



Obtenção de Nanopartículas de Poli(ácido acrílico) via Miniemulsão Inversa com Potencial para Carreamento de Fármacos

Daniel Mendonça Moreira

Nathany Lisbôa de Souza e Castro

Projeto de Final de Curso

Orientadores

Prof. Márcio Nele de Souza, DSc.

Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, DSc.

Marcel Guimarães Martins, MSc.

Agosto de 2017

OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ÁCIDO ACRÍLICO) VIA MINIEMULSÃO INVERSA COM POTENCIAL PARA CARREAMENTO DE FÁRMACOS

Daniel Mendonça Moreira

Nathany Lisbôa de Souza e Castro

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Química Industrial.

Aprovado por:

Luis Claudio Mendes, D.Sc.

Martina Costa Cerqueira Pinto, M.Sc.

Israel Bernardo de Souza Poblete, Eng.

Orientado por:

Márcio Nele de Souza, D.Sc.

José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.

Marcel Guimarães Martins, M.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Agosto de 2017

Moreira, Daniel Mendonça.

Castro, Nathany Lisbôa de Souza.

Obtenção de Nanopartículas de Poli(ácido acrílico) via Miniemulsão Inversa com Potencial para Carreamento de Fármacos / Daniel Mendonça Moreira e Nathany Lisbôa de Souza e Castro. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2017.

xiv, 82 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2017.

Orientadores: Márcio Nele de Souza, José Carlos Costa da Silva Pinto e Marcel Guimarães Martins.

1. Polimerização. 2. Ácido acrílico. 3. Bioconjugação. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Márcio Nele de Souza, José Carlos Costa da Silva Pinto e Marcel Guimarães Martins. I. Título.

Às nossas famílias, nossos amigos e nossos professores, que nos apoiaram, ajudando a
construir nosso caráter e conhecimento.

“Andar por caminhos conhecidos só leva aonde os outros já foram.”

- Alexander Graham Bell

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecemos aos nossos familiares – Jorge, Margareth, Marcella, Roseli, Sylvia, Ana Cláudia, Ana Paula, Ana Carolina, Erick, Letícia, Mariana – por todo apoio, suporte, incentivo e força ao longo de nossas vidas, principalmente nos momentos em que mais precisamos.

À Beatriz e ao Rafael Marcondes, pelo carinho, pelos sorrisos, momentos de descontração e por toda a paciência em toda a nossa jornada.

Aos nossos muito estimados amigos da Escola de Química – Desirée, Evelin, Israel, Izabella, Rafael Coelho, Renan – que estiveram conosco durante a graduação, nos incentivando, sofrendo, nos fazendo rir e nos ajudando. Sem vocês o caminho seria muito mais longo, difícil e chato. Obrigada pela amizade e por serem pessoas incríveis.

À Martina, por todo o ensinamento passado durante os anos como orientadora de Iniciação Científica e por toda a confiança depositada, nos permitindo crescer academicamente, sendo, ao mesmo tempo, uma pessoa carinhosa e cuidadosa. Agradecemos profundamente por todo o tempo a nós dedicado.

Aos nossos orientadores – Márcio, Marcel e José Carlos – pela confiança e amizade, além de sua vasta experiência transmitida, profissional, ética e interpessoal.

Aos integrantes dos laboratórios LMSCP e EngePol, em especial Fred, Jorge, Larissa, Nathalie, Juliana, Thamiris, Iza, Ricardo, e Débora Way, por toda a ajuda e conhecimento compartilhado.

Aos professores da Escola de Química, pelos ensinamentos e desafios, pela sabedoria compartilhada e pela construção do nosso conhecimento, nos permitindo chegar ao final da faculdade de Química Industrial.

À UFRJ e à Fundação COPPETEC, pelo apoio financeiro.

Finalmente, a todos aqueles que, de alguma forma, nos inspiraram e passaram pelas nossas vidas, nos ajudando a construir o nosso caminho e chegar até aqui.

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Química Industrial.

**OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(ÁCIDO ACRÍLICO) VIA
MINIEMULSÃO INVERSA COM POTENCIAL PARA CARREAMENTO DE
FÁRMACOS**

Daniel Mendonça Moreira

Nathany Lisbôa de Souza e Castro

Agosto de 2017

Orientadores: Prof. Márcio Nele de Souza, D.Sc.

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

Marcel Guimarães Martins, M.Sc.

O presente trabalho apresenta estudos sobre a síntese de partículas poliméricas de poli(ácido acrílico) obtidas por polimerização em miniemulsão inversa, bem como a bioconjugação destas partículas com ácido fólico. De forma a aumentar o potencial de uso das partículas poliméricas para aplicações biomédicas, as reações em miniemulsão inversa contaram com o emprego de um agente reticulante, que promove o entrelaçamento da estrutura polimérica e reduz propriedades indesejadas de hidrogel para tais aplicações, como inchamento e solubilidade em meio aquoso. Com o auxílio também de um planejamento experimental, avaliando variáveis como temperatura e carga de reticulante empregada, verificou-se que o controle desses mesmos parâmetros é imprescindível para evitar a aglomeração das partículas formadas e decréscimo no rendimento reacional. Apesar de terem sido sintetizados polímeros reticulados, foi constatado que tal material apresentou uma temperatura de transição vítrea de 71,7 °C e teor de inchamento na faixa de 200 % a 300 %, devido à possível reticulação apenas parcial do produto. Com relação à bioconjugação de ácido fólico na superfície das moléculas poliméricas, foi avaliado tanto a rota de adsorção química através da ativação com carbodiimida quanto a rota de simples mistura entre os compostos. Partindo de ambas as rotas, que se mostraram eficazes, pode ser elaborado um sistema de entrega de fármacos dirigida a receptores folato, bem como estender a proposta para outros sistemas, uma vez que se altere o marcador.

ÍNDICE

Capítulo I Introdução	1
I.1 - Introdução.....	1
I.2 - Objetivos	3
Capítulo II Revisão Bibliográfica.....	4
II.1 - Polímeros	4
II.2 - Técnicas de Polimerização	6
II.2.1 - Polimerização em Massa.....	6
II.2.2 - Polimerização em Solução	7
II.2.3 - Polimerização em Suspensão	7
II.2.4 - Polimerização em Emulsão.....	7
II.2.5 - Polimerização em Miniemulsão.....	9
II.3 - Poli(ácido acrílico).....	11
II.3.1 - Processos de Polimerização do Ácido Acrílico.....	14
II.3.2 - Metodologias para Obtenção de Partículas de PAA.....	15
II.3.3 - Reticulação	19
II.4 - Modificação de Polímeros	21
II.4.1 - PAAs Modificados para Aplicações Biomédicas.....	21
II.4.2 - Adsorção de Biomoléculas em Polímeros.....	23
II.4.3 - Bioconjugação com Ácido Fólico.....	25
Capítulo III Metodologia Experimental.....	28
III.1 - Materiais	28
III.1.1 - Reações de Polimerização	28
III.1.1.1 - Polimerização em Solução	28
III.1.1.2 - Polimerização em Miniemulsão Inversa.....	29
III.1.2 - Reações de Bioconjugação.....	30
III.2 - Procedimento Experimental.....	31
III.2.1 - Reações de Polimerização	31
III.2.1.1 - Polimerização em Solução	32
III.2.1.2 - Polimerização em Miniemulsão Inversa.....	33
III.2.2 - Reações de Bioconjugação.....	35
III.3 - Caracterizações e Especificações de Equipamentos	36
III.3.1 - Análise da Conversão	36
III.3.2 - Análises de Inchamento e Solubilidade	37

III.3.3 - Análise Termogravimétrica (TGA)	37
III.3.4 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	37
III.3.5 - Espectroscopia na Região de Ultravioleta e Visível (UV-vis).....	38
III.3.6 - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	38
III.3.7 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
III.3.8 - Reologia	39
III.4 - Planejamento Experimental	39
Capítulo IV Resultados e Discussão	41
IV.1 – Reações de Polimerização	41
IV.1.1 - Conversão	41
IV.1.2 – Inchamento e Solubilidade.....	44
IV.1.3 - Análises Térmicas	47
IV.1.3.1 - Análise Termogravimétrica (TGA)	48
IV.1.3.1.1 - Polimerização em Solução	48
IV.1.3.1.2 - Polimerização em Miniemulsão Inversa	49
IV.1.3.2 – Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	50
IV.1.4 – Morfologia das Partículas.....	51
IV.1.4.1 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	51
IV.2 – Bioconjugação.....	53
IV.2.1 - Pré-Tratamento	53
IV.2.2 – Conjugação do Ácido Fólico	54
IV.3 - Análise Estatística	58
Capítulo V Conclusões e Perspectivas.....	62
Capítulo VI Referências Bibliográficas.....	65
Apêndice A	73
Apêndice B	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Hidrólise da celulose, um polímero natural. (Fonte: adaptado de ODIAN (2004).).....	5
Figura 2 - Esquema de algumas espécies presentes em uma polimerização em emulsão (M = monômero, R-X = cadeia polimérica crescente). (Fonte: adaptado de BRAUN et al. (2012).).....	9
Figura 3 - Esquema da técnica de polimerização em mini emulsão. (Fonte: adaptado de LANDFESTER (2006).).....	10
Figura 4 – Estrutura do poli(ácido acrílico). (Fonte: adaptado de Sigma-Aldrich.).....	12
Figura 5 – Processo de absorção de água por um polímero acrílico: (a) partícula de material superabsorvente após absorção de água (esquerda) e seca (direita); (b) expansão das cadeias poliméricas após a absorção de água pelo material. (Fonte: adaptado de ZOHURIAAN-MEHR e KABIRI (2008).).....	13
Figura 6 - Reticulação versus ciclização. (Fonte: adaptado de ELLIOTT et al. (2004).).....	20
Figura 7 – Estrutura do dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) (Fonte: adaptado de Sigma-Aldrich.).....	21
Figura 8 - Fórmula estrutural do ácido fólico e seus componentes. (Fonte: adaptado de LITWACK (2008).).....	26
Figura 9 - Etapas da reação de bioconjugação. (Fonte: adaptado de SCIENTIFIC (2012).).....	27
Figura 10 - Sistema de bécheres encamisados em banho termostático, empregado nas polimerizações em solução do ácido acrílico, com diferentes teores de reticulante. (Fonte: elaboração própria.).....	29
Figura 11 - Unidade experimental empregada na produção de nanopartículas poliméricas de ácido acrílico, por meio de polimerização em miniemulsão inversa. (Fonte: elaboração própria.).....	30
Figura 12 - Sistema de agitação de tubos. (Fonte: elaboração própria.).....	31
Figura 13 – Início da etapa de purificação das partículas de PAA obtidas por reação de polimerização em miniemulsão inversa. (Fonte: elaboração própria.).....	35
Figura 14 – Conversão alcançada (%) em relação ao tempo de reação (min), em diferentes temperaturas. (Fonte: elaboração própria.).....	43
Figura 15 – Conversão alcançada (%) em relação ao tempo de reação (min), em relação ao momento de adição do iniciador. (Fonte: elaboração própria.).....	43
Figura 16 - Média percentual de água absorvida por teor de reticulante. (Fonte: elaboração própria.).....	45
Figura 17 – Percentual de polímero solubilizado por teor de reticulante. (Fonte: elaboração própria.).....	46
Figura 18 - PAAs obtidos via polimerização em solução pré-maceração, com teores mássicos (p/p) de EGDMA iguais a: (A) 0%; (B) 3%; (C) 7%; (D) 10%; (E) 15%; (F) 30%; (G) 40%; (H) 42%; (I) 45%. (Fonte: elaboração própria.).....	47
Figura 19 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 15% p/p de EGDMA. (Fonte: elaboração própria.).....	49
Figura 21 - TGA de partículas de PAA obtidas por polimerização em miniemulsão inversa. (Fonte: elaboração própria.).....	50

Figura 22 - DSC de partículas de PAA obtidas por polimerização em miniemulsão inversa. (Fonte: elaboração própria.)	51
Figura 23 - MEV das partículas de PAA obtidas por polimerização em miniemulsão inversa. (Fonte: elaboração própria.)	52
Figura 24 - Espectros de UV-vis dos sobrenadantes contendo AF residual. (Fonte: elaboração própria.)	54
Figura 25 - Espectros de FTIR dos compostos antes e depois da bioconjugação. (Fonte: elaboração própria.)	55
Figura 26 - Espectros de FTIR de bioconjugados: através da ativação por carbodiimida; através de ensaio em branco em solução tampão; através de ensaio em branco em água ultrapura. (Fonte: elaboração própria.)	56
Figura 27 - Correlação entre os valores de intensidade dos espectros de FTIR do polímero puro e do bioconjugado por ativação. (Fonte: elaboração própria.)	57
Figura 28 - Correlação entre os valores de intensidade dos espectros de FTIR do produto do ensaio em branco em água e do bioconjugado por ativação. (Fonte: elaboração própria.)	58
Figura 29 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução em ausência de EGDMA	73
Figura 30 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 3% p/p de EGDMA	73
Figura 31 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 7% p/p de EGDMA	74
Figura 32 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 10% p/p de EGDMA	74
Figura 33 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 30% p/p de EGDMA	75
Figura 34 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 40% p/p de EGDMA	75
Figura 35 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 42% p/p de EGDMA	76
Figura 36 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 45% p/p de EGDMA	76
Figura 37 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (1,1,1) do planejamento experimental	77
Figura 38 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (1,1,-1) do planejamento experimental	77
Figura 39 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (1,-1,1) do planejamento experimental	78
Figura 40 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (1,-1,-1) do planejamento experimental	78
Figura 41 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (-1,1,1) do planejamento experimental	79
Figura 42 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (-1,1,-1) do planejamento experimental	79
Figura 43 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (-1,-1,1) do planejamento experimental	80
Figura 44 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (-1,-1,-1) do planejamento experimental	80
Figura 45 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para o 1º ponto central do planejamento experimental	81

Figura 46 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para o 2º ponto central do planejamento experimental.....	81
Figura 47 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para o 3º ponto central do planejamento experimental.....	82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Proporções de reagentes das reações em solução. (Fonte: elaboração própria.)	32
Tabela 2 - Composição mássica das fases da miniemulsão. (Fonte: elaboração própria.)	33
Tabela 3 - Variáveis de entrada do sistema e seus respectivos limites (Fonte: elaboração própria.)	40
Tabela 4 - Resultados numéricos das variáveis de saída do planejamento associados com cada condição de experimento utilizada. (Fonte: elaboração própria.)	59
Tabela 5 - Tratamento de dados do ponto central. (Fonte: elaboração própria.)	59
Tabela 6 - Matriz de correlação entre variáveis de entrada e de saída do planejamento experimental. (Fonte: elaboração própria.)	60

LISTA DE SIGLAS

AA	ácido acrílico
AF	ácido fólico
AIBN	azobisisobutironitrila
APS	persulfato de amônio
BPO	peróxido de benzoíla
CMC	concentração micelar crítica
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DSC	calorimetria exploratória diferencial
DVB	divinilbenzeno
EDC	1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida
EPR	<i>enhanced permeability and retention</i> (permeabilidade e retenção aumentada)
EGDMA	dimetacrilato de etilenoglicol
EngeCol	Laboratório de Engenharia de Coloides
EngePol	Laboratório de Engenharia de Polímeros
FTIR	espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
HEMA	hidroxietil metacrilato
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
MBA	metilenobisacrilamida
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MPS	γ -(trimetoxisilil) propil metacrilato
O/W	óleo em água
p/p	peso por peso
PAA	poli(ácido acrílico)
PAN	poliacrilonitrila
PE	polietileno

PEAD	polietileno de alta densidade
PEBD	polietileno de baixa densidade
PEG	poli(etileno glicol)
PEGDMA	poli(dimetacrilato de etilenoglicol)
PMMA	poli(metacrilato de metila)
PP	polipropileno
PS	poliestireno
PVC	poli(cloreto de vinila)
SAP	<i>superabsorbent polymers</i> (polímeros superabsorventes)
TAOE	tetraaliloxietano
Tg	temperatura de transição vítrea
TGA	análise termogravimétrica
TMEDA	tetrametiletilenodiamina
TMPTA	1,1,1-trimetilolpropano triacrilato
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV-vis	espectroscopia na região de ultravioleta e visível
W/O	água em óleo

Capítulo I

Introdução

I.1 - Introdução

Produzido a partir da reação de polimerização do ácido acrílico, o poli(ácido acrílico) (PAA) é um polímero hidrossolúvel, hidrofílico e biocompatível, além de possuir baixo custo. Entre as suas diversas aplicações, podem ser destacados seus usos como agentes espessantes, adesivos, dispersantes e floculantes. O hidrogel formado pelo PAA é amplamente utilizado para a produção de polímeros superabsorventes (SAP, do inglês *superabsorbent polymers*) devido à sua capacidade de absorver quantidades de água, que superam significativamente a sua própria massa, sem que ocorra a sua solubilização. Para minimizar a absorção de água pelo hidrogel, pode ser feita a adição, ao sistema, de um agente reticulante de cadeia. Vale ressaltar que é possível obter diversos níveis de reticulação, variando a concentração do reticulante, o que permite a manipulação de propriedades físico-químicas do produto final (LIM *et al.*, 2002; ODIAN, 2004; ZOHURIAAN-MEHR e KABIRI, 2008).

Os diversos processos de polimerização existentes podem ser classificados em homogêneos e heterogêneos. Processos de polimerização em massa e em solução são homogêneos; processos como os de suspensão, emulsão e miniemulsão – diretos ou inversos – são classificados como heterogêneos e dispõem de duas fases reacionais dispersas imiscíveis entre si (ODIAN, 2004). Para a produção comercial do PAA, a técnica de polimerização em solução é a mais amplamente utilizada, enquanto que para a produção de partículas poliméricas os sistemas heterogêneos são mais indicados. Dentre essas técnicas, a de miniemulsão inversa possui grande destaque. Seu diferencial está na formação de gotículas que atuam como nanorreatores no sistema reacional, garantindo sua autonomia e minimizando perturbações externas (ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002; ZOHURIAAN-MEHR e KABIRI, 2008).

As nanopartículas poliméricas apresentam grande estabilidade quando em contato com fluidos biológicos, além de tornar possível a existência de sistemas de liberação controlada. Devido a diversos fatores detalhados no presente trabalho, tais partículas são potenciais carreadores de bioativos que podem ser utilizados em vacinas e na fabricação de

sistemas nanoestruturados para tratamento de câncer (BAJPAI *et al.*, 2008). Ante esse potencial, vários estudos baseados em estratégias de direcionamento e liberação têm sido realizados, com o intuito de desenvolver nanopartículas poliméricas cada vez mais eficazes no carregamento de bioativos, de modo a evitar a degradação do fármaco através dos mais diversos ambientes no organismo e aumentar a precisão de direcionamento. Como consequência, efeitos colaterais resultantes do tratamento com agentes químicos tóxicos a tecidos mais saudáveis podem ser atenuados, ou até mesmo eliminados, com o emprego de nanopartículas poliméricas especializadas (WANG e REMPEL, 2015).

As principais estratégias visadas no direcionamento de fármacos incluem: aproveitamento do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (do inglês EPR – *enhanced permeability and retention*); sensibilidade a estímulos químicos ou físicos do ambiente; utilização de biomarcadores ligantes. O efeito de permeabilidade e retenção aumentada acontece quando nanopartículas (10 a 500 nm) de superfícies hidrofílicas atravessam e são retidas em aberturas existentes no tecido próximo à parede de vasos sanguíneos. Em tecidos tumorais, as células não possuem a capacidade de gerar um revestimento bem definido em função de seu rápido desenvolvimento, gerando muitas aberturas. Portanto, utiliza-se desse efeito para se desenvolver sistemas poliméricos capazes de acumular o fármaco transportado a tumores de forma passiva. Já a estratégia de sensibilidade a estímulos se utiliza da propriedade de alguns monômeros responderem ativamente a sinais do ambiente e mudarem sua estrutura físico-química. Esses monômeros podem produzir homopolímeros ou copolímeros carreadores com as mesmas propriedades, resultando na liberação ativa do fármaco encapsulado apenas quando estímulos como variações no pH, temperatura ou força iônica ocorrerem no ambiente fisiológico. Finalmente, a utilização de biomarcadores decorre da conjugação de biomoléculas como anticorpos, carboidratos ou vitaminas às nanopartículas poliméricas empregadas no encapsulamento. Essa última estratégia, estudada no presente trabalho, permite que o biomarcador induza o transporte ativo de fármacos a receptores específicos, presentes em células não saudáveis (GRANADA *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009).

Dentre as inúmeras metodologias de ligação de biomoléculas a polímeros, destaca-se a bioconjugação, técnica que permite a combinação química entre duas ou mais substâncias, sendo pelo menos uma de origem biológica, para formar um novo sistema com as propriedades de seus componentes individuais. Diferentes procedimentos podem ser utilizados na tentativa de realizar a bioconjugação, porém todos resultarão na reação entre

pelo menos dois grupos funcionais e a formação de ligações covalentes (VAIDYA *et al.*, 2011; HERMANSON, 2013).

O polímero estudado nesse trabalho, poli(ácido acrílico), pode fornecer a proteção ao fármaco encapsulado e a biocompatibilidade necessárias a um nanocarreador resultante da bioconjugação desse material com um biomarcador ligante. De outro lado, é sabido que o ácido fólico (biomarcador ligante estudado no presente trabalho) é um forte direcionador de nanopartículas a receptores folato, com concentração abundante em células tumorais e não significativa em células saudáveis. Nesse sentido, o presente trabalho visa ao desenvolvimento de nanopartículas de PAA bioconjugadas com ácido fólico, com o potencial para carregamento sítio dirigido de quimioterápicos para células tumorais específicas. (VENKATASUBBU *et al.*, 2013).

I.2 - Objetivos

O trabalho teve como objetivos gerais obter nanopartículas de poli(ácido acrílico), a partir da técnica de polimerização em miniemulsão inversa, e bioconjugar tais partículas poliméricas com ácido fólico, visando a potenciais aplicações no encapsulamento de ativos hidrofílicos dotados de mecanismo de entrega sítio-dirigida. Especificamente, buscou-se efetuar estudos acerca de metodologias de polimerização que viabilizam a obtenção de partículas de poli(ácido acrílico) com dimensões submicrométricas e do método de bioconjugação utilizado. Tais estudos incluem: realizar reações de polimerização em solução como estudos exploratórios, de modo a avaliar mais simplesmente determinadas características do material; conduzir reações de polimerização em miniemulsão inversa, procurando examinar as variáveis operacionais desse sistema, bem como as propriedades físico-químicas das partículas obtidas; realizar um planejamento experimental, de modo a analisar as variáveis que interferem na polimerização via miniemulsão inversa; testar e investigar o mecanismo de bioconjugação empregado.

Capítulo II

Revisão Bibliográfica

II.1 - Polímeros

Polímeros são macromoléculas compostas pela combinação de monômeros através de uma reação química, chamada polimerização. A origem do nome vem do grego, sendo a fusão de *poli* com *meros* correspondente a muitas partes. O monômero é a unidade básica da cadeia polimérica e pode se combinar com moléculas de diferentes tipos para a formação do polímero (RUDIN e CHOI, 2012).

Polímeros naturais vêm sendo utilizados desde os primórdios, já que o homem sempre necessitou de recursos animais e vegetais para a sua sobrevivência. A aceitação da existência de macromoléculas, porém, se deu apenas nos anos 1920, com o trabalho de Hermann Staudinger, que lhe rendeu o prêmio Nobel de Química em 1953 (BILLMEYER, 1984). Em 1912, Leo Baekeland havia sintetizado o primeiro polímero sintético, uma resina fenólica hoje conhecida como baquelite. O produto foi obtido através da reação entre fenol e formaldeído. A partir daí, inúmeras sínteses foram realizadas e uma diversa gama de polímeros sintéticos foram produzidos (CANEVAROLO JR, 2006).

Segundo CANEVAROLO JR (2006), para ocorrer a reação de polimerização é necessário que hajam, pelo menos, dois pontos reativos na molécula do monômero. Estes pontos reativos são chamados de funcionalidade, definida por RUDIN e CHOI (2012) como o número de sítios disponíveis para ocorrer a reação, dentro de condições específicas. Sendo assim, para que ocorra a polimerização, o monômero deve possuir, no mínimo, bifuncionalidade. A funcionalidade é definida especificamente para cada reação e pode variar para um mesmo monômero, já que surge devido à insaturações ou grupos funcionais ativos do monômero. Além disso, ela é condição necessária, porém não suficiente para que ocorra a polimerização (RUDIN e CHOI, 2012).

A classificação dos polímeros pode ocorrer de diversas maneiras. Segundo MANO e MENDES (1999), eles podem ser classificados de acordo com a sua origem, a sua rota química de obtenção ou conforme a estrutura química da cadeia e, também, com outras características como taticidade e comportamento mecânico.

A classificação segundo a rota de obtenção surgiu em 1929, quando Wallace Carothers sugeriu a existência de dois grupos: polímeros de condensação e polímeros de adição (CAROTHERS, 1929). Paul Flory utilizou a classificação de Carothers, porém dando ênfase aos mecanismos de formação de cada tipo de polímero: polimerização em etapas e em cadeia (FLORY, 1953). Os polímeros de condensação são aqueles obtidos através de várias reações de condensação dos grupos funcionais das moléculas do monômero de origem. A definição original continha, ainda, a ideia de que polímeros de condensação se diferem de seus monômeros pela ausência de algum grupamento pequeno na unidade repetidora do monômero e, por isso, a celulose (figura 1) já foi considerada um polímero de condensação, já que sua hidrólise dá origem a glicose e água. Já os polímeros de adição foram classificados apenas como sendo aqueles que não perdem nenhum grupamento, ou seja, a composição do polímero é idêntica à do monômero (CAROTHERS, 1929; ODIAN, 2004). Na classificação de Flory, apenas as diferenças entre os processos de obtenção são importantes. A polimerização em etapas ocorre através da condensação de grupos funcionais e a polimerização em cadeia ocorre através de um mecanismo envolvendo centros ativos (FLORY, 1953).

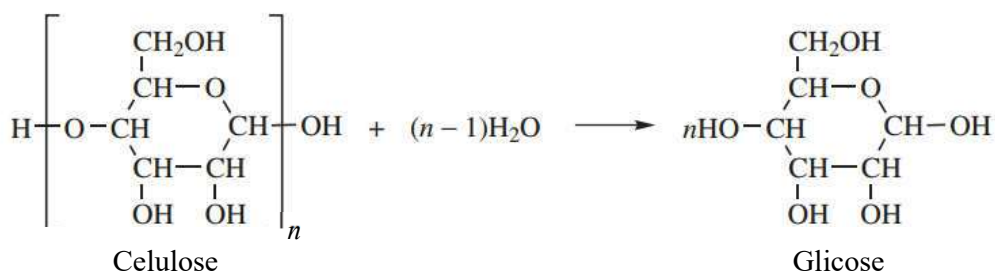


Figura 1 - Hidrólise da celulose, um polímero natural. (Fonte: adaptado de ODIAN (2004).)

É possível realizar uma classificação de acordo com a estrutura química da cadeia polimérica: polímeros de cadeia carbônica e polímeros de cadeia heterogênea. Os primeiros são compostos por poliolefinas, polímeros acrílicos, polímeros halogenados, estirênicos e outros grupamentos carbônicos, enquanto a segunda classe se refere aos polímeros que contêm, em sua cadeia, um heteroátomo diferente de um halogênio, como é o caso dos poliésteres, poliamidas e poliuretanos (CANEVAROLO JR, 2006).

Outra classificação importante e muito utilizada é em relação ao comportamento mecânico dos polímeros: elastômeros, plásticos e fibras. Essas classes se diferenciam em relação ao módulo de elasticidade e são representados em curvas tensão-deformação. Elastômeros aceitam grandes e reversíveis deformações com uma baixa tensão aplicada, e seu módulo de elasticidade geralmente aumenta de acordo com o aumento da temperatura (RUDIN e CHOI, 2012). Algumas outras propriedades que não serão detalhadas ainda são necessárias para a completa reversibilidade de uma elongação. Fibras possuem uma alta resistência à deformação, sendo necessária a aplicação de altas tensões para uma deformação mínima. Os plásticos estão numa categoria intermediária e podem, ainda, ser divididos em flexíveis e rígidos. Os plásticos flexíveis possuem módulo de elasticidade medianos e moderada elongação, enquanto os plásticos rígidos sofrem uma elongação muito baixa antes da sua estrutura se romper, porém possuem um alto módulo de elasticidade (ODIAN, 2004).

