UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

Vânia Aparecida Blasques Bueno

**Produção de hidrogéis
micro e nanoestruturados**

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
01/06/2010

Vânia Aparecida Blasques Bueno

**Produção de hidrogéis
micro e nanoestruturados**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química (Química
Orgânica).*

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

B928p Bueno, Vânia Aparecida Blasques
Produção de hidrogéis micro e nanoestruturados / Vânia
Aparecida Blasques Bueno. -- São Paulo, 2010.
205p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Catalani, Luiz Henrique

1. Polímeros 2. Materiais nanoestruturados I. T. II. Catalani,
Luiz Henrique, orientador.

547.84 CDD

Vânia Aparecida Blasques Bueno

Produção de hidrogéis micro e nanoestruturados

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Química
(Química Orgânica).*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

*A Deus, meu tudo, minha razão de viver.
Ao meu pai José, minha mãe Magdalena,
meu irmão Marcos e meu noivo Junior, meus
quatro tesouros, meus amores.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, o Autor da vida. Sem Ele não haveria nada para ser estudado, nem quem o fizesse.

Agradeço à minha família. Ao meu pai, pela incansável carona que me deu todos os dias desse trabalho, o que permitiu que eu dormisse uma preciosa hora a mais. À minha mãe por pacientemente ouvir meus lamentos e me impelir a continuar. Ao meu irmão pelo amor incondicional que ele dedica a mim e a minha família, e que faz toda a diferença. Ao meu noivo e futuro esposo Junior, pela paciência com que ouve minhas divagações científicas, pelo amor e carinho que dedica a mim (te amo).

Agradeço ao meu orientador, Luiz Henrique Catalani, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, primeiro como aluna de Iniciação Científica e depois como aluna de Doutorado; pela independência que permite aos seus alunos buscar suas próprias soluções, o que faz com que desenvolvamos maior senso crítico e maturidade científica; e pelo incentivo e amizade.

Agradeço aos meus queridos amigos do laboratório (e de fora dele): Antônio, Mariana, Patrícia, Janaína, Flávia Garcia, Silvinha, Ricardo, Renata, Luiz Carlos (técnico), Danielle, Romeu, Alliny, Vítor, Priscilla, Guilhermino, Daniel, Flávia e Leonardo. Posso considerar que vocês são a minha família científica. Choramos juntos nossas angústias e resultados “ruins”, rimos juntos (e como rimos!!!) de absolutamente tudo (essa capacidade é inexplicável...), comemoramos conquistas e resultados bons uns dos outros como se fossem nossas próprias conquistas e resultados, almoçamos juntos (inclusive cozinhamos às vezes), lanchamos juntos, fazemos café e discutimos nossas idéias científicas sem medo de estar certos ou errados, cada um contribuindo para que o trabalho do outro se desenrole mais favoravelmente, sem cobrar nada em troca. Nos corrigimos mutuamente e crescemos a cada dia em nossa amizade! Obrigada, mas muito obrigada por tudo isso, por vocês acreditarem uns nos outros e em mim, até quando eu desacreditava do meu trabalho. Certamente sem vocês essa tese jamais passaria de um sonho.

Agradecimento especial para a Priscilla, que além de tudo ainda me suportou como sua dupla de laboratório pelos quatro anos de graduação!!!

Agradeço ao grupo de pesquisa do Laboratório de Sistemas Biomiméticos, por me receberem em seu laboratório como se eu fosse aluna de lá; em especial aos professores Hernan e Iolanda, por me tratarem como se eu fosse uma filha, e à Katia, pela amizade. Pela paciência com que me sentaram ao seu lado e passo a passo me guiaram pelo caminho das pedras.

Agradeço aos alunos do prof. Massuo, pelos bons vizinhos que são, e pelo café delicioso! E aos alunos do prof. Willi, em especial, Joey, Monica, Ana e Lolo, por fazerem tudo o que podiam e o que não podiam por nós.

Agradeço aos professores Omar El Seould, Suzana Torresi e Iolanda, que foram minha banca de qualificação, pela excelente arguição que muito contribuiu para minha formação e amadurecimento.

Agradeço aos funcionários da Central Analítica, em especial: Adriana, Alessandra, Márcio, Fernando, Cristiane e Luzia, que executam com esmero as análises de nossas preciosas amostras. Por serem compreensivos e oferecerem a nós a sua amizade.

Agradeço aos queridos funcionários da seção de pós-graduação: Cibeles, Milton, Emiliano e Marcelo, por fazerem de tudo para resolver todos os nossos problemas, absolutamente todos (e pelos deliciosos chocolates).

Agradeço ao prof. Ronaldo Mansano, por me permitir utilizar seu laboratório.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Agradeço, por fim, a todos que não estão citados aqui especificamente, mas que também contribuíram para que essa obra se tornasse realidade.

Convite à Sabedoria

**"A Sabedoria clama em alta voz nas ruas,
Ergue a voz nas praças públicas;
Nas esquinas das ruas barulhentas
Ela clama;
Nas portas das cidades faz o seu discurso:
Até quando vocês, inexperientes,
Não contentar-se com a sua inexperiência?
Vocês, zombadores,
Até quando terão prazer na zombaria?
E vocês, tolos,
Até quando desprezarão o conhecimento?
Se acatarem a minha repreensão,
Eu lhes darei um espírito de Sabedoria
E lhes revelarei os meus pensamentos.
Quem me ouvir viverá em segurança
E estará tranquilo, sem temer nenhum mal.
Meu filho, se você aceitar
As minhas palavras
E guardar no coração
Os meus mandamentos;
Se der ouvidos à Sabedoria
E inclinar o coração para o discernimento;
Se clamar por entendimento
E por discernimento gritar bem alto;
Se procurar a Sabedoria
Como se procura a prata
E buscá-la como quem busca
Um tesouro escondido,
Então você entenderá
O que é temer ao Senhor
E achará o conhecimento de Deus.
Pois o Senhor é quem dá sabedoria
E da Sua boca procedem o conhecimento e o discernimento."**

(Provérbios de Salomão Capítulos 1:20-23; 33 e 2:1-6 – Nova Versão Internacional)

Sumário

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	15
Lista de Figuras	17
Lista de Tabelas.....	24
Lista de Equações	25
Lista de Esquemas	26
RESUMO.....	27
ABSTRACT	29
1. Introdução	31
2. Objetivos.....	39
3. Materiais e Métodos	41
3.1 Materiais	41
3.2. Equipamentos e Técnicas	46
Espectroscopia Eletrônica	46
Espectroscopia Vibracional	46
Espectrofluorimetria	46
Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	47
Potencial Zeta.....	47
Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Óptica	47
Espectrometria de Emissão Atômica	48
Espectrometria de Massas	48
Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C	49
Irradiação das Amostras (UV)	49

Medidas de Turbidez	49
Medidas da Concentração de PVP	50
Síntese da sonda poli[(N-vinil-2-pirolidona)-co-(9-vinilantraceno)] (PVPVAnt)....	51
4. Obtenção de Hidrogéis Micrometricamente Estruturados	53
4.1. Eletropulverização como sistema formatador	54
4.1.1. Métodos	56
4.1.2. Resultados e Discussões	59
Obtenção de Microesferas de PVP	59
Reticulação e Caracterização das Micropartículas	70
4.2. Produção de microgéis em Emulsão a/o	79
4.2.1. Métodos	81
Preparação das Emulsões a/o, Reticulação e Caracterização das Micropartículas	81
4.2.2. Resultados e Discussões	84
5. Obtenção de Hidrogéis Nanoestruturados	90
5.1. Vesículas como sistema formatador	91
5.1.1. Métodos	95
Purificação da lecitina de soja	95
Encapsulação de PVP nas vesículas.....	97
Reticulação do PVP Incluído e Purificação das Partículas Obtidas	98
Caracterização das partículas obtidas.....	99
5.1.2. Resultados e Discussões	100
Encapsulação do polímero	100
Reticulação do Polímero Encapsulado	105

Caracterização das Partículas Obtidas	109
5.2. Micelas Reversas.....	116
5.2.1. Sistema AOT em n-hexano.....	118
Métodos	118
Preparação das Micelas Reversas de AOT em n-hexano Contendo PVP	118
Estudo do Sistema Micelar	119
Reticulação do PVP Incluído e Purificação	121
Resultados e Discussões	122
Estudo do Sistema Micelar	122
Reticulação do Polímero Incluído nos Sistemas Micelares	130
Análise dos Nanogéis Obtidos	139
5.2.2. Sistema CTAB em isooctano:n-hexanol 90:10	141
Métodos	141
Preparação das Micelas Reversas de CTAB em n-hexano Contendo PVP....	141
Estudo do Sistema Micelar	142
Reticulação do PVP Incluído e Purificação das Nanopartículas	144
Análise dos nanogéis obtidos	145
Testes in vitro com células.....	146
Testes in vitro com macrófagos e fibroblastos	147
Resultados e Discussões	149
Estudo do Sistema Micelar	149
Solubilidade do PVP no Sistema Micelar	149
Otimização da Turbidez do Sistema Micelar Contendo PVP	151

Complexação de Íons Fe^{2+} e Fe^{3+} com a Cadeia Polimérica e sua Influência nas Micelas Reversas	154
Reticulação do Polímero Incluído nos Sistemas Micelares	157
Reação de Reticulação	157
Cinética de Reticulação	158
Análise dos Nanogéis Obtidos	162
Intumescimento em água	162
Densidade de Reticulação.....	167
Variação da razão de Intumescimento com Força Iônica	168
Variação de Intumescimento com íons da série de Hofmeister	171
Variação de Intumescimento com pH	179
Capacidade de Captação de Íons Metálicos	183
Testes in vitro	184
Testes de citotoxicidade com macrófagos e fibroblastos	185
6. Conclusões.....	189
7. Referências Bibliográficas	191

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos*

Sigla/Abreviatura/Símbolo	Definição
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
EL1	Extrato de Lecitinas 1
EL2	Extrato de Lecitinas 2
DLS	<i>(Dynamic Light Scatering)</i> Espalhamento De Luz Dinâmico
emulsão a/o	Emulsão Água em Óleo
ICP-AES	<i>(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy)</i> Espectroscopia de Emissão atômica com Plasma Induzido
IV	Infravermelho
m/v	Relação entre Massa E Volume
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
$\overline{M}_n$	Massa Molar Média Numérica
$\overline{M}_w$	Massa Molar Média Ponderal
PVP-Fe ³⁺	PVP Complexado com Fe ³⁺
PVP-sem ferro	PVP Sem Complexar com Fe ³⁺
PVPVAnt	Poli[(N-Vinil-2-Pirrolidona)-co-(9-Vinilantraceno)]
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

* As abreviações nem sempre foram traduzidas para evitar ambigüidades nas interpretações.

Sigla/Abreviatura/Símbolo	Definição
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
RPM	Rotações por Minuto
u.a.	Unidade de Anisotropia
UT	Unidade de Turbidez
UV-Vis	Ultra Violeta e Visível
v/v	Relação entre Volume e Volume
W/S	Relação entre Mol de Água e Mol de Surfactante
ρ_x	Densidade de Reticulação
Γ	Anisotropia
$h\nu$	Luz

Lista de Figuras

Figura 1. Comparação entre a administração convencional de um medicamento hipotético e a sua administração por um sistema de liberação controlada.....	32
Figura 2. Esquema da formação de radical hidroxila pela reação de foto-Fenton.....	37
Figura 3. Estruturas de alguns dos materiais utilizados.....	45
Figura 4. Estrutura do complexo PVP-I ₃ ⁻ . (Adaptado de Schenck <i>et al.</i> (1980)).	50
Figura 5. (A) Esquema do equipamento para eletropulverização de solução de polímero. (B) Detalhe de (A) mostrando o gotejamento na ausência de campo elétrico e o cone de Taylor na presença de campo elétrico.	55
Figura 6. Micrografias de MEV do material obtido na condição 2.....	60
Figura 7. (A) Micrografias de MEV do material obtido na condição 1 e (B) Distribuição de diâmetros das partículas.	61
Figura 8. Micrografias de MEV do material obtido na condição 3 e (B) Distribuição de diâmetros das partículas.	62
Figura 9. Micrografias de MEV do material obtido na condição 5 e (B) Distribuição de diâmetros das partículas.	63
Figura 10. Micrografias de MEV do material obtido na condição 6 e (B) Distribuição de diâmetros das partículas.	64
Figura 11. Micrografias de MEV do material obtido na condição 7 e (B) Distribuição de diâmetros das partículas.	65
Figura 12. Micrografias de MEV do material obtido na condição 8 e (B) Distribuição de diâmetros das partículas.	66

Figura 13. Formação do cone de Taylor. (a) Sem aplicação de voltagem, ocorre o gotejamento; (B) e (C) aplicação de pouca voltagem e (D) voltagem ideal com formação do cone (reproduzido de Xie <i>et al.</i> , (2008)).....	68
Figura 14. Diferentes morfologias obtidas por MEV para um mesmo polímero eletropulverizado. (Reproduzido de Almería <i>et al.</i> (2010)).	69
Figura 15. Micrografia de MEV de uma amostra (Condição 1) reticulada com luz UV.	71
Figura 16. Fotografia da suspensão de aglomerados de esferas de hidrogel de PVP, obtidas pela irradiação com luz UV. (A) Recém agitada para suspender os aglomerados em água e (B) dois minutos depois da agitação.	72
Figura 17. Quantificação espectrofotométrica de H_2O_2 por meio da reação com o sistema HRP/KI.	75
Figura 18. Fotografia da suspensão de partículas de hidrogel de PVP, obtidas pela reação de Fenton, antes e após decantação (<i>overnight</i>).	76
Figura 19. Micrografia de MEV de partículas obtidas a partir da reticulação da (A) Condição 4; (B) Condição 6 e (C) Condição 7, da Tabela 2.	77
Figura 20. Esquema da produção de micropartículas de hidrogel de PVP via reação de foto-Fenton.	82
Figura 21. Micrografias de MEV dos microgéis de PVP obtidos com a condição 2.	85
Figura 22. Microscopia óptica de microgéis obtidos a partir de emulsão com tolueno.	86
Figura 23. Estrutura química do surfactante Span 80 (monooleato de sorbitan).	87
Figura 24. Espectro de transmitância da emulsão a/o sem PVP.	88

Figura 25. Microgéis de PVP obtidos por reação de foto-Fenton. (A) Microscopia óptica da suspensão de microgéis; (B) microscopia eletrônica e (C) distribuição de diâmetros.....	89
Figura 26. Microgéis de PVP obtidos de reação de Fenton. (A) Microscopia eletrônica e (B) distribuição de diâmetros.	89
Figura 27. Exemplos de estruturas supramoleculares formadas por anfifílicos.....	91
Figura 28. Representação esquemática dos vários tipos de lipossomos, mostrando a base da sua classificação em termos de tamanho, número de lamelas e sua posição relativa. Cada linha representa uma bicamada lipídica (lamela).....	93
Figura 29. Fluxograma de purificação de lecitina de soja (adaptado de Maximiano et al.)	96
Figura 30. Esquema simplificado da obtenção de vesículas contendo PVP e a reticulação do polímero incluído.....	98
Figura 31. Esquema simplificado da reticulação do polímero incluído e purificação das partículas.	99
Figura 32. Obtenção de vesículas a partir de hidratação de filmes, depleção de detergente e injeção, adaptado de Lasic (1988). As linhas contínuas representam bicamadas lipídicas.....	103
Figura 33. Esquema de formação de MLV a partir da hidratação de filmes de fosfolipídeos, reproduzido de Lasic (1988). As linhas contínuas representam bicamadas lipídicas.....	104
Figura 34. Diâmetro das vesículas contendo polímero sem reticular, reticulada com Fenton e reticulada com foto-Fenton (antes da lise para recuperação do polímero reticulado).	106

Figura 35. Distribuição de diâmetros de vesículas de lecitina de soja contendo PVP. (A) Vesículas não submetidas à reação de reticulação e (B) Vesículas submetidas à reação de foto-Fenton.....	108
Figura 36. (A) Imagem de MEV de partículas obtidas de vesículas de lecitina de ovo e (B) distribuição de diâmetros (DLS).....	110
Figura 37. Distribuição de diâmetros das partículas de PVP obtidas a partir de lecitina de soja, feito por DLS.	111
Figura 38. Imagens de MEV das partículas de PVP obtidas a partir de lecitina de soja.	111
Figura 39. Imagem de MEV de partículas obtidas de vesículas de lecitina de soja contendo 10% de DPTMA.	114
Figura 40. Variação da turbidez do sistema micelar com a concentração da solução de PVP-K90 adicionada.....	123
Figura 41. Gráfico da variação da turbidez da solução de AOT 0,1M com o tempo, para a adição de solução de PVP-K90 2 % e W/S=20.....	126
Figura 42. Diâmetro de micelas reversas de AOT com W/S = 60, contendo ou não PVP.	129
Figura 43. Representação simplificada de (A) uma micela contendo água e (B) uma micela contendo uma cadeia polimérica (adaptado de Luanet al. (2003))......	129
Figura 44. Diâmetro médio das micelas preenchidas com água na solução de n-hexano, em função do tempo de exposição à radiação UV (254 nm).....	131
Figura 45. Efeito da irradiação no diâmetro das partículas de micelas de AOT (W/S = 60 com PVP 0,9%, Ácido Acético 2,3 % e H ₂ O ₂ 10 mM).....	133
Figura 46. Espectros das soluções irradiadas de micelas contendo água.....	135

Figura 47. Espectos das soluções irradiadas de micelas contendo PVP/HAc/H ₂ O ₂ irradiadas.....	135
Figura 48. (A) Espectros UV-Vis de amostras de micelas reversas de AOT irradiadas por 12 horas. (B) Espectro resultante da subtração da curva da amostra contendo água da amostra contendo PVP.	137
Figura 49. (A) Espectros UV-Vis de amostras de PVP/HAc/H ₂ O ₂ em água. (B) Espectro resultante da subtração da curva não irradiada da curva irradiada.....	138
Figura 50. Espectro IV (A) do sólido obtido da reticulação e (B) detalhe do espectro (A), mostrando a presença de duas carbonilas, característico de AOT.	140
Figura 51. Valores de Turbidez da solução de micelas para a adição de solução de PVP.....	150
Figura 52. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de cada variável e suas interações. O valor de $p = 0,05$ indica o nível de significância do efeito. Efeitos com $p < 0,05$ (fator CTAB e suas interações com os outros efeitos) influenciam pouco na variação da turbidez do sistema.	152
Figura 53. Superfícies de resposta para as variáveis envolvidas. [CTAB] fixa em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (A) e em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (A'); [PVP] fixa em 120 g L^{-1} (B) e 80 g L^{-1} (B'); W/S fixa em 40 (C) e 20 (C').	153
Figura 54. Efeito do sistema Fenton no diâmetro das micelas contendo PVP. [CTAB] = $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, W/S = 30, [PVP] = 100 g L^{-1} e $[\text{FeCl}_2] = 17 \text{ mmol L}^{-1}$	158
Figura 55. Perfil da viscosidade dinâmica de uma solução aquosa 80 g L^{-1} submetida à reação de Fenton ($[\text{FeCl}_2] = 5 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50 \text{ mmol L}^{-1}$; tampão acetato = $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH = 2,5) (reproduzido de Barros <i>et al.</i> (2006) ¹⁷²).	159
Figura 56. Perfil da variação da anisotropia em função do efeito de adição do H ₂ O ₂ para a reação de Fenton.....	160

Figura 57. Variação da intensidade de fluorescência (sem polarização) da reação de reticulação no meio micelar contendo PVPVAnt ou PVP + antraceno livre.	161
Figura 58. Espectro de emissão da sonda PVPVAnt, submetida às condições da reação no sistema micelar.	162
Figura 59. Imagens de MEV para (A) nanogéis de PVP colapsados, (B) nanogéis de PVP-Fe ³⁺ liofilizados após intumescimento e (C) nanogéis de PVP-sem ferro liofilizados após intumescimento.	165
Figura 60. Distribuição de diâmetros obtidos por MEV para (A) nanogéis de PVP colapsados, (B) nanogéis de PVP-Fe ³⁺ liofilizados após intumescimento e (C) nanogéis de PVP-sem ferro liofilizados após intumescimento.	166
Figura 61. Distribuição de diâmetros obtidos por DLS para (A) nanogel de PVP-Fe ³⁺ e (B) nanogel de PVP-sem ferro.	167
Figura 62. Variação da razão de intumescimento relativa (Q/Q_0) com a força iônica do meio.	169
Figura 63. Variação da razão de intumescimento relativa dos nanogéis de PVP-Fe ³⁺ com a série de ânions de Hofmeister.	172
Figura 64. Variação da razão de intumescimento relativa dos nanogéis de PVP-sem ferro com a série de ânions de Hofmeister.	172
Figura 65. Esquemas de hidratação íon-específica da PVP. δ^+ e δ^- significam as mudanças nas cargas locais devido à interação com os íons (adaptado de Muta <i>et al.</i> (2001)).	174
Figura 66. Esquema de intumescimento por diferença de pressão osmótica.	177
Figura 67. Esquema do fenômeno osmótico que ocorre dentro do nanogel.	178

Figura 68. Variação da razão de intumescimento relativa com o pH do meio em tampão fosfato.	179
Figura 69. Variação da razão de intumescimento relativa com o pH do meio em solução de NaCl 0,1 mol L ⁻¹ (pH ajustado com HCl ou NaOH diluído).	180
Figura 70. Citotoxicidade dos nanogéis em macrófagos J773. (A) Nanogéis de PVP-Fe ³⁺ (B) Nanogéis de PVP.	186
Figura 71. Citotoxicidade dos nanogéis em fibroblastos 3T3 L1. (A) Nanogéis de PVP-Fe ³⁺ (B) Nanogéis de PVP.	187
Figura 72. Estruturas químicas do (A) MTT e do (B) MTT formazana.	188

Lista de Tabelas

Tabela 1. Materiais utilizados nos experimentos e seus respectivos fornecedores. ...	41
Tabela 2. Condições testadas na obtenção de microesferas de PVP por eletropulverização.....	58
Tabela 3. Condições utilizadas na obtenção de micropartículas de hidrogel de PVP. .	83
Tabela 4. Nomenclatura e diâmetro de vesículas.....	93
Tabela 5. Encapsulação de PVP nas vesículas obtidas.	100
Tabela 6. Variação da turbidez com a concentração da solução de AOT, para a adição de soluções de PVP-K90 e W/S = 20.....	125
Tabela 7. Concentrações de PVP retido na fase orgânica.*	127
Tabela 8. Valores das variáveis analisadas no conjunto de experimentos.....	143
Tabela 9. Teste de dissolução com solvente isooctano:n-hexanol 90:10 e CTAB 0,1 M.	149
Tabela 10. Diâmetros das micelas de CTAB* antes e após a reticulação do PVP incluído.	155
Tabela 11. Valores de Anisotropia para a mistura de PVP-PVPVAnt ^(a) no sistema micelar.	156
Tabela 12. Quantificação dos íons complexados por ICP-AES.	184

Lista de Equações

Equação 1.....	34
Equação 2.....	47
Equação 3.....	98
Equação 4.....	117
Equação 5.....	142
Equação 6.....	144
Equação 7.....	145

Lista de Esquemas

Esquema 1. Reações envolvidas no sistema da reação de Fenton e suas respectivas constantes de velocidade.....	36
Esquema 2. Reações envolvendo moléculas orgânicas e a reação de Fenton.	37
Esquema 3. Aparelhagem para produção de microesferas de PVP por eletropulverização, posicionamento horizontal. (A) Solução de PVP e (B) anteparo. .	57
Esquema 4. Aparelhagem para produção de microesferas de hidrogel de PVP por eletropulverização via reação de Fenton. (A) Solução de PVP e (B) anteparo contendo solução aquosa de Fe^{2+}	57
Esquema 5. Reticulação entre partículas reticuladas por luz UV.	73
Esquema 6. Reticulação individual das partículas com a Reação de Fenton.	74
Esquema 7. (A) Esquema da reticulação resultante da complexação de íons Fe^{3+} com as cadeias poliméricas no nanogel de PVP- Fe^{3+} . (B) Esquema da protonação das cadeias poliméricas do nanogel de PVP-sem ferro.....	182

RESUMO

Bueno, V.A.B. **Produção de Hidrogéis Micro e Nanoestruturados**. 2010. 218p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Hidrogéis (redes poliméricas tridimensionais capazes de absorver grandes quantidades de água) micro e nanoestruturados têm grande potencial como biomateriais em aplicações tais como dispositivos de liberação de fármacos e agentes embólicos. Neste trabalho foram estudadas técnicas de produção desses hidrogéis micro e nanoestruturados à base de poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP), a partir da reticulação do polímero através de reações de Fenton, foto-Fenton e fotólise direta.

Microgéis de PVP foram obtidos a partir da reticulação de esferas obtidas por eletropulverização ou de gotículas de solução aquosa do polímero em emulsão a/o. No primeiro caso, obtiveram-se partículas que, quando reticuladas com a reação de Fenton durante o processo de eletropulverização, apresentaram formato indefinido. No segundo caso, foram obtidas microesferas de PVP, tanto pela reticulação com a reação de Fenton, obtendo-se partículas menores – da ordem de 1 μm – como com a reação de foto-Fenton, que gerou partículas maiores – de 34 μm .

Hidrogéis sub-micrométricos foram obtidos a partir da formação em vesículas de lecitina e reticulados por meio da reação de foto-Fenton. Essas vesículas foram capazes de encapsular grande quantidade de polímero, mesmo sendo este de

alta massa molar média. Os hidrogéis sintetizados apresentam estreita distribuição de diâmetro, porém sem forma definida e com baixo índice de intumescimento.

