aproximadamente 0,6 em 450 nm, utilizando uma cubeta de vidro com caminho óptico de 1 cm.

Para análise da atividade enzimática, eram acondicionado 2,5 mL da solução de *micrococcus* em uma cubeta e adicionados 0,1 mL da solução ou do sobrenadante de lisozima, em que se desejava medir a atividade enzimática. Os tempos de leitura eram pré-fixados, realizando-se ao menos cinco medidas no primeiro minuto de reação. O espectrofotômetro era então zerado com o tampão de fosfato de potássio. A densidade

óptica medida decresce ao longo do tempo, como apresentado na Figura 4.5, que atesta a boa reprodutibilidade do método. À medida que a densidade óptica cai, utilizam-se as primeiras medidas que apresentam um comportamento linear para realizar a regressão linear, obtendo-se o coeficiente angular que pode ser usado para calcular a atividade enzimática na forma de Equação (4.1). A atividade enzimática da lisozima é definida como a atividade que produz uma queda de absorbância (ΔA_{450nm}) de 0,001 por minuto em pH de 6,24 a 25 °C, usando uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* como substrato, em 2,6 mL de uma mistura reacional.

$$UI = \frac{(A_{450nm}/\text{min Amostra} - A_{450nm}/\text{min Branco})}{(0,001)(0,1)(mg\ de\ amostra)} \quad 4.1$$

4.11 Curva de Calibração para a L-Asparaginase

Tanto no método de Bradford quanto no método da atividade enzimática, usados para caracterizar soluções de L-asparaginase, era necessária a construção de uma curva de calibração. A curva de calibração é a representação gráfica da relação entre os valores das absorbâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrões. São necessários três passos para confeccionar a curva padrão: preparar as soluções padrões; medir os valores de absorbância das soluções padrões, de acordo com o procedimento técnico especificado; e montar a curva de calibração propriamente dita, relacionando os valores de absorbância com os de concentração. A relação entre a absorbância e a concentração de amônia é linear na faixa de concentração de 0 a 280 mg.dL⁻¹ para o método fenol-hipoclorito e para o kit enzimático. Para o método de Bradford, o intervalo de identificação adequado é de 0,02 a 0,2 g.L⁻¹ de proteína (BRADFORD, 1976).

Na Figura 4.6 está apresentada uma das curvas de calibração obtidas para o método fenol-hipoclorito. Outras curvas de calibração para a utilização do kit enzimático também foram confeccionadas ao longo do trabalho. Observa-se na Figura 4.6 o caráter marcadamente linear da calibração e a boa precisão da análise.

Na Figura 4.7 é apresentada uma curva de calibração para o método de Bradford, quando aplicado a soluções de L-asparaginase. Curvas similares foram construídas para cada conjunto de amostras analisadas com o reagente de Bradford, não sendo utilizada a

curva de calibração de uma análise em um outro dia. Como no caso anterior, observa-se o caráter marcadamente linear da calibração e a boa precisão da análise.

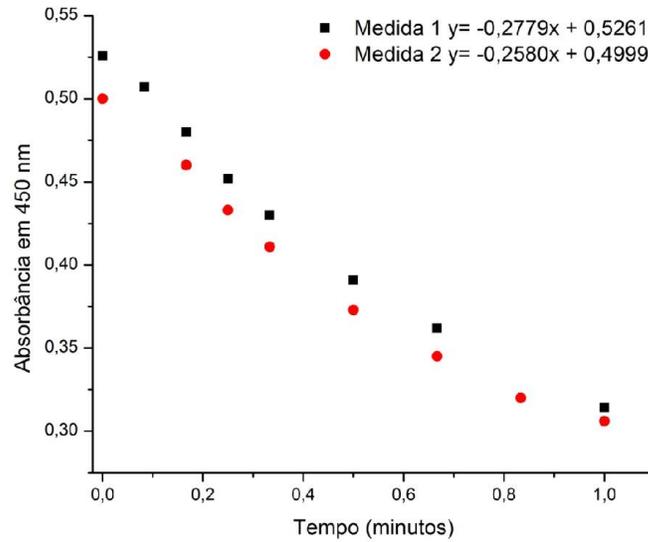


Figura 4. 5: Medidas da absorbância em 450 nm de uma solução de *Micrococcus lysodeikticus* contendo lisozima.

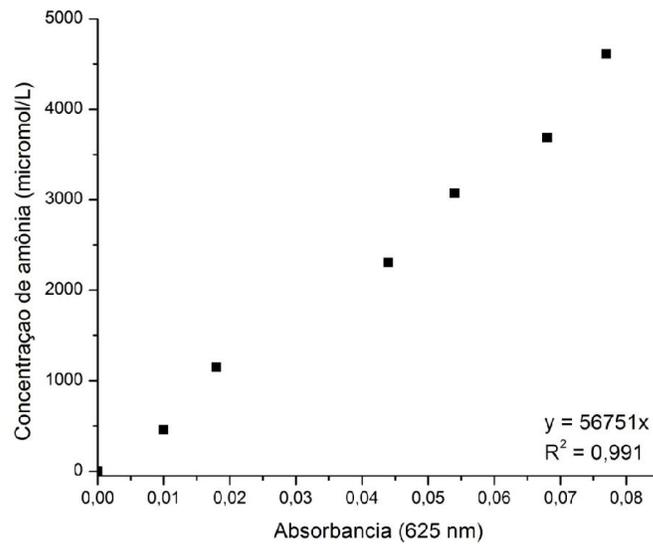


Figura 4. 6: Curva de calibração para análise de solução de L-asparaginase com o método fenol-hipoclorito.

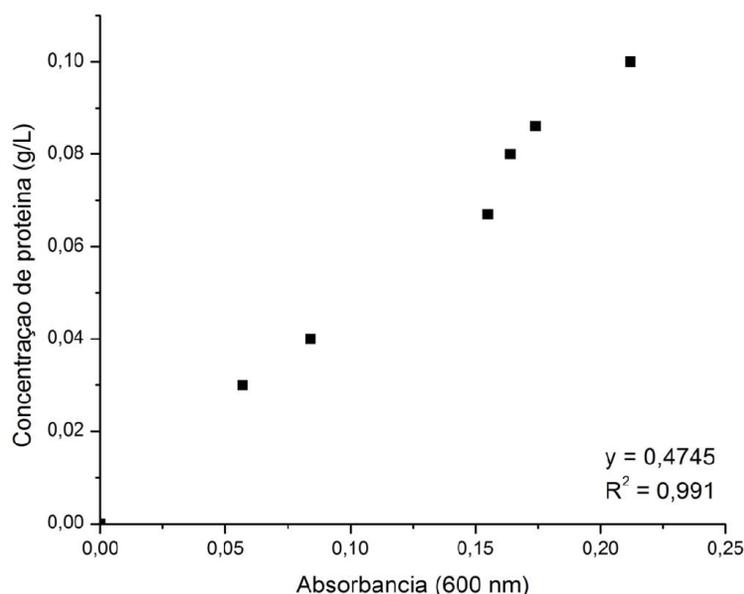


Figura 4. 7: Curva de calibração para o método de Bradford, utilizando solução padrão de BSA.

4.12 Técnicas de Caracterização do Polímero

As propriedades dos materiais poliméricos são influenciadas por suas composições químicas, história do processo de polimerização e morfologia das partículas resultantes. Por isso, as técnicas de caracterização constituem ferramentas importantes na pesquisa de polímeros. Dessa forma, os polímeros produzidos foram submetidos a diversas técnicas de caracterização, para a determinação de suas propriedades físicas, químicas e morfológicas.

4.12.1 Microscopia Óptica

A microscopia óptica permite a análise da estrutura e morfologia das partículas de polímero com o uso de microscópio. Utilizou-se o microscópio óptico SMZ 800 (Nikon, Japão) e a câmera digital Coolpix 995 (Nikon, EUA).

4.12.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A ressonância magnética nuclear é um procedimento muito empregado para a identificação da estrutura e do comportamento dinâmico das cadeias poliméricas, em

solução ou no estado sólido. A identificação de certos átomos ou grupos em uma molécula, assim como as suas posições relativas, pode ser obtida por RMN em uma, duas ou três dimensões (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). Aproveita-se para isso o fato de que alguns núcleos exibem momentos magnéticos (SILVERSTEIN *et al.*, 2006) e spin não nulos. A ressonância magnética é o resultado da interação entre o momento magnético do spin nuclear e o campo magnético imposto.

A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) é um tipo de espectrometria de absorção que correlaciona as absorções da radiação eletromagnética de uma amostra com as características estruturais da mesma. A partir dos espectros de RMN, pode-se identificar a estrutura química e estereoquímica de compostos orgânicos com maior facilidade do que a partir de outros tipos de espectros de absorção, como no caso da técnica de infravermelho e de espectroscopia de massas (SILVERSTEIN *et al.*, 2006).

As amostras eram preparadas usando clorofórmio deuterado ($\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) para dissolver o polímero. O tetrametilsilano (TMS) foi usado como referência interna e manteve-se a temperatura constante igual a 25 °C em todas as análises. Os espectros de RMN ^{13}C foram obtidos no Instituto de Macromolécula Eloisa Mano (IMA) da UFRJ. O equipamento utilizado foi fornecido pela Varian Mercury, modelo VX 300, com campo de 7.05 Tesla. As amostras foram acondicionadas em um tubo de ensaio apropriado e uma quantidade de 120 mg era pesada para realizar as análises em 2 mL de solvente.

4.12.3 Cromatografia de Permeação a Gel (GPC)

A massa molar e a distribuição de massas molares são características fundamentais das amostras de polímero. A finalidade da cromatografia de permeação em gel (GPC) é determinar os valores das massas molares médias e a distribuição de massas molares de um polímero. A técnica consiste em separar o polímero em um elevado número de frações com diferentes massas molares. À medida que a solução polimérica passa por uma coluna recheada com gel poroso, as moléculas vão sendo separadas de acordo com o seu volume hidrodinâmico, que é o tamanho efetivo em uma solução. As moléculas maiores são eluídas mais rapidamente pela coluna, pois estas não conseguem penetrar nos poros. Já as partículas menores penetram nos poros do gel que constitui a coluna, dificultando sua travessia (BILLMEYER, 1975). O gel que constitui

a coluna é normalmente feito de partículas de poliestireno copolimerizado com divinilbenzeno, para o caso de polímeros solúveis em solventes orgânicos.

A faixa de separação dos tamanhos de cadeia depende do tamanho dos poros do material empacotado e a correta determinação das massas molares está relacionada com a seleção correta das colunas. Normalmente, empregam-se várias colunas de diversos tamanhos e constituídas por diferentes recheios. Idealmente, a coluna e o seu recheio não devem sofrer nenhum tipo de interação com o polímero e o solvente empregado. O fluxo do solvente deve ser do tipo empistonado, para minimizar efeitos de separação por difusão. O polímero deve ser bem solúvel no solvente.

Foram utilizados 1,00 mg de amostras nas análises, dissolvidas em 3 mL de tetrahidrofurano (THF). Essa solução polimérica era deixada sob agitação por 24 horas (ou até solubilização) e filtrada, utilizando uma membrana de teflon com 0,45 µm de diâmetro de poro. Depois, cerca de 300 µL eram injetadas no equipamento na temperatura de 35 °C. O equipamento utilizado era um cromatógrafo WATERS 600E, equipado com três colunas ULTRASTYRAGEL com porosidade de 10³, 10⁴ e 10⁵ Å e detector refratométrico WATERS 2414. As calibrações foram feitas com padrões de poliestireno na faixa de massa molares de 500 a 3 x 10⁶ Da.

4.12.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Materiais poliméricos apresentam usualmente duas transições térmicas características, que são a temperatura de fusão cristalina (T_m) e a temperatura de transição vítrea (T_g), identificadas por alterações na estrutura cristalina do material, por meio da diminuição de suas energias de rotação, translação e vibração. Essas temperaturas podem ser identificadas quando um material polimérico é aquecido ou resfriado. No resfriamento, primeiramente ocorre a cristalização, com energia de rotação e translação reduzidas, ponto que caracteriza a T_m. Em seguida, a mobilidade segmental das cadeias poliméricas é reduzida, ponto que caracteriza a T_g. Materiais cristalinos apresentam somente T_m, enquanto os amorfos têm apenas T_g e os materiais semi-cristalinos possuem T_m e T_g (ODIAN, 2004). A temperatura de transição vítrea de um polímero afeta as propriedades mecânicas e determina a faixa de temperaturas em que pode ser empregado.

A técnica de DSC reflete a mudança na capacidade calorífica de uma amostra como função da temperatura, pela medida do fluxo de calor necessário para manter a

temperatura diferencial igual a zero entre um material de referência e a amostra a ser analisada (ODIAN, 2004). As amostras de polímero e de referência são colocadas em cápsulas específicas, posicionadas em um disco termoeletrico, e são aquecidas por uma fonte de calor. O calor é transferido para as amostras por meio do disco e o fluxo de calor diferencial entre ambas as cápsulas é controlado por termopares conectados ao disco. A diferença de temperaturas entre o polímero e o material de referência é proporcional à variação de entalpia, à capacidade calorífica e à resistência térmica total ao fluxo calórico.

Antes de iniciar a análise, uma linha de base é gerada por meio de um ensaio realizado com cápsulas vazias. As condições experimentais, como a faixa de temperatura da análise, taxa de aquecimento e fluxo de gás usado para obter a linha de base, devem ser as mesmas empregadas durante a análise das amostras de polímero. Idealmente, a linha de base deve ser horizontal em toda faixa de temperatura, mas desvios podem ocorrer, em função do desgaste do equipamento, existência de material residual depositado no sensor, vazão do gás de arraste e detalhes da construção do forno.

As curvas de DSC sofrem modificações sempre que ocorrem transições de primeira e de segunda ordem. Transições de primeira ordem envolvem variação de entalpia e geram picos, como fusão, vaporização de água, decomposição e cristalização. As transições de segunda ordem caracterizam-se pela variação de capacidade calorífica, não ocorrendo a formação de picos, notando-se apenas um deslocamento da linha de base.

Para a análise de DSC, eram utilizados 10 mg de polímero, colocados em uma cápsula de alumínio, que posteriormente era selada com auxílio de uma prensa. Todas as amostras eram submetidas a uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, usualmente empregada para polímeros. O primeiro resfriamento e aquecimento eram descartados, para eliminar a história térmica do material. Para a determinação da T_g , apenas o segundo aquecimento era considerado. O equipamento usado no trabalho foi um analisador DSC7 (Perkin-Elmer, EUA), na faixa de -20 a $140\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.12.5 Análise de Tamanhos de Partículas

A análise dos tamanhos de partícula por espalhamento de luz envolve a deconvolução dos padrões de luz espalhada, produzida quando partículas de diferentes

tamanhos são expostas ao feixe de luz. Como a partícula apresenta uma constante dielétrica diferente da do meio e propriedades ópticas distintas, a luz incidente se espalha de uma única forma. A maioria das medidas de espalhamento de luz é realizada usando luz visível, com comprimento de onda de 350 nm a 900 nm. No espalhamento elástico da luz (EEL), a frequência da luz espalhada é a mesma da luz incidente, enquanto a intensidade da luz espalhada é função das dimensões e das propriedades ópticas das partículas (SANDLER, 1998).

As análises das partículas foram conduzidas no módulo úmido do equipamento, que é mais sensível e utiliza uma quantidade menor de amostra. Aproximadamente 5 mL de amostra eram transferidas para um frasco no equipamento, no qual uma bomba de vácuo retirava o ar do meio a ser analisado. A análise era conduzida por 0,5 minuto, usando-se o comprimento de onda do infravermelho. O equipamento já foi descrito no item 4.3 deste capítulo.

As análises de DTP das amostras produzidas nos ensaios de polimerização em miniemulsão foram feitas por espalhamento de luz no equipamento fornecido pela MALVERN INSTRUMENTS, modelo ZETASIZER, NANO-ZS. A faixa padrão de leitura do equipamento está entre 0,3 nm - 10 μ m. Para realizar a medida, uma amostra de látex era preparada em uma cubeta de 2,5 mL de vidro. Na cubeta, com ajuda de uma pipeta Pasteur, era colocada uma gota da mistura preparada no reator. Água mili-Q filtrada era adicionada à cubeta com ajuda de uma seringa, usando um filtro millipore de 0,45 μ m. Água era adicionada ou retirada até que a solução ficasse translúcida. Neste momento, a cubeta era colocada no compartilhamento de leitura, para ser realizada a análise.

4.12.6 Análise Gravimétrica para Determinação de Sólidos Suspensos no Sobrenadante – Curva de Conversão

Após o término do processo de polimerização, uma alíquota do sobrenadante era pesada em um béquer de capacidade de 25 mL e mantida em estufa a 60 °C até massa constante. Os dados eram usados para estimar o teor de sólidos no sobrenadante.

Para a construção da curva de conversão, o mesmo método era utilizado, com algumas modificações. Eram preparados cadinhos com papel de alumínio, utilizando um béquer de 25 mL como forma de modelagem. Esses cadinhos eram pré-pesados e as massas eram registradas. Em tempos pré-determinados, adicionavam-se 8 gotas de

solução de hidroquinona 10 g.L^{-1} para parar a reação de polimerização. Anotava-se esta massa (cadinho + solução de hidroquinona) e, com a ajuda de um tubo Eppendorf de 2 mL preso em uma pinça, eram retiradas duas alíquotas do meio reacional. As amostras eram adicionadas ao cadinho com hidroquinona e novamente pesadas rapidamente, evitando perdas de monômeros por evaporação. A massa era anotada junto com o tempo de retirada de cada amostra. Após a reação de polimerização, todas as alíquotas retiradas eram colocadas em estufa até massa constante. A curva de conversão era traçada utilizando uma planilha do Excel, onde era registrado o tempo da retirada da amostra, a massa do cadinho, a massa do cadinho com hidroquinona, a massa do cadinho com hidroquinona e meio reacional e a massa do cadinho final, após o tratamento em estufa a massa constante. A conversão pode ser calculada então na forma da Equação (4.2)

$$X = \frac{(m4 - m1)}{(m3 - m2)\gamma} \quad 4.2$$

onde $m4$ é a massa de cadinho com o polímero seco, $m1$ é a massa do cadinho, $m3$ é a massa do cadinho que contém a amostra do reator, $m2$ é a massa do cadinho com hidroquinona e γ é a carga orgânica do reator.

4.12.7 Análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica FTIR é o método preferido de espectroscopia de infravermelho, sendo provavelmente o método mais utilizado para a investigação da estrutura e dos grupos funcionais de um polímero. O método pode ser usado para o estudo de amostras no estado gasoso, líquido ou sólido. Na espectroscopia de infravermelho (IV), a radiação IV é passada através de uma amostra. Parte da radiação infravermelha é absorvida pela amostra e parte é transmitida através da amostra. O resultado é representado em termos de espectros de absorção e transmissão, criando uma impressão digital da amostra (BILLMEYER, 1975).

Um espectro de infravermelho representa uma impressão de uma amostra, com a absorção de picos que correspondem às frequências de vibração das ligações dos átomos que formam o material. Cada material tem uma única combinação de átomos; dessa maneira, dois compostos diferentes não podem ter o mesmo espectro de infravermelho.

Portanto, um espectro de infravermelho pode resultar em uma identificação positiva (análise qualitativa) de cada diferente tipo de material. Além disso, o tamanho dos picos nos espectros é uma indicação direta das quantidades dos materiais presentes.

As amostras eram armazenadas em um frasco Eppendorf para serem transportadas até o equipamento. O equipamento era ligado, seguindo as instruções do manual. Uma leitura era realizada sem amostra para construção da linha base de análise. A amostra era colocada no compartimento de leitura na forma sólida e as leituras eram realizadas. O equipamento utilizado foi o espectrômetro Nicolet 6700 (THERMO FISHER SCIENTIFIC Inc., Massachusetts, USA) equipado com detector MCT/B Smart Orbit, usando resolução 4 e 128 varreduras (64 varreduras de fundo).

4.12.8 Potencial Zeta das partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA

A grande maioria dos materiais particulados em contato com um líquido adquire uma carga elétrica na superfície. Esta carga pode aparecer devido a grupos ionogênicos ou adsorção diferencial de íons da solução sobre a superfície de um polímero. A carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contraíons junto à superfície, formando uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. A dupla camada elétrica é dividida em duas regiões. O potencial nessa região decai, à medida que se afasta da superfície. O potencial zeta depende da carga da superfície da partícula, da natureza e da composição do meio que a circunda.

Com a finalidade de caracterizar a carga presente na superfície das partículas poliméricas, para caracterizar melhor o tipo de interação existente entre o material adsorvente e as moléculas biológicas, foi empregada a técnica de caracterização de potencial zeta. Para a condução deste estudo, foi empregado o equipamento da marca SurPass (AntonPaar) presente no Laboratório PAM (Laboratório de Permeação Através de Membranas do PEQ/COPPE). O funcionamento do equipamento baseia-se no fenômeno eletrocinético do potencial de escoamento. Uma solução eletrolítica diluída é recirculada através de um leito constituído pelas partículas de polímeros. O método usa um tubo de acrílico transparente, em que são colocados aproximadamente 500 mg das partículas de polímeros que se deseja medir o potencial zeta. Um suporte cilíndrico é encaixado neste tubo de acrílico e sobre o suporte é colocada uma membrana de

celulose. Outro suporte é colocado sobre a membrana para fixá-la. O sistema é colocado no equipamento apresentado na Figura 4.8.

A Figura 4.9 mostra uma fotografia da parte do equipamento em que a amostra polimérica é colocada. A Figura 4.9a mostra o compartimento sendo encaixado ao suporte do equipamento. A Figura 4.9b mostra o tubo de acrílico encaixado no suporte, e por último, a Figura 4.9c mostra a posição em que se realizava o experimento.

A duração do experimento no intervalo de pH desejado neste trabalho levou aproximadamente 24 horas. Foi preparada uma solução de cloreto de potássio na concentração de 10 mM, uma solução de hidróxido de sódio 1 M e uma solução de ácido clorídrico 1 M. Estas soluções foram conectadas no equipamento, que é dotado de um titulador automático, que permite a adição de solução ácida ou básica à solução eletrocinética.

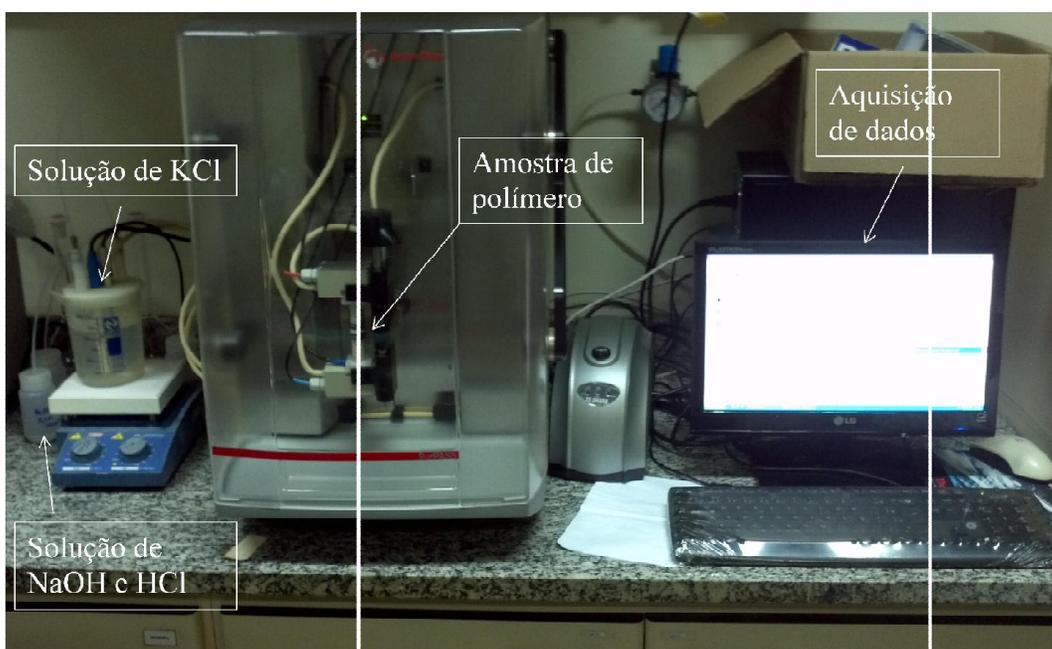


Figura 4. 8: Equipamento usado para medição do potencial zeta.

Os estudos do potencial zeta foram realizados no intervalo de pH de 2,00 a 12,00, região de trabalho em que os processos de imobilização enzimática foram estudados.

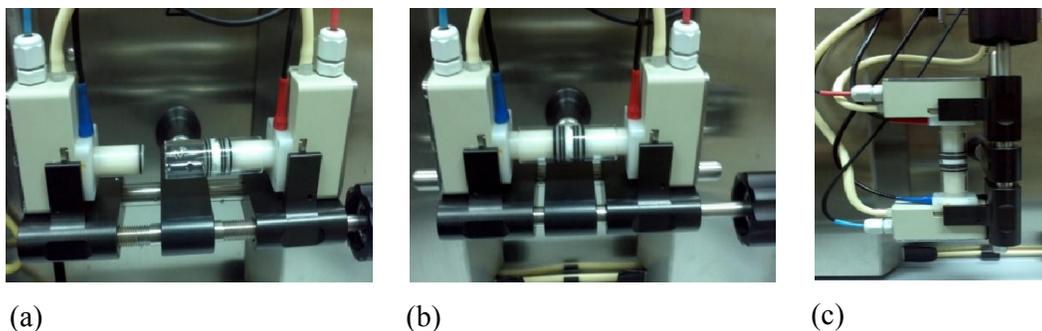


Figura 4. 9: Procedimento de encaixe do tubo de acrílico ao suporte do equipamento usado para medida de potencial zeta.

4.12.9 Ângulo de Contato

A forma que uma gota de líquido adquire sobre uma superfície de um material depende das interações entre o líquido e a superfície do material em que foi depositado. Assim, uma gota de água pode ter um formato mais espalhado, mostrando que a superfície possui uma boa molhabilidade, ou mais aglomerado, mostrando que a superfície tem baixa molhabilidade.

O ângulo de contato, também conhecido como ângulo de molhabilidade, é definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano contendo a superfície do material onde o líquido (neste caso a água) encontra-se depositado (SHAW, 1975). A molhabilidade está relacionada com o equilíbrio de três fases: líquida, sólida e gasosa. Na Figura 4.10 é apresentado um esquema de diferentes gotas sobre uma superfície. Há duas forças atuando sobre este sistema: as forças conhecidas como adesivas, que espalham a gota sobre a superfície; e as forças coesivas, que induzem a gota formar uma esfera de área superficial mínima. Para ângulos de contato menores do que 90° , a superfície pode ser classificada como hidrofílica. No entanto, se o ângulo de contato for maior do que 90° , a superfície pode ser classificada como hidrofóbica.

Para avaliar a hidrofobicidade dos materiais estudados neste trabalho, foram realizadas análises de ângulo de contato no equipamento goniômetro da marca DATAPHYSICS, modelo SCA 20, mostrado na Figura 4.11. O ângulo de contato foi utilizado para avaliar a hidrofobicidade dos materiais. Para realizar a análise de ângulo de contato, foram preparadas membranas das partículas poliméricas do homopolímero de PVAc e do copolímero de PVAc-co-PMMA na concentração de 4% em massa do

polímero. O solvente empregado para a solubilização das partículas de polímeros foi o tetrahidrofurano (THF). Após a solubilização completa do polímero em agitador magnético, a solução foi colocada em um molde de teflon com diâmetro de 12 cm (Figura 4.12). A aderência da membrana de polímeros ao teflon é menor do que com o vidro; por isso, não foram utilizadas moldes em placas de Petri.

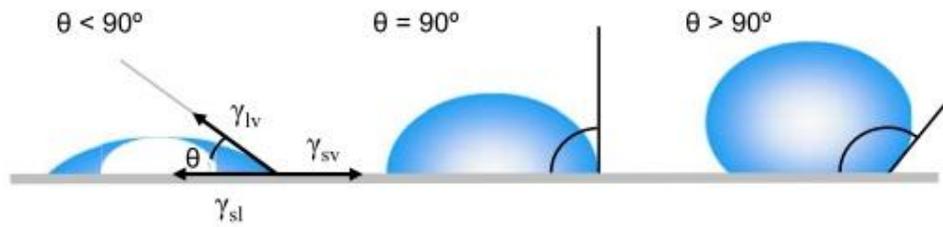


Figura 4. 10: Formato de uma gota sobre uma superfície, mostrando as tensões entre os três meios sólido, líquido e gasoso (YUAN e LEE., 2013).



Figura 4. 11: Goniômetro usado para medir o ângulo de contato.



Figura 4. 12: Moldes de teflon para a produção dos filmes de PVAc e PVAc-co-PMMA.

O molde foi deixado na capela, na temperatura ambiente, para a completa evaporação do solvente e solidificação da membrana. Após um período de três dias, as membranas foram retiradas do molde com cuidado. A Figura 4.13 mostra dois filmes produzidos. A membrana de PVAc possui maior flexibilidade, enquanto a membrana de PVAc-co-PMMA é mais rígida. Isso ocorre porque o PMMA é mais rígido e cristalino que o PVAc.

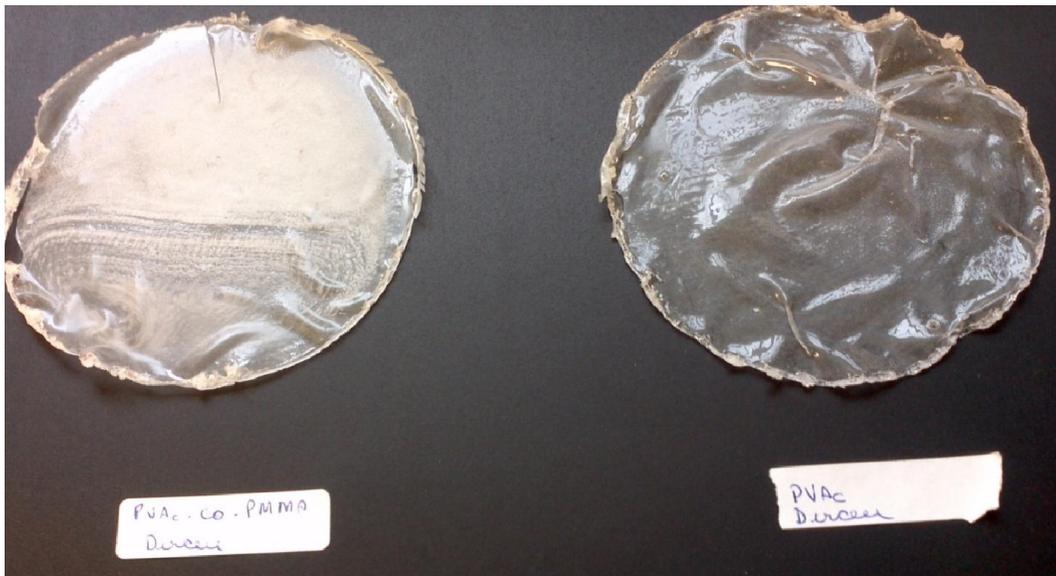


Figura 4. 13: Filmes de PVAc-co-PMMA e de PVAc.

Utilizando os filmes de PVAc e PVAc-co-PMMA mostrados na Figura 4.13, foram realizadas as análises do ângulo de contato em cinco regiões diferentes de cada membrana produzida.

4.12.10 Área Específica

Uma importante característica de suportes enzimáticos é a área específica. A área específica de um material adsorvente é a área de interface sólido-fluido existente por unidade de massa do material. Alguns dos materiais mais utilizados como suporte são apresentados na Tabela 4.7, construída com dados comerciais reportados por GEANKOPLIS (2003) e dados de materiais relatados por pesquisadores do LMSCP/COPPE.

Tabela 4. 6: Relação da área superficial específica de alguns materiais comerciais e poliméricos produzidos no LMSCP.

Material	Área superficial (m ² /g)	Diâmetro de por (Å)
Carvão ativado	300 a 1200	10 a 60
Gel de sílica	600 a 800	20 a 50
Alumina ativada	200 a 500	20 a 140
Poliestireno-co-Divinibenzeno (PS-co-DV) PINTO (2013)	1,9 a 13,1	263,7 a 371,7

As medidas de áreas específicas podem ser obtidas por ensaios de BET (Brunauer, Emmett e Teller). A técnica BET baseia-se na adsorção física de um gás, geralmente o nitrogênio ou argônio, sobre as superfícies das partículas por interações fracas, como as forças de van der Waals (TEIXEIRA, *et al.*, 2001). As partículas estudadas neste trabalho foram avaliadas no laboratório da Universidade Estadual do Rio de Janeiro. O equipamento utilizado foi o MICROMETICS, modelo ASAP 2020.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

Caracterização das Partículas de PVAc e de PVAc-co-PMMA

Neste capítulo, são apresentados os resultados a respeito das características dos polímeros de PVAc e PVAc-co-PMMA produzidos com o emprego das técnicas discutidas no Capítulo 4; ou seja, as polimerizações em suspensão e em miniemulsão. As características discutidas aqui se referem a propriedades físicas e químicas, como o diâmetro médio, hidrofobicidade, morfologia, massa molar, estrutura molecular e potencial zeta.

5.1 Reações de Polimerização em Suspensão e Emulsão para a Produção de PVAc e PVAc-co-PMMA

A metodologia empregada para a produção de partículas poliméricas mostrou-se eficaz e foi possível produzir PVAc e o copolímero PVAc-co-PMMA, para uso posterior como suporte para biomoléculas. Em um primeiro momento, foi feito um breve estudo sobre a produção de PVAc e PVAc-co-PMMA, seguindo procedimentos propostos por PEIXOTO (2007) e OLIVEIRA (2011). As reações estudadas inicialmente estão resumidas na Tabela 5.1. Não foi proposto um plano experimental

para avaliar os efeitos das variáveis, já que trabalhos anteriores documentaram os principais efeitos das variáveis de preparação sobre o polímero final. O objetivo principal perseguido era a produção do material adequado para ser usado como suporte. A partir da reação codificada como R-4-PVAc, o monômero VAc passou a ser utilizado sem purificação. OLIVEIRA (2011), recomendou que as reações de polimerização fossem realizadas após a purificação do monômero pelo processo de destilação, mas não foi encontrada qualquer diferença significativa que justificasse em um primeiro momento esse esforço adicional. As reações foram realizadas inicialmente após a destilação do acetato de vinila, para remoção de impureza e inibidor, mas as reações realizadas sem a destilação do monômero resultaram em respostas similares, como mesma temperatura de transição vítrea e intervalo de massas molares semelhantes. De maneira que a destilação foi abolida.

OLIVEIRA (2011) mostrou em seus estudos que a produção de partículas de PVAc soltas, sem aglomerados, pode estar diretamente ligada à etapa de destilação do monômero. Segundo OLIVEIRA (2011), a destilação remove as impurezas que podem comprometer a obtenção de elevadas conversões e massas molares médias elevadas. No entanto, o processo de destilação é demorado e caro. Diante dos resultados obtidos e mostrados ao longo deste capítulo, não foi necessário seguir as recomendações de OLIVEIRA (2011), talvez porque o monômero mais puro tenha sido adquirido para a realização deste trabalho.

Inicialmente as reações foram realizadas a 75 °C e os polímeros se mostraram mais aglomerados, como observado nas fotografias feitas em microscópio óptico analisadas posteriormente. O aumento da temperatura da reação para 85 °C, visando a acelerar a reação e aumentar a conversão, resultou em menor aglomeração das partículas, como também será observado nas fotografias apresentadas adiante. Apesar disso, mesmo assim foi observada a presença de alguns aglomerados, o que será melhor esclarecido quando for discutida a hidrofobicidade das partículas.

A temperatura de ebulição do acetato de vinila é igual a 72 °C. Por isso, nas temperaturas mais elevadas, apesar da presença de polímero (que reduz a pressão de vapor do monômero), ocorre grande formação de espuma e forte recirculação de condensado. Porém, nas reações realizadas na temperatura de 70 ou 75 °C, nem sempre o produto final é constituído por partículas poliméricas. Nessas condições são produzidas partículas muito pequenas, que dão a consistência de uma cola à suspensão, com baixas conversões, quando se usa o sistema de reação de 1 L, apresentado no

Capítulo 4. Quando a reação ocorre em temperaturas de 70 a 75 °C no sistema de polimerização do mini-reator, o produto final era sempre constituído por partículas, mas com elevado grau de aglomeração. Em ambos os casos, as baixas conversões nessas temperaturas são devidas aos longos tempos de meia-vida do BPO e às baixas constantes de propagação do VAc. Outro fator que dificulta a produção do copolímero na temperatura de 70 a 75 °C é o conhecido efeito inibitório do MMA sobre a reação, que promove aumento expressivo das reações de terminação durante a copolimerização com VAc (ODIAN, 2004). Por isso, as reações com MMA requerem maiores quantidades de iniciadores ou temperaturas mais altas, para compensar o aumento das taxas de terminação. Por todas essas razões, a produção do copolímero de PVAc-co-PMMA foi realizada inicialmente na temperatura de 75 a 80 °C. No entanto, ao longo dos estudos, observou-se que a temperatura de 85 °C produzia as partículas de polímeros com as características mais próximas da desejada, em termos de morfologia.

Tabela 5. 1: Reações de polimerização em suspensão.

Ensaio	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	BPO (g)	Monômeros (g)	PVA (g)	Destil ação
R-1-PVAc-PMMA	75	700	4	140 - 60	0,2	Sim
R-2-PVAc-PMMA	85	700	4	140 - 60	0,2	Não
R-3-PVAc-PMMA	75	700	2	140-60	0,2	Não
R-4-PVAc	80	700	2	200	0,2	Sim
R-4-PVAc _{SAP}	80	700	2	200	0,2	Sim
R-5-PVAc	80	977	4	200	1	Não
R-6-PVAc mini-reator	80	1000	0,645	32,25	0,032	Não
R-7-PVAc	80	1000	2	200	0,2	Sim
R-8-PVAc	80	1000	4	200	0,2	Não
R-9-PVAc	80	1000	2	200	0,2	Não

A reação R-4-PVAc_{sap} corresponde a uma reação de saponificação realizada com as partículas produzidas na reação R-4-PVAc, com a intenção de produzir uma fina casca de poli(álcool vinílico) (PVA) sobre a partícula polimérica de PVAc. A reação de

saponificação é o processo por meio do qual um grupamento éster é hidrolisado em solução alcalina para formar um álcool e um ácido conjugado (SKOOG *et al.* 2005).

Os estudos e caracterização das reações realizada neste trabalho serão melhor discutidos adiante. No entanto, desse trabalho preliminar, definiu-se que a realização da polimerização em suspensão deveria ocorrer na temperatura de 85 °C e sob agitação de 900 rpm para não sobrecarregar o sistema de agitação. A concentração de iniciador (BPO) foi mantida em 2% em relação à massa do iniciador. Para a reação de polimerização em miniemulsão, o processo foi definido como descrito na Seção 4.7 no Capítulo 4.

5.2 Estudo da Conversão

Usando a metodologia apresentada no capítulo anterior, foi possível monitorar a evolução da conversão das reações de polimerização em suspensão e miniemulsão. No final das reações, as partículas tendem a aglomerar no recipiente de coleta de amostra, de maneira que a transferência dessas partículas para a cápsula de amostragem torna-se muito difícil, o que provoca algumas oscilações das medidas de conversão no final do processo de reação. No entanto, durante o procedimento de polimerização em emulsão este problema não é observado, o que facilita o processo de transferência do material para os cadinhos tarados.

Pode ser observado na Figura 5.1 que a conversão de monômero chegou a valores próximos de 100% na reação de polimerização codificada como R-5-PVAc, em que foi utilizado 1,0 g de agente de suspensão (PVA) com a intenção de produzir partículas menos aglomeradas. Nas reações usuais conduzidas no laboratório, são utilizados cerca de 0,2 a 0,5 g de PVA. Porém, este fator não foi determinante na temperatura de 80 °C e as partículas, tanto durante o processo de polimerização quanto na de separação, aglomeraram. Logo, o aumento da concentração do agente de suspensão não preveniu completamente a aglomeração do homopolímero, que requer operação a temperatura mais elevada para a remoção de monômeros residuais.

Um segundo estudo foi realizado com acetato de vinila (R-7-PVAc), usando 0,2 g de agente de suspensão e 2 g de BPO. A diminuição da quantidade de BPO não pareceu influenciar a velocidade de reação significativamente, nem as características das partículas formadas; porém, será discutido adiante que essa mudança influenciou muito a massa molar do polímero. Sendo assim, talvez seja conveniente usar menor

quantidade de catalisador que a utilizada em estudos anteriores, quando a obtenção de altas massas molares constituir um problema.

Na Figura 5.1 vê-se que após 2 horas de reação a conversão é essencialmente completa; contudo, manteve-se o tempo de 4 horas de reação para garantir que a conversão máxima era alcançada e para reduzir problemas associados à presença de monômero residual.

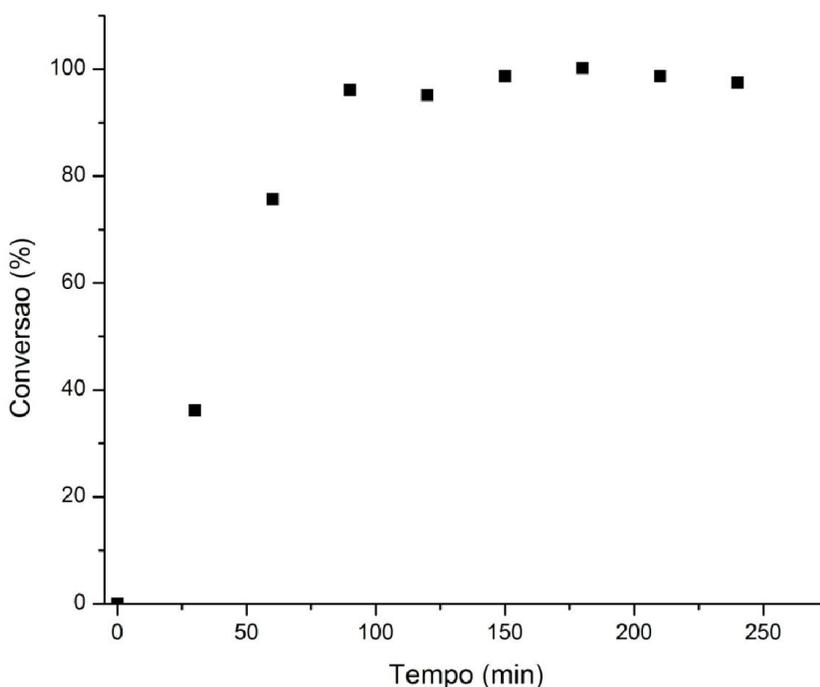


Figura 5. 1: Variação da conversão com o tempo para a reação de polimerização em suspensão conduzida com acetato de vinila, reação de PVAc

Foram também realizadas copolimerizações para a produção do copolímero de acetato de vinila (VAc) e metacrilato de metila (MMA). O processo de polimerização foi realizado em suspensão e a evolução da conversão em função do tempo é ilustrada na Figura 5.2. Nas primeiras 2 horas de reação, observa-se que a reação resulta em rendimento baixo, alcançando a conversão máxima de aproximadamente 20%. Isso ocorre por causa do efeito inibitório induzido pelo aumento de constante de terminação na presença do metacrilato de metila (MMA) e devido ao fato do VAc ser menos reativo do que o MMA (BRANDRUP *et al.*, 1998). Pode-se observar que após 2 horas de reação o sistema alcança rapidamente uma conversão de quase 100%. É bom lembrar

que as reações de copolimerização foram conduzidas utilizando 80% de VAc e 20% de MMA em massa. O aumento súbito e expressivo da conversão é característico das polimerizações de MMA, por causa do significativo efeito gel desse monômero.