Assim como a classificação polimérica, existem diversas técnicas de polimerização, e elas serão brevemente descritas na seguinte seção. As principais técnicas de polimerização utilizadas são: polimerização em massa, solução, suspensão, emulsão e miniemulsão.

II.2 - Técnicas de Polimerização

Os processos de polimerização são classificados como processos homogêneos e heterogêneos. As polimerizações em massa e solução são ditas processos homogêneos, ao contrário das técnicas em suspensão, emulsão e miniemulsão, que são classificadas como processos heterogêneos (BILLMEYER, 1984). Além disso, os processos heterogêneos são utilizados com o objetivo de se obter partículas.

II.2.1 - Polimerização em Massa

A técnica de polimerização em massa é a mais simples existente. São necessários apenas os monômeros e um catalisador ou iniciador, dependendo da reação. Apesar de ser o tipo mais simples de polimerização, a técnica requer um controle rigoroso da temperatura e pode não ser muito adequada para polimerizações de mecanismo radicalar, devido à sua alta energia de ativação e aumento repentino da viscosidade (ODIAN, 2004).

Junto com a polimerização em solução, a polimerização em massa é utilizada em larga escala para a obtenção de diversos polímeros. Neste contexto, a técnica de polimerização em massa é largamente utilizada para a produção de poli(metilmetacrilato) (PMMA), polietileno (PE) e poliestireno (PS) (ODIAN, 2004). Entre as vantagens desse método, o fato de não haver muitos agentes no meio reacional resulta em um polímero com baixa contaminação, deixando a etapa de purificação mais fácil ou até inexistente, além de resultar em reações de alto rendimento (ROSEN, 1993).

II.2.2 - Polimerização em Solução

Para contornar as dificuldades supracitadas, muitas vezes recorre-se à polimerização em solução. Em termos de meio reacional, ela difere da técnica em massa apenas pela adição de um solvente ao mesmo (CANEVAROLO JR, 2006). Há uma maior facilidade, por exemplo, no controle térmico e na agitação. A adição de um solvente, porém, pode trazer problemas, principalmente na purificação do produto final, se a remoção do solvente for complicada. Os monômeros do ácido acrílico costumam ser polimerizados a partir desta técnica, empregando água como solvente (ODIAN, 2004).

II.2.3 - Polimerização em Suspensão

A polimerização em suspensão conta com a dispersão de gotículas de monômeros hidrofóbicos em uma fase aquosa contínua. O iniciador, também presente no sistema reacional, é solúvel no monômero e a adição de um agente de suspensão evita a coalescência das gotículas do monômero, que funcionam como microrreatores. Além do agente de suspensão, é importante que o sistema esteja em constante agitação para manter sua estabilidade (CANEVAROLO JR, 2006). Desse modo, o polímero é obtido na forma de partículas, que podem variar de tamanho a depender das condições operacionais empregadas, principalmente da agitação (ODIAN, 2004).

II.2.4 - Polimerização em Emulsão

A técnica de polimerização em emulsão tem semelhança com a técnica em suspensão, visto que ambas consistem em uma dispersão das gotículas do monômero em uma fase

contínua. A emulsão exige a presença de um emulsificante, ou surfactante, no meio reacional, para evitar a coalescência das partículas (RUDIN e CHOI, 2012). Na emulsão tradicional, chamada de óleo-em-água (O/W), estão presentes os monômeros, água como meio dispersante, o surfactante e um iniciador hidrossolúvel. Um dos iniciadores mais utilizados neste tipo de polimerização, o persulfato de potássio, sofre clivagem homolítica e produz dois radicais iônicos, que dão início à reação (CARRAHER JR., 2003).

O surfactante promove a formação de micelas no meio reacional quando a concentração do mesmo na solução atinge um certo limite, conhecido como concentração micelar crítica (CMC) (BILLMEYER, 1984; ROSEN, 1993). As micelas (figura 2) possuem forma esférica, e as terminações carbônicas apolares estão orientadas para o centro das mesmas, enquanto as terminações hidrofílicas estão orientadas para a interface. A polimerização ocorre nas micelas (Fase I), e não nas gotículas de monômero formadas, pois estas agem apenas como reservatório. Conforme a cadeia polimérica vai crescendo nas micelas e as moléculas de monômero vão se difundindo, as micelas vão desaparecendo e a polimerização passa a ocorrer nas partículas anteriormente formadas (Fase II), com o monômero sendo ainda fornecido pelas gotículas. Na última fase (III), a taxa de conversão já é alta e o monômero é fornecido através de processos de difusão (CARRAHER JR., 2003). É importante ressaltar que o diâmetro das partículas poliméricas formadas vai depender do tipo de surfactante utilizado na reação de polimerização (RAO e GECKELER, 2011).

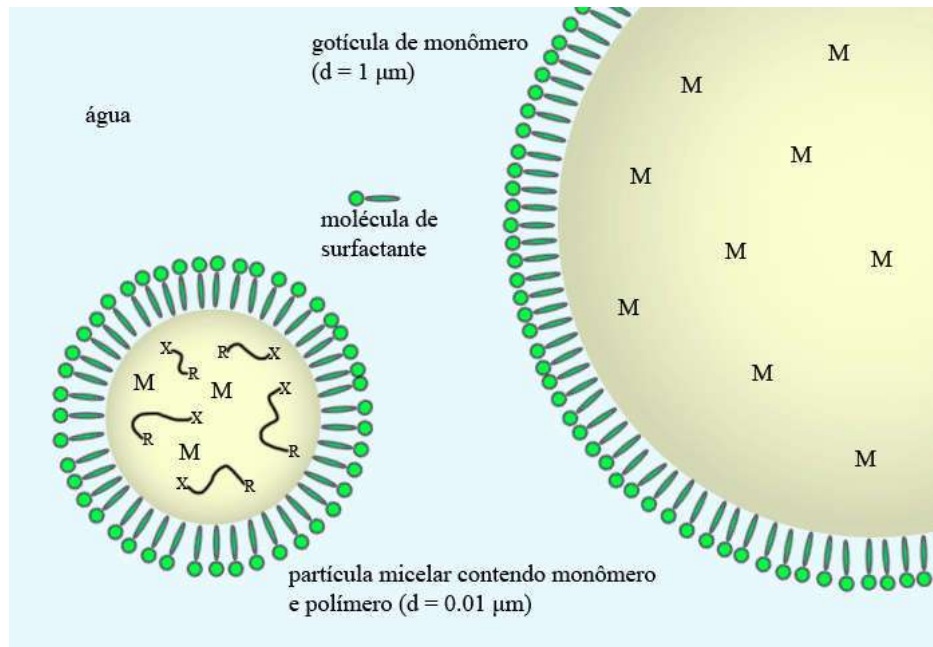


Figura 2 - Esquema de algumas espécies presentes em uma polimerização em emulsão (M = monômero, R-X = cadeia polimérica crescente). (Fonte: adaptado de BRAUN et al. (2012).)

Nos sistemas de polimerização em emulsão inversa, o monômero é hidrofílico e está disperso em uma fase contínua oleosa (BILLMEYER, 1984). O sistema inverso é chamado de água-em-óleo (W/O) e geralmente o surfactante utilizado é lipossolúvel, além de, preferencialmente, ser não-iônico, para uma melhor estabilização da emulsão (ODIAN, 2004). O mecanismo de polimerização é análogo ao da emulsão convencional.

II.2.5 - Polimerização em Miniemulsão

A polimerização através da técnica em miniemulsão possui semelhanças com a técnica de polimerização em suspensão, pois além de contar com uma dispersão do monômero, não há formação de micelas (ODIAN, 2004). A principal diferença para a polimerização em emulsão está na necessidade da utilização de forças cisalhantes de grande poder, como ultrassom, além da utilização de um composto de baixa massa molecular como coestabilizante (RAO e GECKELER, 2011). A miniemulsão convencional é definida como uma dispersão de gotículas de óleo em escala nanométrica (50 a 500 nm) do tipo O/W, composta por um sistema que contém monômero, óleo, água, surfactante e um coestabilizante (LANDFESTER *et al.*, 2000).

Um dos fatores mais importantes para a existência da miniemulsão é a estabilidade de suas gotículas no sistema. O sistema é dito criticamente estabilizado, pois não é termodinamicamente estável. Para que a miniemulsão seja estável, é necessário minimizar os efeitos da maturação de Ostwald e a coalescência das gotículas através de colisões. A maturação de Ostwald é uma degradação molecular que ocorre por difusão, onde o monômero migra de gotículas menores para aquelas maiores, e, se não for minimizada, pode acarretar num aumento do tamanho médio das gotículas na emulsão, que é determinado pela pressão de Laplace (ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002; EL-AASSER e SUDOL, 2004). O fator que estabiliza o sistema e previne a maturação de Ostwald é o coestabilizante, que atua como um agente osmótico no sistema (LANDFESTER *et al.*, 2000).

Em relação à taxa de conversão, a polimerização em miniemulsão ocorre mais rapidamente que as polimerizações em massa e em solução, além de alcançar altas conversões (CAPEK, 2010). Na figura 3 é ilustrado o processo de polimerização por miniemulsão. Primeiramente, há a existência de duas fases imiscíveis que, com a ação de forças cisalhantes, formam gotículas na faixa submicrométrica (30 a 500 nm). Posteriormente as gotículas sofrem polimerização, porém sem perder a sua identidade. Isto ocorre porque cada gotícula atua como um nanoreator no sistema, o que significa que cada gotícula tem, de certa forma, autonomia, e não é influenciada pelo ambiente externo (LANDFESTER, 2006).

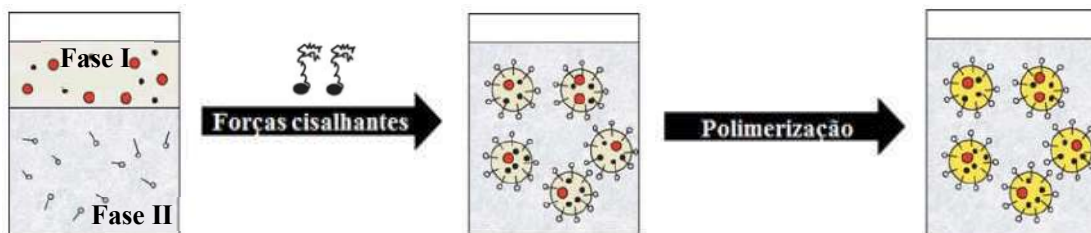


Figura 3 - Esquema da técnica de polimerização em mini emulsão. (Fonte: adaptado de LANDFESTER (2006).)

O mecanismo de formação das partículas na miniemulsão não é simples e envolve nucleação das gotas. O sistema formado pelo surfactante e coestabilizante mantém a estabilidade das gotículas, como destacado anteriormente. As gotículas formadas capturam os radicais de oligômeros formados por nucleação e geram partículas poliméricas. A

nucleação das gotas é o único mecanismo presente no sistema, ao contrário da emulsão, onde também ocorre nucleação micelar e o ideal é que cada gotícula forme uma partícula (polimerização 1:1) (ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002; EL-AASSER e SUDOL, 2004; CAPEK, 2010).

Assim como na emulsão, a miniemulsão também pode ser realizada no sistema inverso, água-em-óleo (W/O). A lógica é a mesma utilizada no sistema comum, com o surfactante solúvel na fase contínua oleosa, resultando numa maior estabilidade do sistema. No sistema inverso, também é necessário utilizar um agente para contrabalancear a maturação de Ostwald. A diferença é que nesse caso, componentes simples como água ou um sal atuam como coestabilizante e garantem a estabilidade das gotículas formadas através da aplicação de forças cisalhantes (OH *et al.*, 2009; CAPEK, 2010).

II.3 - Poli(ácido acrílico)

O poli(ácido acrílico), cuja estrutura está ilustrada na figura 4, é formado a partir da polimerização do monômero ácido acrílico. Juntamente com os polímeros formados pelo ácido metacrílico e seus respectivos ésteres, o PAA pertence à família dos polímeros acrílicos, que é uma das principais utilizadas na produção de hidrogéis. Os polímeros e copolímeros acrílicos possuem aplicações em diversas áreas, devido a sua biocompatibilidade. Alguns exemplos são: agentes espessantes, adesivos, dispersantes e floculantes (ODIAN, 2004). Industrialmente, o ácido acrílico é um dos materiais mais utilizados na produção de polímeros superabsorventes, que serão discutidos ainda nesta seção. Sua utilização para a fabricação de materiais superabsorventes deve-se ao fato do ácido acrílico ser facilmente polimerizável e ter baixo custo (LIM *et al.*, 2002; ZOHURIAAN-MEHR e KABIRI, 2008). A obtenção de PAA na forma de nanopartículas poliméricas é de grande importância, visto que essas apresentam maior estabilidade em fluidos biológicos que outros sistemas coloidais. Devido à suas propriedades físico-químicas, o estudo de tais materiais para sua utilização em sistemas de liberação controlada vem se expandindo (BAJPAI *et al.*, 2008).

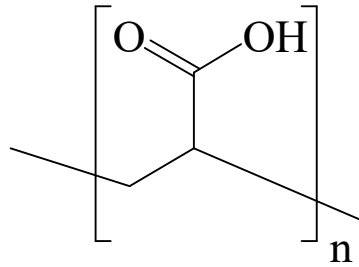


Figura 4 – Estrutura do poli(ácido acrílico). (Fonte: adaptado de Sigma-Aldrich.)

WICHTERLE e LIM (1960) destacaram a importância de materiais plásticos na área biomédica. Naquela época, havia uma crescente demanda de um material que fosse permeável aos metabólitos, inerte e que permitisse a absorção de água, sem que ocorresse a dissolução do mesmo no organismo. Utilizando hidroxietil metacrilato (HEMA) como monômero, foi sintetizado um polímero de estrutura porosa reticulada, que atendia às necessidades e tinha potenciais aplicações (WICHTERLE e LIM, 1960).

Hidrogel é definido como uma rede polimérica hidrofílica que consegue absorver uma enorme quantidade de água, que pode chegar a valores milhares de vezes maior que o seu peso seco (HOFFMAN, 2012). Tais polímeros recebem o nome de polímeros superabsorventes, e são materiais higroscópicos que absorvem água fisicamente, num processo que consiste na captura de água pelos poros por capilaridade, seguida da hidratação de grupos funcionais e, finalmente, expansão das cadeias poliméricas, limitada pela reticulação existente. A figura 5 ilustra esse processo de absorção de água, utilizando como exemplo um polímero acrílico, que faz parte do grupo de polímeros descrito na presente seção. Essa característica é devida à presença de grupos hidrofílicos em sua estrutura, como hidroxilas e amidas. Porém, é necessário destacar que tais compostos não se solubilizam completamente em meio aquoso, propriedade causada pela presença de reticulação na rede polimérica. Uma outra característica citada por alguns autores é a similaridade que o hidrogel apresenta com o tecido natural, pois seu alto teor de água permite uma grande flexibilidade. (WICHTERLE e LIM, 1960; HAMIDI *et al.*, 2008; ZOHURIAAN-MEHR e KABIRI, 2008).

Em relação à classificação, existem os chamados hidrogéis físicos (reversíveis) e os químicos (permanentes). O primeiro tipo possui as cadeias interligadas através de emaranhados moleculares e forças iônicas e hidrofóbicas, enquanto o último possui sua rede

polimérica reticulada covalentemente (HOFFMAN, 2012). Como o nível de reticulação e a quantidade de água que pode ser absorvida pelo polímero possuem uma relação inversa (BUCHHOLZ e PEPPAS, 1994), neste trabalho, objetivou-se a obtenção do polímero de cadeia mais reticulada possível, para que a absorção de água e seu consequente inchamento seja minimizado e as nanopartículas possam ser utilizadas com a finalidade proposta inicialmente.

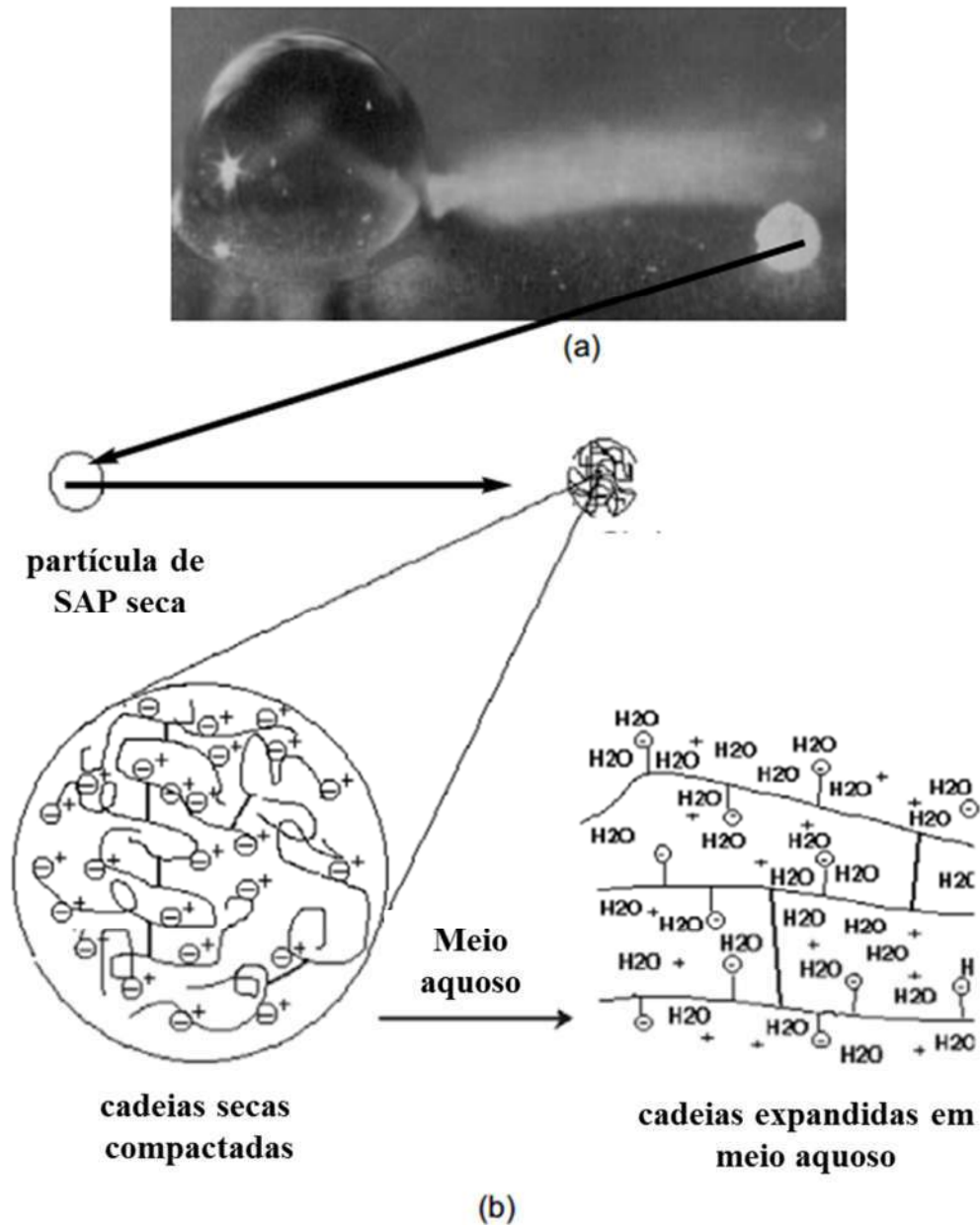


Figura 5 – Processo de absorção de água por um polímero acrílico: (a) partícula de material superabsorvente após absorção de água (esquerda) e seca (direita); (b) expansão das cadeias poliméricas após a absorção de água pelo material. (Fonte: adaptado de ZOHURIAAN-MEHR e KABIRI (2008)).

II.3.1 - Processos de Polimerização do Ácido Acrílico

Entre as diferentes técnicas de polimerização existentes, a técnica mais utilizada para a produção comercial do poli(ácido acrílico) é a polimerização em solução, com a adição ou não de um agente reticulante. A polimerização é realizada numa solução aquosa do monômero e iniciada por mecanismo radicalar, através de compostos azo ou peróxidos, ou ainda com a utilização de um sistema redox. A neutralização parcial do monômero pode ser feita antes ou depois da polimerização (BUCHHOLZ e PEPPAS, 1994; ZOHURIAAN-MEHR e KABIRI, 2008). O ácido acrílico é altamente reativo, o que leva a uma reação intensamente exotérmica. Por consequência, a temperatura de reação pode se elevar excessivamente, principalmente se realizada em batelada. Se o controle não for bem feito, as propriedades do produto final podem ser muito afetadas, além de comprometer a segurança do processo. Neste contexto, é sugerido que a reação de polimerização seja realizada em baixas temperaturas e concentrações de monômero (MOREIRA *et al.*, 2016). Este tipo de reação gera um produto elástico, em forma de gel. No entanto, ao se utilizar uma carga de monômero elevada, é possível realizar uma posterior secagem e pulverização do material, obtendo-se partículas poliméricas de distribuição granulométrica não-homogênea (ZOHURIAAN-MEHR e KABIRI, 2008).

Para a produção de partículas poliméricas, em forma de pó ou microesferas, as reações de polimerização que se utilizam de dispersões são mais indicadas, visto que é possível ter uma melhor distribuição granulométrica. Na polimerização em suspensão inversa, o tipo de dispersante, a viscosidade da solução monomérica e a agitação ditam o tamanho médio das partículas. Como já destacado, esse tipo de reação de polimerização tem vantagens sobre o método em solução, pois permite um maior controle sobre o calor envolvido na reação. É importante ressaltar que iniciadores hidrossolúveis são mais eficientes que os lipossolúveis. As partículas podem ser recuperadas da fase oleosa através de filtração ou centrifugação e um pó fino pode ser obtido após a secagem (TRIJASSON *et al.*, 1990; ZOHURIAAN-MEHR e KABIRI, 2008).

A polimerização em emulsão inversa também é utilizada para a síntese de partículas poliméricas de PAA, através da dispersão de uma solução aquosa do monômero numa fase orgânica oleosa, com a adição de surfactantes. A estabilidade da emulsão é um fator crítico para a obtenção de micro e nanopartículas. Ao final da reação também são obtidas as

partículas dispersas na fase oleosa, sendo necessária uma etapa de separação (KRIWET *et al.*, 1998). Como nesse tipo de reação o monômero é transportado por mecanismos de difusão e as partículas poliméricas produzidas se tornam dependentes da cinética de crescimento, a polimerização em emulsão tem algumas desvantagens como a dificuldade de homogeneização da composição (ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002).

Partículas poliméricas de PAA também podem ser obtidas utilizando-se a técnica de polimerização em miniemulsão inversa. Esse tipo de reação possui peculiaridades intrínsecas, como a necessidade de adição de um agente osmótico para estabilizar o sistema. A formação dos nanorreatores é a principal causa do sucesso desse tipo de reação, pois a independência de cada gotícula faz com que o sistema sofra menos perturbações externas, como acontece com as reações em emulsão (ANTONIETTI e LANDFESTER, 2002)

Entre os iniciadores hidrossolúveis mais utilizados estão o persulfato de potássio e o persulfato de amônio, e entre os pares redox encontram-se o reagente de Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) e o par formado por persulfato de potássio e sulfito de sódio. Os dois primeiros costumam ser utilizados nas técnicas de polimerização em solução e suspensão inversa, enquanto os dois últimos são empregados apenas na polimerização em solução (ZOHURIAAN-MEHR e KABIRI, 2008).

Pelo que se pode perceber, para a produção de partículas poliméricas, sejam elas de distribuição granulométrica micro ou submicrométrica, as técnicas de polimerização que envolvem uma dispersão do monômero em outra fase são mais vantajosas e eficientes. Apesar da polimerização em solução ser amplamente utilizada na produção de PAA, em determinadas aplicações, é importante que se tenha uma distribuição de tamanhos de partículas estreita, sem muitas variações. Por este motivo e por outros citados no presente trabalho, a polimerização em miniemulsão inversa é preferida sobre a polimerização em solução.

II.3.2 - Metodologias para Obtenção de Partículas de PAA

Nesta seção estão brevemente descritos os procedimentos realizados por diversos autores para a obtenção de partículas poliméricas de PAA. Vale ressaltar que as técnicas utilizadas possuem semelhanças entre si, envolvendo, em pelo menos uma etapa do processo, uma dispersão do monômero ácido acrílico.

A patente US3284393 (VANDERHOFF e WILEY, 1966) descreve a polimerização em emulsão inversa para diversos monômeros hidrossolúveis, como acrilamida, metacrilamida, ácido acrílico e ácido metacrílico. Para o ácido acrílico, foi obtida uma dispersão das partículas poliméricas em xileno, reagente utilizado como fase contínua. O surfactante Span 80 foi dissolvido em xileno junto com o iniciador peróxido de benzoíla (BPO) e a solução de monômero foi posteriormente adicionada. A reação ocorreu por 18 h com agitação constante, temperatura mantida a 60 °C e atmosfera inerte. Para separação das partículas foi realizada floculação com ácido clorídrico concentrado e posterior filtração e secagem.

TRIJASSON *et al.* (1990) realizaram a polimerização do ácido acrílico utilizando a técnica de suspensão inversa, obtendo partículas poliméricas em escala micrométrica. O monômero foi parcialmente neutralizado com hidróxido de sódio, formando a fase aquosa juntamente com o iniciador persulfato de potássio e o reticulante N,N'-metilenobisacrilamida (MBA). A fase oleosa composta por ciclohexano e o surfactante Span 80 foi mantida em atmosfera inerte sob aquecimento a 52 °C e agitação. A fase aquosa foi adicionada continuamente e a reação se manteve por 3 h a 52 °C e então a temperatura foi ajustada para 70 °C, com o objetivo de se atingir a máxima conversão. Como etapa de purificação foi realizada uma precipitação em metanol e o pó branco obtido foi recuperado através de secagem.

As patentes US5373066 (REBRE *et al.*, 1994) e US5442014 (REBRE *et al.*, 1995) descrevem um processo de produção de partículas poliméricas de PAA utilizando uma metodologia por suspensão inversa em duas etapas, com o objetivo de reduzir o percentual de monômero residual. A inovação proposta é na sequência final do processo, onde primeiramente é realizada a destilação azeotrópica das partículas produzidas para remoção da água e, posteriormente, as partículas desidratadas são submetidas a tratamento com peróxido de hidrogênio. As partículas obtidas possuíam uma larga distribuição de tamanhos, variando de 100 a 500 µm, sendo a proporção de partículas na faixa de 100 µm muito baixa, além de sua superfície não apresentar regularidade.

LIU e BROOKS (1997) sintetizaram partículas de PAA utilizando um sistema composto por um par de iniciadores redox hidrossolúveis, através de uma emulsão em sistema inverso. A fase contínua era composta por uma mistura parafínica e um surfactante lipofílico. A uma solução aquosa do monômero contendo o reticulante bisacrilamida foi adicionado o componente oxidante do par redox, bromato de potássio. Após formação da

emulsão foi adicionada uma solução aquosa do par redutor, metabissulfito de sódio. As gotículas de monômero formadas antes da adição do agente redutor apresentavam uma faixa de tamanhos variando entre 0,6 e 2 μm , e os autores relatam que não foram observadas mudanças significativas na distribuição de tamanho final das partículas. As reações de polimerização foram realizadas em atmosfera inerte, tanto em sistemas isotérmicos, onde a temperatura se manteve em torno de 23 °C, quanto não-isotérmicos.

KRIWET *et al.* (1998) obtiveram nanopartículas de PAA, com diâmetro médio variando entre 80 e 150 nm, utilizando o iniciador lipofílico azobisisobutironitrila (AIBN) através da técnica de polimerização em emulsão inversa. No entanto, ao empregar o iniciador hidrofílico persulfato de amônio (APS) as partículas obtidas possuíam escala micrométrica, com diâmetro médio em torno de 5 μm . O meio reacional era composto por 70% p/p da fase contínua oleosa e 30% de uma fase aquosa. A concentração de surfactantes no meio era igual a 2% p/p e foi utilizado um sistema composto pelos emulsificantes Span 80 e Tween 80 (polisorbato 80), numa razão igual a 75:25, respectivamente, o que melhorou a estabilidade da emulsão.

LANDFESTER *et al.* (2000) obtiveram nanopartículas de PAA através da polimerização por miniemulsão inversa. As partículas produzidas apresentaram o diâmetro de 100 nm. A fase dispersa composta por ácido acrílico e água foi adicionada à fase contínua composta por ciclohexano e o surfactante dietilenoglicol diacrilato. Para formação da miniemulsão, o sistema foi agitado por 1 h e submetido ao sonicador por 90 s. O início da reação se deu pela adição de AIBN à miniemulsão formada. A temperatura de reação foi mantida em 65 °C e ela foi realizada por 2 h, sob agitação, para garantir a completa polimerização do monômero.