Por fim, nanogéis (nanopartículas de hidrogéis) foram obtidos da reticulação de PVP com a reação de Fenton (Fe^{2+} na presença de H_2O_2), utilizando como sistema formatador o interior aquoso de micelas reversas de CTAB. Os nanogéis assim formados são esféricos e apresentam propriedades interessantes, como fator de intumescimento de até 6000, inédito na literatura, que os colocam na categoria de hidrogéis superabsorventes. Além disso, o intumescimento é passível de controle tanto pela remoção dos íons Fe^{3+} complexados, como pela acidez e composição iônica do meio. Durante o desenvolvimento da síntese dos nanogéis foi possível estudar a influência do Fe^{3+} na estruturação da solução polimérica e do hidrogel. Além disso, a cinética da reticulação do polímero dentro das micelas e uma comparação entre dois sistemas micelares diferentes na formação do nanogel foram analisados. A análise do produto também permitiu constatar a baixa toxicidade do material obtido com testes *in vitro* utilizando macrófagos e fibroblastos.

Palavras-chave: nanogéis superabsorventes, micelas reversas, microgéis, vesículas, eletropulverização

ABSTRACT

Bueno, V.A.B. **Production of Micro and Nanostructured Hydrogels**. 2010. 218p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Micro and nanostructured hydrogels (three-dimensional polymeric networks capable of absorbing large amounts of water) have great potential as biomaterials in applications such as drug delivery devices and embolic agents. In this work techniques to produce micro and nanostructured hydrogels from poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) were studied from various crosslinking reactions like Fenton, photo-Fenton and direct photolysis.

PVP microgels were obtained from crosslinking of polymer spheres obtained by electrospraying a polymer solution or from droplets of aqueous polymer solution in w/o emulsion. In the first case, particles were obtained that, when crosslinked with the Fenton reaction, showed undefined morphology. In the second case, spherical PVP hydrogel microparticles were obtained, which were formed by crosslinking with Fenton reaction, resulting in smaller particles – about 1 μm – while with photo-Fenton reaction it generated larger particles – about 34 μm .

Sub-micrometric hydrogels were obtained from lecithin vesicles as formatting system through crosslinking with photo-Fenton reaction. These vesicles were able to encapsulate large amounts of polymer, in spite of its high average

molecular weight. Hydrogels synthesized by this method are formless, with narrow diameter distribution and low swelling properties.

Finally, nanogels (hydrogel nanoparticles) were obtained from crosslinking of PVP by the Fenton reaction (Fe^{2+} in presence of H_2O_2), using aqueous pool of CTAB reverse micelles as formatting system. The thus formed nanogels are spherical and present interesting properties such as swelling ratio of 6000, a level unreported in literature, which classifies them as superabsorbent hydrogels. Moreover, the swelling is susceptible to control either by the removal of complexed Fe^{3+} ions or by acidity and ionic composition of the medium. During the nanogels synthesis development, the influence of Fe^{3+} in the arrangement of the polymer solution and of the hydrogel was studied. Moreover, the polymer crosslinking kinetics inside the micelles and a comparison between two different micellar systems in formatting of nanogel were analyzed. The product analysis also revealed low toxicity of the obtained material by *in vitro* experiments using macrophages and fibroblasts.

Keywords: superabsorbent nanogels, reverse micelles, microgels, vesicles, electrospray

1. Introdução

Desde que o ser humano conscientizou-se de sua própria existência ele tem buscado alcançar patamares mais elevados de qualidade de vida, principalmente no que é relacionado à área da saúde. Próteses, implantes, curativos inteligentes, novas técnicas cirúrgicas e medicamentos são constantemente desenvolvidos e aperfeiçoados¹⁻³.

A evolução dos medicamentos também tem levado à evolução de diferentes mecanismos de liberação dos mesmos. Medicamentos apresentam, geralmente, uma concentração mínima necessária para obtenção do efeito terapêutico desejado e uma concentração máxima a partir da qual apresenta efeitos tóxicos⁴. Dispositivos de liberação controlada permitem a manutenção de concentrações intermediárias, com minimização de incômodo e de efeitos colaterais. A Figura 1 apresenta um esquema da variação da concentração utilizando como exemplo um medicamento hipotético⁴. A linha pontilhada equivale a um método de administração convencional, onde o medicamento é metabolizado e excretado rapidamente, sendo logo necessária a administração de uma nova dose. A linha cheia equivaleria ao mesmo medicamento administrado por um sistema de liberação controlada e contínua. Neste caso a concentração do medicamento pode ser controlada de forma a não ultrapassar os níveis tóxicos, permanecendo em níveis

terapêuticos por um tempo bastante superior, evitando a necessidade da administração de várias doses durante o período do tratamento.

Figura 1. Comparação entre a administração convencional de um medicamento hipotético e a sua administração por um sistema de liberação controlada.

Na área da saúde, além da liberação de medicamentos, outros campos também têm interesse em materiais com propriedades especiais tais como o desenvolvimento de biossensores^{5,6} e a engenharia de tecidos^{7,8}. Esses materiais, chamados biomateriais, são definidos genericamente como compostos que não apresentam reações tóxicas quando em contato com tecidos vivos, podendo ser usados em aplicações médicas.

Dentro da classe de biomateriais, estão os hidrogéis. Hidrogéis são, por definição, redes poliméricas tridimensionais capazes de absorver grande quantidade

de água ou fluidos biológicos⁹. A capacidade absorptiva de um hidrogel é atribuída à presença de grupos $-\text{OH}$, $-\text{CONH}-$, $-\text{CONH}_2-$, and $-\text{SO}_3\text{H}$ na estrutura dos polímeros que o formam e do nível de reticulação^{10,11}. O intumescimento (absorção de água) pode chegar até 90% m/m em alguns casos¹².

A reticulação ou ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas que formam os hidrogéis podem ser de duas categorias principais: (i) ligações físicas (emaranhamento das cadeias ou formação de cristalitos, forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas) e (ii) ligações químicas (covalentes)¹³.

Hidrogéis podem ser obtidos a partir de polímeros naturais ou sintéticos. Um exemplo de hidrogel natural são as gelatinas, produzidas a partir de hidrolisados de colágeno ou da fração polissacarídica de algas marinhas¹². Exemplos de polímeros sintéticos solúveis em água, utilizados na obtenção de hidrogéis, são o poli(óxido de etileno) (PEO), o poli(álcool vinílico) (PVA) e a polivinilpirrolidona (PVP)¹⁴.

Os principais usos de hidrogéis como biomateriais são: lentes de contato, substratos para engenharia de tecidos, dispositivos para liberação controlada de fármacos, além de aplicações em odontologia, implantes e oftalmologia¹⁵. Hidrogéis capazes de reagir a estímulos, como pH, temperatura, força iônica, campo elétrico, luz e outros, tem sido propostos como biomateriais "inteligentes", utilizados na fabricação de músculos artificiais^{16,17}, como sistemas de liberação de fármacos ou agentes embólicos¹³.

Para promover a formação do hidrogel, vários métodos, físicos e químicos, podem ser empregados. Tipicamente, para a produção de hidrogéis de polímeros sintéticos utiliza-se (i) copolimerização e reticulação simultânea de um ou mais monômeros monofuncionais e um monômero multifuncional seguido do intumescimento em solvente apropriado ou (ii) reticulação de um homopolímero ou copolímero em solução ou no estado sólido, seguido do intumescimento em água ou fluido biológico⁹. Um dos métodos de produção de hidrogel a partir de polímeros pré-formados é a preparação por radiação de alta energia, que apresenta como vantagens a ausência de impurezas, como resíduos monoméricos, agentes reticuladores ou emulsificantes⁹. Entre as desvantagens estão o alto custo das fontes de alta energia e sua manutenção. Rosiak *et al.* desenvolveram metodologias de reticulação de PVP utilizando radiação de alta energia¹⁸⁻²⁴. Basicamente, macrorradicais de PVP são obtidos pela exposição controlada da solução do polímero ou do polímero sólido à radiação γ , e a combinação desses macrorradicais forma a rede polimérica tridimensional característica dos hidrogéis.

Métodos alternativos para a produção de hidrogéis de PVP foram desenvolvidos por Catalani *et al.*²⁵⁻²⁹. A reticulação envolve radiação de menor energia (radiação UV) e sistemas que utilizam a reação de Fenton e foto-Fenton. A principal vantagem desses métodos é a obtenção de hidrogéis com as mesmas propriedades de hidrogéis produzidos por radiação de alta energia porém com menor custo de produção.

A fotólise com luz UV é uma opção viável contra a radiação de alta energia pois o PVP apresenta absorção na região de 200 – 280 nm, e além disso, a amida cíclica que compõe sua estrutura é sujeita à formação de radicais²⁵. Além disso, a reação de reticulação pode ser acelerada pela adição de H_2O_2 , pois o produto da fotólise dessa molécula, o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), reage com as cadeias de PVP formando os macrorradicais, que se recombina e geram o hidrogel²⁶. A fotólise, tanto por si só como pela adição de H_2O_2 , é descrita para a reticulação de soluções concentradas de PVP (concentração maior que 80 g L^{-1}), sendo ineficiente para a reticulação de soluções poliméricas diluídas (por exemplo, 10 g L^{-1}) (dados não publicados do Laboratório de Biomateriais do IQ-USP).

Para a utilização da fotólise na reticulação de soluções diluídas de PVP o grupo do Laboratório de Biomateriais Poliméricos do IQ-USP desenvolveu um procedimento que envolve a adição de compostos carbonílicos à solução diluída do polímero, além de H_2O_2 . A fotólise, com a adição desses compostos (por exemplo, ácido acético ou acetona), é capaz de formar hidrogel a partir de uma solução com concentração igual a 4 g L^{-1} de PVP (dados não publicados do Laboratório de Biomateriais do IQ-USP).

As reações de Fenton e foto-Fenton também são geradoras de radicais $\text{OH}^\bullet$, o que também viabiliza sua utilização como sistema reticulador de PVP.

O sistema Fenton consiste de uma complicada seqüência reacional³⁰ (Esquema 1)³⁰ que gera radicais hidroxila a partir de uma mistura de H_2O_2 e Fe^{2+} , e que pode ser resumida na Equação 1.

Esquema 1. Reações envolvidas no sistema da reação de Fenton e suas respectivas constantes de velocidade³⁰.

A reação de Fenton é bastante utilizada em processos de tratamento de água, por ser muito eficaz na remoção de poluentes orgânicos tóxicos, acelerando a sua oxidação ou redução³⁰ (Esquema 2). Essa reação também é eficaz na reticulação do PVP²⁸, onde a dimerização/"polimerização" dos macrorradicais forma as ligações cruzadas que dão origem aos hidrogéis.

Esquema 2. Reações envolvendo moléculas orgânicas e a reação de Fenton³⁰.

O sistema foto-Fenton consiste de um sistema reacional também gerador de radicais hidroxila. Os radicais são gerados através da reação entre o Fe^{2+} (gerado a partir da foto-redução do Fe^{3+} por luz UVA – visível (290 – 400 nm) e H_2O_2 (Figura 2).

Figura 2. Esquema da formação de radical hidroxila pela reação de foto-Fenton²⁶.

As reações de Fenton e foto-Fenton se destacam por utilizarem recursos relativamente simples e baratos para promover a reticulação quando comparados com outros largamente utilizados, como radiação de alta energia²⁶. Além disso, os hidrogéis produzidos pelos sistemas reacionais descritos acima possuem

propriedades similares às dos produzidos pela fotólise direta do polímero ou pela foto-homólise do peróxido de hidrogênio²⁶.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho consiste no desenvolvimento de metodologias de produção de hidrogéis nano e microestruturados a partir de PVP.

Hidrogéis de tamanho micrométrico foram obtidos (i) a partir da reticulação do PVP em fase aquosa dispersa em um não-solvente, através das reações de Fenton e foto-Fenton e (ii) a partir da reticulação, por meio da reação de Fenton, de solução de PVP eletropulverizada. O material obtido foi caracterizado através da distribuição de tamanho (microscopia óptica e eletrônica de varredura), intumescimento e estabilidade frente à secagem e re-hidratação.

As partículas nanométricas foram obtidas através da inclusão e reticulação de PVP no interior aquoso de vesículas e micelas reversas, utilizando como sistema de reticulação as reações de Fenton e foto-Fenton. A estabilidade dos sistemas, a inclusão do polímero, a cinética de reação de reticulação, a purificação e a caracterização das partículas foram estudadas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os materiais utilizados neste trabalho estão dispostos na Tabela 1. As estruturas de alguns dos compostos estão na

Tabela 1. Materiais utilizados nos experimentos e seus respectivos fornecedores.

Material	Fornecedor
2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (TRIS)	Merck
2,2'-(1,2-diazenodiil)bis[2-metil]-propanonitrila - AIBN	Aldrich
9-vinilantraceno	Aldrich
Acetato de sódio	JT Baker
Acetona	Synth
Ácido acético glacial	Synth
Ácido clorídrico	Synth
Ácido fosfórico	QM
Água deuterada	Aldrich
Alumina neutra	Merck
Bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio (Aerosol OT - AOT)	Sigma
brometo de 2-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-3,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)	Aldrich

Continuação da Tabela 1

Material	Fornecedor
Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB)	Acros Organics
Brometo de sódio	Spectrum
Cápsulas de lecitina de soja	Stem Pharmaceuticals
cloreto de cálcio	Synth
Cloreto de Ferro II	Aldrich
Cloreto de Ferro III	Aldrich
Cloreto de manganês	Merck
Cloreto de N,N-dimetil- dioctadecilamônio - DODAC	Eastman Kodak Co.
cloreto de 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamônio-propano (DPTMA)	Eastman Kodak Co.
Cloreto de sódio	JT Baker
Clorofórmio	Synth
Clorofórmio deuterado	Aldrich
Diclorometano	Synth
Diidrogenofosfato de sódio	Mallinckrodt
Dimetilformamida (DMF)	QM
Dipalmitoil fosfatidilcolina - DPPC	Avanti Polar Lipids Inc.
Etanol	Synth
éter de petróleo	Synth
Fosfato de sódio	Ecibra
Heptano	Synth
Hexano	Synth

Continuação da Tabela 1

Material	Fornecedor
hidrogenocarbonato de sódio	Synth
Hidrogenofosfato de sódio	Synth
Hidrogenosulfito de sódio	Grupo Química
Hidróxido de sódio	Mallinckrodt
Iodeto de potássio	Aldrich
Iodeto de sódio	Merck
Iodo ressublimado	Merck
Isooctano	Merck
Meio de Cultura DMEM	Aldrich
Meio de Cultura RPMI	Aldrich
Metanol	QM
Metanol deuterado	Aldrich
mono-(9Z)-9-octadecenoato de sorbitan - Span 80	Fluka
mono-(9Z)-9-octadecenoato de sorbitan poli(óxido de etileno) éter - Tween 80	Fluka
N-hexanol	BDH
Nitrato de chumbo	Merck
Nitrato de cobalto	Merck
Nitrato de sódio	Fisher Scientific
N-vinil-2-pirrolidona	Aldrich

Continuação da Tabela 1

Material	Fornecedor
perclorato de sódio	Merck
Peróxido de Hidrogênio 30%	Merck
Poli(N-vinil-2-pirrolidona) K16-18 Mw 8.000	Acros
Poli(N-vinil-2-pirrolidona) K30 Mw 58.000	Basf
Poli(N-vinil-2-pirrolidona) K90 Mw 1.300.000	ISP Technologies
Sulfato de cobre	Merck
Sulfato de ferro II	Merck
tiocianato de sódio	Merck
Triflato de sódio	Aldrich

Figura 3. Estruturas de alguns dos materiais utilizados.

3.2. Equipamentos e Técnicas

Espectroscopia Eletrônica

Para a aquisição de espectros eletrônicos no UV-Vis utilizou-se um espectrofotômetro Shimadzu Multispec-1501, na região de 190 a 800 nm. A cubeta utilizada foi de quartzo, com caminho óptico de 1,0 cm.

Espectroscopia Vibracional

Para a aquisição de espectros no infravermelho utilizou-se o equipamento Bomem MB100. As amostras foram incorporadas em pastilhas de KBr para a leitura no intervalo de 350 a 4000 cm^{-1} .

Espectrofluorimetria

Os valores de intensidade de fluorescência foram determinados utilizando um fluorímetro Spex-Fluorolog-2, modelo FL-111, equipado com um arranjo em formato L de polarização, utilizando polarizadores Glan-Thompson, modelo 1935B.

Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Para a medida do diâmetro por espalhamento de luz dinâmico utilizou-se um equipamento da Brookhaven Instruments, com laser em 532,0 nm e análise da luz espalhada em $\theta = 90^\circ$, com o programa ZetaPALS Particle Sizing Software Version 2.29, que calcula o diâmetro das partículas. As amostras foram filtradas em membrana de teflon Micropore, com poros de 0,45 μm , e analisadas em cubetas de quartzo (4 faces).

Potencial Zeta

Foram feitas medidas de potencial zeta das amostras em um equipamento ZetaSizer Nanoseries (Nano ZS ZEN3600, da Malvern Instruments), em pH 6,5. As amostras foram filtradas em membrana de teflon Micropore, com poros de 0,45 μm .

Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Óptica

As análises foram feitas em um microscópio eletrônico de varredura equipado com canhão eletrônico de emissão de campo (FEG-SEM, modelo FEG 7401F, da Jeol). As partículas intumescidas foram submetidas à liofilização antes da

análise no MEV, para manter sua morfologia³¹, e as imagens foram obtidas sem recobrimento das amostras com ouro ou carbono, utilizando baixas voltagens de aceleração (de 1 a 5 kV).

As imagens de Microscopia óptica foram feitas em um microscópio Carl Zeiss modelo Axioscop 40, equipado com câmera fotográfica AxioCam MRc5.

Os diâmetros das esferas observadas ao microscópio foram calculados utilizando o programa AxioVision V. 4.6.3.0 (para cada amostra, pelo menos 500 medições foram realizadas).

Espectrometria de Emissão Atômica

A concentração de íons metálicos presentes nas amostras foi determinada por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido (ICP-AES) em um equipamento Spectro Cirrus CCD.

Espectrometria de Massas

A análise por espectrometria de massas foi feita por infusão direta, em um equipamento LC-MS/MS(n) Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus.

Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

Análises de RMN ^1H e ^{13}C foram feitas em um equipamento de 200MHz (Bruker AC200) e em um equipamento 300MHz (Bruker DPX300).

Irradiação das Amostras (UV)

As amostras foram irradiadas em uma câmara de irradiação Luz Chem ICH2, com lâmpadas de UV-C Sankyo Denki G8T5 (com máximos de absorção em 254 nm ou 365 nm).

Medidas de Turbidez

Para a medida de turbidez mediu-se a transmitância das amostras em 400 nm, pois as mesmas não absorvem nessa região. A turbidez da solução foi calculada através da Equação 2.

$$\tau = d \ln \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

sendo que τ é a turbidez (em UT – unidade de turbidez), d é o caminho óptico da cela (cm) e I_0 e I são a transmitância do branco – hexano puro – e da amostra, respectivamente.

Medidas da Concentração de PVP

Para a medida da concentração de PVP utilizou-se um reagente complexante, conhecido como Lugol³². Para o preparo desse reagente dissolve-se 2 g de KI e 1 g de I₂ em 300 mL de água. Desses, dilui-se 15 mL em 1 L de tampão acético pH 4,75 (a concentração de tampão utilizada foi 5,0 mM). O complexo PVP-I₂-I⁻ é obtido misturando-se as soluções de PVP e Lugol, na proporção de 1:2. Esse complexo (Figura 4)³³, de cor avermelhada, apresenta absorção em 400 nm, permitindo a análise de sua concentração em espectrofotômetro, mediante a construção de uma curva de calibração.

Figura 4. Estrutura do complexo PVP-I₃⁻. (Adaptado de Schenck *et al.* (1980)³³).

Síntese da sonda poli[(N-vinil-2-pirolidona)-co-(9-vinilantraceno)] (PVPVAnt)

A sonda poli[(N-vinil-2-pirolidona)-co-(9-vinilantraceno)] (PVPVAnt) foi sintetizada por polimerização em massa utilizando os monômeros N-vinil-2-pirolidona e 9-vinil-antraceno na proporção de 1000:1 (m/m). O 2,2'-(1,2-diazenodiil)bis[2-metil]-propanonitrila (AIBN) (0,1% m/m) foi utilizado como iniciador e a reação foi conduzida por 48 h a 60°C. O polímero resultante foi dissolvido em etanol e precipitado em éter (3X) para a purificação.

4. Obtenção de Hidrogéis Micrometricamente Estruturados

Este capítulo será dedicado à descrição da obtenção de hidrogéis de PVP micrometricamente estruturados, mais especificamente, microesferas de hidrogel de PVP. Serão abordados dois sistemas utilizados na formatação, para obtenção de microesferas: formatação por eletropulverização e em emulsões a/o. As reações de reticulação utilizadas para produzir o hidrogel foram as reações de Fenton e Foto-Fenton e fotólise com UV.

4.1. Eletropulverização como sistema formatador

O processo de eletropulverização consiste na produção de esferas poliméricas utilizando forças eletrostáticas. Um esquema simplificado do aparato da eletropulverização está disposto na Figura 5A, e consiste basicamente de uma seringa contendo a solução do polímero, dois eletrodos e uma fonte de alta tensão (HV). A solução polimérica é bombeada através da agulha metálica, conectada à fonte de alta tensão e ao coletor (anteparo). A alta voltagem aplicada induz a formação de cargas na solução, e a ejeção do jato de solução ocorre quando a força eletrostática gerada na solução supera a tensão superficial da solução³⁴ (formação do cone de Taylor, Figura 4B). Esse jato se fragmenta, dando origem às esferas, à medida que o solvente evapora. Controlando-se variáveis como concentração do polímero e solvente utilizado, aumenta-se ou diminui-se a quantidade de gotas, podendo-se produzir apenas fibras (eletrofiação) ou somente gotas ou esferas (eletropulverização ou *electrospray*)³⁵.

As esferas obtidas por eletropulverização apresentam diâmetro uniforme e reduzido (entre 0,7 e 10 μm), dependendo das condições utilizadas, como tipo de polímero, solvente, voltagem entre outros³⁶, fazendo com que essa técnica seja bastante interessante na produção de esferas poliméricas minimizando etapas de purificação.

Figura 5. (A) Esquema do equipamento para eletropulverização de solução de polímero. (B) Detalhe de (A) mostrando o gotejamento na ausência de campo elétrico e o cone de Taylor na presença de campo elétrico.

Para obter os microgéis de PVP utilizando eletropulverização, primeiramente determinaram-se condições de formação de esferas desse polímero via esta técnica. A reticulação destas esferas foi feita por fotólise (pós-produção das esferas) e por reação de Fenton (durante a produção das esferas). Os microgéis obtidos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura.

4.1.1. Métodos

Para a obtenção de micropartículas de PVP para reticulação com irradiação de luz ultravioleta, utilizou-se a montagem horizontal descrita no Esquema 3. A solução de PVP é colocada em uma seringa, sendo bombeada com fluxo constante com bomba Cole-Parmer Hz50/60 através de uma agulha metálica. Essa agulha é conectada a uma fonte de alta tensão (fonte Glassman High Voltage serie EH). A diferença de potencial entre a agulha e o anteparo provoca a deformação e ejeção da solução do polímero até o limite em que a solução se fragmenta em esferas livres, que atingem o anteparo. Esse anteparo recoberto de micropartículas de PVP é levado a uma câmara de irradiação, sendo exposto à luz UV (254 nm) por 30 minutos, para a reticulação.

Para a obtenção de micropartículas de hidrogel de PVP com reticulação *in situ* (reticulação durante o processo de fabricação das partículas) utilizou-se a montagem vertical descrita no Esquema 4. A solução de PVP juntamente com peróxido de hidrogênio ou FeCl_2 é colocada em uma seringa, sendo bombeada com fluxo constante através da agulha, conectada a uma fonte de alta tensão. A solução ejetada, fragmentada em esferas, atinge o anteparo, que está coberto com solução aquosa ou etanólica contendo o outro reagente para a reação de Fenton ($\text{FeCl}_{2(\text{aq})}$ ou H_2O_2), e sofre reticulação. As partículas obtidas foram analisadas utilizando microscopia eletrônica de varredura.

Esquema 3. Aparelhagem para produção de microesferas de PVP por eletropulverização, posicionamento horizontal. (A) Solução de PVP e (B) anteparo.

Esquema 4. Aparelhagem para produção de microesferas de hidrogel de PVP por eletropulverização via reação de Fenton. (A) Solução de PVP e (B) anteparo contendo solução aquosa de Fe^{2+} .

As condições experimentais utilizadas, como concentração, solvente, voltagem e fluxo, estão dispostas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições testadas na obtenção de microesferas de PVP por eletropulverização.

Condição	[PVP] (g L ⁻¹)	Solvente	Arranjo	Agente reticulante na solução	Agente reticulante no anteparo	Voltagem aplicada (V)	Distância (cm)	Fluxo (mL h ⁻¹)
1	10	Etanol	horizontal	-	-	20	20	3
2	50	H ₂ O	vertical	FeCl ₂ 5mmol L ⁻¹	H ₂ O ₂ 100mmol L ⁻¹ em etanol*	20	20	3
3	100	DMF	Horizontal	-	-	20	20	3
4	100	H ₂ O	Vertical	H ₂ O ₂ 50mmol L ⁻¹	FeCl ₂ 18mmol L ⁻¹	20	20	3
5	5	Etanol	Vertical	-	-	10	10	0,5
6	10	Etanol	Vertical	H ₂ O ₂ 50mmol L ⁻¹	FeCl ₂ 18mmol L ⁻¹ *	20	17	3
7	50	Etanol:DMF 1:1	Vertical	H ₂ O ₂ 50mmol L ⁻¹	FeCl ₂ 18mmol L ⁻¹ *	15	20	1,5
8	10	Etanol	Vertical	-	-	10	10	1,5

* Essa condição foi feita também sem a presença de solução no anteparo, permitindo observar as esferas antes da reticulação.