A Figura 5.3 mostra a evolução da conversão de monômero VAc em uma reação de polimerização realizada para produzir o PVAc em miniemulsão. A reação ocorre de forma muito rápida, alcançando a conversão de 100% já nos primeiros 50 minutos de reação. Reações de polimerização em emulsão são sabidamente mais rápidas que as polimerizações conduzidas em suspensão (ODIAN, 2004). No entanto, este resultado não é importante para a produção de agentes de embolização, dado que as partículas poliméricas obtidas, como mostrado posteriormente e bem relatado na literatura, têm dimensões nanométricas.

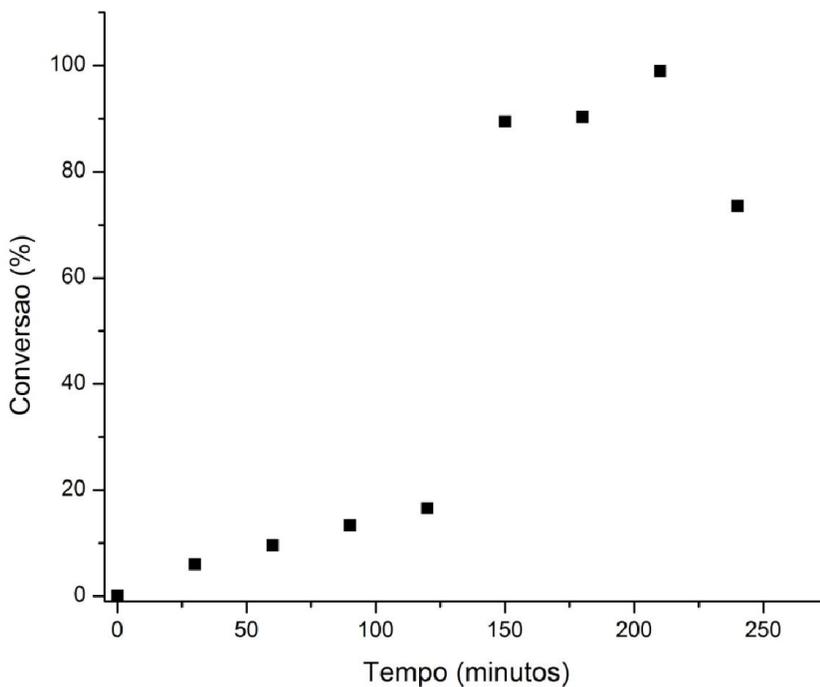


Figura 5. 2: Variação da conversão com o tempo para a reação de polimerização em suspensão conduzida com acetato de vinila e metacrilato de metila para produzir o PVAc-co-PMMA.

5.3 Microscopia Óptica

Em todas as reações realizadas neste trabalho foi utilizada a técnica de microscopia óptica para caracterização da morfologia das partículas. As informações fornecidas pela técnica de microscopia óptica são o tamanho médio, a forma e a morfologia da superfície da partícula.

Nas primeiras reações, como pode ser observado na Figura 5.4, as partículas obtidas tinham a característica esférica. Porém, pode ser constatada a formação de uma grande quantidade de aglomerados. Como já observado, se a temperatura não é mantida acima de 75 °C, o produto final da copolimerização pode ter aspecto de cola, formado por frações de partículas muito finas e por partículas com alto teor de monômero não reagido. Dessa forma, recomenda-se que as reações de copolimerização sejam realizadas a temperaturas maiores. Somente durante o período de treinamento a temperatura de 75 °C foi empregada. No caso da reação R-1-PVAc-PMMA, conduzida com 20% de MMA na temperatura de 75 °C, pode-se observar que as partículas finais possuíam superfície lisa, com tamanhos sempre menores do que 200 µm.

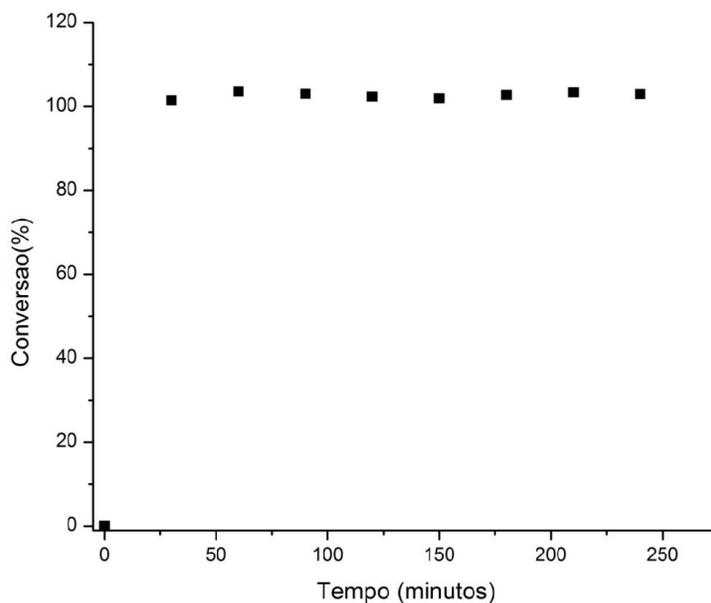


Figura 5. 3: Variação da conversão versus com o tempo para a reação de polimerização em miniemulsão conduzida com acetato de vinila.

Como visto adiante com auxílio das análises de DSC, a temperatura de transição vítrea (T_g) das cadeias poliméricas de PVAc é de aproximadamente 42 °C. Quando esta temperatura é alcançada, a tendência de aglomeração é alta, por causa da mobilidade das cadeias. Isso pode atrapalhar um pouco algumas aplicações em tecidos vivos, já que a temperatura do corpo humano é igual a cerca de 37 °C. A existência de monômero residual e o inchamento com solventes podem tornar esse problema ainda mais crítico, causando a redução de T_g . Por isso, a produção de copolímero de PVAc-co-PMMA se faz necessária em algumas aplicações.

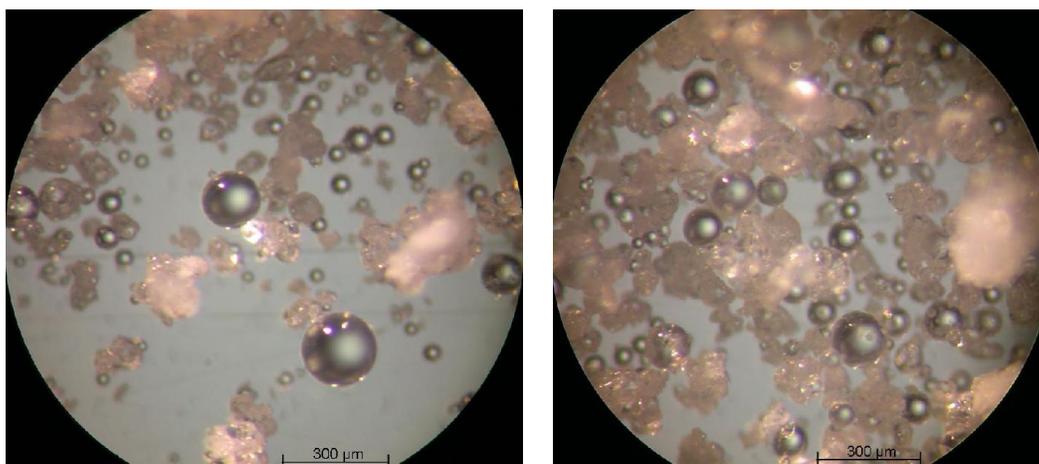


Figura 5. 4: Micrografia óptica das partículas de PVAc-co-PMMA obtidas com monômero destilado no ensaio R-1-PVAc-PMMA.

Um outro ensaio de polimerização foi conduzido com a utilização de 20% de MMA, mas na temperatura de 85 °C. A adição do MMA tem a finalidade de aumentar a T_g das partículas produzidas e diminuir a aglomeração. Como será visto adiante com auxílio das análises de DSC, a T_g pode ser elevada para 78 °C, bastante acima da temperatura do corpo humano. Isso não é necessariamente bom, uma vez que o amolecimento de partículas no corpo pode ser importante para o entupimento efetivo dos vasos sanguíneos. Como pode ser visto na Figura 5.5, as partículas obtidas possuem morfologia esférica e a aglomeração não é observada, possuindo uma superfície lisa e o tamanho médio aproximadamente igual a 300 µm, maior que no ensaio anterior. Com o aumento da temperatura da reação ocorreu maior conversão e os monômeros residuais foram eliminados durante o processo de lavagem e filtração das partículas a vácuo, resultando em partículas menos aglomeradas. O aumento do tamanho médio da partícula com o aumento da temperatura está relacionada à redução do tempo de reação

e aumento das concentração de polímero, que desfavorecem o quebramento das partículas pela agitação.

A Figura 5.6 mostra micrografias de partículas obtidas em outra reação conduzida com VAc e 20% de MMA na temperatura de 75 °C, com 2 g de BPO. Nesta figura, como foi verificado na primeira, vêem-se algumas partículas livres e outras aglomeradas. As partículas apresentam diâmetro médio maior que nos experimentos anteriores, devido claramente ao processo de aglomeração. A aglomeração é resultante das menores conversões, por causa de menor quantidade de iniciador e da menor taxa de reação. Na Figura 5.6 é muito difícil observar partículas individuais, sendo que a superfície das partículas parece ser bastante rugosa neste caso. A presença do monômero residual favorece o processo de aglomeração das partículas durante o processamento e armazenamento; por este motivo, a alta conversão é desejada. As partículas mostradas na Figura 5.5 são mais adequadas para uso como agente de embolização, devido à esfericidade e baixa aglomeração. A adição de MMA e aumento da temperatura de reação proporcionaram estas características desejáveis.

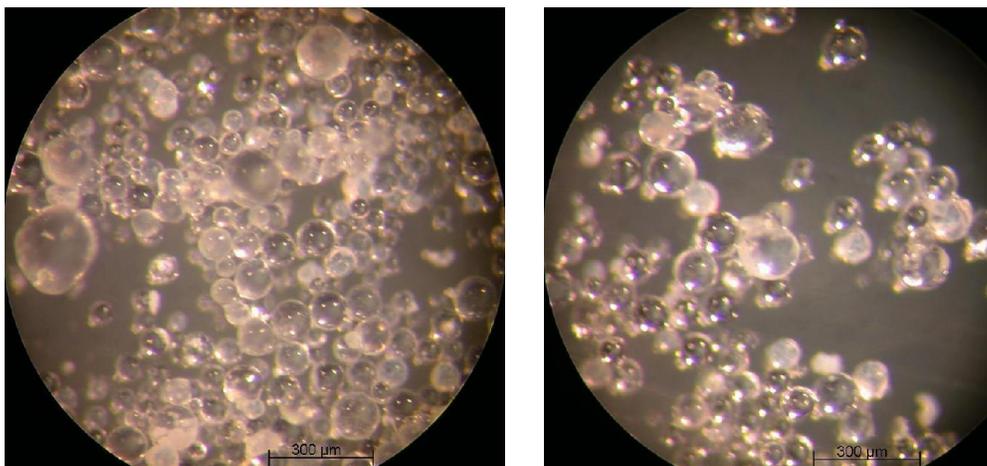


Figura 5. 5: Micrografia óptica das partículas de PVAc-co-PMMA obtidas com monômero de VAc destilado no ensaio R-2-PVAc-PMMA.

A Figura 5.7 mostra micrografias das partículas de PVAc produzidas com acetato de vinila sem purificação. Como observado antes, quase todas as partículas estavam fortemente aglomeradas, com diâmetro médio próximo de 300 µm. Sabe-se que a presença de impureza pode afetar fortemente as tensões interfaciais e a distribuição de tamanho das partículas. Portanto, pode-se esperar que a presença de impurezas também afete a morfologia das partículas geradas.

As partículas saponificadas da reação codificada como R-4-PVAc estão mostradas na Figura 5.8. A quantidade de aglomerados formados foi grande. Portanto, o processo de saponificação pode afetar fortemente a aglomeração entre as partículas. No entanto, não está claro se a aglomeração está relacionada ou não ao processo de secagem, já que não foram observados aglomerados muito grandes no meio reacional. Esse aspecto do processo deverá ser estudado de forma mais detalhada no futuro.

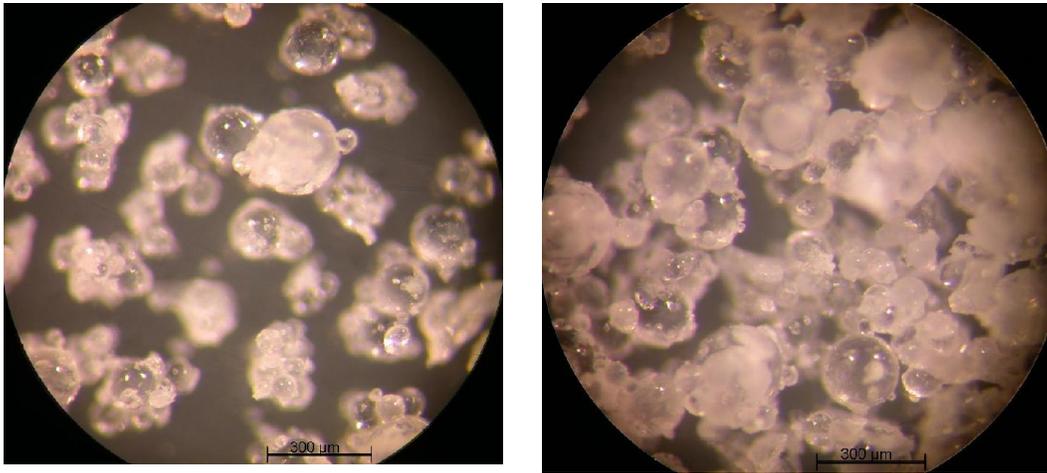


Figura 5. 6: Micrografia óptica das partículas de PVAc-co-PMMA obtidas com monômero de VAc destilado no ensaio R-3-PVAc-PMMA.

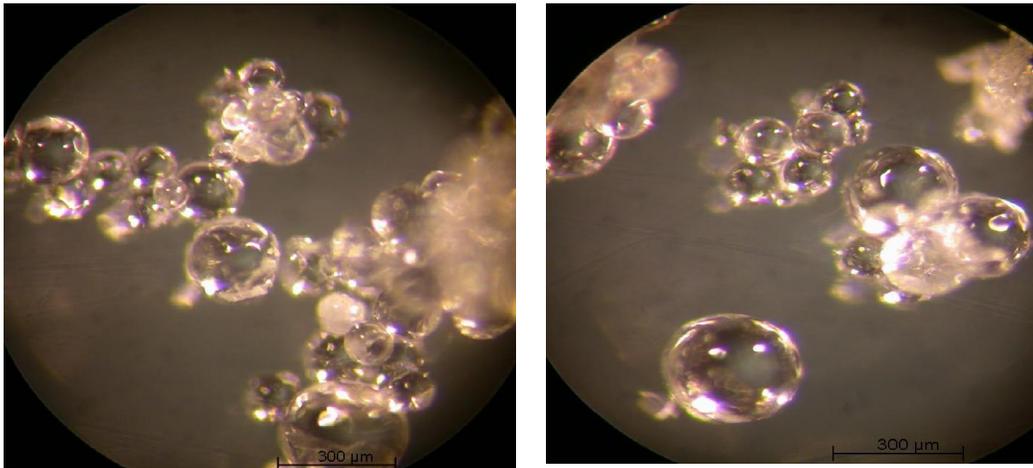


Figura 5. 7: Micrografia óptica das partículas de PVAc obtidas com monômero de VAc não destilado no ensaio R-4-PVAc.

Parece claro que uma alta conversão produz partículas menos aglomeradas, o que leva a acreditar que o processo de aglomeração pode estar associado aos teores de monômero residual presentes durante e depois do processo de filtração. Sendo assim,

parece necessário combinar um taxa de reação alta e uma lavagem das partículas com abundância de água destilada para remover o monômero residual do meio. Essas condições são compatíveis com as reações R-2-PVAc-PMMA e R-5-PVAc, consideradas como boas condições de reações para evitar a formação de aglomerados. Além disso, a presença de MMA também contribui com a redução das aglomerações, por causa do aumento da temperatura de transição vítrea (T_g) do produto final.

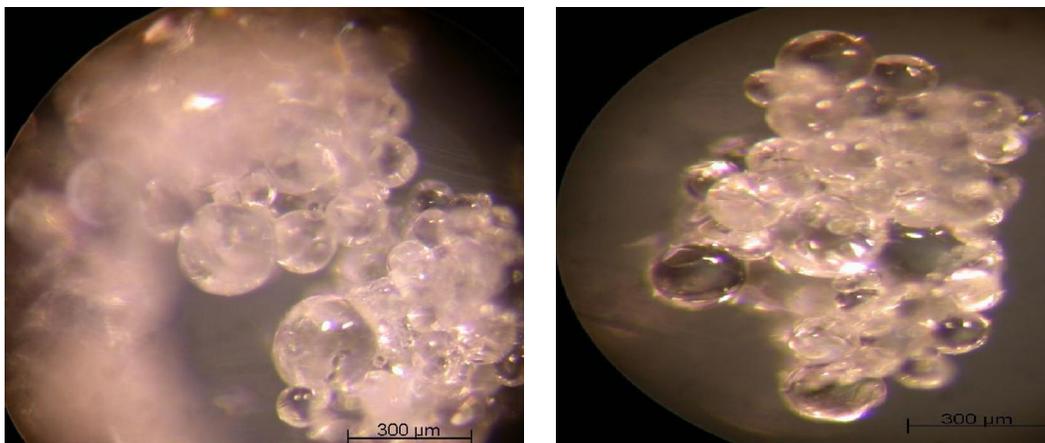


Figura 5. 8: Micrografia óptica das partículas de PVAc obtida com monômero de VAc não destilado depois da etapa de saponificação no ensaio R-4-PVAc_{sap}.

5.4 Resultados das Análises de GPC

A Tabela 4.2 mostra os resultados das análises de GPC efetuadas para amostra de polímero coletada em cada um dos ensaios conduzidos no laboratório. Algumas análises foram realizadas em duplicatas. Pode-se observar que os resultados são reprodutíveis e que os desvios são menores do que os 10% usualmente reportados; porém, quando se olham as reações realizadas em diferentes dias, verifica-se uma variação grande em função das mudanças das variáveis de operação.

Amostra de polímeros são formadas por uma mistura complexa de muitas espécies moleculares de tamanho (e composição, no caso de copolímeros) diferentes; por isso, os métodos de determinação de massas molares conduzem usualmente a valores médios. Na Tabela 5.2, M_n é massa molar numérica média, M_w é a massa molar ponderal média e IP o índice de polidispersão (M_w/M_n). Pode-se verificar na Tabela 5.2 que nas polimerizações em suspensão o menor valor de M_n obtido foi de 24213 Da, enquanto o maior valor obtido foi de 117293 Da. De forma similar, pode ser observado que o menor valor de M_w encontrado foi de 42791 Da, enquanto o maior

valor de 247507 Da, para as reações de polimerização em suspensão. Pode-se ver na Tabela 5.2 que tanto distribuições estreitas ($IP < 2$) como largas ($IP > 3$) podem ser obtidas pelo processo de polimerização em suspensão, mostrando uma ampla variação de distribuição de massas molares quando as condições (temperatura, concentração inicial de iniciador) das reações de polimerização são modificadas.

Tabela 5. 2: Massas molares médias e índices de polidispersão de amostras obtidas nos ensaios de polimerização.

Reação	Mn (Da)	Mw (Da)	IP = Mw/Mn
R-1-PVAc-PMMA	29243	61212	2,093
R-2-PVAc-PMMA	32829	83695	2,549
R-3-PVAc-PMMA	24213	42791	1,767
R-4-PVAc	76350	235698	3,087
R-4-PVAc _{sap}	117293	247507	2,110
R-5-PVAc	33158	62512	1,885
R-5-PVAc repl.	34076	65466	1,921
R-6-PVAc mini-reator	68278	234242	3,431
R-6-PVAc mini-reator repl.	74480	251067	3,371
R-7-PVAc	40351	128224	3,178
R-7-PVAc repl.	29258	129942	4,441
PVAc-emulsão-1	119077	457472	3,842
PVAc-emulsão-2	125211	434426	3,479

As menores massas molares médias foram obtidas na presença de MMA e de altas concentrações de iniciador, em função do aumento das taxas de terminação. Esse efeito já poderia ser esperado (ODIAN, 2004). As maiores massas molares foram obtidas para homopolímeros de VAc, com adição de menores quantidades de iniciador. Isso também já poderia ser esperado, por causa do bem conhecido efeito de

transferência de cadeia para o polímero em polimerização de VAc, que também justifica o aumento do índice de polidispersão nessas amostras. A transferência para o polímero provoca simultaneamente o aumento de massas molares (ODIAN, 2004).

As análises realizadas para amostras de PVAc produzidas por polimerização em miniemulsão resulta nas mais altas massas molares. Os índices de polidispersão também foram elevados. Para realizar as análises de GPC de partículas produzidas em miniemulsão, amostras do látex foram colocadas em uma placa de Petri para secar. Após o processo de evaporação do diluente e monômero residual, era formado um filme que era posteriormente utilizado para as análises de cromatografia de permeação a gel. Como já esperado, as massas molares são mais elevadas para as partículas produzidas em miniemulsão por conta do bem conhecido efeito de compartimentalização dos radicais em sistemas de polimerização em emulsão nanométrica (ODIAN, 2004). Por causa das baixas concentrações de radicais, as taxas de terminação são reduzidas, porque os radicais se distribuem entre as diferentes partículas e acabam crescendo muito mais. Isso também favorece as terminações de transferência para o polímero e explica os maiores índices de polidispersão.

É importante ressaltar que as massas molares médias podem ser manipuladas de forma adequada com a manipulação das condições de operação, mas que o material obtido, sempre tem massas molares elevadas nas condições estudadas.

5.5 Resultados das Análises de DSC

As temperaturas de transição vítrea (T_g) e as capacidades caloríficas dos produtos de alguns ensaios de polimerização estão mostradas na Tabela 5.3.

A temperatura de transição vítrea (T_g) para o PVAc é de aproximadamente 42 °C, apresentada também em trabalhos realizados anteriormente pelo grupo (PEIXOTO, 2007). A T_g medida para partículas de PVAc produzidas aqui em suspensão é pouco maior que 42 °C, mostrando a confiabilidade do método de polimerização e da medida da T_g . A adição de metacrilato de metila (MMA) ao meio reacional provoca aumento da T_g , como já era esperado, para aproximadamente 78 °C. Este aumento também foi reportado por OLIVEIRA *et al.* (2011).

Tabela 5. 3: Resumo das análises de DSC de amostras obtidas em diferentes ensaios.

Reação	Temperatura de transição vítrea (Tg) (°C)	Capacidade calorífica (J.g ⁻¹ .°C ⁻¹)
R-1-PVAc-PMMA	67,40	0,301
R-2-PVAc-PMMA	78,20	0,471
R-3-PVAc-PMMA	78,10	0,302
R-4-PVAc	42,50	0,730
R-4-PVAc _{sap}	42,50	0,746
PVAc-emulsão-1	34,10	0,326 e 0,206

Não foi possível observar grande modificação das características térmicas das amostras que sofreram saponificação. Poderiam ser esperadas duas temperaturas de transição vítrea, uma para a casca de PVA e outra para o núcleo de PVAc, caso as quantidades de PVA formadas fossem significativas. Portanto, pode-se inferir que a quantidade de PVA formado é tão pequena que o ensaio térmico não permite identificar a fina camada de PVA formada, como já reportado por trabalhos anteriores do grupo (PEIXOTO, 2006).

As análises de DSC conduzidas com amostras dos ensaios de polimerização em miniemulsão apresentaram a existência de transições térmicas em 34 e 107 °C, não observadas usualmente em amostras de PVAc. O deslocamento da Tg de 42,5 °C para 34 °C provavelmente é devida à presença do coestabilizante hexadecano, que permanece no filme de PVAc como plastificante. De forma similar, a transição térmica observada a 107 °C é provavelmente devido à vaporização do hexadecano, que tem ponto de ebulição igual a 287 °C. Portanto, as análises de DSC do produto de reação em emulsão indicam a presença e a influência do coestabilizante sobre as propriedades térmicas do produto final.

5.6 Análise da Distribuição dos Tamanhos de Partículas (DTP)

No processo de imobilização de enzimas, vários fatores são importantes, como a área específica disponível para o processo de suportação. A avaliação do diâmetro das

partículas pelos métodos discutidos no Capítulo 4 torna possível o cálculo da área específica das partículas do polímero.

$$a = \frac{\sum n_i \pi d_{pi}^2}{\sum n_i \frac{\pi d_{pi}^3}{6}} = \frac{6 \sum n_i \pi d_{pi}^2}{\sum n_i \pi d_{pi}^3} \quad (5.1)$$

onde n_i é o número de partículas com diâmetro p_i na distribuição.

Na Figura 5.9 é possível observar a DTP para amostras de dois ensaios realizadas com MMA. No primeiro histograma da Figura 5.9a observa-se uma distribuição mais estreita do que o apresentado no segundo histograma. O tamanho ponderal médio dos diâmetros das partículas do histograma da Figura 5.9a está em torno de 80 μm , enquanto o valor encontrado é de aproximadamente 300 μm para o histograma da Figura 5.9b. Pode-se observar que o aumento da temperatura de reação também conduziu a uma distribuição mais larga de DTP, por conta do favorecimento dos termos de coalescência quando as concentrações de polímeros são maiores.

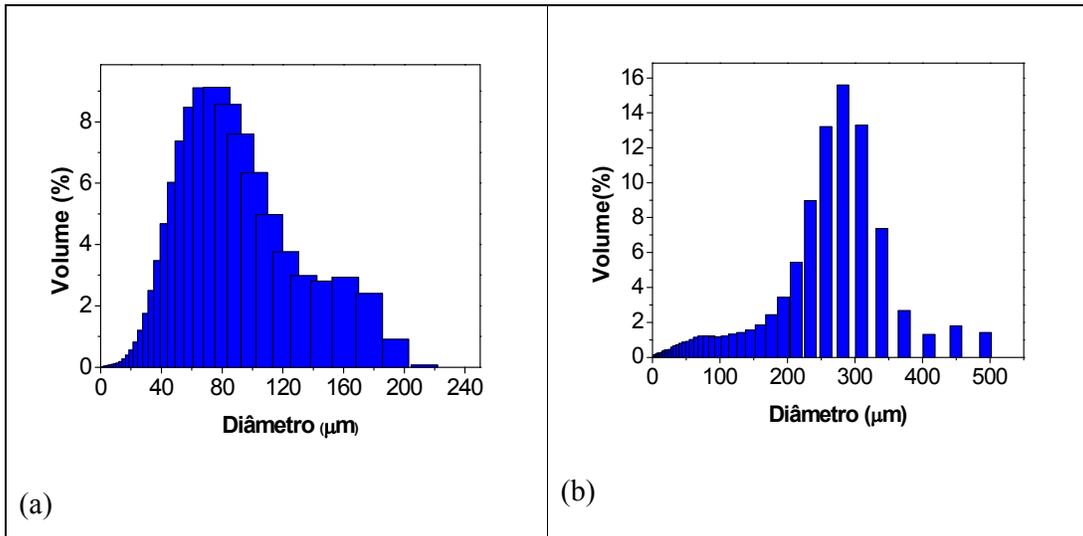


Figura 5.9: Distribuições de tamanhos das partículas para amostras dos produtos finais dos ensaios (a) R-1-PVAc-PMMA. (b) R-2-PVAc-PMMA.

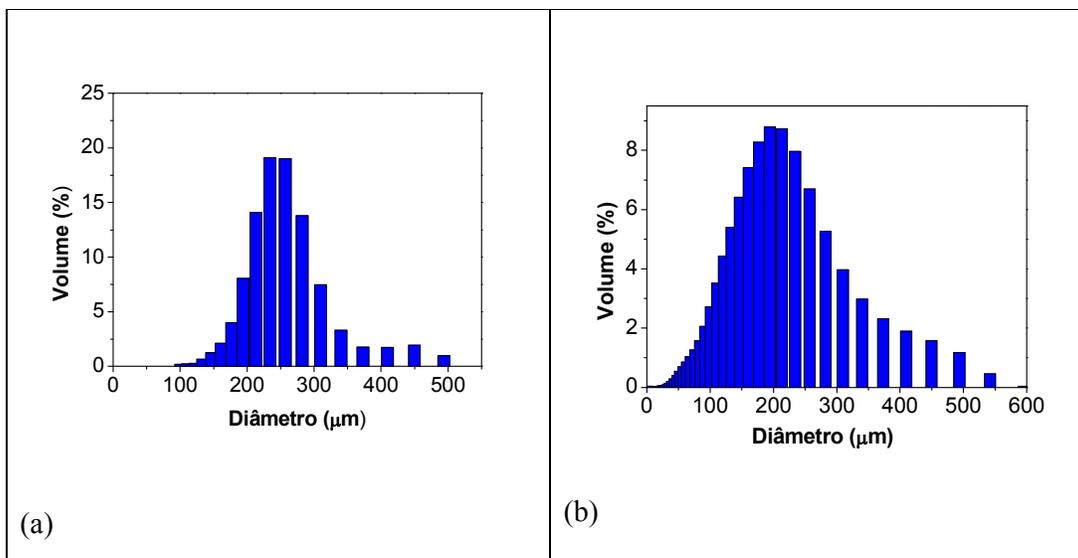


Figura 5. 10: Distribuições de tamanhos de partícula para amostras dos produtos finais dos ensaios (a) R-3-PVAc-PMMA. (b) R-4-PVAc.

A Figura 5.10 mostra as distribuições de tamanho de partícula para amostras de dois ensaios de polimerização. No histograma da Figura 5.10a é possível observar uma DTP mais estreita, com diâmetro ponderal médio de aproximadamente 250 μm . O histograma da Figura 5.10b mostra uma DTP mais larga, com diâmetro ponderal médio em torno de 200 μm . Portanto, aparentemente a adição de MMA provoca estreitamento da DTP, o que pode ser considerado um efeito benéfico para a produção de agentes embolizantes. O estreitamento é devido provavelmente ao tempo maior de reação, por conta do aumento das taxas de terminação na presença de MMA, que favorece o quebraamento.

A Figura 5.11 apresenta DTPs de amostras de polímeros obtidas no mini-reator, utilizando o volume de trabalho de 100 mL. O diâmetro ponderal médio das partículas (realizada em duplicata) aumentou para 600 μm , fora da faixa de interesse para aplicações de embolização ou preparação de carregadores de fármaco. É possível observar ainda que as DTP's são largas. Esse resultado ilustra a importância dos fatores associados a mudanças de geometria do equipamento utilizado (LANGNER *et al.*, 1980). O meio reacional no mini-reator não apresenta o mesmo comportamento hidrodinâmico do vaso do reator de 1 L, resultando em morfologias finais das partículas bastante distintas. Particularmente, a maior relação área/volume do mini-reator pode influenciar bastante o balanço entre as taxas de coalescência e quebraamento das partículas, além de haver menor dissipação de energia no vaso de menor volume.

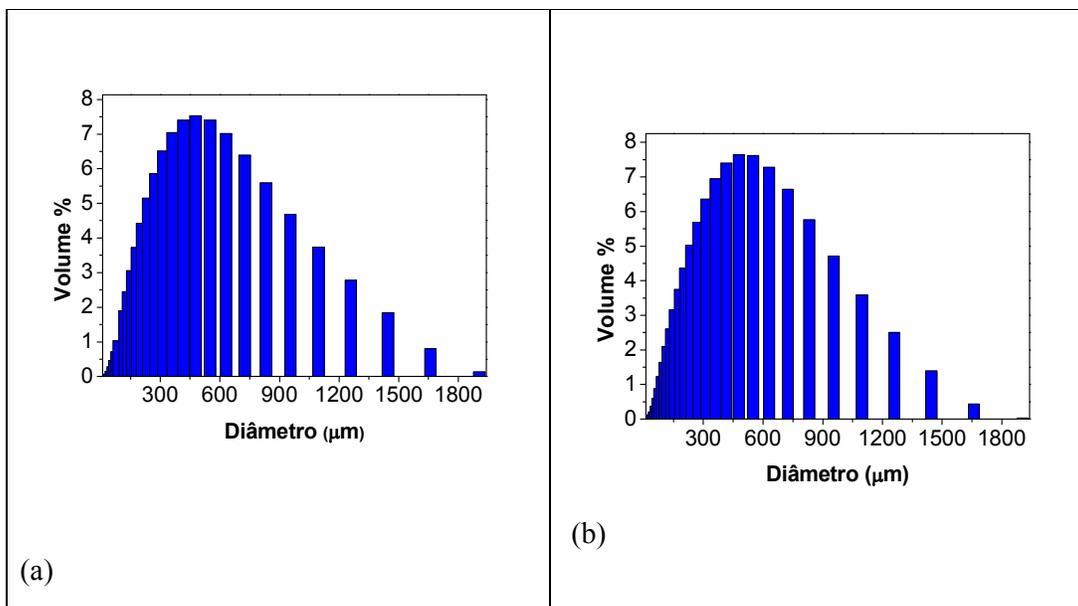


Figura 5. 11: Distribuições de tamanhos de partícula para amostras do produto final do ensaio R-6-PVAc no mini-reator.

A Figura 5.12 mostra distribuições de tamanhos de partículas para uma reação de polimerização realizada no vaso de 1 L. A velocidade de agitação foi mantida constante e igual a aproximadamente 1000 rpm. O aumento da velocidade de agitação provoca redução do tamanho das partículas devido ao aumento das forças de cisalhamento, como já poderia ser esperado (LEE e CHOI, 2010; OPREA e DODITA, 2001).

De forma similar, o aumento da quantidade de agente de suspensão leva à redução dos tamanhos médios e à produção de partículas menos aglomeradas. A despeito disso, quando as reações R-5-PVAc e R-4-PVAc são comparadas, observa-se o aumento pronunciado dos tamanhos médios em R-5-PVAc, por causa do aumento da carga de iniciador. Isso mostra de forma inequívoca que a velocidade de reação exerce enorme influência sobre a DTP do produto final, apesar desse efeito ser pouco discutido na literatura. Portanto, o bom controle do andamento de reação é fundamental para o controle adequado da morfologia das partículas.

A Figura 5.13 mostra a DTP do produto obtido em miniemulsão. Verifica-se como esperado, que os tamanhos são muito menores e posicionados na faixa nanométrica, resultando em áreas específicas maiores. Como já informado, essas partículas não são de interesse para aplicação de embolização, por causa dos tamanhos muito pequenos.

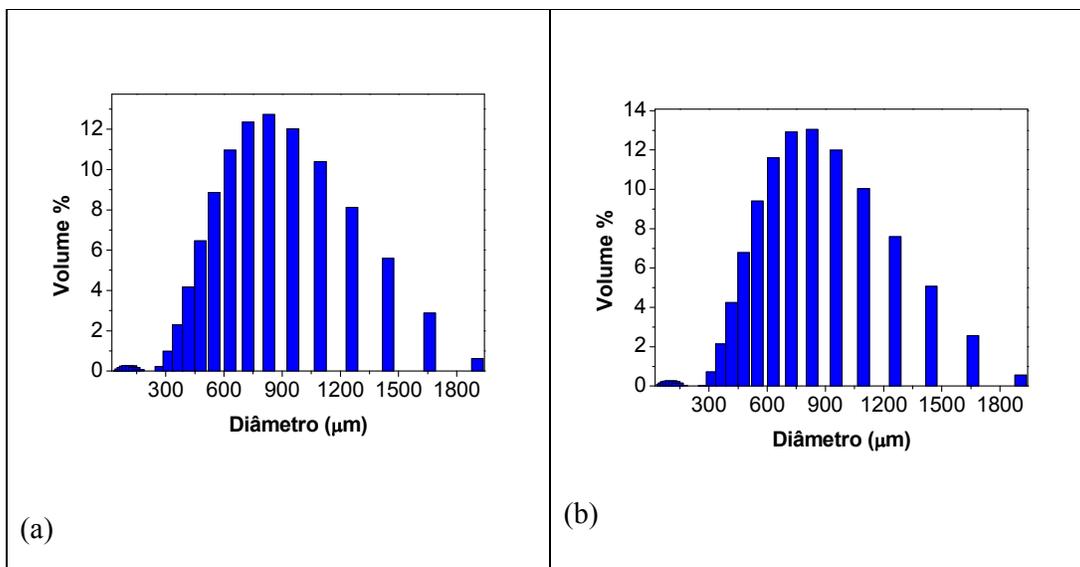


Figura 5. 12: Distribuições de tamanhos de partícula para amostras do produto final do ensaio R-5-PVAc.

A Tabela 5.4 apresenta um resumo dos diâmetros médios obtidos das análises de tamanho de partícula para amostras dos diferentes ensaios. O diâmetro médio das partículas de PVAc produzidas por polimerização em emulsão foi igual a 127,7 nm, um pouco inferior do valor de leitura recomendado pelo equipamento. Portanto, pode-se afirmar que ocorre aumento significativo da área específica do suporte, podendo influenciar o processo de adsorção das biomoléculas, como comentado adiante.

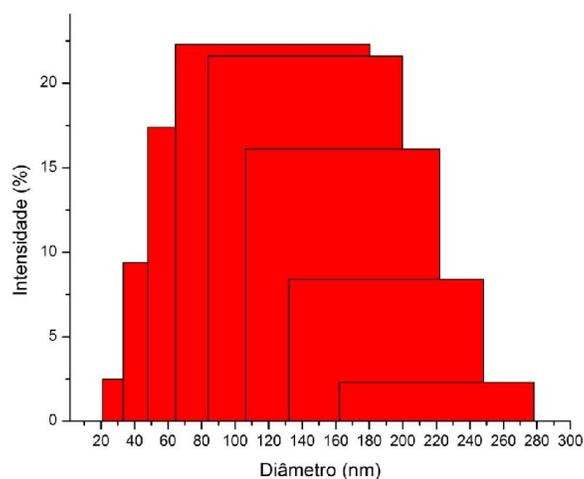


Figura 5. 13: Distribuições de tamanhos de partícula para amostras do produto final do ensaio R-5-PVAc.

Tabela 5. 4: Diâmetros ponderais médios das partículas poliméricas produzidas nos diferentes ensaios.

Reações	Diâmetro médio (μm)
R-1-PVAc-PMMA	80
R-2-PVAc-PMMA	300
R-3-PVAc-PMMA	250
R-4-PVAc	200
R-5-PVAc	900
R-6-PVAc mini-reator	600
PVAc-emulsão	127,7 nm

5.7 Potencial Zeta das Partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA

Medidas de potencial zeta foram feitas para as partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA, com o objetivo de entender melhor a interação existente entre as moléculas biológicas e o suporte. A Figura 5.14 mostra dados do potencial zeta da superfície do PVAc e do PVAc-co-PMMA como função do pH. Pode-se observar que as partículas poliméricas possuem na maior parte do intervalo de pH de interesse um potencial zeta negativo. Com base na Figura 5.14 é possível dizer que o ponto isoelétrico do PVAc se encontra próximo de 3, e que o ponto isoelétrico da resina de PVAc-co-PMMA é menor do que 2. O fato da resina de PVAc-co-PMMA ter potencial zeta mais negativo que a resina de PVAc já poderia ser esperado, pois a resina de PMMA tem grupo éster pendente mais exposto que a resina de PVAc e o resultado de hidrólise parcial do PMMA é o aparecimento de grupos carboxílicos pendentes, enquanto a hidrólise parcial do PVAc resulta na formação de grupamentos hidroxila.

Segundo a literatura científica, quanto menor é o módulo potencial zeta, mais fácil é que ocorra aglomeração, pois partículas com potencial zeta elevados estão sujeitas a forças de repulsão (SHAW, 1975). Os valores de potencial zeta obtidos ajudam a explicar o fato de que as partículas de PVAc aglomeram com maior facilidade

que as partículas de PVAc-co-PMMA, que apresentam potencial zeta mais negativo. Como descrito na seção 2.14, a BSA possui ponto isoelétrico aproximadamente igual a 4,50-5,70 (GOLDBERG, 1952). No caso da lisozima, o ponto isoelétrico é igual a 11,00 (SCAMAN *et al.*, 2005), indicando que as cargas líquidas das superfícies poliméricas são negativas nas regiões dos pontos isoelétricos das enzimas.

Como os suportes têm carga negativa, moléculas com potencial zeta positivo tendem a adsorver melhor sobre os suportes estudados. Nos casos estudados aqui, pode-se levantar a hipótese de que a lisozima deve adsorver melhor ao suporte, por conta das interações eletrostáticas. Além disso, pode-se esperar que a BSA interaja melhor com o suporte em pH's inferiores a 4,5, onde a proteína possui carga positiva e o suporte possui carga negativa. Resultados distintos destes poderão revelar a influência de outros fatores.

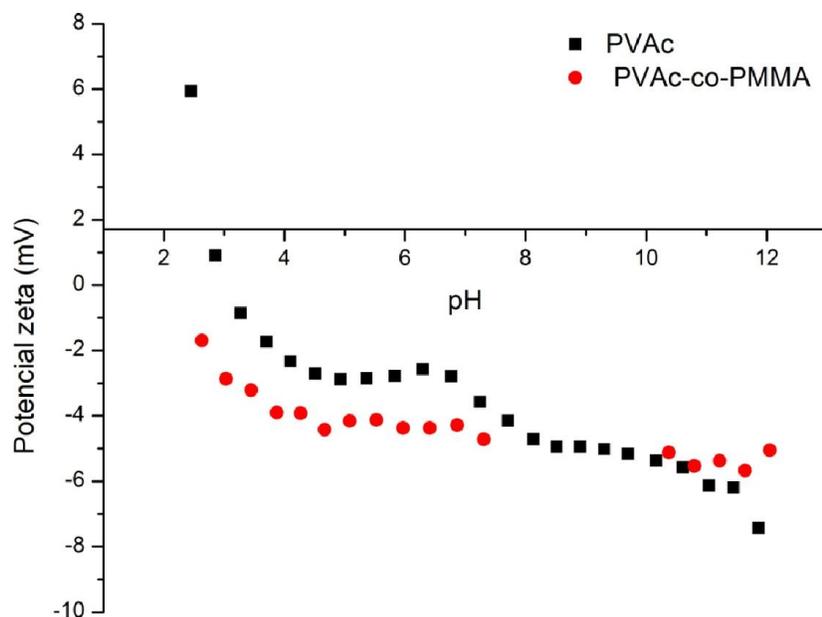


Figura 5. 14: Potencial zeta de amostra das partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA.

