

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

THIAGO ANTONIO VIEIRA

Síntese e caracterização de copolímeros baseados em pululana para produção de partículas autoagregáveis como potenciais agentes de encapsulação de fármacos

Lorena

2023

THIAGO ANTONIO VIEIRA

Síntese e caracterização de copolímeros baseados em pululana para produção de partículas autoagregáveis como potenciais agentes de encapsulação de fármacos

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Talita Martins Lacerda

Versão Corrigida

Lorena
2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Vieira, Thiago Antonio

Síntese e caracterização de copolímeros baseados em pululana para produção de partículas autoagregáveis como potenciais agentes de encapsulação de fármacos / Thiago Antonio Vieira; orientador Talita Martins Lacerda - Versão Corrigida. - Lorena, 2023.
172 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2023

1. Pululana. 2. Copolímeros de enxertia. 3. Copolímeros anfifílicos. 4. Partículas autoagregáveis. 5. Encapsulação de fármacos. I. Título. II. Lacerda, Talita Martins, orient.

Dedico este trabalho aos meus amados pais,
Marlene e Amarildo, como agradecimento
por todo amor, incentivo, apoio,
e por me inspirarem sempre.

AGRADECIMENTOS

À Escola de Engenharia de Lorena e à Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do doutorado e também na figura de seus professores, técnicos, e demais funcionários pelo apoio ao longo destes anos, em especial a Bia, André, Sandra, Rita e Ludmila, por todo apoio, gentileza e eficiência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de demanda social, cujo auxílio foi indispensável para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Talita Martins Lacerda, pela amizade, pela oportunidade de participar deste projeto, pelas conversas, por acreditar em mim e me apoiar sempre, por estimular minha curiosidade científica, por me ajudar a evoluir como pesquisador, pela liberdade e confiança depositadas em mim e por acender novamente este sonho no meu coração.

À Profa. Dra. Simone F. Medeiros Sampaio por me acolher no LabPBio e apoiar a realização deste projeto, pelas discussões científicas, pelo apoio e incentivo, pela amizade e por me ajudar a evoluir como pesquisador.

À MSc. Gizelda Maria Alves pela amizade, companheirismo, pelas conversas científicas e por me ajudar a ver a vida de uma forma mais leve, me incentivar e ao mesmo tempo por me ensinar tanto sobre profissionalismo e sobre a vida.

Ao Prof. Dr. Amilton Martins dos Santos e ao LabPol pelo apoio na realização das análises de DLS, DSC e AFM e pela infraestrutura para que eu pudesse realizar parte do meu trabalho. Ao Laboratório de Plasma da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG/UNESP) pelo auxílio na realização das análises de FTIR-ATR.

Aos Profs. Dra. Jayne Carlos de Souza Barboza e Dr. Antonio Aarão Serra pela amizade, pelas discussões científicas, pelo auxílio na realização de parte das análises de FTIR e RMN deste trabalho, pela leitura deste e de tantos outros trabalhos, por sempre acreditarem em mim, me apoiarem e por serem exemplos de gentileza e humanidade.

À MSc. Layde Teixeira de Carvalho e à MSc. Bruna Green Rodrigues pela amizade, por toda ajuda, incentivo e apoio, pelos cafés, conversas, risadas e por me ajudarem a evoluir como pesquisador. A dedicação, perseverança e garra de vocês me inspiram!

Aos meus amigos e companheiros de laboratório no LabPBio e LabPol, Gizelda, Júlia, Layde, Laura, Lilian, Maria Thereza, Maryana, Milena, Polyana, Willian, Ana Júlia, Atefe, Gabriel, Gabriela, Rodolfo, Tatiane, pela amizade, pelos nossos cafés (os melhores!), por me incentivarem e me apoiarem, em especial à Laura Matos, que trabalhou arduamente comigo neste projeto. Compartilhar esse período trabalhando ao lado de vocês foi um privilégio, vocês estarão sempre nas minhas melhores lembranças!

À Profa. Dra. Elisângela Moraes, ao Evaldo, à Vivian, ao Jonnes, ao Zé Mário, pelos maravilhosos momentos no Cotel, pela oportunidade de participar em momentos diferentes ao longo de 3 anos, como professor de inglês e estagiário, das atividades neste colégio que é tão especial, por me acolherem com tanto carinho, pela amizade, pelas conversas, por me apoiarem sempre e enxergarem e despertarem o melhor em mim.

Ao Cotel e seus alunos, professores, funcionários, e aos meus amigos do curso de letras, Heloísa, Isabel e Ricardo, por me ajudarem a moldar meu sonho de ser professor, por me mostrarem que a luta por educação pública de qualidade vale a pena e por me inspirarem a seguir uma segunda carreira como linguista.

Aos meus amados pais, Marlene e Amarildo, e queridos irmãos, Bonnie e William, pelo amor e apoio incondicionais, por me darem força, mesmo à distância, pelo exemplo de luta e persistência. Agradeço a Deus todos os dias por ter cuidado de vocês, especialmente durante a pior fase da pandemia de COVID-19 (2020-2022), e permitir que eu pudesse dividir essa imensa alegria de concluir o doutorado que um dia pareceu um sonho tão distante.

À minha avó Maria, à minha avó Perciliana (in memoriam) e ao meu avô Moacir (in memoriam), pelo amor, pelas lindas recordações, por ajudarem a moldar quem eu sou hoje e por me inspirarem desde muito pequeno a persistir.

Aos meus grandes amigos, André, Bruno G., Bruno S., Heitor, Ian, Luiza, Thiago, Vinícius, e ao meu namorado, Miguel, por me darem força, cuidarem de mim e serem minha família. Vocês ajudaram a tornar tudo possível! Não tenho palavras suficientes para expressar meu amor e carinho por cada um.

A Deus, por cuidar de mim ao longo destes 5 anos e me dar forças nos momentos mais desafiadores e atribulados desta jornada.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste projeto.

"Change is the constant, the signal for rebirth, the egg of the phoenix"
(A mudança é uma constante, o sinal para o renascimento, o ovo da fênix)

Christina Baldwin

RESUMO

VIEIRA, T. A. **Síntese e caracterização de copolímeros baseados em pululana para produção de partículas autoagregáveis como potenciais agentes de encapsulação de fármacos**. 2023. 172 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

O principal propósito de sistemas de liberação controlada de ingredientes ativos é melhorar propriedades físico-químicas limitantes de fármacos, como baixa solubilidade em meio fisiológico, aumentando sua biodisponibilidade ao mesmo tempo em que reduz seus possíveis efeitos colaterais melhorando sua eficiência. O desenvolvimento de novas tecnologias de carreadores que possibilitem aumentar a solubilidade e permeabilidade de fármacos é altamente desejável. A encapsulação em carreadores apropriados permite um maior controle sobre a cinética de liberação do fármaco, uma vez que as estruturas podem ser modificadas de forma a modular a liberação, sendo a modificação por enxertia uma das possíveis rotas. Neste contexto, a modificação de polímeros naturais – especialmente polissacarídeos (e seus derivados) – como a pululana, que é biodegradável e biocompatível, vêm sendo estudados para aplicação farmacêutica e biomédica. No presente trabalho, foram produzidos copolímeros anfifílicos baseados em pululana via enxertia de PZLL e PEG. Estes copolímeros são capazes de formar partículas do tipo casca hidrofílica/núcleo hidrofóbico por autoagregação em água e que podem ser utilizadas na encapsulação da indometacina. Primeiramente, foram realizadas reações de enxertia de PZLL na pululana via polimerização por abertura de anel para obtenção dos copolímeros anfifílicos PL (Pul-g-PZLL) com diferentes teores de lisina (PL10, PL20, PL30); a seguir, foi realizada a enxertia de PEG tanto na pululana quanto nos copolímeros PL via reações de uretanização formando os copolímeros PE (Pul-g-PEG), PEL e PLE (Pul-g-PEG/PZLL) e PE-PL. As estruturas dos copolímeros foram confirmadas por RMN e FTIR. O caráter anfifílico dos copolímeros foi avaliado pela concentração micelar crítica (variando de 0,066 a 199,9 mg/L conforme enxertia). As partículas dos copolímeros foram produzidas por nanoprecipitação em diálise variando a razão copolímero/solvente (parâmetro A, mg/mL), a estabilidade das partículas (variação do Dh e PDI) foi acompanhada por DLS, bem como sua morfologia foi estudada por AFM. As nanopartículas de PL10 e PL20 (208-338 nm) se mostraram mais estáveis e de morfologia esférica quando secas, porém após encapsulação de indometacina há uma grande variação de tamanho para $A > 0,5$, sendo as formulações com $0,2 \leq A \leq 0,5$ as mais estáveis. Quanto aos copolímeros com PEG, as rotas para obter ambos enxertos (de PEG e PZLL) apresentaram maiores desafios e levaram à obtenção de dois tipos de material: copolímeros em pó e hidrogéis; demonstrando a versatilidade dos sistemas estudados. As análises por UV-Vís e DSC das formulações carregadas com indometacina hidrofóbica encapsulada mostraram alto teor de indometacina presente (43-88%) e queda da cristalinidade do fármaco (para 7-27%) quando incorporado nos copolímeros. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que estas rotas de síntese se tratam de uma estratégia promissora para a produção de copolímeros anfifílicos de fonte renovável com interesse na encapsulação de fármacos hidrofóbicos e aplicação potencial na liberação controlada.

Palavras-chave: Pululana. Copolímeros de enxertia. Copolímeros anfifílicos. Partículas autoagregáveis. Encapsulação de fármacos.

ABSTRACT

VIEIRA, T. A. **Synthesis and characterization of copolymers based on pullulan to produce self-assembling particles as potential agents for drug encapsulation.** 2023. 172 p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

The main purpose of systems for controlled release of active ingredients is to improve limiting physicochemical properties of drugs, such as low solubility in the physiological environment, increasing their bioavailability while reducing their possible side effects, and improving their efficiency. The development of new carrier technologies to increase the solubility and permeability of drugs is highly desirable. Encapsulation in appropriate carriers allows greater control over drug release kinetics, since the polymer structures can be modified in order to modulate release, with graft modification being one of the possible routes. In this context, the modification of natural polymers – especially polysaccharides (and their derivatives) – such as pullulan, which is biodegradable and biocompatible, has been studied for pharmaceutical and biomedical application. In the present work, amphiphilic copolymers based on pullulan were produced via grafting of PZLL and PEG. These copolymers can form hydrophilic shell/hydrophobic core particles by self-assembling in water, which can be used in the encapsulation of indomethacin. First, the grafting reactions of PZLL were performed on pullulan via ring opening polymerization to obtain the amphiphilic copolymers PL (Pul-*g*-PZLL) with different lysine contents (PL10, PL20, PL30). Next, PEG was grafted onto both the pullulan and the PL copolymers via urethanization reactions forming the copolymers PE (Pul-*g*-PEG), PEL and PLE (Pul-*g*-PEG/PZLL) and PE-PL. The structures of the copolymers were confirmed by NMR and FTIR. The amphiphilic character of the copolymers was evaluated by the critical micelle concentration (ranging from 0.066 to 199.9 mg/L according to grafting). The copolymer particles were produced by nanoprecipitation in dialysis using different copolymer/solvent ratios (parameter A, mg/mL), the stability of the particles (variation of Dh and PDI) was monitored by DLS, as well as their morphology was studied by AFM. The PL10 and PL20 nanoparticles (208-338 nm) were more stable and had a spherical morphology when dry, however, after indomethacin encapsulation, a large size variation was observed for $A > 0.5$, with formulations with $0.2 \leq A \leq 0.5$ being the most stable. As for the copolymers with PEG, the routes to graft both PEG and PZLL onto pullulan presented greater challenges and led to obtaining two types of material: powdered copolymers and hydrogels; demonstrating the versatility of the studied systems. UV-Vis and DSC analyzes of the formulations with encapsulated hydrophobic indomethacin showed a high level of indomethacin incorporated (43-88%) and a decrease in drug crystallinity (to 7-27%) when incorporated into the copolymers. The results of this project indicate that these synthesis routes are a promising strategy to produce amphiphilic copolymers from a renewable source with an interest in the encapsulation of hydrophobic drugs and potential application in controlled release.