4.1.2. Resultados e Discussões

Obtenção de Microesferas de PVP

Dois arranjos principais foram testados: o arranjo horizontal e o vertical (Esquema 3 e Esquema 4). No primeiro, utilizou-se a reticulação por fotólise, enquanto no segundo, a reação de Fenton. A troca de arranjo da eletropulverização, do horizontal para o vertical, foi necessária pois para a reação de Fenton é preciso que o anteparo contenha a solução de Fe^{2+} ou de H_2O_2 .

Das condições testadas (Tabela 2), apenas a condição 2 gerou fibras (Figura 6). As demais condições geraram esferas, de diâmetros cujos valores oscilaram entre 1 e 4 μm , dependendo das variáveis alteradas. As respectivas micrografias e diâmetros estão dispostas na Figura 7 a Figura 12 para as outras condições, exceto a 4, respectivamente.

Figura 6. Micrografias de MEV do material obtido na condição 2.

Figura 7. (A) Micrografias de MEV do material obtido na condição 1 e (B) Distribuição de diâmetros das partículas.

Figura 8. Micrografias de MEV do material obtido na condição 3 e (B) Distribuição de diâmetros das partículas.

Figura 9. Micrografias de MEV do material obtido na condição 5 e (B) Distribuição de diâmetros das partículas.

Figura 10. Micrografias de MEV do material obtido na condição 6 e (B) Distribuição de diâmetros das partículas.

Figura 11. Micrografias de MEV do material obtido na condição 7 e (B) Distribuição de diâmetros das partículas.

Figura 12. Micrografias de MEV do material obtido na condição 8 e (B) Distribuição de diâmetros das partículas.

A obtenção de microesferas a partir de técnicas de eletropulverização é bastante conhecida e utilizada na literatura^{35,37-39}. Uma linha muito tênue de condições separa essa técnica de sua análoga produtora de nanofibras, a eletrofiação^{35,40-43}. Alguns parâmetros importantes, como, por exemplo, concentração e massa molar do polímero (influência na força viscoelástica do jato de solução de polímero durante o voo até o alvo)³⁵, solvente⁴¹, voltagem aplicada e distância do anteparo, afetam ambas as técnicas⁴⁴.

Observando-se as imagens obtidas de cada condição, pode-se constatar a influência de cada um desses fatores. Nas Figura 8 e Figura 10 observa-se coalescência entre as partículas. Isso é claramente uma consequência da não evaporação completa do solvente, que pode ser reflexo da escolha de um solvente pouco volátil, da baixa distância entre a agulha injetora e o anteparo, do fluxo, além da baixa voltagem aplicada, que pode implicar na deformação do cone de Taylor, com a consequente geração de gotas maiores, que são mais difíceis de serem secas (Figura 13).

Nas Figura 7, Figura 9 e Figura 12 observa-se a alteração na morfologia. Não foram formadas apenas partículas esféricas, mas também partículas alongadas e algumas fibras. Entre as variáveis envolvidas na alteração de morfologia da gota estão o fluxo^{43,45,46}, a evaporação do solvente e a difusão das cadeias poliméricas dentro da gota durante a evaporação⁴². Há outras duas variáveis, também importantes, mas menos evidentes: a cisão de Coulomb⁴⁷ e o enovelamento das cadeias.

Figura 13. Formação do cone de Taylor. (a) Sem aplicação de voltagem, ocorre o gotejamento; (B) e (C) aplicação de pouca voltagem e (D) voltagem ideal com formação do cone (reproduzido de Xie *et al.*, (2008)⁴³).

A cisão de Coulomb ocorre quando uma gota carregada se aproxima do limite de Rayleigh, isto é, a concentração de cargas é maior que um valor limite determinado pelo equilíbrio entre a tensão elétrica e a tensão superficial, e esta se rompe gerando uma nuvem de novas gotículas carregadas. Gotículas geradas pela eletropulverização podem sofrer esse efeito, uma vez que, durante a evaporação, elas se encolhem sem perder a carga e, eventualmente, atingem esse limite⁴². Esse efeito também é a causa do estiramento das fibras durante o processo de eletrofiação e da formação dos mais variados e complexos tipos de morfologia (Figura 14).

Figura 14. Diferentes morfologias obtidas por MEV para um mesmo polímero eletropulverizado. (Reproduzido de Almería *et al.* (2010))⁴².

Além desse efeito de cargas, há também o efeito do enovelamento das cadeias poliméricas na solução. Quanto maior a sobreposição de cadeias, ou seja, uma maior interação intermolecular, maior a probabilidade de ocorrer formação de fibras durante o processo⁴², numa competição entre fiação e pulverização. Se as cadeias estão enoveladas sobre si mesmas, ou seja, a interação intramolecular é maior, há maior formação de gotas isoladas ou *beads* em uma fibra. Isso é explicado pela interação entre solvente e polímero. Quando existe uma boa interação entre o polímero e o solvente, as moléculas de solvente penetram no novelo, até a total solvatação do mesmo. Nessa condição de total solvatação, as cadeias estão totalmente desenoveladas. Se as interações polímero-solvente e polímero-polímero são semelhantes, condição denominada teta (θ), a cadeia se estende à sua dimensão não-perturbada (parâmetro χ de Flory-Huggins = $\frac{1}{2}$). Mesmo para “bons” solventes ($\chi < \frac{1}{2}$), a cinética da mudança das dimensões deste novelo é variável e dependerá das

interações entre polímero e solvente. Observações da eletrofiação de outros polímeros em nosso laboratório mostram que uma mesma solução polimérica utilizada após pelo menos um dia de seu preparo forma fibras com menor quantidade de *beads* e com maior facilidade do que a mesma solução recém preparada.

Reticulação e Caracterização das Micropartículas

As partículas, quando irradiadas com luz UV, via fotólise direta do polímero em comprimento de onda igual a 254 nm (por 30 minutos), sofrem reticulação, constatada pela diminuição drástica de solubilidade do produto irradiado. Porém, as partículas reticuladas não formam uma suspensão homogênea quando colocadas em água, mas aglomerados que não se separam, mesmo sob agitação vigorosa, decantando-se rapidamente. A micrografia de um desses aglomerados recém-reticulados está colocada na Figura 15. Uma fotografia ilustrando a estabilidade da suspensão das partículas está na Figura 16.

Figura 15. Micrografia de MEV de uma amostra (Condição 1) reticulada com luz UV.

Figura 16. Fotografia da suspensão de aglomerados de esferas de hidrogel de PVP, obtidas pela irradiação com luz UV. (A) Recém agitada para suspender os aglomerados em água e (B) dois minutos depois da agitação.

A dificuldade em ressuspender as partículas livres em água reside no fato de ocorrer, nesse caso, a reticulação inter-partículas. As partículas ficam em contato umas com as outras após a sua produção, sofrendo reticulação nesses pontos de contato, conforme ilustrado no Esquema 5. Evidências dessa reticulação entre as partículas estão no tamanho dos aglomerados em suspensão, formados após a reticulação, que não se desfazem, mesmo com estímulos externos (agitação vigorosa ou ultrassonicação). Caso as partículas estivessem reticuladas individualmente, o tamanho dos aglomerados suspensos seria menor (ou inexistentes) e esses seriam facilmente dispersos através de estímulos externos.

Esquema 5. Reticulação entre partículas reticuladas por luz UV.

O uso de um sistema de reticulação instantâneo promovido antes da aproximação de outra partícula poderia evitar este problema. Para tal, utilizamos a reação de Fenton, onde um de seus componentes é incluído na partícula nascente e outro está acoplado ao alvo, promovendo a reticulação (Esquema 6).

Na reticulação com Fenton, a adição dos componentes Fe^{2+} e H_2O_2 deve ser feita de forma a não influenciar as condições da eletropulverização. A adição do Fe^{2+} na solução polimérica a ser eletropulverizada, que resulta na incorporação de um eletrólito ao sistema, favoreceu a formação de fibras e não de partículas (Figura 6). Por outro lado, quando H_2O_2 é adicionado à solução polimérica, o resultado é a formação de esferas.

Esquema 6. Reticulação individual das partículas com a Reação de Fenton.

Como o H₂O₂ necessário à reação de Fenton é adicionado à solução antes da eletropulverização, é importante controlar o quanto desse componente permanece nas esferas após o processo. Isso foi feito quantificando espectrofotometricamente (método da adição de padrão), através da reação com o sistema HRP/KI, observando a formação de I₂ em 354 nm, obtendo a curva mostrada na Figura 17.

Figura 17. Quantificação espectrofotométrica de H_2O_2 por meio da reação com o sistema HRP/KI.

De acordo com os cálculos, a $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{residual}}$ é de aproximadamente 90 $\mu\text{mol}_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{ g}_{\text{PVP}}^{-1}$. A $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{teórica}}$, considerando a concentração na solução eletropulverizada, é de 500 $\mu\text{mol}_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{ g}_{\text{PVP}}^{-1}$. Assim, tem-se que a retenção de H_2O_2 na amostra é de cerca de 20 %, indicando perda considerável de H_2O_2 após o processo.

Durante a produção e reticulação das partículas, elas depositam-se no fundo da solução que foi colocada sobre o anteparo. Após sua secagem, as partículas obtidas são facilmente suspensas em água, porém sofrem decantação após cerca de quinze minutos de repouso (Figura 18).

Figura 18. Fotografia da suspensão de partículas de hidrogel de PVP, obtidas pela reação de Fenton, antes e após decantação (*overnight*).

A Figura 19 a seguir reproduz micrografias das partículas produzidas e reticuladas segundo esse método. Como se pode observar, as partículas obtidas não têm forma definida e apresentam diâmetro que varia de 0,5 a 10 μm .

As condições 4, 6 e 7 (Tabela 2), sem a presença de agentes reticulantes, formaram esferas, com alguns resquícios de fibras que ainda podem ser observados. A manutenção do formato esférico não ocorre quando se aplica o sistema de reticulação individual descrito acima. Isto porque as esferas produzidas, ao atingir a solução que está sobre o anteparo, sofrem deformação, provavelmente devido à sua dissolução parcial. Apesar deste problema, a reticulação do PVP para a formação dos microgéis pelo método proposto foi bastante satisfatória, considerando-se o fato de que é possível a reticulação através desse método.

Figura 19. Micrografia de MEV de partículas obtidas a partir da reticulação da (A) Condição 4; (B) Condição 6 e (C) Condição 7, da Tabela 2.

Por não envolver aquecimento ou aplicação de vácuo na secagem, a eletropulverização é um excelente método para a obtenção de micro e nanopartículas, podendo ser adaptado de forma que as partículas obtidas possam reagir mergulhando em uma solução. Apenas um estudo sobre eletropulverização na obtenção de microgéis foi encontrado na literatura, através de pesquisa feita na base do CAS – *Chemical Abstracts Service* e também na base do ISI *Web of Knowledge*SM (*Web of Science*), utilizando a entrada “*hydrogel microspheres*” e refinando a pesquisa com a entrada “*electrospray*” (dados obtidos em 17/02/2010). Nesse trabalho, Ranganath *et al.*, (2009)⁴⁸ descrevem a obtenção de *beads* de alginato de cálcio, com diâmetro da ordem de 1,6 mm, contendo microesferas de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) – PLGA (de aproximadamente 11 µm) com uma droga antitumoral. Este trabalho é interessante por utilizar o mesmo método empregado nesta tese: a solução de alginato de sódio em água é eletropulverizada contra uma solução de CaCl₂, sendo, portanto, reticulada durante o processo.

4.2. Produção de microgéis em Emulsão a/o

Existem vários tipos de dispersões coloidais, entre elas as emulsões, que são misturas de dois ou mais líquidos imiscíveis, em que um é denominado fase dispersante e o outro fase dispersa, que se encontra na forma de pequenas gotas.

A propriedade física mais importante de uma emulsão é a sua estabilidade. Entre os fatores que favorecem a estabilidade de emulsões estão a tensão interfacial baixa, repulsão das duplas camadas elétricas, volume relativamente pequeno da fase dispersa, gotículas pequenas e viscosidade Newtoniana elevada. A tensão interfacial baixa é favorecida pela adsorção de uma substância tensoativa que aumenta a estabilidade de grandes áreas interfaciais associadas a emulsões.

O preparo de uma emulsão a partir da homogeneização de dois componentes puros leva à separação rápida das duas fases. Essa emulsão pode ser preparada pela agitação vigorosa dos dois líquidos, de modo a vencer a tensão superficial dos líquidos e favorecer a miscibilidade, mesmo que temporária – uma vez que, cessando a agitação, a tensão superficial é recomposta e os líquidos se separam. Para se estabilizar estas emulsões é necessário utilizar-se um agente emulsionante, sendo que os mais eficientes são as substâncias tensoativas. Esses agentes formam um filme adsorvido em torno das gotículas dispersas, o que ajuda a impedir a sua floculação e coalescência. Este método é normalmente utilizado na produção de micropartículas para a adsorção de proteínas^{36,49,50}.

Microesferas de hidrogel estão sendo cada vez mais utilizadas como transportadores de fármacos, principalmente por via oral⁵¹. Muitos métodos baseados em emulsão têm sido utilizados na síntese desses microgéis, empregando radiação de alta energia⁵² como método de reticulação a partir de monômeros⁵³ ou até mesmo de polímeros⁵⁴. Alguns métodos diferenciados, como a precipitação em um não-solvente⁵⁵, também têm sido descritos na literatura.

No presente trabalho foram estudados métodos de obtenção de microgéis de PVP a partir de emulsões instáveis, nas quais não foi adicionado nenhum agente de superfície e emulsões (estáveis) contendo surfactantes. As partículas obtidas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica.

4.2.1. Métodos

Preparação das Emulsões a/o, Reticulação e Caracterização das Micropartículas

Para obter micropartículas de hidrogel de PVP, por meio de dispersão mecânica para formar as emulsões reversas, utilizou-se a seguinte metodologia: a solução de PVP contendo Fe^{2+} foi dispersa em solvente orgânico, com o dispersor IKA® ULTRA TURRAX T18 basic (6.000 rpm). À emulsão formada, adicionou-se o peróxido, sob agitação magnética. A emulsão foi deixada sob agitação (agitador magnético) por 2 horas (no caso da reação de Fenton) ou 6 horas sob agitação e exposição à luz UV (365 nm), no caso da reação de foto-Fenton (Figura 20). Imagens das partículas foram feitas utilizando microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica.

Figura 20. Esquema da produção de micropartículas de hidrogel de PVP via reação de foto-Fenton.

Todas as concentrações, solventes e velocidades utilizados estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Condições utilizadas na obtenção de micropartículas de hidrogel de PVP.

Condição	[PVP] (g L ⁻¹)	Solvente/Surfactante	Reticulação ^a	Preparação da Emulsão
1	100	Isooctano/nenhum	Fenton	12,5 mL de PVP _(aq) /Fe ²⁺ + 37,5 mL de tolueno, 6000 rpm/5 min + H ₂ O ₂ durante a formação da emulsão ^b
2	100	Tolueno/nenhum	Fenton ^c	12,5 mL de PVP _(aq) /Fe ²⁺ + 37,5 mL de tolueno, 6000 rpm/5 min
3	100	n-heptano/ 5% v/v Span80	Fenton ^c	5 mL de PVP _(aq) /Fe ²⁺ + 45 mL de tolueno, 6000 rpm/30 min
4	80	n-heptano/ 5% v/v Span80	Foto-Fenton ^d	5 mL de PVP _(aq) /Fe ²⁺ + 45 mL de tolueno, 6000 rpm/30 min

^a Em todos os casos utilizou-se: (a) FeCl₂ 5 mmol×L⁻¹ (concentração final) dissolvido na solução aquosa de PVP; (b) H₂O₂ 50 mmol×L⁻¹ (concentração final) adicionado à emulsão a partir de solução estoque de H₂O₂ em éter, com exceção da Condição 1 em que a adição do H₂O₂ foi feita sem o éter.

^b agitação feita com dispersor Turrax® durante a reticulação.

^c Após a adição de H₂O₂, seguem-se 2 h de agitação magnética.

^d Após a adição de H₂O₂, seguem-se 6 h de irradiação no UV (365 nm) com agitação magnética.

4.2.2. Resultados e Discussões

A suspensão de solução aquosa de PVP + FeCl₂ em isooctano sem a adição de surfactante não resultou em uma emulsão estável. Assim, optou-se pela adição de H₂O₂ durante o processo de formação da emulsão, para que a reticulação ocorresse durante a formação forçada da emulsão (Condição 1 da Tabela 3).

Após a rotoevaporação para remoção de todo o solvente orgânico, o material obtido foi suspenso em água, formando uma mistura fortemente espalhadora de luz. Essa suspensão foi liofilizada e analisada por microscopia eletrônica de varredura, na qual se pode observar que o material trata-se de um particulado com forma indefinida (Figura 21). Isso se deve à vigorosa agitação aplicada durante a reticulação para manter as gotículas de PVP_(aq) em suspensão no solvente orgânico.

Como a emulsão em tolueno apresentou estabilidade por algumas horas, mesmo após cessar a agitação com o Turrax, alterou-se o método de adição de H₂O₂ (utilizando éter), para melhor uniformizar a reticulação (Condição 2 da Tabela 3). O método de agitação pós-adição do peróxido também foi alterado, para um mais brando, de tal modo que as partículas em formação fossem submetidas a uma agitação menos agressiva. A proporção entre água e tolueno foi reduzida, visando obter menor distribuição de tamanho das gotículas da emulsão. O mesmo procedimento que foi utilizado para a purificação das partículas produzidas de

emulsão com isooctano foi aplicado para as partículas obtidas a partir da suspensão usando tolueno. Nesse ensaio, observou-se a formação de esferas maiores, provavelmente devido à coalescência das gotículas durante o processo brando de agitação (Figura 22). Essa coalescência também levou à formação de um pouco de macrogel devido à separação de fases, o que reduz o rendimento do processo.

Figura 21. Micrografias de MEV dos microgéis de PVP obtidos com a condição 2.

Alguns polímeros têm características anfóteras. Essa característica pode ser explorada no sentido de preparar emulsões, que podem ser utilizadas na síntese de microgéis. Por exemplo, poli(4-vinilpiridina) é utilizada na síntese de microgéis utilizando divinilbenzeno como agente reticulante, sem a adição de qualquer surfactante (*soap-free*)⁵⁴. No caso $\text{PVP}_{(\text{aq})}$ /tolueno, o PVP apresentou alguma função semelhante, pois a separação de fases, apesar de ser rápida em comparação a

emulsões contendo algum tipo de surfactante, permitiu a reticulação com formação apenas parcial de macrogel.

Figura 22. Microscopia óptica de microgéis obtidos a partir de emulsão com tolueno.

A adição do peróxido é crucial na formação das partículas. Se a formação dos microgéis ocorre sob agitação extremamente vigorosa, como é o caso da agitação fornecida pelo dispersor, as partículas ficam deformadas, como no caso $\text{PVP}_{(\text{aq})}$ /isooctano. A adição controlada do peróxido com éter sob agitação branda gera partículas de formato esférico ($\text{PVP}_{(\text{aq})}$ /tolueno).

Visando acrescentar maior estabilidade à emulsão, evitando a formação de macrogel, tanto para a reação de Fenton como foto-Fenton, utilizou-se um sistema contendo o surfactante (Span 80, Figura 23) (Condições 3 e 4 da Tabela 3), bastante

utilizado na produção de emulsões reversas⁵⁶. A emulsão obtida mostrou-se estável, ideal para a reação de reticulação de foto-Fenton, que exige um tempo maior para ocorrer, sendo necessário apenas aumentar o tempo de exposição, em relação ao utilizado por Fechine *et al.*²⁶.

Figura 23. Estrutura química do surfactante Span 80 (monooleato de sorbitan).

Ensaio de transmitância foram feitos de forma a se avaliar a disponibilidade de luz para promover a reação de Foto-Fenton em toda a suspensão. A emulsão absorve e/ou dispersa cerca de 63% da luz incidente em 365 nm em cela de 1 cm (Figura 24), o que indica que havia luz UV suficiente para promover a reticulação do PVP.

Figura 24. Espectro de transmitância da emulsão a/o sem PVP.

As partículas obtidas, tanto pela reação de Fenton como da reação de foto-Fenton (Figura 25 e Figura 26), são relativamente fáceis de serem purificadas do solvente orgânico e do surfactante através de lavagens com acetona e etanol, seguido de filtração (membrana Millipore 0,45 μm). Os microgéis obtidos da reação de foto-Fenton apresentam diâmetro de aproximadamente 34 μm (Figura 25C). Esse diâmetro é cerca de 35 vezes maior que o diâmetro de microgéis obtidos pela reação de Fenton, partindo da mesma emulsão (Figura 26B).

O aumento do diâmetro é devido à dinâmica da emulsão. Enquanto a reação de Fenton é capaz de produzir hidrogéis instantaneamente²⁸, a reação de foto-Fenton necessita de um tempo maior de reação. Durante o tempo de exposição ao UV, as gotículas da emulsão colapsam, levando ao aumento do diâmetro final dos microgéis.

Figura 25. Microgéis de PVP obtidos por reação de foto-Fenton. (A) Microscopia óptica da suspensão de microgéis; (B) microscopia eletrônica e (C) distribuição de diâmetros.

Figura 26. Microgéis de PVP obtidos de reação de Fenton. (A) Microscopia eletrônica e (B) distribuição de diâmetros.

5. Obtenção de Hidrogéis Nanoestruturados

Este capítulo será dedicado à descrição da obtenção de hidrogéis de PVP nanometricamente estruturados, mais especificamente, nanoesferas de hidrogel de PVP. Serão abordadas dois sistemas utilizados na formatação: vesículas e micelas reversas. As reticulações que geram o hidrogel foram obtidas utilizando a reação de Fenton e Foto-Fenton.

Nanopartículas de hidrogéis, também chamadas nanogéis, são partículas poliméricas coloidais, de tamanho submicrométrico, que aliam as vantagens da biocompatibilidade dos hidrogéis ao tamanho reduzido^{57,58}. Essas partículas, aplicadas como biomateriais, têm a vantagem de poder se infiltrar nos tecidos através dos vasos capilares, liberando a substância de interesse no local desejado⁵⁹. Além disso, um fármaco incorporado na partícula pode ter sua liberação de forma gradual, permitindo um controle necessário onde doses terapêuticas se aproximam de doses tóxicas⁵⁹⁻⁶¹. Os mecanismos de liberação do fármaco podem se dar tanto pela difusão através dos poros quanto pela própria degradação da partícula.

5.1. Vesículas como sistema formatador

Moléculas anfifílicas, ou seja, que apresentam em sua estrutura uma parte apolar e outra polar, são capazes de acumular-se em interfaces de líquidos imiscíveis ou na superfície de um líquido, formando arranjos organizados. Dentre os anfifílicos mais conhecidos estão os fosfolípidos. A formação de arranjos desses anfifílicos em solução tem sido intensamente estudada como modelos de membranas celulares⁶².

Os arranjos mostrados na Figura 2 são estruturas supramoleculares, formados por anfifílicos. Sua forma e tamanho dependem da estrutura dos monômeros, do método de preparação e das condições do meio.

Figura 27. Exemplos de estruturas supramoleculares formadas por anfifílicos⁶³.

Os lipossomos são formações discretas de bicamadas concêntricas, separadas por compartimentos aquosos. Os lipossomos ou vesículas são nomeados de acordo com o número de bicamadas anfifílicas (lamelas), suas posições relativas e seu tamanho (Tabela 4 e Figura 28)⁶⁴.

Um grande número de fenômenos, entre eles transporte de íons, compartilhamento de fármacos, solubilização de drogas e preparação de nanopartículas, por exemplo, tem sido estudado utilizando-se vesículas e lipossomos preparados com fosfolipídios e anfifílicos artificiais⁶³.

As vesículas e micelas, por exemplo, podem ser usadas para criar em seu interior micro-ambientes com características diferentes do ambiente externo, devido ao isolamento proporcionado pela bicamada. Isso possibilita seu uso como um micro reator, uma vez que se podem introduzir em sua estrutura os reagentes necessários, separando-os do meio em que a estrutura do anfifílico está inserida.

Neste capítulo será descrita a obtenção e caracterização de nano- e/ou micropartículas de hidrogéis de PVP a partir da reticulação com reação de Fenton e Foto-Fenton e utilizando vesículas como sistema formatador.

A utilização de vesículas como sistema formatador envolve algumas etapas principais: (a) encapsulação do PVP; (b) reticulação do PVP encapsulado e (c) remoção da bicamada lipídica. Dessas, as duas primeiras etapas são cruciais na obtenção dos nanogéis por esse método.

Tabela 4. Nomenclatura e diâmetro de vesículas⁶⁴.

Vesícula	Nome	Diâmetro
MLV	Vesícula multilamelar	400 – 3500 nm
LUV	Vesícula unilamelar grande	> 100 nm
SUV	Vesícula unilamelar pequena	20 – 50 nm
GUV	Vesícula unilamelar gigante	> 1 μ m
MUV	Vesícula unilamelar média	50 – 100 nm
MVL	Lipossomo multivesicular	-
OLV	Vesícula oligolamelar	-
SOB	Vesícula oligolamelar pequena	20 – 50 nm
LOV	Vesícula oligolamelar grande	> 100 nm
GOV	Vesícula oligolamelar gigante	> 1 μ m

Figura 28. Representação esquemática dos vários tipos de lipossomos, mostrando a base da sua classificação em termos de tamanho, número de lamelas e sua posição relativa. Cada linha representa uma bicamada lipídica (lamela)⁶⁴.

Existem muitos anfifílicos que podem ser utilizados para formar vesículas e eles se classificam em neutros, catiônicos e aniônicos. Dentre os neutros, escolheu-se a classe das lecitinas (fosfolipídeos) para a obtenção das vesículas, porque as lecitinas são naturais, biodegradáveis e possuem características emulsificantes próprias⁶⁵. A relativa facilidade de sua obtenção em laboratório, a partir da gema de ovo ou de cápsulas de lecitina de soja de uso farmacêutico, também influenciou na sua escolha. Alguns anfifílicos catiônicos foram incorporados nas vesículas, visando o aumento da estabilização do sistema e encapsulação do polímero.