5.8 Ângulo de Contato

As análises de ângulo de contato conduzidas com membranas de PVAc mostraram que o material é hidrofílico, resultando em um ângulo de contato de 79°. A

Figura 5.15 mostra a gota de água sobre a superfície do filme de PVAc. Já para o filme de PVAc-co-PMMA o ângulo de contato encontrado foi de $101,7^\circ$, que o caracteriza como material hidrofóbico. Na Figura 5.16 é apresentado o comportamento da gota de água sobre a superfície de PVAc-co-PMMA. Como pode ser visto nas duas fotos, a gota de água sobre o filme de PVAc apresenta-se mais espalhada. Esse resultado é muito curioso, pois a resina de PVAc-co-PMMA, a despeito de ter concentrações de cargas mais negativas, é também mais hidrofóbica. Isso provavelmente indica que os grupamentos metila pendentés na cadeia principal da resina de PMMA exercem grande influência sobre as características da superfície. É possível também que os resultados revelem a influência de outros fatores, como contaminação por solvente ou agente de suspensão, que talvez precise ser mais bem estudado no futuro

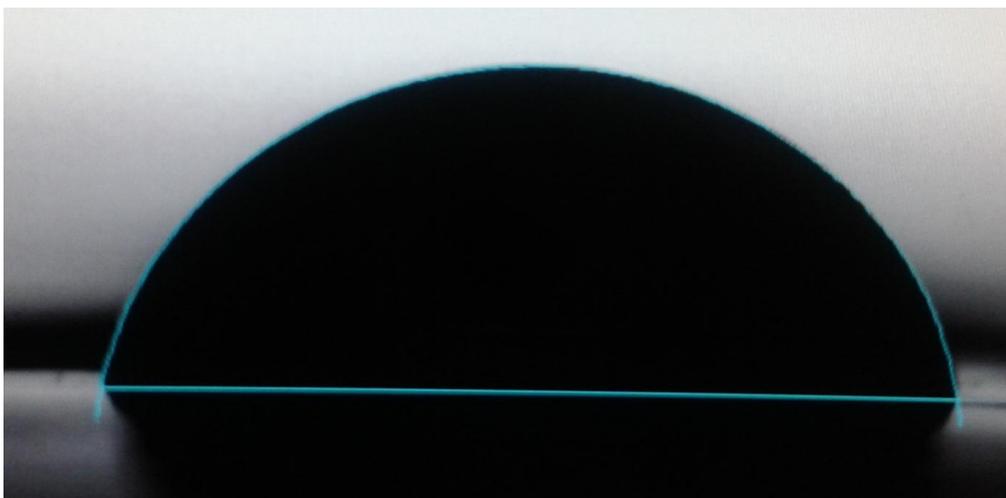


Figura 5. 15: Forma da gota de água sobre uma membrana de PVAc.

Sabe-se que as proteínas em geral são materiais hidrofílicos, havendo certa resistência para que proteínas adsorvam sobre materiais hidrofóbicos. Assim, pode ser admitida a existência de uma resistência pronunciada para adsorção durante o processo de imobilização. O problema da hidrofilicidade é um fator que a indústria farmacêutica precisa superar para utilizar polímeros hidrofóbicos como carregadores de fármacos. Para o homopolímero de PVAc e o copolímero de PVAc-co-PMMA, este problema pode ser minimizado produzindo-se uma fina camada de PVA sobre a partícula por meio da reação de saponificação.

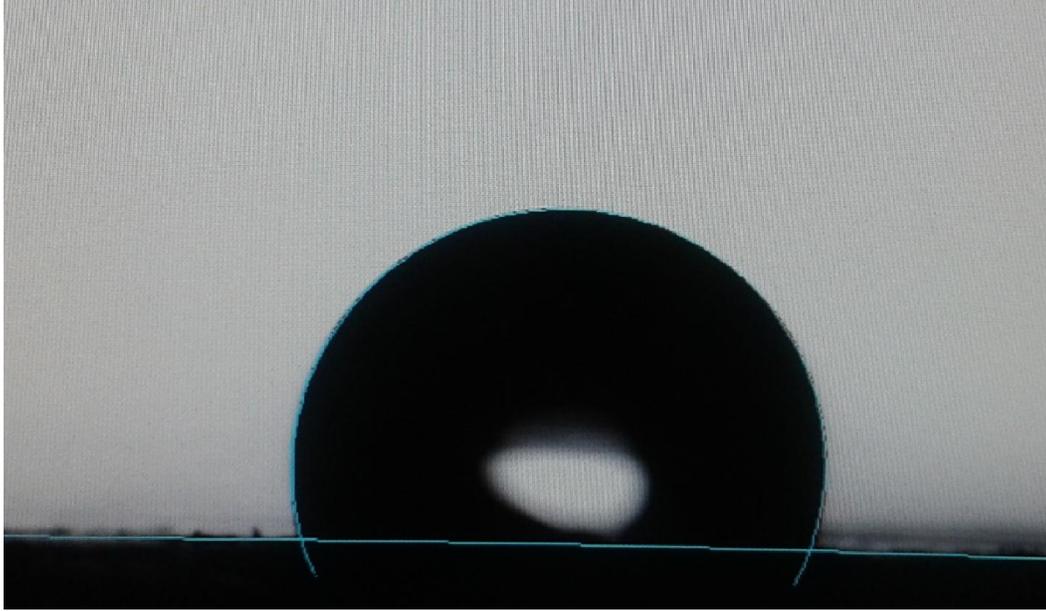


Figura 5. 16: Forma da gota de água sobre uma membranas de PVAc-co-PMMA.

5.9 Resultado das Análises de Área Específica por BET

Os resultados obtidos durante as medidas de área específica pelo método BET não foram satisfatórios. Durante o processo de análise realizado entre as temperaturas de 30 e 40 °C, as partículas aglomeraram, formando uma cola. Além disso, as áreas específicas obtidas eram sempre muito baixas, abaixo do limite de detecção do equipamento

PEIXOTO (2007) realizou a medida da área específica das partículas de PVAc, porém os resultados obtidos também não foram satisfatórios. O limite de detecção do equipamento utilizado por PEIXOTO (2007) era de $0,05 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, e as medidas do equipamento eram sempre inferiores a esse valor.

Dessa forma, as áreas específicas das partículas produzidas durante este trabalho foram calculadas com base nos resultados do diâmetro médio. A Tabela 5.5, mostra as áreas específicas calculadas, utilizando a massa específica de $1,33 \text{ g/ml}$ para partículas de polímero. Este valor foi medido por picnometria, para as amostras poliméricas de PVAc produzidas por suspensão. Considerou-se que as partículas possuem forma esférica e sem porosidade. Como pode ser observado nas micrografias apresentadas anteriormente.

Para estimar a área específica de 1 g de PVAc, realiza-se o cálculo ilustrado a seguir. Para uma partícula com diâmetro $200 \mu\text{m}$, a área da esfera da partícula é igual a

$1,26 \times 10^{-7} \text{ m}^2$. Como a massa específica é igual a $1,33 \text{ g.mL}^{-1}$, uma única partícula possui um volume de $4,19 \times 10^{-12} \text{ m}^3$. Assim, a massa de uma única partícula é igual a $5,57 \times 10^{-6} \text{ g}$. Dessa forma, pode-se concluir que 1 g de PVAc contém $1,8 \times 10^5$ partículas de PVAc e que a área total das partículas é igual a $0,0226 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Esse valor é muito pequeno para a adsorção de quantidades apreciáveis de enzima, sendo possível prever a adsorção pouco expressiva das enzimas sobre os suportes.

Tabela 5. 5: Áreas específicas das partículas poliméricas com diâmetro padronizado.

Suporte	Diâmetro médio (μm)	Área superficial ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)
PVAc	200	0,0226
PVAc-co-PMMA	200	0,0226
PVAc-emulsão	127,7 nm	35,3

Se análise algébrica similar é feita para partículas produzidas por polimerização em emulsão, observa-se áreas específicas muito maiores, em função dos menores diâmetros. Portanto, para fins de interpretação quantitativa dos dados de adsorção, pode ser interessante reduzir os tamanhos médios de partículas

5.10 Resultado da Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A estrutura molecular dos polímeros produzidos foi confirmada por análises de ressonância magnética nuclear. A Figura 5.17 mostra o espectro de prótons (^1H -RMN) do PVAc. É possível observar a principal característica de ressonância no pico posicionado em 4,82 ppm, atribuído ao hidrogênio do grupo -CHO- (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Os demais picos estão representados nas Figura 5.17 por letra do alfabeto em maiúsculo. O sinal posicionado em 7,22 ppm é atribuído aos prótons do anel aromático do iniciador (peróxido de benzoíla).

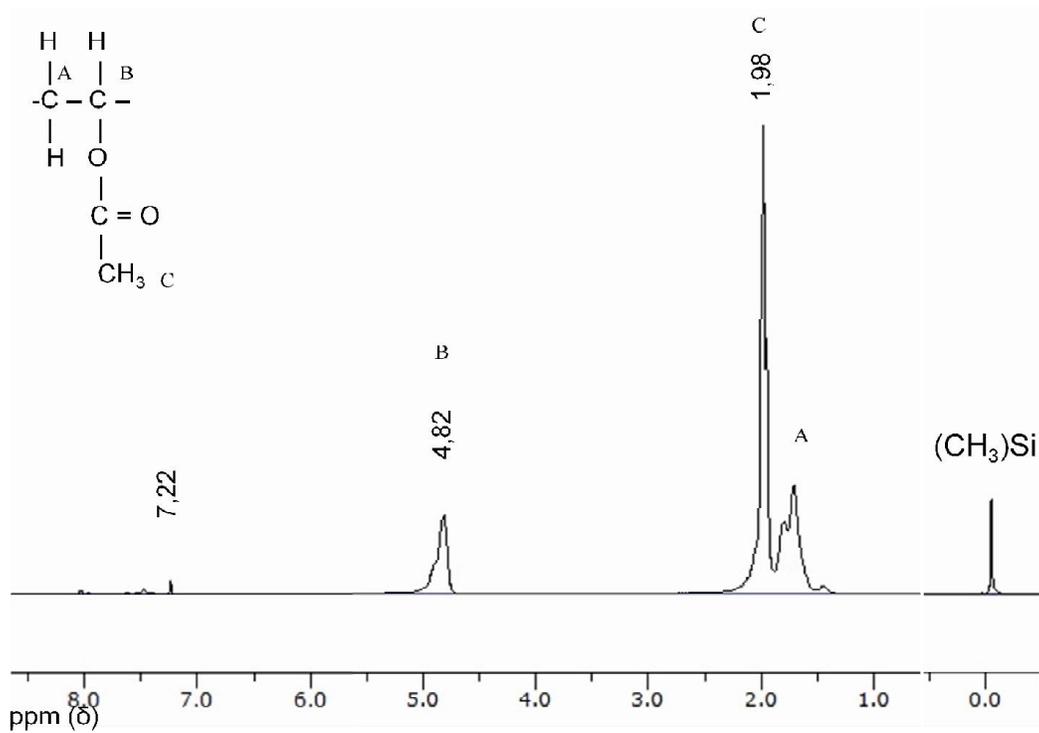


Figura 5. 17: Espectro de ¹H RMN para o PVAc.

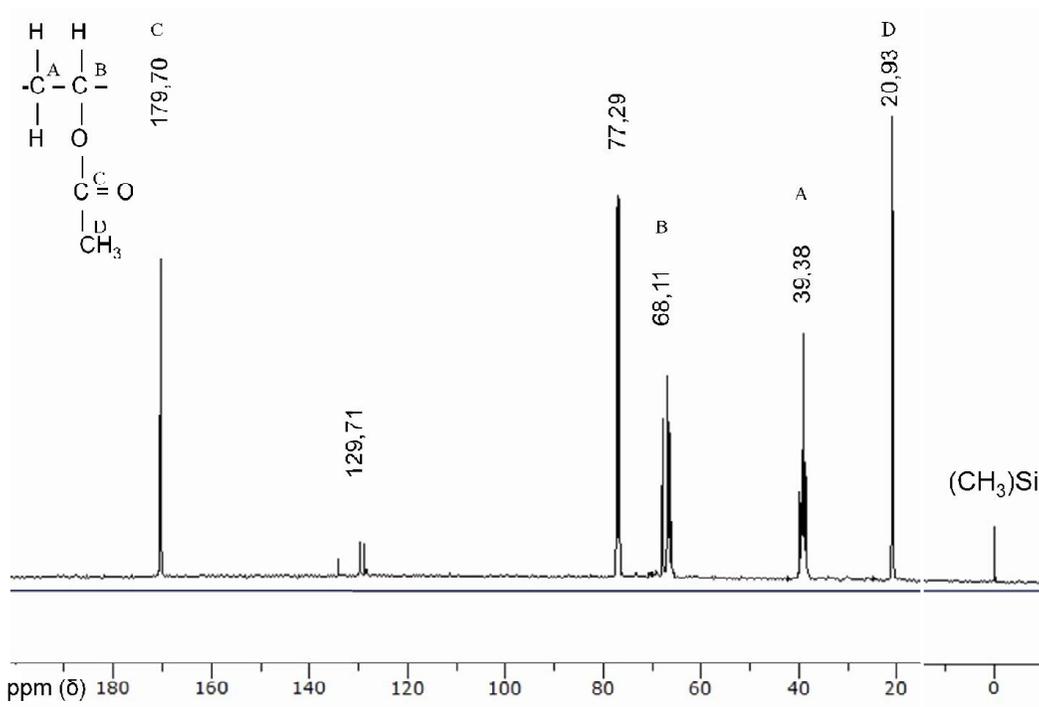


Figura 5. 18: Espectro de ¹³C RMN para o PVAc.

O espectro de carbono ^{13}C foi também obtido para uma amostra de PVAc. A Figura 5.18 mostra os picos característicos do material em 20,93, 68,11 e 179,70 ppm (PEIXOTO *et al.*, 2011). O conjunto de picos no deslocamento químico igual a 77,29 ppm é referente à presença do carbono do solvente (neste caso, usou-se clorofórmio deuterado). A intensidade dos picos no deslocamento químico 129,71 é mais fraca do que no espectro de RMN do acetato de vinila, levando-nos a concluir que as ligações duplas presentes foram consumidas, mas que se observa a presença de algum monômero residual de acetato de vinila.

As amostras de PVAc-co-PMMA também foram analisadas por ressonância magnética nuclear. A Figura 5.19 representa o espectro de hidrogênio para o copolímero produzido. É possível observar o pico posicionado em 4,82 ppm, atribuído ao grupo -CHO-. Em 3,55 ppm observa-se o pico característico do PMMA, atribuído ao agrupamento -COOCH₃. Também é possível observar a presença de prótons do anel aromático entre o deslocamento químico 7 - 8 ppm, devido à presença de iniciador (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

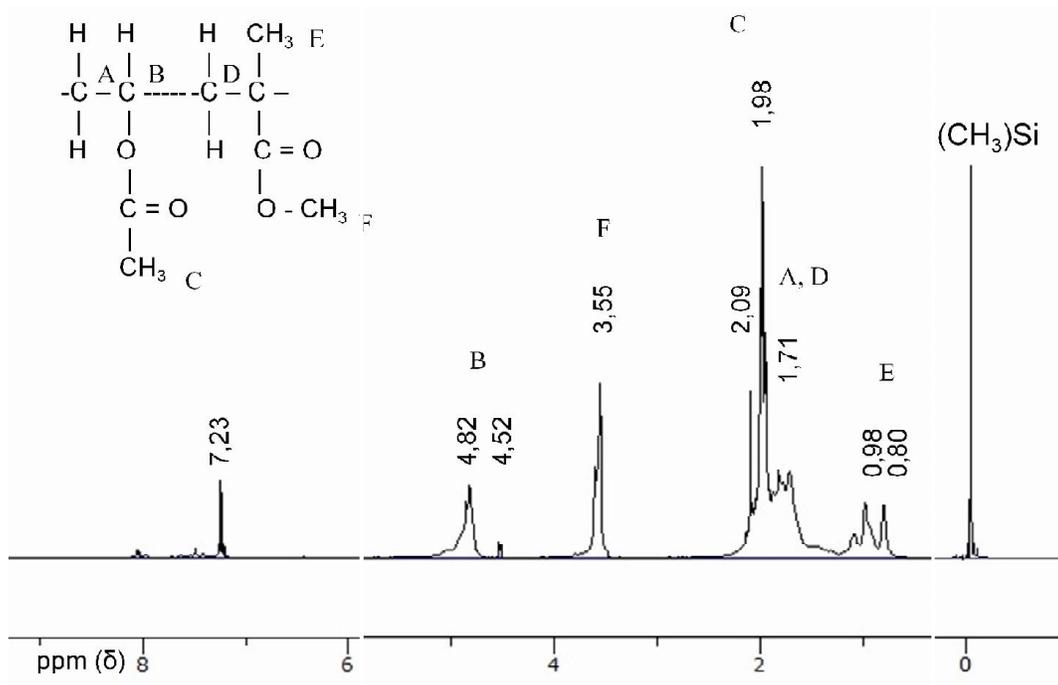


Figura 5. 19: Espectro de ^1H RMN para uma amostra de PVAc-co-PMMA.

Para finalizar, a Figura 5.20 pode ser observado o espectro de ^{13}C produzido. Observa-se novamente o deslocamento químico devido ao carbono do padrão interno e em 76,91 ppm os carbonos do solvente. O espectro do copolímero é mais complexo do

que o espectro do PVAc. A existência do PVAc é confirmado pelos picos posicionados em 20,95, 66,93, e 170,27 ppm. Os picos correspondentes ao PMMA são aqueles posicionados em 16,36, 18,7, 44,49 51,73 e o 176,87 ppm, assim como reportado por PEIXOTO *et al.* (2011) e BRANDOLINI, (2000).

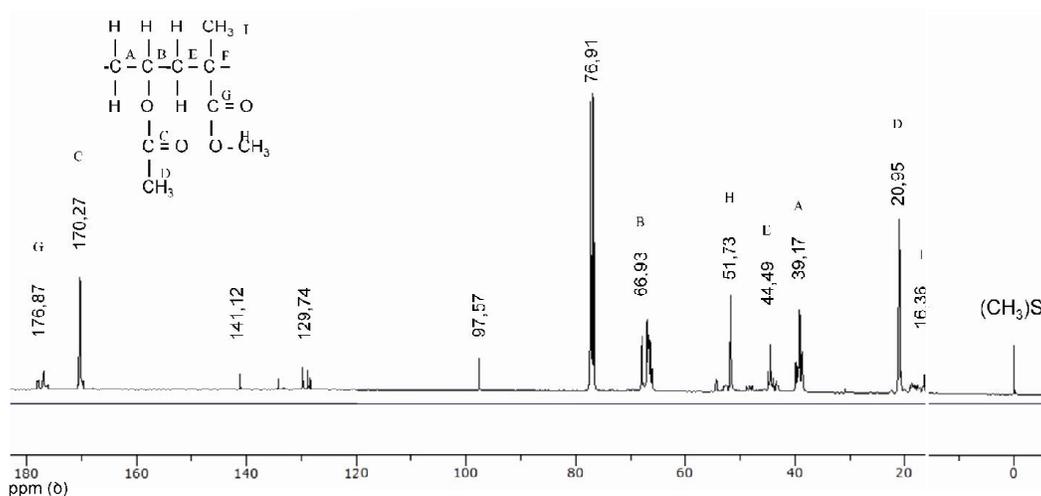


Figura 5. 20: Espectro de ¹³C RMN para uma amostra de PVAc-co-PMMA.

5.11 Comentários Finais

Foram produzidas e caracterizadas partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA para uso em ensaios de adsorção. Em particular, foram caracterizadas pela primeira vez as propriedades superficiais desses materiais, como o potencial zeta e a hidrofobicidade. A depender das condições analisadas foram produzidas partículas de diferentes tamanhos e massas molares. Para fins de ensaios de adsorção, as partículas produzidas têm baixa área específica.

Conhecendo-se as características físico-químicas das partículas produzidas neste trabalho, essas foram empregadas como suporte para a imobilização de L-asparaginase, BSA e lisozima. Os resultados serão discutidos no Capítulo 6.

Capítulo 6

Resultados e Discussão

Imobilização de L-asparaginase, BSA e Lisozima nas Partículas de PVAc e de PVAc-co-PMMA

Neste capítulo é apresentado o estudo da imobilização das biomoléculas L-asparaginase, BSA e lisozima sobre os suportes de PVAc e PVAc-co-PMMA previamente preparados e caracterizados.

6.1 Avaliação dos Métodos de Detecção de Proteínas

Antes de realizar qualquer experimento que envolva biomateriais é importante realizar testes para avaliar desempenho dos métodos e reagentes que se pretende utilizar. Nesta seção, são avaliadas inicialmente a eficiência e a precisão dos métodos usados para a detecção de proteína.

6.1.1 Avaliação do Método de Bradford

Neste trabalho foi utilizado o método de Bradford para caracterizar a concentração de proteína total nas soluções de L-asparaginase, BSA e lisozima preparadas. Esta metodologia também foi empregada para avaliar a concentração de proteínas no sobrenadante da solução de imobilização. O teste de Bradford possui um limite de detecção na faixa de 0,02 a 0,1 g.L⁻¹. As soluções das biomoléculas foram preparadas ou diluídas dentro dessa faixa, na forma discutida no Capítulo 4.

Foi realizado um estudo estatístico preliminar com os dados medidos de concentração de proteínas, usando o programa Statistica 7.0[®]. Duas amostras de solução de L-asparaginase, utilizando como fonte o medicamento Elspar liofilizado, foram preparadas na concentração de 0,2 g.L⁻¹. Segundo a bula, este medicamento é composto por 65% de manitol e 35% de L-asparaginase. Sendo assim, a solução preparada tinha a

concentração de $0,07 \text{ g.L}^{-1}$ de proteína. Alíquotas destas soluções foram retiradas e medidas pelo método de Bradford. A primeira solução foi medida em quadruplicata e a segunda foi medida 5 vezes, para avaliar o erro das medidas. Os resultados estão apresentados na Figura 6.1.

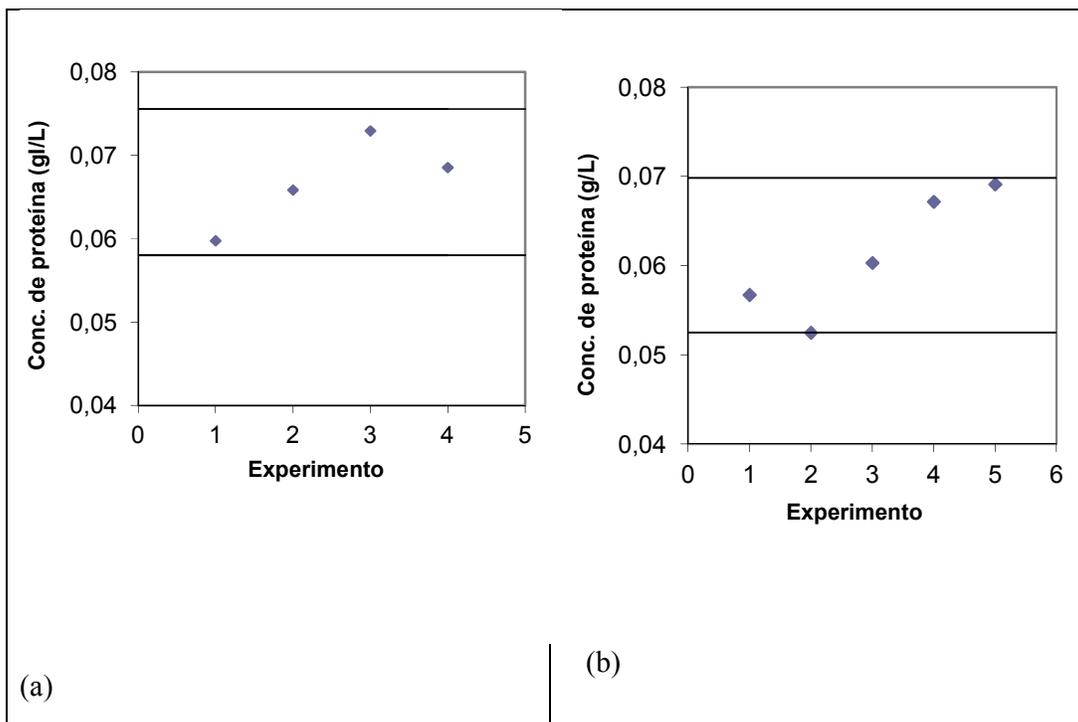


Figura 6. 1: Avaliação da precisão das análises de Bradford para duas soluções de L-asparaginase diferentes, na concentração nominal de $0,07 \text{ g.L}^{-1}$.

Utilizando um nível de significância de 95%, os intervalos de confiança foram calculados para os conjuntos de dados. A média calculada para a primeira solução foi de $0,06678 \text{ g.L}^{-1}$, com erro aproximado de 10% do valor da amostra. Para o conjunto de dados da segunda solução, a média calculada foi de $0,06116 \text{ g.L}^{-1}$, com erro aproximado 13% do valor da amostra. A análise estatística dos dados parece confirmar a adequação das medidas feitas, uma vez que os valores nominais reportados pelo medicamento se encontram na região de confiança dos dados amostrados e que o erro observado é compatível com os limites de detecção da técnica.

Foi realizada análise para avaliar a presença de possíveis interferentes presentes nos materiais poliméricos. Soluções tampões de fosfato nos pHs 3,00; 5,00; 6,80 e 8,60 foram colocados em contato com partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA. Foram utilizados 10 mL da solução tampão e 1 g do adsorvente. Em tempos pré-determinados

de amostragem e depois de 24 horas foram retiradas alíquotas dessas soluções e submetidas à análise de Bradford. As leituras sempre apresentaram valores de absorbâncias negativos e muito próximo de zero; ou seja, a presença das micropartículas poliméricas não parece afetar a qualidade dos resultados obtidos com o método de Bradford.

6.1.2 Avaliação do Método de Ultravioleta para determinação de BSA

Um primeiro experimento foi realizado com a intenção de avaliar a interferência de produtos residuais eventualmente presentes nos suportes poliméricos sobre o desempenho do método UV. Para isso, amostras de polímero (1g) foram colocadas em contato com uma solução tampão fosfato (10 mL), sem a presença de BSA. A temperatura foi mantida em 30 °C e a agitação foi mantida em 250 rpm. As análises foram inicialmente realizadas para o tampão fosfato com pH 8,60.

Devido à facilidade e rapidez do método UV para análise de concentração de BSA, os tempos de amostragem foram fixados em cerca de 10 minutos. Infelizmente, logo na primeira medida realizada é possível observar o aumento da absorbância. Na Figura 6.2 é possível observar que existe um aumento contínuo da absorbância da solução tampão posta em contato com as partículas de polímero ao longo do tempo, resultando em leituras falsas dos teores de BSA. O material polimérico utilizado para a construção da Figura 6.2 foi o PVAc. Pode-se concluir que substâncias são liberadas pelo adsorvente e detectadas por absorção no ultravioleta em 280 nm. Estas análises foram repetidas para diferentes amostras e todas as análises mostraram a presença de materiais contaminantes que mascaram a leitura das análises.

A concentração máxima de proteína utilizada nos ensaios de adsorção durante a realização deste trabalho foi de 0,1 g.L⁻¹. Pode-se ver na Figura 6.2 que ocorre uma falsa detecção de BSA bem acima desse valor limite, caracterizando a forte influência de presença de monômeros nas análises. Outros experimentos foram realizados por tempos mais longos, para tentar alcançar um ponto de saturação do sinal, mas o ponto de saturação nunca foi observado, mostrando que a interferência se manifesta de forma cumulativa por longos períodos de tempo. Como consequência, o método UV teve que ser descartado.

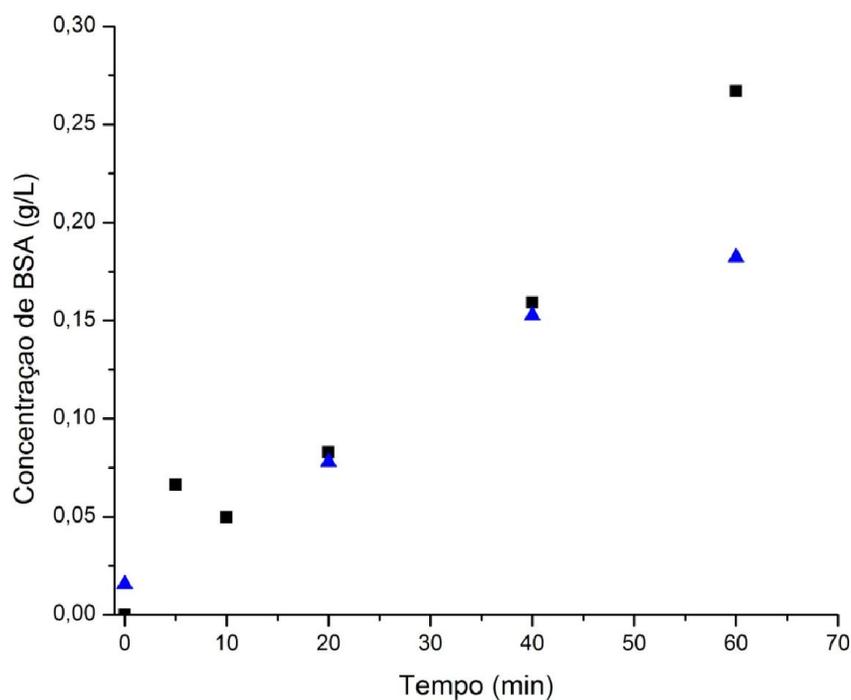


Figura 6. 2: Presença de interferentes durante medidas por ultravioleta a 280 nm de uma solução tampão, sem a presença de BSA, em contato com partículas de PVAc. Experimento realizado em duplicata.

6.2 Teste da Atividade Enzimática da L-asparaginase

Discute-se a seguir o comportamento da curva de reação para ensaios de reação enzimática realizados com L-asparaginase. A Figura 6.3 apresenta um exemplo típico de comportamento observado para uma das reações realizadas com a enzima. Esta curva foi construída medindo-se a concentração de amônia produzida durante a reação enzimática de consumo de asparagina pela L-asparaginase. Sabe-se que a reação da L-asparaginase com L-asparagina produz ácido aspártico e amônia. Com a utilização do kit enzimático ou do método de fenol-hipoclorito para detectar amônia, é possível medir a quantidade deste produto e determinar a curva da reação. Todas as reações enzimáticas realizadas neste trabalho foram conduzidas a 37 °C e em pH 8,6 em tampão tris/HCl, com concentração de 50 mM, exceto quando informado em contrário.

Na Figura 6.3 pode-se observar a produção de amônia até o tempo aproximado de vinte minutos de reação. Após vinte minutos, a concentração de amônia permanece

constante, mostrando que todo o reagente (L-asparagina) foi convertido. A atividade enzimática (AE) medida foi igual a 12,77 UI e a atividade enzimática por ml de solução foi igual a 25,54.

De posse das medidas dos valores da concentração de amônia liberada ao longo do tempo, o coeficiente angular da região linear inicial equivale à atividade enzimática em unidade internacional (UI). Dividindo este fator pelo volume da solução de L-asparaginase utilizada, encontra-se a atividade enzimática por ml. Dividindo-se o fator (UI) pela massa de proteína medida, encontrado pelo o método de Bradford, encontra-se a atividade específica. Na Figura 6.3 observa-se o comportamento da reação enzimática por aproximadamente 60 minutos de reação.

Para validar o método utilizado e avaliar o erro do operador, as amostras retiradas do meio reacional foram analisadas em quadruplicata. Na Tabela 6.1 são apresentados os resultados obtidos. A Tabela 6.2 apresenta os dados resultantes do tratamento estatístico realizado para estas medidas. Como pode ser verificado, os valores calculados na Tabela 6.2 mostram a eficiência do método de detecção de amônia utilizado neste trabalho. Embora os erros sejam grandes, os valores estão na faixa usual reportada de 20%, o que garante a qualidade dos resultados obtidos neste trabalho (RODRIGUES e IEMMA, 2009). A média e o erro calculados estão ilustrados na Figura 6.4. Pode ser visto na figura que as medidas estão relativamente próximas umas das outras e que todas as medidas são significativas, uma vez que as regiões de confiança não incluem o zero.

Utilizando o método proposto, foram determinadas as curvas cinéticas e as atividades enzimáticas para diferentes sistemas durante este trabalho. As análises de atividade enzimática foram realizadas com uma solução de L-asparaginase em água destilada, em tampão tris/HCl no pH 8,6 e a 50 mM, em tampão fosfato no pH 8,60 e a 50 mM, em acetato de vinila e em uma solução contendo 32,25% (m/m) de acetato de vinila e 67,75% (m/m) de tampão tris/HCl. As Figuras 6.3 a 6.7 mostram os resultados obtidos para essas soluções. A Tabela 6.3 mostra as atividades enzimáticas medidas para cada experimento. Em todos os casos, as concentrações de asparagina e L-asparaginase foram mantidas constantes, como reportado para a Figura 6.3.

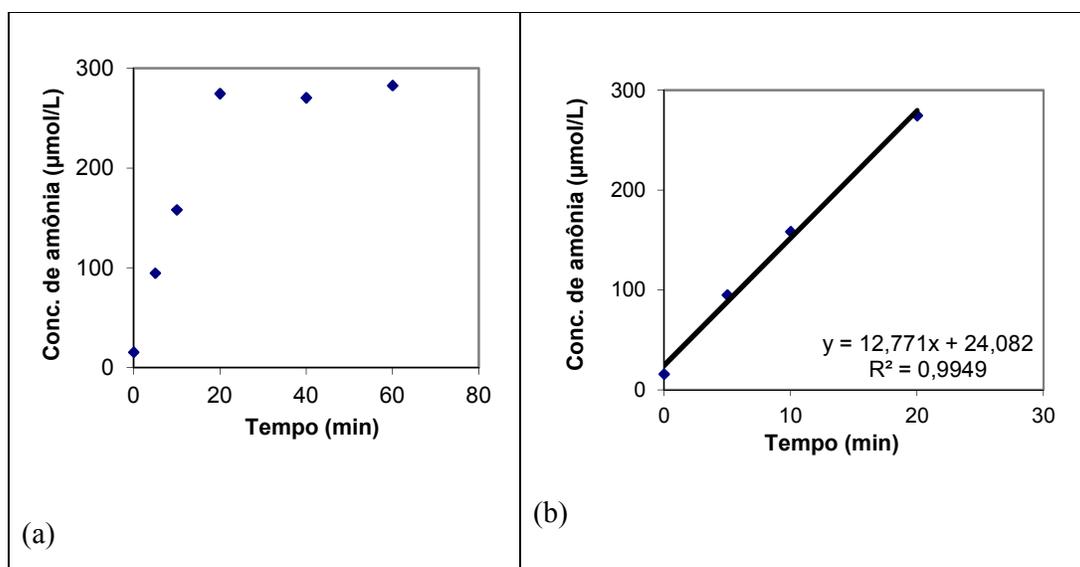


Figura 6. 3: Cinética da reação enzimática da L-asparaginase em tampão tris/HCl 50 mM, pH 8,6 e T = 37°C: (a) dados completos e (b) zoom da parte linear.

Tabela 6. 1: Quadruplicatas medidas com o kit enzimático para a detecção de amônia produzida pela ação da L-asparaginase.

Ensaio	Tempo (min)	Medida 1 (µmol.L ⁻¹)	Medida 2 (µmol.L ⁻¹)	Medida 3 (µmol.L ⁻¹)	Medida 4 (µmol.L ⁻¹)
2	5	2500	1900*	4200	4600
3	10	5500	5000	5300	5300
4	15	9200	4600*	8300	8700
5	20	12300	10200	11200	11000
6	30	11500	11400	12700	12400

*Possível outlier

O estudo realizado com uma solução de L-asparaginase em acetato de vinila (VAc) na concentração de 0,2 g.L⁻¹ do medicamento Elspar é discutido a seguir. O estudo da solubilidade de muitas enzimas mostra que elas são usualmente pouco solúveis em solventes orgânicos (COELHO *et al.*, 2008).

Tabela 6. 2: Caracterização estatística dos dados de concentração de amônia coletados nos ensaios enzimáticos com L-asparaginase.

Média ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Variância ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) ²	Desvio Padrão ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Desvio Padrão/Média
3300	1669605	1292,13	0,39
5300	59541,06	244,01	0,04
8200	1271028	1127,39	0,13
11100	784059,6	885,47	0,07
12000	393462,1	627,26	0,05

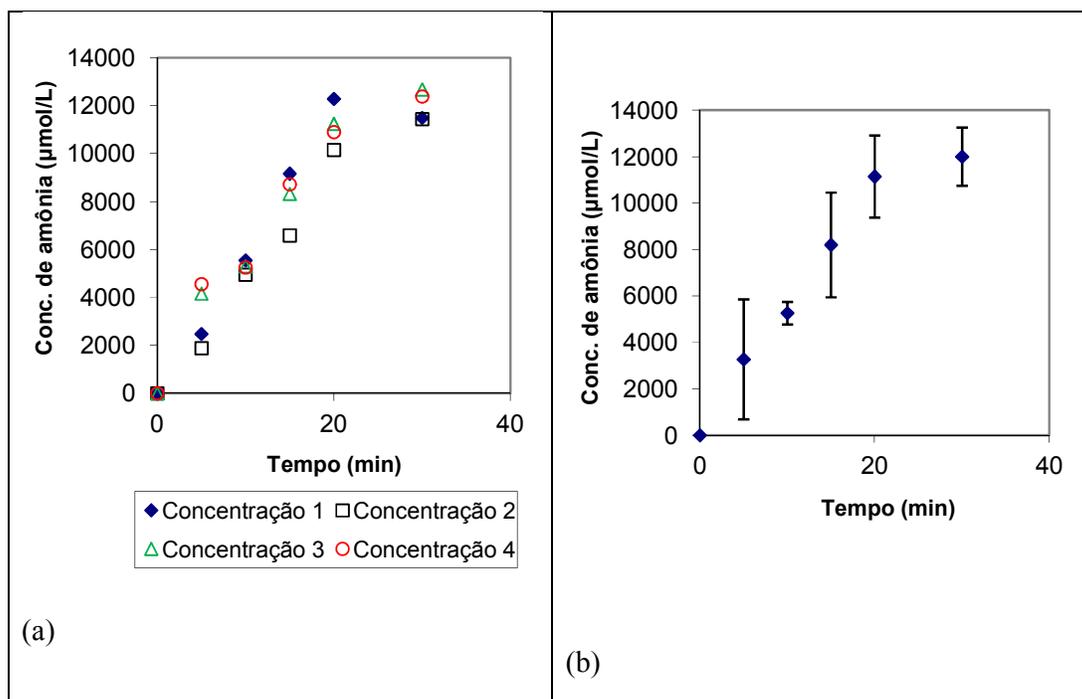


Figura 6. 4: Evolução da concentração de amônia nos ensaios enzimáticos com L-asparaginase: (a) concentrações de amônia e (b) média das concentrações de amônia e respectivas barras de erros.

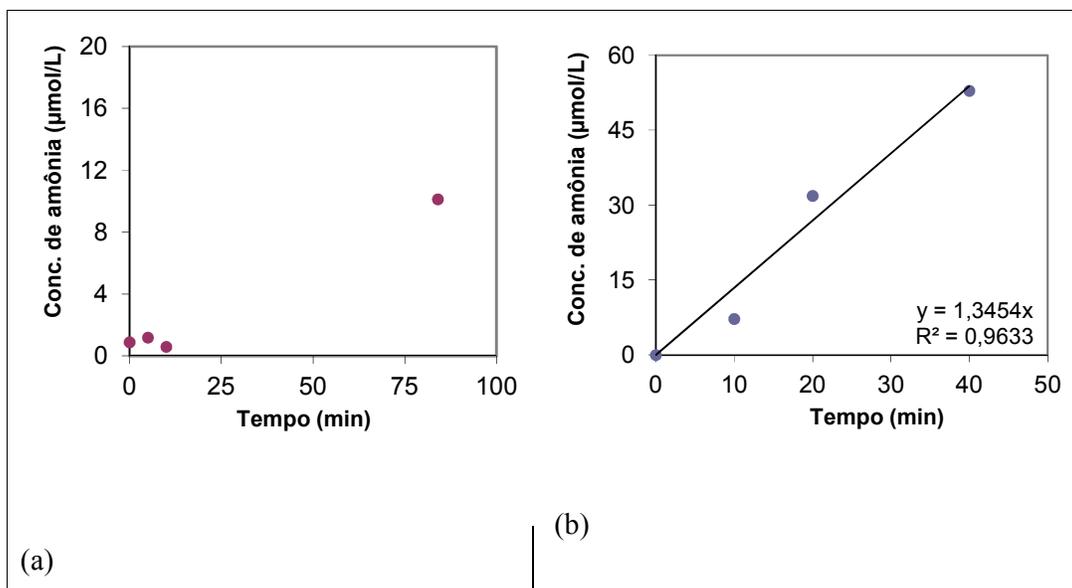


Figura 6. 5: (a) Atividade de L-asparaginase em acetato de vinila puro. (b) Atividade de L-asparaginase em mistura contendo 32,35% (m/m) de acetato de vinila em dispersão aquosa.