Keywords: Pullulan. Graft copolymers. Amphiphilic copolymers. Self-assembling particles. Drug encapsulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação entre liberação controlada e liberação imediata (formulação convencional).....	34
Figura 2 - Sistemas de liberação controlada de fármacos.	35
Figura 3 - Estruturas de diferentes exopolissacarídeos.	37
Figura 4 - Representação esquemática da produção de pululana por fermentação.	39
Figura 5 - Estrutura da pululana.	40
Figura 6 - Diferença entre as ligações e estrutura presentes na dextrana e na pululana.	45
Figura 7 – Indometacina: forma protonada e forma aniônica.	51
Figura 8 - Diferentes estruturas de copolímeros de enxertia anfifílicos (a) e exemplos de morfologias de micelas (b).....	53
Figura 9 - Sequência experimental realizada no projeto.	55
Figura 10 - Representação esquemática dos copolímeros sintetizados.	57
Figura 11 – Esquema da reação para obtenção de pululana- <i>g</i> -poli(Z-L-lisina) (Pul- <i>g</i> -PZLL).	58
Figura 12 - Representação esquemática das reações realizadas no estudo preliminar de funcionalização com isocianatos.	59
Figura 13 - Mecanismo de reação entre álcool e isocianato (a) e representação esquemática da reação entre pululana e FI (b).....	60
Figura 14 - Mecanismo de reação para obtenção de polietilenoglicol funcionalizado com isocianato (PEG-NCO 1) do MDI.....	61
Figura 15 - Mecanismo de reação para obtenção de polietilenoglicol funcionalizado com isocianato (PEG-NCO 2) do HDI.	62
Figura 16 - Mecanismo de reação para obtenção de pululana- <i>g</i> -polietilenoglicol (Pul- <i>g</i> -PEG) usando MDI. Etapa 1: Obtenção de polietilenoglicol funcionalizado com isocianato do MDI (PEG-NCO). Etapa 2: Reação de PEG-NCO e pululana.	63
Figura 17 - Mecanismo de reação para obtenção de pululana- <i>g</i> -polietilenoglicol (Pul- <i>g</i> -PEG) usando HDI. Etapa 1: Obtenção de polietilenoglicol funcionalizado com isocianato do HDI (PEG-NCO). Etapa 2: Reação de PEG-NCO e pululana.	64
Figura 18 - Representação esquemática da sequência de síntese e das estruturas dos copolímeros PEL, PLE e PE-PL.	66

Figura 19 - Espectro de FTIR-ATR da pululana.....	75
Figura 20 - Espectro de RMN ¹ H (em DMSO-d ₆) da pululana.....	76
Figura 21 - Espectro de FTIR-ATR da lisina-Z-NCA.	76
Figura 22 - Espectro de RMN ¹ H (em DMSO-d ₆) da lisina-Z-NCA.....	77
Figura 23 - Espectro de RMN ¹³ C (em DMSO-d ₆) da lisina-Z-NCA.	78
Figura 24 - Mecanismo da síntese dos copolímeros PL (Pul- <i>g</i> -PZLL) por abertura de anel.....	78
Figura 25 - Síntese dos copolímeros PL: final da reação do PL30 (a), PL10 após diálise (b), PL30 e PL20 secos por liofilização (c).	78
Figura 26 - Espectros de FTIR-ATR da pululana e seus copolímeros PL10, PL20 e PL30 (10, 20, 30% lisina) (a); deconvolução da região 1764-1580 cm ⁻¹ do PL20 (b); estrutura dos copolímeros Pul- <i>g</i> -PZLL.	79
Figura 27 - Espectros de RMN ¹ H da pululana e dos copolímeros PL10, PL20, PL30 (em DMSO-d ₆) (a); estrutura dos copolímeros Pul- <i>g</i> -PZLL (b).....	81
Figura 28 - Espectro de FTIR (NaCl) do fenilisocianato.....	83
Figura 29 - Espectro de RMN ¹ H (em CDCl ₃) do fenilisocianato.....	83
Figura 30 - Espectro de RMN ¹³ C (em CDCl ₃) do fenilisocianato.	84
Figura 31 - Produto bruto da reação Pul-FI 1: (a) precipitado em etanol, (b) seco em papel de filtro na estufa, (c) produto bruto isolado.	85
Figura 32 - Comparação dos espectros de RMN ¹ H do composto Pul-FI 1 (em DMSO-d ₆), da pululana (em DMSO-d ₆) e do fenilisocianato (FI) (em CDCl ₃).....	85
Figura 33 - Produto Pul-FI 2 (a) ao final da reação, (b) precipitado em água destilada gelada, e (c) após secagem.	86
Figura 34 - Resultados de TLC dos reagentes, subprodutos e produto final da reação Pul-FI 1: revelação química (a), visualização sob luz UV (b).....	87
Figura 35 - Espectro de FTIR-ATR do composto bruto da reação Pul-FI 2.	87
Figura 36 - Comparação entre os espectros de FTIR do composto Pul-FI 2 (ATR), pululana (ATR) e fenilisocianato (FI) (pastilha de NaCl).	88
Figura 37 - Comparação dos espectros de RMN ¹ H (em DMSO-d ₆) dos compostos obtidos das reações entre pululana e fenilisocianato (Pul-FI 1 e Pul-FI 2).	89
Figura 38 - Mecanismo de formação de oligômero de DFU. (a) Etapa 1: Ligação entre duas DFU via ataque nucleofílico, (b) Etapa 2: ataque nucleofílico no fenilisocianato (FI).	90

Figura 39 - Mecanismo de formação de oligômero de DFU. Duas rotas possíveis para Etapa 3: (a) Ataque nucleofílico na DFU, ou (b) ataque nucleofílico da DFU.	90
Figura 40 - Diferentes possíveis estruturas dos oligômeros de DFU.	91
Figura 41 - Representação dos componentes das reações Pul-FI 1 (a) e Pul-FI 2 (b).....	91
Figura 42 - Espectro de FTIR-ATR do metileno difenilisocianato (MDI).....	92
Figura 43 - Espectro de FTIR (NaCl) do hexametileno diisocianato (HDI).	93
Figura 44 - Espectro de RMN ¹ H (em CDCl ₃) do metileno difenilisocianato (MDI).	93
Figura 45 - Espectro de RMN ¹ H (em DMSO-d ₆) do hexametileno diisocianato (HDI).	94
Figura 46 - Espectro de RMN ¹³ C apt (em CDCl ₃) do metileno difenilisocianato (MDI).	94
Figura 47 - Espectro de RMN ¹³ C (em DMSO-d ₆) do hexametileno diisocianato (HDI).	95
Figura 48 - Espectros de FTIR-ATR do mPEG-OH 5000 e mPEG-OH 2000.	95
Figura 49 - Espectros de RMN ¹ H (em CDCl ₃) do mPEG-OH 5000 e do mPEG-OH 2000.....	96
Figura 50 - Espectro de RMN ¹³ C apt (em CDCl ₃) do mPEG-OH 5000.	97
Figura 51 - Material obtido após reação de síntese do PEG-NCO-1 (MDI). (a) Produto filtrado, (b) produto após 10 minutos de secagem em estufa.	97
Figura 52 - Comparação dos espectros de RMN ¹ H de MDI, mPEG-OH 5000 e PEG-NCO-1 (em CDCl ₃).	98
Figura 53 - Espectros de FTIR-ATR do PEG-NCO 2 (utilizando HDI) nas proporções molares de PEG/HDI de [1:2] e [1:5].	99
Figura 54 - Material obtido após reação PE-1 (Pul-g-PEG) (a), sistema de diálise usado para tratamento (b).....	100
Figura 55 - Espectro de FTIR-ATR do composto PE-1 (Pul-g-PEG) (a) e comparação com os espectros oriundos da pululana, do mPEG-OH 5000 e do MDI comerciais (b).	101
Figura 56 - Comparação dos espectros de RMN ¹ H do MDI (CDCl ₃), mPEG-OH 5000 (CDCl ₃), compostos Pul-FI 1 (DMSO-d ₆) e PE-1 (produto tratado) (DMSO-d ₆) (a), estruturas do Pul-FI 1 e do PE-1.....	102

Figura 57 - Síntese do copolímero PE-2 (Pul- <i>g</i> -PEG): final da reação (a), polímero seco com aspecto duro (b) e com aspecto de espuma (c).	103
Figura 58 - Espectro de FTIR-ATR do PE-2 (Pul- <i>g</i> -PEG) comparado com os espectros da pululana, HDI, mPEG-OH 2000, PEG-NCO (razão PEG/HDI [1:2]).	104
Figura 59 - Espectro de RMN ¹ H do PE-2 (Pul- <i>g</i> -PEG) comparado com a pululana e mPEG-OH 2000 (a), estrutura do PE-2 (b).	104
Figura 60 - Comparação dos espectros de RMN ¹ H dos copolímeros Pul- <i>g</i> -PEG — PE-1 (usando MDI) e PE-2 (usando HDI) — com a pululana (a); estrutura dos copolímeros PE-1 e PE-2 (b).	105
Figura 61 - Estruturas dos copolímeros com enxertos de PEG e de PZLL: PEL, PLE e PE-PL.	106
Figura 62 - Síntese do copolímero PEL: 1 ^a etapa (a), 2 ^a etapa (b), PEL liofilizado (c).	107
Figura 63 - Síntese dos copolímeros PLE-1 e PLE-2: final da reação do PLE-1 (a), final da reação do PLE-2 (b), PLE-1 após ser retirado do balão (c), PLE-2 liofilizado.	107
Figura 64 - Síntese do copolímero PE-PL: durante a diálise (a), depois da diálise (b), PE-PL liofilizado (c).	108
Figura 65 - Espectros de FTIR-ATR dos copolímeros PEL e PLE-2 (Pul- <i>g</i> -PEG/PZLL) comparados com PE-2 (Pul- <i>g</i> -PEG) e com PL20 (Pul- <i>g</i> -PZLL) (a); recorte da região 1800-1200 cm ⁻¹ (b).	109
Figura 66 - Espectros de RMN ¹ H dos copolímeros PEL e PLE-2 (Pul- <i>g</i> -PEG/PZLL) comparados com PE-2 (Pul- <i>g</i> -PEG) e com PL20 (Pul- <i>g</i> -PZLL).	109
Figura 67 - Espectros de RMN ¹ H dos copolímeros PEL e PLE-2 (a), estrutura dos copolímeros PEL e PLE (b).	110
Figura 68 - Espectros de FTIR-ATR dos copolímeros Pul- <i>g</i> -PEG/PZLL: PLE-1 (hidrogel), PLE-2 (pó) e PEL (pó).	110
Figura 69 - Espectros de FTIR-ATR dos 4 copolímeros contendo PEG e PZLL (a), recorte da região 1800-1200 cm ⁻¹ (b).	111
Figura 70 - Comparação dos espectros de RMN ¹ H dos copolímeros PE-PL, PEL e PLE-2 com PE-2 (Pul- <i>g</i> -PEG) e PL20 (Pul- <i>g</i> -PZLL).	112
Figura 71 - PLE-1 no final da reação (a), após ser dispersado em DMSO e em DMF no teste de solubilidade (b) e (c).	114

Figura 72 - Teste de solubilidade do PLE-1 em solventes: clorofórmio (a), água (b), etanol (c), acetona (d), acetato de etila (e), THF (f).....	115
Figura 73 - PLE-1 tratamentos T1 e T4 em presença de água.	116
Figura 74 - Espectros de FTIR do PLE-1 tratamentos T4 e T5 (ATR), e do DMSO (NaCl).....	116
Figura 75 - Cálculo da concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros PL10, PL20, PL30 e PEL.....	117
Figura 76 - Teste de estabilidade de nanopartículas para o copolímero PL10 (Pul-g-PZLL contendo 10% de lisina) durante 30 dias. a) variação de diâmetro (Dh); b) variação de PDI.....	119
Figura 77 - Teste de estabilidade de nanopartículas para o copolímero PL20 (Pul-g-PZLL contendo 20% de lisina) durante 30 dias. a) variação de diâmetro; b) variação de PDI.....	120
Figura 78 - Teste de estabilidade de nanopartículas para copolímero PL30 (Pul-g-PZLL contendo 30% de lisina) durante 30 dias. a) variação de tamanho; b) variação de PDI.....	121
Figura 79 - Diâmetro das nanopartículas dos copolímeros PL10, PL20 e PL30 de acordo com a razão copolímero/solvente: a) ajuste linear, b) ajuste logarítmico.	122
Figura 80 - Teste de estabilidade de nanopartículas para as formulações contendo indometacina dos copolímeros durante 30 dias: variação de diâmetro das NPs de PL10 (a), PL20 (c) e PL30 (e); variação de PDI das NPs de PL10 (b), PL20 (d) e PL30 (f).....	124
Figura 81 - Teste de estabilidade de nanopartículas para copolímero PEL (Pul-g-PEG/PZLL) durante 47 dias. a) variação de tamanho; b) variação de PDI.	126
Figura 82 - Teste de estabilidade de nanopartículas para os copolímeros PE-PL (Pul-g-PEG e Pul-g-PZLL reticulados) e PLE-2 (Pul-g-PEG/PZLL) durante 26 dias. a) variação de tamanho; b) variação de PDI.....	127
Figura 83 - Microscopias por AFM das formulações com PL10 em duas áreas distintas de 5x5 µm para cada formulação [taxa de scan: 1 Hz]: A=0,5 mg/mL (a, b), A=1,0 mg/mL (c, d).	128
Figura 84 - Microscopias por AFM das formulações com PL20 em duas áreas distintas de 5x5 µm para cada formulação [taxa de scan: 1 Hz]: A=0,5 mg/mL (a, b), A=1,0 mg/mL (c, d).	129

Figura 85 - Microscopia por AFM das formulações do PEL em duas áreas distintas de 5x5 µm para cada formulação: A=0,1 mg/mL área 1 (a), área 2 (b); A=0,5 mg/mL área 1 (c), área 2 (d).....	129
Figura 86 - Microscopia por AFM das formulações do PE-PL (hidrogel) em duas áreas distintas de 5x5 µm para cada formulação [taxa de scan: 1 Hz]: A=0,5 mg/mL área 1 (a), área 2 (b); A=1,0 mg/mL área 1 (c), área 2 (d).....	130
Figura 87 - Microscopia por AFM da formulação do PLE-2 (A=1,0 mg/mL) de duas áreas distintas de 5x5 µm: área 1 (a), área 2 (b).....	130
Figura 88 - Perfis de absorbância das soluções de indometacina (190 - 400 nm) em: DMSO (a) e etanol (b).....	131
Figura 89 - Curvas de calibração da absorbância (319 nm) da solução de indometacina em: DMSO (a) e em etanol (b).	131
Figura 90 - Curvas de absorbância de copolímeros puros de pululana enxertada com PEG e poli(Z-lisina) (PEL) nos dias 1 e 2 (a) e apenas com poli(Z-lisina) (PL20) nos dias 1 e 4 (b).	132
Figura 91 - Curvas de absorbância da formulação FI12 (copolímero PEL) nos dias 1 e 2 (a) e destaque para a região de 319 nm (b).	133
Figura 92 - Curvas de absorbância da formulação FI11 (copolímero PL20) nos dias 1 e 4 (a) e destaque para a região de 319 nm (b).....	133
Figura 93 - Curvas de absorbância da formulação FI12 (copolímero PEL1) (a) e destaques para a região de 319 nm das formulações FI12 (b), FI11 (PL20) (c), FI9 (PL10) (d).....	135
Figura 94 - Termogramas de DSC dos copolímeros de pululana: pululana (a), PL10 (b), PL20 (c), PEL (d), PE-2 (e), PEG 2000 (f).	137
Figura 95 - Termogramas de DSC das formulações com indometacina encapsulada (FI9, FI11, FI12) e das misturas copolímero/fármaco: indometacina pura (a), misturas PL10/Indometacina (b), PL20/Indometacina (c), PEL/Indometacina (d), formulações FI9 (e), FI11 (f), FI12 (g).	139
Figura 96 - Termogramas de DSC dos copolímeros de pululana com enxertia de PEG: PEL (a), PE-2 (b), PE-PL (c), PLE-1 (T5) (d), PLE-2 (e).	139
Figura 97 - Comparação entre intensidades de sinal de água no DMSO-d ₆ (a) ampola (Tubo 1) e (b) frasco (Tubo 2).....	160
Figura 98 - Comparação entre intensidades de sinal de água no Tubo 3 contendo MDI e DMSO-d ₆ frasco.	161