As partículas obtidas a partir desse método foram caracterizadas por microscopia e espalhamento de luz.

5.1.1. Métodos

Purificação da lecitina de soja

A purificação da lecitina de soja foi feita segundo método descrito por Maximiano *et al.*⁶⁶ para obtenção de lecitina de ovo. Antes de proceder à purificação, o conteúdo oleoso de cápsulas de lecitina de soja de uso farmacêutico foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como eluente uma mistura de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:35:3, v/v). O procedimento para purificação (obtenção do Extrato de lecitinas 2 – EL2, que posteriormente foi purificado por cromatografia em coluna) está disposto no fluxograma a seguir (Figura 29).

O extrato EL2 foi mantido congelado em $\text{N}_{2(l)}$ para prevenir oxidação dos fosfolípidos. Esse extrato (1,6 g) foi aplicado em coluna cromatográfica (coluna de vidro de 35 cm x 2 cm, contendo uma suspensão em CHCl_3 de 80 g de alumina neutra ativada a 120°C por 12 horas). A fase móvel consistiu de 1L de CHCl_3 , seguido de 100 mL de $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 95:5 e 500 mL $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 90:10. Cada fração coletada (de 100 mL) foi rotoevaporada (35°C e pressão reduzida) e congelada em $\text{N}_{2(l)}$.

Figura 29. Fluxograma de purificação de lecitina de soja (adaptado de Maximiano et al.⁶⁶.)

As frações contendo fosfolipídeos (frações 12-16, verificado por CCD) foram submetidas à análise por espectrometria de massas, RMN ¹H e RMN ¹³C. A caracterização do material encontra-se na seção “Anexos” desta tese.

Encapsulação de PVP nas vesículas

As vesículas contendo o polímero foram obtidas da seguinte forma: 60 mg de lecitina de soja, dissolvidas em 700 μL de CH_2Cl_2 , foram injetadas lentamente em 5 mL da solução aquosa de PVP a 80 g L^{-1} , termostatizados a 50°C, contendo FeCl_2 17 mmol L^{-1} . O CH_2Cl_2 foi evaporado pelo efeito da temperatura e de um fluxo de nitrogênio colocado. A suspensão obtida após a injeção e total evaporação do solvente orgânico foi diluída com $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ e centrifugada (14.200 rpm / 30 min) para separação das vesículas obtidas da fase externa. Essas vesículas foram então lavadas (3x 20 mL $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ seguida de centrifugação) e ressuspensas em $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$.

A análise de inclusão do polímero foi feita quantificando o PVP incluído com o reagente Lugol³². Para tanto, o pellet de vesículas (com volume aproximado de 300 μL) foi diluído em água até o volume final de 1.000 μL . Desses, 100 μL foram diluídos em 900 μL . Os 1.000 μL resultantes foram divididos em 5 alíquotas, às quais foram adicionados água, Lugol e PVP em concentração pré-estabelecida. Medida a absorbância, obtém-se uma reta, onde o módulo do valor da intersecção da reta com o eixo das abscissas corresponde ao valor da concentração de PVP na solução analisada. Corrigindo-se as diluições, temos o valor da concentração de PVP no pellet de vesículas.

Um esquema simplificado da formação das vesículas e inclusão do polímero está colocado na Figura 30.

Figura 30. Esquema simplificado da obtenção de vesículas contendo PVP e a reticulação do polímero incluído.

Reticulação do PVP Incluído e Purificação das Partículas Obtidas

À suspensão final de vesículas contendo PVP e Fe^{2+} foi adicionado 1 mL de solução de NaCl contendo H_2O_2 , para concentração final de H_2O_2 de 100 mmol L^{-1} , para a reticulação. No caso da reação de foto-Fenton, a suspensão foi ainda irradiada por 12 horas em UV 365 nm.

A purificação das partículas obtidas foi feita induzindo a lise das vesículas com a adição de etanol 50% v/v e centrifugação (procedimento que foi repetido 2x); procedendo-se centrifugações e lavagens com água (2x). O pellet resultante foi ressuspensionado em água e liofilizado. O esquema simplificado da reticulação e purificação está disposto na Figura 31.

Figura 31. Esquema simplificado da reticulação do polímero incluído e purificação das partículas.

A remoção completa da bicamada lipídica foi confirmada pela quantificação de espécies de fósforo, feita colorimetricamente⁶⁷.

Caracterização das partículas obtidas

O material particulado foi caracterizado por espalhamento dinâmico de luz e microscopia eletrônica de varredura. A análise do intumescimento foi feita pela pesagem do pellet em balança analítica (m_{int}), seguida de liofilização e pesagem do pellet seco (m_{sec}). O índice de intumescimento Q foi calculado diretamente pela Equação 3.

$$Q = \frac{(m_{int} - m_{sec})}{m_{sec}} \quad (\text{Equação 3})$$

5.1.2. Resultados e Discussões

Encapsulação do polímero

Para aumentar a estabilidade das vesículas, tendo em vista os métodos empregados para a reticulação do polímero incluído, foram adicionados surfactantes catiônicos e também foram feitas vesículas de DBPC, análogo saturado das lecitinas. As eficiências de encapsulação obtidas conforme descrito em Materiais e Métodos estão dispostas na

Tabela 5. Como cada vesícula em solução pode ter um valor de eficiência de encapsulação diferente⁶⁸, é importante considerar que a inclusão do PVP foi medida espectrofotometricamente e o valor obtido é uma média de todas as vesículas formadas.

Tabela 5. Encapsulação de PVP nas vesículas obtidas.

Surfactante	Inclusão de PVP* (%)
Lecitina de Ovo	62
Lecitina de Soja	94
DBPC	31
DODAC 1% + lecitina de soja	21
DPTMA 1% + lecitina de soja	100

*Erro: $\pm 15\%$

É possível observar que uma melhor eficiência de encapsulação pode ser obtida com vesículas da lecitina obtida da soja. Existem algumas diferenças entre lecitinas obtidas de diferentes origens^{66,69} e o comprimento da porção apolar da molécula pode implicar em diferentes propriedades da vesícula formada⁷⁰. Além disso, as interações entre os lipídeos e as moléculas a serem encapsuladas também podem afetar a eficiência de encapsulação, além de suas propriedades físicas e químicas⁶⁸, o que explicaria a baixa eficiência de encapsulação do anfifílico DBPC.

A adição de surfactantes catiônicos pode ser interessante considerando a repulsão adicional entre as vesículas, já que o método utilizado para a reticulação do polímero incluído exige um longo tempo para ocorrer. Por isso, fez-se a adição de DODAC ou DPTMA à preparação de vesículas de lecitina, observando-se diferenças significativas nos valores de encapsulação. Os dois surfactantes adicionados são saturados, porém na molécula de DODAC as duas cadeias de dezoito carbonos estão ligadas diretamente ao amônio quaternário da cabeça polar e, no caso do DPTMA as duas cadeias estão esterificadas a um grupo glicerol, onde também está ligado o amônio quaternário. Assim, o anfifílico DPTMA tem um empacotamento lateral mais semelhante ao de um fosfolipídio que o DODAC (que tem as duas cadeias mais afastadas), o que provoca defeitos no empacotamento. Esses defeitos podem aumentar a permeabilidade da bicamada, podendo até ocasionar o vazamento do polímero. Este fenômeno foi observado medindo-se a concentração de PVP no sobrenadante, o que mostrou que a concentração de PVP não diminuía após algumas lavagens (enquanto o sobrenadante da 5^a lavagem de vesículas contendo PVP de

lecitina continha menos que 10^{-4} g L⁻¹ de PVP, a mesma lavagem das vesículas contendo DODAC continha aproximadamente 0,02 g L⁻¹ de PVP – cerca de 200 vezes maior).

A encapsulação do polímero é uma etapa bastante delicada do processo de obtenção dos nanogéis formatados em vesículas. Sabe-se que quanto maior a molécula a ser encapsulada, mais difícil é a encapsulação^{68,71}. Segundo Szoka e Papahadjopoulos (1980)⁷², em seus estudos sobre encapsulação de proteínas em SUVs e LUVs, observa-se uma diminuição da eficiência de encapsulação em função da massa molar da proteína a ser encapsulada. Dominak *et al.* (2007)⁶⁸ estudaram a encapsulação de PEG (polietilenoglicol) e dextranas em GV, obtidas por hidratação de filmes de fosfolípidos, observando esse mesmo comportamento.

A massa molar do PVP utilizado neste trabalho é bastante elevada ($\bar{M}_n$ 360.000, $\bar{M}_w$ 1.300.000), por isso a importância da determinação da eficiência de encapsulação. O método para obtenção das vesículas contendo PVP foi aquele da injeção, que, pela natureza da formação das vesículas, pode ser o mais eficiente, comparado com a extrusão, por exemplo.

Segundo estudos do mecanismo da formação de vesículas, feitos por Lasic, 1988⁷³, a formação de vesículas envolve a obtenção de fragmentos de bicamadas de fosfolípidos (BFP), uma espécie de micela de fosfolípidos em formato de disco, que se fecham sobre si mesmos. Na Figura 32, adaptada desse artigo, pode-se observar que a formação de vesículas a partir de métodos de injeção permite a encapsulação

de maior quantidade de soluto, uma vez que ela é formada cercada pelo meio que a cerca por todos os lados e não somente por um, como no caso de vesículas obtidas por hidratação de filmes de fosfolipídeos seguida de extrusão (Figura 33). Além disso, no método de injeção, as vesículas formadas são, geralmente, unilamelares.

Figura 32. Obtenção de vesículas a partir de hidratação de filmes, depleção de detergente e injeção, adaptado de Lasic (1988)⁷³. As linhas contínuas representam bicamadas lipídicas.

Figura 33. Esquema de formação de MLV a partir da hidratação de filmes de fosfolipídeos, reproduzido de Lasic (1988)⁷³. As linhas contínuas representam bicamadas lipídicas.

A inclusão da solução do polímero, no caso das vesículas escolhidas - de lecitinas de ovo e de soja - e o método que foi utilizado em sua preparação, foi relativamente fácil. As vesículas injetadas têm algumas limitações como, por exemplo, o diâmetro elevado e a alta polidispersividade, porém, a inclusão de soluções no interior delas é bastante simples.

Reticulação do Polímero Encapsulado

As vesículas de lecitina de ovo obtidas contendo PVP 40 g L^{-1} e FeCl_2 5 mmol L^{-1} foram reticuladas por dois métodos: a reação de Fenton (simples adição de H_2O_2 em $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$, para concentração final na suspensão de 100 mmol L^{-1} , seguida de repouso) e foto-Fenton (adição de H_2O_2 em $\text{NaCl}_{(\text{aq})}$, para concentração final na suspensão de 100 mmol L^{-1} , seguida de 6 horas de irradiação em $\lambda = 365 \text{ nm}$, uma vez que parte do Fe^{2+} é oxidado durante o processo de encapsulação, gerando o Fe^{3+} necessário à essa reação). A reação de foto-Fenton, análoga fotoquímica da reação de Fenton, é capaz de produzir hidrogéis de PVP tal como a reação de Fenton²⁶.

O diâmetro das vesículas, antes e após a reticulação com os dois métodos, permaneceu praticamente o mesmo, conforme Figura 34. Após a lise com etanol 50% não houve retenção da turbidez. Após a centrifugação, não houve formação de *pellet* no caso da amostra reticulada com Fenton; na amostra reticulada com foto-Fenton, houve formação de *pellet*, indicando reticulação do polímero, porém em pouca quantidade.

Figura 34. Diâmetro das vesículas contendo polímero sem reticular, reticulada com Fenton e reticulada com foto-Fenton (antes da lise para recuperação do polímero reticulado).

A reação de Fenton é interessante por ser um método instantâneo para se obter hidrogéis de PVP, com qualquer formato desejado²⁹. Porém, é necessária a presença de Fe^{2+} , que é oxidado a Fe^{3+} no interior da vesícula. A tentativa de se utilizar esta reação para a reticulação não resultou na obtenção de partículas de hidrogel. A reação de foto-Fenton necessita dos íons Fe^{3+} (que foram formados no interior da vesícula), H_2O_2 e radiação UV. As moléculas de H_2O_2 adicionadas podem

permeiar a bicamada da membrana⁷⁴, encontrar os íons Fe^{3+} e a radiação UV pode induzir a reação dentro da vesícula. Como as vesículas podem refletir e espalhar parte da radiação e reagir com o H_2O_2 (lipoperoxidação), foi utilizada uma dose adicional de UV e H_2O_2 , ao invés das quantidades descritas por Fechine *et al.*²⁶.

As vesículas de lecitina de soja contendo PVP 80 g L^{-1} e FeCl_2 5 mmol L^{-1} ou 17 mmol L^{-1} foram reticuladas apenas pela reação de foto-Fenton, com adição de 100 mmol L^{-1} de H_2O_2 seguida de 12 horas de irradiação em $\lambda = 365 \text{ nm}$. Após a lise com etanol (1:1), a amostra contendo menor quantidade de Fe^{2+} não gerou *pellet*, enquanto a amostra com Fe^{2+} mais concentrada permaneceu turva, sugerindo que houve reticulação do material incluído, uma vez que as vesículas não existem mais após a lise. Após a centrifugação, houve formação de *pellet* amarelado que foi lavado e centrifugado com água deionizada.

A reação de foto-Fenton não altera significativamente a distribuição de diâmetros das vesículas, como está mostrado na Figura 35; porém isso não implica que a bicamada lipídica permanece inalterada durante a reação de reticulação. Apesar disso, a quantificação de espécies contendo fósforo nos *pellets* recuperados mostrou que a quantidade remanescente dessas espécies é baixa (<1% para as amostras reticuladas usando vesículas de lecitina de ovo e 0% utilizando vesículas de lecitina de soja).

Figura 35. Distribuição de diâmetros de vesículas de lecitina de soja contendo PVP. (A) Vesículas não submetidas à reação de reticulação e (B) Vesículas submetidas à reação de foto-Fenton.

Caracterização das Partículas Obtidas

Após a lise das vesículas de lecitina de ovo contendo PVP reticulado pela reação de foto-Fenton, foi obtido um *pellet* amarelo bastante escasso, que não contém espécies de fósforo e pode ser ressuspendido em água. A análise por MEV e espalhamento dinâmico de luz do material ressuspendido mostrou que esse material é composto de particulado sem forma definida (Figura 36), cujo diâmetro é levemente superior ao diâmetro das vesículas.

As partículas obtidas a partir da reticulação com foto-Fenton das vesículas contendo PVP e FeCl_2 17 mol L^{-1} também foram analisadas por DLS e MEV. As partículas apresentam diâmetro médio de 760 nm, comparável como o diâmetro das vesículas, com baixa polidispersividade (Figura 37). Dessa forma, pode-se dizer que as vesículas realmente contribuem para a formação das partículas obtidas. Porém, nas imagens de MEV (Figura 38), observa-se que as partículas obtidas apresentam-se sem forma definida.

Figura 36. (A) Imagem de MEV de partículas obtidas de vesículas de lecitina de ovo e (B) distribuição de diâmetros (DLS).

Figura 37. Distribuição de diâmetros das partículas de PVP obtidas a partir de lecitina de soja, feito por DLS.

Figura 38. Imagens de MEV das partículas de PVP obtidas a partir de lecitina de soja.

Comparando-se a distribuição de diâmetros para as partículas de hidrogéis obtidas a partir de preparações de lecitina pura (Figura 36B e Figura 37) percebe-se que o controle de diâmetro, neste caso, é a composição da bicamada, pois o método de obtenção das vesículas é o mesmo. Os diâmetros também podem ser controlados variando-se o método de obtenção das vesículas⁷³. Nanogéis de poliacrilamida, recobertos com a bicamada, da ordem de 100 nm, foram obtidos pelo método da depleção de detergente, utilizando Triton X100⁷⁵, a partir da encapsulação e reticulação de monômeros de acrilamida e bisacrilamida. Nanogéis da ordem de 200 nm, de poli(*N*-iso-propilacrilamida)⁷⁶ e copolímero de poli(*N*-iso-propilacrilamida-co-1-vinilimidazol)^{77,78}, foram obtidos a partir de ciclos de congelamento e descongelamento, seguido de extrusão⁷⁶ ou sonicação^{77,78}, para obtenção de SUVs contendo os monômeros utilizados. Nanogéis maiores, da ordem de 450 nm, produzidos a partir da encapsulação de solução 20% de hidroxietilmetacrilato de dextrana M_n 19.000, foram obtidos de vesículas geradas da hidratação de filmes de fosfolipídeos, seguida de extrusão⁷⁹. Microgéis de PEDOT/PSS (poli(etileno dioxítiofeno)/poli(sulfonato de estireno))⁸⁰ e PNIPA^{81,82} foram obtidos a partir de GUVs obtidas pelos métodos de desidratação/hidratação e eletroformação, respectivamente, gerando micropartículas de hidrogel conjugadas com a bicamada lipídica da ordem de 5 a 100 μm .

Neste trabalho, as partículas de hidrogel não apresentam forma definida, mesmo tendo elas sido obtidas a partir de vesículas esféricas. Muitos autores que obtiveram nanogéis utilizando vesículas como sistemas formatadores não discutem a

forma das partículas obtidas, porém em muitos casos é possível observar pelas microscopias mostradas nos trabalhos que o formato não é perfeitamente esférico^{77,79}.

Existem duas possíveis explicações para a perda de morfologia. Uma delas relaciona-se à estabilidade das vesículas durante o tempo da reação de reticulação. As vesículas podem se fundir ou serem atacadas pelo H_2O_2 ; e essas vesículas lipoperoxidadas sofrem perda da integridade de sua membrana, como aumento de fluidez da mesma⁸³. A adição de DPTMA, um surfactante catiônico, que pode diminuir a fusão de vesículas devido à repulsão das cargas positivas, falhou, pois não preveniu a perda do formato esférico, conforme pode ser visto na Figura 39. Outra explicação diz respeito à densidade de reticulação, que pode influenciar o formato das partículas de hidrogel isoladas da bicamada lipídica⁸⁰. Ainda há uma outra explicação, que diz respeito à perda de morfologia devido à preparação da amostra para a microscopia.

O intumescimento das partículas obtidas a partir da formatação em vesículas de lecitina de soja foi calculado diretamente: a massa das partículas secas foi medida, as partículas foram intumescidas e centrifugadas e sua massa foi medida novamente. A razão Q de intumescimento calculado foi aproximadamente 10, ou seja, as partículas absorveram apenas 10 vezes sua massa em água. Disso pode-se concluir que a densidade de reticulação deve ser alta, pois esta é inversamente proporcional à capacidade de absorver água.

Figura 39. Imagem de MEV de partículas obtidas de vesículas de lecitina de soja contendo 10% de DPTMA.

O intumescimento de nanogéis formatados em vesículas é pouco discutido na literatura. Alguns trabalhos com hidrogéis responsivos de PNIPA e copolímeros tratam do assunto. Na maior parte dos casos, ao invés de observar variação no intumescimento, o que se observa é a coagulação das partículas. Kazakov *et al.* estudou extensivamente esses sistemas⁷⁶⁻⁷⁸, principalmente no que diz respeito à interação entre partícula e lipossoma. Como o hidrogel utilizado é termo- e pH-responsivo, observou-se coagulação com o aumento da temperatura (coagulação inclusive da bicamada lipídica, que, após o resfriamento, passa a cercar todo o conjunto de nanopartículas, em um processo reversível)⁷⁶ e aumento no intumescimento em função da variação de pH (de 100 nm em pH 6,5 a 300 nm em pH 3,0, com formação de dímeros de partículas)⁷⁷. A formação de nanogéis também foi

estudada por Jersoka *et al.*⁸⁰ (nanogéis de dextrana-HEMA, biodegradáveis e que podem ser fagocitadas por células), por van Thienen *et al.*⁷⁹, (nanogéis de PEDOT/PSS em vesículas unilamelares gigantes – GUVs, reticuladas pela injeção de Ca^{2+} no interior da vesícula) e por Schillemans *et al.*⁷⁵ (reticulação seletiva de monômeros em vesículas).

O estudo da interação entre vesícula e hidrogel é de bastante utilidade no que diz respeito à construção de modelos celulares. Por isso, em boa parte dos trabalhos não se remove a bicamada lipídica, ou não se reticula quimicamente o polímero inserido. Vesículas contendo PNIPA não reticulada são bons exemplos. Esse polímero é capaz de responder a variações de temperatura, formando géis físicos, mesmo dentro de vesículas⁸². A transição sol-gel induzida pela temperatura dentro da vesícula mimetiza enrijecimento celular⁸¹. Hidrogéis e soluções poliméricas de PNIPA compartimentalizados são considerados citoesqueletos artificiais e suas propriedades viscoelásticas podem ser comparadas àsquelas de células vivas^{84,85}.

5.2. Micelas Reversas

As micelas são arranjos concêntricos de anfifílicos, podendo apresentar-se com formato esférico, cilíndrico ou lamelar. As micelas esféricas podem ser classificadas em reversas (fase aquosa compartimentada e fase orgânica como solvente) e normais (fase orgânica compartimentada e fase aquosa como solvente)⁸⁶.

Para obter os nanogéis utilizando micelas reversas, primeiramente foi necessário um estudo preliminar da interação do sistema micelar com o polímero, visto que o equilíbrio que envolve a estabilidade micelar é muito sensível à adição de novos componentes, como a solução do polímero contendo FeCl_2 .

O sistema micelar ideal é aquele em que a adição do polímero não envolve separação de fases, ou seja, o sistema deve permanecer límpido mesmo após a adição da solução polimérica. Isso indica a inclusão do polímero no interior aquoso da micela, estando, portanto, em condição de prosseguir com as etapas que envolveriam a reação de reticulação.

Dois sistemas micelares foram propostos: o sistema AOT em n-hexano e CTAB em uma mistura de n-hexanol:isooctano 10:90. O sistema AOT em n-hexano já foi utilizado na obtenção de nanopartículas de hidrogel de PVP partindo do monômero vinílico⁸⁷. Além disso, um sistema semelhante, em que o PVP-K30 foi incluído em micelas reversas de AOT, foi descrito⁸⁸. O sistema CTAB em n-hexanol:isooctano foi escolhido por tratar-se de um sistema micelar catiônico, o que

poderia favorecer a inclusão do polímero, além de ser já conhecido e utilizado no estudo de reações de interfaces⁸⁹.

A reação de reticulação do PVP dentro das micelas reversas também foi estudada, visando definir condições ótimas de reticulação, que levem a um maior controle na obtenção dos nanogéis.

Os nanogéis obtidos foram caracterizados em termos de pureza, morfologia, distribuição de tamanho e comportamento do intumescimento.

5.2.1. Sistema AOT em n-hexano

Métodos

Preparação das Micelas Reversas de AOT em n-hexano Contendo PVP

Para o preparo das micelas reversas, inicialmente escolheu-se o anfifílico AOT, pois este forma micelas reversas em solventes apolares sem adição de nenhum cosurfactante e é capaz de dissolver grandes quantidades de água em solvente orgânico⁹⁰. Além disso, é facilmente removido da solução por precipitação com CaCl_2 .

As micelas reversas foram preparadas dissolvendo-se o AOT em n-hexano, na concentração de 0,05, 0,1 e 0,2 M. A estas soluções foi adicionada solução de polímero, em diversas concentrações, no volume apropriado para se obter o W/S desejado. O W/S (relação entre a quantidade em mol de água e a quantidade em mol de anfifílico) é definido por meio da Equação 4.

$$W/S = \frac{n_{\text{água}}}{n_{\text{anfifílico}}} = \frac{55,51 \times V_{\text{água}}}{[\text{anfifílico}] \times V_{\text{anfifílico}}} \quad (\text{Equação 4})$$

sendo que $n_{\text{água}}$ e $n_{\text{anfifílico}}$ são os números de mol de água e de anfifílico, respectivamente; $V_{\text{água}}$ e $V_{\text{anfifílico}}$ são o volume de água e da solução orgânica contendo o anfifílico, respectivamente. 55,51 é a concentração da água em mol L^{-1} .

A estabilidade do sistema micelar foi medida por turbidimetria (para os sistemas contendo o polímero) e por DLS, antes e após a reticulação por UV, para a avaliação da integridade da micela exposta à essa radiação (254 nm).

Estudo do Sistema Micelar

Nesse estudo, três abordagens principais foram empregadas: (i) a estabilidade das micelas que contém PVP, (ii) a quantidade de PVP incluída e (iii) a estabilidade do sistema frente à reticulação.

A separação de fases foi avaliada por turbidimetria. Após a adição da solução de PVP às micelas, seguido de exaustiva agitação, a variação de turbidez foi medida em função do tempo até a completa separação de fases.

Após a separação de fases, a quantidade de PVP remanescente na fase orgânica foi avaliada. Para a medida da concentração de PVP na solução micelar utilizou-se o reagente complexante Lugol³².

Para a medida da concentração de PVP, extraiu-se com água o PVP da fase orgânica, juntamente com um pouco do AOT, que em parte também é extraído durante o processo. A concentração de PVP nessa solução foi medida no espectrofotômetro.

A curva de calibração foi feita utilizando a mesma matriz n-hexano/AOT a fim de se evitar algum efeito indesejado da matriz na medida. O mesmo volume da

solução de AOT em n-hexano, sem PVP, foi extraído com água; a essa fase aquosa adicionou-se o PVP e procedeu-se a medida.

A concentração de PVP deveria ser medida na fase orgânica, o que mostraria a quantidade de PVP incluído, e na fase aquosa que se separa após algum tempo quando a solução preparada está turva. O PVP foi quantificado após repouso das suspensões (que culmina na separação de fases) na solução próxima à superfície – que consistia apenas da solução de n-hexano/AOT/PVP incluído – e no fundo do recipiente – que era formada pela fase aquosa. De cada uma dessas regiões coletou-se volume de 1,0 mL, que foi extraído com água, complexado com Lugol e analisado.