LIM *et al.* (2002) produziram partículas de PAA utilizando a técnica de polimerização em emulsão inversa. O ácido acrílico foi parcialmente neutralizado com solução de hidróxido de sódio e o agente reticulante utilizado foi o N,N'-metilenobisacrilamida (MBA). Tais reagentes compunham a fase dispersa, enquanto a fase contínua foi composta por tolueno e uma mistura de Span 80 e etil celulose como emulsificantes. As reações ocorreram por 1 h após a adição do iniciador AIBN, com temperaturas controladas entre 50 °C e 90 °C, em atmosfera inerte. As partículas produzidas foram desidratadas em metanol e posteriormente imersas numa mistura de metanol e tolueno para remoção de emulsificantes e iniciador residuais, para serem novamente dispersas em metanol. O produto final foi ainda filtrado e seco.

KOUL *et al.* (2011) estudaram a síntese de partículas de um nanogel híbrido, composto por PAA e gelatina, obtido através da reação de polimerização em miniemulsão inversa. A fase aquosa composta por AA parcialmente neutralizado com hidróxido de sódio e gelatina foi adicionada à fase oleosa contendo Span 20 dissolvido em ciclohexano. Na etapa de polimerização, foram utilizados APS como iniciador, MBA como agente reticulante do PAA e tetrametiletilenodiamina (TMEDA) como acelerador da reação. Foi necessário ainda a posterior adição de glutaraldeído, como agente reticulante da gelatina, para a completa formação do nanogel. O processo foi realizado em atmosfera inerte, tendo a etapa de polimerização duração de 2 h e a reação do glutaraldeído ao semiproduto, 20 h. O produto final, com diâmetro de partícula médio igual a 255 nm, ainda passou por uma etapa de purificação, que envolveu centrifugação com metanol seguida por centrifugação com água para remoção do ciclohexano, e diálise.

PINTO *et al.* (2012) obtiveram partículas de PAA através de um processo que envolveu duas etapas reacionais. Primeiramente foi obtido o hidrogel de PAA através de uma reação de polimerização em solução, utilizando glicerol e dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) como agentes reticulantes e persulfato de potássio como iniciador. As reações ocorreram por 2 horas e a temperatura de reação foi mantida entre 70 °C e 80 °C. A segunda etapa do processo consistiu na síntese de partículas de PAA através da dispersão do polímero numa fase orgânica, numa emulsão. Além do PAA, foram utilizados EGDMA como agente reticulante, Span 80 como surfactante, óleo vegetal como meio dispersante e iniciador persulfato de potássio. As partículas obtidas tiveram larga distribuição de tamanho de partícula, porém todas as análises resultaram em diâmetros médios de 830 nm.

ZHANG *et al.* (2015) obtiveram um nanogel de PAA a partir de nanopartículas de poliacrilonitrila (PAN) sintetizadas via polimerização em miniemulsão direta pós realização de uma etapa de hidrólise alcalina. Na reação de miniemulsão realizada, a fase oleosa foi composta por hexadecano, AIBN, nanopartículas magnéticas de γ -(trimetoxisilil) propil metacrilato modificado (MPS-Fe₃O₄) e os monômeros acrilonitrila e divinilbenzeno (DVB). A fase aquosa foi composta por uma solução aquosa de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) como emulsificante. A reação foi realizada em atmosfera inerte durante 8 h, com a temperatura mantida em 65 °C. O produto obtido (partículas dispersas de PAN) teve o pH ajustado para 9,0 com uma solução de hidróxido de sódio e a hidrólise alcalina ocorreu durante 5 h em temperatura igual a 80 °C. O nanogel obtido apresentou diâmetro médio de partícula por volta de 230 nm.

Tendo em vista os artigos e patentes encontrados sobre a produção de partículas de PAA, foi possível observar que sistemas heterogêneos são amplamente utilizados, porém ainda existem estudos a serem realizados para otimização dos processos existentes. Em muitos trabalhos, a síntese de partículas de PAA leva à distribuição de tamanhos de partículas em escala micrométrica. Além disso, são sempre utilizados solventes orgânicos, havendo a necessidade de uma etapa adicional de purificação, principalmente ao se considerar a subsequente utilização das partículas poliméricas em aplicações biomédicas. A obtenção das partículas a partir da técnica em miniemulsão inversa em apenas uma etapa reacional é de grande interesse e permite uma posterior funcionalização das mesmas para que venham a ser utilizadas na área biomédica, como será detalhado posteriormente.

II.3.3 - Reticulação

A reticulação de um polímero é um fenômeno que pode alterar significativamente suas propriedades físicas. O agente reticulante empregado para a formação de ligações cruzadas é um monômero que possui insaturações, que acabam por fazer a conexão das cadeias lineares de polímero (ELLIOTT *et al.*, 2004). Mínimas quantidades de agente reticulante adicionadas ao meio reacional provocam modificações significativas nas propriedades do polímero. Na reação de polimerização em solução, a eficiência de reticulação é influenciada, inclusive, pela solubilidade do agente no monômero. Outros fatores são: impedimento estérico, pH e mobilidade da cadeia (BUCHHOLZ e PEPPAS, 1994). O grau de reticulação de uma cadeia polimérica é principalmente controlado pela quantidade de agente reticulante adicionada ao meio, mas também pela conversão das insaturações, pois pode ocorrer o fenômeno da ciclização intramolecular. Quanto menor a concentração de monômero e maior a quantidade de água ou qualquer outro solvente presente no meio reacional, maior a ocorrência do fenômeno da ciclização e, por consequência, menor o grau de reticulação do polímero. A ciclização (fenômeno ilustrado na figura 6) impede que as cadeias poliméricas se conectem, fazendo com que o polímero não possua as propriedades desejadas (ELLIOTT *et al.*, 2004).

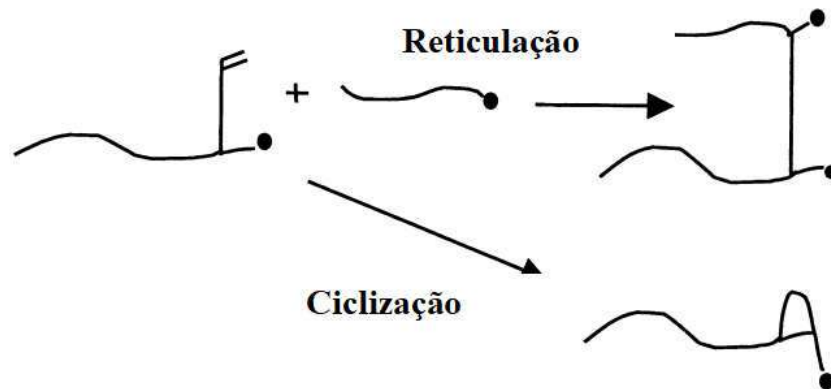


Figura 6 - Reticulação versus ciclização. (Fonte: adaptado de ELLIOTT *et al.* (2004).)

Compostos acrílicos como o ácido acrílico e ácido metacrílico sofrem reação de copolimerização com diversos monômeros vinílicos, através de radicais livres. As insaturações provocam uma alta reatividade, promovendo amplas possibilidades (BUCHHOLZ, 2006). Estudos realizados com poli(metacrilato de metila) (PMMA) mostram que a adição de EGDMA como agente reticulante aumenta a temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero reticulado, em comparação ao polímero de cadeia linear, mesmo que uma baixa concentração de EGDMA seja utilizada. Além disso, foi observado um crescimento no módulo de cisalhamento e na velocidade de deformação (MIN *et al.*, 2014).

Quando a intenção é maximizar o efeito de inchamento e absorção de água, podem ser utilizados agentes de transferência de cadeia, que controlam a massa molecular da cadeia polimérica principal e minimizam as reticulações (BUCHHOLZ e PEPPAS, 1994). Este efeito é justamente contrário ao efeito da reticulação, e deve ser evitado.

Entre os agentes reticulantes mais utilizados estão os bifuncionais MBA e EGDMA, além do trifuncional 1,1,1-trimetilolpropano triacrilato (TMPTA) e o tetrafuncional tetraaliloxietano (TAOE) (ZOHURIAAN-MEHR e KABIRI, 2008). No presente trabalho, o agente reticulante utilizado em todas as reações foi o EGDMA. A estrutura química do reticulante EGDMA está representada na figura 7. É possível visualizar as insaturações na cadeia que permitem a ocorrência das ligações cruzadas que formam a cadeia polimérica reticulada.

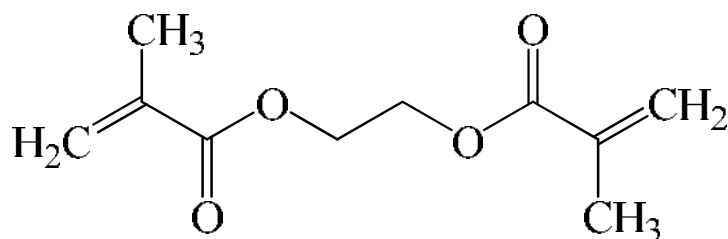


Figura 7 – Estrutura do dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) (Fonte: adaptado de Sigma-Aldrich.)

II.4 - Modificação de Polímeros

A ampla variedade nos processos de produção de polímeros resulta em uma gama de aplicações para esses materiais. Logo após a síntese, muitos polímeros não necessitam de maiores modificações químicas para a sua aplicação. Polietileno de alta e baixa densidades (PEAD e PEBD, respectivamente), poliestireno (PS), poli(cloreto de vinila) (PVC), polipropileno (PP) e muitos outros são utilizados diretamente na produção de reservatórios, utensílios domésticos, brinquedos, peças de automóveis e outros materiais diversos, que contam na maioria das vezes apenas com transformações físicas (MANO e MENDES, 1999). Por outro lado, não é novidade que se recorra à modificação de polímeros já existentes para que novas propriedades sejam desenvolvidas: a síntese de nitrato de celulose, uma forma modificada de celulose, data de 1846. O alto custo no desenvolvimento de um polímero completamente novo, que atenda a diversos requisitos ao mesmo tempo e a longo prazo, faz com que a modificação e a mistura de monômeros, polímeros e outros compostos seja a principal rota de pesquisa quando se deseja atingir determinadas propriedades e aplicações mais específicas (MEISTER, 2000).

II.4.1 - PAAs Modificados para Aplicações Biomédicas

Na biomedicina, o desenvolvimento dos materiais poliméricos e a modificação destes trazem diversas vantagens, como a redução de custos, maior segurança nos tratamentos médicos, aumento de biocompatibilidade e bioatividade (MAGRINI, 2012), além de inovações para diversos campos, tais como engenharia de tecidos, implantes de dispositivos e órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, odontologia e reestruturação óssea (JAGUR-GRODZINSKI, 1999). No setor farmacêutico, os sistemas poliméricos contribuem para o

controle na liberação de fármacos, tornando esta liberação mais prolongada e direcionada, o que impede picos de concentração e efeitos colaterais ocasionados pela toxicidade do fármaco a outras regiões do organismo (KIM *et al.*, 2009).

Dentre os muitos polímeros existentes, o PAA se destaca na área da biomedicina por suas características e versatilidade de transformação. Além de ser conhecido por sua biocompatibilidade, o PAA possui propriedades antibacterianas, bioadesividade e a capacidade de formar um hidrogel superabsorvente, em função de seus grupamentos carboxílicos (FERREIRA *et al.*, 2006), e, em muitos estudos envolvendo o PAA, se faz necessária a modificação desse material para obter uma nova característica, desejada no produto final. Com isso, diferentes técnicas já foram reportadas na literatura, resultando em variações nas propriedades do PAA, entre elas:

- i) tentativas de síntese *template* de um sistema de entrega de fármacos via transmucosa, utilizando-se quitosana (AHN, J.-S. *et al.*, 2001), poli(etileno glicol) (PEG) (CHOI *et al.*, 1999), poloxâmero (CHUN *et al.*, 2001) e sericina (AHN, J. S. *et al.*, 2001) como matrizes, com o objetivo de retardar a dissolução do PAA e aumentar seu poder adesivo;
- ii) copolimerização com poloxâmero, para obter transparência em um gel aplicado em formulações oftalmológicas (BROMBERG, 1998);
- iii) adição de ácido tartárico, para aumento da resistência mecânica em cimentos odontológicos (MOREIRA *et al.*, 2016);
- iv) copolimerização com PEG, para conferir estabilidade e proteção à insulina na entrega desse fármaco via oral (FOSS *et al.*, 2004);
- v) irradiação de raios-gama, para aprimorar a homogeneidade na reticulação de PAA utilizado também em entrega de fármacos (JABBARI e NOZARI, 2000);
- vi) conjugação com cisteína, para melhorar as propriedades mucoadesivas no transporte de fármacos através do trato gastrointestinal (MARSCHÜTZ e BERNKOP-SCHNÜRCH, 2002).

Como se pode observar, o PAA possui potencial para ser modificado de maneiras distintas, a depender da sua aplicação na área da biomedicina.

II.4.2 - Adsorção de Biomoléculas em Polímeros

Diferentes métodos para realizar a modificação na superfície de polímeros foram desenvolvidos ao longo dos anos. Em geral, esses métodos se dividem em físicos, químicos, mecânicos, radioativos e biológicos, e, em alguns casos, há a combinação desses para a obtenção do resultado desejado. A categoria biológica ainda pode ser subdividida em: adsorção física de biomoléculas (proteínas, vitaminas, peptídeos, receptores, fármacos, lipídeos); auto-reticulação de biomoléculas; conjugação química de biomoléculas a grupos funcionais; semeadura e crescimento segundo a confluência de células (HOFFMAN, 1996; PUOCI, 2015).

Adsorção é o processo de adesão de átomos, íons, biomoléculas ou moléculas de um gás, vapor ou líquido à superfície de um substrato sólido. Esse processo tem sido utilizado para modificar a superfície de biomateriais poliméricos através da imobilização, ou conjugação, de um componente bioativo. Ele ocorre por meio de interações físicas, tais como interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou ligações de hidrogênio, ou preferencialmente, no caso da conjugação de biomoléculas, por interações químicas, como ligações covalentes ou quelação (HOFFMAN, 1996; PICHOT, 2004).

A adsorção física ocorre por meio da interação fraca e de longo alcance entre a biomolécula (adsorvato) e a superfície do polímero (adsorvente), originada por forças hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou forças de Van der Waals. Como a interação é de longo alcance, além das moléculas envolvidas não sofrerem alterações em sua estrutura, podem ser formadas várias camadas de adsorção, até ser atingido o equilíbrio entre as biomoléculas adsorvidas e as livres na solução, dependente da concentração das mesmas (PEIXOTO, 2013). Essa estratégia de imobilização pode ser adotada quando se deseja criar um sistema de adsorção reversível, controlado por estímulos de temperatura, pH ou concentrações de íons específicos (HOFFMAN, 1995), e um simples método de mistura entre a solução de biomoléculas e o material polimérico pode ser realizado para se obter este resultado (HERMANSON, 2013).

No caso da adsorção química, o adsorvato se associa ao adsorvente através de ligações químicas primárias, ou covalentes, tais como troca iônica, protonação e complexação, e, ao contrário da adsorção física, alteram a estrutura das moléculas, são de curto alcance e irreversíveis (JENQUIN e MCGINITY, 1994). Nesse tipo de conjugação, a ligação covalente envolve o uso de um grupo reativo de uma das moléculas que possa se unir

com um grupo funcional da outra, com uma amina ou um tiol. Quando uma das moléculas envolvidas nesse processo é de origem biológica, ou é um fragmento ou derivado de uma biomolécula, chamamos esta associação de bioconjugação. Frequentemente, ao se realizar a bioconjugação entre duas moléculas, é necessário que a estrutura original de uma delas seja modificada previamente para que a reação aconteça entre os grupos funcionais desejados (HERMANSON, 2013).

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada – IUPAC, a funcionalização de um polímero se define como sendo a introdução de conjuntos químicos em moléculas poliméricas, para criar propriedades químicas, físicas, biológicas ou farmacológicas específicas. Portanto, ao ser modificado, adquirindo nova função, o polímero pode ser considerado funcionalizado (HORIE *et al.*, 2007). Dessa forma, para que a adsorção, através da bioconjugação, de uma biomolécula em um polímero seja bem-sucedida nesses casos, se recorre à funcionalização do polímero. Segundo TIAN *et al.* (2012), os principais métodos para a funcionalização do polímero com o objetivo de conjugar biomoléculas incluem: introdução de grupos funcionais nos monômeros antes das polimerizações, algumas vezes de forma protegida para que esses grupos sejam expostos depois da polimerização, e a introdução destes grupos funcionais através de modificação química dos polímeros já preparados.

Alguns estudos na literatura já apresentam tentativas de adsorção de biomoléculas em polímeros. LAGANÀ *et al.* (2011) ampliaram o potencial de especificidade de anticorpos anti-Integrina, preservando sua integridade, por meio da adsorção destes na superfície de nanopartículas de PMMA em solução tampão. BARTLING *et al.* (1973) adsorveram, quimicamente, lisozima em matriz de poli(ácido 4-vinil benzoico-co-estireno) através da funcionalização prévia do polímero, com o intermediário 1,1'-carbonildiimidazol. Esse intermediário, que não permanece no produto final, permitiu que os grupos carboxílicos da matriz polimérica pudessem se tornar reativos de forma a estabelecer a ligação em contato com as enzimas. Em mais um estudo, SAHU *et al.* (2008) bioconjugaram metoxi poli(etileno glicol) com ácido palmítico através de uma ligação éster, possibilitando o aumento da biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos como a curcumina.

II.4.3 - Bioconjugação com Ácido Fólico

Estudos acerca do direcionamento de compostos contendo o biomarcador ácido fólico (AF) a células carcinogênicas têm sido reportados na literatura devido à afinidade do AF com essas células. Essa interação se dá através do receptor α -folato, expressado em alta quantidade na superfície das células em razão da multiplicação celular, aumentando assim a concentração de tais compostos em vários tipos de tumores (LIONG *et al.*, 2008; VIEIRA, 2016).

O PAA pode formar um hidrogel com potencial para atuar como um nanocarreador inteligente, que se deforma intencionalmente na presença de um estímulo, tais como variações em pH, temperatura, luz ou campo magnético (YOU *et al.*, 2010). O produto da bioconjugação combina as propriedades dos dois componentes individuais e, portanto, a adsorção por meio da bioconjugação de moléculas de AF na estrutura do PAA pode promover a formação de um nanocarreador biocompatível e seletivo, com potencial para aplicação no combate ao câncer ao direcionar fármacos dentro do organismo (VAIDYA *et al.*, 2011; TIAN *et al.*, 2012). Nanocarreadores têm sido estudados para aplicação em sistemas de tratamento de câncer, pois oferecem mais segurança quanto à estabilidade de fármacos no organismo, além de aumentar a permeabilidade intracelular e a precisão no direcionamento destas substâncias (WANG e REMPEL, 2015). Ainda, segundo VAIDYA *et al.* (2011), a conjugação de biomoléculas em polímeros é uma abordagem segura e eficaz para o desenvolvimento de sistemas de tratamento, podendo resultar em melhor especificidade e estabilidade dos ativos.

O ácido fólico, forma oxidada da vitamina B9, é uma vitamina hidrossolúvel atuante em diversas rotas metabólicas e biossínteses, comumente chamada de folato. Essa substância é composta por três componentes ligados covalentemente: uma pteridina, um ácido *p*-amino benzoico e um resíduo glutamílico, como mostra a figura 8 (LITWACK, 2008).

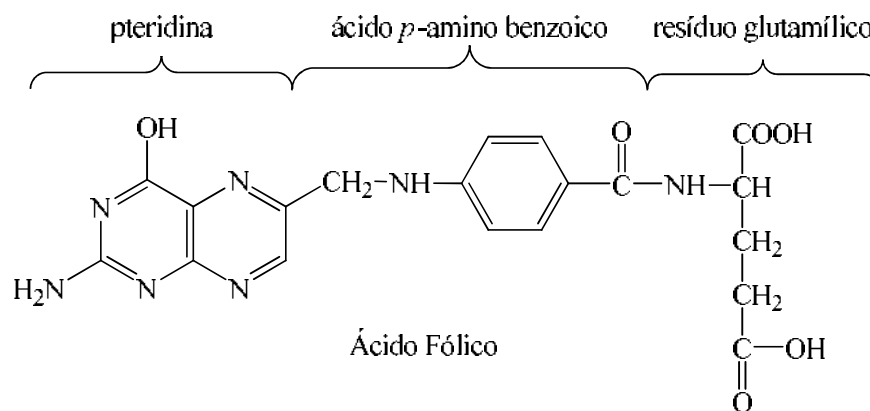


Figura 8 - Fórmula estrutural do ácido fólico e seus componentes. (Fonte: adaptado de LITWACK (2008).)

Como se pode observar, o ácido fólico possui uma amina primária, grupo funcional com alto potencial para a conjugação. Normalmente, aminas primárias são encontradas em terminações de cadeias polipeptídicas, voltadas para fora da estrutura em consequência da carga positiva de sistemas fisiológicos. Esta conformação facilita a acessibilidade deste grupamento para a bioconjugação (HERMANSON, 2013). A estrutura do PAA, por sua vez, é rica em grupamentos carboxila, possibilitando a elaboração de uma estratégia que permita a ligação química entre esses grupamentos e as aminas das moléculas de AF. HERMANSON (2013) descreve diferentes estratégias adotadas para a conjugação entre aminas primárias e carboxilatos utilizando-se carbodiimidas, substâncias mediadoras desta reação. A estratégia mais utilizada, e escolhida para este trabalho, faz o emprego de cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), um intermediário que promove a formação de uma ligação amida entre as duas moléculas e, após a reação, não permanece no produto final (SCIENTIFIC, 2012; HERMANSON, 2013)

A reação entre a molécula contendo o carboxilato e a molécula contendo a amina primária intermediada pelo EDC (figura 9) é caracterizada por duas etapas. Inicialmente ocorre a funcionalização da primeira molécula, através da ativação do grupamento carboxila pelo EDC. Essa etapa envolve a formação de um derivado *O*-acilisourea, resultante da reação entre o EDC e o ácido carboxílico. Na segunda etapa, a reação progride com uma substituição nucleofílica, mediante a adição da substância que carrega a amina primária no meio reacional. Neste instante origina-se uma ligação amida entre as duas moléculas, em concomitância com a dissociação da fração correspondente ao EDC na forma de ureia *N*-substituída (GRABAREK e GERGELY, 1990; NAKAJIMA e IKADA, 1995).

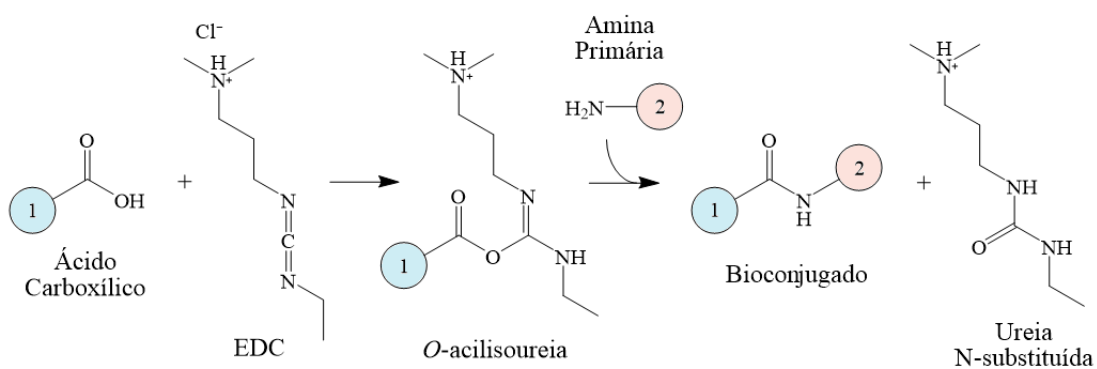


Figura 9 - Etapas da reação de bioconjugação. (Fonte: adaptado de SCIENTIFIC (2012).)

Além das vantagens citadas anteriormente, a bioconjugação entre o polímero e a vitamina pode contribuir para uma melhor configuração entre o ácido fólico e os receptores folato, partindo da premissa de que o polímero pode aumentar a flexibilidade do ácido fólico (LIU *et al.*, 2016). Dessa forma, espera-se que o AF seja adsorvido quimicamente no PAA neste trabalho. Essa técnica pode possibilitar que o sistema PAA-AF seja especificamente ligado a membranas de células cancerígenas e, conseqüentemente, melhorar a eficiência de fármacos que eventualmente serão transportados pela partícula polimérica.

Capítulo III

Metodologia Experimental

Neste capítulo, serão apresentados os materiais utilizados no trabalho, além dos procedimentos experimentais adotados para as etapas de polimerização e bioconjugação, divididos em duas seções, a fim de detalhar e descrever todas as etapas realizadas.

III.1 - Materiais

Para a obtenção das nanopartículas de poli(ácido acrílico) e sua posterior bioconjugação, diversos materiais, entre equipamentos, reagentes e vidrarias foram utilizados. Tais materiais são descritos na presente seção.

III.1.1 - Reações de Polimerização

Os materiais utilizados na obtenção do PAA, em ambos os métodos de polimerização realizados, serão descritos a seguir.

III.1.1.1 - Polimerização em Solução

Para a realização da etapa de polimerização em solução, foram utilizados o monômero ácido acrílico (AA, fornecido pela VETEC Química Fina, com pureza mínima de 99% e grau P.A.), o agente reticulante dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA, fornecido pela Sigma-Aldrich, com pureza mínima de 98%), o iniciador persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$, fornecido pela VETEC Química Fina, grau P.A.), e água ultrapura como solvente. As reações de polimerização foram realizadas em bécheres encamisados (aparato experimental apresentado na figura 10) e tampados com vidros de relógio. Para garantir o controle da temperatura ao longo da reação, o sistema foi conectado a um banho termostático. A homogeneização do meio foi garantida através de barras de agitação magnéticas, com o auxílio de uma placa de agitação magnética multipontos.

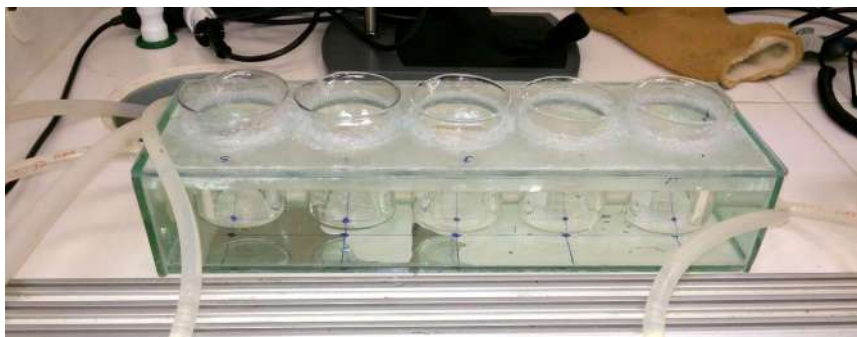


Figura 10 - Sistema de bécheres encamisados em banho termostático, empregado nas polimerizações em solução do ácido acrílico, com diferentes teores de reticulante. (Fonte: elaboração própria.)

III.1.1.2 - Polimerização em Miniemulsão Inversa

Na reação de polimerização em miniemulsão inversa foram utilizados, além dos reagentes citados anteriormente, óleo vegetal de soja (fornecido pela Liza®, pureza comercial) e o emulsificante monooleato de sorbitan (Span 80®, fornecido pela Sigma-Aldrich). Os reagentes foram utilizados da forma que foram adquiridos.

Os reagentes foram pesados em balança analítica, com o auxílio de béqueres e pipetas Pasteur, e a homogeneização dos mesmos para formação da emulsão foi realizada no sonicador Branson (Bransonic Digital Sonifier S-450D®, com 400 W de potência máxima). Um banho de gelo foi acrescentado ao sistema para evitar uma possível iniciação térmica. A reação de polimerização propriamente dita foi realizada em um reator de vidro encamisado de volume igual a 500 ml, com agitação mecânica promovida por agitador mecânico digital (IKA RW 20 Digital), com haste e impelidor de pá vertical revestidos por teflon e temperatura controlada. Este sistema está representado na figura 11.



Figura 11 - Unidade experimental empregada na produção de nanopartículas poliméricas de ácido acrílico, por meio de polimerização em miniemulsão inversa. (Fonte: elaboração própria.)