Figura 99 - Comparação entre as intensidades do sinal de água no Tubo 1 contendo Pul-g-PEG (PEMPU-1) em DMSO-d ₆ ampola após 32 varreduras (a) e 64 varreduras (b), e no Tubo 2 contendo Pul-g-PEG em DMSO-d ₆ frasco após 32 varreduras (c) e 64 varreduras (d).	162
Figura 100 - Comparação entre intensidades de sinal de água no Tubo 1 contendo solução diluída (a) e solução concentrada (b) de Pul-g-PEG (PEMPU-1) em DMSO-d ₆ ampola, e no Tubo 2 contendo solução diluída (c) e solução concentrada (d) de Pul-g-PEG em DMSO-d ₆ frasco.	163
Figura 101 - Possíveis produtos de hidrólise do fenilisocianato (FI) e formação de 1,3-difenilureia (DFU).	165
Figura 102 - Formação de etilfenilcarbamato (EFC).	166
Figura 103 - Possíveis produtos da hidrólise do metileno di(fenilisocianato) (MDI): metileno fenilisocianato-ácido fenilcarbâmico, metileno fenilisocianato-anilina, metileno diácido fenilcarbâmico e metileno dianilina (MDA).	166
Figura 104 - Produtos da reação do metileno difenil isocianato (MDI) com etanol: metileno fenilisocianato-fenilettilcarbamato e metileno di(fenilettilcarbamato) (MDEFEC).	167
Figura 105 - Reação entre fenilisocianato (FI) e água: gota de FI em água (a), composto DFU isolado e seco (b).	168
Figura 106 - Espectro de RMN ¹ H (em DMSO-d ₆) da 1,3-difenilureia (DFU).	168

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Diferentes aplicações de polímeros naturais modificados em encapsulação ou tratamento de doenças diversas.	33
Quadro 2 - Principais parâmetros de controle de qualidade da pululana.	41
Quadro 3 - Diferentes aplicações de pululana modificada em sistemas biomédicos.	44
Quadro 4 - Diferentes aplicações de copolímeros de enxertia usando polímeros naturais como cadeia principal.	47
Quadro 5 - Resultados de TLC (coloração conforme tipo de revelador e RF) dos reagentes, subprodutos e produto final da reação Pul-FI.	87
Quadro 6 - Picos de FTIR-ATR presentes nos 4 copolímeros contendo PEG e PZLL, e nos copolímeros PE-2 e PL20, com foco na região 1800-1200 cm ⁻¹	111
Quadro 7 - Teste de solubilidade e grau de intumescimento do PLE-1 (hidrogel).	114
Quadro 8 - Tratamento do PLE-1 com solventes	115
Quadro 9 - Comportamento dos produtos T1 e T4 (copolímero PLE-1) em presença de água e DMSO.	116
Quadro 10 - Graus de solubilidade.	170
Quadro 11 - Teste de solubilidade do MDI em diferentes solventes (a temperatura ambiente e gelados).	171
Quadro 12 - Teste de solubilidade do mPEG-OH 5000 em diferentes solventes (a temperatura ambiente e gelados).	171
Quadro 13 - Teste de solubilidade da DFU em diferentes solventes (a temperatura ambiente).	172

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Siglas e condições experimentais utilizadas nas sínteses dos copolímeros.....	56
Tabela 2 - Condições experimentais utilizadas nas reações Pul-FI.....	59
Tabela 3 - Resumo das condições experimentais para síntese de PEG-NCO.....	62
Tabela 4 - Resumo das condições experimentais para síntese dos copolímeros PE.....	65
Tabela 5 - Diferentes tratamentos com solventes usados para o copolímero PLE insolúvel em DMSO.....	68
Tabela 6 - Resumo das condições experimentais para síntese dos copolímeros PEL e PLE.....	68
Tabela 7 - Soluções concentradas preparadas para cada teste de eficiência de encapsulação.....	74
Tabela 8 - Razão de sinais do FTIR mostrando o aumento do grau de substituição dos copolímeros PL.....	80
Tabela 9 - Grau de substituição (GS) dos copolímeros com enxertia de PEG: PEL e PE-PL.....	113
Tabela 10 - Concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros PL.....	118
Tabela 11 - Resultados do teste de estabilidade de nanopartículas para o copolímero PL10 (Pul-g-PZLL contendo 10% de lisina) durante 30 dias: Diâmetro médio (Dh) e PDI.....	119
Tabela 12 - Resultados do teste de estabilidade de nanopartículas para o copolímero PL20 (Pul-g-PZLL contendo 20% de lisina) durante 30 dias: Diâmetro médio (Dh) e PDI.....	120
Tabela 13 - Resultados do teste de estabilidade de nanopartículas para o copolímero PL30 (Pul-g-PZLL contendo 30% de lisina) durante 30 dias: Diâmetro médio (Dh) e PDI.....	121
Tabela 14 – Ajuste linear e logarítmico do diâmetro médio (nm) (y) vs. razão copolímero/solvente (mg/mL) (x).....	122
Tabela 15 - Formulações contendo indometacina preparadas com PL10, PL20 e PL30 e usadas no teste de estabilidade.....	123
Tabela 16 - Resultados do teste de estabilidade de nanopartículas para o copolímero PEL (Pul-g-PEG/PZLL) durante 47 dias.....	126

Tabela 17 - Resultados do teste de estabilidade de nanopartículas para os copolímeros PE-PL e PLE-2 durante 30 dias.	127
Tabela 18 - Absorbância em 319 nm das soluções de PL20 e PEL.....	134
Tabela 19 - Eficiência de encapsulação das formulações FI9-FI12 (A:1,0/B=1,0).	134
Tabela 20 - Eficiência de encapsulação das formulações FI9-FI12 (A:1,0/B:1,0)) comparando com os controles PI.	135
Tabela 21 - Tamanhos de nanopartículas e eficiência de encapsulação (EE) de formulações à base de pululana e quitosana carregadas com diferentes princípios ativos.	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AFM	Microscopia de força atômica
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CMC	Concentração micelar crítica
Cq	Carbono quaternário
DFU	1,3-difenilureia
Dh	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de luz dinâmica
D_2O	Água deuterada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d_6	Dimetilsulfóxido deuterado
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
EE%	Eficiência de encapsulação
EE_{FI}	Eficiência de encapsulação calculada usando a curva de INDO
$\text{EE}_{(\text{FI-P})}$	Eficiência de encapsulação calculada subtraindo a Abs do polímero
EE'_{FI}	Eficiência de encapsulação calculada comparativamente com controle cuja $\text{EE}\%=100\%$
EFC	Etilfenilcarbamato
EPS	Exopolissacarídeo
FDA	Food and Drug Administration (agência federal estadunidense)
FI	Fenilisocianato
FI	Formulação contendo indometacina encapsulada, e sua solução concentrada
FI_{dil}	Solução diluída (1:10) da formulação de indometacina encapsulada
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
FTIR-ATR	FTIR com reflectância total atenuada
FTIR (NaCl)	FTIR em pastilha de NaCl
GI	Grau de intumescimento
GS	Grau de substituição
HDI	Hexametileno diisocianato
MDI	4,4'-diisocianato de difenil metileno ou metileno difenilisocianato
I	Solução concentrada de indometacina pura

Idil.	Solução diluída (1:10) de indometacina pura
mmol	Milimol
mPEG-OH	Metóxi-poli(etilenoglicol) hidroxilado
NP	Nanopartícula
<i>One-pot</i>	Reações consecutivas realizadas no mesmo balão sem uma etapa intermediária de purificação
<i>Overnight</i>	De um dia para o outro
Parâmetro A	Razão copolímero/solvente (mg/mL)
Parâmetro B	Razão indometacina/copolímero (mg/mg)
P	Solução polimérica concentrada
P _{dil.}	Solução polimérica diluída (1:10)
PDI	Polidispersidade
PE	Pululana- <i>graft</i> -PEG
PE-PL	[Pululana- <i>graft</i> -PEG] e [pululana- <i>graft</i> -poli(Z-L-lisina)] reticulados
PEG-NCO	Poli(etilenoglicol) funcionalizado com grupo isocianato
PEL	Pululana- <i>graft</i> -PEG/poli(Z-L-lisina)
PI	Solução concentrada da mistura copolímero/indometacina (1:1)
PI _{dil.}	Solução diluída (1:10) da mistura copolímero/indometacina (1:1)
PL	Pululana- <i>graft</i> -poli(Z-L-lisina)
PL10	Pululana- <i>graft</i> -poli(Z-L-lisina) com 10% m/m de enxertia
PL20	Pululana- <i>graft</i> -poli(Z-L-lisina) com 20% m/m de enxertia
PL30	Pululana- <i>graft</i> -poli(Z-L-lisina) com 30% m/m de enxertia
PLE	Pululana- <i>graft</i> -poli(Z-L-lisina)/PEG
PLL	Poli(L-lisina)
PZLL	Poli(Z-L-lisina)
Pul	Pululana
Pul-FI	Pululana funcionalizada com fenilisocianato
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de próton
ROP	Polimerização por abertura de anel
t.a.	Temperatura ambiente
TLC	Cromatografia de camada fina (ou delgada)
Z	Carbobenzoxi (Cbz)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos específicos	30
3	REVISÃO DA LITERATURA	31
3.1	Evolução da indústria farmacêutica e importância de parcerias entre empresas e universidades para alavancar a inovação farmacêutica.....	31
3.2	Sistemas de liberação de fármacos	32
3.3	Polissacarídeos e exopolissacarídeos	36
3.4	Pululana.....	39
3.5	Modificações químicas da pululana visando encapsulação de compostos ativos	45
3.5.1	Modificações por enxertia	46
3.5.2	Nanomedicina, sistemas micro e nanoparticulados e encapsulação de indometacina	49
3.5.3	Produção de partículas via autoagregação	52
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	55
4.1	MATERIAIS.....	55
4.2	METODOLOGIA	55
4.2.1	Síntese de pululana- <i>g</i> -poli(Z-lisina)	57
4.2.2	Avaliação preliminar da inserção de grupos reativos isocianato na pululana e no mPEG-OH	58
4.2.3	Síntese de pululana- <i>g</i> -PEG	62
4.2.4	Síntese de copolímeros de enxertia da pululana com PZLL e PEG: PEL, PLE e PE-PL.....	65
4.2.5	Caracterizações.....	70
4.2.6	Produção de partículas por diálise e estudo de estabilidade	72
4.2.7	Incorporação de indometacina nas partículas de pululana- <i>g</i> -poli(Z-lisina)	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1	Síntese de pululana- <i>g</i> -poli(Z-lisina) (PL).....	75
5.2	Funcionalização da pululana e do PEG com grupos isocianato	81

5.2.1	Reação da pululana com fenilisocianato (Pul-FI)	82
5.2.2	Funcionalização do PEG com diisocianatos (PEG-NCO)	92
5.3	Síntese de pululana- <i>g</i> -polietilenoglicol (PE)	99
5.3.1	Enxertia do PEG com MDI (aromático): PE-1	100
5.3.2	Enxertia do PEG com HDI (alifático): PE-2	103
5.4	Síntese de copolímeros de pululana enxertada com polietilenoglicol e poli(Z-lisina)	106
5.4.1	Testes de solubilidade e tratamento do PLE-1 (hidrogel).....	113
5.5	Produção de nanopartículas usando copolímeros de pululana	116
5.5.1	Nanopartículas dos copolímeros PL10, PL20 e PL30	117
5.5.2	Nanopartículas dos copolímeros PEL, PLE-2 e PE-PL	125
5.6	Morfologia das nanopartículas.....	127
5.7	Encapsulação de indometacina em copolímeros de pululana.....	130
5.7.1	Eficiência de encapsulação	130
5.7.2	DSC dos copolímeros e das formulações com fármaco encapsulado	137
6	CONCLUSÕES	141
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	143
	REFERÊNCIAS	144
	APÊNDICE A - Cromatografia em camada fina ou delgada (CCF ou TLC).....	158
	APÊNDICE B - Influência da umidade presente em solventes deuterados na análise por RMN	159
	APÊNDICE C - Avaliação de possíveis subprodutos obtidos durante o tratamento das reações com FI e MDI.....	165
	APÊNDICE D - Testes de solubilidade	170

1 INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de materiais poliméricos é aplicada em diversas áreas da indústria para a produção de dispositivos eletrônicos, peças do setor automobilístico e aeroespacial, fibras têxteis, produtos cosméticos e médico-farmacêuticos, entre outros. Em especial na área médica-farmacêutica, o avanço da química de polímeros e da nanotecnologia tem permitido desenhar sistemas de liberação capazes de ultrapassar barreiras biológicas, químicas e de transporte altamente complexas, melhorando consideravelmente a eficácia de fármacos e reduzindo os efeitos colaterais. Ainda, além de se tratar de uma estratégia que permite aumentar o tempo de circulação do fármaco e melhorar o seu perfil de liberação, é possível a produção de sistemas que sejam específicos para cada tipo de aplicação pela exploração de propriedades físico-químicas das próprias partículas carreadoras, conferindo capacidade de reagir a condições externas como alterações no pH do meio, temperatura, entre outras, para melhorar a eficácia dos tratamentos (MURA; NICOLAS; COUVREUR, 2013).