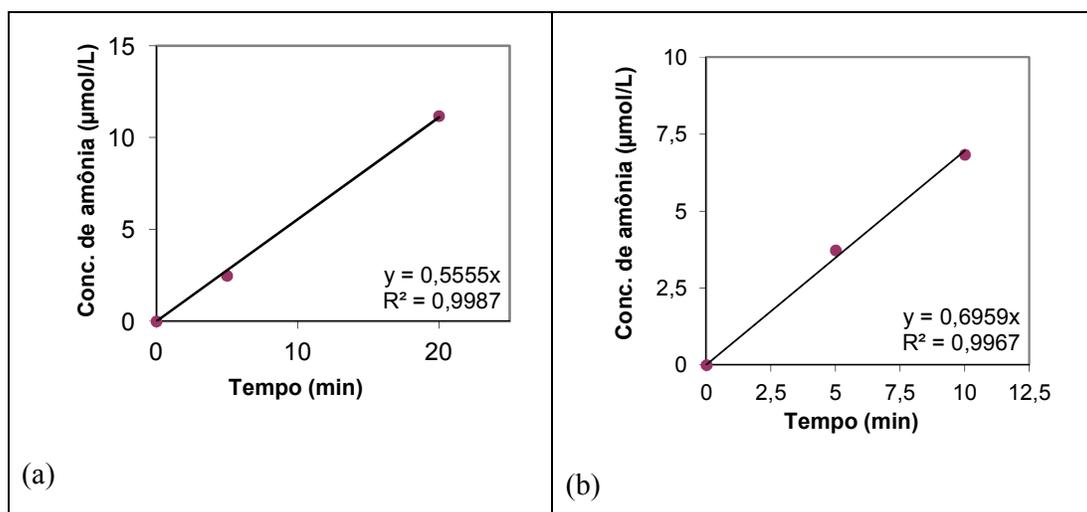


Figura 6. 6: (a) Atividade de L-asparaginase em tampão tris/HCl a 70 °C durante duas horas. (b) Atividade enzimática na mistura contendo 32,25% (m/m) de acetato de vinila e 67,75% (v/v) de tampão tris/HCl a 70 °C por duas horas.

Testes de solubilidade das enzimas L-asparaginase e lisozima mostraram que elas não solubilizam no VAc. Mesmo assim, foi aplicado o método de determinação enzimática numa dispersão preparada com VAc. Esse teste foi realizado para avaliar a possibilidade de adicionar L-asparaginase no meio de polimerização. A Figura 6.5

mostra os resultados obtidos durante o experimento. Pode ser observado um aumento da concentração de amônia após 80 minutos de reação; porém, esta concentração é insignificante, quando comparadas às concentrações de amônia detectadas na Figura 6.3. Sendo assim, pode ser dito que na dispersão de acetato de vinila com L-asparaginase não foi observada qualquer atividade enzimática significativa. Esse resultado pode ser devido à desnaturação da L-asparaginase ou à não solubilidade da enzima no meio.

Nos testes preparados com uma solução aquosa contendo 32,25% (m/m) de acetato de vinila em suspensão, foi detectada uma atividade enzimática um pouco maior, mas ainda inexpressiva, como mostra a Figura 6.5. Este estudo foi realizado porque essa é a composição média do meio durante a reação de polimerização. No entanto, a atividade foi muito menor que a atividade mostrada na Figura 6.3, o que parece mostrar que a presença do acetato de vinila inibe a atividade da L-asparaginase. Isso mostra que a incorporação *in-situ* da enzima durante a reação de polimerização não parece ser apropriada.

Um estudo sobre a atividade enzimática da L-asparaginase foi realizado na temperatura de 70 °C por 2 horas. A solução de L-asparaginase foi preparada com concentração do material liofilizado de 0,2 g.L⁻¹ em tampão tris/HCl 50mM e pH 8,6. Uma segunda solução de L-asparaginase também foi preparada, utilizando uma mistura que continha 32,25% (m/m) de acetato de vinila em suspensão e 67,75% (m/m) de tampão tris/HCl 50 mM e pH 8,6, na concentração de 0,2 g.L⁻¹ de L-asparaginase liofilizada do medicamento Elspar[®]. As duas soluções foram mantidas em 70 °C por duas horas. Este teste foi realizado porque esta temperatura corresponde às condições usuais de polimerização. Na Figura 6.6 estão apresentadas as partes lineares das medidas da concentração de amônia. A atividade enzimática em ambos os casos diminui de maneira considerável, mostrando uma grande influência da temperatura sobre a atividade enzimática. Como discutido antes, essa desativação desfavorece a incorporação *in-situ* do fármaco nas partículas de polímeros. O fato de a solução aquosa de L-asparaginase ser preparada em tampão tris/HCl mantida a 70 °C por 2 h ou em dispersão aquosa de acetato de vinila 32,25% (m/m) não pareceu exercer grande influência sobre os resultados obtidos, uma vez que as atividades encontradas em ambos os estudos estavam próximas. Isso mostra que a temperatura é um fator preponderante na desativação. A influência da temperatura mostrou que ocorre uma desnaturação da L-asparaginase superior a 95% a 70 °C na solução tampão tris/HCl, valor similar ao obtido

com a mistura contendo 32,25% (m/m) de acetato de vinila em suspensão, que foi de cerca de 90%. Portanto, os resultados recomendam que a eventual incorporação de L-asparaginase nas partículas embolizantes deve ser feita em uma etapa após a polimerização.

No Capítulo 2 foi mostrado o comportamento da L-asparaginase em relação ao pH, notando-se que a atividade se mantém em um patamar constante entre os pH's de 5,6 a 9,5, tendo atividade ótima em pH igual a 8,6. Sabe-se que o pH da circulação sanguínea é de cerca de 5,2. Nessas condições, a atividade da L-asparaginase em solução aquosa encontrada foi de 4,37 UI ou 8,75 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$.

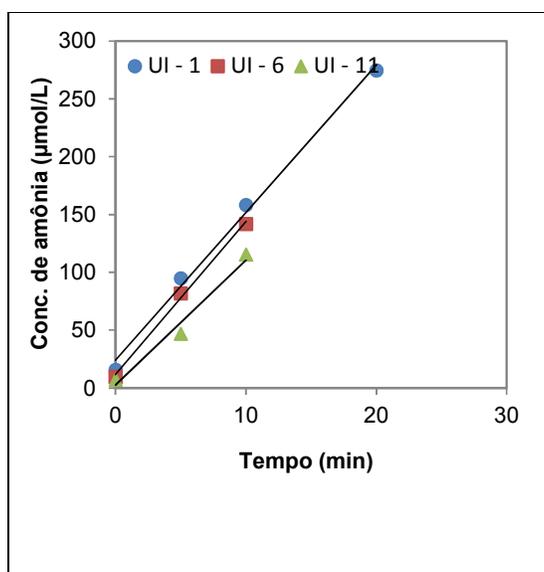


Figura 6. 7: Avaliação da atividade de L-asparaginase em tampão tris/HCl 50 mM e pH 8,6 por um período de 11 dias armazenada em geladeira.

Na Figura 6.7 está ilustrada a desativação da solução de L-asparaginase em tampão tris/HCl armazenada em refrigerador a temperatura de 3-4°C. UI – 1 é a medida no dia em que a solução foi preparada, cujo valor encontrado foi de 12,77 UI ou 25,54 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$. A medida UI – 6 foi igual a 13,22 UI ou 26,45 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, estando muito próxima do primeiro valor, apesar da solução ter sido armazenada por 6 dias. A terceira medida foi realizada após 11 dias corridos (UI-11) e a atividade enzimática encontrada foi de 10,82 ou 21,64 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$, o que acarretou em perda de aproximadamente 16% da atividade da solução inicial (no entanto, similar estatisticamente às demais). Isso indica que o armazenamento da enzima por ambos os períodos em geladeira é possível. Um estudo de atividade por um período maior de tempo deve ser realizado para avaliar

a estabilidade da solução aquosa de L-asparaginase por longos períodos, mas suficiente para permitir o armazenado com segurança. A L-asparaginase é comercializada liofilizada devido ao fato que a enzima pode perder sua atividade com muita facilidade em solução.

Tabela 6. 3: Resumo das atividades enzimáticas medidas em diferentes condições.

Experimento	Condição de reação	Atividade enzimática	Atividade enzimática por ml
01	Solução de L-asparaginase em tampão tris/HCl 50 mM pH 8,6	12,77	25,54
02	Solução de L-asparaginase em acetato de vinila	0	0
03	Solução de L-asparaginase em tampão tris/HCl 50 mM pH 8,6 tratado durante 2 h a temperatura de 70 °C	0,55	1,1
04	Solução de L-asparaginase preparada com 32,25% (v/v) de VAc e tampão tris/HCl 50 mM pH 8,6 tratado durante 2 h a temperatura de 70 °C	0,69	1,38
05	Solução de L-asparaginase em tampão tris/HCl 50 mM pH 8,6 com 32,25% (v/v) de acetato de vinila	1,34	2,69

A Tabela 6.3 apresenta um resumo das atividades enzimáticas medidas em diferentes condições. Com auxílio desta tabela, é possível avaliar como a atividade enzimática é afetada pela solução de acetato de vinila e pela temperatura. Como já descrito, a imobilização da L-asparaginase *in-situ* durante o processo de polimerização parece ser inapropriada. É importante enfatizar que algumas enzimas têm a propriedade de sofrer desativação em condições severas de operação e, quando colocadas em

condições brandas, recuperar a atividade enzimática (COELHO *et al.*, 2008). Não parece ser esse o caso da L-asparaginase.

6.3 Imobilização de L-asparaginase

Admitindo que a enzima tem densidade aproximadamente igual a 1 g.mL^{-1} formato esférico e diâmetro de 200 \AA , a área requerida para a imobilização de um volume de 10 mL de solução com concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de enzima é aproximadamente igual a $0,01 \text{ m}^2$. Dessa forma, 1 g de polímero produzido em suspensão nas condições descritas no Capítulo 5 parece conter área suficiente para a imobilização de 10 mL de uma solução enzimática com concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$. Nesse caso, a concentração de enzima sobre o suporte seria igual a cerca de 1 mg por grama de suporte.

Foram utilizados três tipos de partículas para avaliar a imobilização da enzima L-asparaginase. As primeiras partículas utilizadas eram formadas por PVAc. Estas partículas, depois do pré-tratamento, foram postas em contato com uma solução de L-asparaginase na temperatura ambiente. A Figura 6.8a mostra que não foi verificada a imobilização significativa de enzima, utilizando o método de Bradford para medir a quantidade de proteína restante no sobrenadante.

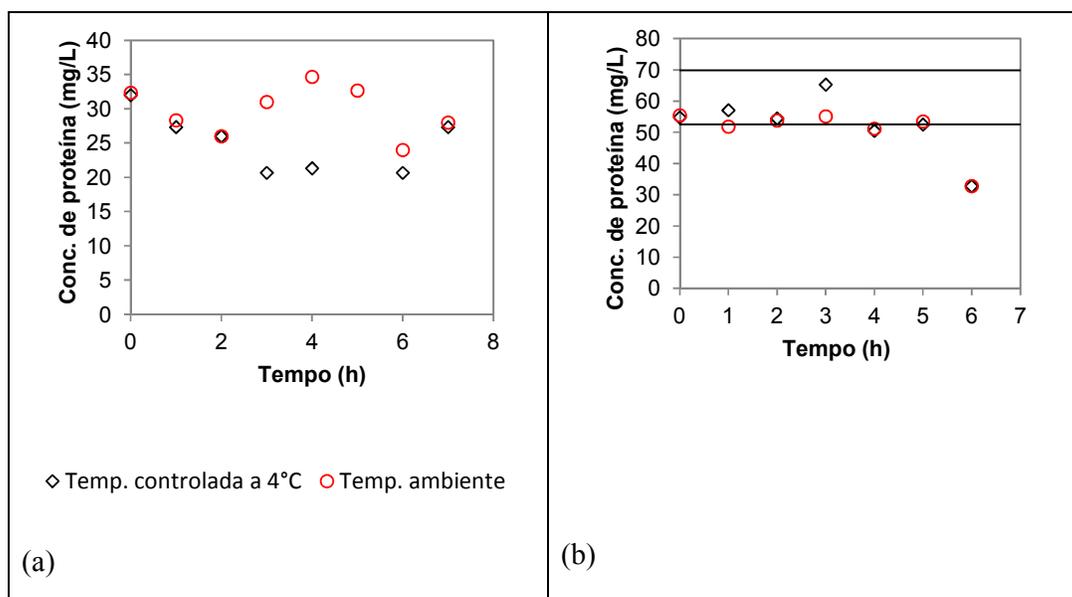


Figura 6. 8: Dados de concentração de L-asparaginase no sobrenadante na presença de partículas de PVAc para dois sistemas: (a) duas amostras de PVAc em diferentes temperaturas a 200 rpm (b) e réplicas de duas amostras de PVAc a 4 °C e 200 rpm.

Sabe-se que um processo de imobilização é geralmente favorecido por baixa temperatura. Com o objetivo de avaliar o processo de imobilização em temperaturas baixas, novos estudos foram realizados utilizando banho de gelo e controlando a temperatura em 4 °C. A Figura 6.8a mostra que também não ocorreu a imobilização significativa da L-asparaginase a 4 °C.

Pode ser observado na Figura 6.8a que a solução inicial de L-asparaginase continha aproximadamente 35 mg.L⁻¹ de proteína. Apesar de ser observada uma queda de proteína no sobrenadante da solução de L-asparaginase no início do experimento para os dois casos, não se pode garantir que esteja ocorrendo imobilização significativa. Na Figura 6.8b duas amostras de PVAc foram colocadas em contato com amostra de uma solução de L-asparaginase em banho de gelo a 4 °C, sob agitação de 200 rpm. As linhas horizontais na figura indicam o intervalo de 95% de confiança das medidas. Nota-se, após 6 horas de contato com a solução de L-asparaginase, uma queda na concentração da proteína no sobrenadante da solução de aproximadamente 45%, indicando uma possível imobilização. De qualquer maneira, os resultados parecem indicar a baixíssima afinidade da enzima pelo suporte estudado.

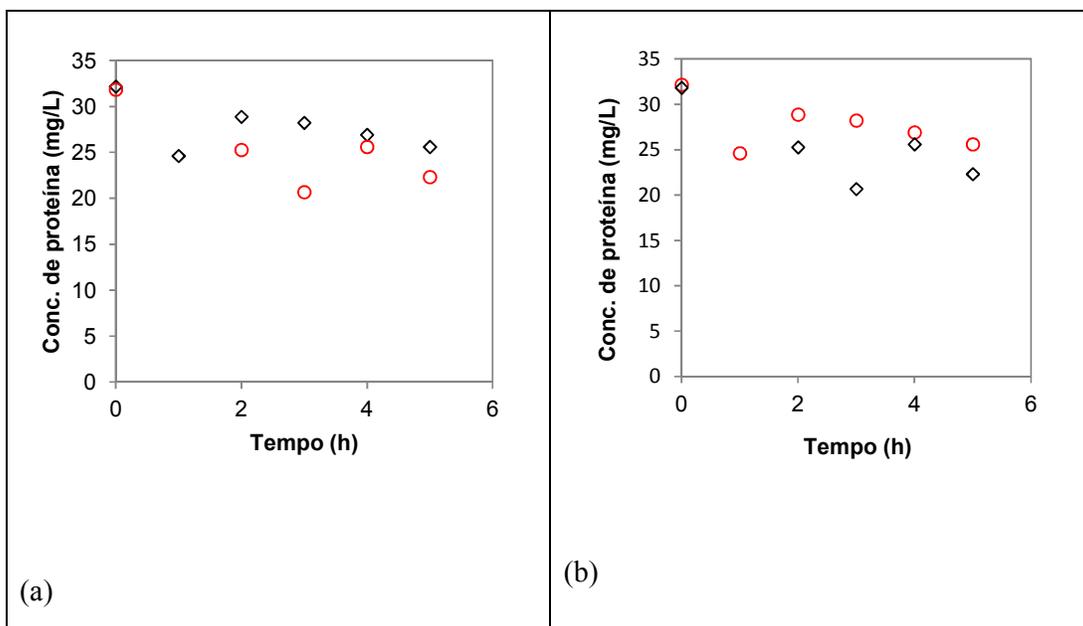


Figura 6. 9: Dados de concentração de L-asparaginase no sobrenadante na presença de partículas de PVAc-co-PMMA (a) e PVAc-PVA (b) na temperatura de 4 °C e a 200 rpm.

Testes de imobilização foram também conduzidos com partículas de PVAc-co-PMMA mostrado na Figura 6.9a. Os dois testes realizados com partículas de PVAc-co-PMMA foram conduzidos com temperatura controlada a 4 °C. Como pode ser observado nas Figuras 6.9 e como observado no caso anterior, não foi possível concluir que a enzima foi imobilizada de forma significativa.

As partículas saponificadas de PVAc-PVA oriundas do ensaio R-4-PVAc foram também testadas no processo de imobilização. Os resultados são apresentados nas Figuras 6.9b. Não foi também possível observar imobilização significativa sobre este suporte nas réplicas estudadas.

Foi aplicado o método de Bradford a uma solução de tampão desprovida de enzimas, mas posta em contato com as partículas poliméricas. A finalidade deste teste foi avaliar a liberação de possíveis substâncias que pudessem interferir no resultado do método. A solução foi mantida em contato por 4 horas e amostras foram retiradas de hora em hora e analisadas segundo a metodologia apresentada no Capítulo 3. Os resultados não detectaram qualquer traço de proteína no sobrenadante, indicando que não há interferência significativa das partículas nas análises de Bradford.

As partículas poliméricas utilizadas durante o processo de imobilização foram filtradas e colocadas em contato com uma solução de L-asparaginase nas condições ótimas das reações enzimáticas; ou seja, temperatura de 37 °C e solução tampão tris/HCL no pH 8,6 e a 50 mM. Amostras retiradas em tempos pré-determinados foram analisadas para avaliar a produção de amônia e a possibilidade da existência de enzimas nas superfícies da partícula. O teste não mostrou qualquer produção significativa de amônia, indicando que a reação enzimática não estava ocorrendo de forma significativa e reforçando a ideia de que a suportação não foi efetiva.

A atividade enzimática do sobrenadante da solução de L-asparaginase que foi colocada em contato com as partículas poliméricas foi determinada, com a intenção de avaliar se a enzima estava perdendo sua atividade, o que não foi verificado. O sobrenadante mostrou atividade enzimática aproximadamente igual a 12,77 UI, indicando que a presença do polímero não parece afetar a atividade enzimática da L-asparaginase.

Por tudo o que foi descrito, parece possível concluir que não é eficiente carregar as partículas embólicas com L-asparaginase, para combinar o efeito físico da

embolização com o efeito químico do medicamento. No entanto, deseja-se avaliar se os resultados são similares com o uso de outros sistemas proteicos.

6.4 Imobilização de BSA

Como todos os dados obtidos parecem reforçar a ideia de que as partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA são maus suportes para a adsorção de L-asparaginase, testes foram planejados com outras enzimas para verificar de forma mais ampla se esse resultado deve ser estendido a outros sistemas enzimáticos ou se o resultado está mais relacionado à natureza específica da L-asparaginase.

Diante dos resultados discutidos na Seção 6.3 para a L-asparaginase, foram realizadas algumas modificações no processo de imobilização. A temperatura passou a ser controlada de forma mais precisa em todos os experimentos. A agitação usada passou a ser de 300 rpm, para minimizar possíveis problemas de transferência de massa, e o pH foi variado. Outra modificação importante foi a adição de experimentos de controle (sem a presença de polímeros), para avaliar de forma independente os resultados obtidos.

6.4.1 Imobilização de BSA sobre Micropartícula de PVAc

Para avaliar o processo de imobilização de BSA sobre os suportes poliméricos, apenas o método de Bradford foi empregado para avaliar a concentração de proteína, como discutido anteriormente. Os testes preliminares tiveram por finalidade avaliar a capacidade do suporte de adsorver BSA, dados os problemas relacionados ao processo de adsorção, discutidos anteriormente. Os experimentos foram realizados apenas medindo a mudança de concentração de proteína do sobrenadante após 24 horas de contato da solução de BSA com o suporte. Na Figura 6.10 são apresentados resultados de 5 experimentos, utilizando como suporte o PVAc nos pH's de 3,00; 5,00; 6,80 e 8,60. Para a construção desta figura, foram coletadas uma alíquota do sobrenadante no ponto inicial e outra após 24 horas.

Os experimentos para o estudo da adsorção da BSA e Lisozima foram realizados em diferentes pH's como descrito no parágrafo acima e utilizando duas quantidades de adsorventes. O conjunto de experimentos para o PVAc apresentado nas figuras neste trabalho como PVAc-1, PVAc-2, PVAc-3 e PVAc-4, utilizou 1 g de polímero, para o conjunto PVAc-5, PVAc-6, PVAc-7 e PVAc-8, utilizaram-se 2 g de polímero.

Na Figura 6.10 tem-se o ensaio Controle, onde não havia a presença de suportes poliméricos, não sendo esperada qualquer variação da concentração de BSA no sobrenadante. Como pode ser verificado, o experimento de controle mostrou-se variação de 0% de BSA no sobrenadante, como esperado, validando o procedimento de análise. O experimento PVAc foi realizado em pH 3,00, pH 5,00, pH 6,80 e pH 8,60. Pode-se observar que em todos os pH's estudados foram observado um decréscimo da concentração de BSA no sobrenadante. De acordo com a Figura 6.10, pode-se concluir que a maior quantidade de BSA adsorvida ocorreu no pH 5,00. Utilizando a mesma massa de carvão ativado foi observado uma adsorção significativa de BSA.

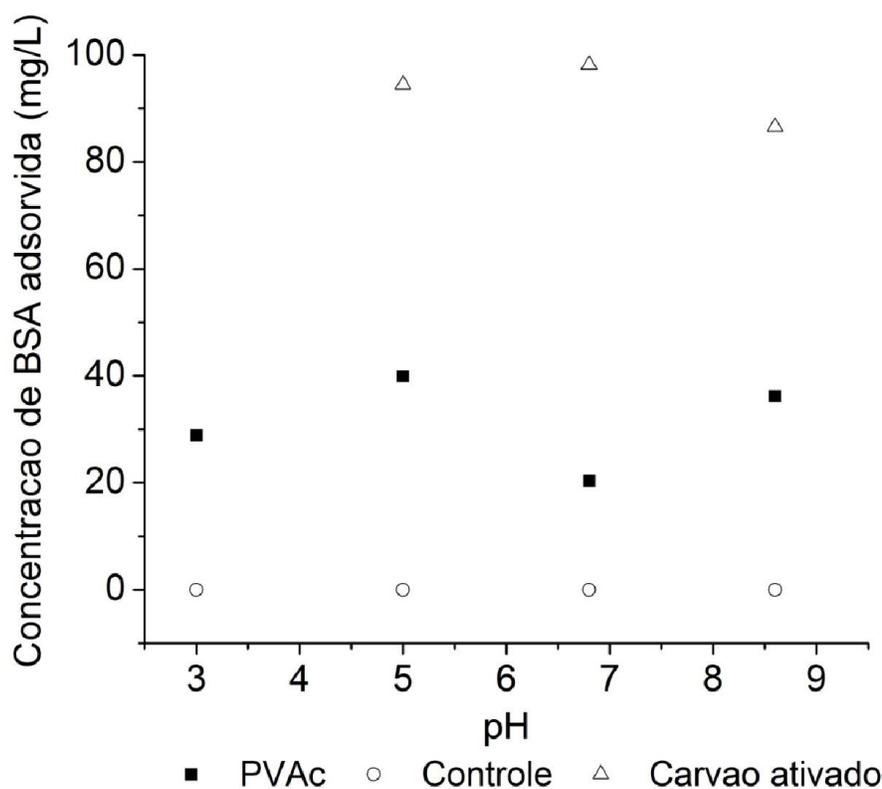


Figura 6. 10: Concentração de BSA no sobrenadante em contato com as partículas de PVAc, em diferentes pH's, na agitação de 300 rpm e temperatura de 30 °C.

Diante dos resultados obtidos, acompanhou-se a cinética de adsorção da BSA sobre o suporte de PVAc. As Figuras 6.11 a 6.14 apresentam as cinéticas da concentração de proteína no sobrenadante em quatro condições estudadas na Figura 6.10. O experimento PVAc-1 pH 3,00 utilizou 1 g de massa de adsorvente. O experimento PVAc-5 utilizou 2 g de adsorvente. Diferentes massas foram usadas para identificar se a disponibilidade de área estava afetando os resultados de forma

apreciável. No caso do experimento Controle-1 a massa de adsorvente era igual a zero. Esse último experimento teve por finalidade verificar a validade do método.

Como pode ser observado na Figura 6.11, o experimento Controle-1 está localizado na parte superior da figura. Com variabilidade de aproximadamente 20%, atribuída ao erro experimental. O experimento controle também mostra que a BSA não adsorve sobre as paredes do tubo falcon, no qual as análises eram conduzidas. Outro fator importante observado é a estabilidade da medida da concentração de proteína durante o processo de adsorção, na temperatura de 30 °C, 250 rpm e no pH considerado. Observa-se que os experimentos denominados PVAc-1 pH 3,0 e PVAc-5 pH 3,00 não mostram decréscimo estatisticamente significativo da quantidade de BSA presente no sobrenadante.

A Figura 6.12 apresenta a cinética da concentração de proteína no sobrenadante no pH 5,00 em três experimentos, sendo que o experimento PVAc-2 pH 5,00 utilizou 1 g de adsorvente e o experimento PVAc-6 utilizou 2 g de adsorvente. No caso do experimento Controle-2, a massa de adsorvente foi igual a zero. Como no caso anterior, esse último experimento teve por finalidade verificar a eficiência do método.

Na Figura 6.12 é possível observar que o processo de adsorção da BSA sobre as partículas de PVAc é lento, mas ocorre. O pH 5,00 é próximo do ponto isoelétrico da proteína BSA, que é de pH 4,70 (LI HU e LIU, 2005). Sabe-se que a carga da proteína é próxima de zero nesta condição e que o suporte, segundo as análises do potencial zeta, apresentadas no Capítulo 5, tem carga negativa. Segundo a literatura, as partículas poliméricas possuem maior potencial para uso como adsorventes no ponto isoelétrico das moléculas biológicas (LI e LIU, 2005). Isso indica que adsorção apreciável de material enzimático pode ocorrer nas proximidades do ponto isoelétrico e após tempos suficientemente longos de contato, o que parece sugerir que o processo de adsorção não é controlado pelas cargas. Além disso, parece claro que o aumento da área de contato favorece o processo de adsorção, como já poderia ser esperado, indicando que a disponibilidade de área é um fator crítico no problema analisado.

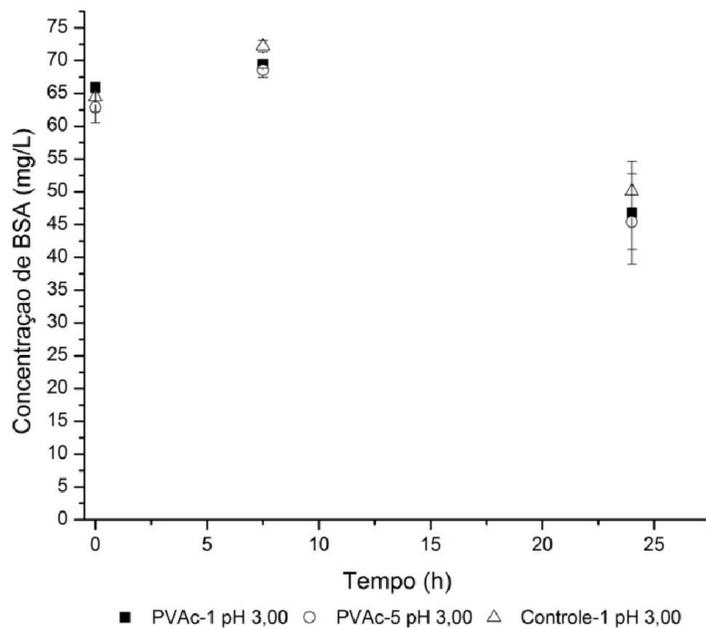


Figura 6. 11: Cinética da concentração da BSA nos sobrenadante em contato com as partículas de PVAc no pH 3,00, na temperatura de 30 °C e 250 rpm.

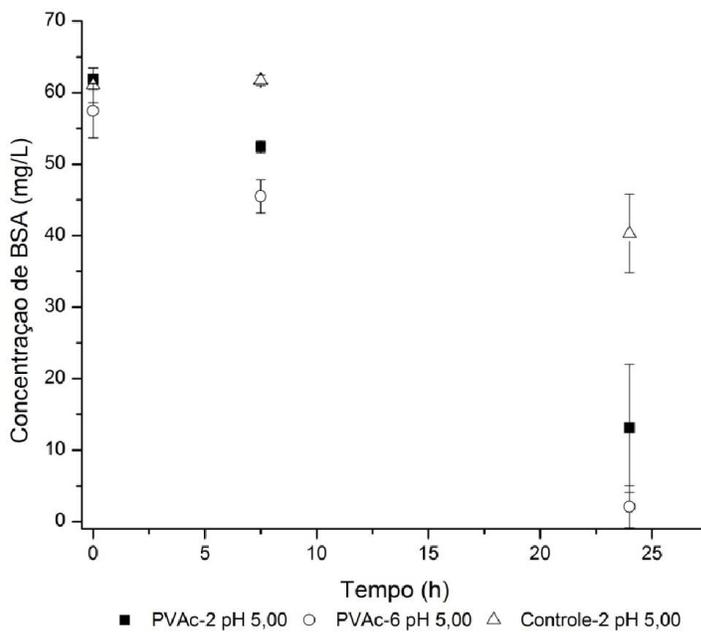


Figura 6. 12: Cinética da concentração da BSA nos sobrenadantes em contato com as partículas de PVAc no pH 5,00, na temperatura de 30°C e 250 rpm.

A Figura 6.13 apresenta a cinética da concentração de proteína do sobrenadante no pH 6,80 em três experimentos, sendo que o experimento PVAc-3 pH 6,80 utilizou 1 g de adsorvente e o experimento PVAc-7 utilizou 2 g de adsorvente. No caso do experimento Controle-3 a massa de adsorvente era igual a zero, como nos casos anteriores.

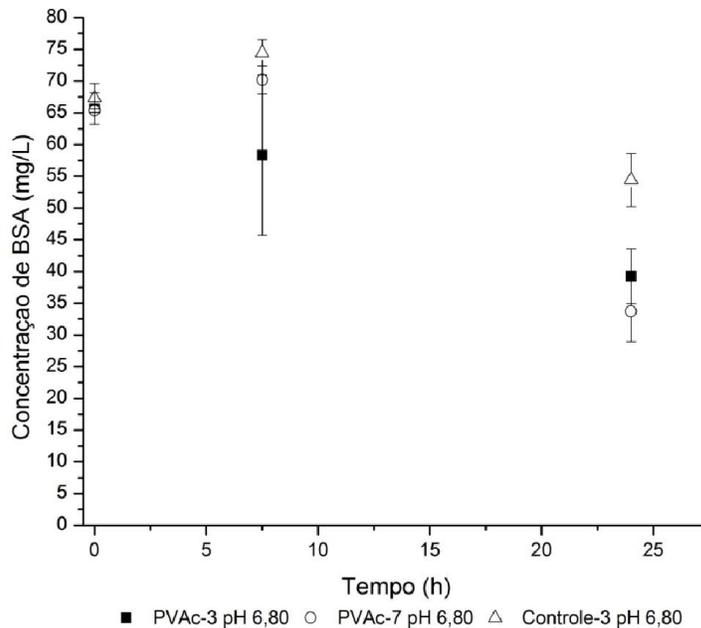


Figura 6. 13: Cinética da concentração da BSA nos sobrenadantes em contato com as partículas de PVAc no pH 6,80, na temperatura de 30°C e 250 rpm.

Observa-se na Figura 6.13 que o resultado do experimento Controle-3 está sempre acima dos demais, como esperado. Nos experimentos PVAc-3 pH 6,80 e PVAc-7 pH 6,80 é possível observar, após 24 h de experimentação, decréscimo apreciável da concentração de BSA no sobrenadante, embora não tão pronunciado como mostrado na Figura 6.12. Os resultados confirmam a valiação feita anteriormente sobre a velocidade do processo de adsorção e a importância da área disponível.

A Figura 6.14 apresenta as cinéticas de concentração de proteína do sobrenadante no pH 8,60 em três experimentos, sendo que o experimento PVAc-4 pH 8,60 utilizou 1 g de adsorvente e o experimento PVAc-8 pH 8,60 utilizou 2 g de adsorvente. No caso do experimento Controle-4 a massa de adsorvente foi igual a zero. Os resultados para o conjunto de experimentos apresentado na Figura 6.14 são diferentes do esperado, já que as medidas do experimento Controle-4 estão entre as dos

dois experimentos em que poderia ocorrer alguma imobilização. Observa-se que os erros para estes experimentos são pequenos, de maneira que pode não estar ocorrendo um processo de adsorção, mas sim de desnaturação da BSA. Pode-se fazer esta afirmação também baseada nos resultados apresentados nas Figuras 6.11, 6.12 e 6.13, já que nos experimentos controle parece ser nítida a ocorrência de desnaturação. Segundo as médias experimentais disponíveis a degradação da BSA atinge cerca de 25%.

Analisando o conjunto dos experimentos nas Figuras 6.11 a 6.14, pode-se afirmar que a imobilização da BSA é verificada de forma significativa nos pH's 5,00 e 6,80. Logo, o fato da proteína estar na proximidade do ponto isoelétrico pode influenciar de forma positiva o processo de adsorção. Como o processo é lento, isso pode explicar os maus resultados obtidos com a L-asparaginase, cujos os ensaios foram realizados em condições distantes do ponto isoelétrico. Mas os resultados parecem indicar que as cargas não exercem fator predominante no processo de adsorção, como apontado na literatura para suportes orgânicos (LEE *et al.*, 2005).

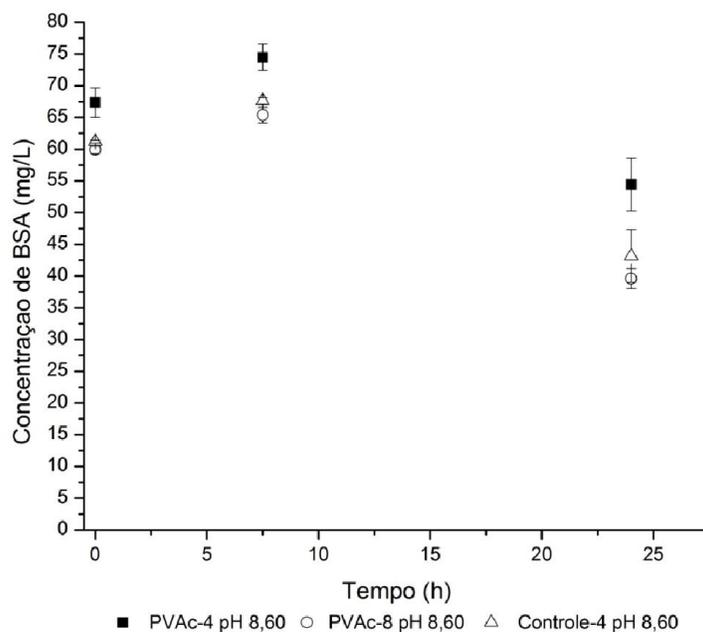


Figura 6. 14: Cinética da concentração da BSA nos sobrenadantes em contato com as partículas de PVAc no pH 8,60, na temperatura de 30°C e 250 rpm.

Baseado nos resultados das Figuras 6.12 e 6.13, foram realizados novos ensaios cinéticos para o processo de imobilização, na condição de pH 5,00 e 6,80. Para estes experimentos, também foram realizados experimentos de controle. As Figuras 6.15 e

6.16 mostram as cinéticas das concentrações de BSA no sobrenadante nos pHs iguais a 5,00 e 6,80, respectivamente. É nítido uma vez mais que todas as concentrações de proteína nos sobrenadantes dos experimentos de controle são maiores que nos experimentos feitos na presença do material adsorvente. Além disso, pode-se observar que existe uma queda consistente na concentração de proteínas do sobrenadante no experimento realizado na presença de suporte, embora esta diminuição seja muito mais pronunciada no experimento realizado no pH 5,00 que no experimento realizado no pH 6,80. Portanto, parece claro que existe um processo de adsorção de BSA ocorrendo sobre as micropartículas de PVAc, em particular no pH 5,00. A queda da concentração de BSA nos experimentos de controle é provavelmente devida a alguma degradação que a proteína sofre durante a execução do experimento. Outro fato que deve ser observado é a grande variabilidade dos resultados e a baixa velocidade do processo. Os novos resultados, portanto, confirmam os resultados anteriores.

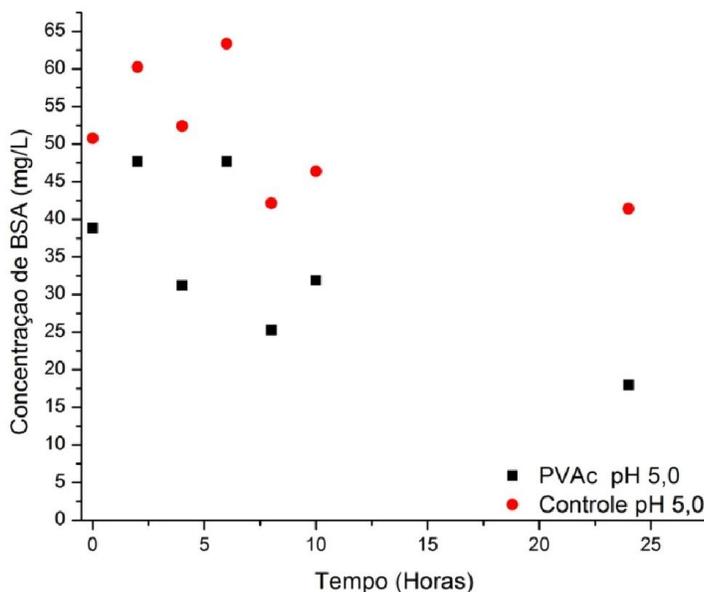


Figura 6. 15: Cinética da concentração de BSA nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc no pH 5,00, temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

A quantidade de proteína imobilizada no material adsorvente no pH 5,00 foi igual a 0,7 mg de BSA por g de PVAc. Baseado nas contas aproximadas feitas na Seção 6.3.1, 70% de enzima disponível foi imobilizada, ocupando uma área de 0,007 m². Considerando a massa de 1 g de polímero, essa área é compatível com partículas com

diâmetro de 1 mm, aparentemente muito grande, mas com ordem de grandeza similar ao diâmetro médio das partículas (cerca de 300 μm , como visto no Capítulo 5). Dessa forma, segundo os cálculos efetuados, parece razoável admitir uma vez mais que a disponibilidade de área afete o processo de imobilização da BSA..

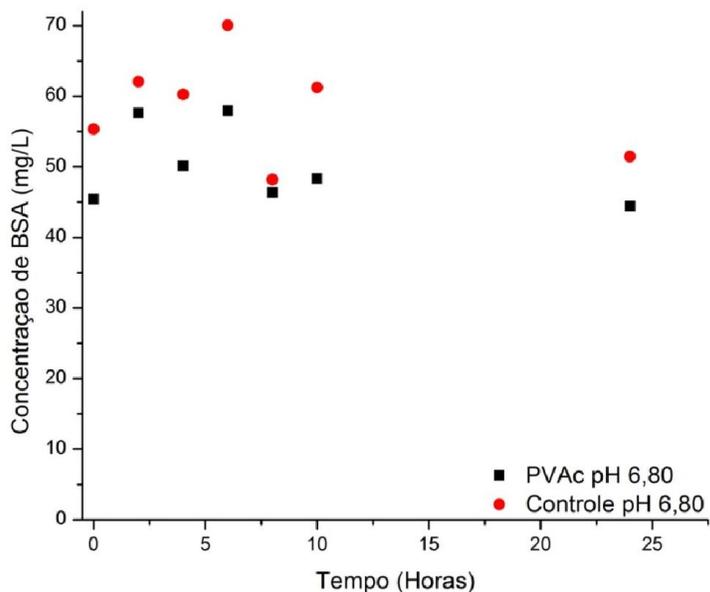


Figura 6. 16: Cinética da concentração de BSA nos sobrenadantes em contato com as partículas de PVAc no pH 6,80, temperatura de 30°C e agitação de 250 rpm.

A Tabela 6. 4 apresenta um resumo das quantidades adsorvidas de BSA nas micropartículas de PVAc. Na primeira coluna da tabela foram colocado as quantidades de adsorventes utilizado em cada experimento. Na segunda coluna tem-se o pH em que o experimento foi mantido. Por ultimo temos as quantidades adsorvidas. Observa-se que o maior valor alcançado foi para o pH 5,0 e 6,8. Nos outros pH's não foram verificado adsorção de BSA, porém com 2 g de micropartículas de PVAc e no pH 8,6 é possível observar uma queda de BSA no sobrenadante. No entanto, este valor pode ser observado devido a erros experimentais.

Tabela 6. 4: Adsorção de BSA em micropartículas de PVAc.

Massa de adsorvente (g)	pH	Quantidade adsorvida (mg/g de polímero)
1	3,0	Não verificado
	5,0	0,45
	6,8	0,26
	8,6	Não verificado
2	3,0	Não verificado
	5,0	0,30
	6,8	0,32
	8,6	0,105

6.4.2 Imobilização de BSA sobre Micropartículas de PVAc e o Efeito da Temperatura

Este efeito já foi estudado para a L-asparaginase no começo deste capítulo e não foi verificada qualquer diferença significativa nas quantidades adsorvidas. Com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura sobre o processo de adsorção da BSA, experimentos foram realizados na temperatura de 10 °C. A Figura 6.17 mostra a cinética de imobilização de BSA a 10 °C em pH's diferentes. No conjunto de experimentos PVAc-1 a PVAc-4 foi utilizado 1 g de adsorvente, enquanto os experimentos PVAc-5 a PVAc-8 foram realizados com 2 g de PVAc, para avaliar o efeito de disponibilidade de área. De acordo com a Figura 6.17, não é possível admitir que ocorreu imobilização significativa de BSA em qualquer dos casos avaliados. Os valores medidos estão dentro da variabilidade do erro experimental, sendo possível concluir que na condição estudada a temperatura influencia de forma negativa o processo de imobilização de BSA. A temperatura de transição vítrea (Tg) do PVAc é aproximadamente igual a 42 °C, como mostrado no Capítulo 5. Sabe-se que próximo a essa temperatura as cadeias poliméricas possuem maior mobilidade. Em temperatura menores que a Tg, a partícula torna-se mais

rígida. Acredita-se que o aumento da temperatura favorece a movimentação das cadeias poliméricas e possibilita a interação mais efetiva das cadeias de polímero com as moléculas de BSA. Assim, na temperatura de 10 °C a mobilidade das cadeias poliméricas é baixa e o processo de adsorção da proteína fica comprometido.