III.1.2 - Reações de Bioconjugação

A funcionalização do poli(ácido acrílico) foi realizada com a utilização do intermediário cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, fornecido pela Sigma-Aldrich, com pureza mínima de 99%) e do agente funcionalizante ácido fólico (AF, fornecido pela Sigma-Aldrich, com pureza mínima de 97%). Foram utilizados também, para o preparo de solução tampão, fosfato de sódio monobásico mono-hidratado (fornecido pela Vetec, com pureza mínima de 98%), fosfato de sódio dibásico (fornecido pela Vetec, com pureza mínima de 99%) e água ultrapura. Para as lavagens finais, foi preparada uma solução de hidróxido de sódio (fornecido pela Tedia Brazil, com pureza mínima de 97%) em água ultrapura. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos.

Os reagentes foram pesados em balança analítica, com o auxílio de espátulas de aço inoxidável e béqueres, e as soluções produzidas foram armazenadas temporariamente em erlenmeyers. Todas as transferências de líquidos foram realizadas com o auxílio de pipetas automáticas. As reações de funcionalização foram promovidas em tubos do tipo Falcon de

15 ml, fixados em haste conectada ao rotor IKA-Werke EUROSTAR Power Control-visc, conforme sistema de agitação demonstrado na figura 12.

Para a realização das lavagens dos polímeros funcionalizados, foram utilizadas membranas do tipo Amicon (100 kDa) e uma centrífuga Heraeus Megafuge 16R da Thermo Fisher Scientific, com rotor Fiberlite F15-6x100y.

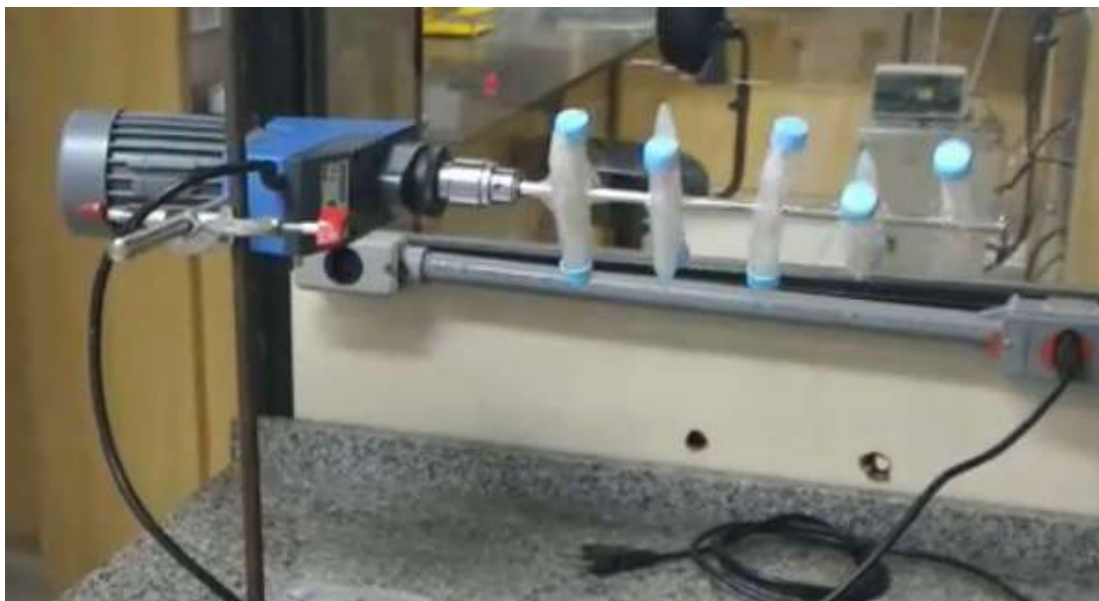


Figura 12 - Sistema de agitação de tubos. (Fonte: elaboração própria.)

III.2 - Procedimento Experimental

Nesta seção serão descritos os procedimentos realizados para a polimerização do poli (ácido acrílico), bem como para a conjugação do ácido fólico às partículas poliméricas.

III.2.1 - Reações de Polimerização

O foco do presente trabalho é a polimerização através da técnica de miniemulsão inversa. No entanto, foram realizados experimentos adotando a técnica de polimerização em solução, com a finalidade de obter, de forma mais simplificada, um polímero com propriedades físico-químicas compatíveis. Assim, foi possível proceder com as análises e caracterizações. Ambos os procedimentos serão descritos na presente seção.

III.2.1.1 - Polimerização em Solução

Com o objetivo de avaliar a influência do teor de reticulante em propriedades do polímero, reações de polimerização em solução foram realizadas. Primeiramente foi preparada uma solução aquosa do iniciador, onde 1% p/p de persulfato de potássio foi solubilizado em uma quantidade de água ultrapura, que variou entre 24% p/p e 69% p/p. Posteriormente, 30% p/p de ácido acrílico foram adicionados a um bécher de 250 ml, assim como quantidades de EGDMA que variaram entre 0% p/p e 45% p/p. A tabela 1 apresenta, resumidamente, os teores mássicos dos reagentes empregados nas reações de polimerização em solução.

Tabela 1 - Proporções de reagentes das reações em solução. (Fonte: elaboração própria.)

Reação	Ácido Acrílico (% p/p)	EGDMA (% p/p)	Iniciador (% p/p)	Água ultrapura (% p/p)
01	30	0	1	69
02	30	3	1	66
03	30	7	1	62
04	30	10	1	59
05	30	15	1	54
06	30	30	1	39
07	30	40	1	29
08	30	42	1	27
09	30	45	1	24

Após homogeneização da mistura reacional, com auxílio de agitação magnética, e estabelecimento da temperatura a 70 °C, através do banho termostático, a solução de iniciador foi adicionada e a reação foi iniciada. Embora as reações tenham ocorrido em apenas alguns minutos, os blocos macios de polímero formados foram deixados em seus respectivos bécheres para efeitos de comparação. Após o tempo determinado de 2h, cada bloco de polímero foi transferido para um gral e macerado com o auxílio de um pistilo. Como os blocos eram macios e de aspecto borrachoso, foi necessário adicionar nitrogênio líquido ao recipiente, submetendo o polímero a temperaturas bem inferiores à sua temperatura de transição vítrea (Tg). Desse modo, o material se tornou quebradiço, facilitando o processo

de maceração. O procedimento foi necessário para que fosse alcançada uma melhor distribuição granulométrica das amostras do polímero produzido.

III.2.1.2 - Polimerização em Miniemulsão Inversa

No procedimento experimental da etapa de polimerização do ácido acrílico em miniemulsão inversa, a fase contínua representou 80% p/p da massa total do experimento, e os outros 20% foram compostos pela fase dispersa. A fase contínua oleosa continha 97% p/p de óleo vegetal de soja e 3% p/p do agente emulsificante Span 80. Já a fase dispersa foi composta por 30% p/p do monômero ácido acrílico, 15% p/p do agente reticulante EGDMA, 54% p/p em água ultrapura e 1% p/p do iniciador persulfato de potássio. A tabela 2 resume a composição mássica de ambas as fases reacionais presentes na miniemulsão inversa.

Tabela 2 - Composição mássica das fases da miniemulsão. (Fonte: elaboração própria.)

Fase	Componente	Teor (% p/p)
Dispersa	Ácido Acrílico	30
	EGDMA	15
	Água ultrapura	54
	Persulfato de potássio	1
Contínua	Óleo vegetal	97
	Span 80	3

A fase aquosa contendo todos os componentes – exceto o iniciador – foi vertida a um bécher contendo a fase oleosa, e foi feita uma homogeneização prévia com um bastão de vidro. O bécher foi imerso em um banho de gelo e o sistema foi então levado ao sonificador, onde 30% da potência máxima do equipamento (120W) foi utilizada, durante o tempo de 10 minutos. Por ação de forças cisalhantes produzidas pelo equipamento, a miniemulsão foi formada como desejado. Apenas uma reação foi feita com a adição do iniciador antes da formação da miniemulsão, para efeitos de comparação.

A miniemulsão foi transferida para o reator de vidro encamisado com a temperatura do banho termostático já estabilizada. Reações foram realizadas em temperaturas fixas iguais a 60 °C, 70 °C e 80 °C, com o intuito de determinar uma temperatura ótima de polimerização,

ou seja, uma temperatura em que maiores valores de conversão fossem alcançados, sem prejudicar o desempenho do produto final. Um agitador mecânico foi acoplado ao sistema reacional e, após a agitação estar estabelecida em 800 (± 10) rpm e o equilíbrio térmico do sistema ter sido alcançado, o iniciador foi adicionado. Em todos os casos, o instante que foi considerado como início da polimerização foi o instante logo após a adição do iniciador. As reações ocorreram durante 4 horas e, após esse tempo, a mistura reacional foi resfriada, mantendo-se a agitação constante, até atingir temperatura ambiente.

O produto final (nanopartículas poliméricas) obtido apresentava-se disperso no meio oleoso, e uma etapa adicional de purificação foi necessária a fim de se obter o produto estabilizado em meio aquoso. A purificação foi realizada transferindo-se todo o conteúdo do reator para um bécher e adicionando-se uma quantidade de água ao meio, mantendo uma proporção de 1:2 (figura 13). Este sistema foi mantido em repouso durante 1 semana, com o objetivo de garantir uma total separação de fases e migração das nanopartículas poliméricas para a fase aquosa, através de decantação e afinidade química. A fase aquosa foi então transferida para um funil de separação e a fase oleosa foi devidamente descartada. Foi observado que, após 1 semana, a fase aquosa apresentava uma turbidez elevada e uma coloração esbranquiçada, o que indica a presença das nanopartículas em solução. No funil de separação, foram feitas algumas lavagens a fim de se retirar algum óleo residual. Após esse procedimento, parte do material foi seca em estufa de recirculação e parte foi armazenada ressuspensa em água. Após secas, foi observado que algumas amostras formaram filmes poliméricos, enquanto outras apresentaram a forma de um pó branco de baixa granulometria após terem sido maceradas com o auxílio de gral e pistilo.



Figura 13 – Início da etapa de purificação das partículas de PAA obtidas por reação de polimerização em miniemulsão inversa. (Fonte: elaboração própria.)

III.2.2 - Reações de Bioconjugação

As reações de funcionalização foram desenvolvidas a partir de uma adaptação do procedimento descrito por HERMANSON (2013), dividido em duas etapas. Vale ressaltar que o polímero utilizado neste procedimento foi o poli(ácido acrílico) produzido anteriormente por polimerização em miniemulsão a 70 °C, com um teor de 15% p/p de reticulante, e também que todos os percentuais descritos a seguir são mássicos e relativos à massa de PAA inicial empregada. Previamente, foram preparadas uma solução tampão fosfato em pH 6,8 e uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) em pH 10, empregados ao longo do procedimento e no processo de lavagem, respectivamente.

A primeira etapa (ativação do polímero) se iniciou com a transferência do PAA e de 30% de EDC, 5% de água ultrapura e 5% de solução tampão para o tubo Falcon. Em seguida, o tubo foi submetido a agitação a 50 rpm, durante 20 minutos. Após a agitação, a suspensão foi transferida para a membrana Amicon, e o sistema foi centrifugado a 6000 rpm por 10 min, com o objetivo de remover o excesso de EDC.

Para realizar a segunda etapa do procedimento de bioconjugação, o polímero ativado foi ressuspenso e transferido, com 5% de tampão, de volta ao tubo Falcon contendo 15% de ácido fólico. Novamente, o tubo foi submetido a agitação a 50 rpm, durante 2 horas. Decorrido o tempo de reação, a amostra foi lavada por ação de 5 ciclos com 5% de água ultrapura, 5 ciclos com 5% de tampão fosfato e 5 ciclos com 5% de solução de NaOH (pH 10), utilizando-se a membrana Amicon e a centrífuga, nas mesmas condições da primeira etapa. Alíquotas do material foram recolhidas ao longo do procedimento de lavagem e secas em estufa de recirculação, para análise do material por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os sobrenadantes gerados nos ciclos de lavagem também foram recolhidos para a detecção da presença de ácido fólico remanescente em solução em análise por espectroscopia na região de ultravioleta e visível (UV-vis).

Dois ensaios em branco foram elaborados para avaliar a eficácia do método de bioconjugação. Estes ensaios consistiram em realizar apenas a segunda etapa do método, sem a prévia ativação do polímero com o EDC e repetindo-se o restante do processo. No primeiro foi utilizada a solução tampão, seguindo o método utilizado neste trabalho. No segundo a solução foi substituída por água ultrapura.

III.3 - Caracterizações e Especificações de Equipamentos

Esta seção é dedicada à descrição das técnicas analíticas de caracterização dos polímeros obtidos a partir das reações de polimerização, tanto em solução quanto em miniemulsão inversa, e de bioconjugação, bem como dos equipamentos utilizados.

III.3.1 - Análise da Conversão

Para análise da conversão, foram retiradas, em instantes de tempo definidos, alíquotas das reações de polimerização em miniemulsão inversa realizadas. Foram utilizados cadinhos de vidro e pipetas Pasteur, além de balança analítica. Para interromper a reação de polimerização nas alíquotas retiradas, uma pequena quantidade de solução 1% p/p de hidroquinona (fornecida pela Tedia Brasil) foi adicionada a cada recipiente. Foram retiradas alíquotas de 3,0 mL e adicionadas 10 gotas da solução de hidroquinona em cada ponto. A

hidroquinona foi utilizada como recebida. Os tempos de amostragem para cada reação de polimerização realizada foram iguais a 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 210 e 240 minutos.

A análise de conversão foi feita por diferença mássica. Os recipientes foram, então, levados à estufa de vácuo com recirculação, com temperatura controlada entre 70 °C e 80 °C, durante vários dias, até a sua massa apresentar valores constantes, considerando a precisão de duas casas decimais.

III.3.2 - Análises de Inchamento e Solubilidade

Para realizar estudos acerca do comportamento do poli (ácido acrílico) reticulado em água, uma alíquota de cada polímero produzido em solução foi seca em estufa a 70 °C, até que apresentasse valor de massa constante. Em tubos do tipo Falcon, foram pesados 0,5 g da amostra seca junto a 9,5 g de água ultrapura. Os tubos foram submetidos a agitação (sistema ilustrado anteriormente na figura 12, seção III.1.2) e permaneceram em agitação durante 4 dias a 50 rpm. Ao término desse tempo, os tubos contendo as amostras em suspensão foram centrifugados a 10.000 rpm durante 5 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e a massa do conjunto foi aferida. Finalmente, os sólidos foram levados para secagem em estufa a 70 °C novamente, até que apresentassem valores de massa seca constantes.

III.3.3 - Análise Termogravimétrica (TGA)

A medida da variação da massa de PAA reticulado em relação à uma determinada variação de temperatura foi obtida através de equipamento fabricado pela Perkin-Elmer, modelo STA 6000. As análises termogravimétricas foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Polimerização (EngePol) da UFRJ, em atmosfera inerte e fluxo de nitrogênio constante igual a 20 mL.min⁻¹. A taxa de aquecimento foi mantida constante a 10 °C.min⁻¹.

III.3.4 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise teve como objetivo determinar as temperaturas das transições térmicas das partículas poliméricas obtidas. Para a padronização da história térmica das amostras foi utilizado o primeiro ciclo de aquecimento/resfriamento, enquanto o segundo ciclo foi utilizado com o objetivo de obter os termogramas propriamente ditos. Os termogramas foram

obtidos em equipamento fabricado pela Perkin-Elmer, modelo DSC 8500. As análises foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Polimerização (EngePol) da UFRJ, sob taxa constante de aquecimento/resfriamento igual a $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e atmosfera de nitrogênio.

III.3.5 - Espectroscopia na Região de Ultravioleta e Visível (UV-vis)

Para evitar interferência na análise de espectroscopia de infravermelho, verificou-se a presença de ácido fólico não reagido nos sobrenadantes de lavagem por meio de análises no espectrofotômetro UV-VIS fabricado pela Perkin-Elmer, modelo Lambda 35. As análises foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Polimerização (EngePol) da UFRJ, realizando-se lavagens e obtenções de espectros sucessivos nas amostras de polímero funcionalizado.

III.3.6 - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para a identificação dos principais grupos funcionais no polímero original e no funcionalizado, foi utilizado um espectrômetro fabricado pela Thermo Fisher Scientific, do Laboratório de Engenharia de Polimerização (EngePol) da UFRJ. O equipamento possui um detector MCT/B SmartOrbit, modelo Nicolet 6700. As análises foram realizadas na região do infravermelho médio ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$), em modo de reflexão total e resolução de 2 cm^{-1} .

III.3.7 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o objetivo de avaliar a morfologia das partículas poliméricas obtidas, a microscopia eletrônica de varredura foi realizada. As microscopias foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica e Microanálise da UFRJ, com o auxílio do equipamento JEOL Milestones, modelo 6460LV, equipado com filamento de tungstênio e resolução de 10 nm , com tensão máxima de operação igual a 30 kV . O metalizador utilizado foi o Emitech K550, com taxa de deposição igual a $50\text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$.

III.3.8 - Reologia

Para a medição da viscosidade, foram analisados os sistemas de partículas de PAA que foram ressuspensas em água, referentes ao planejamento experimental que será descrito na seção III.4. Cada amostra de polímero foi seca até peso constante, e, em tubos do tipo Falcon de 50,0 mL, foram pesados 0,4 g de amostra junto a 15,0 g de água ultrapura. Após agitação dos tubos por 5 dias a 60 rpm, cada amostra passou por três ciclos de 10 min de centrifugação a 800 rpm, para remoção das partículas e análise apenas do sobrenadante, que contém o hidrogel solubilizado parcialmente. As soluções sobrenadantes foram analisadas em reômetro da TA Instruments, modelo DHR, no Laboratório de Engenharia de Coloides da UFRJ (EngeCol). Foi utilizada a geometria de cilindros concêntricos de duplo gap, a 25° C por 300 s. Foram empregados taxa de cisalhamento de 10 s⁻¹ e 40 pontos por deca.

III.4 - Planejamento Experimental

Foi elaborado um planejamento experimental fatorial completo a dois níveis, com réplica no ponto central, com a intenção de estudar de que forma algumas características do polímero obtido variam com a as propriedades das reações em miniemulsão. O mesmo consistiu em estabelecer variáveis de entrada e saída do sistema, realizar os experimentos necessários e, a partir dos resultados de caracterizações, analisar estatisticamente possíveis relações entre tais variáveis. Vale ressaltar que, devido ao objetivo deste planejamento ter sido puramente avaliar a possível correlação entre as variáveis e a significância estatística entre elas, não foram definidos modelos matemáticos neste trabalho.

As caracterizações do material produzido contaram com análise termogravimétrica e ensaio reológico, conforme metodologias citadas na seção anterior. As características que se desejou estudar (variáveis de saída) foram a conversão após 2h de reação, a variação de massa através da última degradação térmica do polímero e a viscosidade do sobrenadante, a solubilidade e o inchamento do material, resultantes da imersão do PAA em água no ensaio reológico. As variáveis de entrada, apresentadas com seu ponto central (0) e seus limites superior (1) e inferior (-1) na tabela 3, foram a temperatura reacional (T) e os teores de monômero (A) e reticulante (R). As reações dessa análise foram baseadas na metodologia desenvolvida na seção III.2.1.2, e totalizaram 11 experimentos (8 reações principais e 3 réplicas no ponto central).

Tabela 3 - Variáveis de entrada do sistema e seus respectivos limites (Fonte: elaboração própria.)

Variável	Descrição	Unidade	-1	0	1
T	Temperatura	°C	65	70	75
A	Teor de AA	% p/p	30	40	50
R	Teor de EGDMA	% p/p	2	5	8

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do software Statistica 7, admitindo-se as hipóteses do modelo perfeito e experimento bem feito, utilizando-se de uma distribuição normal de probabilidades com intervalo de confiança de 95%. O erro foi avaliado com base nas repetições do ponto central e considerado constante para os demais experimentos. Por fim, admite-se também que as variáveis não estão correlacionadas (implicação do planejamento ortogonal), as variáveis independentes são isentas de erros e que todos os erros das variáveis dependentes sejam iguais e independentes.

Capítulo IV

Resultados e Discussão

O presente capítulo se dedica à apresentação dos resultados obtidos a partir das reações de polimerização, do procedimento de bioconjugação e da análise estatística. Também são apresentadas discussões quanto aos resultados obtidos e o que podem significar para o processo de obtenção das nanopartículas de poli(ácido acrílico) visadas no presente trabalho. O capítulo está dividido em três seções principais, associadas a cada bloco de experimentos realizados.

IV.1 – Reações de Polimerização

Como destacado anteriormente, a obtenção de partículas poliméricas via miniemulsão inversa é o principal estudo do trabalho. No entanto, reações de polimerização em solução variando a carga de reticulante foram realizadas, como estudos exploratórios, a fim de se avaliar mais facilmente determinadas características do polímero obtido. Nas reações realizadas em miniemulsão inversa foram avaliadas propriedades do material em função de efeitos de temperatura, teor de reticulante e adição de iniciador. Os resultados obtidos para as duas técnicas de polimerização utilizadas são demonstrados a seguir.

IV.1.1 - Conversão

Para efeitos de avaliação do percentual de conversão atingido pela reação de polimerização, dois parâmetros foram avaliados: influência da temperatura de reação e ordem de adição do iniciador no sistema reacional. As reações foram realizadas via miniemulsão inversa, seguindo o procedimento descrito na seção III.2.1.2.

A influência da temperatura sobre a conversão da reação de polimerização por miniemulsão inversa está ilustrada na figura 14. É possível perceber que o aumento da temperatura do meio reacional causa um aumento da conversão, como previsto pela termodinâmica. Com o auxílio da equação 1, sabe-se que a variação da entalpia de polimerização (ΔH) é negativa (reação exotérmica), bem como o termo relativo à entropia (-

T Δ S), tendo como consequência a variação negativa da energia livre de Gibbs (ΔG). Dessa forma, quanto maior a temperatura de reação, maior será o termo $-T\Delta S$ e mais negativa será a variação de G. Por conseguinte, a reação de polimerização será favorecida pelo aumento da temperatura reacional (ODIAN, 2004).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Eq. 1}$$

Outros fatores também devem ser levados em consideração antes de afirmar que a temperatura mais alta deve ser adotada no processo. Na reação realizada em temperatura mais baixa (60 °C), a conversão atingiu porcentagens muito baixas, não sendo representativa. Isto pode ser atribuído à possibilidade do iniciador não estar completamente ativo e disponível para a reação, visto que o persulfato de potássio forma radicais livres e é ativado termicamente (RUDIN e CHOI, 2012). A 70 °C, é possível perceber que, após os 240 minutos (4 h) de reação, a conversão alcança níveis próximos a 70 %. O percentual de conversão alcançado pela reação à temperatura de 80 °C se mostra próximo a 100 %, porém, nesta reação, foi observada uma pequena aglomeração do polímero. Sendo assim, esta temperatura está acima da desejada para a obtenção de partículas isoladamente dispersas. Pelo motivo apresentado, a reação a 70 °C foi escolhida como sendo a temperatura ótima de reação para o processo.

Polimerizações realizadas em miniemulsão tendem a apresentar uma cinética mais rápida do que a observada (CAPEK, 2010). Contudo, a cinética relativamente lenta pode ser atribuída à uma limitação difusional do iniciador para as gotículas de monômero. A alta viscosidade da fase contínua (óleo vegetal) também pode contribuir para a resistência à transferência de massa. A elevada taxa de conversão observada nos instantes iniciais da polimerização pode ser atribuída à possibilidade de iniciação térmica da reação, devido à promoção de pontos de aquecimento localizados, por ação do sonicador, no momento de formação da emulsão.

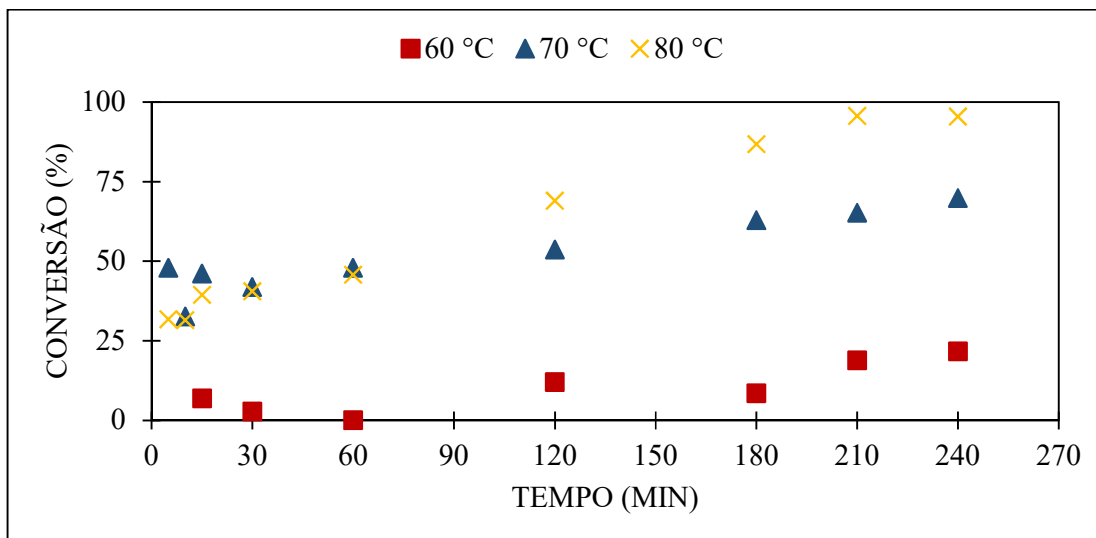


Figura 14 – Conversão alcançada (%) em relação ao tempo de reação (min), em diferentes temperaturas. (Fonte: elaboração própria.)

Para entender melhor a influência do momento de adição do iniciador, duas reações foram realizadas exatamente nas mesmas condições reacionais anteriores. Porém, em uma delas, o iniciador foi adicionado ao meio reacional no momento anterior à formação da miniemulsão, enquanto na outra prosseguiu-se com a adição após equilíbrio térmico no reator. Os resultados estão ilustrados na figura 15.

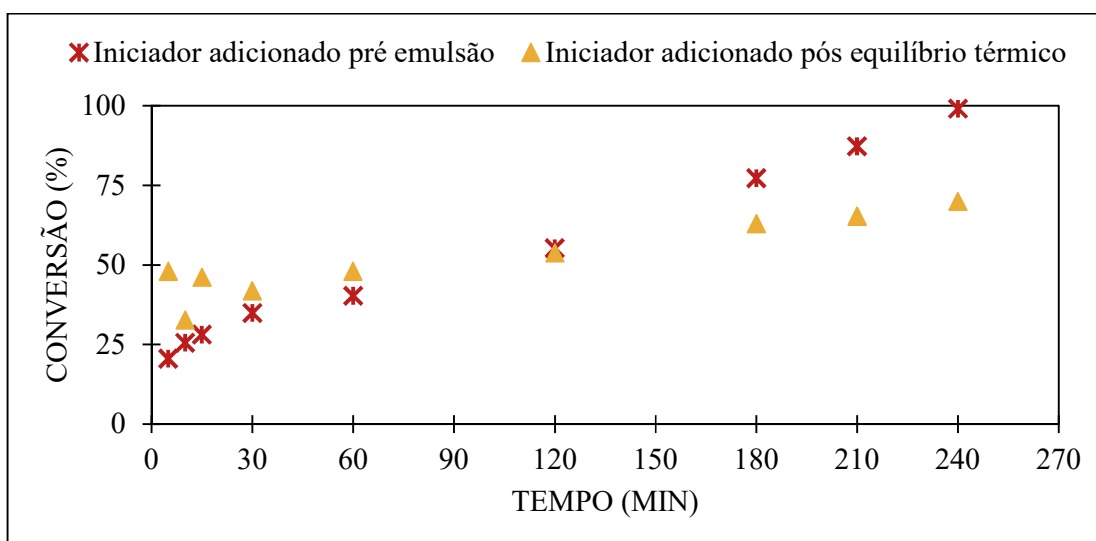


Figura 15 – Conversão alcançada (%) em relação ao tempo de reação (min), em relação ao momento de adição do iniciador. (Fonte: elaboração própria.)

Nos momentos iniciais, a conversão apresenta comportamento similar, tanto na reação em que o iniciador é adicionado no momento anterior à formação da emulsão quanto na reação em que o iniciador é adicionado pós equilíbrio térmico no reator. Após 120 minutos de reação (2 h), observa-se uma mudança no comportamento das curvas, de forma que a taxa de conversão é mais pronunciada na situação em que o iniciador é adicionado ao sistema desde o início do processo do que no caso da adição do iniciador ao meio reacional apenas após o equilíbrio térmico ser atingido no reator. A adição do iniciador antes da formação da miniemulsão, então, proporcionou uma maior conversão do monômero ao final do processo, chegando a valores próximos a 100 %, por volta de 5 h de reação.