A nanomedicina tem avançado muito e recebido cada vez mais reconhecimento, principalmente devido a resultados de eficiência e segurança sem precedentes, como no tratamento de câncer (XU *et al.*, 2015a). Vários tratamentos terapêuticos usando nanopartículas poliméricas já foram aprovadas pelo FDA (Food and Drug Administration, órgão estadunidense equivalente à Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA) para uso clínico (SANNA; PALA; SECHI, 2014) e várias outras estão em fase de teste clínico (XU *et al.*, 2015a). Nanopartículas também são imprescindíveis para terapias como o tratamento combinado, pois garantem a constância das taxas de liberação dos diferentes fármacos e, por conseguinte, o efeito sinérgico desejado (XU *et al.*, 2015a; WANG *et al.*, 2021). O desenvolvimento de tecnologias nas áreas de polímeros, química, ciência de materiais, biotecnologia e nanoengenharia foi o principal responsável pelos avanços recentes em sistemas de liberação de fármacos (*drug delivery systems*, DDS) e nanomedicina, principalmente devido à produção de grande variedade de nanomateriais com alto potencial de aplicação em sistemas de liberação, justificando a importância de trabalhos que explorem o desenvolvimento de novos polímeros (SHARIATINIA, 2021).

Considerando a alta demanda por materiais poliméricos em praticamente todos os setores industriais, a exploração de rotas sustentáveis para a obtenção de matérias-primas e para a produção de compostos de interesse para a indústria de polímeros – alternativos àqueles baseados em petróleo – é cada vez mais importante, haja vista o impacto das atividades humanas no agravamento global dos fenômenos climáticos extremos e no aumento da frequência e da abrangência destas ocorrências, como ondas de calor, secas, avanço de processos de desertificação, tempestades, furacões e alagamentos.

Além disso, o aquecimento global, causado principalmente pela queima de combustíveis fósseis, é responsável pelo derretimento das calotas polares e das geleiras, e pela conseqüente elevação do nível dos mares e perturbações das correntes oceânicas e de migração de animais marinhos, o que tende a afetar diretamente o fornecimento de água potável e a agricultura, além de causar o desaparecimento de extensas áreas costeiras, causando a migração de dezenas de milhões de pessoas ao redor do mundo (EYRING *et al.*, 2021).

A maioria das matérias-primas para produção de polímeros ainda tem sua origem no petróleo, sendo o seu baixo custo e a alta eficiência da indústria petroquímica no aproveitamento de todas frações obtidas, alguns dos principais motivos. Porém a sociedade civil vem se conscientizando e seu apoio vem crescendo nas últimas décadas na cobrança pelo estabelecimento de políticas públicas para o combate às mudanças climáticas, o que fortalece a posição de inovação na busca por sustentabilidade. Entretanto, os efeitos reais podem continuar a ser superficiais enquanto a produção de combustíveis fósseis e seus derivados for economicamente mais atrativa, (NATIONAL [...], 1994; BRAUNGARDT; VAN DEN BERGH; DUNLOP, 2019) ratificando a importância do desenvolvimento de tecnologias que busquem sustentabilidade e que possam suprir as necessidades da sociedade de forma financeiramente viável.

Neste sentido, o desenvolvimento de rotas biotecnológicas de síntese e de aproveitamento de biomassa são uma das principais apostas para uma indústria sustentável e que ajude na mitigação dos efeitos antrópicos extremamente danosos no equilíbrio ecológico do planeta. No que diz respeito ao desenvolvimento de sistemas para aplicação biomédica, uma preocupação central está relacionada à própria natureza do material que os compõe, sendo imprescindível que seja intrinsecamente biocompatível e de baixa imunogenicidade. Logo, o emprego de

polímeros naturais figura como uma opção bastante vantajosa em vários aspectos, pois além das características mencionadas acima, também são potencialmente biodegradáveis e de origem renovável, indo de encontro à visão de desenvolvimento sustentável (LI *et al.*, 2021).

A pululana é um polímero natural pertencente à classe dos polissacarídeos. É obtido por via fermentativa, é solúvel em água, e apresenta boa biocompatibilidade e degradabilidade enzimática, além de ser aprovado pela agência federal norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) para uso nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. Uma grande quantidade de estudos tem sido publicada recentemente mostrando a versatilidade desse polímero (*in natura* e modificado), bem como a diversidade de aplicações com resultados muito promissores na área farmacêutica-médica, como encapsulação de diferentes terapêuticos e teranósticos para sistemas de liberação de fármacos e de genes, vacinação, engenharia de tecidos, entre outros (PANDEY *et al.*, 2021; GANIE; RATHER; LI, 2021). Existem muitos trabalhos mostrando aplicações biomédicas interessantes de copolímeros de enxertia, inclusive de pululana enxertada, sendo o polietilenoglicol e a poli(lisina) dois enxertos que conferem propriedades desejáveis para sistemas de liberação, porém ainda não há trabalhos que apliquem ambos enxertos na pululana.

O propósito deste trabalho é a produção de copolímeros anfifílicos via enxertia utilizando a pululana como estrutura principal, e polietilenoglicol e poli(lisina) como enxertos, buscando avaliar e otimizar as condições para a obtenção de partículas autoagregáveis, bem como o estudo posterior da encapsulação de indometacina, um medicamento modelo do tipo anti-inflamatório não esteroide. Estes copolímeros apresentam-se como potenciais sistemas para aplicação na encapsulação de fármacos hidrofóbicos e posteriormente em sistemas de liberação, o que significa avançar no desenvolvimento de uma nova plataforma nanotecnológica com potencial para ser usada no tratamento de diversas doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta tese é estudar as condições de síntese de copolímeros anfifílicos baseados em pululana enxertada com polietilenoglicol como bloco hidrofílico, e poli(Z-L-lisina) como bloco hidrofóbico, e posteriormente avaliar seu potencial de aplicação na produção de nanopartículas pelo método de autoagregação em água e na encapsulação de indometacina.

2.2 Objetivos específicos

- Polimerizar poli(Z-L-lisina) (PZLL) por abertura de anel (ROP) a partir da cadeia de pululana para produzir copolímeros com diferentes graus de substituição;
- Realizar reações químicas modelo a partir de pululana e fenilisocianato (FI);
- Funcionalizar a extremidade do polietilenoglicol hidroxilado (mPEG-OH) com 4,4'-diisocianato de difenil metileno (MDI) e hexametileno diisocianato (HDI) via reação de uretanização;
- Enxertar as cadeias de PEG funcionalizado com isocianato (PEG-NCO) na pululana via reação de uretanização para obter Pul-*g*-PEG;
- Sintetizar diferentes copolímeros de enxertia contendo tanto PZLL quanto PEG;
- Caracterizar os copolímeros por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectroscopia de Infravermelho (FTIR);
- Avaliar o comportamento de autoagregação dos copolímeros determinando sua Concentração Micelar Crítica (CMC) por fluorescência;
- Produzir partículas dos copolímeros por diálise e estudar sua estabilidade (usando a técnica de espalhamento de luz dinâmico, DLS) e morfologia (usando a técnica de microscopia de força atômica, AFM);
- Incorporar indometacina nos copolímeros e avaliar a eficiência de encapsulação por espectroscopia UV-Visível e a redução da cristalinidade do fármaco encapsulado por calorimetria diferencial de varredura (DSC).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Evolução da indústria farmacêutica e importância de parcerias entre empresas e universidades para alavancar a inovação farmacêutica

Durante a maior parte da história da humanidade, a descoberta de compostos terapêuticos dependia exclusivamente da compreensão das propriedades intrínsecas de plantas, seus extratos, e suas possíveis aplicações. Apenas nos últimos dois séculos, com o avanço das pesquisas em ciências de base e ciências aplicadas, como a química, a farmacologia, a modelagem de moléculas, entre outras, os métodos modernos de desenvolvimento de fármacos foram desenvolvidos. A supervisão governamental e de agências regulatórias também foi essencial para mudar completamente o paradigma do desenvolvimento de fármacos, assegurando a segurança e a eficiência de novos tratamentos (BLASS, 2021).

Os trabalhos de Paul Ehrlich (BOSCH; ROSICH, 2008), que propôs (i) a existência de quimiorreceptores nas células que estariam relacionados aos efeitos biológicos produzidos pelos medicamentos, (ii) que a composição química dos fármacos seria responsável por seu mecanismo de atuação, e (iii) que os quimiorreceptores de organismos infecciosos e de células cancerígenas teriam características particulares, podendo ser exploradas no direcionamento do ataque pelo fármaco, foram fundamentais para o estabelecimento dos métodos modernos de desenvolvimento de medicamentos. Ao longo das décadas seguintes, as ferramentas necessárias para isolamento, caracterização e estudo da atividade biológica de fármacos foram desenvolvidas, como cristalografia de raios-X, modelagem molecular, química computacional, tecnologias de uso de DNA, entre outras, criando o paradigma padrão atual de descobrimento e desenvolvimento de fármacos (BLASS, 2021; NICOLAOU, 2014).

A revolução biotecnológica que começou na década de 1970 trouxe um impacto imenso no desenvolvimento de terapias para condições até então intratáveis, como a insulina e outras proteínas humanas recombinantes, anticorpos monoclonais e tecnologias híbridas. Nos EUA, a partir da década de 1980, uma

nova política de patenteamento possibilitou, ao mesmo tempo, o desenvolvimento da estrutura de financiamento de pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos e a possibilidade de reverter os ganhos da comercialização destes compostos em verbas para financiar mais pesquisas, gerando um ciclo virtuoso. Cientistas de diferentes campos, como química, biologia e medicina, têm reconhecido a importância de unir esforços conjuntos para avançar na elucidação de vias bioquímicas, processos patogênicos e criação de ferramentas que tornem o processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos mais eficiente. Ainda, programas de pesquisa com parceria público-privada entre academia e indústria têm aumentado, podendo-se citar como exemplo a parceria entre o National Institutes of Health (do governo norte-americano), dez empresas biofarmacêuticas e diversas ONGs para lidar com Alzheimer, diabetes tipo II, lúpus e artrite reumatoide. Com isso, verificou-se um salto de 12 para 100 centros acadêmicos estadunidenses especializados em descoberta de fármacos entre os anos de 2001 e 2013 (BLASS, 2021; NICOLAOU, 2014).

Apenas nos últimos 10 anos, uma média de 40 a 60 novos fármacos foram aprovados anualmente pelo FDA, sendo a maioria para prevenção e tratamento de doenças, o que contrasta com a média, até os anos 2000, de 20 a 30 fármacos aprovados anualmente, mostrando o potencial de alavancar a inovação na área farmacêutica via parcerias entre universidades e empresas (KINCH; KRAFT; SCHWARTZ, 2022).

3.2 Sistemas de liberação de fármacos

Uma ampla gama de fármacos apresenta baixa solubilidade em meio fisiológico, o que acarreta sua rápida eliminação da corrente sanguínea, baixa internalização pelas células e reduzido acúmulo nos tecidos de interesse, limitando a extensão global da ação do tratamento. A falta de solubilidade em meio aquoso é apontada, inclusive, como uma das principais razões por trás de falsos negativos durante o processo de triagem de fármacos (KENAKIN, 2019). A solubilidade e a estabilidade dos fármacos podem, contudo, ser melhoradas usando diversas abordagens nanotecnológicas (ZHANG *et al.*, 2013), sendo duas delas a encapsulação física e a conjugação química com outros materiais (PEER *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2012). Usando essas técnicas, é possível controlar a taxa de

liberação do fármaco e direcioná-lo com maior precisão para as células de interesse, aumentando a eficácia e diminuindo efeitos colaterais.

Diversos trabalhos estudaram a encapsulação de fármacos empregando polímeros naturais e/ou sintéticos, com ou sem modificação na estrutura ou conjugação com outras moléculas, o que mostra o potencial e a ampla gama de aplicações em diversas áreas, como tratamento de doenças, engenharia de tecidos, liberação de vacinas, hormônios, entre outros (Quadro 1) (LI *et al.*, 2021; FECZKÓ, 2021; MAITI; JANA, 2019; HASNAIN; NAYAK, 2019).

Quadro 1 - Diferentes aplicações de polímeros naturais modificados em encapsulação ou tratamento de doenças diversas.

Aplicação	Polímero utilizado	Princípio ativo	Referência
Inibição de <i>Helicobacter pylori</i>	Etilcelulose-PEG-acrilato	Capsaicina, claritromicina	TACHAPRUTINUN <i>et al.</i> , 2014
Células calciformes	Trimetil quitosana	Insulina	JIN <i>et al.</i> , 2012
Anticancer	Quitosana-PEG-ácido poliglutâmico	Doxorrubicina	DENG <i>et al.</i> , 2015
Colite ulcerativa	Poliestireno revestido com PEG	-	MAISEL <i>et al.</i> , 2015
Redução de glicose sanguínea	Ácido hialurônico-quitosana-Eudragit® L-100	Insulina	SLADEK <i>et al.</i> , 2020
Receptores Fc neonatais (FcRn)	PLA-PEG	Insulina	PRIDGEN <i>et al.</i> , 2013
Doença inflamatória intestinal	PLGA, PLGA-quitosana, PEG-PLGA	-	LAUTENSCHLÄGER <i>et al.</i> , 2013
Tratamento do câncer via PDT	Nanoagregados híbridos de quitosana e NPs de óxido de ferro, modificados com PEG	Doxorrubicina, azul de metileno	ZHANG <i>et al.</i> , 2020
Tratamento de epilepsia	Quitosana-PLGA	Hidrato de catequina	AHMAD <i>et al.</i> , 2020
Aumento de tempo de residência do fármaco	Hialuronato de sódio	Meloxicam	BARTOS <i>et al.</i> , 2015

(Continua)

(Conclusão)

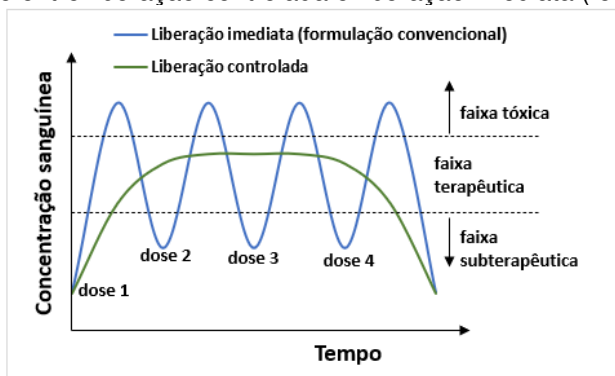
Quadro 1 - Diferentes aplicações de polímeros naturais modificados em encapsulação ou tratamento de doenças diversas.