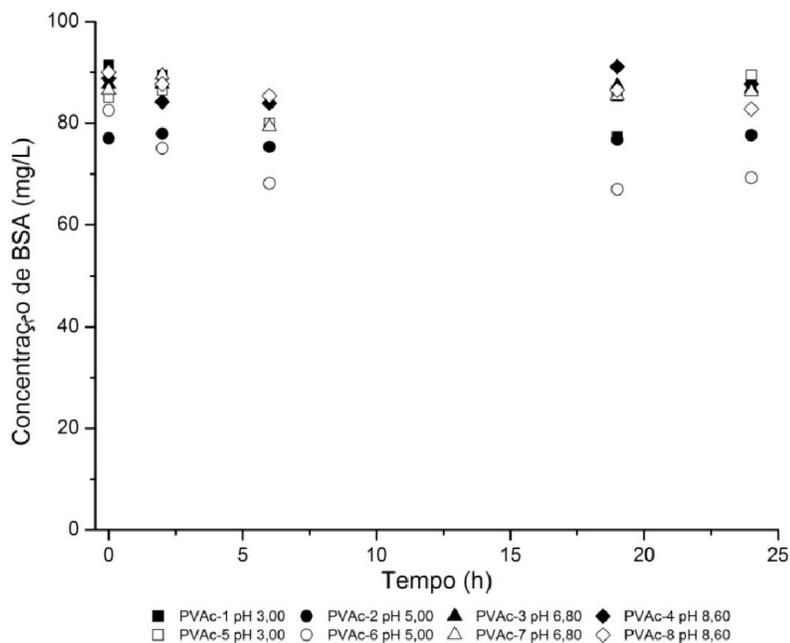


Figura 6. 17: Cinética da concentração de BSA nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc, na temperatura de 10°C e agitação de 250 rpm, em diferentes pH's.

Estudos realizados por BUDHLALL e TRONGSATIKUL (2013) mostram que a adsorção de BSA aumenta com a temperatura em suporte de poliestireno (PS). Segundo os pesquisadores, este fenômeno ocorre porque o aumento da temperatura favorece a interação com a superfície das partículas de PS.

KISS (1993) também estudou a adsorção de BSA em poli(óxido de etileno). O pesquisador também observou que o aumento da temperatura ocasionava aumento da taxa de adsorção de BSA. Segundo o autor, o efeito da temperatura sobre o processo de adsorção de proteínas é devido a muitos fenômenos complexos. KISS (1993) afirmou que o aumento da taxa de adsorção ocorria entre 55-65 °C devido ao desdobraimento da BSA.

UDDIN *et al.* (2006) também estudaram a influência da temperatura na adsorção de BSA em derivados de poli(acrilamida). Os pesquisadores observaram o aumento da taxa de adsorção de BSA ao aumentar a temperatura. Segundo os pesquisadores, a

superfície do polímero, que é hidrofóbica, passava a ser hidrofílica com o aumento de temperaturas.

Os dados obtidos são portanto, corroborados por dados de sistemas similares reportados na literatura. Os dados parecem indicar que fatores associados à mobilidade e conformação geométrica das espécies químicas envolvidas controlam o processo de adsorção

6.4.3 Imobilização de BSA sobre Micropartículas de PVAc-co-PMMA

A Figura 6.18 mostra os resultados preliminares de adsorção de BSA sobre micropartículas de PVAc-co-PMMA postas em contato com a solução de BSA por 24 h em diferentes pH's. Os pHs dos experimentos são respectivamente 3,00, 5,00, 6,80 e 8,60. Como é possível observar, no pH igual a 3,00 foi observada variação expressiva de concentração de proteína, e que variação menos expressivas foram observadas nas outras condições. O experimento controle não foi verificado variação da concentração de proteína significativo. No entanto, os experimentos usando carvão ativado como suporte a concentração de proteína no sobrenadante após 24 h foi de quase zero.

O estudo realizado com as micropartículas de PVAc foi repetido com o PVAc-co-PMMA nos pH's 3,00; 5,00; 6,80 e 8,60. Nos experimentos PVAc-co-PMMA-1 a PVAc-co-PMMA-4 foram empregados 1 g de adsorventes, enquanto nos experimentos PVAc-co-PMMA-5 a PVAc-co-PMMA-8 foram empregados 2 g de adsorventes. As condições de imobilização foram similares às anteriores, com agitação de 300 rpm e temperatura de 30 °C durante 24 horas. Os resultados estão apresentados na Figura 6.19.

Pode-se afirmar novamente que a imobilização de BSA é favorecida nos pH's iguais a 5,00 e 6,80. Também pode ser observado que a cinética de imobilização é mais rápida nas partículas de PVAc-co-PMMA nos pH's iguais a 5,00 e 6,80 do que observado para as partículas de PVAc. Como é possível observar, em menos de 20 horas a imobilização já era completa nas micropartículas de PVAc-co-PMMA. É nítido também na Figura 6.19 que as concentrações de proteína nos experimentos PVAc-co-PMMA 1 a PVAc-co-PMMA 4 são superiores as do conjunto de experimentos PVAc-co-PMMA 5 a PVAc-co-PMMA 8, já que estes foram realizados com maior quantidade de material adsorvente, fornecendo dessa maneira uma maior área para a imobilização da proteína. Portanto, os resultados podem ser considerados similares aos anteriores,

embora a presença do monômero MMA parece favorecer o processo de adsorção.

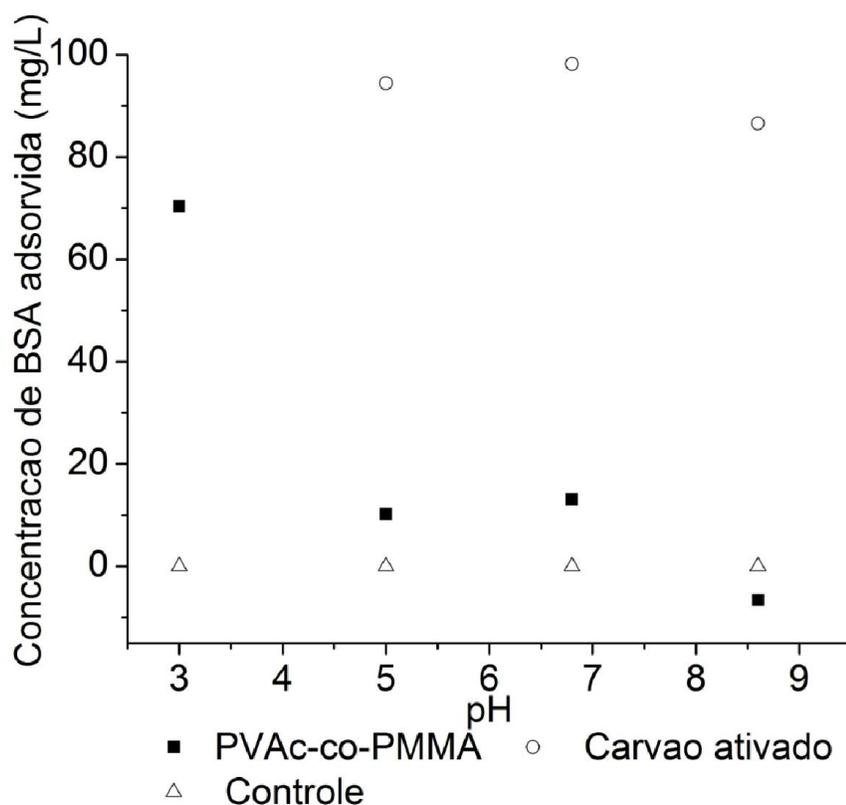


Figura 6. 18: Concentração de BSA no sobrenadante em contato com as partículas de PVAc-co-PMMA, em diferentes condições de pH's, na agitação de 250 rpm e temperatura de 30 °C.

A imobilização da BSA nos pH's iguais a 3,00 e 8,60 só foi observada de forma estatisticamente significativa quando se utilizaram 2 g de material adsorvente. Assim pode-se afirmar que a adsorção de BSA nos pH's 3,00 e 8,60, utilizando como adsorvente as partículas PVAc-co-PMMA, ocorre de forma desprezível nas condições estudadas.

PEIXOTO (2013) estudou a funcionalização de partículas de PMMA produzidas em miniemulsão para avaliar a influência dos grupos funcionais sobre o processo de adsorção de BSA. Em seus estudos, PEIXOTO (2013) demonstrou que os grupos funcionais presentes na superfície e os tipos de iniciador utilizados na reação de polimerização influenciaram na quantidade de proteína imobilizada. No entanto, seus resultados conduzem à conclusão de que o processo de adsorção da BSA com partículas de PMMA funcionalizadas ocorre através de interação hidrofóbicas, o que explica os

melhores resultados obtidos na presença do MMA, já que essas partículas são mais hidrofóbicas, como mostrado no Capítulo 5.

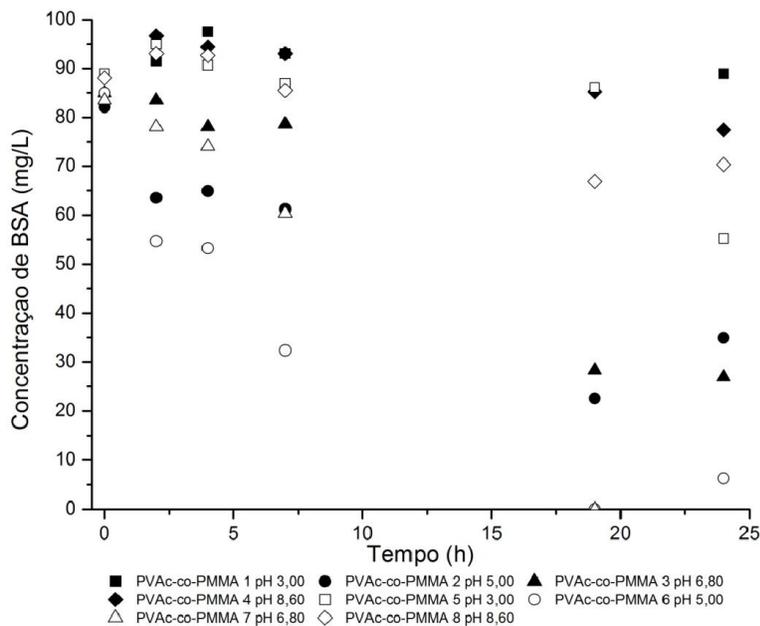


Figura 6. 19: Cinética de concentração de BSA nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc-co-PMMA a 30 °C e 250 rpm, em diferentes pH's como função do tempo.

A BSA é normalmente descrita como uma enzima flexível, porque ela tende a mudar sua conformação durante o processo de adsorção, orientando as cargas de forma a favorecer a interação com o substrato. Segundo LI e LIU (2005) esta flexibilidade de conformação é melhor estabelecida no ponto isoelétrico, o que também ajuda a explicar os resultados obtidos.

A Tabela 6. 5 apresenta um resumo das condições em que os experimentos de adsorção foram realizados e os resultados obtidos. Pode-se observar que o melhor resultado é encontrado para o pH 5,0 e 6,8. Como observado para as micropartículas de PVAc. No pH 3,00 não foi possível observar adsorção de proteína de forma significativa.

Tabela 6. 5: Adsorção de BSA em micropartículas de PVAc-co-PMMA.

Massa de adsorvente (g)	pH	Quantidade adsorvida (mg/g de polímero)
1	3,0	Não verificado
	5,0	0,9
	6,8	0,64
	8,6	0,11
2	3,0	0,18
	5,0	0,46
	6,8	0,46
	8,6	0,09

6.5 Estudo da Imobilização de Lisozima

Nesta seção é feito o estudo do processo de imobilização da lisozima sobre as micropartículas de PVAc e PVAc-co-PMMA. Para avaliar a eficiência do processo de adsorção da enzima, foram aplicados dois métodos de análises: a medida da atividade enzimática (mais sensível do que a medida da concentração de proteína pelo método de Bradford) e o método de Bradford (também utilizado para avaliar os processos de adsorção de L-asparaginase e de BSA).

6.5.1 Análise da Atividade Enzimática da Lisozima em Função do pH

Um experimento preliminar foi realizado para avaliar a atividade do reagente adquirido. Uma solução de lisozima, com aproximadamente 400 unidades de atividade.mL⁻¹ foi preparada. A Figura 6.20 mostra a atividade enzimática para o consumo do substrato de *micrococcus* nos pH's iguais a 3,00; 5,00, 6,80; 8,60 e 10,80. Na Figura 6.20 é possível observar que as melhores atividades enzimáticas são obtidas nas condições de pH neutro ou ácido, pois a lisozima possui uma boa estabilidade nas

condições ácidas (MAKKI e DURANCE, 1996). Já nos pH's alcalinos, pode-se observar que ocorre uma queda da atividade enzimática. Este resultado é reforçado pelos dados apresentados por CHEN e CHEN (1997).

6.5.2 Efeito do Acetato de Vinila sobre a Atividade Enzimática da Lisozima

Como realizado na Seção 6.2, o efeito da concentração de acetato de vinila sobre a atividade da lisozima também foi estudado. As soluções de lisozima foram preparadas na concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$. As misturas com diferentes concentrações de VAc foram preparadas com 0, 1, 5, 10, 25, 50, e 100% de VAc (v/v) em relação ao tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ M}$ pH 6,80. Como o acetato de vinila (VAc) é pouco solúvel em água, as misturas são heterogêneas, na forma de dispersões, com fase aquosa saturada com VAc.

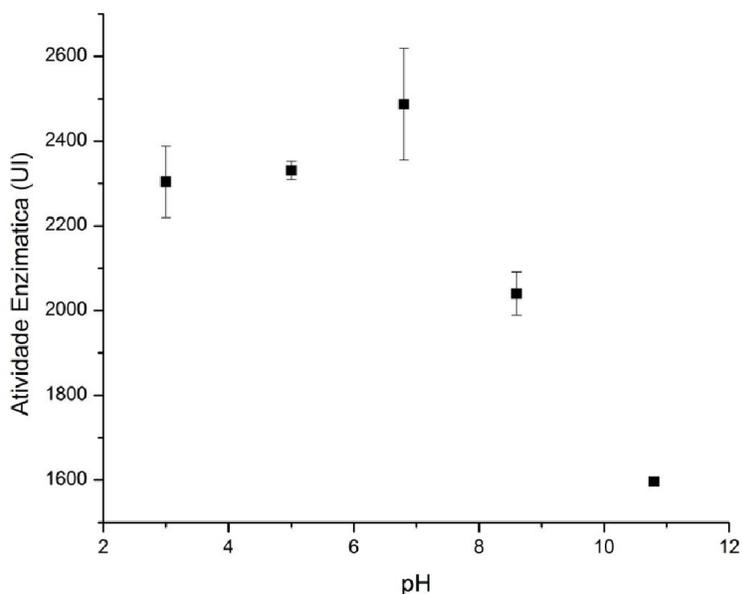


Figura 6. 20: Atividade enzimática da lisozima como função do pH em solução de fosfato de sódio $0,05 \text{ M}$, na temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

O efeito do VAc sobre a atividade da lisozima é apresentado na Figura 6.21. Ao contrário do que aconteceu com a L-asparaginase, a lisozima não só manteve a atividade enzimática na presença de VAc como é possível observar acréscimo na atividade na presença de VAc. No entanto, é necessário chamar a atenção do leitor para o fato de que é observada a formação de emulsão durante a medida de atividade enzimática. O sistema de medida da atividade enzimática é formado por $2,5 \text{ mL}$ de solução de

micrococcus em solução aquosa de tampão fosfato em pH 6,22 e 100 μ L da solução de lisozima, com a presença de acetato de vinila em diferentes frações. Como o VAc é pouco solúvel em água (cerca de 1% m/m; BRANDRUP, 1998), ao realizar a agitação da cubeta era observada a formação de gotas de VAc em meio aquoso. Neste momento, a absorvância pode variar de forma muito rápida. Observou-se que, quanto maior era a quantidade de fase orgânica, mais rápida era a variação da absorvância. Dessa forma, os resultados de atividade enzimática podem ser afetados por esse efeito, resultando em maior variabilidade, como mostrado na Figura 6.21. No entanto, até cerca 25% de VAc no meio que contém lisozima esta interferência ocorre de forma desprezível e os erros experimentais são pequenos permitindo concluir que a presença de VAc é benéfica à enzima.

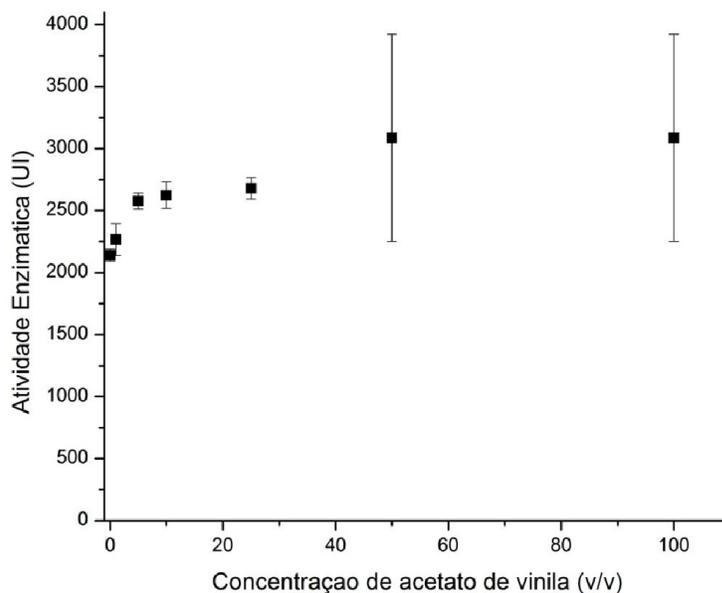


Figura 6. 21: Efeito da concentração de acetato de vinila sobre a atividade da lisozima, na temperatura de 25 °C.

Vários estudos indicam que a presença de uma fase orgânica pode ser benéfica ao desempenho enzimático, por conta de fatores geométricos e conformacionais, como aqueles associados ao inchamento de molécula e a maior exposição do sítio ativo (OGINO e DOUKYU, 2010; KUMAR *et al.*, 2013). Isso pode explicar o efeito benéfico do VAc sobre a atividade, efeito esse que é reportado aqui pela primeira vez.

6.5.3 Imobilização de Lisozima sobre as Micropartículas de PVAc

Foram feitos experimentos para avaliar o processo de imobilização de lisozima sobre as micropartículas de PVAc. Inicialmente foram preparadas soluções de lisozima nos tampões com pH 3,00; 5,00; 6,80; 8,60 e 10,80. O tampão com pH 10,80 foi utilizado para avaliar a adsorção da enzima nas proximidades do ponto isoelétrico, que está entre 10,50 a 11,00 (SCAMAN *et al.*, 2005). A solução de lisozima era preparada na concentração de 0,08 g.L⁻¹. As partículas poliméricas eram então colocadas em contato com 10 mL dessa solução, com 32000 unidades de atividades. Inicialmente o processo de imobilização foi analisado em três tempos pré-fixados. Dois conjuntos de experimentos foram utilizados para avaliar a o processo de adsorção. O primeiro conjunto de experimentos denominados PVAc-1, PVAc-2, PVAc-3, PVAc-4 e PVAc-5 com 1 g de polímero e o segundo conjunto denominado PVAc-6, PVAc-7, PVAc-8, PVAc-9 e PVAc-10 com 2 g de material adsorvente. As Figuras 6.22, 6.23, 6.24, 6.25 e 6.26 apresentam as concentrações de proteína nos sobrenadantes, medidas pelo método de Bradford.

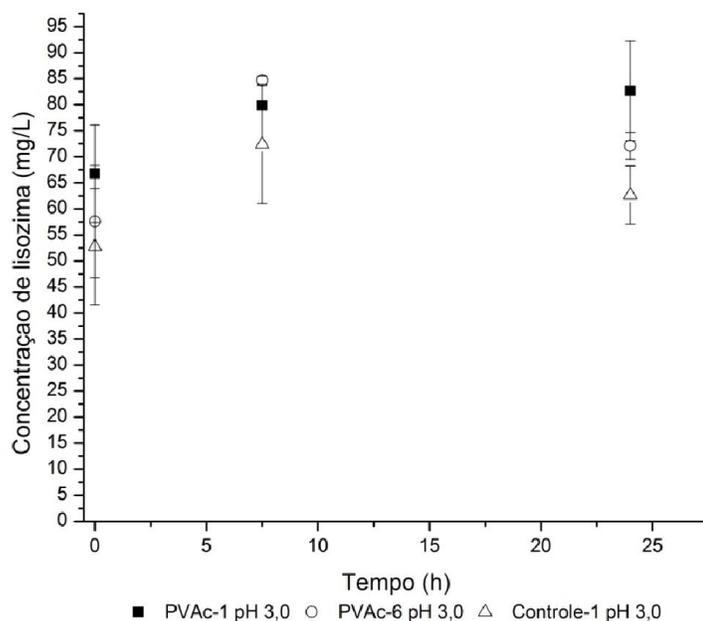


Figura 6. 22: Cinética de concentração de lisozima nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc, no pH 3,00, na temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

Pode-se observar que nos experimentos representados nas Figuras 6.22, 6.23 e 6.24 não há evidência de processo de adsorção de lisozima. Observa-se que a

desnaturação não é tampouco verificada, conforme evidenciado para a adsorção de BSA, o que está em acordo com a literatura, pois é sabido que a Lisozima é uma enzima com boa estabilidade (MAKKI e DURANCE, 1996). Esses resultados estão de acordo com os resultados relatados para BSA, já que as maiores taxas de adsorção foram observadas nas proximidades do ponto isoelétrico.

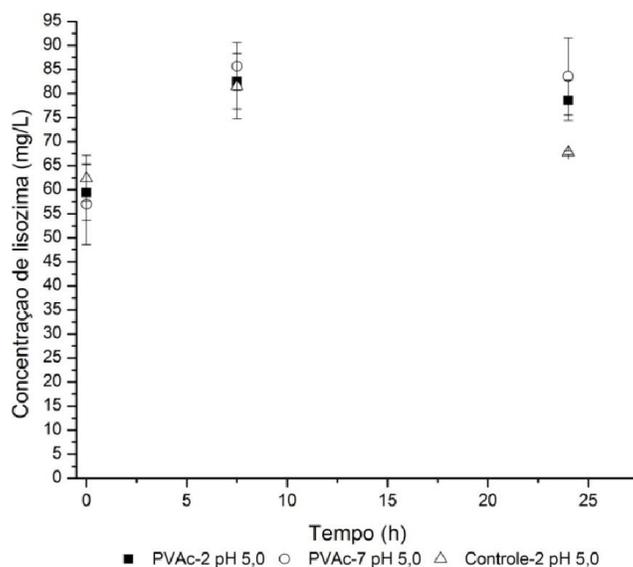


Figura 6. 23: Cinética da concentração de lisozima nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc, no pH 5,00, na temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

No entanto, é nítida a redução de massa de proteína nos experimentos de controle Controle-4 e Controle-5, conduzido nos pHs 8,60 e 10,80, respectivamente. Dessa forma, é possível que nas condições de 30 °C e 250 rpm a lisozima sofra um processo de desnaturação. A desnaturação é total no pH 10,80. Assim, nos experimentos PVAc-5 pH 10,80 e PVAc-10 pH 10,80, que apresentam uma queda da massa de proteína no sobrenadante na Figura 6.26, pode ser que esteja ocorrendo apenas a desnaturação da enzima. No entanto, é curioso observar que ocorre uma inversão de comportamento na presença de partículas, que causam aumento de concentração de proteína no sobrenadante.

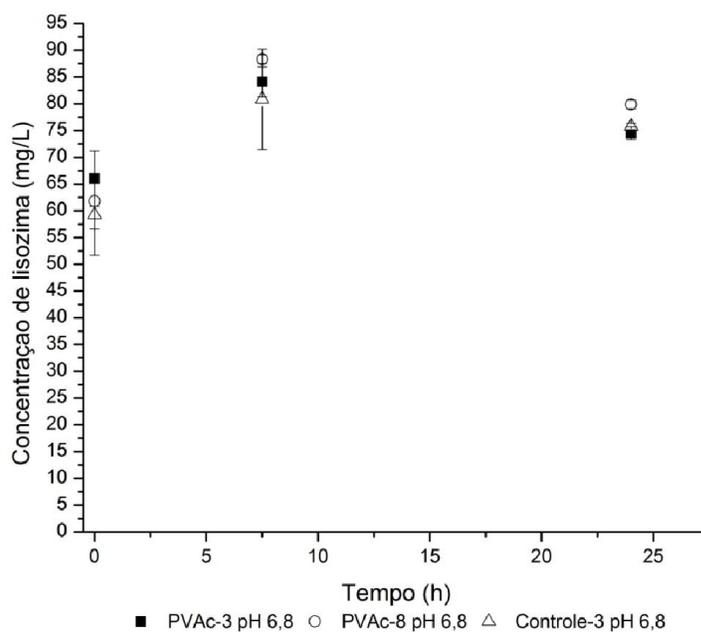


Figura 6. 24: Cinética da concentração de lisozima nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc, no pH 6,80, na temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

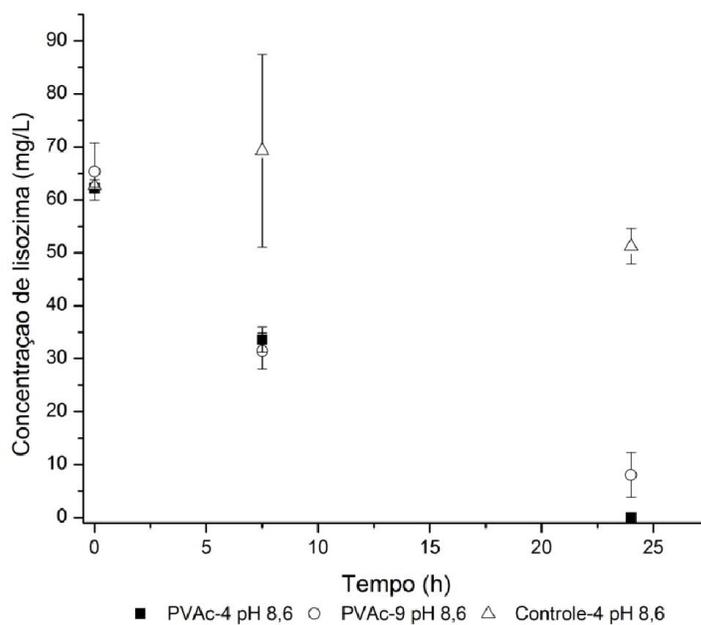


Figura 6. 25: Cinética da concentração de lisozima nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc, no pH 8,60, na temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

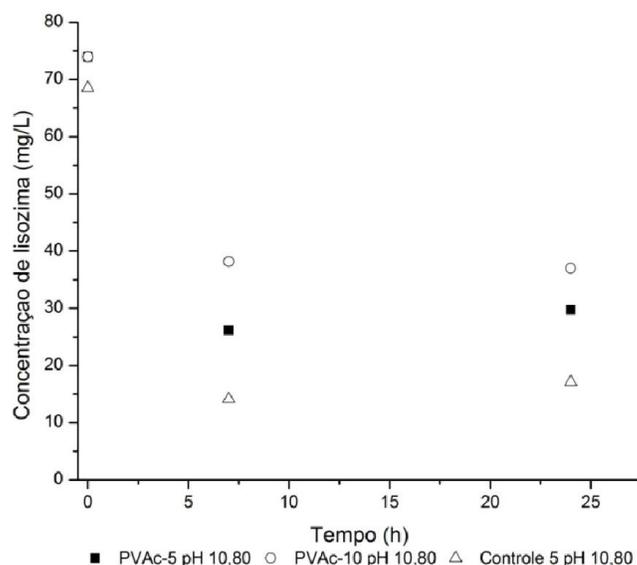


Figura 6. 26: Cinética da concentração de lisozima nos sobrenadantes em contato com partículas de PVAc, no pH 10,80, na temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

Os únicos experimentos em que se pode afirmar que ocorreu um processo de adsorção de lisozima são aqueles apresentados na Figura 6.25. Como pode ser observado, mesmo ocorrendo a desnaturação da lisozima em aproximadamente 25%, os experimentos conduzidos na presença de adsorventes resultaram em maior decréscimo de concentração de proteína. Não parece ser coincidência ser esse ponto mais próximo do ponto isoelétrico da enzima.

Como as análises de concentração de proteína no sobrenadante apresentam uma variabilidade muito grande, mediu-se também a atividade enzimática do sobrenadante nos mesmos tempos utilizados para avaliar a massa de proteína presente no sobrenadante. As Figuras 6.27, 6.28, 6.29, 6.30 e 6.31 representam as análises de atividade enzimática medidas ao longo do tempo. Pode-se observar na Figura 6.31 que é nítido que todas os experimentos realizados em tampão carbonato no pH 10,80 e força molar de 0,05M, na temperatura de 30 °C por 24 horas, resultaram em um processo de desnaturação da enzima, comprovando os dados presentes na Figura 6.26. O processo de desnaturação pode ser observado já nas primeiras horas para o conjunto de três experimentos apresentados na Figura 6.31.

Os experimentos controles, Controle-1, Controle-2 e Controle-3, encontram-se sempre na parte superior, o que era esperado, já que não havia material adsorvente nos tubos de falcon. Já nos experimentos Controle-4 e Controle-5, é possível ver um

decréscimo de atividade enzimática, reforçando a ideia que a atividade da lisozima é reduzida em soluções alcalinas, devido ao processo de desnaturação.

Em relação aos respectivos controles, no experimento conduzido em tampão pH 3,00 foi observada a diminuição de atividade do sobrenadante em contato com as partículas de PVAc, como mostrado na Figura 6.27. Essa tendência foi observada para os experimentos realizados em pH 5,00 e 6,80 também, como mostrado nas Figuras 6.28 e 6.29 respectivamente, sendo ainda mais pronunciada no pH 8,60, como mostrado na Figura 5.30. Logo, é possível afirmar que a adsorção de lisozima ocorre de forma significativa, embora lenta, em pH 8,60, mesmo sendo observado um processo de desnaturação enzimática.

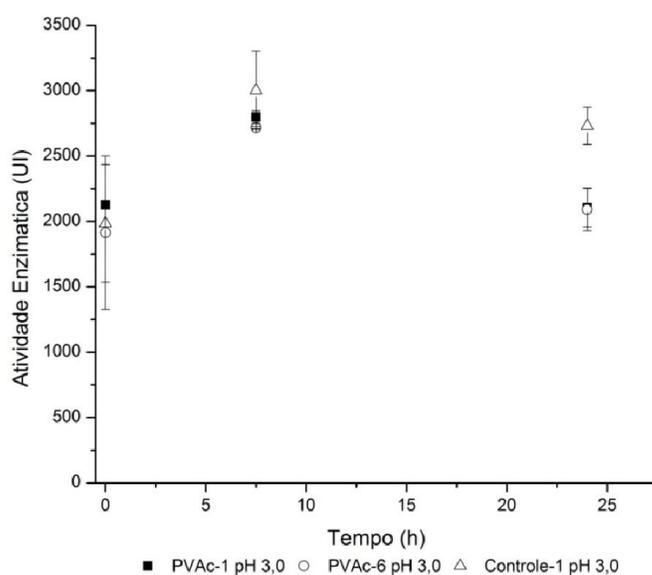


Figura 6. 27: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc, no pH 3,00, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

Observa-se com auxílio dos resultados obtidos que a adsorção da lisozima ao suporte de PVAc ocorre principalmente na região mais próxima do ponto isoelétrico. Esta conclusão é reforçada quando se observa que nos pHs 3,00; 5,00 e 6,80, em que a enzima possui carga positiva e o suporte apresenta carga negativa, não foi observada de forma significativa a adsorção de proteína, sendo possível descartar a hipótese de que o processo de adsorção ocorra através de efeito eletrostático, como discutido na literatura para suportes orgânicos (LEE *et al.*, 2005).

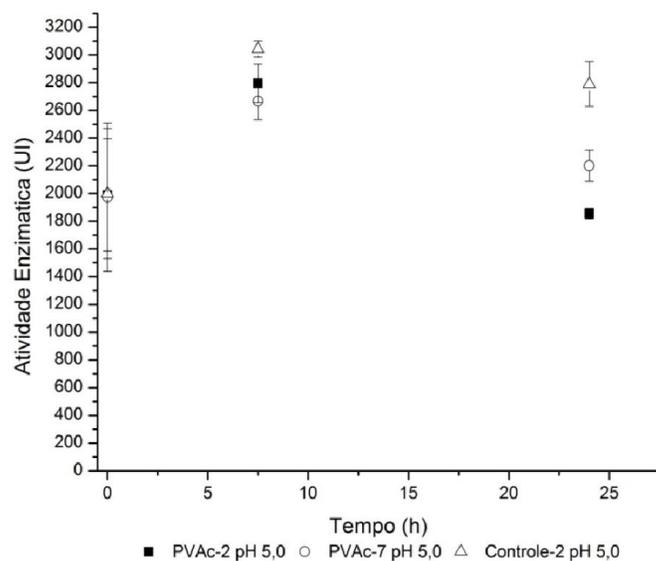


Figura 6. 28: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc, no pH 5,00, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

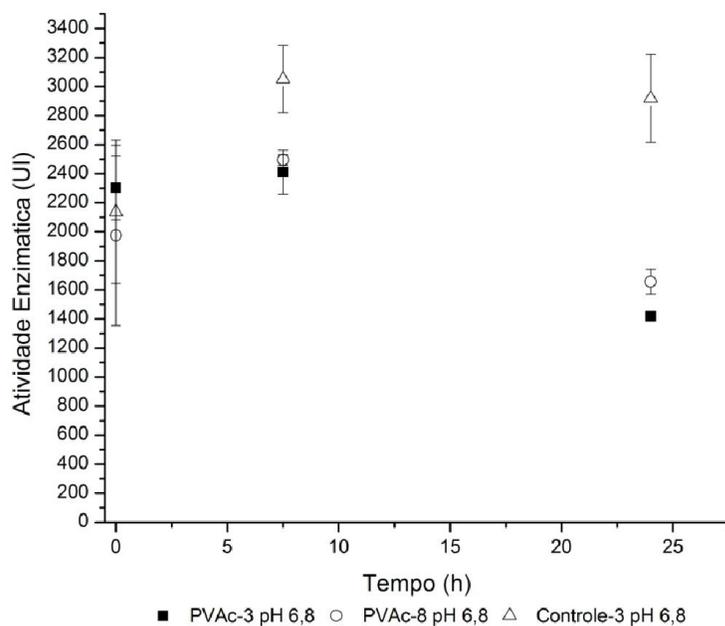


Figura 6. 29: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc, no pH 6,80, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

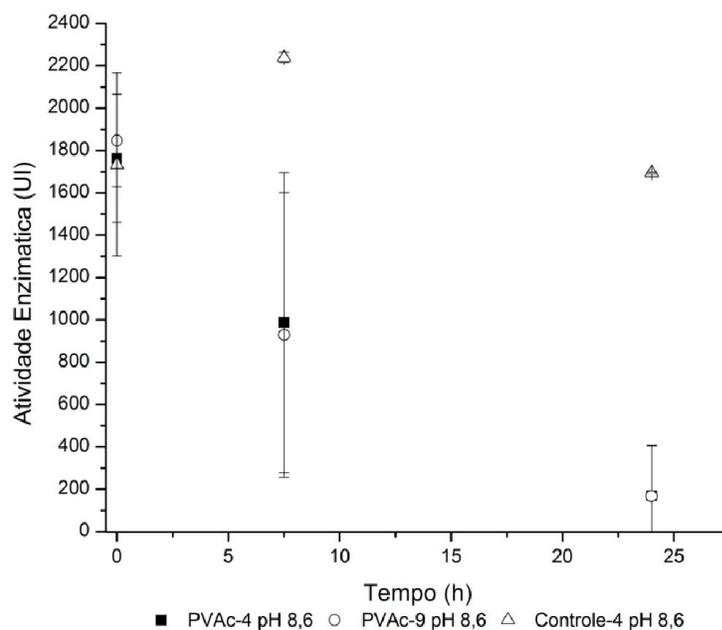


Figura 6. 30: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc, no pH 8,60, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

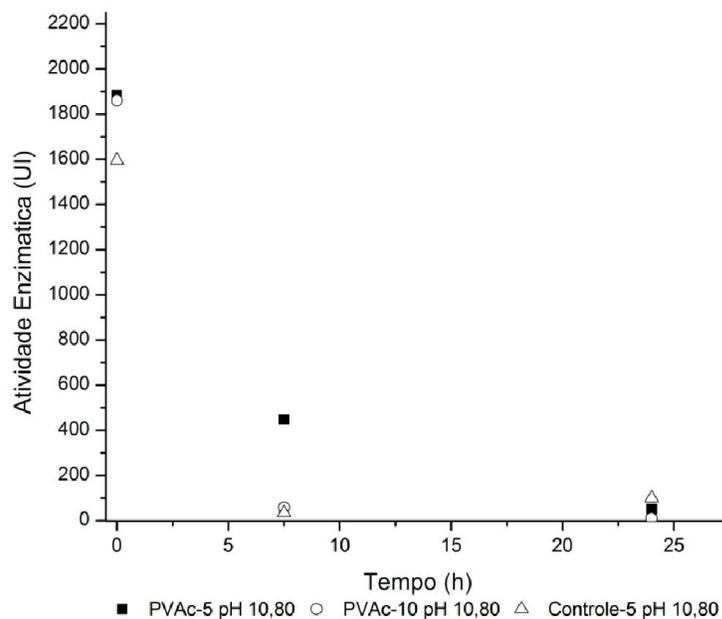


Figura 6. 31: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc, no pH 10,80, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

A Tabela 6. 6 apresenta o resumo da adsorção de lisozima em micropartículas de PVAc. Pode-se afirmar pelos experimentos estudados que o pH 8,6 é o único que é possível observar o decréscimo de lisozima no sobrenadante de forma significativa.

Tabela 6. 6: Adsorção de lisozima em micropartículas de PVAc.

Massa de adsorvente (g)	pH	Quantidade adsorvida (mg/g de polímero)
1	3,0	Não verificado
	5,0	Não verificado
	6,8	Não verificado
	8,6	0,6 e 0,8
	10,8	Não verificado
2	3,0	Não verificado
	5,0	Não verificado
	6,8	Não verificado
	8,6	0,32
	10,8	Não verificado

6.5.4 Imobilização de Lisozima em Suporte de PVAc-co-PMMA

O mesmo estudo realizado para caracterizar a imobilização de lisozima sobre as micropartículas de PVAc foi realizado com o suporte de PVAc-co-PMMA. Estes experimentos não foram realizados na condição de pH 10,80, já que foi observada a desnaturação da proteína nessa condição. Durante a realização destes experimentos, foram realizadas análises de proteína presente no sobrenadante pelo método de Bradford, como discutido nos casos anteriores. Dois conjuntos de experimentos foram utilizados para avaliar a o processo de adsorção. O primeiro conjunto de experimentos denominados PVAc-co-PMMA-1, PVAc-co-PMMA-2, PVAc-co-PMMA-3, PVAc-co-PMMA 4 e PVAc-co-PMMA-5 com 1 g de polímero e o segundo conjunto denominado

PVAc-co-PMMA-6, PVAc-co-PMMA-7, PVAc-co-PMMA-8, PVAc-co-PMMA-9 e PVAc-co-PMMA-10 com 2 g de material adsorvente. As Figuras 6.32, 6.33, 6.34 e 6.35 apresentam os dados dos experimentos de imobilização de lisozima sobre os suportes de PVAc-co-PMMA. Como é possível observar, existe grande variabilidade dos dados.

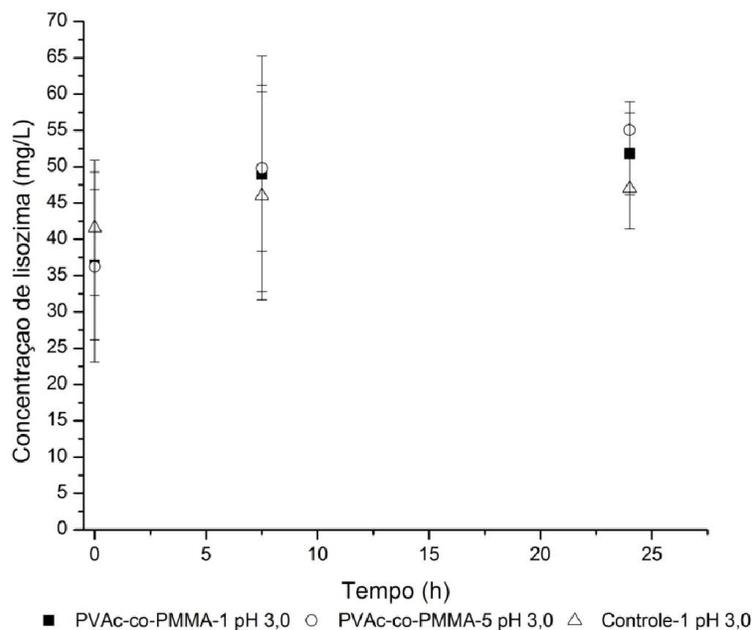


Figura 6. 32: Cinética da concentração de lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 3,0, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

Os experimentos representados pelas Figuras 6.32, 6.33 e 6.34 mostram que é impossível concluir que haja alguma imobilização de lisozima sobre o suporte de PVAc-co-PMMA nos pHs mais baixos, como observado também na seção anterior, quando foram usadas partículas de PVAc. Se alguma adsorção de lisozima ocorreu nesses experimentos, esta quantidade está abaixo do limite de detecção do método de Bradford.

O único experimento em que se pode concluir que ocorreu adsorção de lisozima é aquele representado na a Figura 6.35. Nesta figura é possível observar o decréscimo de concentração de massa de proteína no sobrenadante nas análises que possuem adsorventes. Os resultados são muito similares aos apresentados na Figura 6.25, de maneira que é possível afirmar que o uso do monômero de MMA não parece afetar de forma significativa o processo de adsorção de lisozima.

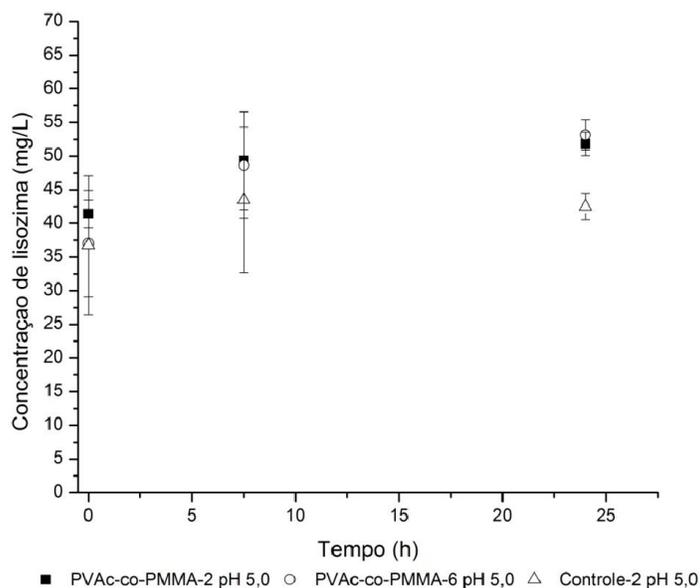


Figura 6. 33: Cinética da concentração de lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 5,0, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

Nas Figuras 6.36, 6.37, 6.38 e 6.39 são apresentados os resultados da atividade enzimática do sobrenadante em relação ao tempo para o suporte de PVAc-co-PMMA. É nítido em todos os casos que ocorre um decréscimo de atividade em todos os experimentos, incluindo o conjunto de experimentos de controle. Parece que existe um processo de desativação da lisozima durante o experimento, mais acentuado no pH 8,60. No entanto, mesmo com a ocorrência de desnaturação pode-se observar que os experimentos realizados na presença de material adsorvente, a queda de atividade observada foi maior. Observa-se maior decréscimo para os experimentos realizados em pH 6,80 e 8,60, mostrados nas Figuras 6.38 e 6.39, respectivamente, reforçando dessa forma os resultados e conclusões apresentadas nas seções anteriores. A Figura 6.39 mostra que a melhor condição dentro das estudadas para imobilização da lisozima em suporte de PVAc-co-PMMA é a de pH 8,60. Verifica-se que a desnaturação da enzima pode atingir cerca de 40% nestas condições.