A maior conversão alcançada no caso do iniciador adicionado na etapa pré emulsão pode ser explicada através de mecanismos de transferência de massa. Quando o iniciador é adicionado com a emulsão já estabilizada, gotas grandes contendo o iniciador coexistem com as gotículas da miniemulsão. O mecanismo de transferência de massa da gota de iniciador para a gotícula contendo o monômero é mais lento, uma vez que a difusão das moléculas de iniciador para as gotículas (nanorreatores) demora mais para ocorrer, em razão das limitações difusionais impostas pela configuração do sistema de emulsão formada (coexistência de gotas contendo iniciador e gotículas contendo o monômero). No caso da adição pré emulsão, não é necessário que o iniciador vença as limitações difusionais impostas pelo meio, pois ele está homoganeamente distribuído nas gotículas da emulsão, uma vez que o iniciador é agregado na fase aquosa que posteriormente é vertida sobre a fase contínua oleosa. Como a concentração de iniciador no interior das gotículas tende a ser maior e a atividade dos radicais livres é mantida por um tempo mais longo, a fase de terminação da reação se estende, proporcionando uma maior conversão.

IV.1.2 – Inchamento e Solubilidade

Foram realizadas reações de polimerização do ácido acrílico em solução aquosa, de acordo com o procedimento descrito na seção III.2.1.1, de modo a avaliar o nível de reticulação do polímero obtido.

Através dos dados de quantidade de água absorvida pelo polímero, seguindo protocolo descrito na seção III.3.2, foi possível avaliar o inchamento do poli(ácido acrílico) em água, com relação ao teor de reticulante empregado em cada uma das reações de polimerização em solução. Os resultados são apresentados na figura 16, que explicita a

tendência decrescente da absorção de água em função do aumento no teor de reticulante, além de mostrar uma reprodutibilidade aceitável. Esses resultados podem ser fundamentados a partir da premissa de que o teor de reticulante empregado nas reações de polimerização tende a influenciar positivamente a formação de entrelaçados tridimensionais curtos e firmes na cadeia polimérica. Em consequência, a cadeia reticulada não incha facilmente, o que impede a absorção de maiores teores de água (ARIMA *et al.*, 1996).

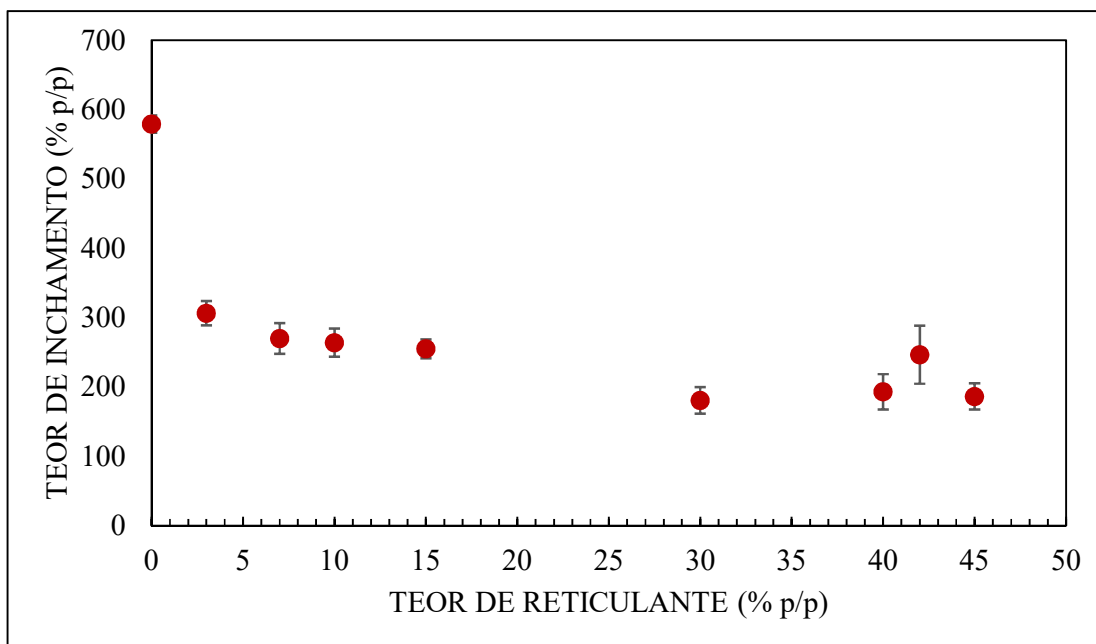


Figura 16 - Média percentual de água absorvida por teor de reticulante. (Fonte: elaboração própria.)

A análise de solubilidade do poli(ácido acrílico), por sua vez, foi realizada por balanço de massa, como detalhado na seção III.3.2. O PAA reticulado com EGDMA, quando submetido a meio aquoso, manifesta uma tendência em se solubilizar parcialmente. Tal tendência se justifica pela elevada solubilidade do PAA não reticulado, que compõe trechos da cadeia polimérica em estudo (LI *et al.*, 2004). Todavia, a solubilização apresentada não é muito significativa, o que indica a efetividade da reticulação da matriz polimérica de PAA por ação do reticulante EGDMA. A avaliação sobre a fração da amostra de polímero solubilizada em água (figura 17) corrobora a premissa de que materiais poliméricos com maiores teores de reticulante apresentam tendência a menor solubilidade. De fato, a presença mais expressiva de agente reticulante no meio reacional resulta em um material com maior

densidade de ligações cruzadas, o que reduz a solubilidade do polímero (CANEVAROLO JR, 2006).

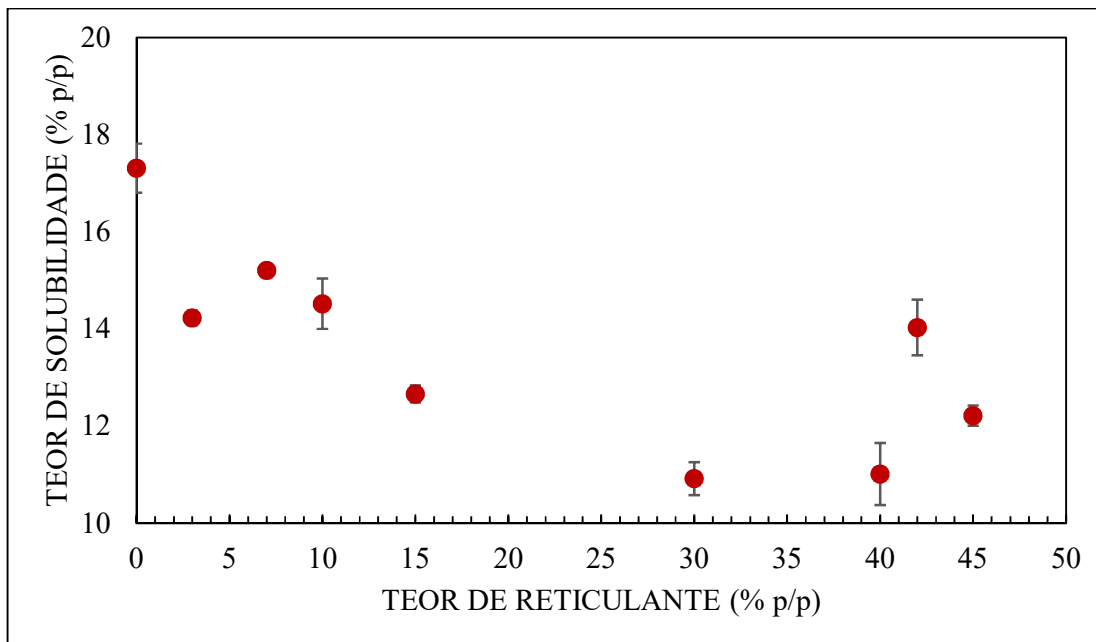


Figura 17 – Percentual de polímero solubilizado por teor de reticulante. (Fonte: elaboração própria.)

Os perfis de inchamento e solubilidade apresentados neste trabalho sugerem a efetiva reticulação do polímero, e apresentam indícios de que o nível da reticulação aumenta com o incremento no teor de reticulante no meio reacional. Em contrapartida, o aumento do efeito da ciclização com o acréscimo no teor de solvente no meio reacional, mencionado na seção II.3.3, contribui para a diminuição no nível de reticulação dos materiais analisados no presente trabalho. Desse modo, o hidrogel de PAA com EGDMA apresentou teores de inchamento elevados em meio aquoso, na faixa de 200 % a 300 %. Vale ressaltar que, como ambos os ensaios são realizados através de pesagens, erros experimentais podem exercer influência nas medidas, principalmente no ensaio de solubilidade, onde as massas absolutas tendem a ser menores.

Em relação à morfologia dos materiais produzidos ainda nas reações de polimerização em solução, ao final foram obtidos blocos sólidos de polímero, como esperado. Apenas na reação em que não foi empregado o reticulante o polímero foi obtido na forma de um filme. Os produtos obtidos através da técnica em solução estão apresentados

na figura 18. Foi observado que, nas reações onde baixos teores de agente reticulante foram utilizados (3 e 7% p/p), o polímero obtido apresentou um aspecto borrachoso, enquanto que nas reações com teores de EGDMA acima de 30%, apresentou aspecto quebradiço. Portanto, a carga de reticulante também afeta significativamente a resistência mecânica do material polimérico, o que está de acordo com a literatura (KONG *et al.*, 2003).

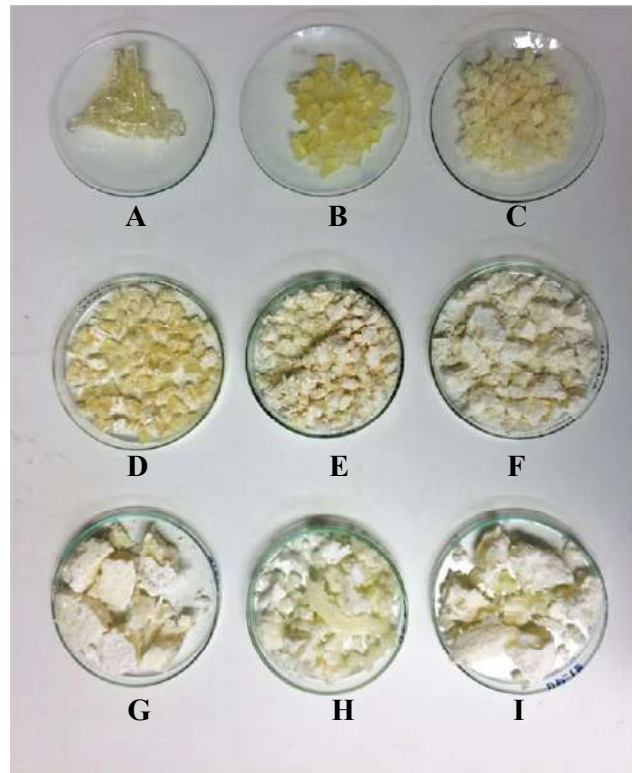


Figura 18 - PAAs obtidos via polimerização em solução pré-maceração, com teores mássicos (p/p) de EGDMA iguais a: (A) 0%; (B) 3%; (C) 7%; (D) 10%; (E) 15%; (F) 30%; (G) 40%; (H) 42%; (I) 45%.

(Fonte: elaboração própria.)

IV.1.3 - Análises Térmicas

A presente seção apresenta os resultados referentes às análises térmicas realizadas: TGA e DSC. Ainda, na subseção referente à termogravimetria, são apresentados os resultados e discussões relativos tanto ao material obtido via polimerização em solução quanto às partículas poliméricas sintetizadas por miniemulsão inversa.

IV.1.3.1 - Análise Termogravimétrica (TGA)

IV.1.3.1.1 - Polimerização em Solução

A estabilidade térmica dos polímeros obtidos via reação em solução foi avaliada. O termograma da reação de polimerização com teor de EGDMA igual a 15% p/p está apresentado na figura 19. As demais curvas de TGA são encontradas no Apêndice A. Observando os termogramas obtidos, condizentes com encontrados na literatura e característicos para o PAA, é possível constatar que o material apresenta duas temperaturas de degradação térmica, além de uma pequena perda de massa observada em temperaturas baixas – abaixo de 150 °C. Esta perda de massa encontrada em temperaturas baixas pode ser atribuída a perdas de água residual presentes no interior da cadeia polimérica, enquanto as perdas referentes a 250 e 400 °C são atribuídas à formação de anidrido e descarboxilação seguida de degradação da cadeia, respectivamente (ALI *et al.*, 2003 apud CERRAI *et al.*, 1994; CERRAI *et al.*, 1996). Além disso, pode ser observada uma mudança no comportamento da curva conforme o teor de EGDMA empregado aumenta. A segunda degradação térmica passa a ocorrer em temperatura mais alta em maiores concentrações de agente reticulante. Esse comportamento indica que o material é mais estável termicamente.

A maior estabilidade térmica apresentada pelo polímero indica que o nível de reticulação das cadeias aumenta de acordo com o teor de EGDMA, como esperado. Com um número alto de ligações cruzadas na cadeia polimérica, é necessária uma quantidade maior de energia térmica para o rompimento das ligações, uma vez que a rede polimérica apresenta maior grau de empacotamento.

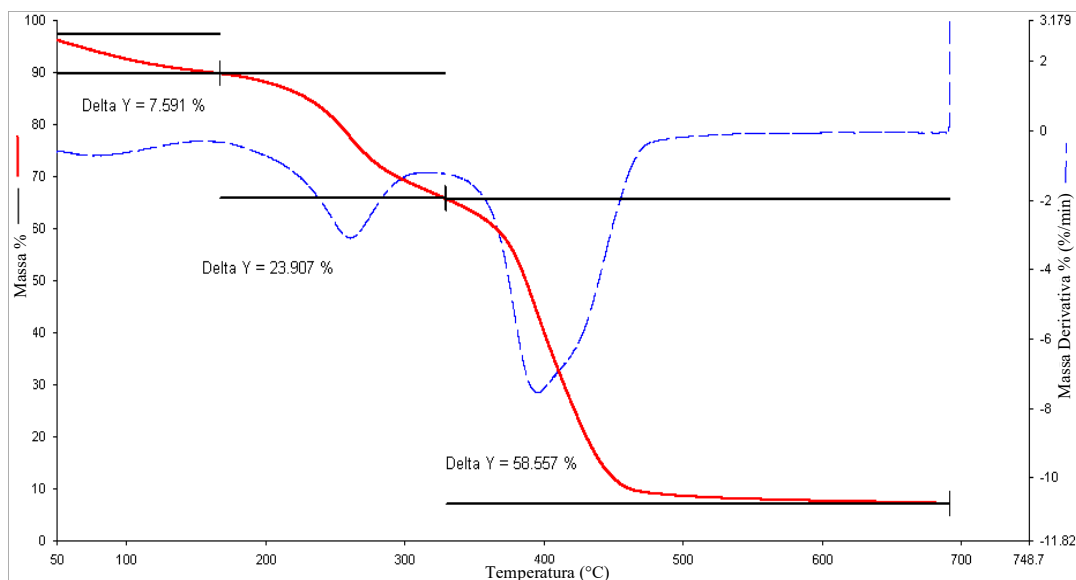


Figura 19 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 15% p/p de EGDMA. (Fonte: elaboração própria.)

IV.1.3.1.2 - Polimerização em Miniemulsão Inversa

A avaliação da estabilidade térmica também foi realizada para as reações de polimerização via miniemulsão inversa. A figura 20 apresenta o termograma da reação realizada com o teor de EGDMA igual a 15% p/p, seguindo a metodologia descrita na seção III.2.1.2. Conforme pode ser observado, o comportamento da curva para as nanopartículas poliméricas é semelhante ao observado para o material obtido via solução. Uma pequena perda de massa em temperaturas inferiores a 150 °C atribuída à perda de água residual presente nos intercrossamentos da cadeia é encontrada. Duas regiões de degradação térmica são observadas, com picos de perda de massa em torno de 250 °C e 420 °C, comprovados pela derivada da curva (apresentada em vermelho na figura). Como a maior perda de massa ocorre na maior temperatura de degradação, as nanopartículas poliméricas obtidas apresentam boa estabilidade térmica.

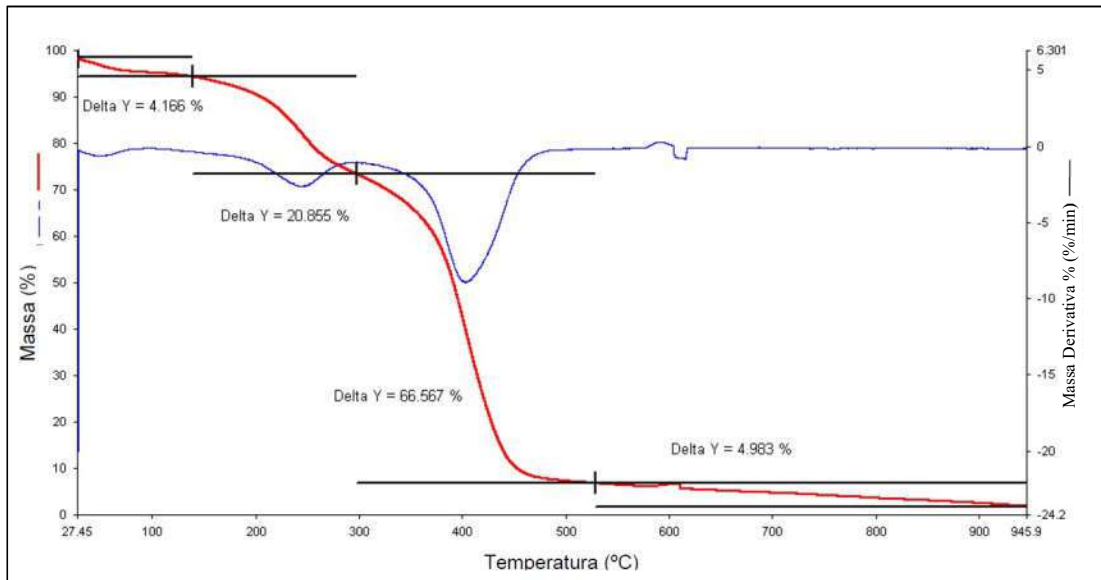


Figura 20 - TGA de partículas de PAA obtidas por polimerização em miniemulsão inversa. (Fonte: elaboração própria.)

IV.1.3.2 – Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A curva de DSC obtida para as partículas de PAA sintetizadas em miniemulsão inversa, de acordo com a metodologia descrita na seção III.2.1.2 (figura 21), é apresentada abaixo. É possível observar uma transição de fase de segunda ordem. A temperatura de transição vítrea (T_g) encontrada para as partículas obtidas é de 71,70 °C, concordando com o valor de T_g encontrado na literatura para o PAA puro (PINTO *et al.*, 2012). Polímeros reticulados possuem a tendência a não apresentar T_g , já que suas cadeias possuem alto grau de intercrossamento. No entanto, a presença de T_g para o polímero apresentado pode ser um indício do grau de reticulação do material, já que a T_g é dependente da flexibilidade da cadeia polimérica (ODIAN, 2004). Outro fato que pode ser destacado é a possibilidade da formação de um copolímero entre os reagentes (AA e EGDMA). Como ambos possuem insaturações em seus carbonos terminais, a existência da T_g apresentada na figura 21 pode indicar a formação de copolímeros em bloco. O EGDMA pode ainda atuar como monômero e reticulante na reação, formando o poli(dimetacrilato de etilenoglicol) (PEGDMA). Considerando essa hipótese, espera-se que haja uma transição de fases correspondente ao polímero. Dados encontrados na literatura indicam que a T_g do PEGDMA se encontra em torno de 50 °C negativo (KILLION *et al.*, 2011). No entanto, a análise não foi realizada para temperaturas negativas, não podendo ser observada mudança de linha de base adicional.

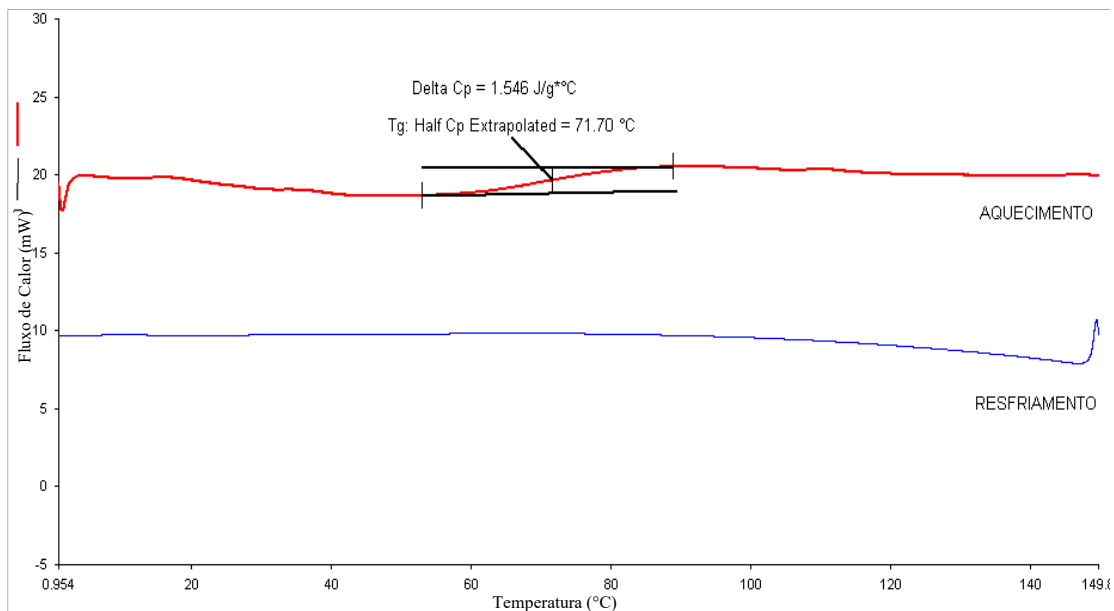


Figura 21 - DSC de partículas de PAA obtidas por polimerização em miniemulsão inversa. (Fonte: elaboração própria.)

IV.1.4 – Morfologia das Partículas

IV.1.4.1 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das partículas de PAA sintetizadas de acordo com a metodologia descrita na seção III.2.1.2 é apresentada nas imagens de microscopia eletrônica de varredura realizada (figura 22). As imagens obtidas apresentam aglomerados com diâmetro na ordem de 300 nm. É possível observar que as partículas possuem diâmetro inferior a 300 nm, apesar das limitações de resolução do equipamento não permitirem definir com mais clareza a delimitação das partículas. Para se obter uma melhor visualização da morfologia do material obtido, uma alternativa é a realização de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Contudo, a análise não foi realizada devido à indisponibilidade do equipamento. Neste tipo de microscopia pode ocorrer a degradação da amostra pelo feixe de elétrons, no momento da medida. Vale ressaltar que o material apresentou boa dispersão em água, permanecendo ressuspenso e não decantando com facilidade.

Foram realizados ensaios por técnica de espalhamento de luz, objetivando a determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas obtidas. Todavia, os resultados obtidos não foram representativos, fato que pode ter relação com a possibilidade de solubilidade parcial do PAA reticulado em meio aquoso. Outro fato que deve ser levado em consideração é a agregação de partículas que ocorre neste tipo de material (hidrogel).

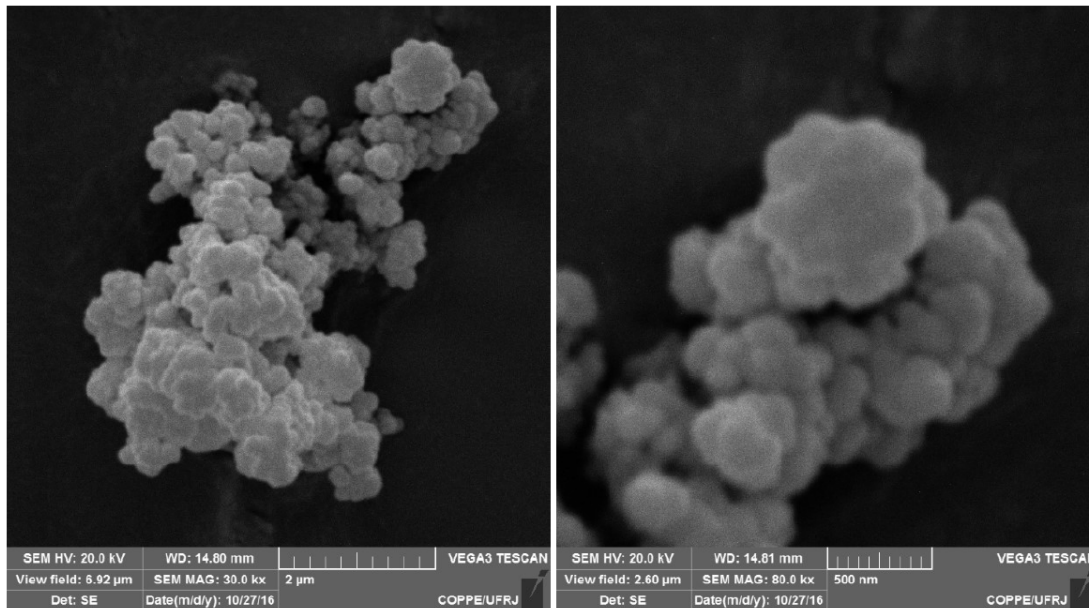


Figura 22 - MEV das partículas de PAA obtidas por polimerização em miniemulsão inversa. (Fonte: elaboração própria.)

O diâmetro das partículas poliméricas é um fator essencial para aplicações biomédicas, e é importante destacar que essa propriedade pode ser controlada através da modificação de parâmetros operacionais. Como visto anteriormente, a estabilidade da miniemulsão é um dos fatores críticos para a obtenção das nanopartículas, portanto um agente de pressão osmótica deve estar presente. Além disso, a etapa de formação da miniemulsão através de forças cisalhantes também pode modificar o diâmetro das partículas. Tais forças devem possuir alta intensidade para que seja possível a obtenção de partículas com dimensões submicrométricas (LANDFESTER *et al.*, 2000; LANDFESTER, 2006).

IV.2 – Bioconjugação

Esta seção se destina à avaliação do processo de bioconjugação entre o poli(ácido acrílico) e o biomarcador ácido fólico. Este material foi obtido conforme protocolos descritos na seção III.2.2, com o intuito de ser estudada a viabilidade de funcionalizar o polímero para aplicação em entrega de fármacos sítio-dirigida.

IV.2.1 - Pré-Tratamento

Antes de investigar a efetividade das reações realizadas, por meio da análise dos materiais produzidos por FTIR, foi necessário retirar todo o ácido fólico não reagido que pudesse estar adsorvido fracamente ou depositado na superfície do sistema bioconjugado poli(ácido acrílico)-ácido fólico (PAA-AF). Dessa forma, o ácido fólico não reagido não afetaria a avaliação dos espectros de infravermelho.

O ácido fólico apresenta coloração amarelada quando em solução aquosa e absorção de luz na região de comprimentos de onda de ultravioleta e visível, em torno de 280 e 360 nm (MATIAS *et al.*, 2014). A cada ciclo de lavagem, segundo procedimento descrito na seção III.2.2, foi avaliada a redução da concentração do AF na água de lavagem, por análise em espectrofotômetro. Os resultados dos espectros na região de ultravioleta e visível das últimas lavagens realizadas estão registradas na figura 23. Ainda na 5ª lavagem aparecem picos de intensidade de absorção em comprimentos de onda condizentes com o espectro de absorção obtido para o ácido fólico por MATIAS *et al.* (2014), e indicam a presença desse composto na solução sobrenadante. É possível observar que a intensidade de absorção se reduziu a cada lavagem adicional, até prevalecer somente o ruído do equipamento. Conseqüentemente, a concentração de ácido fólico não reagido na suspensão de PAA-AF se reduziu, supondo-se ao final das lavagens que o polímero filtrado possuía em sua maioria apenas o ácido fólico que foi adsorvido.

Vale ressaltar que o procedimento de lavagens foi realizado em condições de favorecimento da solubilidade do ácido acrílico, baseadas na literatura (YOUNIS *et al.*, 2009). Portanto, foi considerada apenas adsorção química ou física forte o suficiente para que não ocorresse o desprendimento.