Aplicação	Polímero utilizado	Princípio ativo	Referência
Liberação controlada de drogas antituberculose	Alginato	Isoniazida, rifampicina, pirazinamida	ZAHOOR; SHARMA; KHULLER, 2005
Entrega sustentada de fármaco	PLA, PLGA	Rifampicina	COOWANITWONG <i>et al.</i> , 2008
Tratamento para diabetes tipo 2	Quitosana-PLGA	Exendin-4	LEE <i>et al.</i> , 2013a
Suportes para formação óssea em cirurgias maxilofaciais ou ortopédicas	Pululana/ Dextrana-nano-hidroxiapatita	-	FRICAIN <i>et al.</i> , 2013
Sistema de liberação ou adjuvante de vacinas contra tuberculose	Polímeros de quitosana e derivados	BCG, antígeno 85A, lipídeos de <i>Mtb</i> , entre outros	KHADEMI <i>et al.</i> , 2018
Sistema de liberação de vacina	Nanopartículas de polímero baseado em PEG	Vacina de DNA	GULCE-IZ <i>et al.</i> 2019 apud BASU <i>et al.</i> , 2021

Fonte: Próprio autor.

As tecnologias e formulações de sistemas de liberação têm como finalidade proteger o fármaco de degradação e modificar o seu perfil de liberação e suas taxas de absorção e eliminação, controlando assim sua biodisponibilidade e garantindo que sua concentração na corrente sanguínea esteja dentro da faixa de efeito terapêutico desejada (Figura 1).

Figura 1 - Comparação entre liberação controlada e liberação imediata (formulação convencional).



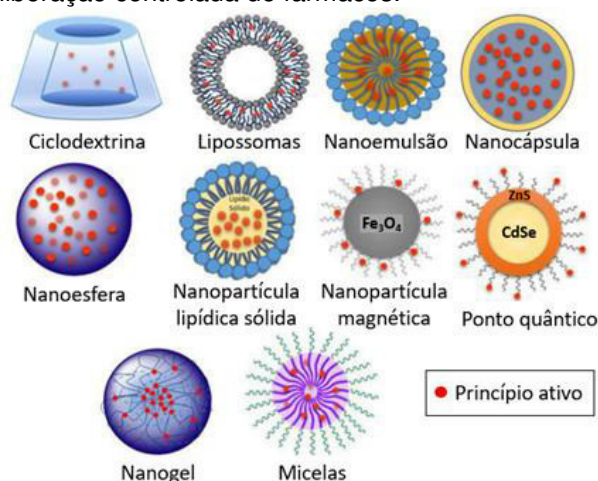
Fonte: Próprio autor.

Tal estratégia significa manter os princípios ativos circulando na corrente sanguínea por um tempo prolongado, além de possibilitar um melhor controle da

distribuição dos compostos terapêuticos nos tecidos de interesse (farmacocinética). Essas características tendem a minimizar os efeitos colaterais e permitem uma maior eficácia dos fármacos, além de reduzir a necessidade de administração de novas doses. Para tal, o fármaco é encapsulado em um material polimérico que possui propriedades intrínsecas capazes de modular a liberação. Os sistemas de liberação controlada podem ser de diferentes tipos como partículas, micelas, hidrogéis e fibras (Figura 2) (MAEDA, 2012; BERTRAND *et al.*, 2014; SAHU *et al.*, 2021; SHAH *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de um sistema nanoparticulado eficiente para liberação de fármacos envolve, necessariamente, ultrapassar barreiras biológicas, químicas e de transporte altamente complexas, entre as quais a liberação rápida de agentes no citoplasma é um passo crítico. O fármaco precisa ser transportado para os núcleos e/ou outros compartimentos subcelulares para uma ação terapêutica efetiva. Todos esses processos podem ser modulados por modificação dos carreadores, sendo possível direcionar ativamente a entrega de fármacos, modificando a superfície do carreador e/ou utilizando um ligante adequado que ajude no reconhecimento das células de interesse (FLORENCE, 2012; KWON *et al.*, 2012; BLANCO, SHEN, FERRARI, 2015; SHAH *et al.*, 2021; FECZÓ, 2021).

Figura 2 - Sistemas de liberação controlada de fármacos.



Fonte: adaptado de MORAES (2019).

Uma preocupação central para o desenvolvimento de aplicações biomédicas é a natureza do material utilizado, sendo imprescindível que seja intrinsecamente biocompatível e de baixa imunogenicidade. Os polissacarídeos naturais se tornam assim uma opção bastante promissora, pois além das características mencionadas

acima, também são de origem renovável e potencialmente biodegradáveis, indo de encontro à visão de desenvolvimento sustentável (LI *et al.*, 2021).

3.3 Polissacarídeos e exopolissacarídeos

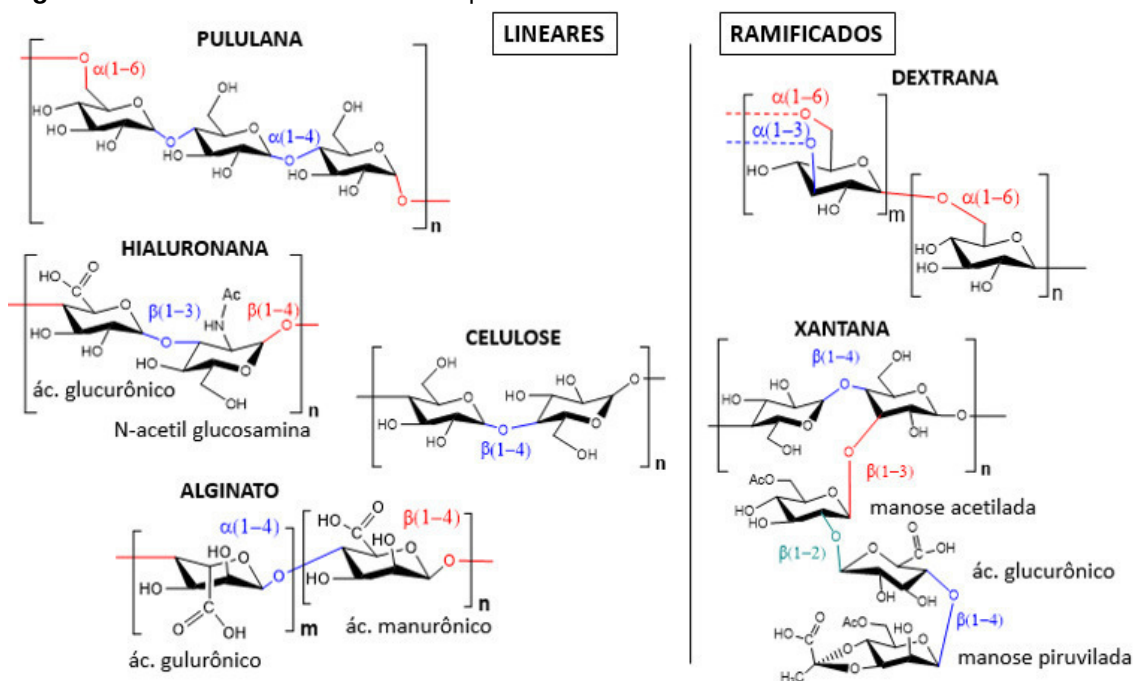
Nas últimas décadas, materiais de origem natural têm sido cada vez mais estudados e empregados na indústria devido à vasta abundância, boa relação custo-benefício, sustentabilidade e potencial biodegradabilidade em diferentes meios. Uma grande quantidade de estudos tem sido feita com foco em substituir materiais sintéticos por análogos de origem natural. Dentre os materiais naturais, os polissacarídeos se destacam, sendo os mais utilizados na indústria e os mais frequentemente reportados na literatura (XIE *et al.*, 2016; HASNAIN; NAYAK, 2019).

Na natureza, polissacarídeos podem ser encontrados em praticamente todos os organismos vivos, constituindo estruturas e tecidos diversos. Isso é possível devido à variedade macromolecular dos polissacarídeos, que possibilita diferentes organizações e propriedades, conferindo imunomodulação, antioxidação, efeito anti-inflamatório, antitumoral, entre outras atividades intrínsecas. Em termos gerais, polissacarídeos são polímeros cujas unidades repetitivas são monossacarídeos (ex. glicose, xilose, manose) ou dissacarídeos (ex. maltose, celobiose), que se encontram ligados por ligação glicosídica. As cadeias podem ser lineares ou ramificadas, constituídas de um único monômero ou de monômeros diferentes que se repetem a um determinado intervalo (XIE *et al.*, 2016; HASNAIN; NAYAK, 2019).

Os exopolissacarídeos (EPS) são um subgrupo composto por polissacarídeos produzidos por bactérias, fungos ou microalgas que exibem características físico-químicas bastante interessantes e peculiares. São, portanto, de interesse industrial, podendo ser usados como agentes espessantes, gelificantes ou estabilizantes em sistemas aquosos, nas áreas de alimentos, cosméticos, biomédica, entre outras. Embora ainda não se conheça completamente todas as funções fisiológicas, ações contra variações de temperatura e pH, desidratação, radiações UV, entre outras, têm sido atribuídas aos EPS (FREITAS *et al.*, 2017). Dentre os EPS de maior potencial pode-se citar a celulose bacteriana, os alginatos, a pululana, a xantana, a dextrana e a hialuronana (Figura 3).

Os EPS possuem características altamente desejáveis para serem aplicados em sistemas biomédicos, sendo biodegradáveis em meio fisiológico, não-tóxicos e a biocompatíveis; ademais, suas estruturas podem ser quimicamente modificadas pela presença de grupos funcionais reativos, principalmente hidroxilas (CARVALHO *et al.*, 2021a; HASNAIN; NAYAK, 2019).

Figura 3 - Estruturas de diferentes exopolissacarídeos.



Fonte: Próprio Autor.

As estruturas de polissacarídeos são diversas e complexas, entretanto a sua cadeia principal é composta pela combinação de unidades de monossacarídeos, principalmente glicose. Os polissacarídeos cuja cadeia principal é composta de glicose são chamados de glucanas; variando-se o monossacarídeo obtém-se as xilanas, mananas, galactanas, ou a combinação delas (ex. galactomananas) (THOMAS *et al.*, 2013; HASNAIN; NAYAK, 2019).

A cadeia principal dos polissacarídeos naturais pode ser quimicamente modificada e funcionalizada para a construção de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, com potencial de aplicação na produção de partículas e de outros dispositivos biomédicos. Assim, a partir de suas estruturas tridimensionais nativas, que já são bastante diversas, podem-se desenvolver géis e suportes (*scaffolds*) com estruturas macromoleculares moduláveis para aplicação em engenharia de tecidos, por exemplo (HASNAIN; NAYAK, 2019).

Os polissacarídeos de fontes microbianas podem ser produzidos de forma sustentável e economicamente viável a partir de sistemas de fermentação controlados que permitem a obtenção de altos rendimentos. Comparando com outros materiais de fontes naturais, EPS apresentam tempo de produção muito inferior e podem ser isolados com altíssima pureza (BHATIA, 2016; HASNAIN; NAYAK, 2019; FREITAS *et al.*, 2017).

Considerando a necessidade do desenvolvimento de alternativas sustentáveis aos materiais disponíveis atualmente, a utilização de polímeros naturais, em especial de polímeros microbianos, surge como algo promissor do ponto de vista ambiental, pois além das vantagens supracitadas, podem ser produzidos por via fermentativa a partir de resíduos agroindustriais. Trata-se de estratégia muito interessante, tendo em vista que a maioria dos processos industriais de produção de EPS utiliza glicose ou sacarose como fonte de carbono, que podem corresponder a até 30% dos custos totais. A indústria de alimentos produz uma enorme quantidade de resíduos durante o processamento, os quais podem ser utilizados como fonte alternativa de carbono e nitrogênio. Tanto resíduos agroindustriais quanto biomassa lignocelulósicas são matérias-primas economicamente viáveis para produção de glucanas, incluindo a pululana (FREITAS *et al.*, 2017; MISHRA; ZAMARE; MANIKANTA, 2018; WANI *et al.*, 2021). Porém nem todas as matérias-primas alternativas têm seus nutrientes diretamente disponíveis, o que requer etapas de pré-tratamento ou pré-processamento. Além desta restrição, a composição dos resíduos agroindustriais e a seleção dos microrganismos produtores são outros pontos de atenção (WANI *et al.*, 2021).

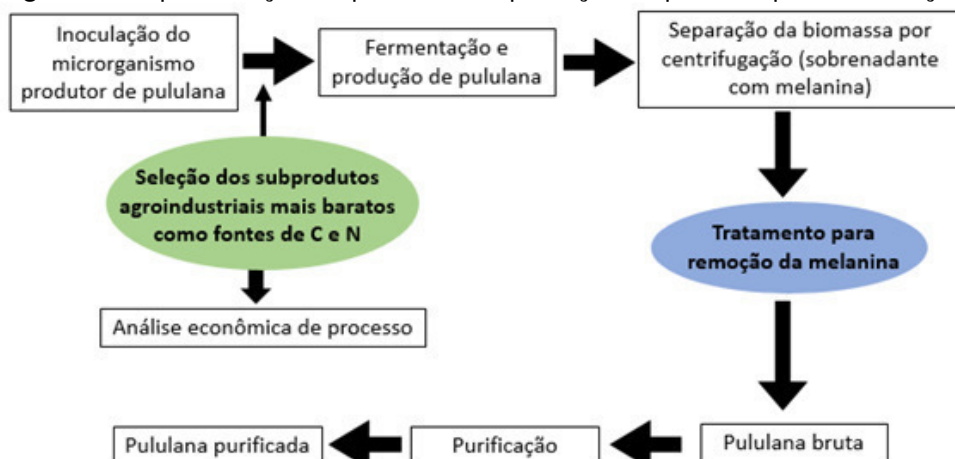
Quanto às condições de produção, cada microrganismo produtor tem características específicas, não havendo uma metodologia única que sirva para todos e garanta produção elevada. As bactérias são mais frequentemente estudadas para este propósito, pois têm tempo de geração menor e conseqüentemente levam a uma maior produtividade, porém a levedura *A. pullulans* (produtora da pululana) e o fungo *S. rolfsii* (produtor da escleroglucana) também são capazes de atingir alta produtividade. Diversos resíduos já foram estudados para composição de meio fermentativo, como melão de cana-de-açúcar, glicerol residual da produção de biodiesel, hidrolisados de palha ou de bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de polpa de frutas, soro de queijo, entre outros

(FREITAS *et al.*, 2017; HILARES *et al.*, 2019; WANI *et al.*, 2021). Freitas *et al.* (2017) listaram diversos trabalhos indicando diferentes microrganismos, os substratos utilizados, as diferentes condições empregadas, e os rendimentos obtidos de diferentes EPS; especificamente sobre produção de pululana, Wani *et al.* (2021) e Pandey *et al.* (2021) listaram dezenas de trabalhos usando subprodutos agroindustriais como principais matérias-primas.