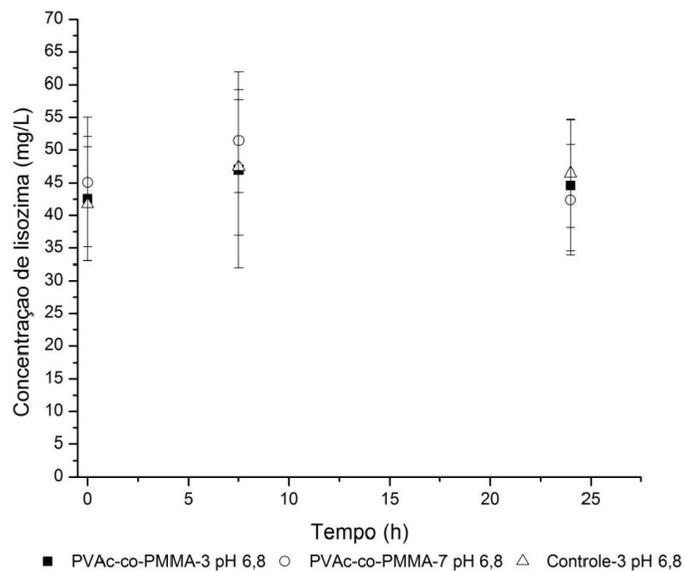


Figura 6. 34: Cinética da concentração de lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 6,8, a temperatura de 30°C e agitação de 250 rpm.

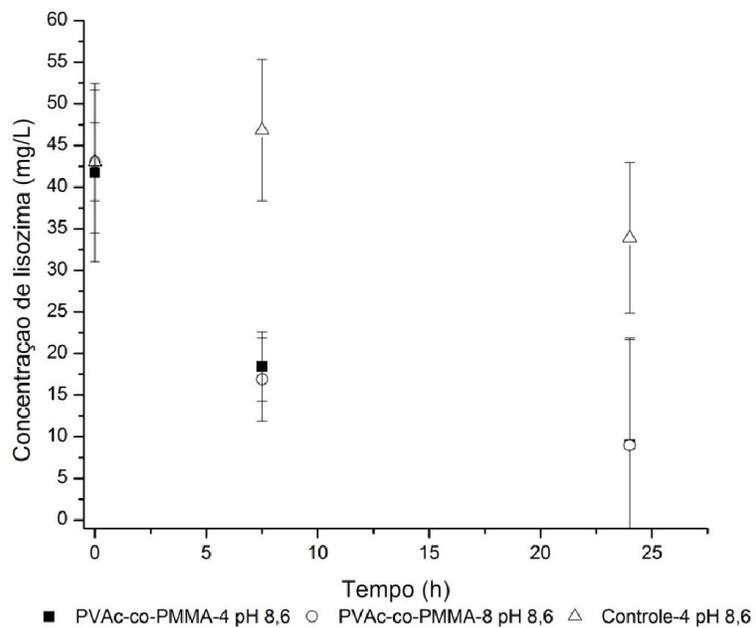


Figura 6. 35: Cinética da concentração de lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 8,6, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

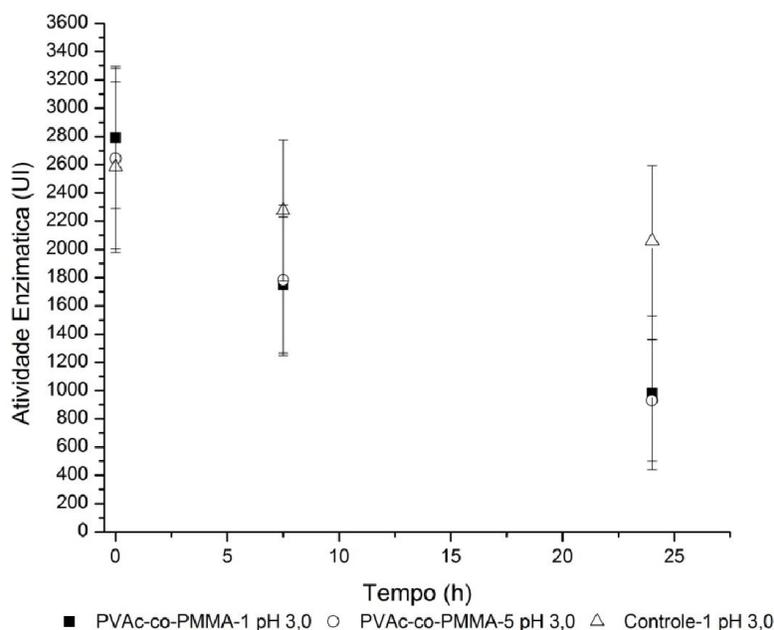


Figura 6. 36: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 3,0 a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

Como pode ser observado durante a discussão sobre a adsorção de BSA e lisozima sobre partículas poliméricas de PVAc e PVAc-co-PMMA, as análises de Bradford resultam em grande variabilidade, não sendo eficaz para observar adsorção de proteína quando o gradiente de concentração de moléculas imobilizadas é menor do que $0,02 \text{ g.L}^{-1}$, limite inferior de detecção do método (BRADFORD, 1976). O método de Bradford também possui o inconveniente de fazer uso de uma solução de Bradford, que possui baixa estabilidade. Mesmo realizando a filtração todas as vezes em que o método era utilizado e reconstruindo a curva de calibração, o método de Bradford pode resultar em difícil controle, somente sendo eficiente para grandes variações de proteínas adsorvidas, como verificado no pH 5,00 para a BSA e 8,60 para a lisozima. Para a lisozima, como a atividade enzimática constitui um método de detecção mais sensível, foi possível observar queda sutil de atividade durante o processo de imobilização, pois a medida da atividade enzimática é muito mais precisa do que o método de Bradford.

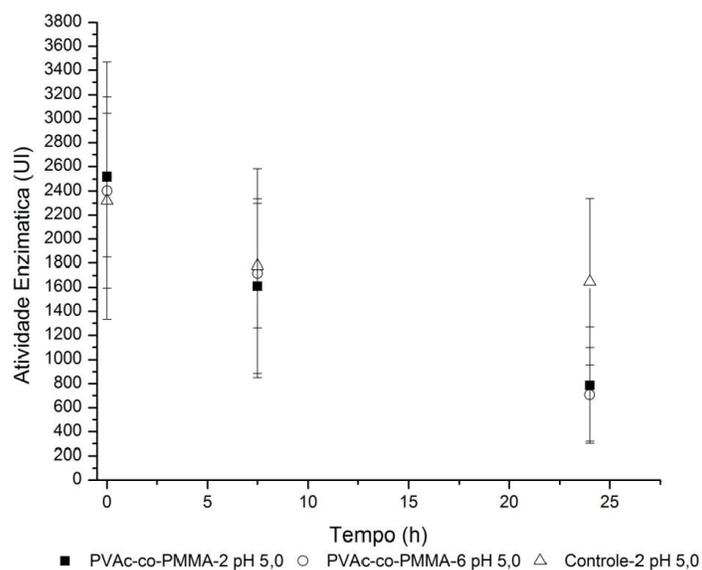


Figura 6. 37: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 5,0, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

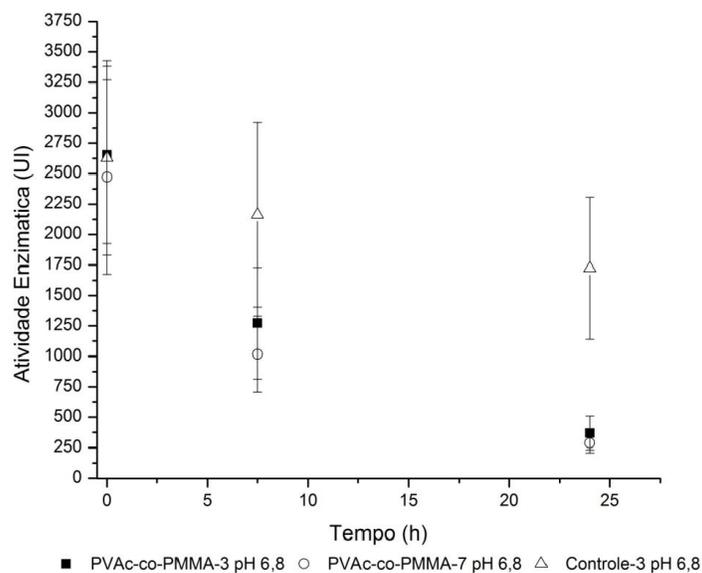


Figura 6. 38: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 6,8, a temperatura de 30°C e agitação de 250 rpm.

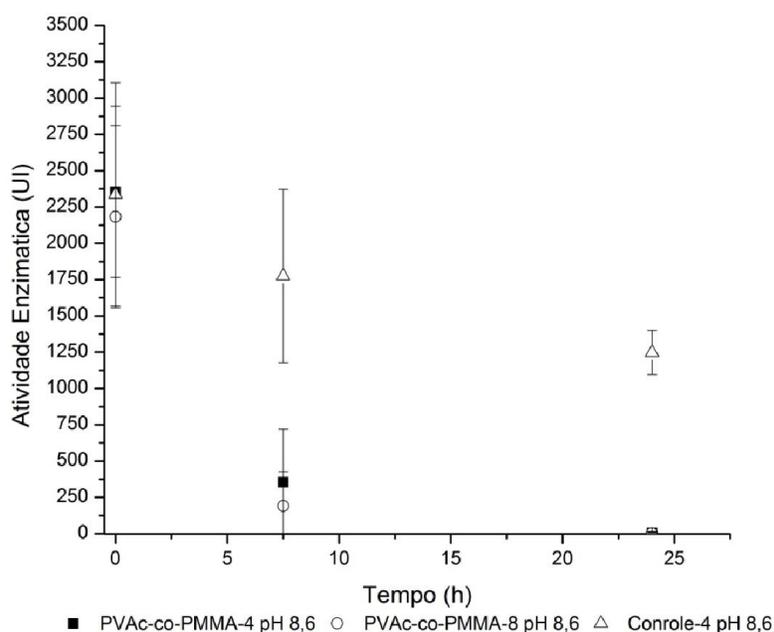


Figura 6. 39: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, no pH 8,6, a temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm.

Tabela 6. 7: Adsorção de lisozima em micropartículas de PVAc-co-PMMA.

Massa de adsorvente (g)	pH	Quantidade adsorvida (mg/g de polímero)
1	3,0	Não verificado
	5,0	Não verificado
	6,8	Não verificado
	8,6	0,32 e 0,6
2	3,0	Não verificado
	5,0	Não verificado
	6,8	Não verificado
	8,6	0,16

Com os experimentos realizados até aqui, vê-se claramente que a adsorção das biomoléculas estudadas é fortemente influenciada por seus respectivos pontos isoelétricos. O tipo de superfície parece afetar mais a taxa de adsorção, que é sempre lenta. Os resultados sugerem que as interações hidrofóbicas controlam o processo de adsorção.

Por último tem-se a Tabela 6.7 com o resumo das condições e os resultados dos experimentos para a adsorção de lisozima utilizando micropartículas de PVAc-co-PMMA. A única condição observada adsorção de lisozima, foi para o pH 8,6. Repetindo a mesma condição para as micropartículas de PVAc.

6.5.5 Imobilização de BSA e Lisozima em Partículas Poliméricas Produzidas por Polimerização em Miniemulsão

Como pode ser observado, a imobilização de BSA e lisozima sobre as micropartículas poliméricas produzidas por polimerização em suspensão ocorre de forma lenta e limitada, sendo mais pronunciada nos pH's próximos aos pontos isoelétricos. As medidas de área específica por BET (PEIXOTO,2007) e os cálculos realizados mostraram que as áreas específicas dessas partículas são muito pequenas, em comparação com as áreas específicas de adsorventes comerciais. Na literatura científica é reportado que uma das limitações da aplicação de polímeros como materiais adsorventes é a pequena área específica (OUCHI e OHYA, 2006).

Para avaliar se a área específica limita o processo de adsorção das moléculas estudadas, foram produzidas partículas poliméricas com tamanhos menores, através da reação de polimerização em miniemulsão. O processo foi descrito no na Seção 3.7 do Capítulo 3. As partículas obtidas possuem tamanhos médios de 127,7 nm, sendo possível estimar a área específica de $35 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, já que a área específica das partículas em miniemulsão não foram medidas por BET, porque o polímero obtido está presente em forma de látex. Quando o solvente da reação de emulsão é evaporado, as partículas de PVAc se aglomeram, formando um filme. Dessa forma, o estudo de imobilização de BSA e lisozima sobre as partículas de PVAc produzidas em emulsão foram realizadas sem o processo de acondicionamento ou separação do solvente das partículas de polímeros.

É bom lembrar que o diluente utilizado durante o processo de polimerização em emulsão era a água. Contudo, no sobrenadante do látex é possível encontrar monômeros não reagidos, agente surfactantes e iniciador, o que pode influenciar o processo de

adsorção das biomoléculas. Além disso, não deve ser esquecido o uso do hexadecano como co-surfactante no meio reacional.

Na Seção 5.5.2 foi mostrado que a enzima lisozima não perde a atividade em contato com o monômero de acetato de vinila. Neste caso, a presença de monômeros residuais não deve influenciar a atividade enzimática até uma concentração de 25% em massa de VAc, como já discutido. No caso das partículas produzidas por polimerização em suspensão, as quantidades de PVAc ou PVAc-co-PMMA usadas durante o processo de adsorção eram de 100 ou 200 g.L⁻¹. Para as partículas produzidas por polimerização em emulsão, foi fixada a concentração de 40 g.L⁻¹.

O fato de não ser utilizada a mesma concentração nos dois casos estudados é porque, no processo de adsorção com partículas produzidas em suspensão, a separação das partículas era feita com facilidade. No caso das partículas produzidas por polimerização em miniemulsão, o processo de separação não foi alcançando com filtros millipore de 0,22 µm, porque as partículas produzidas tinham diâmetro médio menor do que os poros dos filtros. Para alcançar a separação do sobrenadante e das nanopartículas, as alíquotas eram centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos. Era observada alguma separação, porém o processo não se mostrava eficiente a ponto de deixar o sobrenadante transparente. Assim, para diminuir o possível efeito interferente das partículas nos métodos espectrométricos, a concentração de partículas durante a adsorção foi de 40 g.L⁻¹.

O pH do meio reacional era outro fator difícil de controlar. O pH da emulsão de polímero era de 3,70. Devido aos resultados obtidos anteriormente para a imobilização da BSA e lisozima sobre os suportes poliméricos, foram utilizadas as seguintes condições de imobilização: partículas de PVAc em emulsão, na temperatura de 30°C e agitação de 250 rpm, no tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 5,00 para a molécula de BSA e pH 8,60 para a lisozima. As demais condições foram mantidas constantes.

Os experimentos conduzidos com BSA eram difíceis de ser analisados com auxílio de método espectrofotométrico, pois mesmo após a filtração em membranas millipore de 0,22 µm de celulose e a centrifugação, a suspensão ainda apresentava aspecto turvo. Outro fator verificado foi o tingimento das partículas presente nas alíquotas, de azul. Dessa forma, os experimentos que se mostraram mais vantajosos foram os que utilizaram a atividade enzimática como método de avaliar o processo de adsorção.



(a) (b)

Figura 6. 40: Coagulação da emulsão de PVAc com a solução de lisozima em pH 8,60. (a) emulsão de PVAc e (b) emulsão de PVAc em solução de lisozima 0,1 g.L⁻¹.

A presença de lisozima na emulsão de PVAc produziu um efeito curioso de coagulação das partículas de polímeros, como mostrado na Figura 6.40. Para comprovar esta hipótese, foi adicionada a mesma quantidade de tampão fosfato pH 8,60 sem a presença de lisozima, para verificar se o efeito de coagulação poderia ser atribuído ao fosfato. Porém, como pode ser visto na Figura 6.41, a solução de fosfato apenas diluiu a emulsão de PVAc. Assim, pode-se concluir que a coagulação da emulsão ocorre devido à presença de lisozima. Isso mostra que a enzima de fato interage com o suporte. Para a realização destes testes foram utilizados 5 mL da emulsão de PVAc e 5 mL da solução de lisozima 0,1 g.L⁻¹, ou 5 mL da solução tampão fosfato 0,05 M e pH 8,60. Outros testes foram realizados utilizando BSA no pH 5,00 e 8,60; contudo, como pode ser observado nas Figuras 6.42 e 6.43, não foi verificado o processo de coagulação. O aumento da concentração de BSA para 1 g.L⁻¹ também provoca a coagulação da emulsão de PVAc. Assim, o processo de coagulação do látex de PVAc depende da concentração de biomoléculas, o que parece ser resultado das interações da proteína com o látex. Esses resultados são muito curiosos e aparentemente nunca foram descritos na literatura.



(a) (b)

Figura 6. 41: Coagulação da emulsão de PVAc com a solução tampão fosfato em pH 8,60.

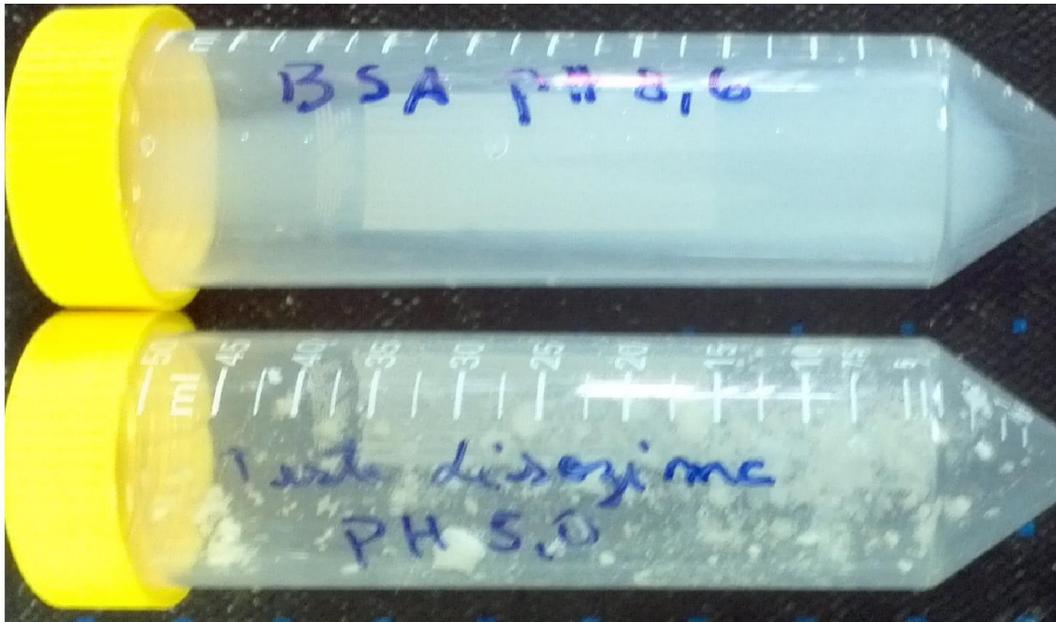


Figura 6. 42: Coagulação do látex de PVAc com a solução tampão fosfato 0,05 M no pH8,60, com a concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de BSA, e solução tampão fosfato 0,05 M no pH 5,00, com concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de lisozima.

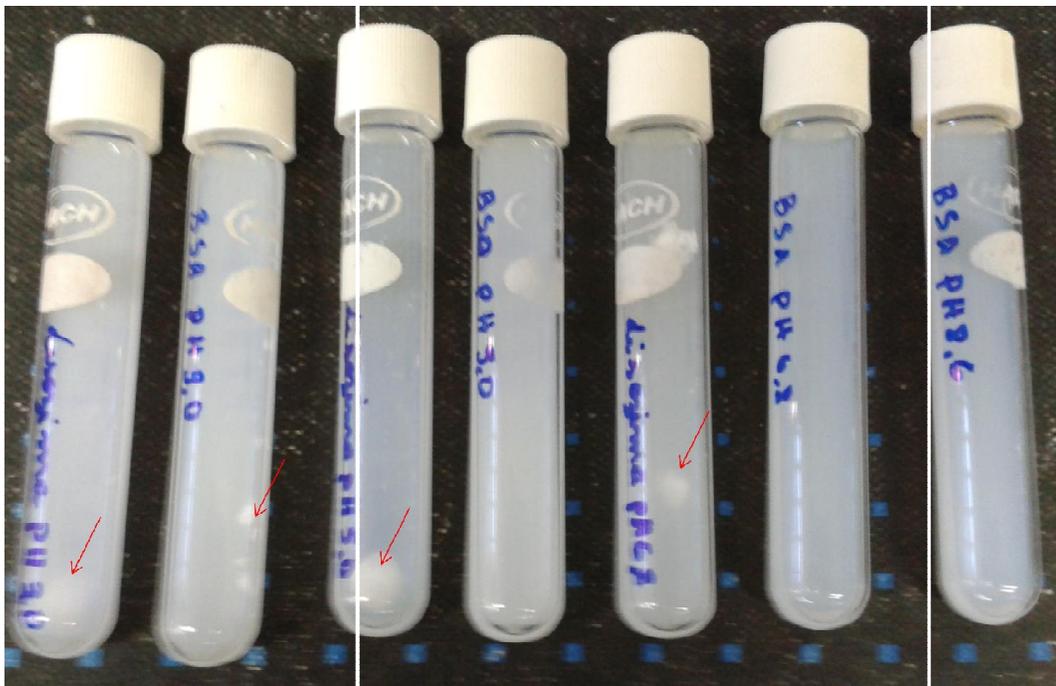


Figura 6. 43: Coagulação da emulsão de PVAc com a solução tampão fosfato em diferentes pHs com a concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de BSA ou de lisozima.

Pode-se observar na Figura 6.43 que todas as soluções de lisozima nos diferentes pHs formaram aglomerados quando em contato com o látex polimérico, como indicado pelas flechas em vermelho. Já para a BSA, foi observada a formação de grumos paenas no pH 3,00. Como já observado, no entanto, acredita-se que o aumento da concentração de BSA pode influenciar o processo de coagulação como evidenciado para a lisozima.

A Figura 6.44 mostra a concentração de enzima adsorvida pelo látex (obtido por diferença em relação ao sobrenadante) como função da concentração de enzima em equilíbrio. A medida era realizada imediatamente após a mistura do látex a solução enzimática. Como pode ser observado na Figura 6.44 o processo de imobilização ocorre de forma muito rápida nas partículas de PVAc produzidas por polimerização em miniemulsão, alcançando um patamar quando a concentração inicial de lisozima é de 4 g.L⁻¹.

O experimento foi mantido por 24 horas na temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm. Novas alíquotas foram retiradas e uma nova isoterma foi levantada. A Figura 6.45 apresenta a isoterma após 24 h de contato do látex de PVAc com a solução de lisozima. Pode-se verificar que a solução com concentração inicial de 1 g.L⁻¹ de lisozima é completamente imobilizada no primeiro instante em que a solução entra em contato com a emulsão de PVAc, não sendo necessário um tempo longo para que o processo de adsorção se complete. Vê-se que o processo ocorre de forma rápida, ao contrário do que foi observado anteriormente com as micropartículas poliméricas, mostrando que a disponibilidade de área é fundamental para a compreensão dos resultados obtidos.

A Figura 6.46 mostra as atividades enzimáticas nos sobrenadantes. Observa-se na Figura 6.46 o mesmo comportamento observado na adsorção apresentada na Figura 6.45. Isso reforça a significância dos resultados obtidos.

Diante dos resultados obtidos, resta-nos saber se a enzima adsorvida sobre o suporte possui alguma atividade. Para realizar este experimento, as partículas de polímero foram filtradas em papel de filtro, gramatura 80. As partículas foram deixadas sobre a bancada para secar. Após uma hora, as partículas foram armazenadas em tubos Eppendorfs e guardados em geladeira. Na avaliação da atividade enzimática, foram pesados 100 mg das partículas e colocadas em contato com 10 mL de uma solução de *micrococcus*. Esse sistema era mantido a 25 °C e alíquotas do sobrenadante eram retiradas em tempos pre-determinados. Pode-se observar que as enzimas imobilizadas possuem atividade. A atividade enzimática encontrada foi de 51,5 UI. Embora ativa, a

atividade parece ter sido bastante afetada pelo processo de imobilização. Nos dois experimentos mostrados na Figura 6.47, foi observado um atraso de cerca de 10 minutos para identificar diminuição da absorbância. Somente após este tempo é que a reação enzimática começava a ocorrer, talvez limitada por um processo de dessorção ou de um mecanismo de transferência de massa mais complexo entre substrato e enzima.

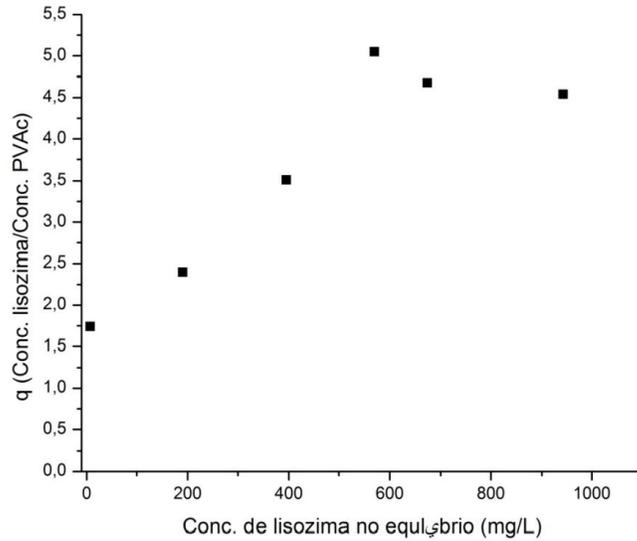


Figura 6. 44: Isoterma de adsorção de lisozima no tempo inicial.

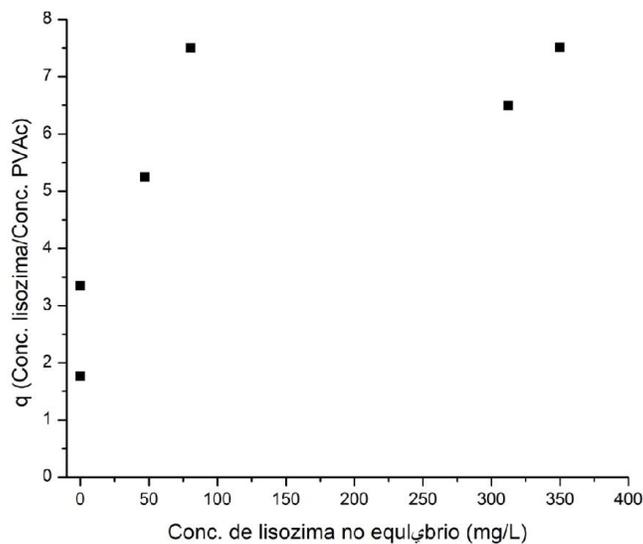


Figura 6. 45: Isoterma de adsorção de lisozima após 24 horas.

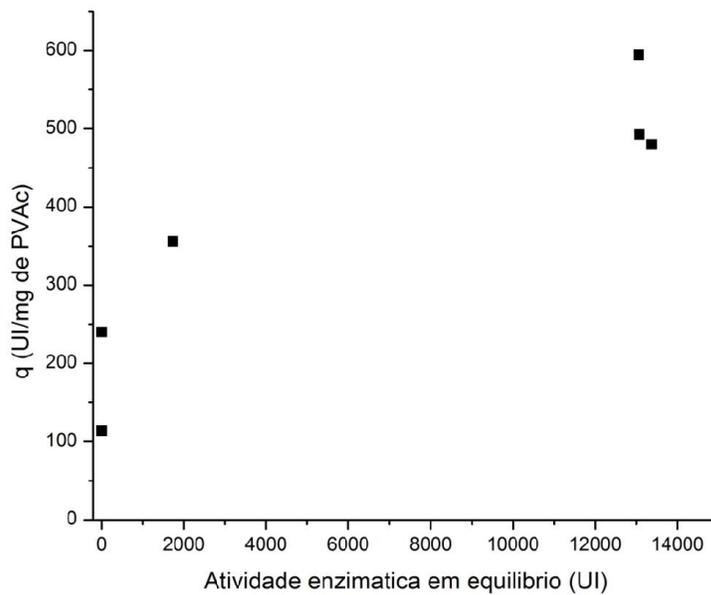


Figura 6. 46: Isoterma de adsorção de lisozima após 24 horas.

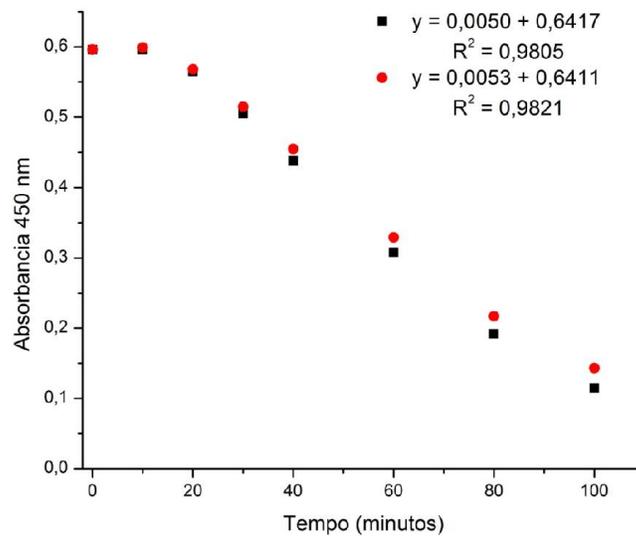


Figura 6. 47: Análise da atividade enzimática da partículas de PVAc em emulsão após processo de imobilização de 24 horas.

Com auxílio dos dados levantados neste trabalho é possível concluir que a imobilização de BSA e de lisozima sobre as partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA produzidas por polimerização em suspensão está limitada pela disponibilidade de área.

Quando se aumentou a área do polímero produzido, foi possível obter quantidades expressivas de material adsorvido e clara evidência de interação enzima com as partículas do látex, levando a coagulação.

6.5.6 Cinética de Imobilização de Lisozima em Partículas Poliméricas Produzidas por Polimerização em Suspensão

Diante de tudo que foi exposto, novo estudo cinético foi construído para a lisozima, utilizando como suporte partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA produzidas em suspensão, nas melhores condições estudadas até aqui: agitação de 250 rpm, 30 °C e pH de 8,60. A Figura 6.48 mostra a queda de massa de proteína presente no sobrenadante. Durante as 10 primeiras horas esta variação é quase imperceptível pelo método de Bradford com o suporte de PVAc, mostrando que a sensibilidade do método de Bradford é baixa. Os experimentos foram realizados em duplicatas. Observa-se a excelente reprodutibilidade.

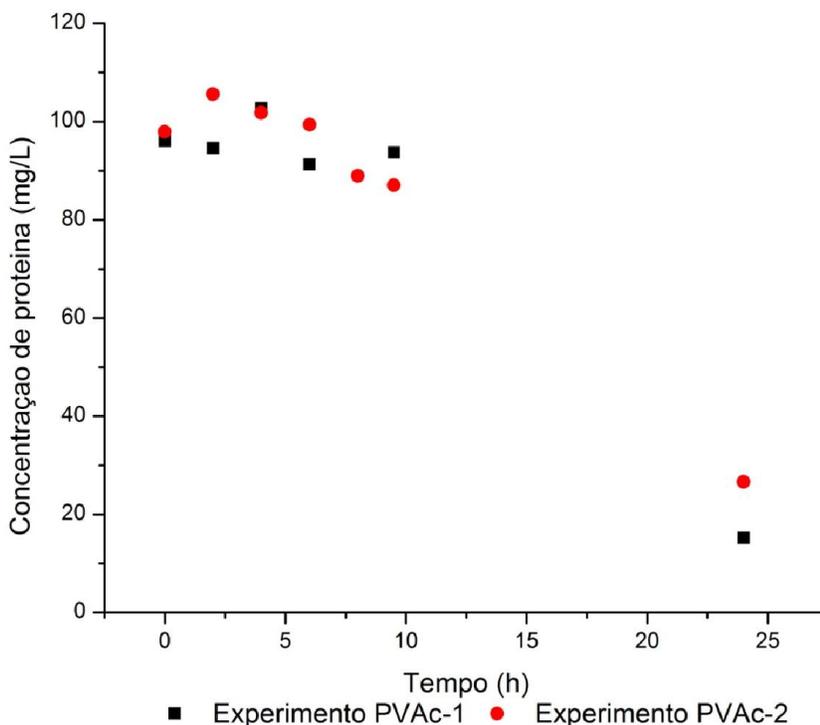


Figura 6. 48: Cinética de concentração da lisozima no sobrenadante em contato com as partículas de PVAc, medida pelo método de Bradford.

Utilizando a medida da atividade enzimática presente no sobrenadante, um segundo gráfico é apresentado na Figura 6.49 para o mesmo processo. Pode-se observar como a inclinação da curva para a atividade enzimática é muito mais sensível do que a medida para a concentração de proteína obtida pelo método de Bradford.

Gráficos similares foram construídos para os experimentos realizados com o suporte de PVAc-co-PMMA, como mostrado nas Figuras 6.50 e 6.51. Não parece haver diferenças significativas entre as cinéticas de adsorção de lisozima sobre o suporte de PVAc e PVAc-co-PMMA. Aparentemente os dois resultam no mesmo comportamento, quando observadas as concentrações de proteína pelo método de Bradford. No entanto, pode-se afirmar que existe uma taxa maior de adsorção de lisozima sobre o copolímero, como observado na Tabela 6.4 e na Figura 6.51.

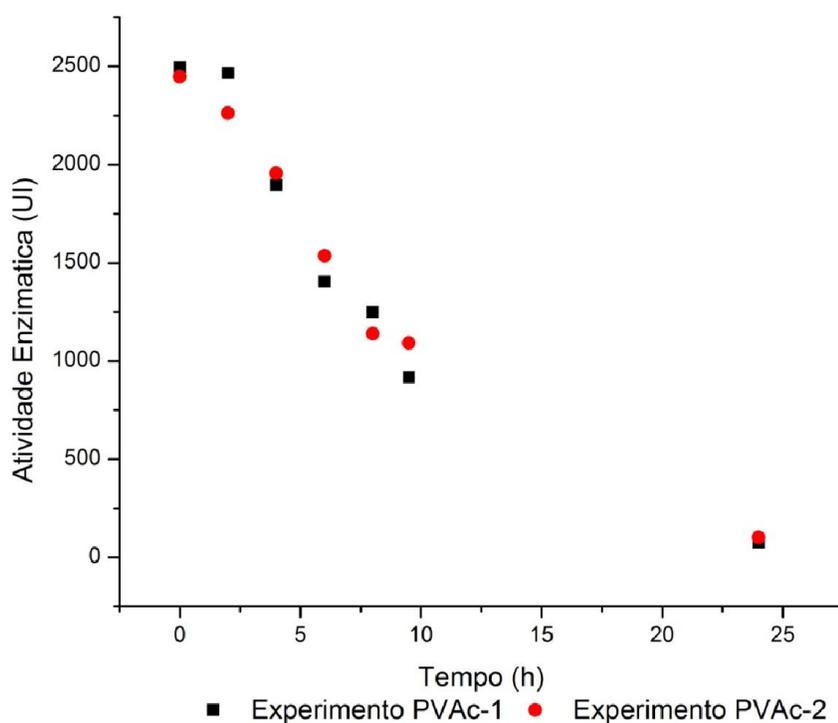


Figura 6. 49: Atividade enzimática da lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc.

A Figura 6.50 mostra novamente a mais baixa sensibilidade do método de Bradford no início do experimento. A Figura 6.51, como no caso da BSA, sugere que a presença do MMA acelera o processo de adsorção, por causa da maior hidrofobicidade do produto polimérico.

Tabela 6. 8: Taxa de adsorção de lisozima sobre os suportes de PVAc e PVAc-co-PMMA produzidos por polimerização em suspensão.

Suporte	Taxa de imobilização em relação a atividade enzimática (UI.h ⁻¹)	R ²
PVAc	-167,68	0,97
PVAc-co-PMMA	-182,24	0,99

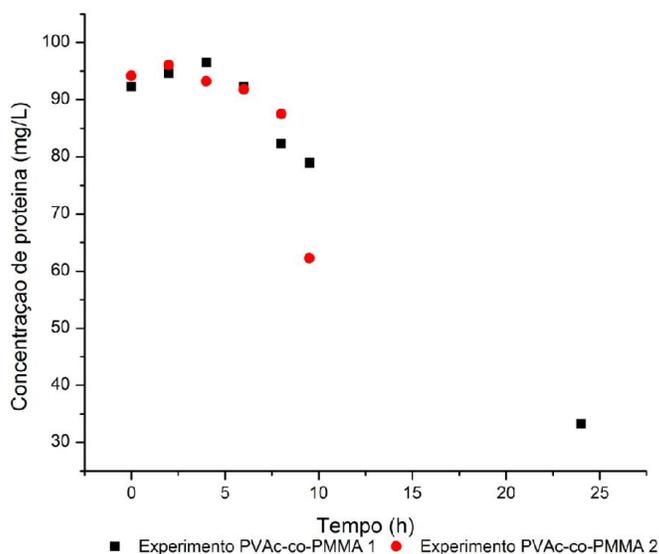


Figura 6. 50: Cinética de concentração de lisozima no sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA, medida pelo método de Bradford.

6.6 Resultados das Análises de FTIR das Partículas de PVAc e PVAc-co-PMMA

Como foi comprovado nas seções anteriores pelo método de Bradford e da atividade enzimática, ocorre a adsorção de quantidades significativas das moléculas de BSA e lisozima sobre os suportes poliméricos, embora lentamente. Uma segunda forma de confirmar a adsorção pode ser feita com análises de FTIR. Como as proteínas possuem um grupamento amina (NH₃) que absorve no comprimento de onda de 3500 a 3300 cm⁻¹ (PAIVA *et al.*, 2010), a presença dessa banda em um espectrograma da amostra do material que foi utilizado como adsorvente pode caracterizar a presença de proteína adsorvida. Os grupamentos ésteres possuem duas bandas características

intensas, devido à deformação axial do grupamento C = O, que ocorre em 1750 e 1735 cm^{-1} , e ao grupo C - O que ocorre em 1240 cm^{-1} (PAIVA *et al.*, 2010).

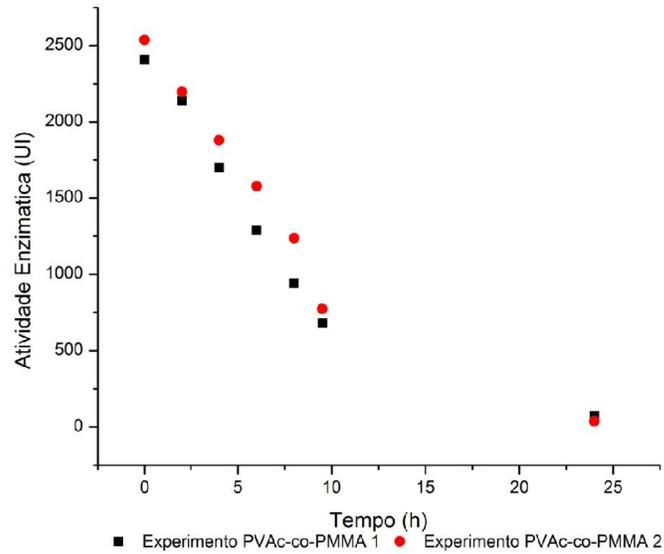


Figura 6. 51: Atividade enzimática da lisozima em sobrenadante em contato com partículas de PVAc-co-PMMA.

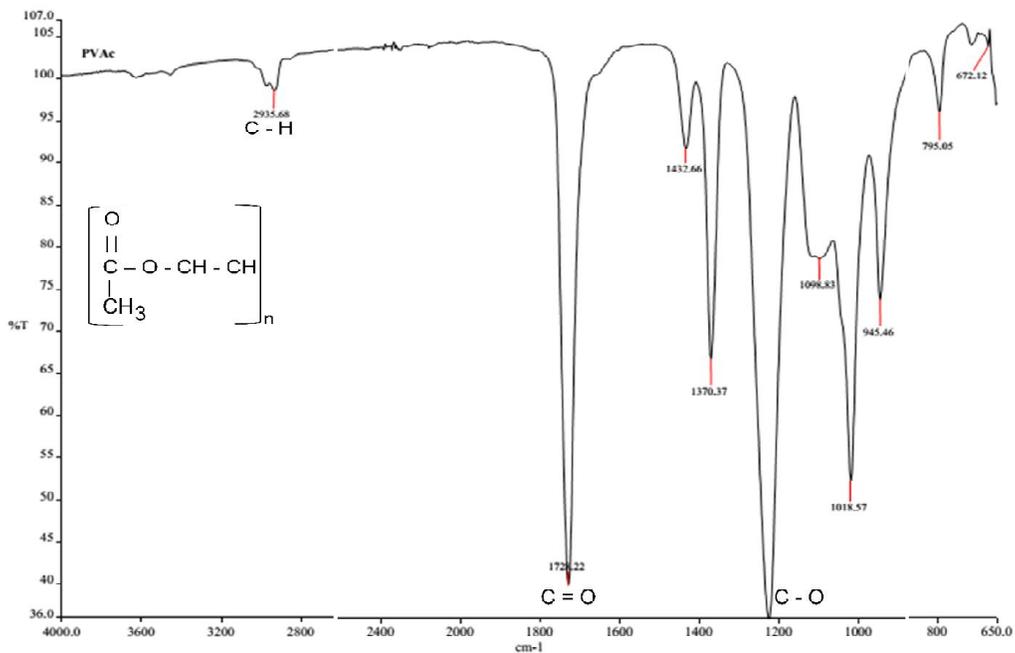


Figura 6. 52: Espectrograma de FTIR de partículas de PVAc.