O sistema micelar, sem a adição de PVP, foi exposto às mesmas condições de reticulação descritas abaixo. Alíquotas removidas do sistema em intervalos de tempo de 1 hora foram analisadas por espectrofotometria de UV-Vis e por DLS.

Reticulação do PVP Incluído e Purificação

Uma tentativa de reticulação do PVP incluso no sistema micelar foi feita utilizando parâmetros delineados pelos ensaios realizados com macrogéis (reticulação do PVP diluído com H_2O_2 e HAc) e analisada por DLS e espectrofotometria.

Para a reticulação utilizou-se como sistema micelar 0,1M de AOT em n-hexano, com $W = 60$, alcançado com adição de solução de PVP 5%, contendo 2,3% de ácido acético e 10 mM de H_2O_2 . Essa mistura foi irradiada com luz UV de $\lambda = 254$ nm por 12 horas.

A solução obtida após a irradiação foi analisada por DLS e espectrofotometria de UV-Vis. A amostra irradiada por 12 horas foi tratada da seguinte forma: o solvente foi removido por rotoevaporação e o líquido resultante foi ressuspenso em água suficiente para a dissolução total. O AOT foi precipitado com solução de cloreto de cálcio 30% (m/v) e a suspensão obtida foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi liofilizado. O sólido obtido foi analisado por espectrometria no infravermelho.

Resultados e Discussões

Estudo do Sistema Micelar

No estudo do sistema micelar composto por AOT em n-hexano, propôs-se definir o melhor W/S para o trabalho, ou seja, qual a relação entre água e AOT que possibilita a inclusão de maior quantidade de PVP por volume de solução orgânica. A concentração de PVP incluída na micela reversa é muito importante, visto que muitos dos sistemas reticuladores, entre eles os sistemas propostos – Fenton, Foto-Fenton e fotólise – são ineficientes na reticulação de soluções poliméricas muito diluídas.

Para a avaliação da inclusão do PVP na solução micelar, utilizou-se a medida de turbidez da solução. Uma solução que não apresente aparência turva é ideal, visto que, nessas condições, o PVP estaria totalmente incluso nas micelas, sem a formação de gotículas em suspensão. O aumento da turbidez da solução indica a formação de uma emulsão, cuja reticulação levaria à formação de partículas de hidrogel maiores do que a dimensão nanométrica proposta.

O ensaio da turbidez mostrou que, à medida que se aumenta o W/S, há um aumento na turbidez da solução, conforme mostra a Figura 40. Esse aumento é previsível, visto que, com maior quantidade de água, pode haver separação de fases. Porém, a variação da turbidez foi muito mais alta do que o esperado, uma vez que o AOT é capaz de incluir grandes quantidades de água, até $W/S \approx 60^{90}$. Este fato pode

ser explicado lembrando que a razão W/S foi obtida adicionando-se o volume necessário da solução de PVP para se atingir o valor da relação H_2O/AOT (mol/mol), e que para se aumentar o W/S, não se aumentou apenas a quantidade de água, mas também a massa de PVP-K90 adicionada. Isso gerou na solução uma sobrecarga do polímero, o que culminou com a não inclusão deste excesso no núcleo aquoso das micelas.

Figura 40. Variação da turbidez do sistema micelar com a concentração da solução de PVP-K90 adicionada.

Em outro teste sem a variação da massa adicionada de PVP-K90 ($m_{ad.} = 0,18 \text{ g}_{PVP} \text{ L}_{\text{hexano}}^{-1}$), observou-se que, na adição inicial da solução de PVP-K90 – fornecendo $W/S = 2,50$ – houve a formação de um precipitado de PVP. Este precipitado foi formado pois as moléculas de água foram deslocadas para a hidratação das cabeças polares do surfactante nas micelas reversas⁹¹. Mesmo adições

sucessivas de água (fornecendo W/S de 17; 32; 47) não foram capazes de dissolver o precipitado. Após a última adição de água (W/S = 62), a solução de AOT em n-hexano ficou turva. Agitou-se essa solução por aproximadamente duas horas, constatando-se que a turbidez não desapareceu e que houve a dissolução do precipitado. Isto não implica que o mesmo foi incluído nas micelas reversas, pois, como houve a separação de fases, o PVP se dissolveu, principalmente, nas gotículas de água suspensas no solvente orgânico. Após algum tempo em repouso, houve separação das duas fases (aquosa e orgânica). Dessa forma, conclui-se que a massa de PVP não foi o fator principal que levou à sua não-inclusão, mas, provavelmente, sua alta massa molar média⁸⁸.

A concentração de AOT também apresentou influência sobre a turbidez da solução. Para a mesma concentração de PVP-K90 adicionada e mesmo W/S (igual a 20), as soluções de AOT de maior concentração apresentaram maior turbidez, conforme Tabela 6. Tal fato também pode ser atribuído ao aumento do número de micelas/gotículas presentes na solução⁸⁶.

A pequena variação na turbidez observada para adição de PVP-K90 20 g L⁻¹ – que, apesar de apresentar, a olho nu, maior turbidez, apresentou menores valores de turbidez medidos no espectrofotômetro – deve-se ao fato de, nessa concentração, a separação das fases aquosa e orgânica da emulsão é mais rápida, não sendo possível efetuar uma medida mais precisa da turbidez inicial.

Tabela 6. Variação da turbidez com a concentração da solução de AOT, para a adição de soluções de PVP-K90 e W/S = 20.

	Solução	Concentração da solução de PVP-K90 adicionada (g L ⁻¹)		
		5	10	20
Valores de Turbidez (UT)	AOT 0,05 M	0,001	0,001	0,002
	AOT 0,10 M	0,003	0,010	0,007
	AOT 0,20 M	0,013	0,030	0,008

Para as soluções que apresentaram maior turbidez a olho nu, observou-se que houve a formação de uma segunda fase, mais densa e viscosa, no fundo do recipiente, com a diminuição da turbidez da solução sobrenadante. A formação dessa segunda fase é atribuída à decantação do excesso de solução de PVP-K90, que não foi incluído nas micelas. O fato de essa fase aquosa ser mais viscosa que a solução inicial de PVP-K90 adicionada às micelas é devido à absorção de parte da água pelas micelas.

A variação da turbidez, medida em 400 nm, com o tempo, foi feita a fim de se observar qual o tempo necessário para a separação das duas fases. O experimento mostrou que a separação se dá em cerca de dois minutos, conforme Figura 41.

Figura 41. Gráfico da variação da turbidez da solução de AOT 0,1M com o tempo, para a adição de solução de PVP-K90 2 % e W/S=20.

A separação das duas fases e o fato de a fase aquosa ser muito mais viscosa do que as soluções de PVP adicionadas implicam que a concentração de PVP dentro das micelas deve ser muito menor que a concentração de PVP adicionada, e que boa parte do PVP não foi incluída. Assim, procedeu-se a avaliação da quantidade de PVP incluída dentro das micelas reversas, medindo-se a quantidade de PVP retida na fase orgânica (Tabela 7). Para avaliar também a influência do tamanho da cadeia polimérica, sobre a inclusão nas micelas de AOT, utilizou-se polímeros de diferentes tamanhos: PVP-K16, PVP-K30 e PVP-K90, com $\overline{M}_w$ de 8.000, 58.000 e 1.300.000, respectivamente.

Tabela 7. Concentrações de PVP retido na fase orgânica.*

Tipo de PVP	[PVP] adicionada (g L ⁻¹)	[PVP] extraído (g _{PVP} L _{hexano} ⁻¹)		
		W/S = 20	W/S = 30	W/S = 60
PVP-K16	1,0	0,1	0,2	0,4
	5,0	0,2	0,2	0,8
	10,0	0,3	0,5	1,7
	20,0	0,5	0,8	2,8
	30,0	0,5	0,9	3,3
	40,0	0,6	1,0	4,8
	50,0	0,5	1,0	4,9
PVP-K30	1,0	0,4	0,4	0,2
	5,0	0,5	0,4	1,3
	10,0	0,7	0,8	1,8
	20,0	0,7	1,0	3,7
	30,0	0,6	0,9	4,1
	40,0	0,7	0,8	4,6
	50,0	0,6	1,1	4,5
PVP-K90	1,0	0,2	0,2	0,2
	5,0	0,3	0,2	0,3
	10,0	0,4	0,2	0,4
	20,0	0,3	0,4	0,3
	30,0	0,4	0,3	0,6
	40,0	0,3	0,2	0,7
	50,0	0,4	0,3	1,4

* [AOT] = 0,1 mol L⁻¹.

Para um mesmo W/S e mesmo tipo de PVP, observa-se que, após um valor de concentração de PVP adicionada (que depende do tamanho das cadeias do

polímero), a concentração de PVP na superfície se torna aproximadamente constante.

O melhor resultado de inclusão foi obtido para o PVP-K16, que, sendo o de menor massa molar, pôde ser incluído mais facilmente na micela. O PVP-K90 não mostrou uma inclusão muito satisfatória por ser o de maior cadeia. Por outro lado, o PVP-K30, de tamanho intermediário, apresentou inclusão também intermediária. A inclusão do PVP também causa alterações no tamanho das micelas, pois a micela contendo PVP apresenta raio hidrodinâmico maior que a que contém apenas água. A diferença de tamanho foi observada por DLS (Figura 42), em micelas com W/S igual a 60 com água e com adição de PVP-K90 50 g L^{-1} (a concentração de PVP-K90 no interior aquoso das micelas nesse caso corresponde a 9 g L^{-1}), feita pela adição de solução de PVP-K90 até o volume necessário para se atingir $W/S = 60$. A esquematização de como o polímero está incluído nas micelas encontra-se na Figura 43⁸⁸. Esse esquema, adaptado de Luan et al. (2003)⁸⁸, mostra o PVP interagindo preferencialmente com a cabeça polar do surfactante. Esse esquema foi proposto baseado em medidas de diâmetro das micelas contendo PVP e em medidas de infravermelho, através da deconvolução da banda de absorção de -OH (água), que mostrou que após a adição de PVP havia um rearranjo das moléculas de água que solvatavam a cabeça polar e os contra-íons⁸⁸.

Figura 42. Diâmetro de micelas reversas de AOT com W/S = 60, contendo ou não PVP.

Figura 43. Representação simplificada de (A) uma micela contendo água e (B) uma micela contendo uma cadeia polimérica (adaptado de Luan et al. (2003)⁸⁸).

A estabilidade das micelas à radiação UV ($\lambda = 254$ nm) também foi avaliada. A resistência das micelas à radiação neste comprimento de onda é importante visto que alguns dos sistemas reticuladores de PVP (fotólise e fotólise

com peróxido de hidrogênio e ácido acético) envolvem a irradiação do polímero com luz desse comprimento de onda.

Para que o sistema reticulador do PVP gere o nanogel dentro da micela reversa, é necessário que o sistema micelar (solução de hexano com o AOT) seja transparente a essa radiação.

O espectro UV-Vis da solução de AOT 0,1 M em n-hexano, com W/S = 60, sem a adição de polímero, mostrou que a absorção/espalhamento de luz da solução em 254 nm é bastante significativa (o valor obtido para a absorbância foi aproximadamente 1). O espectro da solução micelar com a adição de PVP 0,9% com 2% de ácido acético apresentou absorbância ligeiramente maior (aumento de 20% no valor da absorbância). O aumento desse valor pode ser consequência de maior absorção (causada pela adição de PVP/HAc) ou maior espalhamento de luz (causado pelo aumento do diâmetro das micelas).

Reticulação do Polímero Incluído nos Sistemas Micelares

Como a absorção pela micela representa a maior parte da absorção da solução, tem-se que, para se obter o hidrogel nessas condições, seria imprescindível expor o sistema à radiação por mais tempo para que a absorção de energia pelo PVP seja a mesma. Assim, se faz necessário que o sistema seja estável por um tempo

maior, isto é, as moléculas de AOT devem manter-se íntegras e a estrutura micelar estável.

A solução micelar com $W/S = 60$ sem a adição de polímero foi exposta a radiação UV, e sua estabilidade foi avaliada pela medida do tamanho das micelas, feita por DLS, conforme mostrado na Figura 44.

Figura 44. Diâmetro médio das micelas preenchidas com água na solução de n-hexano, em função do tempo de exposição à radiação UV (254 nm).

Pode-se observar que, conforme há o aumento no tempo de irradiação da solução, as micelas sofrem, em um primeiro momento (15 minutos de exposição à radiação), uma diminuição em seu tamanho. Após esse tempo, o tamanho das micelas aumenta com o tempo de irradiação.

A primeira queda no tamanho do diâmetro das micelas pode ser devido a uma desestruturação do sistema micelar devido à radiação. O crescimento do

diâmetro pode ser devido à aglomeração das novas estruturas formadas no primeiro momento de radiação.

Foi feita uma tentativa de reticulação do PVP incluído nas micelas reversas por fotólise com irradiação a 254 nm e adição de H_2O_2 e HAc. Para tanto, foi feito um cálculo considerando a obtenção de fração gel próximo a 70%, e considerando o coeficiente de partição do ácido acético no n-hexano (aproximadamente 0,2).

Para a obtenção de valor de fração gel próximo a 70%, é necessário que o PVP incluído receba a mesma quantidade de radiação que o PVP livre em solução, que necessitou de um tempo de irradiação de duas horas. Considerando que o PVP esteja absorvendo apenas 10% da radiação que é incidida sobre o sistema (metade dos 20% de aumento da absorção atribuídos à adição de PVP), serão necessárias 12,5 horas para que o PVP receba a mesma quantidade de radiação, supondo que o sistema AOT/n-hexano não sofra danos/alterações durante o processo de irradiação. A quantidade de ácido acético adicionada deve ser de tal forma que os 84% de ácido que ficam na solução aquosa equivalham aos 2% v/v que fornecem a fração gel desejada.

Após a irradiação a amostra foi analisada por DLS, constatando-se uma queda no valor do diâmetro das partículas em solução na amostra irradiada, quando comparada com um controle não irradiado, conforme Figura 45.

Observa-se que o diâmetro das micelas preenchidas com polímero se comporta ao contrário do que ocorre com as micelas preenchidas apenas com água, conforme comparação feita na Figura 45.

Figura 45. Efeito da irradiação no diâmetro das partículas de micelas de AOT (W/S = 60 com PVP 0,9%, Ácido Acético 2,3 % e H₂O₂ 10 mM).

A drástica redução no diâmetro observada após a exposição das micelas contendo PVP/HAc/H₂O₂ pode ser associada ao processo de redução de volume do polímero quando há a reticulação. Ao se formarem as ligações intramoleculares, o polímero perde alguns graus de liberdade e fica mais enovelado, além de haver uma reestruturação das moléculas de água que solvatavam o polímero. Essa contração do polímero pode causar, conseqüentemente, a contração da micela que o contém. Porém a redução poderia também ser devida às alterações sofridas pelas micelas – se o composto gerado na degradação do anfifílico absorver radiação no comprimento de

onda do laser utilizado no equipamento, a medida será comprometida. Porém observando o aumento de diâmetro sofrido pelas micelas contendo apenas água, constata-se que a contração é principalmente devida a alterações no polímero.

As soluções obtidas da irradiação também foram analisadas por espectrofotometria. Nesse ensaio, irradiou-se micelas com $W/S = 60$ contendo apenas água e micelas de mesmo W/S contendo a mistura para formação do gel (PVP, ácido acético e H_2O_2). As amostras foram irradiadas por tempos distintos, de modo a tentar observar a variação do espectro em função do tempo de irradiação, conforme Figura 46 e Figura 47.

Pode-se observar que, no sistema contendo PVP, há a formação pronunciada de um novo pico de absorção, por volta de 280 nm, conforme Figura 48A, que pode ser claramente visto quando se subtrai o espectro da micela contendo PVP reticulado da micela irradiada sem PVP Figura 48B. A diferença da absorbância em 400 nm do espectro da amostra irradiada por 12 horas é devido à leve turbidez que se originou na amostra após esse tempo de irradiação. Comparando-se os espectros da Figura 48 com o espectro do PVP 0,9 % reticulado com HAc/ H_2O_2 sem micelas reversas (Figura 49), vê-se que aparentemente esse mesmo pico aparece também nesse espectro (Figura 49B).

Figura 46. Espectos das soluções irradiadas de micelas contendo água.

Figura 47. Espectos das soluções irradiadas de micelas contendo PVP/HAc/H₂O₂ irradiadas.

Pode-se notar que o espectro de absorção UV do PVP reticulado na forma de um macrogel apresenta dois picos bem definidos: um com máximo em 243 nm e o outro em 297 nm (Figura 49B). Entretanto, o espectro de absorção do PVP reticulado

incluído no sistema micelar não são tão bem delineados (Figura 48B). Apesar de os formatos dos picos serem aparentemente semelhantes, não é possível afirmar que as bandas correspondam às mesmas modificações ocorridas no polímero, principalmente pelo deslocamento dos picos. Além disso, o sistema micelar é mais complexo, e, ocorrendo a degradação das micelas, partes do anfifílico podem se ligar ao polímero nas reações radicalares que ocorrem durante o processo de reticulação, fazendo com que o hidrogel obtido ao final do processo esteja de alguma forma modificado, e seu espectro não possa ser comparado de forma precisa com o espectro de um hidrogel reticulado em solução aquosa.

Figura 48. (A) Espectros UV-Vis de amostras de micelas reversas de AOT irradiadas por 12 horas. (B) Espectro resultante da subtração da curva da amostra contendo água da amostra contendo PVP.

Figura 49. (A) Espectros UV-Vis de amostras de PVP/HAc/H₂O₂ em água. (B) Espectro resultante da subtração da curva não irradiada da curva irradiada.

Análise dos Nanogéis Obtidos

A amostra de AOT/n-hexano com PVP irradiada por 12 h foi tratada segundo descrito anteriormente, fornecendo um sólido amarelado. Esse sólido foi analisado por espectrometria no infravermelho (Figura 50). O espectro da amostra mostrou a presença de diversos picos característicos de AOT, além de outros picos não pertencentes ao polímero.

Os espectros de infravermelho mostraram que os nanogéis obtidos em micelas de AOT ficam contaminados com o surfactante, o que compromete a sua aplicação como biomaterial, logo, outro sistema micelar foi estudado com resultados mais promissores, como será visto a seguir.

Figura 50. Espectro IV (A) do sólido obtido da reticulação e (B) detalhe do espectro (A), mostrando a presença de duas carbonilas, característico de AOT.

5.2.2. Sistema CTAB em isooctano:n-hexanol 90:10

Métodos

Preparação das Micelas Reversas de CTAB em n-hexano Contendo PVP

Para o preparo das micelas reversas, escolheu-se o anfifílico CTAB, que já foi descrito na literatura como nanocompartimento para reações⁹² e é facilmente removido da solução por precipitação com NaClO_4 .

As micelas reversas foram preparadas adicionando-se o CTAB à mistura de solventes n-hexanol:isooctano (10:90, v/v), para concentrações de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O anfifílico não se dissolve sem a presença de água no sistema, de tal modo que foi acrescentada solução aquosa de PVP a diversas concentrações (80, 100 e 120 g L^{-1}), contendo Fe^{2+} , no volume apropriado para se obter o W/S desejado. Após a adição da solução do polímero, o sistema permaneceu sob agitação até total dissolução do surfactante (cerca de 7 minutos). A estabilidade do sistema micelar contendo o polímero e o Fe^{2+} foi medida por turbidimetria e por espalhamento dinâmico de luz.

Estudo do Sistema Micelar

Nesse estudo, três principais frentes de trabalho foram abordadas: a inclusão do PVP nas micelas estudadas, a otimização da turbidez do sistema e a influência dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} no sistema.

A inclusão do PVP foi avaliada pela adição de solução de PVP de diversas concentrações (de 50 a 100 g L⁻¹), em dois W/S distintos (30 e 60), examinando-se o efeito dessa adição na turbidez do sistema.

A otimização do sistema micelar para a minimização da turbidez e conseqüente obtenção de partículas menores foi feita utilizando planejamento fatorial de experimentos⁹³. O planejamento fatorial de experimentos possibilita avaliar os efeitos de cada variável no sistema utilizando um número mínimo de experimentos. Para tal, foram avaliadas três variáveis em dois níveis (planejamento 2³): concentração da solução de PVP adicionada, W/S e concentração do anfifílico, segundo a Tabela 8.

Tabela 8. Valores das variáveis analisadas no conjunto de experimentos.

	[PVP] (g L ⁻¹)	W/S	[CTAB] (mol L ⁻¹)
1	80	20	0,05
2	80	20	0,1
3	80	40	0,05
4	80	40	0,1
5	120	20	0,05
6	120	20	0,1
7	120	40	0,05
8	120	40	0,1

A influência dos íons Fe²⁺ e Fe³⁺ na mobilidade das cadeias poliméricas no interior das micelas reversas foi avaliada por DLS e por anisotropia de fluorescência. Para os ensaios de fluorescência, foi utilizada uma mistura de PVP e PVPVant na proporção de 1:1 (m/m). Os valores de anisotropia, Γ , foram calculados a partir de experimentos de polarização de fluorescência pela Equação 5⁹⁴.

$$\Gamma = \frac{I_{VV} - I_{VH} \frac{I_{HV}}{I_{HH}}}{I_{VV} + 2.I_{VH} \frac{I_{HV}}{I_{HH}}} \quad (\text{Equação 5})$$

sendo que I_{VV} é a luz de excitação e emissão polarizadas verticalmente, I_{VH} é a luz de excitação polarizada verticalmente e a emissão polarizada horizontalmente, I_{HV} é a luz de excitação polarizada horizontalmente e a emissão polarizada verticalmente e I_{HH} é a luz de excitação e emissão polarizadas horizontalmente. Quanto maior o valor da

anisotropia, maior a restrição de mobilidade do fluoróforo, durante o tempo de fluorescência.

Reticulação do PVP Incluído e Purificação das Nanopartículas

O PVP incluído nas micelas foi reticulado mediante a adição de solução estoque de peróxido de hidrogênio dispersa em éter, para obtenção de concentração final (na fase aquosa somente) de 50 mmol L^{-1} . A concentração da solução estoque de peróxido de hidrogênio é medida regularmente utilizando o espectrofotômetro ($\varepsilon = 43,6 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 240 nm)⁹⁵, garantindo que a quantidade de peróxido adicionada fosse a adequada ao sistema. O sistema permaneceu sob agitação durante aproximadamente 12 horas, garantindo que a reação ocorresse por completo. O perfil da reação de reticulação foi acompanhado por anisotropia de fluorescência, durante a primeira hora de reação.

Após a reticulação do sistema, o isolamento das nanopartículas foi feito rotoevaporando-se o solvente orgânico. À mistura resultante da rotoevaporação, foi acrescentado água até a sua total suspensão e, em seguida, solução de NaClO_4 foi adicionada de forma a obter uma proporção em mol de $\text{ClO}_4^-/\text{CTA}^+$ igual a 3, garantindo, assim, a precipitação quantitativa do sal do anfifílico. O sólido precipitado foi separado por centrifugação (10.000 rpm por 20 minutos). Essa centrifugação separa apenas o anfifílico insolúvel, não tendo influência sobre o polímero ou o

hidrogel, que permanecem no sobrenadante, que é submetido à diálise. Os nanogéis foram então precipitados pela adição de NaCl(aq) saturado. Esse precipitado foi ressuspensionado em H₂O e dialisado novamente. A suspensão foi então liofilizada. A total remoção do CTAB foi confirmada por RMN ¹H.

Para obter estes mesmos nanogéis de PVP livres de Fe³⁺, fez-se a remoção desses íons adicionando-se HCl à suspensão das nanoesferas, seguido de diálise contra HCl diluído, em pH 2. A remoção do ácido foi feita por diálise contra água. A concentração residual de íons ferro foi determinada por ICP-AES.

Análise dos nanogéis obtidos

Todo o material obtido foi analisado por microscopia eletrônica de varredura, DLS e foram feitas medidas de potencial zeta. A razão de intumescimento (*Q*) foi calculada por meio da Equação 6, adaptada de Peppas *et al.*, 1986¹⁰:

$$Q = \frac{w_s - w_d}{w_d} \approx \frac{V_s \times d_w}{V_d \times d_{PVP}} \quad (\text{Equação 6})$$

sendo que *w_s* é a massa do hidrogel intumescido, *w_d* é a massa do hidrogel colapsado (seco), *V_s* é o volume do gel intumescido, *d_w* é a densidade da água, *V_d* é o volume do gel colapsado (seco) e *d_{PVP}* é a densidade do PVP.

Para análise do comportamento do intumescimento, os nanogéis foram intumescidos em soluções aquosas de NaCl, variando a concentração do sal de 0 a 3,8

mol L⁻¹. O tipo de ânion em sais de sódio também foi variado (triflato, acetato, iodeto, nitrato, bissulfito e tiocianato) nos ensaios de intumescimento, porém em duas concentrações fixas (0,2 e 2,0 mol L⁻¹). Os nanogéis também foram submetidos a variações de pH. Em todos esses casos, o diâmetro foi medido por espalhamento dinâmico de luz.

A razão Q/Q_0 (razão entre o intumescimento do nanogel no meio em que ele está, Q , dividido pelo intumescimento do nanogel em água, Q_0) foi calculada através da Equação 7.

$$\frac{Q}{Q_0} = \left(\frac{D^s}{D_0^s} \right)^3 \quad (\text{Equação 7})$$

sendo que D^s é o diâmetro do nanogel intumescido no meio e D_0^s é o diâmetro do nanogel em água.

A capacidade dos nanogéis complexarem outros íons metálicos, além do Fe³⁺, foi avaliada intumescendo-os em soluções 0,1 mol L⁻¹ de alguns sais (Pb(NO₃)₂, CuSO₄, MnCl₂, Co(NO₃)₂ e CaCl₂). Após o intumescimento, as soluções foram exaustivamente dialisadas contra água e a concentração residual de cada cátion foi medida por ICP-AES.