3.4 Pululana

A pululana surge como um material muito promissor do ponto de vista ambiental, pois além de ser solúvel em água e apresentar biocompatibilidade e degradabilidade enzimática, gera compostos de degradação não-tóxicos e pode ser usada nas áreas cosmética, farmacêutica e de alimentos. Pululana é o nome usado para um grupo de α -glucanas com estruturas muito similares entre si, porém com algumas distinções quanto ao número de unidades de glicose no monômero e à presença de ligações glicosídicas específicas. É um exopolissacarídeo obtido por via fermentativa (Figura 4) usando principalmente o fungo *Aureobasidium pullulans*, mas outros microrganismos usados comercialmente para o mesmo propósito são *Cytaria spp.*, *Teloschistes flavicans*, *Rhodotorula bacarum* e *Cryphonectria parasitica* (SUGUMARAN; PONNUSAMI, 2017). Também são capazes de produzir pululana *Tremella mesenterica* (FRASER; JENNINGS, 1971), *Rhodototula bacarum* (CHI; ZHAO, 2003) e *Aspergillus japonicus* (MISHRA; SUNEETHA, 2014). O custo aproximado da pululana varia entre US\$33 e 40/kg (ALIBABA, 2022; INDIAMART, 2022).

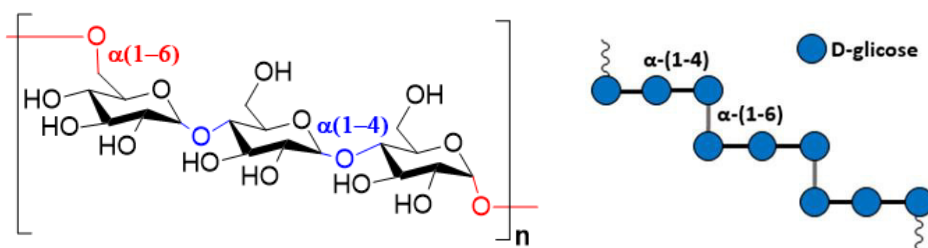
Figura 4 - Representação esquemática da produção de pululana por fermentação.



Fonte: adaptado de MISHRA, ZAMARE e MANIKANTA (2018).

Do ponto de vista molecular, a pululana é frequentemente definida como um homopolímero linear de D-glicose, não-ramificado, não-redutor e não-iônico, cuja unidade repetitiva é a maltotriose, conectada por ligação glicosídica α -(1-6) (Figura 5). Entretanto, alguns estudos indicam a presença de até 7% de unidades de maltotetraose dispersas aleatoriamente ao longo da cadeia polimérica, a presença ocasional de 2 a 5 unidades de glicoses, além de terem sido identificadas ligações α -(1-3), β -(1-3) e β -(1-6) na cadeia principal de pululanas produzidas por algumas cepas microbianas (MCINTYRE; VOGEL, 1991; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008; TIWARI *et al.*, 2019).

Figura 5 - Estrutura da pululana.



Fonte: Próprio autor.

A massa molecular média numérica da pululana (M_n) varia entre 45 e 600 kDa, e a massa molecular média ponderada (M_w) entre 362 e 480 kDa, com valores de polidispersidade (\mathcal{D}) entre 2,1 e 4,1. Outros polissacarídeos importantes industrialmente, como amilose e dextrana, possuem valores de polidispersidade consideravelmente maiores (OKADA *et al.*, 1990; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008; TIWARI *et al.*, 2019; SHINGEL, 2004; SINGH; KAUR; KENNEDY, 2019). Vários parâmetros de fermentação afetam a massa molecular média e o rendimento de produção de pululana, tais como a cepa de microrganismo, as técnicas de cultivo empregadas, o pH do meio, e o substrato utilizado. Por exemplo, em meio contendo frutose, a pululana produzida tem maior massa molecular média, e em meio contendo glicose o rendimento tende a ser maior. Para algumas cepas de *A. pullulans*, o meio contendo uma mistura de peptona, sulfato de amônio e ureia mostrou-se ideal para a obtenção de maiores rendimentos e valores de massa molecular média (WILEY *et al.*, 1993¹ apud SHINGEL, 2004).

¹ WILEY, B. J. *et al.* Control of molecular weight distribution of the biopolymer pullulan produced by *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Environmental Polymer Degradation**. v.1, p. 3–9, 1993.

Para algumas aplicações da pululana, como na encapsulação de fármacos e na indústria cosmética, é importante que sua massa molecular média seja elevada, e por isso é importante conhecer as diferentes formas de controlar o tamanho das cadeias. A presença das enzimas α -amilase, glicoamilase e isopululanase, que são naturalmente produzidas por alguns microrganismos, é responsável pela hidrólise da pululana e, conseqüente, pela redução da massa molecular média. Em estudos feitos usando organismos geneticamente modificados (OGMs) cujos genes que codificam estas enzimas foram removidos, pululanas de alta massa molecular média (maior que 1000 kDa) foram obtidas (WEI *et al.*, 2021).

Considerando todos esses aspectos, dificilmente pululanas de diferentes fornecedores serão iguais, havendo variações inclusive entre lotes de um mesmo fornecedor. O Quadro 2 mostra os principais parâmetros de controle de qualidade de pululanas comerciais.

Quadro 2 - Principais parâmetros de controle de qualidade da pululana.

Parâmetro	Especificação
Aparência	Pó branco ou branco amarelado
Solubilidade em água (25 °C)	Facilmente solúvel
pH da solução	5-7
Atividade óptica específica $[\alpha]_{D_2O}$ (1% em água)	Mínimo +160°
Umidade (perda em secagem)	Máximo de 6%
Massa molecular (faixa)	45-600 kDa
Polipeptídios	Máximo de 0,5%
Resíduo mineral-cinzas (sulfatada)	Máximo de 3%

Fonte: adaptado de SINGH, SAINI e KENNEDY (2008); SINGH, KAUR e KENNEDY (2019).

Devido aos tipos de ligações glicosídicas, α -(1-4) e α -(1-6), e à regularidade com que se alternam na cadeia, a conformação da pululana exhibe um formato “em escada” com alta flexibilidade, possibilitando que assumam conformação de *random coil* (bobina aleatória, em tradução livre), quando em solução. A mobilidade, entretanto, não é uniforme ao longo da cadeia polimérica, mas centrada nas ligações α -(1-6), as quais reduzem o grau de restrição de rotação livre, aumentando a flexibilidade da cadeia (OKADA; MATSUKAWA; WATANABE, 2002; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). Devido a essa distribuição das ligações na cadeia, a

pululana é um intermediário entre a dextrana e a amilose em termos de similaridade estrutural (PETROV *et al.*, 2002).

Essas características estruturais conferem à pululana alta hidrofiliçidade, alta ocorrência de ligações de hidrogênio intramoleculares e alta taxa de retenção de água (TABASUM *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2017), produzindo um caráter de alta interatividade com água – não chegando, entretanto, a ser considerado o mesmo da higroscopicidade (SINGH *et al.*, 2017; LEATHERS, 2003). Também como consequência estrutural, a pululana apresenta baixa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, devido às propriedades hidrodinâmicas decorrentes da flexibilidade da cadeia (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008; TABASUM *et al.*, 2018). A pululana é solúvel em água, em solução alcalina diluída, em dimetilsulfóxido (DMSO), em dimetilformamida (DMF), e em piridina (SINGH *et al.*, 2017). Experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) demonstraram que, quando em solução, cada unidade de glicose da pululana está envolvida por 13 moléculas de água (OKADA; MATSUKAWA; WATANABE, 2002). A solubilidade da cadeia em diferentes solventes, contudo, pode ser modificada e ampliada por meio de modificações químicas (derivatização) (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008; TIWARI *et al.*, 2019).

A pululana *in natura* é difícil de processar pelos métodos convencionais de fusão sem o emprego de auxiliares de processamento, uma vez que sua estrutura começa a degradar termicamente em valores próximos de 250 °C, sem o claro aparecimento de temperatura de transição vítrea (T_g) ou de temperatura de fusão cristalina (T_m) durante o aquecimento (SHIBATA *et al.*, 2001). A temperatura de transição vítrea relatada para pululana é 178 °C (RATTO; SCHNEIDER, 1998² *apud* SHIBATA *et al.*, 2001).

Assim como acontece com todos os demais polímeros, a massa molecular média da pululana influencia diretamente suas propriedades reológicas e mecânicas. A pululana se dissolve facilmente em água formando uma solução viscosa que se comporta como fluido newtoniano quando em baixa concentração

² RATTO, J. A.; SCHNEIDER, N. The effect of water interactions on the thermal transition behavior of pullulan. **Polymeric Materials Science and Engineering**, v. 79, p. 469-470, 1998.

(4% m/m) e se torna um líquido viscoelástico quando se adiciona outro polissacarídeo na mesma concentração. A solução de pululana possui alta estabilidade, não sofrendo alteração devido a mudanças de pH ou de temperatura (OKADA; MATSUKAWA; WATANABE, 2002; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008; TIWARI *et al.*, 2019).

Outras propriedades únicas e interessantes que a pululana possui são sua excelente adesividade, capacidade de formar filmes, e aptidão a formar barreiras eficientes à difusão de oxigênio, as duas últimas sendo especialmente úteis na área de embalagens alimentícias (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). Devido à resistência à hidrólise enzimática em mamíferos, quando ingerida por humanos, a pululana tem função de fibra alimentar, pode ser utilizada na composição de alimentos dietéticos, e possui efeito prebiótico, pois estimula o crescimento de bifidobactérias benéficas (OKADA *et al.*, 1990; YONEYAMA *et al.*, 1990; MITSUHASHI; YONEYAMA; SAKAI, 1990; WOLF, 2005). Kycia *et al.* (2020) comprovaram o potencial da pululana de aumentar a viabilidade de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em iogurtes com baixo teor de gordura (adição de 1,5-2% de pululana tiveram os melhores resultados) durante o armazenamento, além de melhorar aspectos como viscosidade e cremosidade.

Na indústria alimentícia, soluções de pululana podem ser usadas como ligantes e estabilizantes em pastas alimentícias, melhorando a estabilidade e a textura de alimentos como maionese; também podem ser usadas como substituintes do amido, pois conseguem fornecer várias características desejáveis como consistência, dispersibilidade e retenção de umidade, quando usadas em alimentos sólidos e líquidos. A pululana também pode aumentar a vida de prateleira de alimentos, por não ser prontamente assimilável pela maioria dos fungos, leveduras e bactérias de degradação de alimentos, e por possibilitar uma maior retenção de umidade quando comparada ao amido, retardando o ressecamento do alimento (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). Filmes finos de pululana podem ser usados para preservar propriedades de alimentos, como vitaminas e gorduras que são facilmente oxidadas, devido às boas propriedades mecânicas e de barreira ao oxigênio, para controlar o crescimento microbiano, para retardar a maturação ou envelhecimento, e para preservar as propriedades organolépticas; e, como estes filmes se dissolvem facilmente em água, podem ser usados como recobrimento

comestível de uma enorme variedade de alimentos, tais como frutas, legumes, ovos, carne crua, incluindo desidratados, como nozes, vegetais e frutas (KROCHTA; DE MULDER-JOHNSTON, 1997; WANI *et al.*, 2021).

Na indústria farmacêutica, três das características da pululana bastante utilizadas são a adesividade, a formação de filmes e a baixa permeabilidade ao oxigênio. As duas primeiras têm sido exploradas na área de cuidados dentários, como adesivo para dentaduras, enquanto para recobrimento de comprimidos e pílulas, a capacidade de impedir (ou minimizar significativamente) a passagem de oxigênio evita o escurecimento e aumenta o tempo de prateleira (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). Pululana de baixa massa molecular (na faixa de 30 a 90 kDa) pode ser utilizada como expansor de volume plasmático sanguíneo em substituição à dextrana (SHINGEL, 2004). Quando quimicamente modificada, as possibilidades de aplicação da pululana se expandem enormemente para diversas áreas, e algumas delas estão listadas no Quadro 3.

Quadro 3 - Diferentes aplicações de pululana modificada em sistemas biomédicos.

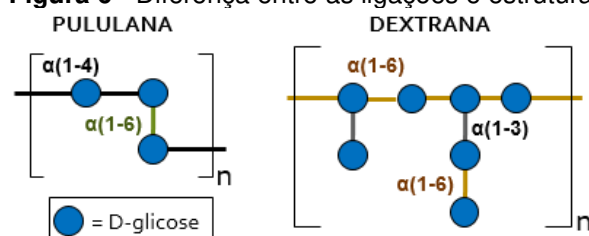
Aplicações	Derivado	Princípio ativo	Referência
Curativo	Nanofibras de compósito de pululana-quitosana	Ácido tânico	XU <i>et al.</i> , 2015b
Reparo ósseo	Microesferas de pululana-dextrana como suporte	Hidroxiapatita nanocristalina	SCHLAUBITZ <i>et al.</i> , 2014
Reparo ósseo	Matriz de pululana-dextrana como suporte	Hidroxiapatita nanocristalina	FRICAIN <i>et al.</i> , 2013
Direcionamento de fármacos	Nanopartículas de Pululana-colesteril	Insulina Docetaxel Doxorrubicina	AKIYOSHI <i>et al.</i> 1998 SATOH <i>et al.</i> , 2008 LI <i>et al.</i> , 2014
Tratamento de câncer	Nanogel de pululana conjugada com ácido retinoico (ATRA)	Doxorrubicina	LEE <i>et al.</i> , 2013b
Tratamento de câncer	Nanoesferas de pululana-g-PLGA	Adriamicina	JEONG <i>et al.</i> , 2006
Tratamento de HIV	Nanopartículas de pululana acetato	Lopinavir	RAVI <i>et al.</i> , 2014

Fonte: Próprio autor.