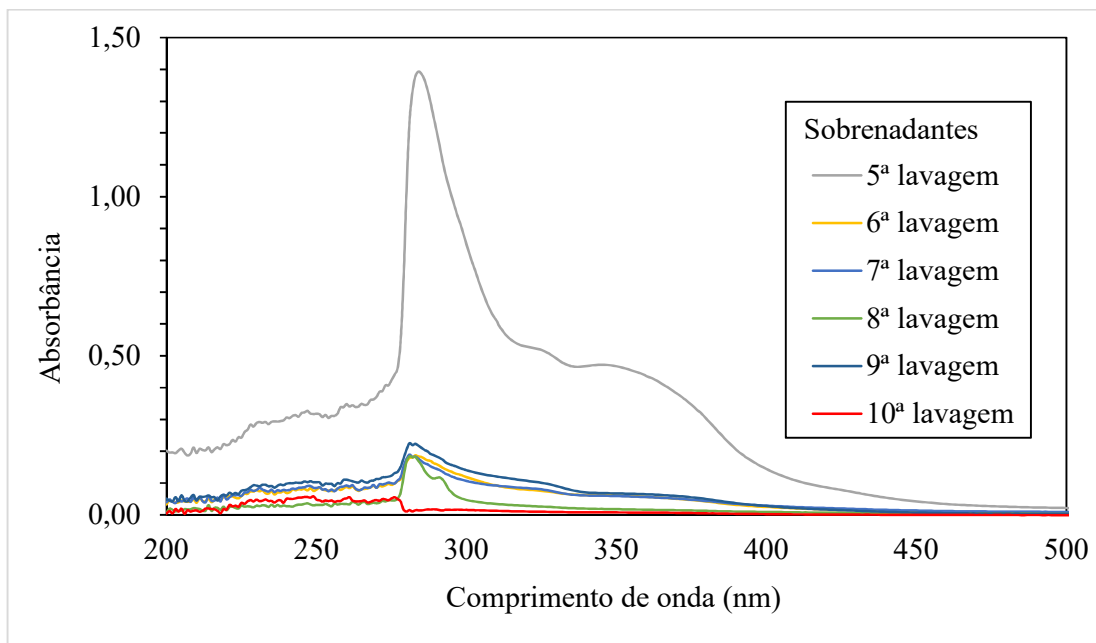


Figura 23 - Espectros de UV-vis dos sobrenadantes contendo AF residual. (Fonte: elaboração própria.)

IV.2.2 – Conjugação do Ácido Fólico

Para que fosse confirmada a formação efetiva de uma ligação química entre o polímero e a biomolécula, os precursores PAA e AF foram caracterizados previamente por FTIR, a fim de comparar as estruturas dos compostos puros com daqueles obtidos após a bioconjugação. Os espectros das substâncias antes e depois do processo de bioconjugação estão confrontadas na figura 24 e detalhadas a seguir.

O espectro de infravermelho correspondente ao PAA possui configuração semelhante a espectros encontrados para este material na literatura (RUTNAKORNPITUK *et al.*, 2011). O mesmo apresenta uma banda intensa em torno de 1712 cm^{-1} , característica das ligações carbonila na estrutura do polímero, além de bandas na região de 1000 a 1200 cm^{-1} , atribuídas à ligação C-O presente no ácido carboxílico. O espectro referente ao AF apresenta aspecto ruidoso, devido ao elevado número de bandas proveniente da grande variedade de ligações químicas presente na complexa estrutura da molécula orgânica em questão. Ainda assim, é importante destacar a banda em torno de 1552 cm^{-1} , que pode ser atribuída às ligações amina e amida, bem como à presença de anéis aromáticos na estrutura do AF (que pode ser vista na figura 8, seção II.4.3).

É possível observar que o espectro resultante da caracterização do polímero após a bioconjugação (sistema PAA-AF) diferencia-se do espectro do PAA anterior ao procedimento justamente através da presença da banda em torno de 1552 cm^{-1} , que consta apenas no AF. O aparecimento desta banda no espectro de infravermelho, após a conjugação entre os dois componentes, é um forte indicativo do sucesso na adsorção da vitamina na superfície do polímero, decorrente da reação de bioconjugação. Vale ressaltar que a adsorção ocorrida pode incluir tanto interações químicas quanto físicas, porém acredita-se que haja predominância das interações químicas devido ao tipo de reação empregado, que se utiliza do intermediário EDC para formar uma ligação peptídica entre a carbonila do PAA e a amina primária do AF. Não obstante, seria necessário outro tipo de caracterização para confirmar tal inferência.

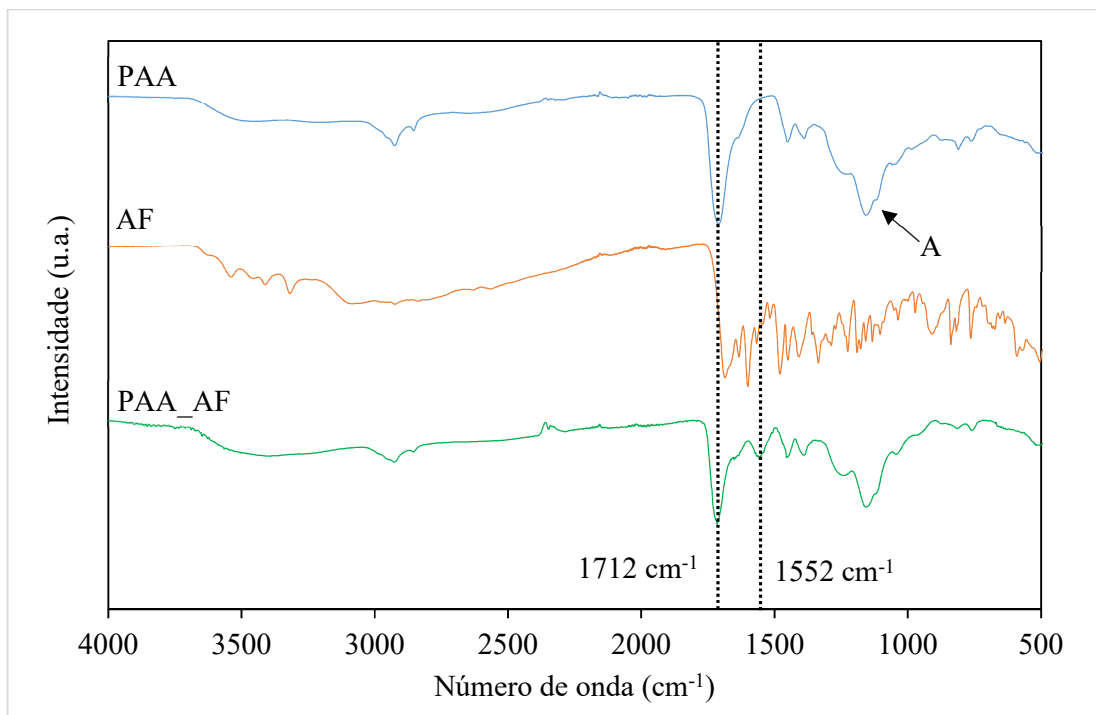


Figura 24 - Espectros de FTIR dos compostos antes e depois da bioconjugação. (Fonte: elaboração própria.)

Além da avaliação sobre o material bioconjugado por intermédio do EDC, também foi realizada a verificação da adsorção de AF na superfície do material polimérico proveniente da simples mistura em solução entre os dois componentes, desenvolvida nos ensaios em branco descritos no final da seção III.2.2. Após os ciclos de lavagem, os sólidos

resultantes foram submetidos também à caracterização por FTIR, e seus espectros são comparados ao espectro do bioconjugado PAA-AF na figura 25. Como se pode observar, a banda em torno de 1552 cm^{-1} , que sugere o acoplamento entre as duas moléculas, também aparece nos espectros correspondentes aos materiais produzidos em ambos os ensaios em branco (tanto em solução tampão quanto em água ultrapura). Esse resultado revela que, possivelmente, não há a necessidade do intermédio da reação de conjugação pela carbodiimida, ou a utilização de uma solução mais elaborada para este procedimento. Dessa forma, pode-se reduzir o custo com insumos e otimizar o número de etapas e o tempo do processo.

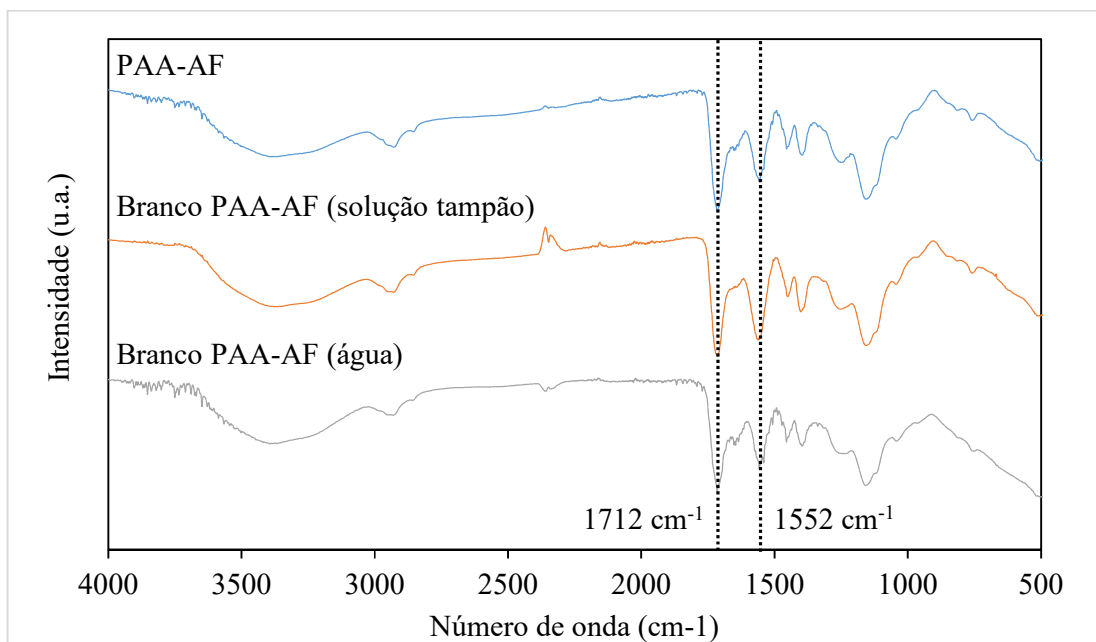


Figura 25 - Espectros de FTIR de bioconjugados: através da ativação por carbodiimida; através de ensaio em branco em solução tampão; através de ensaio em branco em água ultrapura. (Fonte: elaboração própria.)

Para auxiliar a comparação entre os espectros de FTIR mais relevantes nessa análise, as bandas presentes no intervalo de 1490 cm^{-1} a 1790 cm^{-1} foram avaliadas com maior atenção. O intervalo escolhido compreende os principais sinais procurados nos materiais, correspondentes às ligações carbonila (1770 cm^{-1}) e amida/amina/aromáticos (1552 cm^{-1}). Os espectros foram confrontados em gráficos de intensidade x intensidade, de forma a obter um coeficiente de determinação entre eles. Assim, quanto menor o coeficiente de determinação resultante, mais divergentes serão os espectros, de forma a facilitar a

confirmação do aparecimento de bandas ou mudanças de intensidades relativas pronunciadas entre os espectros.

Como mostra a figura 26, o coeficiente de determinação entre o polímero puro e o bioconjugado intermediado por EDC é de 0,42, mostrando que há pouca correspondência entre os dois perfis nesse intervalo de bandas. A baixa correlação entre os espectros ratifica a formação efetiva de ligação peptídica entre o AF e as partículas poliméricas, por aparecimento de banda correspondente a ligação amida, ou ao menos efetiva e forte adsorção física, uma vez que mesmo que a ligação química não ocorra, existem bandas características do AF nesta região.

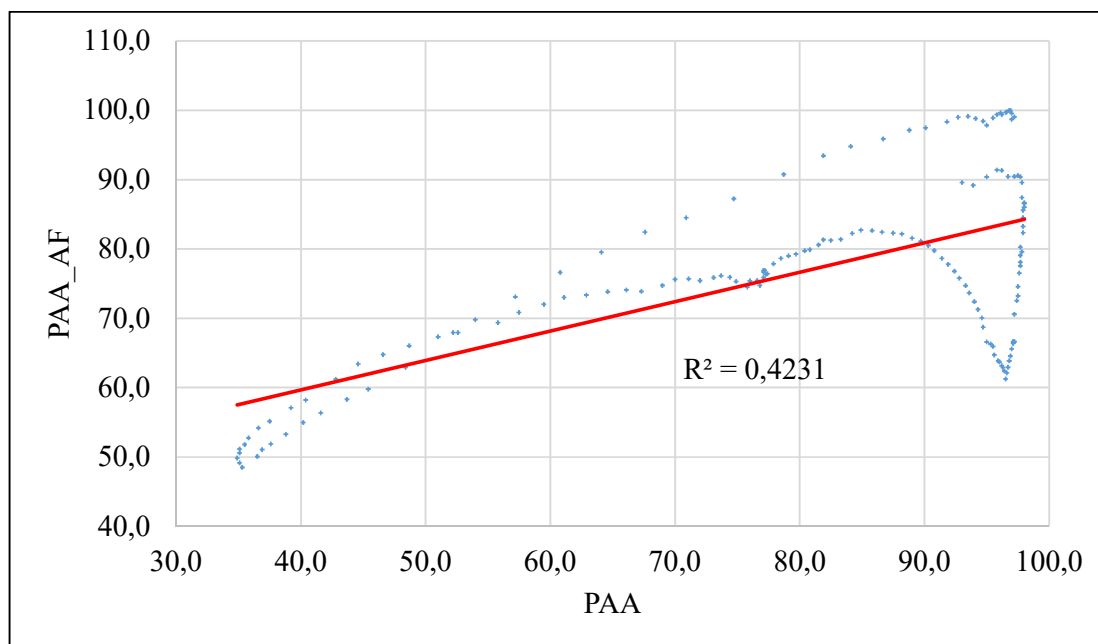


Figura 26 - Correlação entre os valores de intensidade dos espectros de FTIR do polímero puro e do bioconjugado por ativação. (Fonte: elaboração própria.)

Por outro lado, o confronto entre as intensidades dos espectros referentes ao ensaio em branco realizado com água ultrapura e ao bioconjugado pelo método de ativação (figura 27) produziu um coeficiente de determinação de 0,98. O coeficiente encontrado indica similaridade entre as bandas identificadas, confirmando a presença de AF, seja por adsorção química ou física, em ambos os materiais. Esse resultado corrobora a inferência sobre a conjugação da molécula ao polímero sem a necessidade da etapa de ativação.

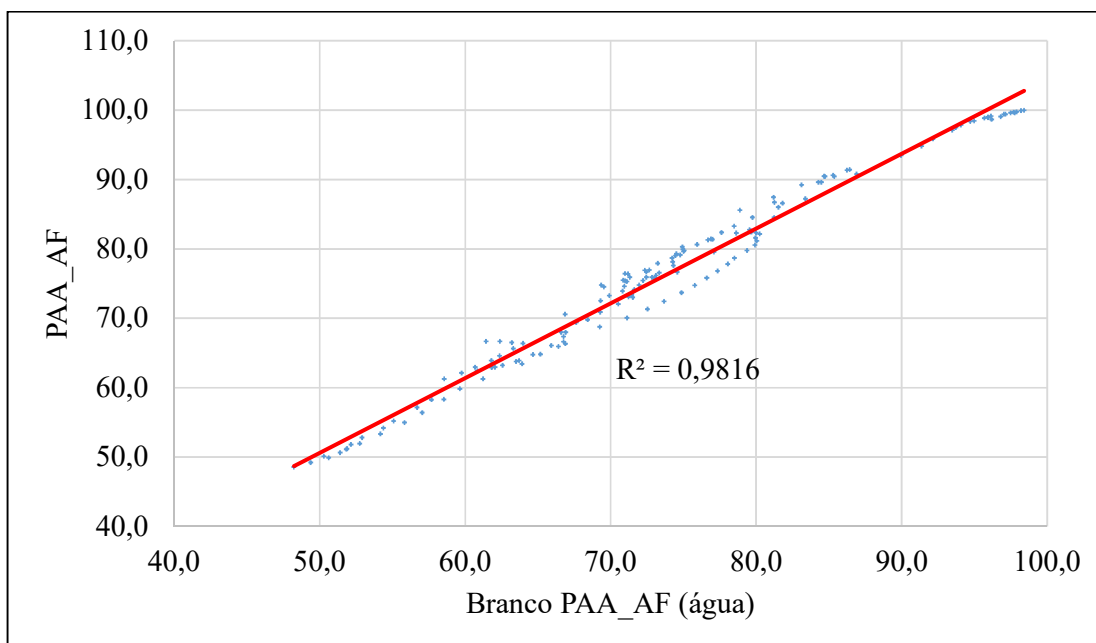


Figura 27 - Correlação entre os valores de intensidade dos espectros de FTIR do produto do ensaio em branco em água e do bioconjugado por ativação. (Fonte: elaboração própria.)

IV.3 - Análise Estatística

Os resultados numéricos obtidos para o planejamento experimental descrito na seção III.4 estão apresentados na tabela 4, associados às variáveis de entrada normalizadas utilizadas em cada experimento. Como já mencionado, esta análise teve por objetivo estudar como as propriedades de conversão reacional e reticulação do material variam com as condições de reação. Dessa forma, os valores obtidos para as variáveis de saída representam a conversão após 2h de reação (C), a variação de massa (M) referente à última degradação térmica do polímero nos ensaios de TGA encontrados no Apêndice B e, resultantes do ensaio reológico, a viscosidade do sobrenadante (V), a solubilidade (S) e o inchamento (I) do material.

Tabela 4 - Resultados numéricos das variáveis de saída do planejamento associados com cada condição de experimento utilizada. (Fonte: elaboração própria.)

T	A	R	C (% p/p)	M (% p/p)	V (cP)	S (% p/p)	I (% p/p)
1	1	1	69,39	41,98	7,50	35,58	11,58
1	1	-1	61,74	40,38	10,80	55,93	17,27
1	-1	1	94,37	45,18	6,50	25,65	14,64
1	-1	-1	87,92	42,4	11,70	45,48	26,84
-1	1	1	34,20	43,36	5,30	23,05	6,37
-1	1	-1	43,83	40,42	20,10	55,62	24,41
-1	-1	1	60,71	39,61	5,40	15,95	5,31
-1	-1	-1	69,20	41,73	10,10	42,63	21,36
0	0	0	59,40	39,58	5,00	18,43	6,00
0	0	0	70,59	39,65	5,40	19,08	5,42
0	0	0	66,89	40,64	6,70	23,32	15,51

*(T - Temperatura, A - Teor de monômero, R - Teor de reticulante)

A única condição de experimento que se repetiu foi a de ponto central (0,0,0), totalizando três réplicas iguais. A partir dos resultados referentes aos experimentos desta tréplica, foi calculado o erro do planejamento e assumido como constante para todas as condições experimentais. O tratamento destes dados é exibido na tabela 5, constituída pelos valores de média, variância e desvio padrão do ponto central do planejamento, para cada variável de saída. Apesar das variáveis conversão (C) e inchamento (I) terem apresentado valores de variância relativamente elevados, é possível realizar uma análise quantitativa dos dados, uma vez que os erros (desvio padrão) não refletem em valores estatisticamente iguais.

Tabela 5 - Tratamento de dados do ponto central. (Fonte: elaboração própria.)

Variável de saída	C (% p/p)	M (% p/p)	V (cP)	S (% p/p)	I (% p/p)
Média	65,63	39,96	5,70	20,28	8,98
Variância	32,50	0,35	0,79	7,05	32,06
Desvio Padrão	5,70	0,59	0,89	2,66	5,66

Com os dados, foi gerada uma matriz de correlação entre as variáveis de entrada e saída utilizadas neste planejamento experimental, através de uma análise multivariada das correlações. Seu conteúdo é exibido na tabela 6 e discutida nos parágrafos seguintes.

Tabela 6 - Matriz de correlação entre variáveis de entrada e de saída do planejamento experimental. (Fonte: elaboração própria.)

Variáveis	T	A	R	C	M	V	S	I
T	1,00	0,00	0,00	0,69	0,30	-0,11	0,19	0,18
A	0,00	1,00	0,00	-0,67	-0,17	0,25	0,30	-0,12
R	0,00	0,00	1,00	-0,03	0,33	-0,70	-0,74	-0,74
C	0,69	-0,67	-0,03	1,00	0,36	-0,16	-0,03	0,28
M	0,30	-0,17	0,33	0,36	1,00	-0,07	0,05	0,23
V	-0,11	0,25	-0,70	-0,16	-0,07	1,00	0,86	0,81
S	0,19	0,30	-0,74	-0,03	0,05	0,86	1,00	0,83
I	0,18	-0,12	-0,74	0,28	0,23	0,81	0,83	1,00

Como o planejamento experimental realizado é ortogonal, a tabela 6 apresenta uma matriz identidade ao correlacionar as variáveis de entrada do planejamento. Quanto às correlações entre as variáveis de entrada e de saída, as interações estatisticamente significativas estão destacadas (em vermelho) na tabela. Avaliando as interações significativas, é possível observar que o acréscimo na temperatura reacional (T), assim como a redução na carga de monômero (A), aumenta a conversão (C). O acréscimo no teor de reticulante (R) apenas afeta, significativamente, as variáveis relacionadas ao ensaio reológico (V, S e I), resultando em uma redução destas. Tais interações serão detalhadas mais adiante. As interações restantes (pares entrada/saída) não apresentaram correlações significativas. No entanto, apesar da variável de degradação térmica (M) não apresentar nenhuma correlação direta com as variáveis de entrada analisando individualmente, existe a possibilidade de estar correlacionada com pares de sinergia entre as variáveis de entrada, o que não foi analisado neste trabalho. Vale ressaltar que, entre as variáveis de saída, V, S e I são análogas, por expressarem a mesma propriedade estudada no polímero (grau de reticulação). Portanto, no canto inferior esquerdo da tabela são observadas correlações significativas entre elas.

O comportamento da conversão relativo à sua dependência direta com a temperatura, nesta análise, condiz com o resultado encontrado na seção IV.1.1, onde temperaturas mais altas acarretaram em conversões mais expressivas. Em relação à sua dependência negativa com o teor de monômero, a conversão se reduz pela premissa de que a geração de centros ativos que formarão as cadeias poliméricas é limitada pela carga de iniciador, devido ao mecanismo de iniciação da reação empregada. O radical formado pelo iniciador também não se propaga indefinidamente, portanto não sendo utilizado todo o restante do monômero na formação das cadeias. Assim, mantendo parâmetros como carga de iniciador e tempo de

reação constantes, apenas certa quantidade de monômero será utilizada pelo sistema, e o excedente inutilizado, resultando em menor conversão (MARTINS, 2017 apud ODIAN, 2004; CANEVAROLO JR, 2006).

Como esperado, através de outras caracterizações realizadas no presente capítulo referentes à reticulação do PAA, a solubilidade e o inchamento do material são afetados negativamente pelo acréscimo no teor de reticulante no meio reacional. Este fenômeno é justificado nos resultados do ensaio de imersão em água do PAA produzido por polimerização em solução, na seção IV.1.2, onde são descritas as consequências do entrelaçado tridimensional formado pelo agente reticulante. A relação inversa da viscosidade (V) com o teor de reticulante exibida na tabela também era esperada, visto que o maior grau de reticulação do material reduz a transferência do mesmo para a solução. Com isso, a redução da fração de polímero na solução provoca a atenuação na viscosidade resultante, já que os valores de viscosidade de cada componente individualmente (dado 1,0 cP para a água, 1,3 cP para AA e 3,2 cP para EGDMA) são inferiores aos valores exibidos na tabela 4 (MARTINS, 2017).

Capítulo V

Conclusões e Perspectivas

No presente trabalho foi possível sintetizar, pela técnica de miniemulsão inversa, partículas poliméricas a partir do ácido acrílico, com dimensões submicrométricas, estáveis em solução aquosa e com boa estabilidade térmica. A metodologia desenvolvida permitiu a síntese das partículas poliméricas em uma única etapa reacional. A partir dos resultados, pode-se observar que algumas propriedades do processo de miniemulsão e, por consequência, do produto, são manipuláveis, tais como o rendimento da reação e o grau de reticulação do polímero. Tais propriedades ajudam a estudar uma possível otimização do processo e prever o comportamento do material produzido. Também foi possível, a partir de métodos adicionais, modificar esse mesmo material com ácido fólico, de forma a aumentar ainda mais o seu potencial de aplicação na área da biomedicina, tendo em vista que o polímero de ácido acrílico tem sido amplamente estudado e utilizado para essa finalidade.

A técnica de miniemulsão inversa desenvolvida neste trabalho compreendeu a utilização de duas fases imiscíveis no meio reacional. A fase dispersa incluiu a água atuando como solvente e coestabilizante do sistema, além dos principais componentes formadores do polímero desejado, ácido acrílico e EGDMA, devido à hidrofiliabilidade dos mesmos. É importante destacar que a utilização da água como coestabilizante foi essencial para a manutenção da estabilidade da miniemulsão, favorecendo a formação de partículas de dimensões submicrométricas (inferiores a 300 nm). Foi constatado que a inserção do iniciador também na composição dessa fase é uma abordagem mais adequada, evitando assim a limitação difusional observada quando este é inserido após a formação da emulsão entre as fases, que pode prejudicar o andamento da reação e acarretar em uma menor conversão do monômero. A fase contínua, composta principalmente por óleo vegetal, ajudou a manter a fase aquosa bem distribuída, em conjunto com o surfactante utilizado, Span 80. Os diversos experimentos realizados sugerem que a melhor faixa de temperatura reacional para essa técnica é de 70° C, visto que temperaturas superiores resultam em aglomerações das partículas, enquanto temperaturas inferiores prejudicam o rendimento.

As análises sobre o material produzido através da técnica de miniemulsão inversa permitiram concluir que o ácido acrílico se polimeriza sofrendo reticulação com atuação do EGDMA. Análises térmicas realizadas comprovaram que a adição do EGDMA acarreta em

maior estabilidade térmica e diminuição da hidrofobicidade do material hidrogel, refletindo em redução de propriedades tais como solubilidade e inchamento em solução aquosa. Esse efeito favorece a aplicação biomédica de polímeros de ácido acrílico que possuam maior grau de reticulação, dado que a solubilidade e a variação na sua distribuição de tamanho em ambientes aquosos tendem a ser menores. Para controle do diâmetro médio das partículas formadas também é possível uma alteração na intensidade das forças cisalhantes utilizadas para formação da miniemulsão. Maiores intensidades permitem a formação de gotículas menores e mais bem distribuídas.

A metodologia de bioconjugação empregada se mostrou eficaz, pois promoveu a adsorção (química ou física) do ácido fólico na superfície das partículas poliméricas de PAA. Este acoplamento entre as moléculas pode dar origem a ferramentas úteis para o tratamento de câncer e outras doenças, uma vez que é possível utilizar as terminações carboxila do PAA para ancorar biomoléculas e ampliar seu potencial. Ainda, experimentos adicionais mostraram que, possivelmente, a etapa de ativação com carbodiimida não se faz necessária.

É proposto que maiores estudos sejam realizados, de forma a aprofundar o conhecimento sobre as técnicas e materiais explorados neste trabalho. Tais estudos incluem:

- ❖ Aprofundamento sobre o mecanismo de formação das cadeias e reticulação, de forma a avaliar possíveis modificações no procedimento de polimerização e otimizar o grau de reticulação do PAA, reduzindo assim o efeito de inchamento;
- ❖ Realização de experimentos variando a intensidade e a fonte das forças cisalhantes para formação da miniemulsão, com o objetivo de verificar a real interferência dessas variáveis sobre o comportamento das partículas poliméricas sintetizadas;
- ❖ Variação da fase contínua a fim de se avaliar as vantagens e desvantagens do emprego de óleo vegetal, em comparação com outros solventes;
- ❖ Ensaios de incorporação de fármacos à estrutura do PAA, já que as nanopartículas poliméricas possuem o potencial de encapsulamento, com o objetivo de proteger o fármaco contra degradações indesejadas através do organismo e facilitar seu transporte para aplicações *sítio* dirigidas (quando funcionalizadas com biomarcadores);
- ❖ Avaliação do perfil de liberação de fármacos encapsulados em ambientes similares aos do organismo, com a possível utilização de estímulos, tais como variações no pH ou na temperatura, que incitem a liberação;

- ❖ Avaliação da eficácia do direcionamento do polímero bioconjugado com ácido fólico a ambientes com alta concentração de receptores folato, a fim de examinar e otimizar o acúmulo do material em células tumorais.