Testes in vitro com células

Testes in vitro com macrófagos e fibroblastos

Macrófagos murinos, linhagem J774 (imortalizados), foram expandidos sob condições de cultura celular (37°C, umidade e atmosfera de CO₂ (5%) controladas, asséptico), em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). Fibroblastos murinos, linhagem 3T3 L1, também imortalizados, foram expandidos sob as mesmas condições, utilizando meio de cultura DEMEM suplementado com 10% de soro de bezerro e 1% de antibiótico. Para o teste de citotoxicidade dos nanogéis de PVP-sem ferro e de PVP-Fe³⁺, 5x10⁴ células por poço foram plaqueadas em uma placa de Elisa de 96 poços e incubadas por 24 horas para total adesão celular. Após as 24 horas, o meio de cultura foi removido e substituído por 200 µL de meio de cultura contendo diferentes concentrações dos nanogéis. Os experimentos para cada concentração foram feitos em quintuplicata. Os macrófagos foram mantidos com os nanogéis por 24 e 48 horas.

Após a incubação com os nanogéis, o meio foi removido e aos poços foram adicionados 200 µL de meio de cultura contendo 0,05 mg mL⁻¹ de brometo de 2-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-3,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). As células foram então incubadas por 4 horas na estufa sob atmosfera de CO₂, a 37°C.

Após a incubação, o sobrenadante foi removido e o MTT formazana formado, juntamente com os detritos celulares, foram dissolvidos em DMSO e analisados em espectrofotômetro em 492 nm (leitor de Elisa, modelo Microplate

Reader Stat Fax 3200). Os resultados foram normalizados considerando os controles de vida (em que houve adição de meio de cultura sem nanogéis) e de morte (adição de 200 μ L de meio de cultura contendo 15% v/v de DMSO).

Resultados e Discussões

Estudo do Sistema Micelar

Solubilidade do PVP no Sistema Micelar

Os testes de solubilidade da solução de PVP nas micelas reversas mostraram que a mesma dissolve-se facilmente nas micelas reversas de CTAB em isooctano:hexanol (90:10). Em W/S igual a 60, a solução de PVP dissolve-se mais facilmente do que a água. Os dados estão dispostos na Tabela 9. A adição de FeCl_2 e ácido acético à solução de PVP não alterou a solubilidade da solução nas micelas.

Tabela 9. Teste de dissolução com solvente isooctano:n-hexanol 90:10 e CTAB 0,1 M.

[PVP] (%)	W/S = 30	W/S = 60
0	dissolve	turva
5	dissolve	dissolve
8	dissolve	dissolve
10	dissolve	lento

Medidas de turbidez do sistema para a adição de solução de PVP de diferentes concentrações mostraram que quanto maior a concentração de PVP da solução adicionada, menor a turbidez do sistema (Figura 51).

Figura 51. Valores de Turbidez da solução de micelas para a adição de solução de PVP.

Para verificar se o PVP não está se dissolvendo no solvente, foi feita uma adição de PVP 100 g L^{-1} ao solvente, sem surfactante, na proporção de 1:1. Após agitação e separação de fases, a concentração de PVP na fase orgânica foi determinada pela adição de Lugol, não sendo constatada a presença de PVP na fase orgânica ($[\text{PVP}] = 0,000 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$).

Como a solução de PVP-K90 dissolve-se mais facilmente nas micelas que a água pura para o mesmo W/S e o PVP-K90 não está se particionando na fase orgânica, pode-se admitir que sua presença estabilize a condição da microemulsão. A presença do grupo amida na PVP favoreceria a dissolução, pois o CTAB, de carga positiva, deve complexar com o polímero através da carbonila e/ou do nitrogênio.

Otimização da Turbidez do Sistema Micelar Contendo PVP

Os resultados dos experimentos mostraram que o aumento da variável [PVP] isolada provoca diminuição da turbidez (efeito < 0), enquanto que o aumento da variável W/S provoca aumento dela (efeito > 0). Porém, os dois fatores [PVP] e W/S interagem entre si, e o aumento de ambas leva à diminuição da turbidez (Figura 52) (efeito < 0). O fator [CTAB] não apresenta um efeito expressivo sobre a variável turbidez e não apresenta interação significativa com os outros fatores.

A visualização do efeito de cada variável e suas interações na turbidez do sistema pode ser feita mais facilmente observando as superfícies de resposta na Figura 53. Por exemplo, na Figura 53A é possível observar que em $W/S = 40$ e $[PVP] = 120 \text{ g L}^{-1}$ obteve-se o menor valor de turbidez. A curvatura observada na superfície dos gráficos [PVP] x W/S x Turbidez indica a interação entre [PVP] x W/S. As outras superfícies não apresentam a curvatura pois o fator [CTAB] não apresenta interação significativa com as outras variáveis.

Figura 52. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos de cada variável e suas interações. O valor de $p = 0,05$ indica o nível de significância do efeito. Efeitos com $p < 0,05$ (fator CTAB e suas interações com os outros efeitos) influenciam pouco na variação da turbidez do sistema.

O aumento da [PVP] diminui a turbidez provavelmente devido à interação entre a amida do PVP, rica em elétrons, e a cabeça polar do CTAB, carregada positivamente. A razão W/S e [PVP] se relacionam pois quanto maior o valor de W/S, maior a massa de PVP adicionada, uma vez que a razão é obtida adicionando-se solução aquosa de PVP às micelas reversas.

Figura 53. Superfícies de resposta para as variáveis envolvidas. $[CTAB]$ fixa em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (A) e em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (A'); $[PVP]$ fixa em 120 g L^{-1} (B) e 80 g L^{-1} (B'); W/S fixa em 40 (C) e 20 (C').

Complexação de Íons Fe^{2+} e Fe^{3+} com a Cadeia Polimérica e sua Influência nas Micelas Reversas

A adição de FeCl_2 ou FeCl_3 à solução de PVP que será incluída no interior aquoso das micelas reversas de CTAB não altera significativamente a solubilidade do polímero no sistema micelar, mas aumenta o diâmetro das micelas, conforme Tabela 10 (o aumento é de cerca de 50% para FeCl_2 e 18% para FeCl_3).

Os íons Fe^{3+} por complexarem com PVP⁹⁶ conferem ao polímero incluído caráter de polieletrólito. A constante dessa complexação é da ordem de 10^{11} , fazendo com que a utilização do polímero como quelante na remoção e recuperação de íons de metais pesados tenha sido sugerida⁹⁶. Já para íons Fe^{2+} não há registro na literatura da sua constante de complexação com PVP, porém a complexação desse íon com compostos carbonílicos é possível, sendo que as constantes dessa complexação são menores que as constantes para complexação com Fe^{3+} (Fe^{3+} é mais duro, por isso complexa melhor com oxigênio da carbonila, base dura). A diferença entre as constantes de complexação do polímero com cada cátion também é refletida no valor final do diâmetro da micela, sendo esse 23% menor para micelas contendo PVP- Fe^{3+} .

A repulsão entre as cargas dos íons Fe^{2+} ou Fe^{3+} presos nas cadeias poliméricas pode ser responsável pelo aumento do diâmetro das micelas em comparação com o diâmetro de micelas contendo apenas PVP. Por outro lado, a

repulsão de cargas entre as cabeças polares do surfactante (positivamente carregadas) e os íons Fe^{2+} ou Fe^{3+} complexados também pode ter influência no diâmetro das micelas.

Tabela 10. Diâmetros das micelas de CTAB* antes e após a reticulação do PVP incluído.

Interior das Micelas	Diâmetro (nm)
Água	11 ± 1
PVP 100 g L^{-1}	51 ± 1
PVP $100 \text{ g L}^{-1} + \text{FeCl}_2 \text{ } 7 \text{ mmol L}^{-1}$	$78,2 \pm 0,5$
PVP $100 \text{ g L}^{-1} + \text{FeCl}_3 \text{ } 7 \text{ mmol L}^{-1}$	60 ± 6
PVP após reticulação**	$30,2 \pm 0,9$

* Micelas de CTAB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em isooctano:n-hexanol 90:10.

** reticulado pela adição de 100 mmol L^{-1} de H_2O_2 suspenso em éter às micelas contendo PVP + Fe^{2+} .

O efeito de complexação por íons de ferro também podem ser observado através do uso de PVP marcada com uma sonda fluorescente. Para tanto, foi preparado um copolímero de vinil-2-pirrolidona e 9-vinilantraceno (PVPVAnt). Através do estudo da anisotropia de fluorescência da sonda no estado estacionário puderam-se acompanhar eventos de estruturação do polímero dentro da micela.

Em água, observou-se que a solução de PVP/PVPVAnt 1:1 apresenta valores de anisotropia muito baixos ($I' = 0,041 \pm 0,007$) (Tabela 11), resultado da grande movimentação da sonda PVPVAnt. A inclusão dessa solução no interior aquoso das micelas não altera significativamente esse valor, como pode ser

observado na Tabela 11. Porém, como esperado, a adição dos íons Fe^{2+} ou Fe^{3+} provoca um aumento da anisotropia de até duas vezes, como consequência da complexação do PVP com esses cátions metálicos⁹⁶⁻⁹⁸, que restringe a mobilidade da sonda.

Tabela 11. Valores de Anisotropia para a mistura de PVP-PVPVAnt^(a) no sistema micelar.

Condição ^(b)	$I^{(c)}$
Em água deionizada	0,041±0,007
Em micelas de CTAB	0,057±0,009
Em micelas de CTAB + FeCl_2	0,09±0,01
Em micelas de CTAB + FeCl_3 ^(d)	0,10±0,02
Após a reticulação	0,260±0,007

(a) PVP:PVPVAnt 1:1 (m/m); (b) $[\text{CTAB}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, W/S = 30, $[\text{PVP}] = 100 \text{ g L}^{-1}$; (c) anisotropia; ^(d) $[\text{FeCl}_3] = 7 \text{ mmol L}^{-1}$.

O experimento de anisotropia (Tabela 11) também mostra que a complexação dos íons Fe^{2+} ou Fe^{3+} também pode gerar reticulação através de coordenação. Contudo, esse efeito é menos proeminente que a reticulação covalente gerada pela reação de Fenton.

Reticulação do Polímero Incluído nos Sistemas Micelares

Reação de Reticulação

Uma vez constatada a possibilidade da inclusão do PVP juntamente com um dos componentes do sistema Fenton (íon Fe^{2+}) procedeu-se a reticulação do PVP incluído. Para tal, foi adicionado H_2O_2 ao sistema micelar, dissolvido em éter etílico até uma concentração final na fase aquosa de 50 mmol L^{-1} . Medidas de diâmetro da micela no espalhamento dinâmico de luz mostraram que aquelas contendo apenas Fe^{2+} apresentam diâmetro maior que as micelas submetidas à reticulação pelo sistema Fenton (Figura 54), resultado da reorganização do polímero quando reticulado.

A autooxidação espontânea do Fe^{2+} pode ser retardada acidificando-se a solução de PVP com ácido acético antes da adição do Fe^{2+} , até $\text{pH} \approx 3$. A reticulação do polímero com o sistema Fenton requer apenas a presença do Fe^{2+} e do peróxido de hidrogênio. O peróxido foi adicionado ao sistema após a total dissolução. A garantia de que a adição do peróxido ocorra de forma homogênea foi conseguida com a pré-dissolução do peróxido em éter.

Figura 54. Efeito do sistema Fenton no diâmetro das micelas contendo PVP. $[\text{CTAB}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{W/S} = 30$, $[\text{PVP}] = 100 \text{ g L}^{-1}$ e $[\text{FeCl}_2] = 17 \text{ mmol L}^{-1}$.

Cinética de Reticulação

A reticulação com a reação de Fenton apresenta velocidade muito alta, o que dificulta um estudo cinético. Além disso, o produto, que se constitui no polímero reticulado, apresenta estrutura muito similar ao do polímero livre, o que dificulta o acompanhamento a reação através de suas mudanças estruturais. A formação dos íons Fe^{3+} também não é um bom parâmetro, pois sua formação não implica, necessariamente, que ocorreu reticulação.

As alterações nas propriedades mecânicas da solução²⁸ também dificultam o acompanhamento da cinética por métodos espectrofotométricos. Uma alternativa para acompanhar com maior acuidade os instantes iniciais seria usar técnicas de

medida de cinética em fluxo, o que não é possível devido à elevada viscosidade da solução inicial. O acompanhamento por medida da viscosidade dinâmica foi feito por Barros *et al.*²⁸, porém os instantes iniciais da reação foram perdidos, conforme pode ser observado na Figura 55.

Figura 55. Perfil da viscosidade dinâmica de uma solução aquosa 80 g L^{-1} submetida à reação de Fenton ($[\text{FeCl}_2] = 5 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50 \text{ mmol L}^{-1}$; tampão acetato = $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{pH} = 2,5$) (reproduzido de Barros *et al.* (2006)**Erro! Indicador não definido.**).

A reticulação do polímero dentro de micelas reversas não causa alterações significativas na viscosidade da solução, portanto é possível o uso de espectrofotometria para acompanhar a reação, no caso, acompanhou-se por espectrofluorimetria, utilizando-se a sonda PVPVAnt. Ao seguir a variação da anisotropia dessa sonda (Figura 56), é possível dizer que o polímero está em uma conformação mais fixa (reticulada) ou livre (não-reticulada), e pode-se observar o tempo mínimo necessário para que a reticulação ocorra por completo no sistema.

Figura 56. Perfil da variação da anisotropia em função do efeito de adição do H_2O_2 para a reação de Fenton.

Na Figura 56 é possível observar que a anisotropia da sonda sofre diversas variações no decorrer da reação. Nos primeiros 15 minutos a anisotropia aumenta e diminui após a adição de um novo componente, o H_2O_2 . Essa região de comportamento atípico provavelmente indica a reestruturação de todo o sistema, induzida pela adição do H_2O_2 em éter etílico. A anisotropia atinge um valor constante após 30 minutos da adição do H_2O_2 . No intervalo de tempo entre 15 e 60 minutos é possível ver com clareza o perfil da reticulação através do aumento de anisotropia da sonda, até que ela atinja um patamar, quando ocorre estabilização do valor da anisotropia.

O comportamento da anisotropia da sonda desacoplada da cadeia polimérica é diferente do perfil da sonda acoplada, permanecendo aproximadamente constante durante todo o período da reação, o que indica que a variação de

anisotropia observada no caso da reação de Fenton com a sonda presa não é causada pela degradação ou alteração da sonda fluorescente, mas sim pela reticulação das cadeias poliméricas.

A adição dos íons Fe^{2+} não afeta quimicamente a sonda fluorescente utilizada, porém a adição do H_2O_2 (para promover a reação de Fenton) pode hidroxilar o antraceno da estrutura química da sonda, o que muda as características de excitação e emissão dela (Figura 57 e Figura 58). Porém deve ser enfatizado que esta mudança não afeta as medidas de anisotropia estática, pois o produto apresenta também forte fluorescência nas mesmas condições de excitação e emissão que o resíduo 9-antracênil e, como expresso na Equação 5, quaisquer alterações na intensidade de fluorescência por causa de alterações químicas da sonda são anuladas no cálculo da anisotropia.

Figura 57. Variação da intensidade de fluorescência (sem polarização) da reação de reticulação no meio micelar contendo PVPVAnt ou PVP + antraceno livre.

Figura 58. Espectro de emissão da sonda PVPVAnt, submetida às condições da reação no sistema micelar.

Análise dos Nanogéis Obtidos

Intumescimento em água

Os nanogéis colapsados apresentam diâmetro médio de 27 ± 5 nm. Quando suspensos em água, os nanogéis contendo Fe^{3+} apresentam diâmetro de 280 ± 80 nm (por MEV, conforme Figura 59 e Figura 60) ou 262 ± 50 nm (por DLS, conforme Figura 61), que fornece uma razão de intumescimento Q de cerca de 900. Quando os íons Fe^{3+} são removidos da estrutura do nanogel o diâmetro resultante passa a ser de 360 ± 90 nm (por MEV - Figura 59 e Figura 60) ou 400 ± 90 nm (por DLS - Figura 61),

fornecendo uma razão de intumescimento Q de 2.000. Hidrogéis são considerados superabsorventes quando os valores de Q variam entre 10-1000⁹⁹.

O valor de diâmetro obtido por DLS é menor que aquele obtido por MEV para os nanogéis PVP-Fe³⁺, enquanto que, para os nanogéis PVP-sem ferro esta relação é inversa. Isso ocorre devido a efeitos de difusão induzida. A difusão é utilizada nos cálculos para a obtenção do diâmetro pelo DLS, fazendo com que se obtenham apenas diâmetros aparentes. No caso de nanogéis de PVP-Fe³⁺, carregados positivamente, a difusão de uma das partículas induz a difusão das partículas vizinhas. Assim, o movimento das partículas é mais rápido, o que causa um desvio nos dados para valores menores de diâmetro (já que partículas menores difundem mais rapidamente). No caso dos nanogéis de PVP-sem ferro, o que o equipamento detecta são as apenas as partículas, mas também a camada de solvente que ela desloca em sua movimentação, desviando os valores de diâmetro para valores maiores que o valor real.

Os macrogéis de PVP obtidos pelo mesmo método²⁸ apresentam valores de Q em torno de 23, o que é cerca de 40 e 90 vezes menor que os valores dos nanogéis de PVP com e sem Fe³⁺, respectivamente. Esses valores implicam em um enorme aumento da relação área/volume no intumescimento de um hidrogel.

Em dimensões reduzidas, onde o hidrogel está em condições coloidais, ou seja, suspenso no solvente em dimensões nanométricas, o grau de liberdade para o estiramento das cadeias poliméricas é grande. O meio o cerca por todos os lados, e

pode permeá-lo livremente. No caso de macrogéis, com baixa relação área/volume, o aumento do volume do hidrogel é limitado, devido ao menor grau de liberdade para estiramento das cadeiras poliméricas.

Comportamento superabsorvente em hidrogéis já foi observado em outros sistemas. Porém, nanogéis com razão de intumescimento da ordem obtida neste trabalho (com Q que pode atingir até 6000 em meio ácido) são inéditos na literatura. Alguns exemplos de nanogéis superabsorventes são os nanogéis casca-carço de PNIPAAm/poli(2-vinilpiridina), que apresentam intumescimento Q em torno de 1.300^{100} ; nanocápsulas de heparina (Q por volta de 1.000^{99} , intumescimento este controlado por transição térmica) e macrogéis de derivados de poliacrilamida e carragenana modificada, com intumescimento Q de 2.000^{101} e 1.500^{102} , respectivamente.

Figura 59. Imagens de MEV para (A) nanogéis de PVP colapsados, (B) nanogéis de PVP-Fe³⁺ liofilizados após intumescimento e (C) nanogéis de PVP-sem ferro liofilizados após intumescimento.

Figura 60. Distribuição de diâmetros obtidos por MEV para (A) nanogéis de PVP colapsados, (B) nanogéis de PVP-Fe³⁺ liofilizados após intumescimento e (C) nanogéis de PVP-sem ferro liofilizados após intumescimento.

Figura 61. Distribuição de diâmetros obtidos por DLS para (A) nanogel de PVP-Fe³⁺ e (B) nanogel de PVP-sem ferro.

Densidade de Reticulação

Hidrogéis com baixo nível de reticulação apresentam capacidade de absorver grandes quantidades de água (superabsorventes). Este comportamento também foi observado nos nanogéis obtidos. A questão se o comportamento superabsorvente do nanogel é produto do seu tamanho reduzido ou do baixo nível

de reticulação pode ser respondida determinando-se o valor da densidade de reticulação do nanogel, $\rho_x^{nanogel}$.

Fechine *et al.*²⁷ mostraram, para hidrogéis de PVP, uma correlação entre o valor da densidade de reticulação e anisotropia de uma sonda fluorescente conectada à rede tridimensional do hidrogel. Assim, um estudo utilizando PVPVAnt foi feito.

A partir dos dados de anisotropia da sonda PVPVAnt para o nanogel, é possível prever o valor da sua densidade de reticulação $(\rho_x^{nanogel})^{27}$. Como o valor de anisotropia obtido para o nanogel é 0,26, valor próximo ao obtido para macrogéis²⁷, tem-se que a densidade de reticulação $\rho_x^{nanogel}$ pode ser calculada como sendo aproximadamente $9 \times 10^6 \text{ mol cm}^{-3}$. Esse valor de densidade de reticulação é da mesma magnitude daquele de hidrogéis com razão de intumescimento da ordem de algumas dezenas, o que implica que a capacidade superabsortiva dos nanogéis obtidos não provém da baixa densidade de reticulação e sim da maior relação área superficial/volume dos nanogéis.

Variação da razão de Intumescimento com Força Iônica

O intumescimento das nanoesferas foi estudado por DLS, variando-se a força iônica do meio; o pH foi mantido constante e igual a 7,4, com o auxílio de tampão Tris-HCl.

No gráfico da razão de intumescimento relativa (Q/Q_0 , em que Q é o intumescimento da partícula no meio e Q_0 é o intumescimento da partícula em água) em função da concentração de sal (Figura 62) pode-se observar que o aumento da força iônica do meio induz o colapso do nanogel, tanto para o nanogel PVP-sem ferro, como para o nanogel PVP- Fe^{3+} , sendo que esse efeito é mais proeminente no último, que é positivamente carregado.

Figura 62. Variação da razão de intumescimento relativa (Q/Q_0) com a força iônica do meio.

A resposta à composição iônica do meio pode estar atrelada ao caráter de polieletrólito dos nanogéis (devido à complexação com Fe^{3+}). O efeito da força iônica é um exemplo de quão sensível pode ser o intumescimento às propriedades do meio.

Quando o nanogel intumescido em água é colocado em uma solução salina, ocorre um desequilíbrio entre a pressão osmótica dentro e fora da rede polimérica. O balanço entre a tensão das cadeias poliméricas e a pressão osmótica

criada devido à presença de contra-íons, que podem interagir com os cátions metálicos ligados à estrutura do nanogel, determina o seu intumescimento característico. Por isso, o aumento na concentração salina e, conseqüentemente, na força iônica do meio, causa o desintumescimento do hidrogel pela redução da pressão osmótica (Figura 62). O desintumescimento também ocorre com os nanogéis cujos íons Fe^{3+} foram removidos, porém com menor intensidade.

O desintumescimento foi observado também em outros sistemas de hidrogéis, não necessariamente em dimensões nanométricas. Sistemas compostos de hidrogéis derivados de poliacrilamida também desintumescem em soluções de NaCl ¹⁰¹, o mesmo ocorrendo para nanogéis casca-caroco de PNIPAAm/polivinilpiridina^{100,101}.

Estudos comparando hidrogéis de polieletrólitos e hidrogéis neutros foram feitos utilizando poli(HEMA-co-AA)¹⁰³ e derivados de poliacrilamida¹⁰⁴. Nos dois casos, os hidrogéis carregados (ionizados) apresentaram maior efeito de desintumescimento que os correspondentes neutros, o que foi justificado pelo caso, observou-se inclusive a dependência da sensibilidade do hidrogel à força iônica do meio com a concentração de cargas presentes na cadeia polimérica.

O desintumescimento, em todos os casos, é atribuído à ligação dos íons com as moléculas de água de hidratação associadas aos segmentos hidrofílicos ou hidrofóbicos, o que intensifica as interações hidrofóbicas, causando o

desintumescimento. Em outras palavras, existe uma competição pela solvatação entre os íons e o polímero.

Variação de Intumescimento com íons da série de Hofmeister

A série de íons de Hofmeister é bastante conhecida por seu efeito na solubilidade de proteínas. Takano *et al.*¹⁰⁵ observaram que o intumescimento de hidrogéis de polivinilpirrolidona também sofre influência da composição salina do meio, devido a reestruturação das moléculas de água que solvatam tanto o polímero quanto os íons. Os ânions causam o desintumescimento do hidrogel, sendo que íons como SCN^- têm menor efeito que íons como F^- , por exemplo.

Os nanogéis foram intumescidos utilizando sete diferente ânions, representando parte da série de ânions de Hofmeister, obtendo os resultados dispostos na Figura 63 (nanogéis de PVP- Fe^{3+}) e na Figura 64 (nanogéis de PVP-sem ferro).

Pode-se observar que, no gráfico da Figura 63, para ânions do tipo cosmotrópicos, o desintumescimento ocorre mais extensivamente do que em ânions caotrópicos (o efeito de *salting-out* ocorreu para todos os ânions testados), sendo que no caso dos ânions acetato e triflato acontece coagulação. Diferentemente do caso dos nanogéis de PVP-sem ferro, nos nanogéis de PVP- Fe^{3+} há um efeito da carga

que os íons conferem ao hidrogel, o que os torna mais sensíveis à desestabilização pela solvatação.

Figura 63. Variação da razão de intumescimento relativa dos nanogéis de PVP-Fe³⁺ com a série de ânions de Hofmeister.

Figura 64. Variação da razão de intumescimento relativa dos nanogéis de PVP-sem ferro com a série de ânions de Hofmeister.

O efeito de desintumescimento ocorre também nos nanogéis de PVP-sem ferro, porém esse efeito é menos acentuado. Não acontece coagulação no caso dos ânions cosmotrópicos, como observado para os nanogéis de PVP-Fe³⁺.

No estudo do efeito da adição de sal a macrogéis intumescidos de PVP, foi proposto um modelo baseado na hidratação da pirrolidona¹⁰⁵. Nesse trabalho, o íon Cl⁻ está em uma posição de ânion com efeito moderado sobre o intumescimento, o que explica a pouca alteração do intumescimento do nanogel de PVP com o aumento da concentração de sal. A série de ânions testada para os nanogéis de PVP na Figura 63 e Figura 64 concorda com esses dados da literatura¹⁰⁵.