3.5 Modificações químicas da pululana visando encapsulação de compostos ativos

Uma grande vantagem da modificação química de polissacarídeos é o fato de que, geralmente, as reações podem ser transpostas de um polissacarídeo para outro conforme as similaridades de suas estruturas, possibilitando produzir uma gama de macromoléculas com ligeiras diferenças em suas características finais. Por exemplo, dextrana e pululana são bastante similares em termos de composição monomérica (Figura 6), porém, em função do tipo de ligação glicosídica, a dextrana apresenta uma estrutura mais flexível, enquanto a pululana uma estrutura mais rígida e com conformação helicoidal semelhante à amilose. A pululana também apresenta maior degradabilidade enzimática relativa, além de ter demonstrado hemocompatibilidade e afinidade por células do fígado, sendo capaz de interagir com os receptores de asialoglicoproteína dos hepatócitos (STENSGAARD DIGET *et al.*, 2019; BRUNEEL; SCHACHT, 1995; MAITI; JANA, 2019).

Figura 6 - Diferença entre as ligações e estrutura presentes na dextrana e na pululana.



Fonte: Próprio autor.

A presença de diferentes grupos funcionais, principalmente hidroxilas, e de diferentes tipos de ligações glicosídicas em polissacarídeos, é responsável pelas peculiaridades de cada biomolécula, bem como pela existência de diferentes sítios com reatividades diferentes. De forma específica, a pululana apresenta 9 grupos hidroxila por unidade de repetição disponíveis para substituição. A reatividade de cada hidroxila varia de acordo com a polaridade dos solventes e com os reagentes empregados, sendo a hidroxila do C₆ a mais reativa (SHINGEL, 2004; CARVALHO *et al.*, 2022).

As potenciais aplicações da pululana podem aumentar consideravelmente tendo em vista a ampla gama de possibilidades de modificações químicas, que visam melhorar e/ou adicionar novas propriedades ao polímero. Diversos tipos de modificação química em pululana já foram reportados, como oxidação (BRUNEEL;

SCHACHT, 1993a) carbonação (BRUNEEL; SCHACHT, 1993b), succinilação (BRUNEEL; SCHACHT, 1994), produção de derivados de palmitoil e colesteil (NISHIKAWA; AKIYOSHI; SUNAMOTO, 1994), fotoimobilização (HASUDA *et al.*, 2005), entre outras. Dentre as diversas modificações, a enxertia tem sido extensamente estudada (SINGH *et al.*, 2017).

3.5.1 Modificações por enxertia

Uma forma de conferir, a um único material, características intermediárias de diferentes polímeros, é recorrer a técnicas de copolimerização. A enxertia corresponde a um tipo específico de copolimerização, em que ramificações de um ou mais blocos de polímero (*graft copolymer*) estão conectadas a uma cadeia principal (*backbone*). A enxertia pode ser de dois tipos: “*grafting-from*” ou “*grafting-to*”, sendo que, no primeiro caso, as cadeias enxertadas são crescidas a partir de sítios ativos na cadeia principal, e no segundo, cadeias pré-formadas são conectadas a ela. As características desse tipo de copolímero são extremamente dependentes das características estruturais inerentes da cadeia principal e também do tipo de monômero usado no enxerto e suas características, da taxa e eficiência de enxertia, e da distribuição dos enxertos ao longo da cadeia principal. As características físicas e químicas dos copolímeros enxertados são afetadas pela presença de grupos funcionais polares, pelo aumento da massa molecular média e pela rigidez da cadeia principal (NAYAK *et al.*, 2018; ALY; EL-BISI, 2018).

Diferentes tipos de aplicações podem ser desenvolvidos por meio de enxertia. Uma vasta gama de trabalhos na literatura reporta enormes avanços focando, especificamente, no uso de polissacarídeos como cadeia principal, visando aplicações biomédicas (Quadro 4).

Um dos enxertos comuns utilizados na preparação de materiais para sistemas de liberação é o polietilenoglicol (PEG), por ser um polímero hidrofílico e biocompatível, de cadeia flexível, solúvel em água e não-iônico; pode ser utilizado como recobrimento em nanopartículas, em processo comumente chamado de PEGuilação.

Quadro 4 - Diferentes aplicações de copolímeros de enxertia usando polímeros naturais como cadeia principal.

Aplicação	Derivado	Princípio ativo	Referência
Liberação controlada	Nanopartículas de pululana acetato- <i>g</i> -PEG	Clonazepam	JUNG <i>et al.</i> , 2004
Carreador de gene	Nanopartículas de pululana- <i>g</i> -PLL	DNA plasmidial pEGFP-N1	PARK <i>et al.</i> , 2012
Liberação controlada	Nanopartículas de pululana- <i>g</i> -PCL	Indometacina	CARVALHO <i>et al.</i> , 2021b.
Liberação controlada	Nanopartículas de pululana- <i>g</i> -pNIPAM	Indometacina	CONSTANTIN <i>et al.</i> , 2017
Suporte para crescimento celular	Exopolissacarídeo HE800- <i>g</i> -PHBV	-	LEMECHKO <i>et al.</i> , 2013
Carreador	Nanopartículas MOF revestidas com dextrana- <i>g</i> -PEG/ alendronato	-	CUTRONE <i>et al.</i> , 2019
Tratamento de doenças cardiovasculares	Nanopartículas de quitosana- <i>g</i> -PEG	Estreptoquinase	BAHARIFAR <i>et al.</i> , 2020
Liberação controlada	Nanopartículas catiônicas de pululana-DEAE- <i>g</i> - PZLL	-	CARVALHO <i>et al.</i> , 2022.
Curativo com liberação controlada	Hidrogel de pululana enxertada com ácidos acrílico e itacônico e reticulada	Ampicilina	MERT; ÖZKAHRAMAN; DAMAR, 2020.
Liberação transdérmica controlada eletricamente	Hidrogel de poli(acrilamida)- <i>g</i> -pululana recoberto com filme de pululana-PVA	Rivastigmina tartarato	PATIL <i>et al.</i> , 2020.

Fonte: Próprio autor.

Tais características aumentam a solubilidade dos copolímeros ou compostos a ele conectados, melhoram o perfil farmacológico de fármacos, e auxiliam na diminuição da taxa de eliminação sanguínea (*clearance rate*) (HONS, 2010; BISWAS *et al.*, 2016).

A PEGuilação também impede agregação, reduz a imunogenicidade, ajuda a evitar a captura pelo sistema reticuloendotelial e a fagocitose; porém, também pode levar a um aumento no tempo de liberação do fármaco devido à barreira de difusão formada pela camada de PEG (TU *et al.*, 2017; SUK *et al.*, 2016). Existem

vários trabalhos que combinam PEG com outros polímeros para formar micelas, como poliésteres (ex. PLA, PLGA, PCL) e poliaminoácidos (ex. poli(lisina), poli(histidina), poli(ácido aspártico)) (BISWAS *et al.*, 2016).

A poli(lisina) (pLys ou PLL) faz parte de uma classe chamada de peptídeos penetradores de célula (CPP, em inglês), que são compostos catiônicos, capazes de atravessar a membrana celular por meio de mecanismos diversos (de acordo com o tipo de CPP e com o composto carregado), possibilitando o transporte de macromoléculas conectadas para dentro das células eucarióticas (HONS, 2010). Nanopartículas do tipo núcleo-casca foram produzidas por Jiang *et al.* (2015) usando PEG e PLL, sendo o núcleo um complexo poli-iônico neutralizado formado pelas cadeias da PLL – contendo grupos NH carregados – e regiões negativas de uma enzima antioxidante, e a casca composta por cadeias de PEG. Os resultados demonstraram que tais partículas sofriam acumulação em vasos sanguíneos feridos após acidentes vasculares, sendo, portanto, uma nova forma específica de entrega de terapêuticos em regiões com dano vascular.

Enxertos de poli(lisina) foram utilizados para preparar um copolímero a partir de pululana (Pul-*g*-PLL) com capacidade de autoagregação em água. Nos testes destas micelas como carreadoras de gene *in vitro* utilizando células HepG2, não foi observada citotoxicidade (PARK *et al.*, 2012), e a viabilidade celular foi mantida próxima de 100%, o que contrasta com o valor de 60% encontrado para os complexos usando poli(lisina) pura (CHAE *et al.*, 2005). Carvalho *et al.* (2022) também demonstraram a ausência de citotoxicidade do copolímero Pul-DEAE-PZLL utilizando células L929 MEF em testes *in vitro*, indicando o alto potencial de aplicação de copolímeros de pululana enxertada com poli(lisina).

Poliaminoácidos podem ser utilizados como núcleo hidrofóbico em micelas e apresentam vantagens como biocompatibilidade, biodegradabilidade e facilidade de funcionalização (devido à presença de uma variedade de grupos ativos) e de conjugação com fármacos.

Apesar destas vantagens do uso de PEG e poli(lisina) na produção de copolímeros, ainda não há trabalhos que apliquem ambos como enxertos em pululana.

3.5.2 Nanomedicina, sistemas micro e nanoparticulados e encapsulação de indometacina

Nanomedicina é definida como o *design* e o desenvolvimento de agentes terapêuticos e/ou de diagnóstico em escala nanométrica, que podem ser transportados em sistemas biológicos e entregues em locais delimitados para tratamento, prevenção ou diagnóstico de doenças (SANNA; PALA; SECHI, 2014). Recentemente, a tecnologia de desenvolvimento de micropartículas e nanopartículas tem sido desenvolvida como plataforma de sistemas de liberação de fármacos. Nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais de aproximadamente 100-500 nm, enquanto micropartículas variam de 0,1 a 100 µm, embora o tamanho exato de transição de um tipo para o outro ainda esteja em discussão. Quanto às vantagens de cada tecnologia, as micropartículas são ideais para períodos mais longos de liberação (semanas a meses), suas formulações são administradas via injeção intramuscular ou subcutânea; as nanopartículas são normalmente escolhidas quando se deseja o direcionamento do fármaco, já que podem ser preparadas com propriedades particulares de acordo com sua aplicação, e também devido às suas características ótimas de carregamento e liberação (CASTRO *et al.*, 2022; VERT *et al.*, 2012; SHARIATINIA, 2021; SHAH *et al.*, 2021).

A preparação de carreadores leva em consideração diversos aspectos, como as características do fármaco a ser transportado, a biocompatibilidade e a capacidade dos carreadores de superar as barreiras biológicas, o direcionamento desejado, a toxicidade do material que os compõem, e como a forma e o tamanho dos carreadores afeta sua atuação (SHAH *et al.*, 2021). Como o efeito terapêutico do fármaco depende de sua biodisponibilidade, que por sua vez depende das propriedades físico-químicas, a encapsulação é uma das estratégias para combater a baixa solubilidade em meio fisiológico, que é uma das limitações comuns de alguns fármacos (HIPÓLITO-NÁJERA *et al.*, 2019) como, por exemplo, a indometacina (INDO).

A INDO pertence à classe dos antiinflamatórios não esteróides (AINEs), que são estruturalmente diversos e amplamente utilizados para tratar inflamações, dores e febre. Eles inibem a enzima ciclooxigenase (COX), que catalisa a

biossíntese de prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos). A maioria dos AINEs são não-seletivos, como a INDO, a aspirina, o ibuprofeno, e inibem a atividade da COX-1 e da COX-2, enquanto alguns são seletivos para COX-2, como o celecoxibe (TSUNODA *et al.*, 2021; VALENTOVIC, 2007). A INDO é um antiinflamatório mais potente do que a aspirina, sendo prescrita para artrite reumatóide, osteoartrite, bursite, entre outros. Além disso, vem ganhando atenção de pesquisadores como um possível tratamento ou terapia adjuvante para SARS-CoV-2/COVID-19 (DANDIC, 2022).

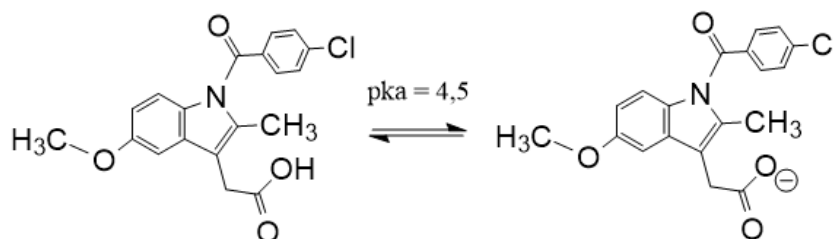
Contudo a sua administração a longo prazo pode causar efeitos adversos graves levando à falta de adesão do paciente ao tratamento, limitando a sua aplicação. Entre estes, pode-se citar problemas gastrointestinais e relacionados ao sistema nervoso central, como sangramento gastrointestinal, dor abdominal, náusea, tontura, sonolência, insônia, distúrbio psíquico, erupções cutâneas, dor de cabeça (VALENTOVIC, 2007; HIPÓLITO-NÁJERA *et al.*, 2019; DOUGHERTY, 2021).

A INDO possui alta permeabilidade através das membranas intestinais, porém sua solubilidade em água é muito limitada ($< 0,01$ mg/L), o que torna a sua encapsulação uma via possível para potencializar suas aplicações (HIPÓLITO-NÁJERA *et al.*, 2019). Além disso, sabe-se que micelas poliméricas autoagregadas podem atuar como solubilizantes potentes para medicamentos da classe II (aqueles que possuem alta permeabilidade e baixa solubilidade). Isto é especialmente importante porque estas características são centrais para melhorar a eficácia terapêutica dos medicamentos administrados por via oral (GAUCHER *et al.*, 2010; LAHA *et al.*, 2019).