Capítulo VI

Referências Bibliográficas

AHN, J.-S.; CHOI, H.-K.; CHO, C.-S. A Novel Mucoadhesive Polymer Prepared by Template Polymerization of Acrylic Acid in the Presence of Chitosan. **Biomaterials**, v. 22, n. 9, p. 923-928, 2001. ISSN 0142-9612.

AHN, J. S.; CHOI, H. K.; LEE, K. H.; NAHM, J. H.; CHO, C. S. Novel Mucoadhesive Polymer Prepared by Template Polymerization of Acrylic Acid in the Presence of Silk Sericin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 80, n. 2, p. 274-280, 2001. ISSN 1097-4628.

ALI, A. E.-H.; SHAWKY, H.; EL REHIM, H. A.; HEGAZY, E. Synthesis and Characterization of PVP/AAc Copolymer Hydrogel and its Applications in the Removal of Heavy Metals from Aqueous Solution. **European Polymer Journal**, v. 39, n. 12, p. 2337-2344, 2003. ISSN 0014-3057.

ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. Polyreactions in Miniemulsions. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 4, p. 689-757, 2002. ISSN 0079-6700.

ARIMA, T.; MURATA, H.; HAMAD, T. The Effects of Cross-Linking Agents on the Water Sorption and Solubility Characteristics of Denture Base Resin. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 23, n. 7, p. 476-480, 1996. ISSN 1365-2842.

BAJPAI, A.; SHUKLA, S. K.; BHANU, S.; KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 11, p. 1088-1118, 2008. ISSN 0079-6700.

BARTLING, G. J.; BROWN, H. D.; CHATTOPADHYAY, S. K. Synthesis of a Matrix-Supported Enzyme in Non-Aqueous Conditions. **Nature**, v. 243, n. 5406, p. 342-344, 1973.

BILLMEYER, F. **Textbook of Polymer Science**. 3^a ed. New York: Wiley-Interscience, 1984. 578 p. ISBN 0471031968.

BROMBERG, L. Polyether-Modified Poly(acrylic acid): Synthesis and Applications. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 37, n. 11, p. 4267-4274, 1998. ISSN 0888-5885.

BUCHHOLZ, F. L. Superabsorbent Polymers. In: (Ed.). **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**: John Wiley & Sons, Inc., 2006. ISBN 9780471440260.

BUCHHOLZ, F. L.; PEPPAS, N. A. **Superabsorbent Polymers: Science and Technology**. ACS Publications, 1994. p. ISBN 0841230390.

CANEVAROLO JR, S. V. **Ciência dos Polímeros: Um Texto Básico para Tecnólogos e Engenheiros**. 2ª ed. São Paulo: Artiber editora, 2006. 280 p. ISBN 85-88098-10-5.

CAPEK, I. On Inverse Miniemulsion Polymerization of Conventional Water-Soluble Monomers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 156, n. 1, p. 35-61, 2010. ISSN 0001-8686.

CAROTHERS, W. H. Studies on Polymerization and Ring Formation. I. An Introduction to the General Theory of Condensation Polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 51, n. 8, p. 2548-2559, 1929/08/01 1929. ISSN 0002-7863.

CARRAHER JR., C. E. **Seymour/Carraher's Polymer Chemistry: Sixth Edition**. 6ª ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003. p. ISBN 0-8247-0806-7.

CERRAI, P.; GUERRA, G. D.; MALTINTI, S.; TRICOLI, M.; GIUSTI, P.; PETARCA, L.; POLACCO, G. Physicochemical Properties of Poly(allylammonium acrylate) Complexes Obtained by Radical Template Polymerization. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 15, n. 12, p. 983-990, 1994. ISSN 1521-3927.

CERRAI, P.; GUERRA, G. D.; TRICOLI, M.; MALTINTI, S.; BARBANI, N.; PETARCA, L. Polyelectrolyte Complexes Obtained by Radical Polymerization in the Presence of Chitosan. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 197, n. 11, p. 3567-3579, 1996. ISSN 1521-3935.

CHOI, H. K.; KIM, O. J.; CHUNG, C. K.; CHO, C. S. A Novel Mucoadhesive Polymer Prepared by Template Polymerization of Acrylic Acid in the Presence of Poly(ethylene glycol). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 73, n. 13, p. 2749-2754, 1999. ISSN 1097-4628.

CHUN, M. K.; CHO, C. S.; CHOI, H. K. A Novel Mucoadhesive Polymer Prepared by Template Polymerization of Acrylic Acid in the Presence of Poloxamer. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, n. 8, p. 1525-1530, 2001. ISSN 1097-4628.

EL-AASSER, M. S.; SUDOL, E. D. Miniemulsions: Overview of Research and Applications. **JCT Research**, v. 1, n. 1, p. 21-32, 2004. ISSN 1547-0091.

ELLIOTT, J. E.; MACDONALD, M.; NIE, J.; BOWMAN, C. N. Structure and Swelling of Poly(acrylic acid) Hydrogels: Effect of pH, Ionic Strength, and Dilution on the Crosslinked Polymer Structure. **Polymer**, v. 45, n. 5, p. 1503-1510, 2004. ISSN 0032-3861.

FERREIRA, P.; COELHO, J.; DOS SANTOS, K.; FERREIRA, E.; GIL, M. Thermal Characterization of Chitosan-Grafted Membranes to be Used as Wound Dressings. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 25, n. 2-3, p. 233-251, 2006. ISSN 0732-8303.

FLORY, P. J. **Principles of Polymer Chemistry**. Cornell University Press, 1953. 672 p. ISBN 9780801401343.

FOSS, A. C.; GOTO, T.; MORISHITA, M.; PEPPAS, N. A. Development of Acrylic-Based Copolymers for Oral Insulin Delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 163-169, 2004. ISSN 0939-6411.

GRABAREK, Z.; GERGELY, J. Zero-Length Crosslinking Procedure With the Use of Active Esters. **Analytical Biochemistry**, v. 185, n. 1, p. 131-135, 1990. ISSN 0003-2697.

GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C.; NECKEL, G.; LEMOS-SENNA, E. O Emprego de Sistemas de Liberação Como Estratégia para Melhorar as Propriedades Terapêuticas de Fármacos de Origem Natural: o Exemplo da Camptotecina e seus Derivados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 129-139, 2009. ISSN 2179-443X.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel Nanoparticles in Drug Delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638-1649, 2008. ISSN 0169-409X.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. 3^a ed. Elsevier Science, 2013. 1146 p. ISBN 9780123822406.

HOFFMAN, A. S. "Intelligent" Polymers in Medicine and Biotechnology. *Macromolecular Symposia*, 1995, Wiley Online Library. p.645-664.

HOFFMAN, A. S. Surface Modification of Polymers: Physical, Chemical, Mechanical and Biological Methods. *Macromolecular Symposia*, 1996, Wiley Online Library. p.443-454.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for Biomedical Applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 18-23, 2012. ISSN 0169-409X.

HORIE, K.; BARÓN, M.; FOX, R. B.; HE, J.; HESS, M.; KAHOVEC, J.; KITAYAMA, T.; KUBISA, P.; MARÉCHAL, E.; MORMANN, W.; STEPTO, R. F. T.; TABAK, D.; VOHLÍDAL, J.; WILKS, E. S.; WORK, W. J. Definitions of Terms Relating to the Structure and Processing of Sols, Gels, Networks, and Inorganic-Organic Hybrid Materials (Iupac Recommendations 2007). **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 10, p. 1801-1829, 2007. ISSN 1365-3075.

JABBARI, E.; NOZARI, S. Swelling Behavior of Acrylic Acid Hydrogels Prepared by Γ -Radiation Crosslinking of Polyacrylic Acid in Aqueous Solution. **European Polymer Journal**, v. 36, n. 12, p. 2685-2692, 2000. ISSN 0014-3057.

JAGUR-GRODZINSKI, J. Biomedical Application of Functional Polymers. **Reactive & Functional Polymers**, v. 39, p. 99-138, 1999.

JENQUIN, M. R.; MCGINITY, J. W. Characterization of Acrylic Resin Matrix Films and Mechanisms of Drug-Polymer Interactions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 101, n. 1, p. 23-34, 1994. ISSN 0378-5173.

KILLION, J. A.; GEEVER, L. M.; DEVINE, D. M.; KENNEDY, J. E.; HIGGINBOTHAM, C. L. Mechanical Properties and Thermal Behaviour Of PEGDMAa Hydrogels for Potential Bone Regeneration Application. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 7, p. 1219-1227, 2011. ISSN 1751-6161.

KIM, S.; KIM, J.-H.; JEON, O.; KWON, I. C.; PARK, K. Engineered Polymers for Advanced Drug Delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 420-430, 2009. ISSN 0939-6411.

KONG, H. J.; WONG, E.; MOONEY, D. J. Independent Control of Rigidity and Toughness of Polymeric Hydrogels. **Macromolecules**, v. 36, n. 12, p. 4582-4588, 2003. ISSN 0024-9297.

KOUL, V.; MOHAMED, R.; KUCKLING, D.; ADLER, H.-J. P.; CHOUDHARY, V. Interpenetrating Polymer Network (IPN) Nanogels Based on Gelatin and Poly(acrylic acid) by Inverse Miniemulsion Technique: Synthesis A=and Characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 2, p. 204-213, 2011. ISSN 0927-7765.

KRIWET, B.; WALTER, E.; KISSEL, T. Synthesis of Bioadhesive Poly(acrylic acid) Nano- and Microparticles Using an Inverse Emulsion Polymerization Method for the Entrapment of Hydrophilic Drug Candidates. **Journal of Controlled Release**, v. 56, n. 1, p. 149-158, 1998. ISSN 0168-3659.

LAGANÀ, A.; VENDITTI, I.; FRATODDI, I.; CAPRIOTTI, A. L.; CARUSO, G.; BATTOCCHIO, C.; POLZONETTI, G.; ACCONCIA, F.; MARINO, M.; RUSSO, M. V. Nanostructured Functional Co-Polymers Bioconjugate Integrin Inhibitors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 361, n. 2, p. 465-471, 2011. ISSN 0021-9797.

LANDFESTER, K. Synthesis of Colloidal Particles in Miniemulsions. **Annu. Rev. Mater. Res.**, v. 36, p. 231-279, 2006. ISSN 1531-7331.

LANDFESTER, K.; WILLERT, M.; ANTONIETTI, M. Preparation of Polymer Particles in Nonaqueous Direct and Inverse Miniemulsions. **Macromolecules**, v. 33, n. 7, p. 2370-2376, 2000. ISSN 0024-9297.

LI, A.; WANG, A.; CHEN, J. Studies on Poly(acrylic acid)/Attapulgite Superabsorbent Composite. I. Synthesis and Characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 92, n. 3, p. 1596-1603, 2004. ISSN 1097-4628.

LIM, D.-W.; SONG, K.-G.; YOON, K.-J.; KO, S.-W. Synthesis of Acrylic Acid-Based Superabsorbent Interpenetrated with Sodium PVA Sulfate Using Inverse-Emulsion Polymerization. **European Polymer Journal**, v. 38, n. 3, p. 579-586, 2002. ISSN 0014-3057.

LIONG, M.; LU, J.; KOVOCHICH, M.; XIA, T.; RUEHM, S. G.; NEL, A. E.; TAMANOI, F.; ZINK, J. I. Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery. **ACS Nano**, v. 2, n. 5, p. 889-896, 2008. ISSN 1936-0851.

LITWACK, G. **Folic Acid and Folates**. Academic Press, 2008. 443 p. ISBN 0123742323.

LIU, W.; NIE, L.; LI, F.; AGUILAR, Z. P.; XU, H.; XIONG, Y.; FU, F.; XU, H. Folic Acid Conjugated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Nondestructive Separation and Detection of Ovarian Cancer Cells from Whole Blood. **Biomaterials Science**, v. 4, n. 1, p. 159-166, 2016.

LIU, Z.; BROOKS, B. A Study of Inverse Dispersion Polymerization of Acrylic Acid Using Water-Soluble Redox Initiators. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 66, n. 11, p. 2191-2197, 1997. ISSN 1097-4628.

MAGRINI, A. **Impactos Ambientais Causados pelos Plásticos: Uma Discussão Abrangente Sobre os Mitos e os Dados Científicos**. E-papers, 2012. 295 p. ISBN 9788576503415.

MANO, E.; MENDES, L. **Introdução a Polímeros**. 2ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1999. 191 p. ISBN 85-21 2-0247-4.

MARSCHÜTZ, M. K.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Thiolated Polymers: Self-Crosslinking Properties of Thiolated 450 kDa Poly(acrylic acid) and their Influence on Mucoadhesion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 4, p. 387-394, 5// 2002. ISSN 0928-0987.

MARTINS, M. G. **Encapsulamento de Nanopartículas Magnéticas em Polímeros Acrílicos e Avaliação de Hipertermia para Potencial Tratamento de Câncer** 2017. Tese de Mestrado. Programa de Engenharia Química/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MATIAS, R.; RIBEIRO, P. R. S.; SARRAGUCA, M. C.; LOPES, J. A. A UV Spectrophotometric Method for the Determination of Folic Acid in Pharmaceutical Tablets and Dissolution Tests. **Analytical Methods**, v. 6, n. 9, p. 3065-3071, 2014. ISSN 1759-9660.

MEISTER, J. **Polymer Modification: Principles, Techniques, and Applications**. New York: Marcel Dekker, Inc, 2000. 936 p. ISBN 9780824700782.

MIN, K.; SILBERSTEIN, M.; ALURU, N. Crosslinking PMMA: Molecular Dynamics Investigation of the Shear Response. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 52, n. 6, p. 444-449, 2014. ISSN 1099-0488.

MOREIRA, D.; PINTO, M.; KLEIN, R.; SOUZA, N.; PINTO, J. C. Influence of Medium Composition on Acrylic Acid Solution Polymerization and Process Scale-Up. **Macromolecular Symposia**, v. 368, n. 1, p. 49-59, 2016. ISSN 1521-3900.

NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. **Bioconjugate Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 123-130, 1995. ISSN 1043-1802.

ODIAN, G. **Principles of Polymerization**. 4^a ed. Wiley, 2004. 812 p. ISBN 9780471478744.

OH, J. K.; BENCHERIF, S. A.; MATYJASZEWSKI, K. Atom Transfer Radical Polymerization in Inverse Miniemulsion: a Versatile Route toward Preparation and Functionalization of Microgels/Nanogels for Targeted Drug Delivery Applications. **Polymer**, v. 50, n. 19, p. 4407-4423, 2009. ISSN 0032-3861.

PEIXOTO, A. C. B. **Funcionalização de Nanopartículas Poliméricas para Liberação de Medicamentos Sítio-Dirigida**. 2013. Tese de Doutorado. Programa de Engenharia Química/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

PICHOT, C. Surface-Functionalized Latexes for Biotechnological Applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 9, n. 3, p. 213-221, 2004. ISSN 1359-0294.

PINTO, M. C.; GOMES, F. W.; MELO, C. K.; MELO, P. A.; CASTRO, M.; PINTO, J. C. Production of Poly(acrylic acid) Particles Dispersed in Organic Media. **Macromolecular Symposia**, 2012, Wiley Online Library. p.15-22.

PUOCI, F. **Advanced Polymers in Medicine**. Springer International Publishing, 2015. 537 p. ISBN 9783319124780.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011. ISSN 0079-6700.

REBRE, S. R.; COLLETTE, C.; DENIE, S. **Superabsorbent Acrylic Powders Having Low Residual Monomer Content**. United States: Google Patents 1994.

REBRE, S. R.; COLLETTE, C.; DENIE, S. **Superabsorbent Acrylic Powders Having Low Residual Monomer Content**. United States: Google Patents 1995.

ROSEN, S. L. **Fundamental Principles of Polymeric Materials**. 2^a ed. Wiley, 1993. p. ISBN 9780471575252.

RUDIN, A.; CHOI, P. **The Elements of Polymer Science & Engineering**. 3^a ed. New York: Academic Press, 2012. 584 p. ISBN 0123821797.

RUTNAKORNPITUK, M.; PUANGSIN, N.; THEAMDEE, P.; RUTNAKORNPITUK, B.; WICHAI, U. Poly(acrylic acid)-Grafted Magnetic Nanoparticle for Conjugation With Folic Acid. **Polymer**, v. 52, n. 4, p. 987-995, 2011. ISSN 0032-3861.

SAHU, A.; BORA, U.; KASOJU, N.; GOSWAMI, P. Synthesis of Novel Biodegradable and Self-Assembling Methoxy Poly(ethylene glycol)-Palmitate Nanocarrier for Curcumin Delivery to Cancer Cells. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 6, p. 1752-1761, 2008. ISSN 1742-7061.

SCIENTIFIC, T. Crosslinking Technical Handbook. **Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham**, 2012.

TIAN, H.; TANG, Z.; ZHUANG, X.; CHEN, X.; JING, X. Biodegradable Synthetic Polymers: Preparation, Functionalization and Biomedical Application. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 2, p. 237-280, 2012. ISSN 0079-6700.

TRIJASSON, P.; PITH, T.; LAMBLA, M. Hydrophilic Polyelectrolyte Gels by Inverse Suspension. *Macromolecular Symposia*, 1990, Wiley Online Library. p.141-169.

VAIDYA, A.; AGARWAL, A.; JAIN, A.; K AGRAWAL, R.; K JAIN, S. Bioconjugation of Polymers: a Novel Platform for Targeted Drug Delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 11, p. 1108-1125, 2011. ISSN 1381-6128.

VANDERHOFF, J. W.; WILEY, R. M. **Water-in-Oil Emulsion Polymerization Process for Polymerizing Watersoluble Monomers**: Google Patents 1966.

VENKATASUBBU, G. D.; RAMASAMY, S.; AVADHANI, G.; RAMAKRISHNAN, V.; KUMAR, J. Surface Modification and Paclitaxel Drug Delivery of Folic Acid Modified Polyethylene Glycol Functionalized Hydroxyapatite Nanoparticles. **Powder Technology**, v. 235, p. 437-442, 2013. ISSN 0032-5910.

VIEIRA, V. B. C. **Estudo da Influência da Morfologia de Nanopartículas de Sílica Mesoporosa na Liberação do Anticancerígeno Indol-3-Carbinol**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília., Brasília, DF, Brasil.

WANG, H.; REMPEL, G. L. Introduction of Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications. **J Nanotechnol Nanomed Nanobiotechnol**, v. 2, n. 008, 2015.

WICHTERLE, O.; LIM, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. **Nature**, v. 185, n. 4706, p. 117-118, 1960. ISSN 0028-0836.

YOU, J.-O.; ALMEDA, D.; GEORGE, J.; AUGUSTE, D. T. Bioresponsive Matrices in Drug Delivery. **Journal of Biological Engineering**, v. 4, n. 1, p. 15, 2010. ISSN 1754-1611.

YOUNIS, I. R.; STAMATAKIS, M. K.; CALLERY, P. S.; MEYER-STOUT, P. J. Influence of pH on the Dissolution of Folic Acid Supplements. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, n. 1, p. 97-102, 2009. ISSN 0378-5173.

ZHANG, J.; LU, Z.; WU, M.; WU, Q.; YANG, J. Large-Scale Synthesis and Characterization of Magnetic Poly(acrylic acid) Nanogels via Miniemulsion Polymerization. **RSC Advances**, v. 5, n. 72, p. 58889-58894, 2015.

ZOHURIAAN-MEHR, M. J.; KABIRI, K. Superabsorbent Polymer Materials: a Review. **Iranian Polymer Journal**, v. 17, n. 6, p. 451, 2008. ISSN 1026-1265.

Apêndice A

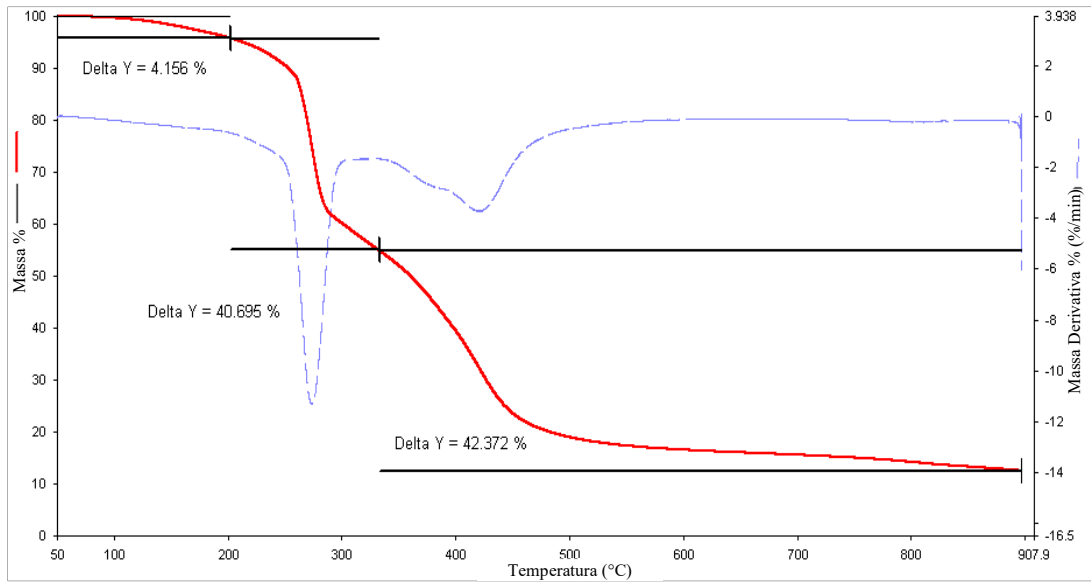


Figura 28 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução em ausência de EGDMA