Para chegar às conclusões, foi realizada uma análise de FTIR do polímero de PVAc, como apresentado na Figura 6.52. Pode-se observar o grupo C = O em 1728 cm^{-1}

¹. Entre 1300 e 1000 cm^{-1} , observam-se as deformações axiais ocorridas devido às vibrações assimétricas acopladas. A banda presente em aproximadamente 1240 cm^{-1} é uma banda mais larga e forte do que a deformação do C = O e é devida ao grupo C - C (= O) - O. Já a banda do O - C - C dos ésteres ocorre entre 1100 e 1000 cm^{-1} . A banda observada em 1375 cm^{-1} é devida à deformação angular simétrica das ligações C - H presentes no grupamento metila. O grupamento vinila absorve próximo a 1432 cm^{-1} , devido à deformação angular simétrica no plano do grupo metileno terminal. Nesta figura fica nítido que o monômero de acetato de vinila sofreu reação, pois a banda da dupla ligação C = C, que absorve em aproximadamente 1600 cm^{-1} , não está presente, como mostrado nas análises de RMN.

A análise de FTIR foi empregada para avaliar a amostra do copolímero de PVAc-co-PMMA, como mostrado na Figura 6.53. Na Figura 6.53, vê-se também a banda em 1726 cm^{-1} , devida à ligação C = O. Vê-se também a banda de estiramento do C - O, entre 1230 e 1144 cm^{-1} . No espectro do PVAc-co-PMMA aparecem duas bandas próximas por causa dos diferentes monômeros. Novamente, não é observada a banda para carbono insaturado em 1600 cm^{-1} . As principais diferenças entre os espectros do PVAc e do copolímero PVAc-co-PMMA estão presentes nos comprimentos de onda 1240 e 900 cm^{-1} , por causa da presença do MMA.

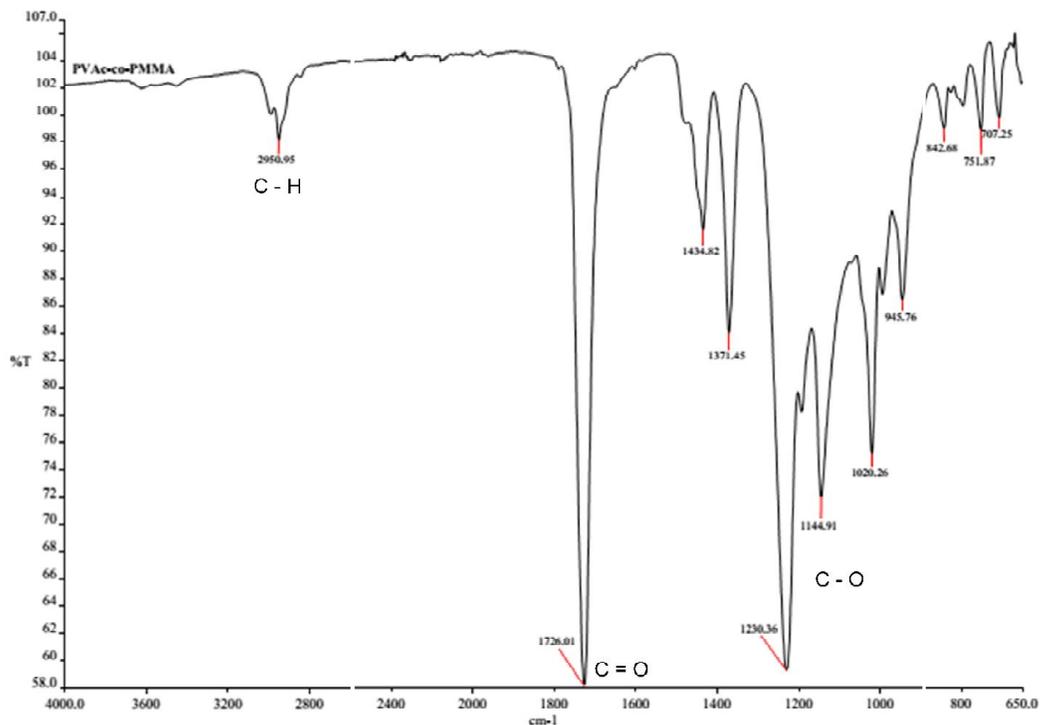


Figura 6. 53: Espectrograma de FTIR de partículas de PVAc-co-PMMA.

O espectrograma de FTIR da BSA está apresentado na Figura 6.54. Sabe-se que as proteínas são formadas por aminoácidos que se ligam utilizando os grupos funcionais amina (-NH₂) e a carboxila (-COOH) para formar uma ligação peptídica. Dessa forma no espectro da BSA e da lisozima devem ser encontradas as bandas para esses agrupamentos. Os espectros das proteínas estudadas neste trabalho são mais simples do que os espectros dos materiais poliméricos. O estiramento do N - H deve ocorrer entre 3500 a 3300 cm⁻¹. Sabe-se que a BSA e a lisozimas são formadas por aminoácidos, tornando esta banda intensa. No entanto, o grupo hidroxila (-OH) do ácido carboxílico também absorve entre 3400 - 2400 cm⁻¹, de forma que não se pode afirmar que as bandas observadas para a BSA e para a lisozima em 3286 e 3282 cm⁻¹, são devidas ao grupo funcional amina ou hidroxila, sendo esperado que ocorra a sobreposição dessas duas bandas.

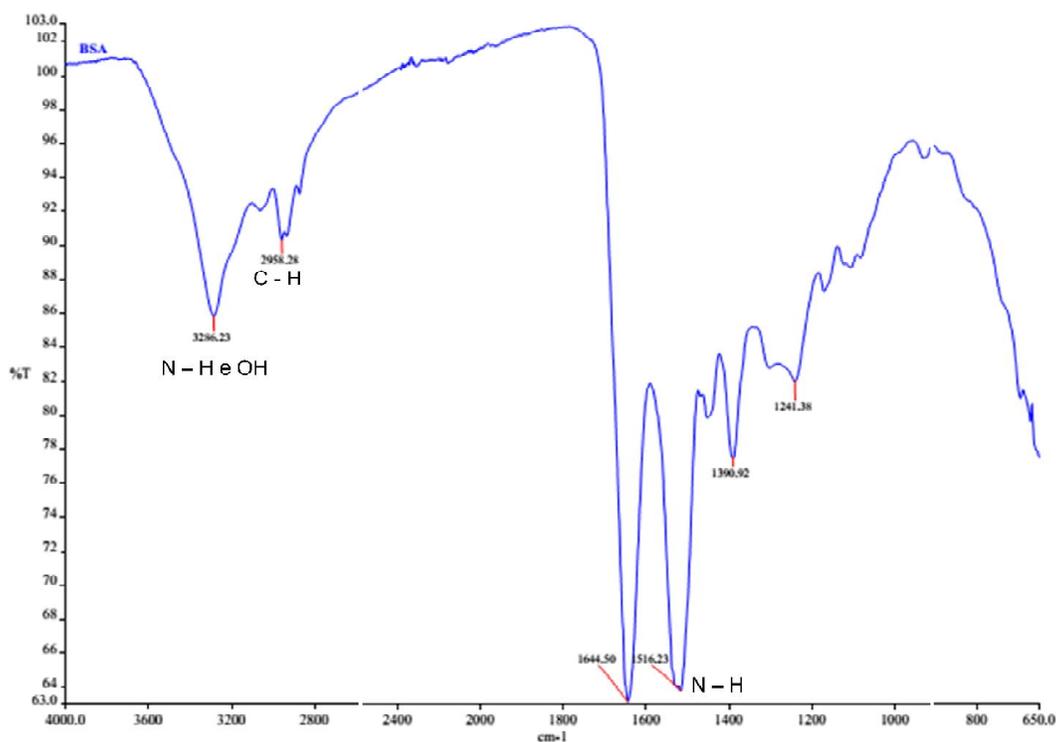


Figura 6. 54: Espectrograma de FTIR da BSA.

As bandas intensas observadas em 1644 e 1516 cm⁻¹ no espectro da BSA corresponde ao dobramento N-H. Já para a lisozima, estas bandas são observadas em 1642 e 1516 cm⁻¹, como mostra a Figura 6.55. O estiramento da ligação C - N ocorre na faixa de 1350 a 1000 cm⁻¹; porém é bom lembrar que também é observado estiramento do grupo C - O na faixa de 1320 a 1210 cm⁻¹ com intensidade média. Pode-se observar que existe um dobramento N - H fora do plano em aproximadamente 800 cm⁻¹. No

entanto, devido à presença dos grupos funcionais do ácido carboxílico e da amina, que absorvem em bandas próximas, há certa dificuldade para denominar cada banda do espectro.

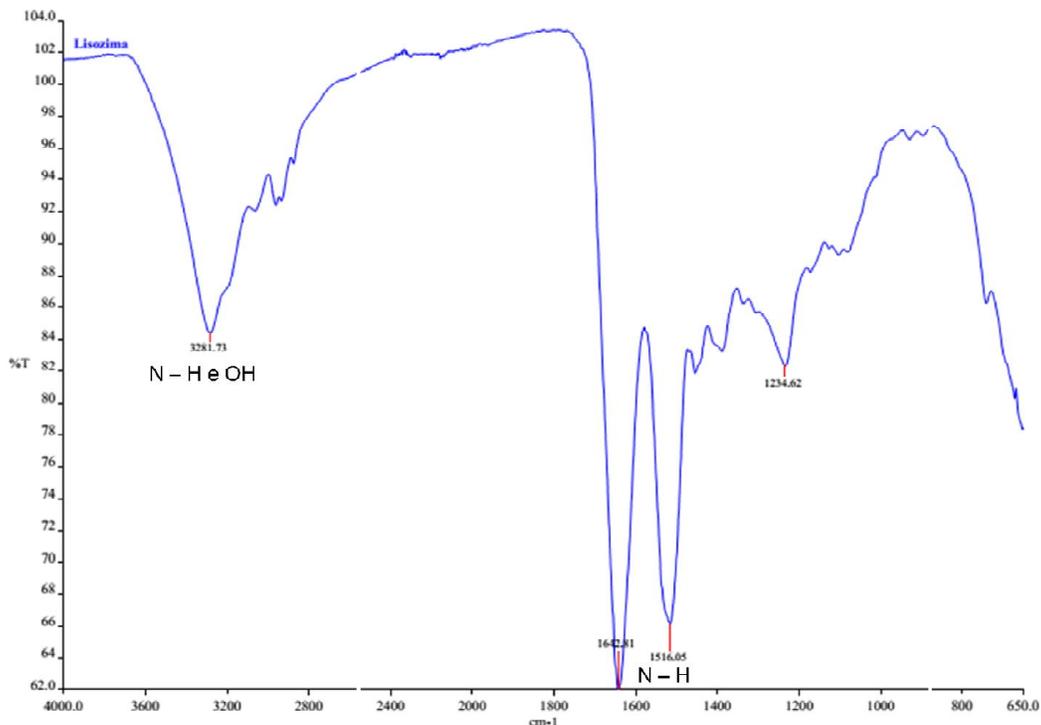


Figura 6. 55: Espectrograma de FTIR da lisozima.

Na Figura 6.56 são apresentados os espectros do PVAc após o processo de adsorção de proteína. Pode-se observar que somente nos suportes produzidos por emulsão é visível uma banda na região das proteínas, não deixando dúvidas sobre a presença da lisozima no suporte. Para o caso do material produzido por suspensão, é verificado de forma sutil o deslocamento da linha base, no intervalo de 3600 a 3300 cm^{-1} , referente à absorção da biomolécula. Este resultado reforça a conclusão de que a quantidade de material imobilizado é influenciada pela área específica. Os resultados parecem também mostrar a presença de proteína sobre o suporte seco.

A Figura 6.57 apresenta o conjunto de espectros obtidos após o processo de adsorção da lisozima e BSA sobre as partículas de PVAc-co-PMMA. Como era esperado, a quantidade de material adsorvido no suporte de PVAc-co-PMMA é pequena. É possível observar um deslocamento da linha base entre os comprimentos de ondas de 3600 a 3300 cm^{-1} , sendo este mais significativo para o PVAc-co-PMMA-lisozima e pouco pronunciado para o conjunto PVAc-co-PMMA-BSA.

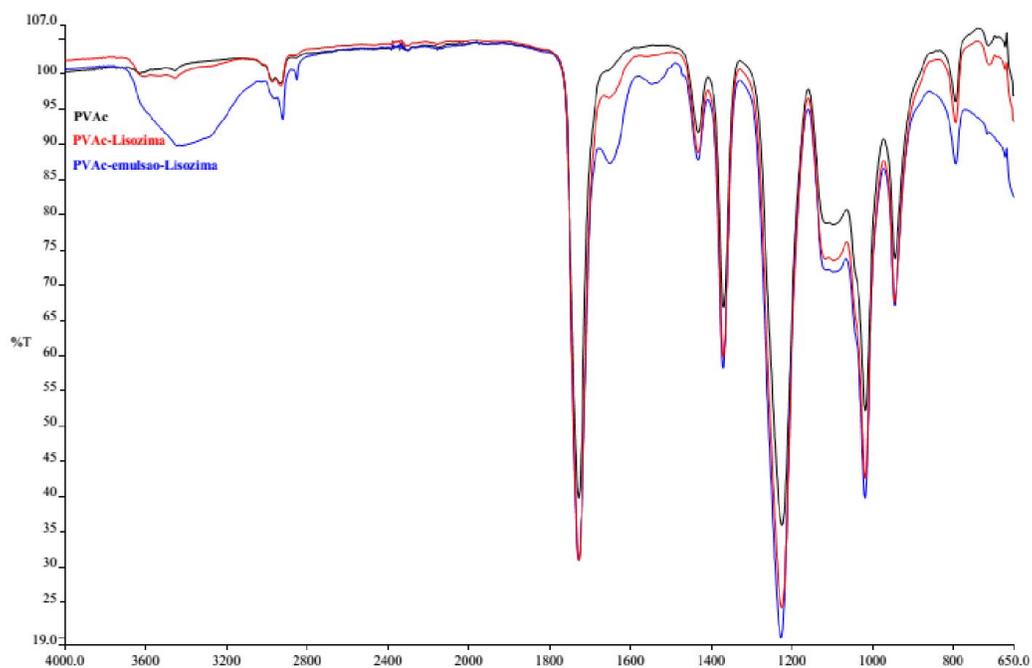


Figura 6. 56: Espectrograma de FTIR da adsorção da lisozima sobre o suporte de PVAc.

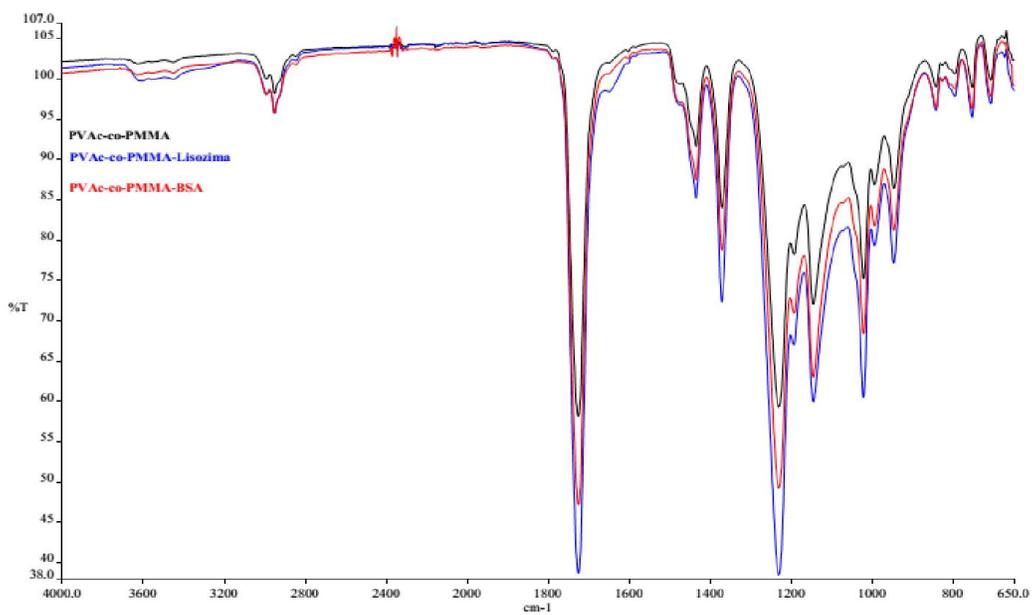


Figura 6. 57: Espectrograma de FTIR da adsorção da lisozima e BSA sobre o suporte de PVAc-co-PMMA.

Capítulo 7

Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros

A polimerização em suspensão de acetato de vinila permitiu produzir partículas poliméricas para uso como agentes de embolização e que podem ser usadas como suporte de enzimas. As propriedades dos materiais produzidos são similares às aquelas reportadas na literatura, com massas molares ponderais médias na faixa de 40 a 120 kDa e Tg em torno de 42 °C. A destilação do monômero de acetato de vinila não parece constituir uma etapa fundamental para a produção de PVAc na temperatura de 80-85 °C, embora pareça afetar a distribuição de tamanho das partículas.

A adição de metacrilato de metila (MMA) durante o processo de polimerização do acetato de vinila produz o copolímero PVAc-co-PMMA, com características desejadas para uso como agente de embolização. Obtêm-se partículas esféricas e superfícies lisas, observando-se ao microscópio óptico menor formação de aglomerados. A incorporação de 20% de MMA permite aumentar a temperatura de transição vítrea (Tg) para aproximadamente 78 °C, contribuindo com o menor grau de aglomeração.

As reações de saponificação, aplicadas às partículas de PVAc com o objetivo de produzir uma camada PVA, não causa modificação suficiente para ser observado por análises de DSC, mas provoca mudanças dos dados de GPC e características morfológicas das partículas, segundo as micrografias realizadas em microscópio óptico.

Esse aspecto está mal documentado na literatura e talvez mereça análise mais aprofundada no futuro próximo.

Os dois métodos usados para medir a atividade enzimática nesse trabalho mostraram-se eficientes. Apesar da solução de tris/HCl apresentar átomos de nitrogênio em sua composição, sua presença não prejudica os resultados finais. O método de Bradford, usado para a medida de proteína total em solução, também se mostrou eficaz. Estudos estatísticos mostraram que o erro é igual a aproximadamente 15% dos valores das medidas das soluções de proteínas. A análise da atividade enzimática da lisozima pelo método que usa como substratos o *micrococcus* foi empregado com sucesso durante a execução deste trabalho, apresentando maior sensibilidade e menos variabilidade para detecção da enzima. O método de ultravioleta mostrou-se ineficiente, por estar sujeito à interferência de substâncias residuais liberadas pelo material polimérico.

A enzima L-asparaginase perde a atividade enzimática, quando em contato com acetato de vinila puro. É verificada alguma atividade enzimática na mistura de acetato de vinila (32,25% m/m) e 67,75% (m/m) tampão tris/HCl. Nesse caso, a atividade medida é aproximadamente igual a 10% da atividade da enzima no tampão tris/HCl pH 8,60. Isso mostra o efeito inibitório que o VAc exerce sobre a atividade enzimática. Também foi observada perda de atividade enzimática na temperatura de 70 °C da solução de L-asparaginase por duas horas. No entanto, o armazenamento a frio parece não perturbar de forma significativa a atividade enzimática em solução tampão tris/HCl por um intervalo de 11 dias. Esses resultados impedem a incorporação *in-situ* de L-asparaginase nas partículas embolizantes.

As partículas poliméricas produzidas neste trabalho foram utilizadas para ensaios de adsorção da enzima L-asparaginase, mas não foi verificada a presença de enzima sobre o suporte estudado. Isso pode ser resultado de baixa área específica desses materiais ou das condições inadequadas de processamento, dado que todos os testes de adsorção foram conduzidos no pH fisiológico de 6,70, que é o pH esperado para a aplicação. A imobilização de moléculas biológicas em materiais poliméricos é fortemente influenciada pela variação de pH, como observado para BSA e lisozima. Em ambos os casos, as melhores condições de adsorção ocorrem nas proximidades dos respectivos pontos isoelétricos.

É possível realizar a imobilização de BSA sobre o suporte de PVAc e PVAc-co-PMMA nas proximidades ponto isoelétrico, entre 4,5 - 5,60. Neste trabalho foi possível imobilizar aproximadamente 1 mg de BSA por grama de polímero, utilizando uma solução tampão de fosfato de sódio 0,05M no pH de 5,0. Foi evidenciada a imobilização apreciável de lisozima nos suportes poliméricos em solução alcalina, sendo que a melhor condição de adsorção da lisozima ocorreu no pH 8,60. No pH 10,5 foi observada a desnaturação pronunciada da lisozima.

Com o aumento da área específica das partículas de PVAc, através da polimerização em miniemulsão, foi possível observar uma maior concentração de enzimas adsorvidas. Isso mostrou que o processo de adsorção em micropartículas poliméricas é controlado pela disponibilidade de área. A lenta taxa de adsorção nas micropartículas e o aumento dessas taxas na presença do comonômero MMA sugerem que o processo é controlado por interações hidrofóbicas.

A solução de lisozima posta em contato com a emulsão de PVAc provoca a coagulação das partículas, o que favorece o processo de caracterização. O aumento da concentração de BSA também provocou a coagulação da emulsão de PVAc. Como não foi verificada a coagulação da emulsão de PVAc pela soluções tampões utilizadas neste trabalho, estas são evidências adicionais de existência de interações entre as proteínas e os materiais poliméricos. Esse aspecto ainda não foi discutido na literatura.

Os espectros de FTIR dos produtos da adsorção evidenciaram a presença de bandas pertencentes às proteínas nas amostras analisadas. Esse fator parece confirmar de forma independente a ocorrência de adsorção.

Após a imobilização da lisozima sobre os materiais, foi possível observar que esta ainda possuía atividade enzimática, embora menor que na forma original. Esse aspecto deve ser melhor estudado no futuro.

7.1 Trabalhos futuros

Com este trabalho, pode-se entender melhor como ocorre o processo de adsorção de moléculas biológicas sobre os polímeros. Baseado nos resultados obtidos, acredita-se que diferentes biomoléculas possam ser imobilizadas sobre os adsorventes de PVAc e PVAc-co-PMMA variando apenas o pH das soluções. Esse fato pode abrir oportunidade

para o desenvolvimento de agentes embolizantes modificados quimicamente, embora as aplicações nesse caso sejam realizadas sempre em pH fisiológico de 6,70.

O processo de coagulação de látex provocado por proteína não foi relatado na literatura e pode ser explorado em aplicações que envolvam a produção de embalagens anti-microbianas, carregadores de medicamentos ou a suportação de biomoléculas. Além disso, o problema ainda não foi avaliado de forma mecanística.

Devem ser realizados estudos sobre o processo de dessorção da lisozima e da BSA sobre os suportes poliméricos, para avaliar a reversibilidade do processo. Também devem ser realizados estudos sobre a estabilidade dos sistemas formados pelos adsorventes e enzimas. No presente trabalho foi relatada queda apreciável de atividade após a adsorção, o que deve ser explorado no futuro.

Bibliografia

- ABUD, A.K.S., 2005. “Estudo do Controle do Processo de Produção de L-asparaginase por *Zymomonas mobilis*”, Dissertação de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- ABRAHÃO-NETO, J., STECHER, A.L., DEUS, M.P., POLIKARPOV, I., 1999, “Stability of L-asparaginase: an Enzyme Used in Leukemia Treatment.” *Pharmaceutica Acta Helvetiae* v. 74, pp. 1-9.
- ANIRUDHAN, T.S., RAUF, T.A., 2013, Lysozyme Immobilization Via Adsorption Process Using Sulphonic Acid Functionalized Silane Grafted Copolymer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 107, pp. 1-10.
- ANIRUDHAN, T.S., REJEENA, S.R., 2012, Poly(acrylic acid)-Modified Poly(glycidylmethacrylate)-grafted nanocellulose as Matrices for the Adsorption of Lysozyme from Aqueous Solutions. *Chemical Engineering Journal*, v. 187, pp. 150-159.
- AMINABHAVI, T.M., SOPPIMATH, K.S., KULKARNI, A.R., RUDZINSKI, W.E., 2001, “Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices.” *Journal of Controlled Release*, v. 70, pp. 1-20.
- ARCAN, I., YEMENICIOGLU, A., 2013., Development of Flexible Zein–Wax Composite and Zein–Fatty Acid Blend Films for Controlled Release of Lysozyme". *Food Research International*, v. 51, pp. 208-216.
- ARIAS, L. J., MOLINERO, L. F., GALLARDO, V., DELGADO, V., A., 2008, “Study of Carbonyl Iron/Poly(butylcyanoacrylate) Core/Shell Particles as Anticancer Drug Delivery Systems.” *Pharmaceutical Sciences* v. 33, pp. 252-261.
- ASHOUR, R., AZIZ-SULTAN, A., 2014. Preoperative Tumor Embolization. *Neurosurgery Clin.*, v. 25, pp. 607-617.
- BALDURSDOTTIR, S., JORGENSEN, L., 2011. The Influence of Size, Structure and Hydrophilicity of Model Surfactants on the Adsorption of Lysozyme to Oil-

Water Interface-Interfacial Shear Measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 87, pp. 96-102.

BARBANTI, S. H., ZAVAGLIA, C. A. C, DUEK, E. A. R., 2005, “Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecido.” *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, pp. 13-21.

BESTETI, M. D., PINTO, J. C., SOUZA, F. G. Jr, FREIRE, D. M.G., 2013, " Production of Core-Shell Polymer Particles-Containing Cardanol by Semibatch Combined Suspension/Emulsion Polymerization. *Polymer Engineering of Science*.

BRANDOLINI, A. J., 2000. " NMR Spectra of Polymer and Polymer Additives", Marcel Dekker, New York.

BEILEN, J.B.V., LI, Z., 2002, “Enzyme Technology: An Overview.” *Curr Opin Biotechnol*, v. 42, pp. 13-338.

BENJAMIN, S., PANDEY, A., 1998, “Review – *Candida rugosa* Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology.” *Yeast*, v. 14, pp. 1069-1087.

BERENSTEIN, A., RUSSEL, E., 1981, “Gelation Sponge in Therapeutic Neuroradiology: A Subject Review.” *Radiology*, v. 141, pp. 105-112.

BILLMEYER, F.W., 1975, “Ciencia de los Polímeros.” Editorial Reverté, s.a

BING YU, A., QING LU, G., ZENG, H., Q., PING XU, Z., 2005, “Inorganic Nanoparticles as Carriers for Efficient Cellular Delivery.” *Chemical Engineering Science* v. 61, pp. 1027-1040.

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., 2005, “Biotecnologia Industrial.” v. 1, Ed. Edgar Blücher LTDA.

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., 2005, “Biotecnologia Industrial.” v. 2 Ed. Edgar Blücher LTDA.

BRADFORD, M., 1976, “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principles of Protein Dye Binding.” *Analytical Biochemistry*. v. 72 , pp. 248-254.

- BRANDRUP, J., IMMERGUT, E.H., GRUKLE, E.A., 1998, "Polymer Handbook." Fourth Edition.
- BRENNECKA, C.R., PREUL, M.C., BICHARD, W.D., VERNON, B.L., 2012. In Vivo Experimental Aneurysm Embolization in a Swine Model with a Liquid-to-Solid Gelling Polymer System: Initial Biocompatibility and Delivery Strategy Analysis. Biocompatibility and Delivery Strategy for Aneurysm Embolization.
- BRITO, K.J.S., 2009, " Nanocompósito de Borracha SBR com Nanoargila Organicamente Modificada". Dissertação de M.Sc., PPGEM, Rio Grande do Sul, RS, Brasil
- BROOME, J.D., 1963, "Evidence that the L-asparaginase of Guinea Pig Serum is Responsible for its Ant Lymphoma Effects." Journal Exp. Medical. v. 118 , pp. 99.
- BROOME, J.D., 1968, "Studies on the Mechanism of Tumor Inhibition by L-asparaginase: Effects of the Enzyme on Asparagine Levels in the Blood Normal Tissues and 6C3Hed Lymphomas of Mice: difference in Asparagine Formation and Utilization in Asparagine-Sensitive and Resistent Lymphoma Cells." Journal Exp. Medical. v. 127 , pp. 1055-1072.
- BUDHLALL, B.M., TRONGSATITKUL, T., 2013, Temperature Dependence of Serum Protein Adsorption in PEDylated PNIPAm microgels, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 103, 244-252.
- BURT, H.M., JACKSON, J.K., LIANG, L.S., HUNTER, W.L., REYNOLDS, M., SANDBERG, J.A., SPRINGATE, C., 2002. "The Encapsulation of Ribozymes in Biodegradable Polymeric Matrices". International Journal of Pharmaceutics, v. 243, pp. 43-55.
- CABRAL, J.M.S., AIRES-BARROS, M.R., GAMA, M., 2003." Engenharia Enzimática". Lidel- edições técnica, lda. Lisboa - Porto - Portugal.
- CALONDER, C., TIE, Y., TASSEL, P.R.V., 2001. History Dependence of Protein Adsorption Kinetics. PNAS, v. 98.

- CANÇADO, F.C., BARBOSA, J.A.R.G., MARANA, S.R., 2007. Crystallographic Structure of the Lysozyme 2 (Mdl2) from Musca Domestica. Brazilian Synchrotron Light Laboratory - Activity Report.
- CANEVAROLO, S.V., 2003, "Ciência dos Polímeros: Um Texto Básico para Tecnólogos e Engenheiros." 2 ed. Ed. Artliber.
- CARTA, G., ZHU, M., 2014, Adsorption of Polyethylene-Glycolated Bovine Serum Albumin on Macroporous and Polymer-Grafted Anion Exchangers. Journal of Chromatography A, v. 1326, pp. 29-38
- CARTER, D.C., J.X, HO, 1994, " Structure of Serum-Albumin". Advances in Protein Chemistry, v. 45, pp. 153-203.
- CARVALHO, W., CANILHA, L., SILVA, S.S. 2006, "Uso de Biocatalisadores Imobilizados: uma Alternativa para a Condução de Bioprocessos." Revista Analytica, v.23, pp. 60-70.
- CASTELLAN, G., 1986, Fundamentos de Físico-Química, LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1ªed., 462.
- CHEN, J-P. , CHEN, Y-C, 1997, Preparations of Immobilized Lysozyme with Reversibly Soluble Polymer is Hydrolysis of Microbial Cells, Bioresource Technology, v. 60, pp. 231-237.
- CHITRA, A.D.R., CHOUDHURY, R.R., RAMANADHAM, M., 2004, " Structural Changes During the Unfolding of Bovine Serum Albumin in the Presence of Urea: A Small-Angle Neutron Scattering Study". Journal of Physics, v. 63, pp. 363-368.
- COELHO, M. A. Z., SALGADO, A. M., RIBEIRO, B. D., 2008, "Tecnologia Enzimática." Ed. EPUB Editora.
- COMYNS, A.E., 2011, "Global Industrial Enzymes Market: A Comprehensive Analysis". Focus on Catalysts.
- CORRADINI, C., ALFIERI, I., CAVAZZA, A., LANTANO, C., LORENZI, A., ZUCCHETTO, N., MONTENERO, A., 2013, " Antimicrobial Films Containing

- Lysozyme for Active Packaging Obtained by sol-gel Technique". *Journal of Food Engineering*, v. 119, pp. 580-587.
- DASU, V.V, KUMAR, S., PAKSHIRAJAN, K., 2010, "Localization and Production of Novel L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428." *Process Biochemistry*. v. 45, pp. 223-229.
- DION, J.E., RANKIN, R.N., VIÑUELA, F., FOX, A.J., WALLACE, A.C., MERVART M., 1986, "Dextran Microspheres Embolization: Experimental and Critical Experience with Radiologic-Pathologic Correlation." *Radiology*. v. 160 , pp. 717-721.
- DOKTYCS, M.J., SUBRAMANIAN, A., KENNEL, S.J., ODEN, P.I., JACOBSON, K.B., WOODWARD, J., 1999, "Comparison of Techniques for Enzyme Immobilization on Silicon Supports." *Enzyme and Microbial Technology*. v. 24 , pp. 26-34.
- ELDAR-BOOCK, A., POLYAK, D., SCOMPARIM, A., SATCHI-FAINARO, R., 2013. Nano-Sized Polymers and Liposomes Designed to Deliver Combination Therapy for Cancer. *Current Opinion in Biotechnology*.
- EMERSON, T.E., 1989, "Unique Features of Albumin - a Brief Review". *Critical Care Medicine*, v. 17, pp. 690-694.
- EUROPEAN PLASTICS, 2012. "Plastics - The Facts 2012 An Analysis of European Plastic Production, Demand and Waste data for 2011".
- FIGUEROLA, A., COARATO, D.R., MANNA, L., PELLEGRINO, T., 2010, "From Iron Oxide Nanoparticles Towards Advanced Iron-Based Inorganic Materials Designed for biomedical Applications." *Pharmacological Research*. v. 62, pp. 126-143.
- FOCUS ON CATALYSTS, 2012. " Industrial Enzymes: Technology Trends and Opportunities.
- FONSECA, L.B, NELE, M., VOLPATO, N.M., SEICEIRA, R.C., PINTO, J.C., 2013, "Production of PMMA Nanoparticles Loaded with Praziquantel, Through In-Situ Miniemulsion Polymerization. *Macromol. React. Eng*. v. 7, pp. 54 - 63.

- FRENKEL, E., HALEY B., 2008, "Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Treatment." *Urologic Oncology*. v. 26, pp. 57-64.
- GALLIER, J., RIVET, P., CERTAINES, J., 1987, "¹H- and ²H-NMR Study of Bovine Serum Albumin Solutions"., *Biochimica et Biophysica ACTA*, v. 915, pp. 1-18.
- GEANKOPLIS, C.J., 2003. "Transport Processes and Separation Process Principles (Includes Unit Operations). Prentice Hall- 4th edition.
- GERBSCH, N., BUCHHOLZ, R., 1995, "New Processes Actual Trends in Biotechnology" *FEM Microbiology Reviews*. v. 16, pp. 259-269.
- GHOSH, P., HAN, G., DE, M., KIM, C.K., ROTELLO, V.M., 2008, "Gold Nanoparticles in Delivery Applications." *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 60, pp. 1307-1315.
- GOLDBERG, R. J., 1952, " A Theory of Antibody Antigen Reactions 1. Theory for Reactions of Multivalent Antigen with Bivalent and Univalent Antibody". *Journal of the American Chemical Society*. v. 74, pp. 5715-5725.
- GREGORIADIS, G., FERNANDES, A.I., 1997, "Polysialylated Asparaginase: Preparation, Activity and Pharmacokinetics." *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1341, pp. 26-34.
- GREGORIADIS, G., RYMAN, B.E., LEATHWOOD, P.D., 1977, "Enzyme Entrapment in Liposomes." *FEBS Letters*. v. 14, pp. 95-99.
- GRINDLAY, J.H., CLAGGETT, O.T., 1949, "Plastic Sponge Prosthesis for Use after Pneumonectomy: Preliminary Report." *Mayo Clin Proc.*, v. 24, pp. 1538-1539.
- GUISÁN, J.M., SABUQUILLO, P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., FERNANDEZ-LORENTE, G., *et al.*, 2001, "Preparation of new Lipases Derivatives with High Activity-Stability in Anhydrous Media: Adsorption on Hydrophobic Support plus Hydrophilization with Polyethylemine." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, pp. 817-824.

- HANY, M.A.S., HOSAM, G.E., 2014. Polyvinyl Alcohol and N-butyl Cyanoacrylate for Transarterial Embolization of Ruptured Renal Angiomyolipomas. The Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine.
- HAMIDI, M., AZADI, A., RAFIEI, P., 2008, "Hydrogel Nanoparticles in Drug Delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 60, pp. 1638-1649. *Research Communications*". v. 173, pp. 639-546.
- HIRAYAMA, K., 1990. " Rapid Confirmation and Revision of the Primary Structure of Bovine Serum-Albumin by Esims and Frit-labLc Ms. *Biochemical and Biophysic*.
- HIRAYAMA, K., AKASHI, S., FURUYA, M., FUKUHARA, K-I., HUBBEL, J.A., 1998, "Synthesis Biodegradable Polymers for Tissue Engineering and Drug Delivery." *Biomaterials*. pp. 246-251.
- HIROTSU, T, TAGAKI, C., 2004, Plasma Copolymer Membranes of Acrylic Acid and the Adsorption of Lysozyme on the Surface. *Thin Solid Films*, v. 457, pp. 20-25.
- HU, J., LI, S., LIU, B., 2005, Adsorption of BSA onto Sulfonated Microspheres. *Biochemical Engineering Journal*, v. 23, pp. 259-263.
- HUANG, L., GUO, S., 2014. Nanoparticles Containing Insoluble Drug for Cancer Therapy. *Biotechnology Advances*, v. 32, pp. 778-788.
- HUANG, L., SONG, J., CHEN, B., 2014. A Novel Targeting Drug Carrier to Deliver Chemical Bonded and Physical Entrapped Anti-Tumor Drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 466, pp. 52-57.
- ICONOMOPOULOU, S.M., 2005, "Incorporation of Low Molecular Weight Biocides into Polystyrene-Divinyl Benzene Beads With Controlled Release Characteristics." *Journal of Controlled Release*, v. 102, pp. 223-233.
- JACOBSON, K.B., WOODWARD, J., SUBRAMANIAN, A., KENNEL, S.J., ODEN, P.I., DOKTYEZ, M.J., 1999, "Comparison of Techniques for Enzyme for Immobilization on Silicon Support ." *Enzyme and Microbial Technology*. v. 24, pp. 26-34.

- JEREBZOFF, S., JEREBZOFF-QUINTIN, S., 1984, "Cyclic Activity of L-asparaginase Through Reversible Phosphorylation in *Leptosphaeria michotii*." *Biochemistry*. v. 171, pp. 67-71.
- JOHNSON, E.A., HUGHEY, V.L., 1987, "Antimicrobial Activity of Lysozyme against Bacteria Involved in Food Spoilage and Food-Borne Disease". *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, pp. 2165-2170.
- KATO, K., UCHIDA, E., KANG, E-T., UYAMA, Y., IKADA, Y., 2003, "Polymer Surface with graft chains." *Progress in Polymer Science*, v. 28, pp. 209-259.
- KATCHALSKI-KATZIR, E., KRAEMER, D.M., 2000, "Eupergit® C, a Carrier for Immobilization of Enzymes of Industrial potential." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* . v. 10, pp. 157-176.
- KIDD, J.G., 1953, "Regression of Transplanted Lymphomas Induced *in vivo* by means of Normal Guinea Pig Serum." *Journal Medical*, v. 98, pp. 565.
- KIM, S.W., LEE, J.Y., SHIN, H.Y., LEE, J.H., SONG, Y.S., KANG, S.W., PARK, C., KIM, J.B., 2009, "A Novel Enzyme-Immobilization Method for a Biofuel Cell." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 59 , pp. 274-278.
- KISS, É., 1993, Temperature Dependence of Bovine Serum Albumin Adsorption onto a Poly(ethylene Oxide)-Grafted Surface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 76, 135-140.
- KOPAC, T., BOZGEYIK, K., YENER, J., 2008, "Effect of pH and Temperature on the Adsorption of Bovine Serum Albumin onto Titanium Dioxide". *Colloids and surfaces A*. pp. 19-28.
- KOPELMAN, R., PHILBERT, A., M., XU, H., GAO, D., 2008, "Bioeliminable Nanohydrogels for Drug Delivery." *Nano Letters*, v. 8, pp. 3320-3324.
- KRAJEWSKA, B., 2004. "Application of Chitin- and Chitosan-Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review". *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, pp. 126-139.
- KUMAR, R., SINGH, R., KAUR, J., 2013. Characterization and Molecular Modelling of an Engineered Organic Solvent Tolerant, Thermostable Lipase with

- Enhanced Enzyme Activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 97, pp. 243-251.
- KUN, L. E., 1997, "Acute Lymphoblastic Leukemia." *Seminars in Radiation Oncology*, v. 7, pp. 185-194.
- KWOK, D.Y., 2000. "Contacte Angle Interpretation in Terms of Solid Surface Tension, Colids and Surface". *A Physicochemical and Enginnering Aspects*, v. 161, pp. 31-48.
- LABROU, N.E., KOTZIA, G.A., 2005, "Cloning, Expression and Characterization of *Erwinia carotovora* L-asparaginase." *Journal of Biotechnology*. v. 119 , pp. 309-323.
- LANGER, R., 2007, "New Methods of Drug Delivery." *Science* v. 249, pp. 1527-1533.
- LANGNER, F., MORITZ, H.-U., REICHERT, K.-H, 1980. Reactor Scale-up for Polymerization in Suspension. *Chemical Engineering Science*, v. 35, pp. 519-525.
- LANDFESTER, K., ZIENER, U., MUSYANOVYCH, A., SCHOELLER, K., ETHIRAJAN, A., 2008, "Synthesis and Optimization of Gelation Nanoparticles Using the Miniemulsion Process." *Biomacromolecules* v. 9, pp. 2383-2389.
- LAURENT, A., BEAUJEU, R., WASSEF, W., CASASCO, A., GOBIN, Y.P., AYMARD, A., RUFENACHT, D., MERLAND, J.J., 1996, "Trisacryl Gelatin Microspheres for Therapeutic Embolization, I: Development and in Vitro Evaluation." *American Journal of Neuroradiology*, v. 17, pp. 533-540.
- LEE, V.A., CRAIG, R.G., FILISKO, F.E., ZAND, R., 2005, Microcalorimetry of the Adsorption of Lysozyme onto Polymeric Substrates. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 288, pp. 6-13.
- LEE, V.A., CRAIG, R.G., FILISKO, F.E., ZAND, R., 1996. Preparation and Characterization of High-Surface-area Polymer Substrates for Microcalorimetry. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 31, pp. 51-62.