Para esse modelo, foi proposta a existência de dois tipos de ligações de hidrogênio que poderiam interagir na solvatação: uma proveniente de moléculas de água com habilidade de aceitar pares de elétrons (*EPA - electron-pair acceptance*) e outro de moléculas com habilidade de doar pares de elétrons (*EPD - electron-pair donation*). As propriedades da água são afetadas pela presença de íons, resultando na alteração da solvatação de uma cadeia polimérica. Ânions pequenos, com alta densidade de carga, “doam” pares de elétrons - densidade de carga negativa - para a água, o que diminui a EPA da água. Assim, ocorre desestabilização da ligação de hidrogênio entre a água e a carbonila da PVP, como descrito na Figura 65, e levando ao desintumescimento do hidrogel. O efeito contrário é provocado por cátions com alta densidade de carga, que “retiram” um par de elétrons da água, aumentando a densidade de carga positiva sobre a água, incrementando a EPA e estabilizando a ligação de hidrogênio entre carbonila do polímero e molécula de água, levando a um

aumento ou manutenção do intumescimento¹⁰⁶. Assim, ânions grandes com baixa densidade de carga possuem um efeito menor sobre a água, alterando menos a sua capacidade de hidratar o polímero, conforme observado na Figura 63 e Figura 64, que mostram que os ânions como SCN^- e I^- pouco influenciam o intumescimento dos nanogéis de PVP-Fe^{3+} e PVP -sem ferro.

Figura 65. Esquemas de hidratação íon-específica da PVP. δ^+ e δ^- significam as mudanças nas cargas locais devido à interação com os íons (adaptado de Muta *et al.* (2001))¹⁰⁶.

Outros autores têm estudado essa especificidade iônica (série liotrópica de íons) sobre o intumescimento de hidrogéis, tanto neutros como com cargas. Entre os exemplos encontrados para hidrogéis neutros estão o HPMC (hidroxi-propil-metilcelulose)¹⁰⁷, cujo comportamento de transição térmica sol-gel é atribuído à

influência de ânions na estrutura da água; hidrogéis de PEO (poli(óxido de etileno))¹⁰⁸, cujo desintumescimento é pequeno com íons como Cl^- , Br^- e I^- e bastante elevado com SO_4^{2-} ; e hidrogéis de PVA (poli(álcool vinílico))¹⁰⁹, onde se observou também o desintumescimento mais proeminente em íons que interagem fortemente com a água. Exemplos para hidrogéis compostos por polieletrólitos são o poli(ácido acrílico)¹¹⁰, o ftalato de hidroxipropilcelulose¹¹¹ e caragenana modificada¹⁰². O mesmo efeito de desintumescimento foi observado nesses sistemas para a adição de diferentes ânions.

No caso da Figura 63 (nanogéis de PVP-Fe^{3+}), observa-se o desintumescimento para todos os ânions, incluindo os grandes, como o tiocianato, o nitrato e o bissulfito. No limite oposto, o desintumescimento é maior, seguido inclusive de coagulação quando se aumenta a concentração de triflato e acetato. Esse efeito não pode ser atribuído à presença de Fe^{3+} , por efeito de contra-íon, uma vez que a concentração local de íons ferro é baixa e todas as cargas desses íons complexados são blindadas a aproximadamente $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de sal.

Portanto, o efeito pode ser explicado pela interação entre água e ânion, como esclarecido anteriormente para os nanogéis de PVP-sem ferro. No caso dos nanogéis de PVP-Fe^{3+} , há necessidade de muito mais moléculas de água para solvatar o polímero, devido à carga acumulada sobre ele pela complexação com os íons Fe^{3+} . Assim, na competição entre a solvatação do sal adicionado e a do polímero, o polímero é mais sensível à perda de moléculas de água de solvatação para os ânions, provocando o desintumescimento e, em casos extremos, a total coagulação.

Como o efeito da série liotrópica de ânions não é mensurável como um valor quantitativo, sendo somente uma observação empírica, alguns desvios em relação à ordem dos ânions podem ser observados, como foi verificado para alguns ânions estudados.

A explicação do efeito de íons sobre o intumescimento/desintumescimento de um hidrogel deve também levar em consideração o efeito osmótico. Para que haja o desintumescimento, deve existir uma força motriz que faça com que a água saia do nanogel.

A influência do efeito osmótico foi observada em micropartículas de PNIPAM¹¹². No caso, a adição de polímero não-reticulado à suspensão proporcionou uma diferença de concentração. Como a cadeia polimérica livre não era capaz de permear o microgel, essa diferença foi compensada com a saída de água da estrutura do microgel, para equilibrar o potencial químico dentro e fora da estrutura gelificada.

Dado o elevado índice de intumescimento observado nos nanogéis, pode-se dizer que a maior parte da água contida na estrutura do nanogel apresenta-se na forma livre (*bulk water*), não diferenciada da água livre existente fora da nanopartícula. Portanto, como a estrutura da água dentro e fora do nanogel é a mesma, para que ocorra o desintumescimento deve existir uma diferença de concentração iônica entre a água contida no nanogel e a água externa, de forma que, por osmose, a água seja induzida a sair do nanogel (Figura 66). Essa diferença de

concentração pode ser diferente entre os ânions adicionados, o que explicaria o efeito da série liotrópica.

Por outro lado, considerando a natureza superabsorvente dos nanogéis, não há razão para que exista diferença na concentração iônica da água interna e externa, conforme exemplificado na Figura 66.

Figura 66. Esquema de intumescimento por diferença de pressão osmótica.

Destaca-se, contudo, que a água livre não é a única estrutura de água presente no nanogel, podendo existir pelo menos três tipos diferentes, conforme descrito para outros sistemas poliméricos absorventes de água: (i) água livre, (ii) intermediária e (iii) ligada ao polímero¹¹³. O transporte de íons ocorre apenas na fase livre¹¹³. Devido a fatores entrópicos, os íons são totalmente excluídos das outras fases¹¹³.

Assim, pode-se considerar que existe um gradiente de concentração iônica dentro do nanogel. Esse gradiente desloca a água intermediária e a água ligada para o volume de água livre, visando a estabilização osmótica do sistema. Com isso, há a

dessolvatação das cadeias poliméricas e o conseqüente aumento das interações hidrofóbicas entre as cadeias, que leva à diminuição do volume do nanogel, causando o desintumescimento, conforme ilustrado na Figura 67.

Figura 67. Esquema do fenômeno osmótico que ocorre dentro do nanogel.

Varição de Intumescimento com pH

O intumescimento dos nanogéis também foi estudado em função da variação de pH. Em uma primeira abordagem, o intumescimento foi feito em tampões fosfato 50 mmol L⁻¹. O valor da razão Q/Q_0 , conforme mostrado no gráfico da Figura 68, é muito baixo, o que indica que, além do efeito de pH, também observa-se o efeito da força iônica do tampão e sua afinidade pelos íons Fe³⁺. Pode-se observar que a razão Q/Q_0 é maior em meio ácido, o que indica que nesses valores de pH o nanogel tem maior diâmetro e, conseqüentemente, maior intumescimento.

Figura 68. Variação da razão de intumescimento relativa com o pH do meio em tampão fosfato.

Para evitar esse efeito, utilizou-se meio não-tamponado, cuja força iônica foi controlada com NaCl 0,1 mol L⁻¹ (nessa concentração salina, a razão Q/Q_0 é próxima de 1, conforme Figura 62), e cujo pH foi ajustado após a adição dos nanogéis com HCl ou NaOH diluído. Os resultados, dispostos na Figura 69, mostram que realmente há um efeito de aumento do intumescimento em meio ácido, que não ocorre em meio neutro ou básico, e que ocorre estabilização após pH 1,5 para o nanogel PVP-sem ferro, indicando que o nanogel atingiu seu intumescimento máximo em aproximadamente $Q = 6.000$.

Figura 69. Variação da razão de intumescimento relativa com o pH do meio em solução de NaCl 0,1 mol L⁻¹ (pH ajustado com HCl ou NaOH diluído).

O efeito de pH sobre o intumescimento do nanogel (Figura 68 e Figura 69) pode ser explicado pela protonação do grupo amida, presente na cadeia da polivinilpirrolidona, criando um acúmulo de cargas, que repelem-se mutuamente

(Esquema 7). Paralelamente, ocorre a descomplexação dos íons Fe^{3+} , por causa da competição entre Fe^{3+} e H^+ pelos grupos amida. É possível observar na Figura 69, onde se minimiza o efeito da força iônica com $\text{NaCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, sendo possível observar apenas o efeito do pH, que em pH 1 há a estabilização do intumescimento do nanogel de PVP-sem ferro e que o intumescimento do nanogel de PVP-Fe^{3+} aumenta, ficando mais próximo do intumescimento de seu análogo sem ferro. Uma explicação para este resultado é a remoção dos íons Fe^{3+} , que foi comprovada pela análise de ICP-AES (a concentração de Fe^{3+} nessa amostra é $0,12 \text{ mgFe gPVP}^{-1}$, que corresponde a 1,8% da concentração de Fe^{3+} presente no nanogel de PVP-Fe^{3+}). Como o Fe^{3+} foi removido, o intumescimento do nanogel de PVP-Fe^{3+} aproxima-se do intumescimento do nanogel de PVP-sem ferro.

Deve-se ressaltar que intumescimento de hidrogéis na magnitude alcançada ($Q = 6.000$) nunca foi reportado na literatura.

Esquema 7. (A) Esquema da reticulação resultante da complexação de íons Fe^{3+} com as cadeias poliméricas no nanogel de PVP- Fe^{3+} . (B) Esquema da protonação das cadeias poliméricas do nanogel de PVP-sem ferro.

Capacidade de Captação de Íons Metálicos

Uma das aplicações propostas para os hidrogéis é sua utilização como sistemas absorvedores de íons de metais pesados, como Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} ou Cr^{4+} , Pb^{2+} ou Pb^{4+} e Hg^{2+} , visando principalmente tornar efluentes livres desses íons¹¹⁴⁻¹¹⁶.

A possibilidade dos nanogéis de PVP em formar complexos estáveis com outras espécies iônicas metálicas, além dos íons Fe^{3+} , na qual se teria o nanogel atuando como um agente quelante de toxicidade reduzida, foi considerada inicialmente.

Para avaliar essa capacidade, alguns íons como Pb^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} e Ca^{2+} foram testados. Os nanogéis foram adicionados a soluções $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ desses íons, e, após o intumescimento, submetidos à exaustiva diálise contra água. Os nanogéis foram então liofilizados e submetidos à quantificação dos íons metálicos presentes por ICP-AES. Os resultados estão dispostos na Tabela 12.

Na Tabela 12, observa-se que a quantidade de íons residuais (retidos na estrutura do nanogel após diálise contra água) é relativamente baixa para os íons testados (exceto o íon Fe^{3+}). Por isso, os nanogéis não podem ser considerados bons agentes quelantes para remoção de íons metálicos.

Tabela 12. Quantificação dos íons complexados por ICP-AES.

Íon	mg _{íon} xg _{amostra} ⁻¹	%
Fe ³⁺	265 ± 1	26,5 ± 0,1
Pb ²⁺	0,35 ± 0,04	0,035 ± 0,004
Cu ²⁺	0,51 ± 0,02	0,051 ± 0,002
Mn ²⁺	< 1x10 ⁻⁶	<1E-07
Co ²⁺	< 2x10 ⁻⁶	<4E-07
Ca ²⁺	0,24 ± 0,01	0,024 ± 0,001

Testes in vitro

Nessa etapa, após a caracterização dos nanogéis e de seu comportamento, foi avaliada sua interação com sistemas biológicos. Para tanto, testes *in vitro* foram realizados, utilizando células do sistema imune (macrófagos) e células não fagocíticas (fibroblastos). A citotoxicidade dos nanogéis, tanto de PVP-sem ferro quanto de PVP-Fe³⁺, foi avaliada.

Testes de citotoxicidade com macrófagos e fibroblastos

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade, avaliada através da medida de viabilidade celular utilizando o teste de MTT¹¹⁷, estão dispostos na Figura 70 e na Figura 71.

O teste de MTT é um teste muito conhecido e largamente utilizado na determinação de viabilidade celular. Especificamente, o MTT (Figura 72A), cuja solução em água apresenta coloração amarela, é reduzido nas mitocôndrias (oxidoredutases mitocondriais) onde ocorre o transporte de elétrons responsável pela respiração celular¹¹⁷, ao MTT formazana (Figura 72B), que precipita no interior da célula na forma de um cristal de coloração azul, solúvel em DMSO. Essa reação ocorre apenas em células cujas mitocôndrias estejam ativas, isto é, em células vivas e viáveis. A coloração azul pode ser acompanhada por espectrofotometria UV-Vis.

Como se pode observar na Figura 70 e na Figura 71, os nanogéis não se mostraram tóxicos mesmo em altas concentrações: aproximadamente 75% de sobrevivência após 48 h em meio com nanogel 2 mg mL⁻¹. Esse resultado mostra que a aplicação dos nanogéis como sistema de liberação de fármacos ou como agente emboloterápico é viável.

Figura 70. Citotoxicidade dos nanogéis em macrófagos J773. (A) Nanogéis de PVP-Fe³⁺
(B) Nanogéis de PVP.

Figura 71. Citotoxicidade dos nanogéis em fibroblastos 3T3 L1. (A) Nanogéis de PVP-Fe³⁺ (B) Nanogéis de PVP.

Figura 72. Estruturas químicas do (A) MTT e do (B) MTT formazana.

Um detalhe que é bastante importante e deve ser ressaltado, é que a presença dos íons Fe^{3+} não influenciou significativamente na toxicidade. Íons Fe^{3+} livres são bastante tóxicos para as células, porém, nesse caso, os íons estão fortemente presos às cadeias poliméricas, não sendo, portanto, disponibilizados.

6. Conclusões

O uso da técnica de eletropulverização mostrou-se interessante na produção de micropartículas, porém, da mesma forma, não produziu o formato desejada das partículas (esférica). O método utilizado para a reticulação por reação de Fenton, em que as esferas poliméricas recém-obtidas são depositadas sobre a solução de FeCl_2 causa a deformação destas esferas. Já na produção de microgéis utilizando métodos mecânicos para a obtenção da emulsão, foi possível obter microgéis esféricos tanto pela reticulação por reação de Fenton como foto-Fenton, variando-se as condições para a obtenção de uma emulsão estável.

Os experimentos de obtenção de nanogéis utilizando vesículas como sistemas formatadores proporcionaram resultados bem promissores. Enfatiza-se o fato de que os nanogéis obtidos por esse método apresentam distribuição de valores de diâmetro de baixa dispersão, o que torna o método interessante para sua produção, apesar da perda da morfologia esférica. Além disso, com as vesículas é possível controlar a magnitude do diâmetro, possibilitando formar desde nanogéis até microgéis.

Na obtenção dos nanogéis a partir de micelas reversas, utilizou-se dois surfactantes: AOT e CTAB. Em micelas do surfactante AOT foi constatado que é possível incluir baixa quantidade de PVP. Apesar do sistema ácido acético/ H_2O_2 / $h\nu$ 254 nm permitir a reticulação de PVP em concentrações muito baixas, o sistema

AOT/n-hexano não é transparente à radiação empregada na reticulação do polímero incluído e a degradação/alteração do sistema micelar é evidente, concluindo-se que não é possível obter nanopartículas a partir dessas micelas utilizando os sistemas reticuladores propostos.

A troca por micelas de CTAB tornou possível incluir quantidade suficiente de PVP e Fe^{2+} nas micelas para a formação de nanogel utilizando a reação de Fenton. O sistema micelar permaneceu estável mesmo com a inclusão do polímero e sua reticulação, sendo que a purificação realizada foi capaz de remover todo o surfactante ao final do processo. Além disso, os nanogéis formados têm alta capacidade de intumescimento em água ($Q = 6.000$) que, além de permitir sua classificação como superabsorventes, também é um dos maiores já reportado na literatura ($Q = 2.000$), ressaltando-se que hidrogéis de PVP, tanto macrogéis quanto nanogéis, nunca foram reportados na literatura como superabsorventes. Destaca-se, também, que o intumescimento é passível de controle, tanto pela remoção dos íons complexados, como pela acidez e composição iônica do meio.

Em suma, os resultados aqui apresentados representam uma contribuição significativa para o desenvolvimento de hidrogéis micro e nanoestruturados.

7. Referências Bibliográficas

- ¹ LANGER, R.; TIRRELL, D.A. Designing materials for biology and medicine, *Nature*, 2004; 428: 487-492.
- ² LANGER, R.; PEPPAS, N.A. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology, *AIChE Journal*, 2003; 49: 2990-3006.
- ³ ZHU, C. Science-based health care, *Science*, 2010; 327: 1429.
- ⁴ BRANNON-PEPPAS, L. Biomaterials – Polymers in Controlled Drug Delivery, *Medical Plastics and Biomaterials*, 1997; 4: 34-44.
- ⁵ SIRKAR, K.; PISHKO, M.V. Amperometric Biosensors Based on Oxidoreductases Immobilized in Photopolymerized Poly(Ethylene Glycol) Redox Polymer Hydrogels, *Analytical Chemistry*, 1998; 70: 2888-2894
- ⁶ BASHIR, R.; BioMEMS: State-of-the-Art in Detection, Opportunities and Prospects, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004; 56: 1565-1568.
- ⁷ REVZIN, A.; RAJAGOPALAN, P.; TILLES, A.W.; BERTHIAUME, F.; YARMUSH, M.L.; TONER, M. Designing a Hepatocellular Microenvironment with Protein Microarraying and Poly(Ethylene Glycol) Photolithography, *Langmuir*, 2004; 20: 2999-3005.
- ⁸ REVZIN, A., TOMPKINS, R.G.; TONER, M. Surface Engineering with Poly(Ethylene glycol) Photolithography to Create High-Density Cell Arrays on Glass, *Langmuir*, 2003; 19: 9855-9862
- ⁹ PEPPAS N.A.; MIKOS, A.G. Preparation methods and structure of hydrogels. In: N.A. Peppas, Editor, *Hydrogels in Medicine and Pharmacy, Volume 1 - Fundamentals*, CRC Press, Boca Raton, FL (1986), pp. 1–26

- ¹⁰ PEPPAS, N.A.; BARR-HOWELL, B.D. Characterization of the Crosslinked Structure of Hydrogels. In: N.A. Peppas, Editor, *Hydrogels in Medicine and Pharmacy, Volume 1 - Fundamentals*, CRC Press, Boca Raton, FL (1986), pp. 27-56.
- ¹¹ PEPPAS, N.A.; KHARE, A.R. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1993; 11: 1–35.
- ¹² HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008; 60: 1638-1649.
- ¹³ HOFFMAN, A.S. Hydrogels for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002; 43: 3–12
- ¹⁴ ROSIAK J.M. *Radiation Formation of Hydrogels for Biomedical Applications*, Institute of Applied Radiation Chemistry, Technical University of Lodz, Poland.
- ¹⁵ PEPPAS, N.A.; HUANG, Y.; TORRES-LUGO, M.; WARD, J.H.; ZHANG, J. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2000; 2: 9-29.
- ¹⁶ ZRINYI, M. Intelligent polymer gels controlled by magnetic fields, *Colloid and Polymer Science*, 2000; 278: 98-103.
- ¹⁷ SHANG, J.; SHAO, Z.; CHEN, X. Electrical Behavior of a Natural Polyelectrolyte Hydrogel: Chitosan/Carboxymethylcellulose Hydrogel, *Biomacromolecules*, 2008; 9: 1208-1213.
- ¹⁸ KADLUBOWSKI, S.; HENKE, A.; ULANSKI, P.; ROSIAK, J.M. Hydrogels of polyvinylpyrrolidone (PVP) and poly(acrylic acid) (PAA) synthesized by radiation-induced crosslinking of homopolymers, *Radiation Physics and Chemistry*, 2010; 79: 261-266.

- ¹⁹ ROSIAK, J.M.; ULANSKI, P.; JANIK, I.; SLAWOMIR KADLUBOWSKI, A. (2006) *Obtaining polymeric nanogels by intramolecular crosslinking using ionizing radiation*, Pol. 4pp. PL 191664 B1 20060630 CAN 147:10661 AN 2007:637349
- ²⁰ AJJI, Z.; OTHMAN, I.; ROSIAK, J.M. Production of hydrogel wound dressings using gamma radiation, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2005; 229: 375-380.
- ²¹ LUGAO, A.B.; MACHADO, L.D.B.; MIRANDA, L.F.; ALVAREZ, M.R.; ROSIAK, J.M. Study of wound dressing structure and hydration/dehydration properties, *Radiation Physics and Chemistry*, 1998; 52: 319-322.
- ²² BACCARO, S.; PAJEWSKI, L. A.; SCOCCIA, G.; VOLPE, R.; ROSIAK, J.M. Mechanical properties of polyvinylpyrrolidone (PVP) hydrogels undergoing radiation, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 1995; 105: 100-102.
- ²³ ROSIAK, J.M. Radiation formation of hydrogels for drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 1994; 31: 9-19.
- ²⁴ ROSIAK, J.M.; OLEJNICZAK, J. Medical applications of radiation formed hydrogels, *Radiation Physics and Chemistry*, 1993; 42: 903-906.
- ²⁵ LOPERGOLO, L.C.; LUGAO, A.B.; CATALANI, L.H. Direct UV photocrosslinking of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) to produce hydrogels, *Polymer*, 2003; 44: 6217-6222.
- ²⁶ FECHINE, G.J.M.; BARROS, J.A.G.; CATALANI, L.H. Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel production by ultraviolet radiation: new methodologies to accelerate crosslinking, *Polymer*, 2004; 45: 4705-4709.

- ²⁷ FECHINE, G.J.M.; BARROS, J.A.G.; ALCANTARA, M.R.; CATALANI, L.H. Fluorescence polarization and rheological studies of the poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels produced by UV radiation, *Polymer*, 2006; 47: 2629-2633.
- ²⁸ BARROS, J.A.G.; FECHINE, G.J.M.; ALCANTARA, M.R.; CATALANI, L.H. Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels produced by Fenton reaction, *Polymer*, 2006; 47: 8414-8419.
- ²⁹ CATALANI, L.H.; FECHINE, G.J.M.; BARROS, J.A.G. (2006) *Process for production of hydrogels by crosslinking of polymers in aqueous solutions*, Braz. Pedido PI, 10pp. 2004002081 A 20060103 CAN 147:508389 AN 2007:1321228
- ³⁰ NEYENS, E.; BAEYENS, J. A Review of Classic Fenton's Peroxidation as an Advanced Oxidation Technique, *Journal of Hazardous Materials B*, 2003; 98: 33-50.
- ³¹ BELLOWS, R.J.; KING, C.J. Freeze-drying of aqueous solutions. Maximum allowable operating temperature, *Cryobiology*, 1972; 9: 559-561.
- ³² LÉGER, C.; NGUYEN, Q.T.; NÉEL, J.; STREICHER, C. Level and Kinetics of PVP Extraction from Blends, Interpenetrating Polymer Blends, and Semiinterpenetrating Polymer Networks, *Macromolecules*, 1995; 28:143-151.
- ³³ SCHENCK, H.U.; SIMAK, P.; SCHWARZ, W.; HORN, D. Structure of Povidone-Iodine, *Current Chemotherapy and Infectious Disease. Proceedings of the 11th International Congress of Chemotherapy (Meeting Date 1979)*, 1980; 1: 477-478.
- ³⁴ RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W.-E.; LIM, T.-C.; MA, Z. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, World Scientific Publishing Co Pte Ltd, Singapore, Jun 2005.

- ³⁵ FANTINI, D.; ZANETTI, M.; COSTA, L. Polystyrene microspheres and nanospheres produced by electrospray, *Macromolecular Rapid Communications*, 2006; 27: 2038-2042.
- ³⁶ CHESKO, J.; KAZZAZ, J.; UGOZZOLI, M.; O'HAGAN, D.T.; SINGH, M. An investigation of the factors controlling the adsorption of protein antigens to anionic PLG microparticles, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005; 94: 2510-2519.
- ³⁷ MOROZOV, V.N.; MOROZOVA, T.YA.; KALLENBACH, N.R. Atomic force microscopy of structures produced by electrospraying polymer solutions, *International Journal of Mass Spectrometry*, 1998; 178: 143-159.
- ³⁸ PARK, C.H.; KIM, M.Y.; YOO, J.Y.; KIM, K.-H.; LEE, J.-C.; LEE, J. Preparation of polymer/drug nano- and micro-particles by electrospraying, *Macromolecular Symposia (Advanced Polymers for Emerging Technologies)*, 2007; 249/250: 116-119.
- ³⁹ BAGHERI-TAR, F.; SAHIMI, M.; TSOTSIS, T.T. Preparation of Polyetherimide Nanoparticles by an Electrospray Technique, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2007; 46: 3348-3357.
- ⁴⁰ ZHENG, J.; HE, A.; LI, J.; XU, J.; HAN, C.C. Studies on the controlled morphology and wettability of polystyrene surfaces by electrospinning or electrospraying, *Polymer*, 2006; 47: 7095-7102.
- ⁴¹ CHAKRABORTY, S.; LIAO, I.-C.; ADLER, A.; LEONG, K.W. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009; 61: 1043-1054.
- ⁴² ALMERIA, B.; DENG, W.; FAHMY, T.M.; GOMEZ, A. Controlling the morphology of electrospray - generated PLGA microparticles for drug delivery, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010; 343: 125-133.