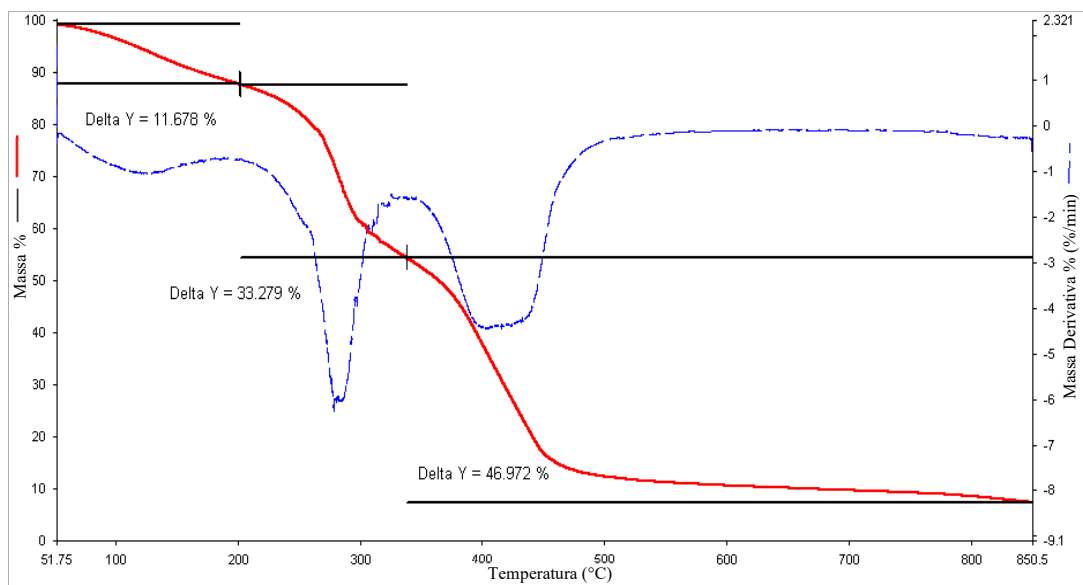


Figura 29 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 3% p/p de EGDMA

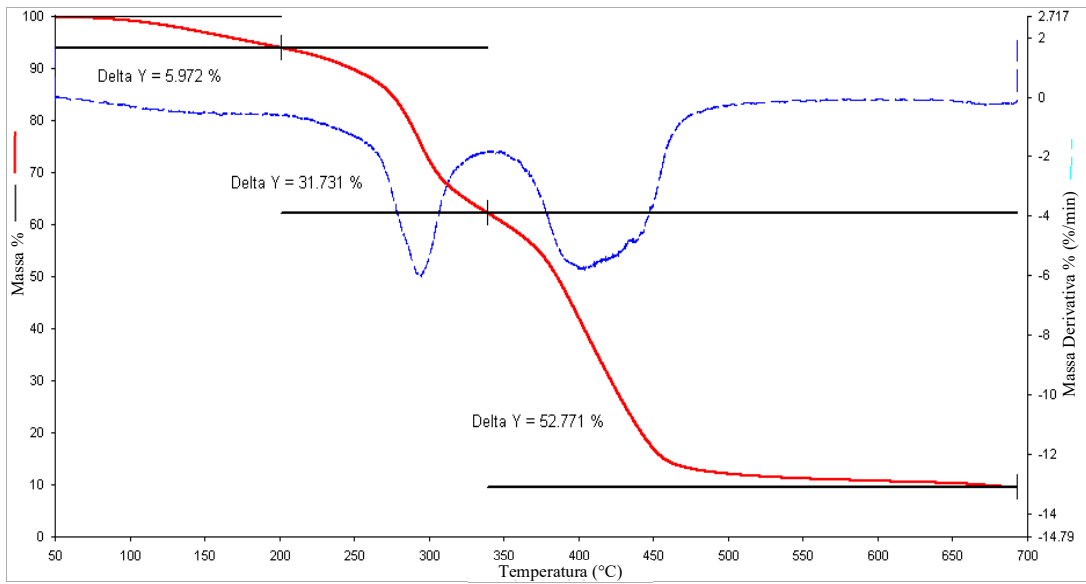


Figura 30 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 7% p/p de EGDMA

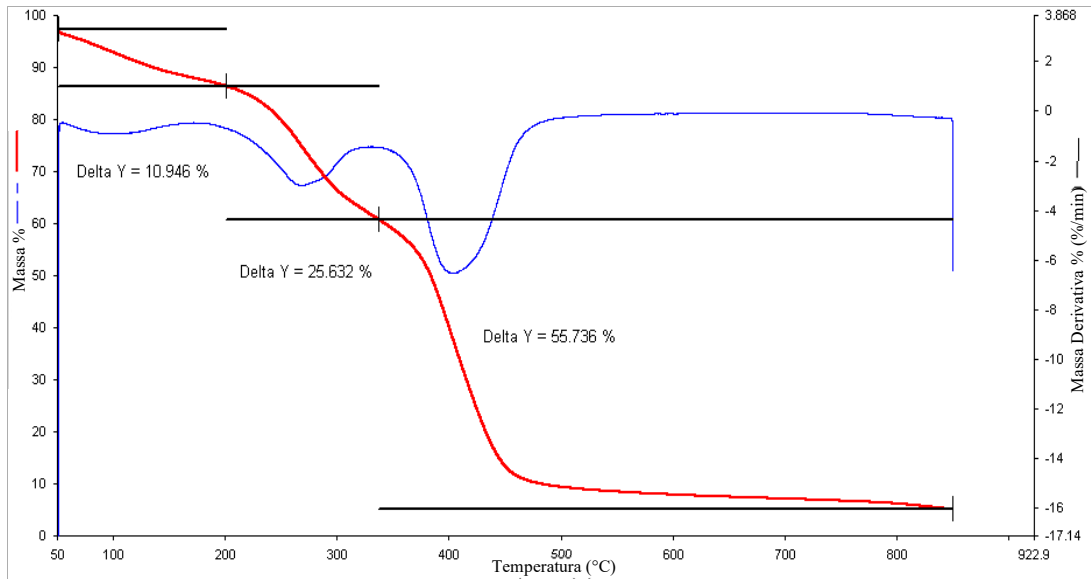


Figura 31 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 10% p/p de EGDMA

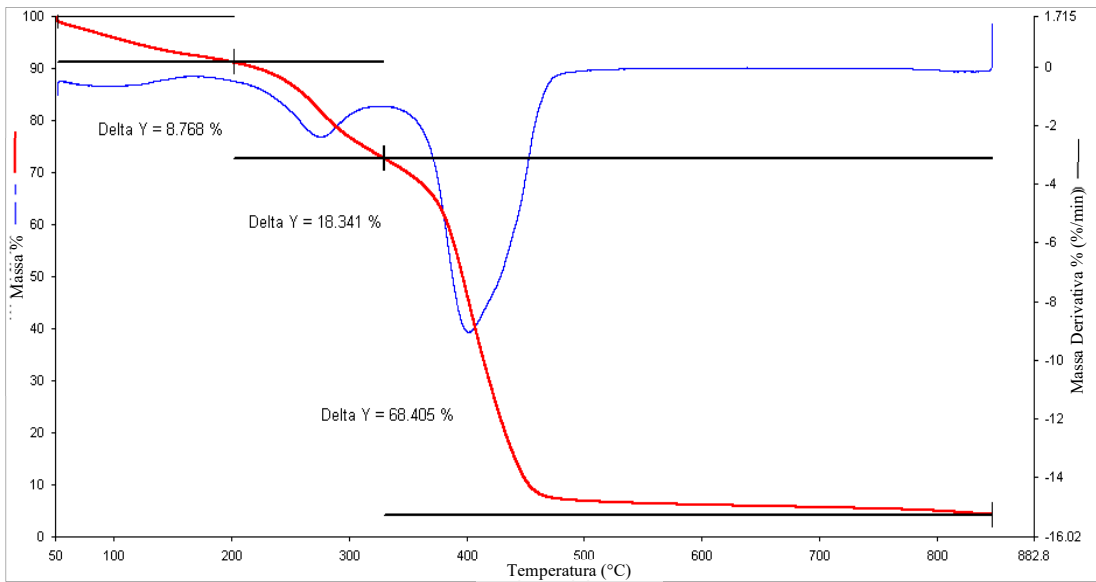


Figura 32 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 30% p/p de EGDMA

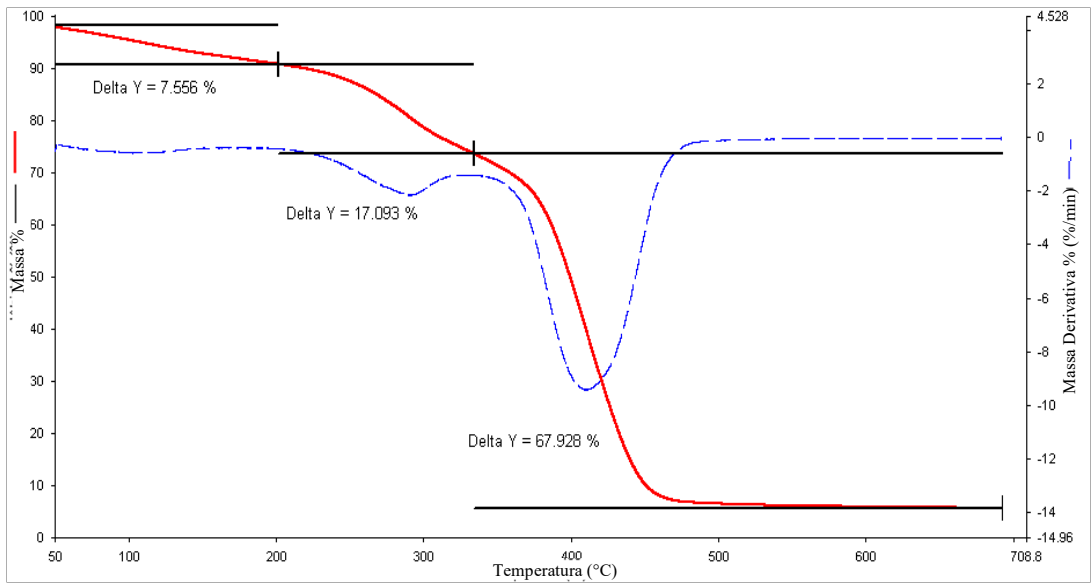


Figura 33 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 40% p/p de EGDMA

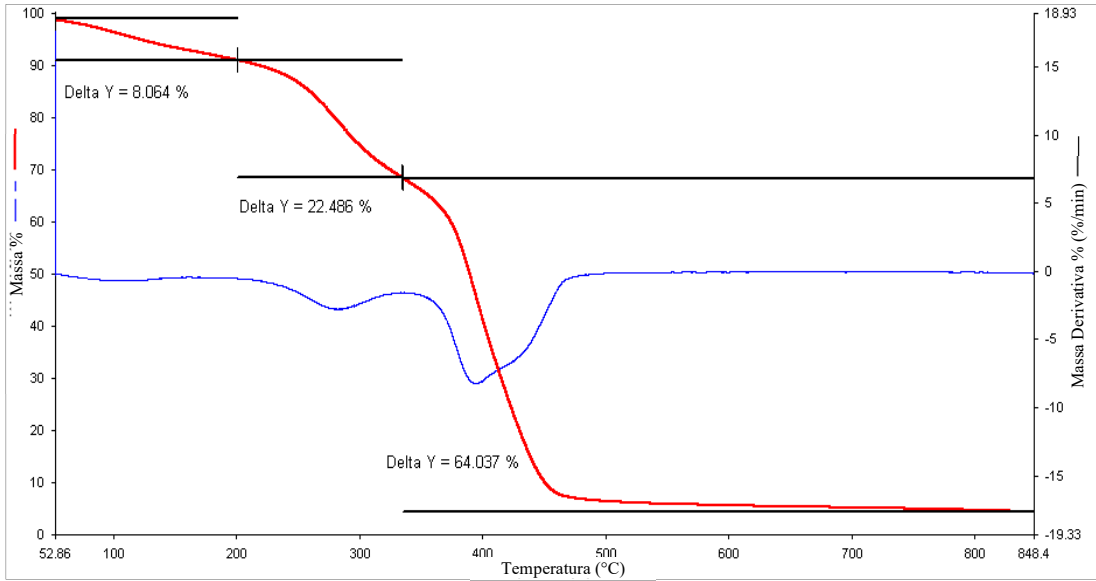


Figura 34 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 42% p/p de EGDMA

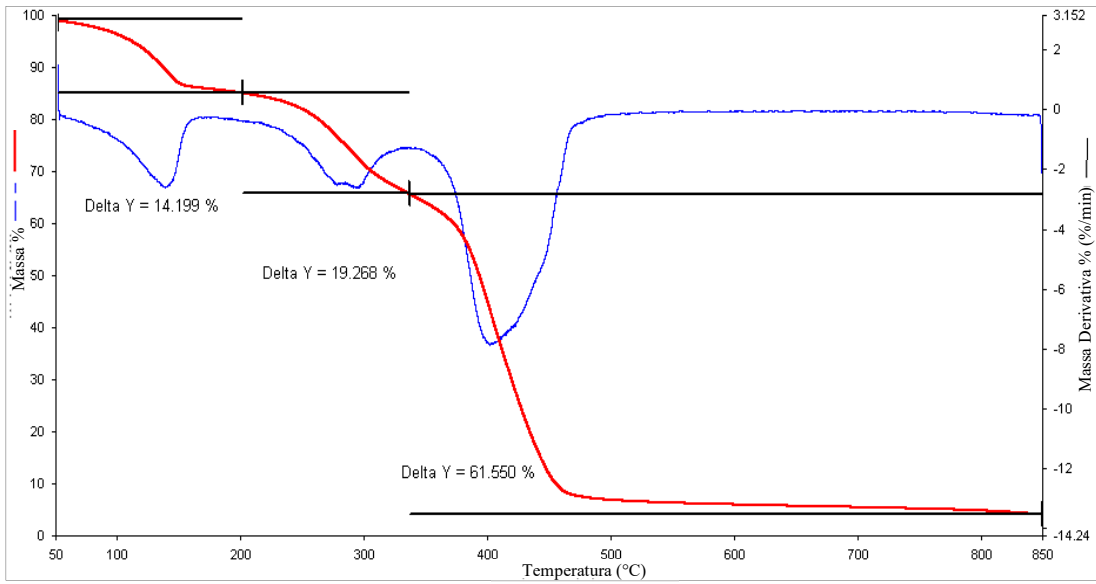


Figura 35 - TGA de PAA obtido por polimerização em solução com 45% p/p de EGDMA

Apêndice B

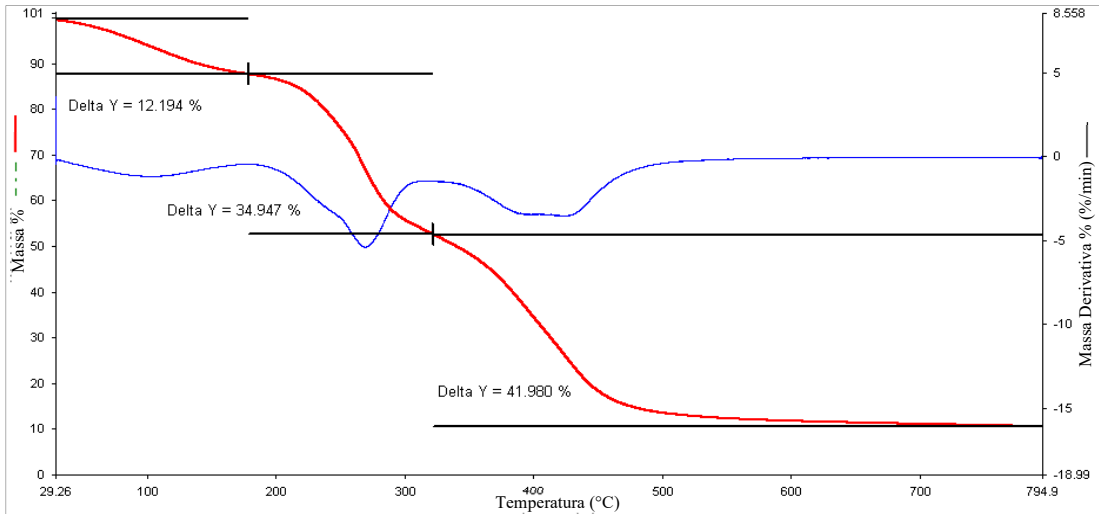


Figura 36 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (1,1,1) do planejamento experimental

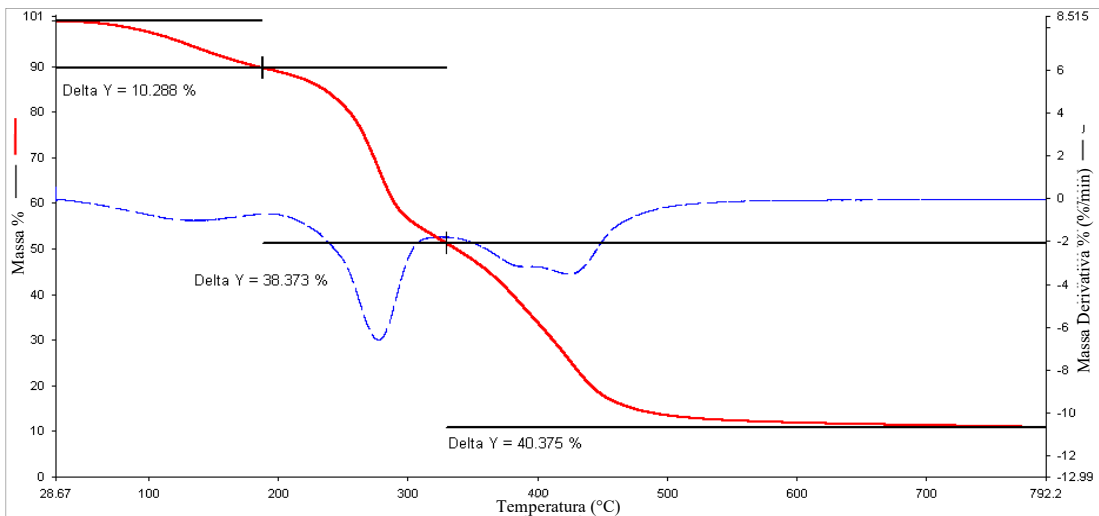


Figura 37 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (1,1,-1) do planejamento experimental

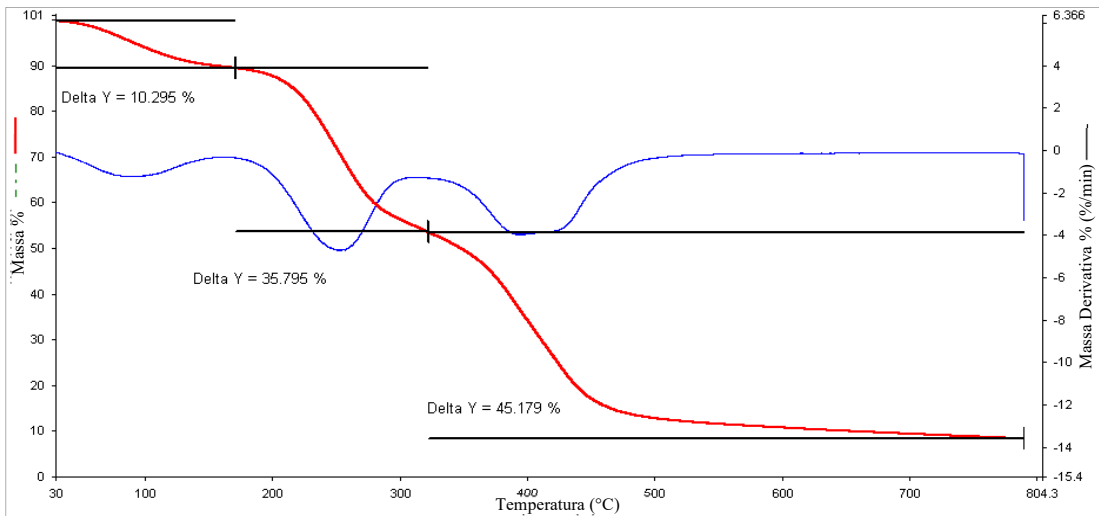


Figura 38 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (1,-1,1) do planejamento experimental

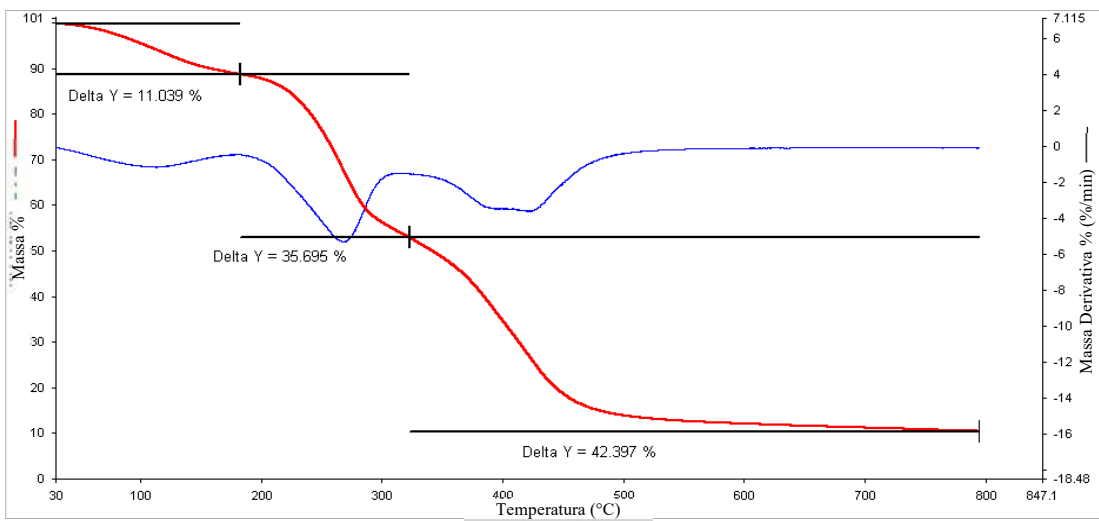


Figura 39 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (1,-1,-1) do planejamento experimental

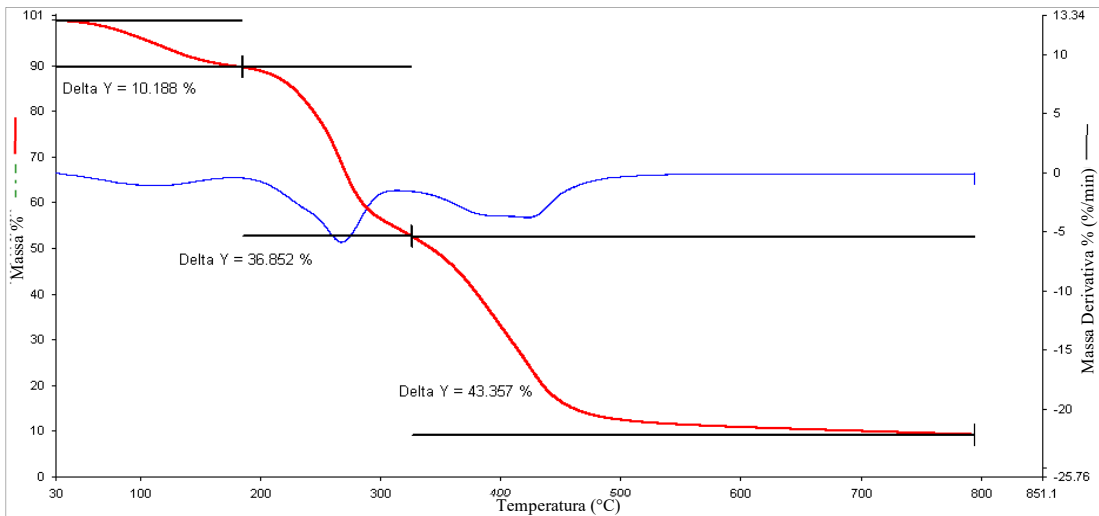


Figura 40 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (-1,1,1) do planejamento experimental

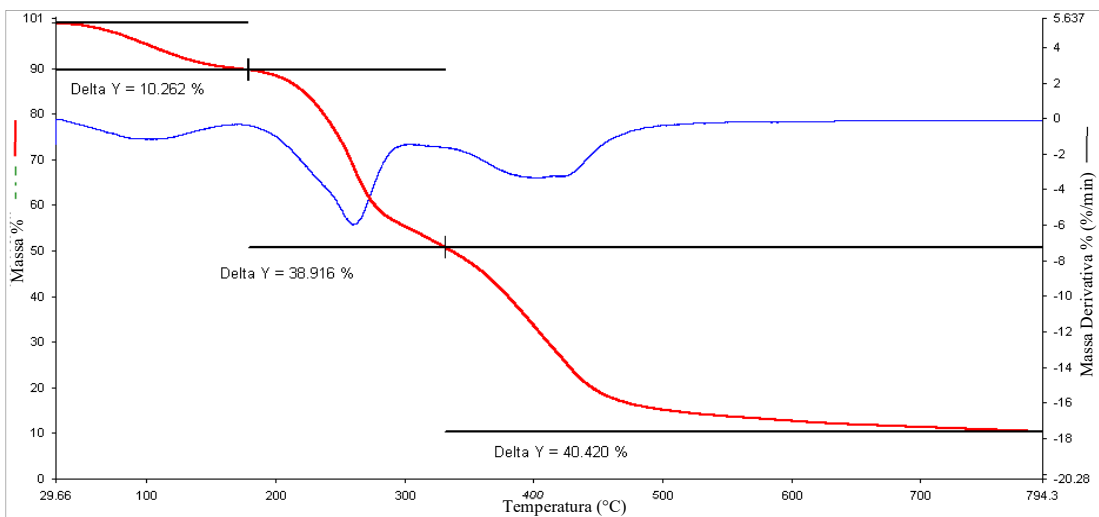


Figura 41 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (-1,1,-1) do planejamento experimental

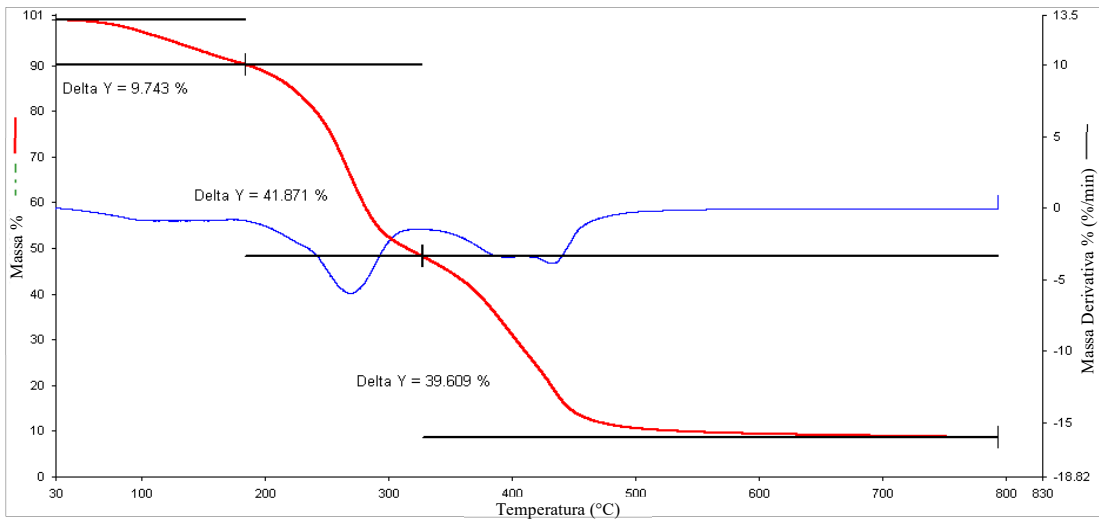


Figura 42 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (-1,-1,1) do planejamento experimental

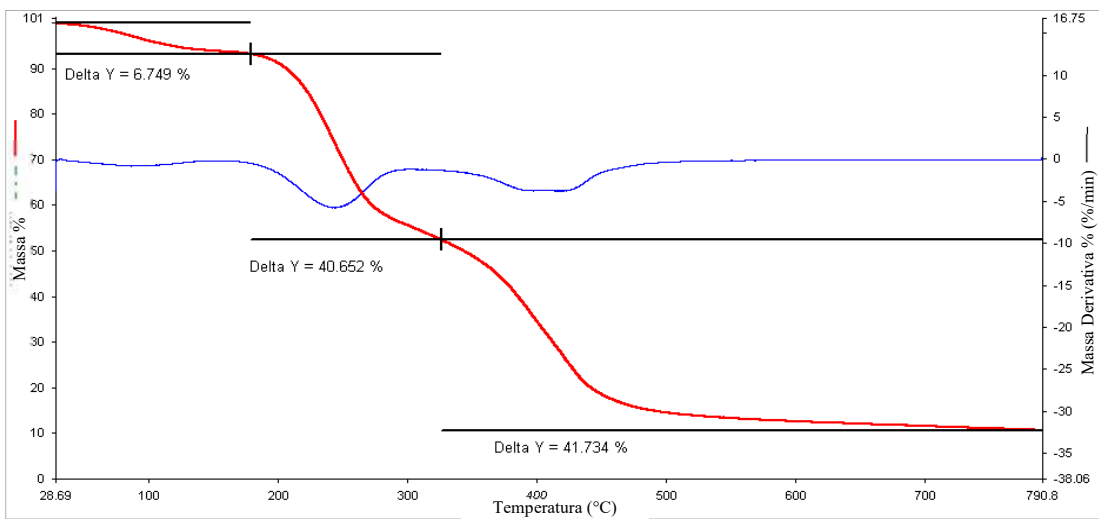


Figura 43 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para a reação (-1,-1,-1) do planejamento experimental

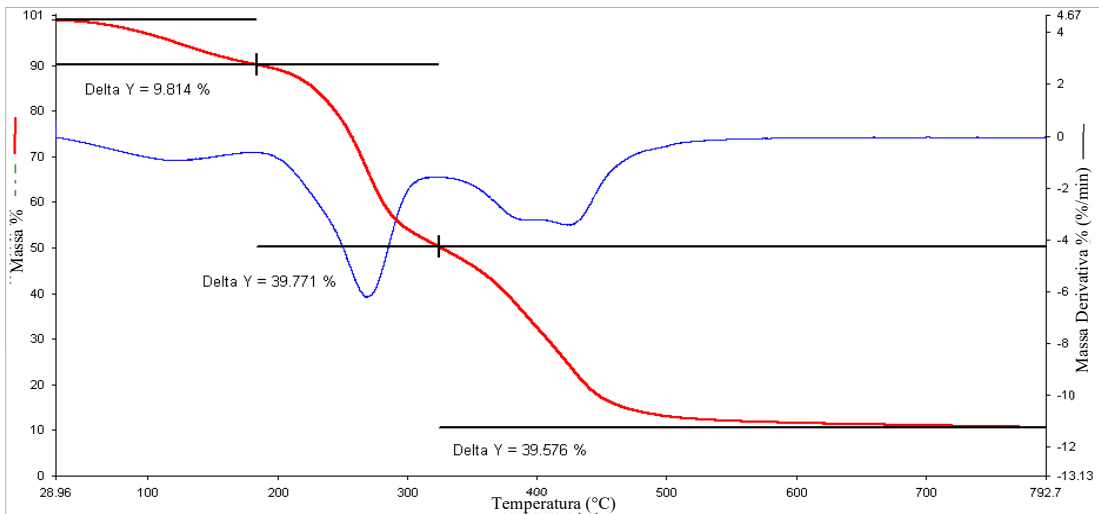


Figura 44 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para o 1º ponto central do planejamento experimental

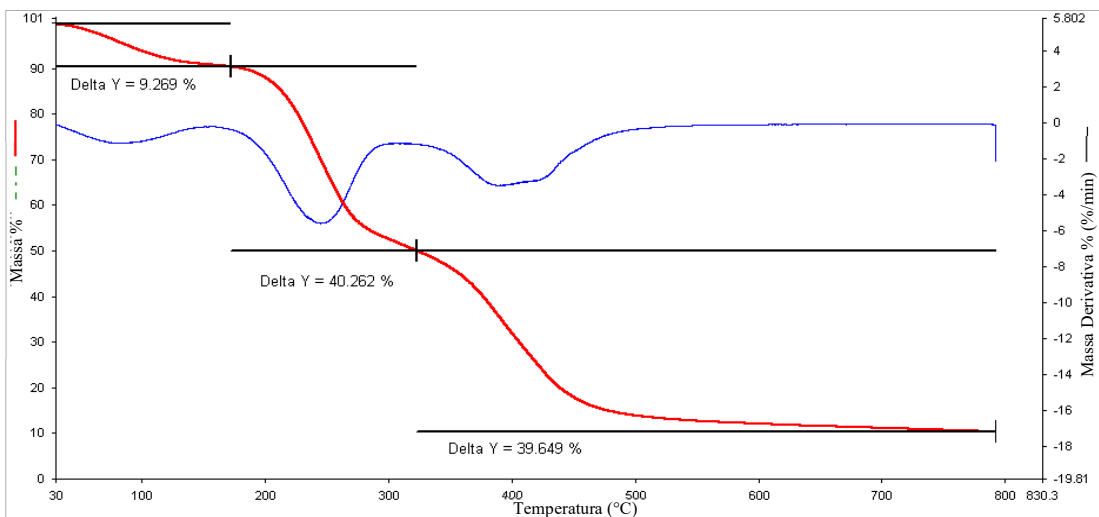


Figura 45 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para o 2º ponto central do planejamento experimental

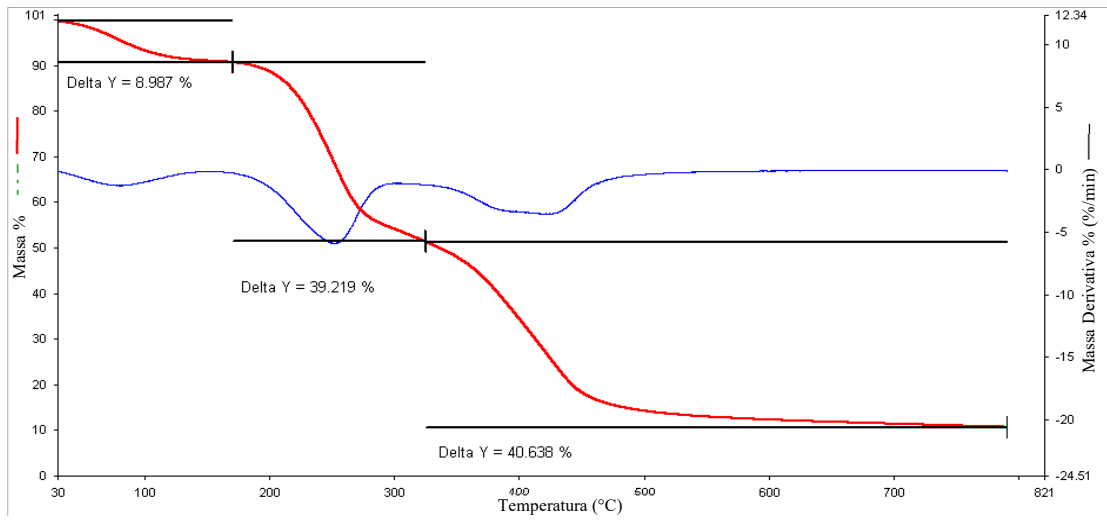


Figura 46 - TGA de PAA obtido por polimerização em miniemulsão inversa para o 3º ponto central do planejamento experimental