- LEE, W.-K., CHOI, Y.-H., 2010. Effects of Agitation in Emulsion Polymerization of Vinyl Acetate, Ethylene, and N-Methylol Acrylamide. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 16, pp. 431-436.
- LI, S., HU, J., LIU, B., 2005, " A Study on the Adsorption Behavior of Protein onto functional Microspheres". *Journal of Chemical Techn. and Biotechnology*, v. 80, pp. 531-536.
- LI, Z., CAO, M., ZHANG, W., LIU, L., WANG, J., GE, W., YUAN, Y., YUE, T., LI, R., YU, W.W., 2014, Affinity Adsorption of Lysozyme with Reactive Red 120 Modified Magnetic Chitosan Microspheres. *Food Chemistry*, v. 145, pp. 749-755.
- LIGHT, R.U., PRENTICE, H. R., 1945, "Gelatin Sponge." *Archives of Surgery*, v. 51, pp. 69-77.
- LIU, J., HUANG, Y., KUMAR, A., TAN, A., JIN, S., MOZHI, A., LIANG, X.-J., 2014. pH-Sentive Nano-Systems for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Biotechnology Advances*, v. 32, pp. 693-710.
- LORCA, B. S.S., PINTO, J. C., BESSA, E. S., NELE, M., SANTOS, E. P., 2012. " Preparation of PMMA Nanoparticles loaded with Benzophenone-3 through Miniemulsion Polymerization. *Macromol. Symp.* v. 319, pp. 246-250.
- LOWE, L. T., HUANG, XIAO, 2005, "Biodegradable Thermoresponsive Hydrogels for Aqueous Encapsulation and Controlled Release of Hydrophilic Model Drugs." *Biomacromolecules* v. 6, pp. 2131-2139.
- MACHADO, F., PINTO J. C., LIMA, E.L., 2007, "Uma Revisão Sobre os Processos de Polimerização em Suspensão." *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, pp. 166-179.
- MAKKI, F. , DURANCE, T. D. , 1996, Thermal Inactivation of Lysozyme the Racketeer Influenced by pH, Sucrose and Sodium w Emulsions and Inactivation and Preservative Effect in Beer, *Food Research Internantional*, v. 29, pp. 635-645.
- MASTROMATTEO, M., LECCE, L., VIETRO, N.D., FAVIA, P., NOBILE, M.A.D., 2011. " Plasma Deposition Processes from Acrylic/Methane on Natural Fibres to

- Control the Kinetic Release of Lysozyme from PVOH Monolayer Film". Journal of Food Engineering, v. 104, pp. 373-379.
- MATYJASZEWSKI, K., SIEGWART, J., D., DRUMRIGHT, R., OH, K., J., 2008, "The Development of Microgels/Nanogels for Drug Delivery Applications." Progress in Polymer Science v. 33, pp. 448-477.
- MELO, C. K., 2009. "Reciclagem de Materiais Poliméricos por Incorporação In Situ na Polimerização em Suspensão de Estireno", Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- MINOR, W., MAJOREK, K.A., POREBSKI, P.J., DAYAL, A., ZIMMERMAN, M.D., JABLONSKA, K., STEWART, A.J., CHRUSZCZ, M., 2012, "Structural and Immunologic Characterization of Bovine, Horse, and Rabbit Serum Albumins". Molecular Immunology, v. 52, pp. 174-182.
- MOTHÉ, C. G., AZEVEDO, A. D., 2009, Análise Térmica de Materiais. Ed. Artliber - São Paulo - SP.
- MOTHERWELL, W.B., BINGHAN, M.J., SIX, Y., 2001, "Recent Progress in the design Synthesis of Artificial Enzymes." Tetrahedron . v. 57, pp. 4663-4686.
- MUKHERJEE, H.J., KHUSHOO, A., PAL, Y., SINGH, B.N., 2004, "Extracellular Expression and Single Step Purification of Recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II." Protein Expression & Purification. v. 38, pp. 29-36.
- NELSON, D. L., LEHNINGER ER, ALBERT L., COX, M. M., 2008, "Lehninger Principles of Biochemistry." Ed. W. H. Freeman & Co.
- ODIAN, G., 2004, "Principles of Polymerization." Ed. 4, Wiley Interscience.
- OGINO, H., DOUKYU, N., 2010. Organic Solvent-Tolerant Enzymes. Biochemical Engineering Journal, v. 48, pp. 270-282.
- OLIVEIRA, M.A.M., MELO, P.A.Jr, PINTO, J.C., 2012, Suspension Copolymerization of Vinyl Acetate and Methyl Methacrylate in the Presence of Amoxicillin. Macromolecular Reaction Engineering, v. 6, pp. 280-292.

- OLIVEIRA, M.A.M.O., MELO, P.A.Jr., NELE, M., PINTO, J.C., 2011, "In-Situ Incorporation of Amoxicillin in PVA/PVAc-co-PMMA Particles during Suspension Polymerizations." *Macromolecular Symp.* v. 299/300 pp. 34-40.
- OPREA, S., DODITA, T., 2001. Influence of Agitation During Emulsion Polymerization of Acrylic-Styrene Latexes on end Product Properties. *Progress in Organic Coating*, v. 42, pp. 194-201.
- ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S., 2012, " Biomateriais Fundamentos e Aplicações". Guanabara Koogan - Rio de Janeiro - RJ
- OUCHI, T., OHYA, Y., 2006, "macromolecular Prodrugs. " *Prog. Polymer Sct.* v. 20, pp. 211-257.
- PAIVA, L.D., LAMPMAN, M.G., KRIZ, G.S., VYVYAN, J.R., 2010. "Introdução à Espectroscopia". Cengage Learning.
- PHILLIPS, A.W., BOYD, J.W., 1970, "Purification and Properties of Asparaginase from *Serratia marcescens*. " *Journal of Bacteriology.* v. 106 , pp. 578-587.
- PEIXOTO, A.C.B., 2013, "Funcionalização de Nanopartículas Poliméricas para Liberação de Medicamentos Sítio-dirigida". Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PEIXOTO, S. L., SILVA, F.M., NIEMEYER, M.A.L., PINTO J.C., NELE, M., MELO, P.A., ESPINOSA, G. 2006, "Synthesis of Poly(Vinyl Alcohol) and/or Poly(Vinyl Acetate) Particles with Spherical Morphology and Core-Shell Structure and its Use in Vascular Embolization." *Macromolecula Symp.*, v. 243, pp. 190-199.
- PEIXOTO, L.S., 2007. "Produção de Partículas Esféricas de PVA/PVAc com Morfologia Casca-Núcleo para Uso em Embolização Vascular", Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PEIXOTO, S. L., PINTO J. C., NELE, M., MELO, A. P, 2009, "Expanded Core/Shell (Poly(vinyl acetate)/Poly(vinyl alcohol) Particles for Embolization." *Macromolecular Material and Engineering*, v. 294, pp. 463-471.

- PEIXOTO, L.S., CORDEIRO, F.B., MELO, P.A., NELE, M., PINTO, J.C., 2011, "Synthesis of Spherical Core-Shell PVAc-co-PMMA/PVA Particles for use in Vascular Embolization". *Macromol. Symp.* v. 299, pp. 132-138.
- PENG, M., SHI, S., ZHANG, Y., 2012, " Investigation of Proton Pump Inhibitors Binding with Bovine Serum Albumin and Their Relationship to Molecular", *Journal of Luminescence*, v. 132, pp. 1921-1928.
- PINTO J. C., ALVES, T.L.M., ABUD, A.K.S., 2004, "Processo de Produção de Asparaginase pela Bactéria *Zymomonas mobilis* e Uso do Caldo Fermentativo e/ou da Enzima Purificada no Tratamento de Doenças." Registrado no INPI sob N° PI0404994-2.
- PINTO, J. C., MAGRINI, A., M.K., C., CASTOR, A.C., GAIOTO, C.C., SANTOS, P.D., BORGES, G., ROSA, S.I., DELGADO, S.J.J., SOUZA. M.N., OLIVEIRA, M.C.B.R., SOUZA, P.N., MELO, P.A., ADERNE, R. VASCONCELOS, S.M.R., 2012. " Impactos Ambientais Causados pelos Plásticos: Uma Discussão Abrangente sobre os Mitos e os Dados Científicos"., Editora E-paper. 2°ed. Rio de Janeiro-RJ.
- PINTO, J. C., OLIVEIRA, M. A. M., MELO, P. A. Jr, NELE, M., 2011, " *In-situ* Incorporation of Amoxicillin in PVA/PVAc-co-PMMA Particles During Suspension Polymerization". *Macromol. Symp.* v. 299, pp. 34-40.
- PINTO, J. C., OLIVEIRA, M. A. M., MELO, P. A. Jr, NELE, M., 2012, "*In-situ* Incorporation of Doxorubicin in Copolymer Particles During Suspension Polymerization". *Macromol. Symp.* v. 319, pp. 23-33.
- PINTO J. C., NIEMEYER, M., ESPINOSA, G., SILVA, F.M., NELE, M., MELO Jr, P.A., 2004, "Processo de Síntese de Poli(Álcool Vinílico) e/ou Poli(Acetato Vinila) com morfologia Esférica e Estrutura Casca-Núcleo e seu Uso na Embolização Vascular." Registrado no INPI sob N° PI04044952-7.
- PINTO, M.C.C., 2013, "Influência de Variáveis na Morfologia de Suportes Enzimáticos Preparados por Polimerização em Suspensão-Emulsão". Dissertação de Mestrado - UFRJ/PEQ/COPPE - Rio de Janeiro.

- PORSTMANN, W., HIERONYMI, K., WIERNY, L., WARNKE, H., 1974, "Nonsurgical Closure of Oversized Patent Ductus Arteriosus with Pulmonary Hypertension (Report of a Case)." *Circulation*, v. 50, pp. 379-381.
- REDDY, B.S.R., ARUN, A., 2004, "In Vitro Drug Release Studies from the Polymeric Hydrogels Based on HEA and HPMA Using 4-{E-[3Z]-3-4-acryloyloxy)benzylidene)-2-hexylidene]methyl} Phenyl Acrylate as a Crosslinker." *Biomaterials* v. 26, pp. 1185-1193.
- RODRIGUEZ, F., COHEN, C., OBER, C.K., ARCHER, L.A., 2003, "Principles of Polymer Systems." Ed. 5, Taylor & Francis.
- RODRIGUES, M.I., IEMMA, A.F., 2009, Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. 2ªed. Editora Carita - Campinas - SP.
- RÖHM, K-H, AUNG, H-P, BOCOLA, M., SCHLEPER, S., 2000, "Dynamics of a Mobile Loop at the Active Site of *Escherichia coli* Asparaginase." *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1481, pp. 349-359.
- ROLLINI, M., BARBIROLI, A., BONOMI, F., CAPRETTI, G., IAMETTI, S., MANZONI, M., PIERGIOVANNI, L., 2012. "Antimicrobial Activity of Lysozyme and Lactoferrin Incorporated in Cellulose-Based Food Packaging". *Food Control*, v. 27, pp. 387-392.
- ROTELLO, M. V., KIM, K. C., DE, M., HAN, G., GHOSH, P., 2008, "Gold Nanoparticles in Delivery Applications." *Advanced Drug Delivery Reviews* v. 60, pp. 1307-1315.
- SANDLER, S. R., KARO, W., BONESTEEL, J-A., PEARCE, E. M., 1998, "Polymer Synthesis and Characterization." Academic Press.
- SARAVANAN, R., SHANMUGAM, A., ASHOK, P., KUMAR, D.S., ANAND, K., SUMAN, A., DEVADOSS, F.R., 2007. "Studies on Isolation and Partial Purification of Lysozyme from egg white of the Lovebird (*Agapornis species*)". *African Journal of Biotechnology*, v. 8, pp. 107-109.
- SCAMAN, C., NAKAI, S., AMINLARI, M., 2005., "Effect of pH, Temperature and Sodium Bisulfite or Cysteine on the Level of Maillard-Based Conjugation of

- Lysozyme with Dextran, Galactomannan and Mannan". Food Chemistry, v. 9, pp. 368-380.
- SCOTTI, C., CAPPELLETTI, D., CHIARELLI, L.R., PASQUETTO, M.V., STIVALA, S., VALENTINI, G., 2008, "*Helicobacter pylori* L-asparaginase: A Promising Chemotherapeutic Agent." Biochemical and Biophysical Research Communications v. 377. pp. 1222 - 1226.
- SEKHON, B.S., KAMBOJ, S.R., 2010, "Inorganic Nanomedicine – Part 1." Nanomedicine.
- SEKHON, B.S., KAMBOJ, S.R., 2010, "Inorganic Nanomedicine – Part 2." Nanomedicine.
- SEVILLA, P. RIVAS, J.M., BLANCO, F., GARCÍA-RAMOS, J. V., SÁNCHEZ-CORTÉS, S., 2007, " Identification of the Antitumoral Drug Emodin Binding Sites in Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Methods". Biochimica et Biophysica Acta, v. 1774, pp. 1359-1369.
- SHAMIM, N., LIANG, H., HIDAJAT, K., UDDIN, M.S., 2008, Adsorption, Desorption, and Conformational Changes of Lysozyme from Thermosensitive Nanomagnetic Particles. Journal of Colloid and Interface Science, v. 320, pp. 15-21.
- SHAW, D. J., 1975. Introdução à Química dos Colóides e de Superfície. São Paulo: Edgar Blucher Ltda.
- SHERWOOD, R. F., 1996, "Advanced Drug Delivery Reviews: Enzyme Prodrug Therapy" Advanced drug delivery reviews, v. 22, pp. 269-288.
- SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X., KIEMLE, D.J., 2006, "Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos."Ed. 1, Ed. LTC.
- SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J., 2005, "Fundamentos de Química Analítica." ed. 8, Ed. Pioneira.
- SMITH, S.C.S., AHMED, F., GUTIERREZ, K.M., RODRIGUES, D.F., 2014, A Comparative Study of Lysozyme Adsorption with Graphene, Graphene Oxide,

- and Single-Walled Carbon Nanotubes: Potential Environmental Applications. *Chemical Engineering Journal*, v. 240, pp. 147-154.
- STEVENS, M.P., 1999, "Polymer Chemistry – Na Introduction" 3 ed. Ed. Oxford University Press, New York,.
- STRELKOV, S.V., LEYSEN, S., VAN HERREWEGHE, J.M., CALLEWAERT, L., HEIRBAUT, M., MICHIELS, C.W., BUNTINX, P., 2011. Molecular Basis of Bacterial Defense Against Host Lysozymes: X-ray Structure of Periplasmic Lysozyme Inhibitors Plil and PliC. *Journal Mol. Biol.* v. 5, pp. 1233-1245.
- SULKOWSKA, A., 2002, " Interaction of Drugs with Bovine and Human Serum Albumin". *Journal of Molecular Structure*, v. 614, pp. 227-232.
- TADARVARTHY, S.M., MOLLER, J.H., AMPLATZ, K., 1975, "Polyvinyl Alcohol (Ivalon) – a new Embolic Material." *Journal Roentgenol Radium ther Nucl Med.*, v. 125, pp. 609-616.
- TANYOLAÇ, D., SÖNMEZİSİK, H., ÖZDURAL, A.R., 2005, A Low Cost Porous Polyvinylbutyral Membrane for BSA Adsorption. *Biochemical Engineering Journal*, v. 22, pp. 221-228.
- TEIXEIRA, V.G., COUTINHO, F.M.B., GOMES, A.S., 2001, "Principais Métodos de Caracterização da Porosidade de Resinas à Base de Divinilbenzeno". *Química Nova*, v. 24, pp. 808-818.
- TIZZOT, M.R.P.A., FRÖHNER, C.R.A., GUGELMIN, C., GONÇALVES, D., HILL, J.A.G., LIMA, P.G.C., SILVA, C.J., BORSARI, A.P., FUNAYAMA, S., 2005, "Asparaginase [EC 3.5.1.1] de *Herbaspirillum seropedicae* HsZ₇₈." *Tuiti: Ciencia e Cultura.*, v. , pp. 53-72.
- UCHEGBU, I.F., SCHÄTZLEIN, A.G., 2006, "Polymer in Drug Delivery." ed. 1, Ed. LLC.
- UDDIN, M.S., SHAMIM, N., HONG, L., HIDAJAT, K., 2006, Thermosensitive-Polymer-Coated Magnetic Nanoparticles: Adsorption and Desorption of Bovine Serum Albumin, *Journal of Colloid and Interface Science*, 304, 1-8.

- ULIJN, V., R., MART, J. R., THORNTON, D., P., 2007, "Enzyme-Responsive Polymer Hydrogel Particles for Controlled Release." *Advanced Materials*, v. 19, pp. 1252-1256.
- VELLARD, M., 2003, "The Enzyme as Drug: Applications of Enzymes as Pharmaceuticals." *Current Opinion in Biotechnology* v. 14, pp. 444-450.
- VENDITTO, V.J., SZOKA, F.C. Jr, 2013, Cancer Nanomedicines: So Many Papers and so Few Drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, pp. 80-88.
- VOET, D. AND VOET, J.G., 1995, "Biochemistry." 2^a Edition, Wiley.
- VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J.M., GRAILLE, J., HAAS, M.J., 2000, "Customizing Lipases for Biocatalysis: a Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approches." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, pp. 113-148.
- WAHN, U., PETERS, T., Jr., SIRAGANIAN, R.P., 1980, " Allergenic and Antigenic Properties of Bovine Serum Albumin". *Molecular Immunology*. v. 18, pp. 19-28.
- WANG, Y., WANG, X., LUO, LUO, G., DAI Y., 2008, Adsorption of Bovin Serum Albumin (BSA) onto the Magnetic Chitosan Nanoparticles Prepared by a Microemulsion System. *Bioresource Technology*, v. 99, pp. 3881-3884.
- WANGKAM, T. YODMONGKOL, S., DISRATTAKIT, J., SUTAPUN, B., AMARIT, R., SOMBOONKAEW, A., SRIKHIRIN, T., 2012, Adsorption of Bovine Serum Albumin (BSA) on Polystyrene (PS) and its Acid Copolymer. *Current Applied Physics*, v. 12, pp. 44-52.
- WETHERBURN, M.W., 1967, "Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia." *Analytical Chemistry* v. 39, pp. 971-974.
- WIPF, P., FARAJI, H., A., 2009, "Nanoparticles in Cellular Drug Delivery." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* v. 17, pp. 2950-2962.
- WRISTON, C., WHELAN,, H.A., 1969, "Purification and Properties of Asparaginase from *Escherichia coli* B." *Biochemistry*. v. 8 , pp. 2386-2393.

- WLODAWER, A., HOUSSET, D., JASKÓLSKI, M., SWAIN, A., RAO, J.K.M., 1993, "Crystal Structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an Enzyme Used in Cancer Therapy" *Biochemistry*. v. 90 , pp. 1474-1478.
- WRIGHT, K.C., ANDERSON, J.H, GIANTURCO, C., WALLACE, S., CHUANG, V.P., 1982, "Partial Splenic Embolization Using Polyvinyl Alcohol Foam, Dextran, Polystyrene, or Silicone." *Radiology*. v. 142, pp. 351-354.
- WRISTON, J.C., YELLIN, T.O., 1973, "L-asparaginase a Review." *Adv. Enzymolog.* v. 39, pp. 185-248.
- WRISTON, J.C.Jr, 1985, "L-asparaginase, In: *Method in Enzymology*." New York. v. 113.
- YANG, C. V., DAVID, E. A., GITLIN, D. S., PARK, J. Y., YOCKMAN, J., MOON, C., CHUNG, S. H., KWON, M. Y., 2009, "L-asparaginase Encapsulated Intact Erythrocytes for Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia (LLA)." *Journal of Controlled Release* v. 139, pp. 182-189.
- YUAN, H. G., KALFAS, G., RAY, W. H., 1991 "Suspension Polymerization", *Journal of Macromolecular Science – Reviews in Macromolecular Chemistry and physics*, pp. 215-299.
- YUAN, Y., LEE, R.T., 2013. "Contact Angle and Wetting Properties". *Surface Science Techniques - Chapter 1, Springer Series in Surface Sciences*.
- ZHANG, Y-Q, TAO, M-L, SHEN, W-D, ZHOU, Y-Z, DING, Y, MA, Y., ZHOU, W-L., 2003. " Immobilization of L-asparaginase on the Microparticles of the Natural Silk Sericin Protein and its Characters". *Biomaterials*, v. 25, pp. 3751-3759.
- ZHOU, Y, WANG, Z., ZHANG, Q.Z., XI, X., ZHANG, J., YANG, W., 2012, Equilibrium and Thermodynamic Studies on Adsorption of BSA Using PVDF Microfiltration Membrane. *Desalination*, v. 307, pp. 61-67.

Anexo A

Análise da área específica do PVAc-co-PMMA Resultado da análise específica por BET

UERJ-Laboratorio de caracterizacao instrumental II

ASAP 2020 V3.01 E

Unit 1

Serial #: 858

Page 1

Sample: Pvac co PMMA - 1
Operator: Juan
Submitter: Marcos Costa
File: C:\2020\DATA\000-472.SMP

Started: 04/07/2013 9:48:41	Analysis Adsorptive: N2
Completed: 04/07/2013 11:10:04	Analysis Bath Temp.: -195.637 °C
Report Time: 30/07/2013 12:24:14	Thermal Correction: No
Sample Mass: 0.7411 g	Warm Free Space: 16.0437 cm ³ Measured
Cold Free Space: 46.7614 cm ³	Equilibration Interval: 15 s
Low Pressure Dose: None	Automatic Degas: Yes

Summary Report

Surface Area

Langmuir Surface Area: 0.0202 m²/g

UERJ-Laboratorio de caracterizacao instrumental II

ASAP 2020 V3.01 E

Unit 1

Serial #: 858

Page 2

Sample: Pvac co PMMA - 1
 Operator: Juan
 Submitter: Marcos Costa
 File: C:\2020\DATA\000-472.SMP

Started: 04/07/2013 9:48:41
 Completed: 04/07/2013 11:10:04
 Report Time: 30/07/2013 12:24:14
 Sample Mass: 0.7411 g
 Cold Free Space: 46.7614 cm³
 Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
 Analysis Bath Temp.: -195.637 °C
 Thermal Correction: No
 Warm Free Space: 16.0437 cm³ Measured
 Equilibration Interval: 15 s
 Automatic Degas: Yes

Isotherm Tabular Report

Relative Pressure (P/Po)	Absolute Pressure (mmHg)	Quantity Adsorbed (mmol/g)	Elapsed Time (h:min)	Saturation Pressure (mmHg)
			00:55	774.491211
0.012119145	9.386171	0.00031	01:08	
0.023706374	18.360378	0.00030	01:12	
0.034973428	27.086613	0.00023	01:14	

UERJ-Laboratorio de caracterizacao instrumental II

ASAP 2020 V3.01 E

Unit 1

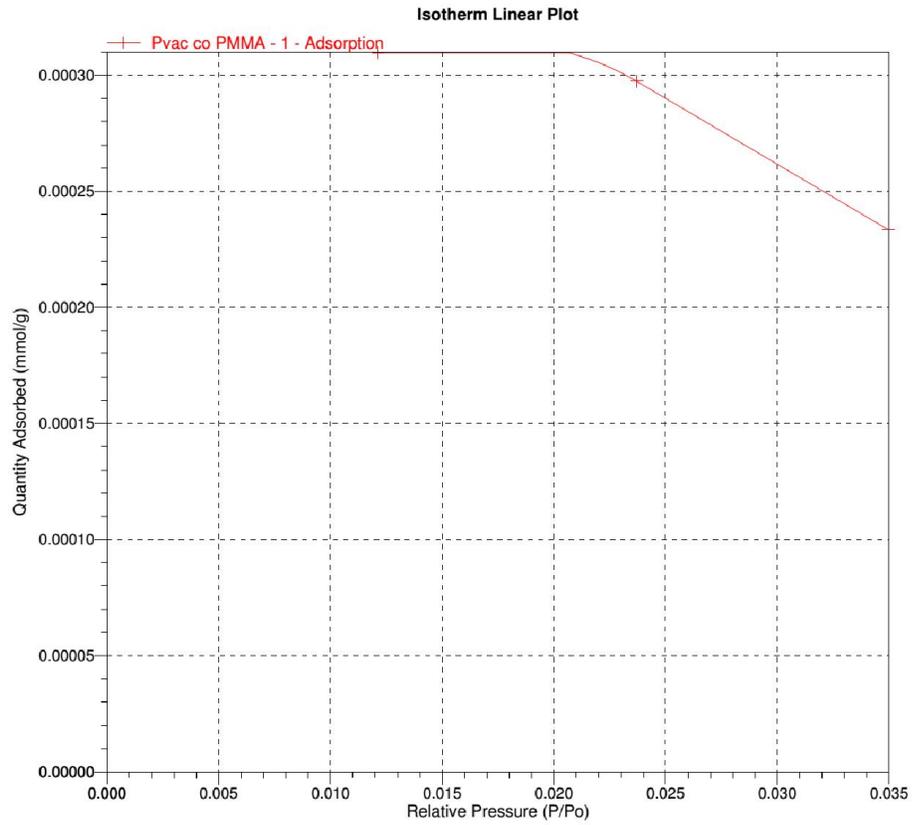
Serial #: 858

Page 3

Sample: Pvac co PMMA - 1
Operator: Juan
Submitter: Marcos Costa
File: C:\2020\DATA\000-472.SMP

Started: 04/07/2013 9:48:41
Completed: 04/07/2013 11:10:04
Report Time: 30/07/2013 12:24:14
Sample Mass: 0.7411 g
Cold Free Space: 46.7614 cm³
Low Pressure Dose: None

Analysis Adsorptive: N2
Analysis Bath Temp.: -195.637 °C
Thermal Correction: No
Warm Free Space: 16.0437 cm³ Measured
Equilibration Interval: 15 s
Automatic Degas: Yes



Anexo B

Resultados das análises de DSC para o PVAc

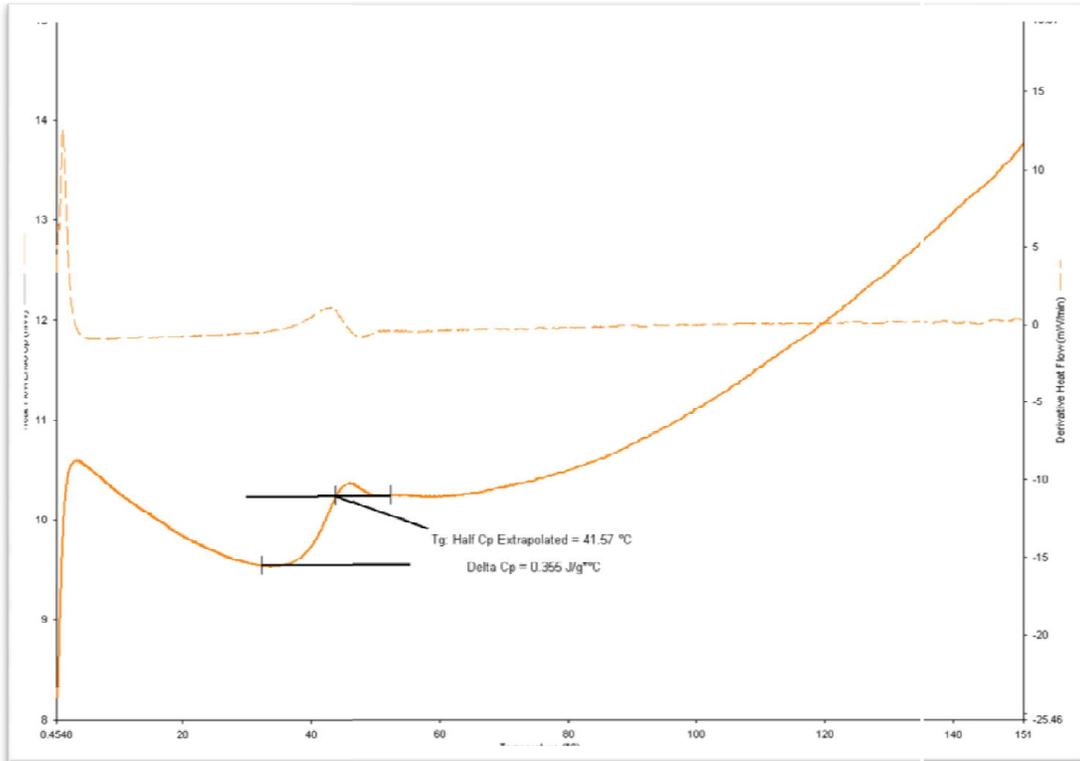


Figura B. 1: Curva de DSC do produto da reação R-11- PVAc.

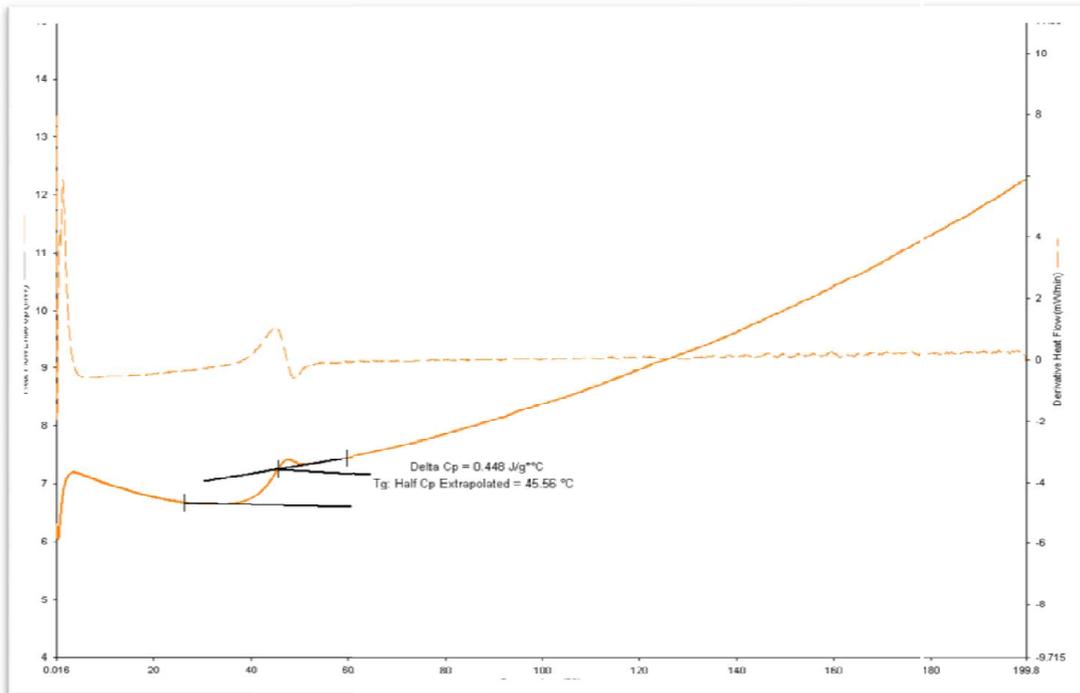


Figura B. 2: Curva de DSC do produto da reação R-10- PVAc.

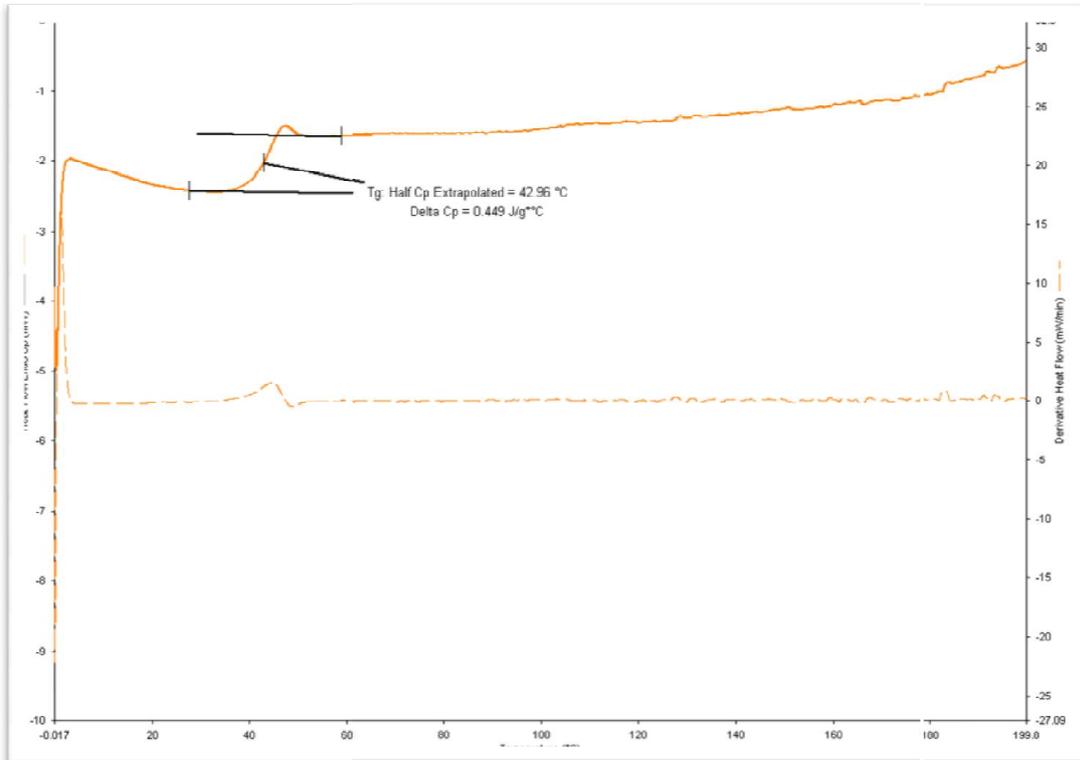


Figura B. 3: Curva de DSC do produto da reação R-7- PVAc.

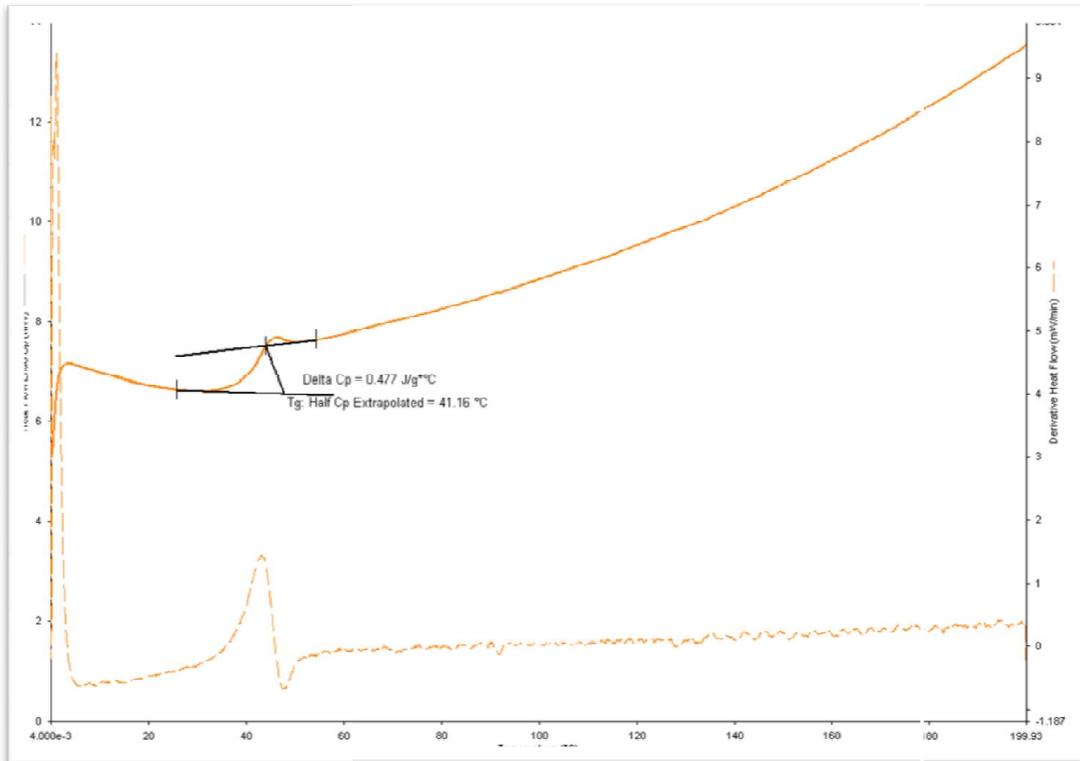


Figura B. 4: Curva de DSC do produto da reação R-6- PVAc.

Resultados das análises de DSC para o PVAc-co-PMMA

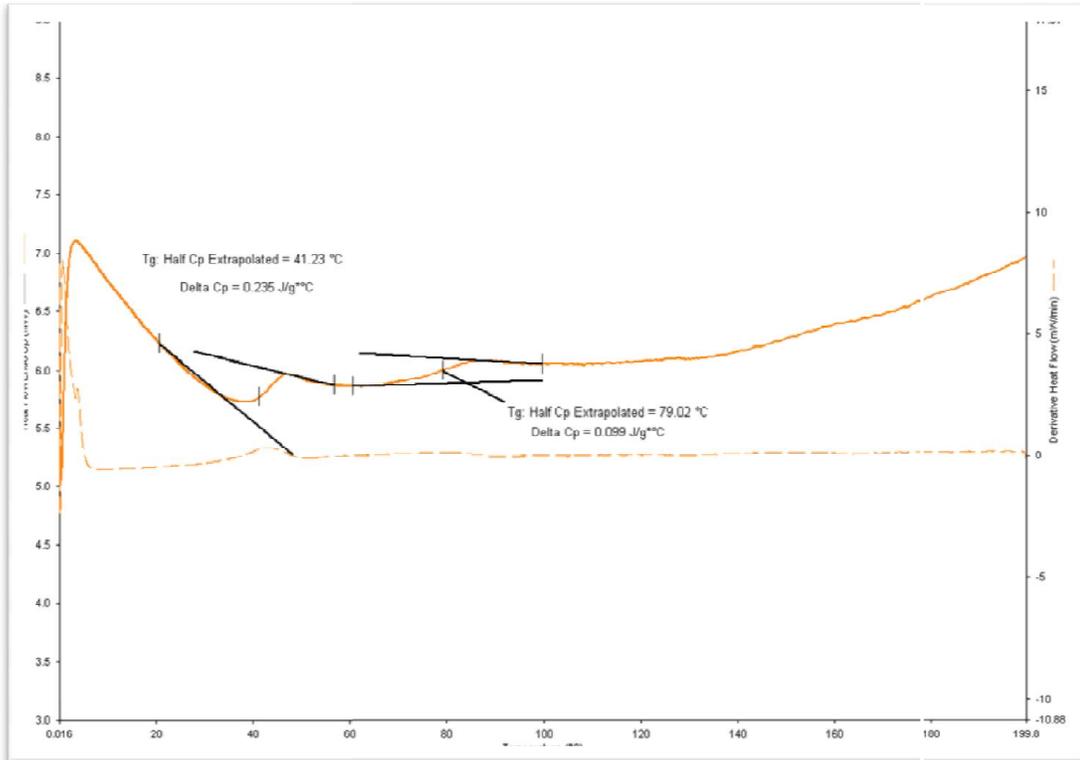


Figura B. 5: Curva de DSC de uma das reações de PVAc-co-PMMA.

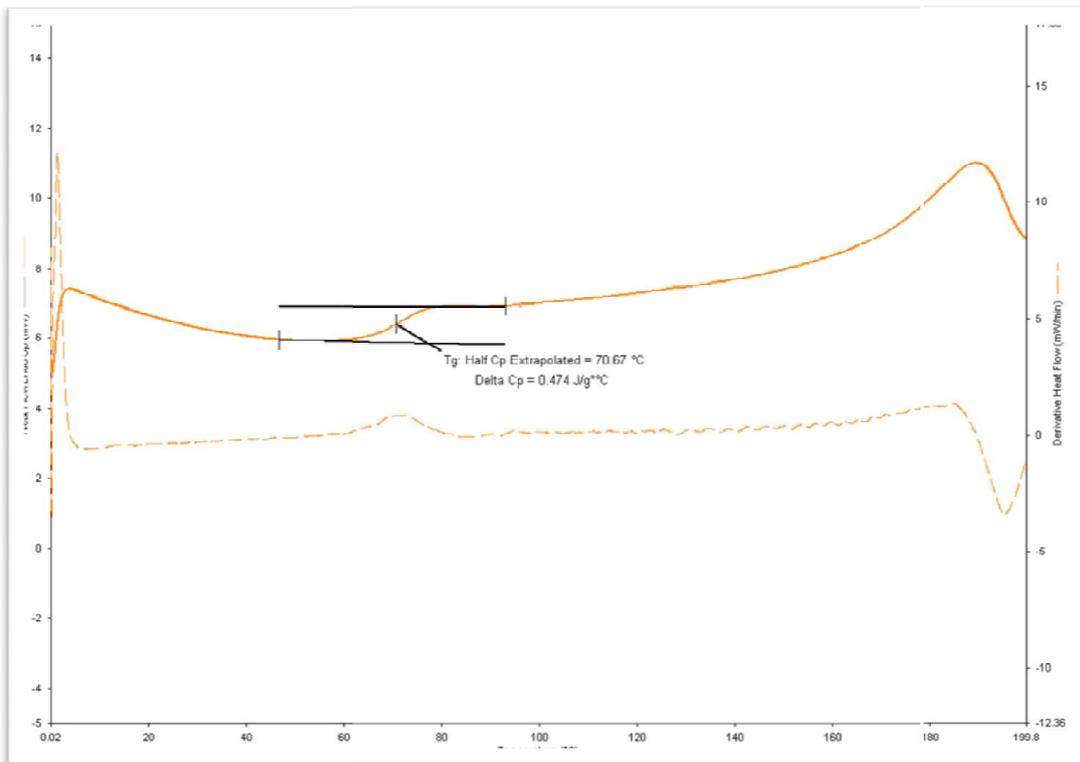


Figura B. 6: Curva de DSC de uma das reações de PVAc-co-PMMA.

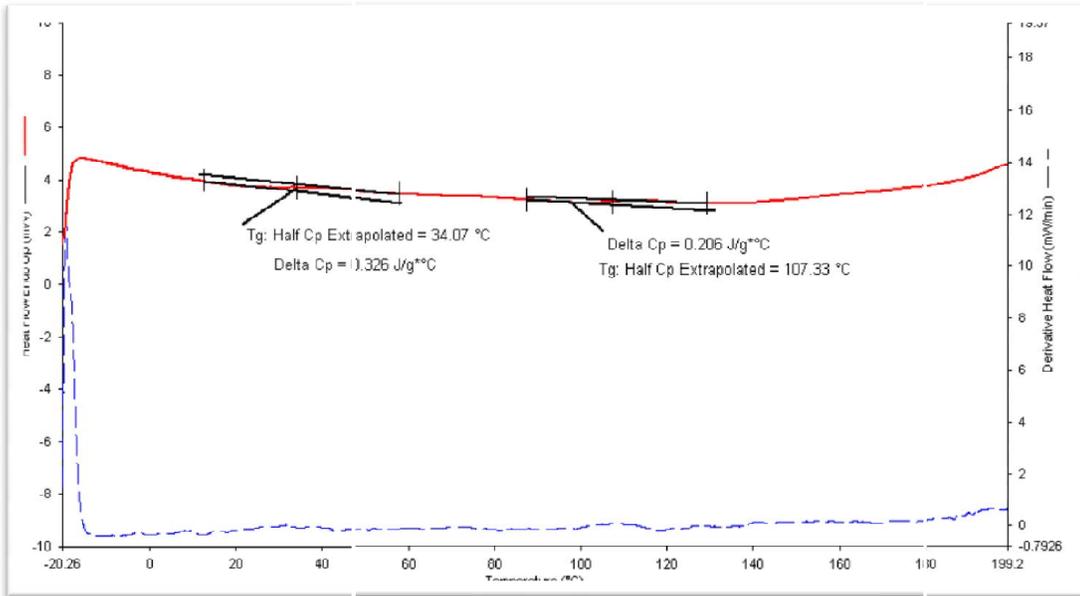


Figura B. 7: Curva de DSC da amostra de PVAc emulsão.