- ⁴³ XIE, J.; NG, W.J.; LEE, L.Y.; WANG, C.-H. Encapsulation of protein drugs in biodegradable microparticles by co - axial electrospray, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008; 317: 469-476.
- ⁴⁴ HAO, X.; LU, X.; LI, Z.; ZHAO, Y.; SHANG, T.; YANG, Q.; WANG, C.; LI, L. Effects of the electrospray ionization parameters on the formation and morphology of colloidal microspheres of polyacrylonitrile, *Journal of Applied Polymer Science*, 2006; 102: 2889-2893.
- ⁴⁵ PARK, C.H.; LEE, J. Electrosprayed Polymer Particles: Effect of the Solvent Properties, *Journal of Applied Polymer Science*, 2009; 114: 430–437.
- ⁴⁶ YAOA, J.; LIMA, L.K.; XIEA, J.; HUAB, J.; WANG, C.-H. Characterization of electrospraying process for polymeric particle fabrication, *Journal of Aerosol Science*, 2008; 39: 987 –1002
- ⁴⁷ GU, W.; HEIL, P.E.; CHOI, H.; KIM, K. Comprehensive model for fine Coulomb fission of liquid droplets charged to Rayleigh limit, *Applied Physics Letters*, 2007; 91: 064104/1-064104/3.
- ⁴⁸ RANGANATH, S.H.; KEE, I.; KRANTZ, W.B.; CHOW, P.K.-H.; WANG, C.-H. Hydrogel Matrix Entrapping PLGA-Paclitaxel Microspheres: Drug Delivery with Near Zero-Order Release and Implantability Advantages for Malignant Brain Tumour Chemotherapy, *Pharmaceutical Research*, 2009; 26: 2101-2114.
- ⁴⁹ SINGH, M.; KAZAZ, J.; CHESKO, J.; SOENAWAN, E.; UGOZZOLI, M.; GIULIANI, M.; PIZZA, M.; RAPPOULI, R.; O'HAGAN, D.T. Anionic Microparticles are a Potential Delivery System for Recombinant Antigens from *Neisseria meningitidis* Serotype B, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004; 93: 273-282.

- ⁵⁰ CASCONI, M.G.; LAZZERI, L.; CARMIGNANI, C.; ZHU, Z. Gelatin Nanoparticles Produced by a Simple W/O Emulsion as Delivery System for Methotrexate, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2002; 13: 523-526.
- ⁵¹ KURKURI, M.D.; AMINABHAVI, T.M. Poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) sequential interpenetrating network pH-sensitive microspheres for the delivery of diclofenac sodium to the intestine, *Journal of Controlled Release*, 2004; 96: 9-20.
- ⁵² SAFRANJ, A.; KANO, S.; YOSHIDA, M.; OMICHI, H.; KATAKAI, R.; SUZUKI, M. Functional polymeric microspheres synthesized by radiation polymerization, *Radiation Physics and Chemistry*, 1995; 46: 203-206.
- ⁵³ 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*, 1998; 56: 149-158.
- ⁵⁴ MA, G.H.; FUKUTOMI, T. Studies on the preparation and characterization of poly(4-vinylpyridine) microgel. I. Preparation with polymer emulsifier, *Journal of Applied Polymer Science*, 1991; 43: 1451-1457.
- ⁵⁵ KAMIJO, Y.; FUJIMOTO, K.; KAWAGUCHI, H.; YUGUCHI, Y.; URAKAWA, H.; KIIWARA, K. Preparation and structural characterization of hydrogel microspheres, *Polymer Journal*, 1996; 28: 309-316.
- ⁵⁶ LANDFESTER, K.; WILLERT, M.; ANTONIETTI, M. Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions, *Macromolecules*, 2000; 33: 2370-2376.
- ⁵⁷ LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H.; FUKUMORI, Y.; PEPPAS, N.A. Monodisperse nanoparticles of poly(ethylene glycol) macromers and N-isopropyl

acrylamide for biomedical applications, *Journal of Applied Polymer Science*, 2003; 87: 1678-1684.

- ⁵⁸ HU, Z.B.; XIA, X.H. Hydrogel nanoparticle dispersions with inverse thermoreversible gelation, *Advanced Materials*, 2004; 16: 305-309.
- ⁵⁹ PANYAN, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003; 55: 329-347.
- ⁶⁰ OTSUKA, H.; NAGASAKI, Y.; KATAOKA, K. PEGlated Nanoparticles for Biological and Pharmaceutical Applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003; 55: 403-419.
- ⁶¹ TAO, S.L.; DESAI, T.A. Microfabricated Drug Delivery Systems: from Particles to Pores, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003; 55: 315-328.
- ⁶² MORTARA, R.A. *Formação e Propriedades de Vesículas de Anfifílicos Sintéticos*, Dissertação de Mestrado, São Paulo, 1980, págs. 2-5, 12.
- ⁶³ CUCCOVIA, I.M. *Reações em Vesículas de Anfifílicos Sintéticos*, Tese de Livre Docência, São Paulo, 1982, págs. 4-6.
- ⁶⁴ SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomas: A Bala Mágica Acertou?, *Química Nova*, 2002; 25: 1181-1185.
- ⁶⁵ HORWITZ, C.; KRUT, L.; KAMINSKY, L.S. Emulsifying properties of egg yolk phosphatidylcholine, *Lipids*, 1972; 7: 234-239.
- ⁶⁶ MAXIMIANO, F.A.; DA SILVA, M.A.; DAGHASTANLI, K.R.P.; DE ARAUJO, P.S.; CHAIMOVICH, H.; CUCCOVIA, I.M. A Convenient Method For Lecithin Purification From Fresh Eggs, *Química Nova*, 2008; 31: 910-913.

- ⁶⁷ ROUSER, G., FLEISCHER, S., AND YAMAMOTO, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots, *Lipids*, 1970; 5: 494-496.
- ⁶⁸ DOMINAK, L.M., KEATING, C.D. Polymer Encapsulation Within Giant Lipid Vesicles, *Langmuir*, 2007; 23: 7148-7154.
- ⁶⁹ PALACIOS, L.E.; WANG, T. Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2005; 82: 571-578.
- ⁷⁰ NAGARAJAN, R.; RUCKENSTEIN, E. Aggregation of amphiphiles as micelles or vesicles in aqueous media, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1979; 71: 580-604.
- ⁷¹ DOMINAK, L.M.; KEATING, C.D. Macromolecular Crowding Improves Polymer Encapsulation within Giant Lipid Vesicles, *Langmuir*, 2008; 24: 13565-13571.
- ⁷² SZOKA, F., JR.; PAPAHA DJOPOULOS, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes), *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 1980; 9: 467-508.
- ⁷³ LASIC, D.D. The mechanism of vesicle formation, *Biochemical Journal*, 1988; 256: 1-11.
- ⁷⁴ SITARAMAM, V.; MATHAI, J.C.; RAO, N.M.; BLOCK, L.H. Hydrogen peroxide permeation across liposomal membranes: a novel method to assess structural flaws in liposomes, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1989; 91: 91-97.
- ⁷⁵ SCHILLEMANS, J.P.; FLESCHE, F.M.; HENNINK, W.E.; VAN NOSTRUM, C.F. Synthesis of Bilayer-Coated Nanogels by Selective Cross-Linking of Monomers inside Liposomes, *Macromolecules*, 2006; 39: 5885-5890.

- ⁷⁶ KAZAKOV, S.; KAHOLEK, M.; TERAOKA, I.; LEVON, K. UV-Induced Gelation on Nanometer Scale Using Liposome Reactor, *Macromolecules*, 2002; 35: 1911-1920.
- ⁷⁷ KAZAKOV, S.; LEVON, K. Liposome-nanogel structures for future pharmaceutical applications, *Current Pharmaceutical Design*, 2006; 12: 4713-4728.
- ⁷⁸ KAZAKOV, S.; KAHOLEK, M.; KUDASHEVA, D.; TERAOKA, I.; COWMAN, M.K.; LEVON, K. Poly(N-isopropylacrylamide-co-1-vinylimidazole) hydrogel nanoparticles prepared and hydrophobically modified in liposome reactors: Atomic force microscopy and dynamic light scattering study, *Langmuir*, 2003; 19: 8086-8093.
- ⁷⁹ VAN THIENEN, T.G.; LUCAS, B.; FLESCHE, F.M.; NOSTRUM, C.F.; DEMEESTER, J.; DE SMEDT, S.C. On the synthesis and characterization of biodegradable dextran nanogels with tunable degradation properties, *Macromolecules*, 2005; 38: 8503-8511.
- ⁸⁰ JESORKA, A.; MARKSTROEM, M.; KARLSSON, M.; ORWAR, O. Controlled Hydrogel Formation in the Internal Compartment of Giant Unilamellar Vesicles, *Journal of Physical Chemistry B*, 2005; 109: 14759-14763.
- ⁸¹ JESORKA, A.; MARKSTROEM, M.; ORWAR, O. Controlling the Internal Structure of Giant Unilamellar Vesicles by Means of Reversible Temperature Dependent Sol-Gel Transition of Internalized Poly(N-isopropyl acrylamide), *Langmuir*, 2005; 21: 1230-1237.
- ⁸² MARKSTROEM, M.; GUNNARSSON, A.; ORWAR, O.; JESORKA, A. Dynamic microcompartmentalization of giant unilamellar vesicles by sol-gel transition and temperature induced shrinking/swelling of poly(N-isopropyl acrylamide), *Soft Matter*, 2007; 3: 587-595.

- ⁸³ DOBRETISOV, G.E.; BORSCHEVSKAYA, T.A.; PETROV, V.A.; VLADIMIROV, Y.A. The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation, *FEBS Letters*, 1977; 84: 125-128.
- ⁸⁴ CAMPILLO, C.; PEPIN-DONAT, B.; VIALLAT, A. Responsive viscoelastic giant lipid vesicles filled with a poly(N-isopropylacrylamide) artificial cytoskeleton, *Soft Matter*, 2007; 3: 1421-1427.
- ⁸⁵ KREMER, S.; CAMPILLO, C.; PEPIN-DONAT, B.; VIALLAT, A.; BROCHARD-WYART, F. Nanotubes from gelly vesicles, *EPL*, 2008; 82: 48002/1-48002/5.
- ⁸⁶ SHAW, D.J. *Introdução à Química de Colóides e de Superfícies*, tradução: Juergen Heinrich Maar, São Paulo, Edgard Blücher, Ed. Da Universidade de São Paulo, 1975, 185 pp.
- ⁸⁷ BHARALI, D.J.; SAHOO, S.K.; MOZUMDAR, S.; MAITRA, A. Crosslinked polyvinylpyrrolidone nanoparticles as a potential carrier for hydrophilic drugs, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003; 258: 415-423.
- ⁸⁸ LUAN, Y.; XU, G.; DAI, G.; SUN, Z.; LIANG, H. The interaction between poly(vinylpyrrolidone) and reversed micelles of water/AOT/n-heptane, *Colloid and Polymer Science*, 2003; 282: 110-118.
- ⁸⁹ CORREIA, V.R.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. Effect of hexadecyltrimethylammonium bromide micelles on the hydrolysis of substituted benzoate esters, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 1991; 4: 13-18.
- ⁹⁰ DE, T.K.; MAITRA, A. Solution behavior of Aerosol OT in non-polar solvents, *Advances in Colloid and Interface Science*, 1995; 59: 95-193.

- ⁹¹ FENDLER, J.H. *Membrane Mimetic Chemistry: Characterizations and Applications of Micelles, Microemulsions, Monolayers, Bilayers, Vesicles, Host-Guest Systems, and Polyions*, New York, John Wiley and Sons, 1982, 522 pp.
- ⁹² CUCCOVIA, I.M.; DIAS, L.G.; MAXIMIANO, F.A.; CHAIMOVICH, H. Analysis of Bromide Ion Distribution in the Water Pool of Reverse Micelles of Hexadecyltrimethylammonium Bromide in Chloroform/n-Dodecane and Isooctane/n-Hexanol by Chemical Trapping, *Langmuir*, 2001; 17:1060-1068.
- ⁹³ BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, Editora da Unicamp, 2001.
- ⁹⁴ VALEUR, B. *Molecular fluorescence: principles and application* (2nd ed), Wiley, NY, USA (2002).
- ⁹⁵ BANERJEE, D.; KUMAR, P.A.; KUMAR, B.; MADHUSOODANAN, U.K.; NAYAK, S.; JACOB, J. Determination of Absolute Hydrogen Peroxide Concentration by Spectrophotometric Method, *Current Science*, 2002; 83:1193-1194.
- ⁹⁶ ÇAYKARA, T.; INAM, R.; ÖEZTÜERK, Z.; GÜEVEN, O. Determination of the complex formation constants for some water-soluble polymers with trivalent metal ions by differential pulse polarography, *Colloid and Polymer Science*, 2004; 282: 1282-1285.
- ⁹⁷ LIU, M.; YAN, X.; LIU, H.; YU, W. An investigation of the interaction between polyvinylpyrrolidone and metal cations, *Reactive & Functional Polymers*, 2000; 44: 55-64.
- ⁹⁸ BIEDERMANN, H.G.; GRAF, W. Metal complexes with polymeric ligands. XI. Reactions of metal carbonyls with poly-1-vinyl-2-pyrrolidinone, *Zeitschrift fuer Naturforschung, Teil B: Anorganische Chemie, Organische Chemie*, 1975; 30: 226-228.

- ⁹⁹ CHOI, S.H.; LEE, J.-H.; CHOI, S.-M.; PARK, T. G. Thermally Reversible Pluronic/Heparin Nanocapsules Exhibiting 1000-Fold Volume Transition, *Langmuir*, 2006; 22: 1758-1762.
- ¹⁰⁰ KUCKLING, D.; VO, C.D.; WOHLRAB, S.E. Preparation of nanogels with temperature-responsive core and pH-responsive arms by photo-crosslinking, *Langmuir*, 2002; 18: 4263-4269.
- ¹⁰¹ OKAY, O.; SARIISIK, S.B.; ZOR, S.D. Swelling behavior of anionic acrylamide-based hydrogels in aqueous salt solutions: comparison of experiment with theory, *Journal of Applied Polymer Science*, 1998; 70: 567-575.
- ¹⁰² HOSSEINZADEH, H.; POURJAVAVDI, A.; ZOHURIAAN-MEHR, M.J. Modified carrageenan. 2. Hydrolyzed crosslinked kappa-carrageenan-g-PAAm as a novel smart superabsorbent hydrogel with low salt sensitivity, *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 2004; 15: 1499-511.
- ¹⁰³ KHARE, A.R.; PEPPAS, N.A. Swelling/deswelling of anionic copolymer gels, *Biomaterials*, 1995; 16: 559-567.
- ¹⁰⁴ BAKER, J.P.; STEPHENS, D.R.; BLANCH, H.W.; PRAUSNITZ, J.M. Swelling equilibria for acrylamide-based polyampholyte hydrogels, *Macromolecules*, 1992; 25: 1955-1958.
- ¹⁰⁵ TAKANO, M.; OGATA, K.; KAWAUCHI, S.; SATOH, M.; KOMIYAMA, J. Ion-specific swelling behavior of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) gel: correlations with water hydrogen bond and non-freezable water, *Polymer Gels and Networks*, 1998; 6: 217-232.
- ¹⁰⁶ MUTA, H.; KOJIMA, R.; KAWAUCHI, S.; TACHIBANA, A.; SATOH, M. Ion-specificity for hydrogen-bonding hydration of polymer: an approach by ab initio molecular orbital calculations, *THEOCHEM*, 2001; 536: 219-226.

- ¹⁰⁷ LIU, S. Q.; JOSHI, SUNIL C.; LAM, Y. C. Effects of salts in the Hofmeister series and solvent isotopes on the gelation mechanisms for hydroxypropylmethylcellulose hydrogels, *Journal of Applied Polymer Science*, 2008; 109: 363-372.
- ¹⁰⁸ MASUDA, Y.; NAKANISHI, T. Ion-specific swelling behavior of poly(ethylene oxide) gel and the correlation to the intrinsic viscosity of the polymer in salt solutions, *Colloid and Polymer Science*, 2002; 280: 547-553.
- ¹⁰⁹ MASUDA, Y.; OKAZAKI, Y.; NAKANISHI, T. Ion-specific swelling behavior of poly(vinyl alcohol) gel in aqueous solutions containing some divalent ions, *Colloid and Polymer Science*, 2002; 280: 873-875.
- ¹¹⁰ MUTA, H.; KAWAUCHI, S.; SATOH, M. Ion-specific swelling behavior of uncharged poly(acrylic acid) gel, *Colloid and Polymer Science*, 2003; 282: 149-155.
- ¹¹¹ XU, L.; YUE, Z.; WANG, M.; ZHAI, M.; YOSHII, F.; SEKO, N.; PENG, J.; WEI, G.; LI, J. Radiation effects on hydroxypropyl methylcellulose phthalate in aqueous system, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2007; 265: 394-398.
- ¹¹² SAUNDERS, B.R.; VINCENT, B. Microgel particles as model colloids: theory, properties and applications, *Advances in Colloid and Interface Science*, 1999; 80: 1-25.
- ¹¹³ WISNIEWSKI, S.; KIM, S. W. Permeation of water-soluble solutes through poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and poly(2-hydroxyethyl methacrylate) crosslinked with ethylene glycol dimethacrylate, *Journal of Membrane Science*, 1980; 6: 299-308.
- ¹¹⁴ BAILEY, S.E.; OLIN, T.J.; BRICKA, R.M.; ADRIAN, D.D. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals, *Water Research*, 1999; 33: 2469-2479.

- ¹¹⁵ XIE, J.; LIU, X.; LIANG, J. Absorbency and adsorption of poly(acrylic acid-co-acrylamide) hydrogel, *Journal of Applied Polymer Science*, 2007; 106: 1606-1613.
- ¹¹⁶ KATIME, I.; RODRIGUEZ, E. Absorption of metal ions and swelling properties of poly(acrylic acid-co-itaconic acid) hydrogels, *Journal of Macromolecular Science, Pure and Applied Chemistry*, 2001; A38: 543-558.
- ¹¹⁷ BERRIDGE MV, HERST PM, TAN AS, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction, *Biotechnology Annual Review*, 2005; 11: 127-152.

Anexos

Lista de Anexos

Anexo1. Caracterização da Lecitina de Soja

Anexo 2. Sumula Curricular da Autora

Anexo 1. Caracterização da Lecitina de Soja

Espectro de massas da fração 12. (a) espectro inteiro e (b) ampliação do pico m/z 782,6.

Espectro de ^1H RMN, da fração 12. (A) Estrutura contendo os tipos de hidrogênio (de 1 a 17); (B) Espectro inteiro atribuído; (C) e (D)

Ampliações de regiões do espectro.

Espectro de ^{13}C RMN, da fração 12. (A) Estrutura contendo os tipos de carbono (de 1 a 18); (B) Espectro inteiro atribuído; (C), (D) e (E) Ampliações de regiões do espectro.

Anexo 2. Súmula Curricular da Autora

Vânia Aparecida Blasques Bueno

Nascimento 10/11/1982 - São Paulo/SP - Brasil

Formação Acadêmica/Titulação

- 2005 – Presente** Doutorado em Química Orgânica.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Produção de Hidrogéis Nanoestruturados e
Microestruturados
Orientador: Luiz Henrique Catalani
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São
Paulo - FAPESP
- 2001 - 2004** Graduação em Química.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Estudo da Demetilação Oxidativa da Melatonina Catalisada
por Peroxidase de Raiz Forte
Orientador: Luiz Henrique Catalani
Bolsista do: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
do CNPq – PIBIC/CNPq

Atuação profissional

Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2005 - Atual Aluno de Doutorado , Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva, bolsista FAPESP

2001 - 2004 Aluno de Iniciação Científica , Carga horária: 8, Regime: Dedicação Exclusiva, bolsista PIBIC

Prêmios e títulos

2005 Diploma de Melhor Aluno do Curso de Bacharelado com Atribuições Tecnológicas, Conselho Regional de Química - IV Região

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. CASARANO, R.; BENTINI, R.; BUENO, V.B.; IACOVELLA, T.; MONTEIRO, F.B. F.; IHA, F.A.S.; CAMPA, A.; PETRI, D.F.S.; JAFFE, M.; CATALANI, L.H. Enhanced fibroblast adhesion and proliferation on electrospun fibers obtained from poly(isosorbide succinate-b-L-lactide) block copolymers, *Polymer*, 2009; 50: 6218-6227.
2. BUENO, V.B.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H.; CATALANI, L.H. PVP superabsorbent nanogels, *Colloid and Polymer Science*, 2009; 287: 705-713.
3. BUDU, A.; PERES, R.; BUENO, V.B.; CATALANI, L.H.; GARCIA, C.R.S. N1 - acetyl - N2 - formyl - 5 - methoxykynuramine modulates the cell cycle of malaria parasites, *Journal of Pineal Research*, 2007; 42: 261-266.
4. XIMENES, V.F.; RODRIGUES, A.P.; CABELLO, C.; DE MENEZES, M.L.; FERNANDES, J.R. The co- catalytic effect of chlorpromazine on peroxidase-mediated oxidation of melatonin: enhanced production of N1 - acetyl - N2 - formyl - 5 -

methoxykynuramine, *Journal of Pineal Research*, 2008; 44: 115-120.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BUENO, V. B.; DAGHASTANLI, K. R. P.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H.; CATALANI, L.H. Sub-micrometric particles of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel formatted by lecithin vesicles In: 2nd International Congress on BIOHYDROGELS, 2009, Viareggio (IT) Book of Abstracts, 2009.

2 BUENO, V. B.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H.; CATALANI, DLS Study of the Swelling of PVP Nanogels Obtained by Fenton Reaction In: 2nd French-Brazilian Meeting on Polymers - FBPol, 2008, Florianópolis, Abstracts, 2009.

3. BUENO, V. B., CATALANI, L.H. Production of PVP Microgels from Reverse Emulsions by Photo-Fenton Reaction In: VII Encontro da Sociedade Brasileira de Materiais - SBPMat, 2008, Guarujá. VII Encontro da Sociedade Brasileira de Materiais - SBPMat. , 2008.

4. SILVA, C. S., BUENO, V. B., CATALANI, L.H. Microgels of Polyvinylpyrrolidone Produced by Fenton Reaction In: 8º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2005, Águas de Lindóia. CBPol. , 2005.

5. BUENO, V. B.; BUDU, A.; PERES, R.; GARCIA, C.R.S.; CATALANI, L.H. Análise dos Metabólitos de Melatonina pelo Plásmódio Causador da Malária In: 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2004, São Paulo. CD Rom do 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. , 2004.

6. BUENO, V. B., XIMENES, V.F., CATALANI, L.H., CAMPA, A. Estudo da De-Metilação

Oxidativa da Melatonina Catalisada por Peroxidase de Raiz Forte In: 11º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2003, São Carlos. CD Rom do 11º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. , 2003.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. BUENO, V. B., Cuccovia, I.M., Chaimovich, H., Catalani, L.H. Estudo de Intumescimento de Nanogéis de Poli(N-vinil-2-pirrolidona) In: 32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 32a RASBQ, 2009, Fortaleza. Livro de Resumos. , 2009.
 2. BUENO, V. B., Cuccovia, I.M., Chaimovich, H., Catalani, L.H. Obtenção de Nanogéis de Poli(N-vinil-2-pirrolidona) Utilizando Micelas Reversas de CTAB In: 31a Reunião Anual da SBQ, 2008, Águas de Lindóia/SP. Livro de Resumos da 31a Reunião Anual da SBQ. , 2008.
 3. BUENO, V. B., FOGACA, R., CATALANI, L.H. Hydrogel Microspheres Produced by Electrospray In: International Congress on BioHydrogels, 2007, Viareggio. International Congress on BioHydrogels. , 2007.
 4. BUENO, V. B., MANSANO, R. D., CATALANI, Luiz Henrique Microestampas de Hidrogel de PVP Produzidas por Fotolitografia em Superfícies Inertes In: 9º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2007, Campina Grande - PB. Anais do 9º Congresso Brasileiro de Polímeros. , 2007.
-

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) 32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 32a RASBQ, 2009. (Congresso) Estudo de Intumescimento de Nanogéis de Poli(N-vinil-2-pirrolidona).
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) 2nd International Congress on BIOHYDROGELS, 2009. (Congresso) Sub-micrometric particles of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel formatted by lecithin vesicles.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) 2nd French-Brazilian Meeting on Polymers 2008 - FBPol 2008, 2008. (Congresso) DLS Study of the Swelling of PVP Nanogels Obtained by Fenton Reaction.
4. Apresentação Oral no(a) 31a Reunião Anual da SBQ, 2008. (Congresso) Obtenção de Nanogéis de Poli(N-vinil-2-pirrolidona) Utilizando Micelas Reversas de CTAB.
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) VII Encontro da Sociedade Brasileira de Materiais - SBPMat, 2008. (Encontro) Production of PVP Microgels from Reverse Emulsions by Photo-Fenton Reaction.
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) 9º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2007. (Congresso) Microestampas de Hidrogel de PVP Produzidas por Fotolitografia em Superfícies Inertes.
7. Apresentação de Poster / Painel no(a) 8º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2005. (Congresso) Microgéis de Polivinilpirrolidona Produzidos por Reação de Fenton.

8. Apresentação de Poster / Painel no(a) 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2004. (Simpósio) Análise dos Metabólitos de Melatonina pelo Plásmódio Causador da Malária.

9. Apresentação de Poster / Painel no(a) 11º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2003. (Simpósio) Estudo da De-Metilação Oxidativa da Melatonina Catalisada por Peroxidase de Raiz Forte.

Citações em bases bibliográficas

Web of Science Número total de citações: 21; Número de trabalhos: 4

Data: 31/05/2010; Fator H: 2; Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações: BUENO VB

Disciplinas Cursadas no Doutorado

Disciplina	Créditos	Conceito
Conceitos em Química Orgânica Avançada	8	A
Conceitos Básicos de Espectroscopia	8	A
Mecanismos das Reações Orgânicas	8	A
Biomoléculas e Superfícies	10	A
Técnicas de Determinação Estrutural	8	A
Microscopia Eletrônica I (Instituto de Física - Universidade de São Paulo)	12	A
Seminários Gerais de Química Orgânica Seminário Apresentado: "Sistemas de liberação controlada de fármacos"	3	A
Microscopia Eletrônica II (Instituto de Física - Universidade de São Paulo)	12	A
A Arte de Escrever Manuscritos Científicos	4	A
Biomateriais	4	A
Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	2	A
Princípios Físico-Químicos de Sistemas Biomiméticos	12	OUVINTE
Química de Colóides Formados por Autoassociação	4	OUVINTE