Quanto à solubilidade da indometacina, das duas formas polimórficas mais comuns (α e γ) a forma cristalina menos solúvel é a γ , enquanto a forma amorfa é muito mais solúvel. A determinação da solubilidade da INDO amorfa (sua concentração) é difícil devido à sua tendência a cristalizar rapidamente em contato com a água. A INDO amorfa exibe um pico de concentração em água a 25 °C em 10-20 min (cerca de 5 vezes maior que a forma γ -cristalina), caindo significativamente após 40 min (KANENIWA *et al.*, 1985; MURDANDE *et al.*, 2010). Considerando seu $pK_a = 4,5$, em meio biológico coexistem as formas protonada

(Indo-H) e aniônica (Indo⁻), sendo a forma aniônica a mais presente (Figura 7) (HIPÓLITO-NÁJERA *et al.*, 2019).

Figura 7 – Indometacina: forma protonada e forma aniônica.



Fonte: Próprio autor.

O potencial farmacológico dos medicamentos é limitado pela fraca solubilidade em água e, como nos últimos anos, a maioria dos novos medicamentos apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, diferentes abordagens têm sido estudadas para resolver esta questão, como a encapsulação utilizando nanopartículas, micelas, microemulsões, nanocristais de fármacos, entre outros. Algumas das vantagens da encapsulação em nanopartículas são o aumento da solubilidade do medicamento, a entrega sustentada, a proteção contra atividade enzimática e uma melhor estabilidade do medicamento (BHALANI *et al.*, 2022).

Carvalho *et al.* (2020, 2021b) prepararam copolímeros anfifílicos de pululana-*g*-PCL para a preparação de nanopartículas carregadas de INDO (169-367 nm) (com eficiência de encapsulação de 35%), que exibiram um perfil de liberação sustentado adequado em comparação à INDO livre, de modo que a forma encapsulada demorou o dobro do tempo para atingir 100% de dissolução do medicamento livre. A viabilidade celular foi testada utilizando fibroblastos embrionários murinos na presença do copolímero e suas NPs, e os resultados atenderam aos critérios de aceitação (viabilidade celular > 70%) para concentrações de até 100 µg/mL.

É possível preparar carreadores que também respondam a alterações externas de acordo com cada aplicação utilizando propriedades físico-químicas das próprias partículas carreadoras, como resposta a alterações no pH do meio, concentração de enzimas ou gradientes redox, temperatura, campo magnético, ultrassom, e pulsos leves ou elétricos, de modo a melhorar a eficácia dos tratamentos (MURA; NICOLAS; COUVREUR, 2013). Tais polímeros que respondem a estímulos são denominados inteligentes (*smart polymers*). Muitos

estudos relatam a possibilidade de melhoria significativa no desempenho da liberação de princípios ativos a partir desses estímulos (WANG *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2006; HE; LIU; LIN, 2015; WANG *et al.*, 2021; GHOSH; BISWAS, 2021). Outras abordagens envolvem modificação das partículas utilizando sinalizadores biológicos para que haja reconhecimento específico em determinadas células, direcionando a atuação do fármaco no local desejado. Por exemplo, a pululana pode ser utilizada na superfície de nanopartículas para promover direcionamento ativo, uma vez que interage com receptores da asialoglicoproteína nas membranas de células hepáticas (DAVIS, CHEN, SHIN, 2008; FAROKHZAD, LANGER, 2009; SANNA, PALA, SECHI, 2014; LI *et al.*, 2014).

Estes carreadores podem ser produzidos usando diversos materiais inorgânicos ou orgânicos, como nanotubos de carbono, pontos quânticos de materiais mesoporosos, polímeros, dendrímeros e lipídeos. São materiais que podem se organizar em diferentes nanoestruturas como micelas, vesículas, nanopartículas poliméricas, lipossomos, poliplexos e conjugados, os quais podem estar conjugados quimicamente ou complexados, ou podem atuar como cápsulas físicas para o ingrediente ativo (SHARIATINIA, 2021). O uso combinado de nanopartículas para encapsulação e liberação controlada de fármacos tem sido amplamente estudado, bem como sua aplicação na terapia-alvo, pois a possibilidade de customização dessas nanopartículas por meio de modificações superficiais as torna ainda mais eficientes e específicas, ampliando a gama de aplicações (LEE; YUN; PARK, 2015; XU *et al.*, 2015a; KANDASAMY; MAITY, 2021; GANIE; RATHER; LI, 2021; LI *et al.*, 2021).

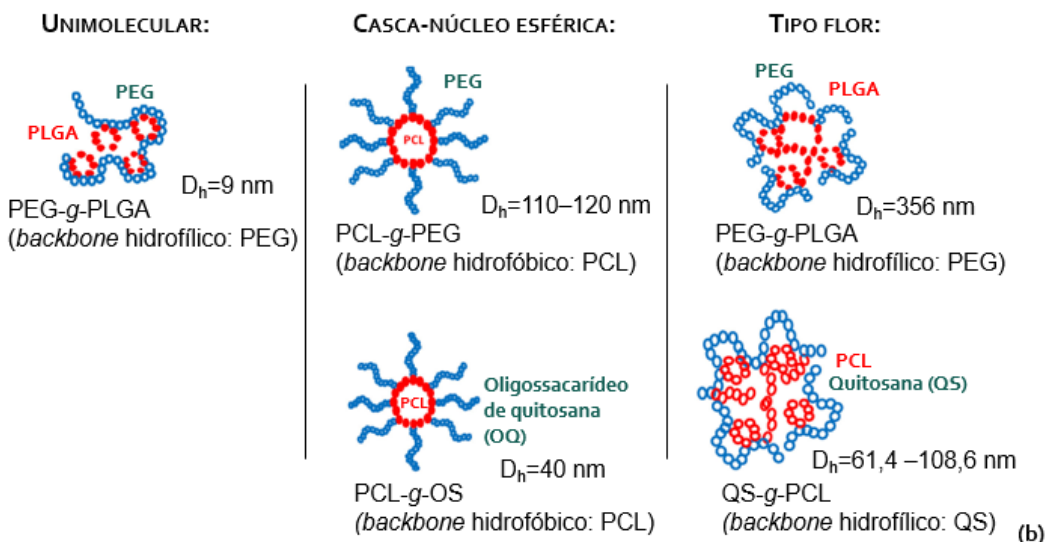
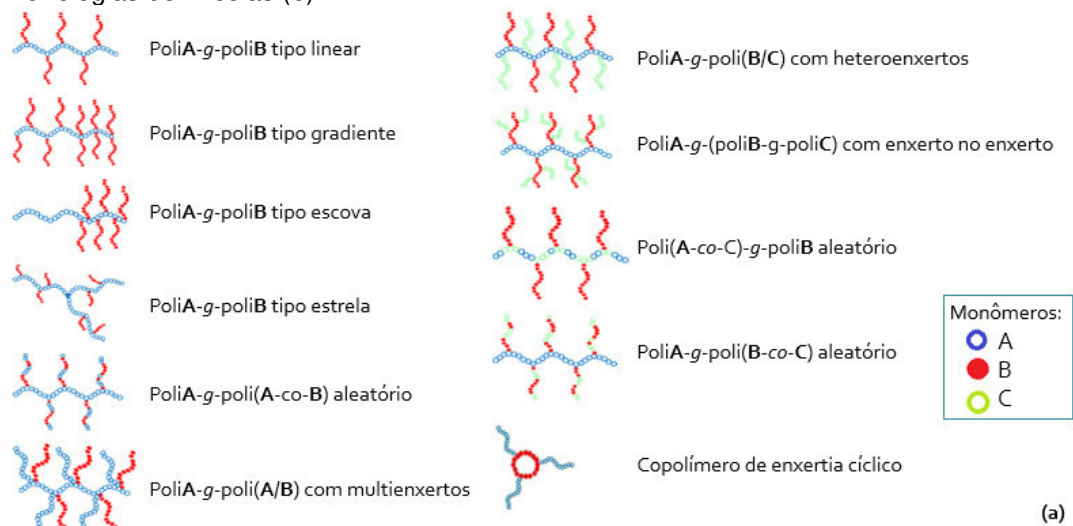
Entre as vantagens mais relevantes para a utilização de nanopartículas destaca-se a possibilidade de realizar múltiplas modificações em suas superfícies utilizando ligantes-alvo, o que torna o transporte mais eficiente em ambiente fisiológico, melhorando a migração para o interior das células e garantindo taxas constantes de liberação do fármaco (XU *et al.*, 2015a).

3.5.3 Produção de partículas via autoagregação

A técnica preferível para preparação de sistemas micelares usando copolímeros anfífilos (Figura 8a), principalmente em água, é a diálise. Apesar de

ser demorada, tem como vantagens a simplicidade e a não-formação de agregados. A formação de micelas ocorre quando a concentração do polímero se encontra acima da concentração micelar crítica (CMC), levando-o a se autoagregar em micelas. Os fatores que influenciam esse processo são o tamanho da sequência hidrofóbica em relação à hidrofílica, a temperatura e o solvente utilizado. Copolímeros de enxertia ou de bloco geralmente se autoagregam formando micelas esféricas, porém a morfologia micelar pode variar de acordo com a densidade dos enxertos (ATANASE; DESBRIERES; RIESS, 2017). Sabe-se que copolímeros anfífilicos cuja estrutura principal (*backbone*) é hidrofílica e as cadeias laterais são hidrofóbicas têm uma tendência marcante em formar micelas com configuração do tipo flor (Figura 8b) (MENG *et al.*, 2018; ATANASE; DESBRIERES; RIESS, 2017).

Figura 8 - Diferentes estruturas de copolímeros de enxertia anfífilicos (a) e exemplos de morfologias de micelas (b).



Fonte: Adaptado de ATANASE; DESBRIERES; RIESS, 2017.

No processo de autoagregação em água, a interação entre as regiões hidrofóbicas de macromoléculas anfifílicas leva a uma diminuição da energia livre do sistema. Então, essas regiões se organizam formando o núcleo hidrofóbico, enquanto as regiões hidrofílicas permanecem em contato com o meio externo servindo de “casca” estabilizadora. Porém, não apenas as interações hidrofóbicas são importantes em se tratando de processos de encapsulação, mas também as interações hidrofílicas com a cadeia principal. Por exemplo, nanopartículas de pululana-colesteril (CHP, em inglês) tem ótima aplicação para encapsular macromoléculas anfifílicas, como proteínas globulares solúveis (AKIYOSHI *et al.*, 1996).

Outra aplicação de CHP modificada com grupos amino possibilitou a produção de nanopartículas ($d = 20\text{-}30\text{ nm}$) para sistema de liberação de Docetaxel com resultados melhores do que a aplicação do fármaco sozinho, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SATO, 2008). Enquanto na encapsulação física tradicional, a quantidade de fármaco encapsulado é relativamente baixa (ca. 5%), uma alternativa possível para elevar essa taxa para acima de 10% é por meio de conjugação do fármaco ao carreador (MENG *et al.*, 2018).

Copolímeros catiônicos de pululana modificada com dietiletilamina (DEAE) e enxertada com diferentes teores de PZLL foram estudados por Carvalho *et al.* (2022) e se demonstraram como potenciais materiais para aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos, uma vez que não afetaram significativamente a viabilidade celular mesmo após 72h de contato com as células L929 MEF *in vitro*.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

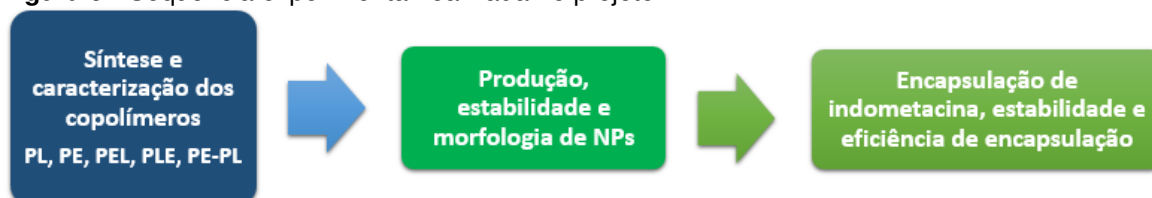
4.1 MATERIAIS

A pululana (Hayashibara, grau alimentício, Mn = 120 kDa) foi cedida gentilmente pela Dinaco, Brasil, e usada como recebida. Poli(etilenoglicol) hidroxilado (mPEG-OH 5000 kDa e mPEG-OH 2000 kDa, Sigma-Aldrich), fenilisocianato (FI, 99%, Sigma-Aldrich), 4,4'-diisocianato de difenil metileno (MDI, 98%, Sigma-Aldrich), hexametileno diisocianato (HDI, ≥99%, Sigma-Aldrich), L-lisina-Z-NCA (Lis-Z-NCA, >97%, AEchem Scientific Corporation), pireno (98%, Sigma-Aldrich), indometacina (>99%, Sigma-Aldrich), etanol (99,5% Synth), acetona (99,5%, Dinâmica), éter de petróleo (30-70, 100%, Sigma-Aldrich), tolueno (P.A., Synth), acetato de etila (99%, Synth), clorofórmio (100%, PA, Synth), metanol (99,8%, Synth), tetrahidrofurano (100%, PA, Synth), hexano (99%, Synth), dimetilsulfóxido (DMSO, P.A., Synth), diclorometano (DCM, 99% Synth), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆, 99%, Sigma-Aldrich), clorofórmio deuterado (CDCl₃, 99%, Sigma-Aldrich) foram utilizados sem qualquer tratamento prévio. Membrana de diálise Spectra/Por® MWCO = 6-8 kDa (Spectrum Laboratories Inc.).

4.2 METODOLOGIA

Para alcançar os objetivos propostos no presente trabalho, seguiram-se as etapas ilustradas no fluxograma apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Sequência experimental realizada no projeto.



Fonte: Próprio autor.

Foram sintetizados copolímeros diferentes a partir da enxertia de cadeias de poli(Z-lisina) (PZLL) e de PEG na cadeia principal da pululana. Os copolímeros contendo Pul e PZLL (Pul-g-PZLL) foram chamados de PL, aqueles contendo Pul e PEG (Pul-g-PEG) foram chamados de PE e, finalmente, os contendo Pul, PEG e

PZLL foram preparados usando condições diferentes e, portanto, foram chamados de: PEL, PLE (conforme a sequência em que as reações de enxertia foram realizadas), e PE-PL (copolímero reticulado a partir de PE e PL).

A etapa de enxertia do PEG necessitou de um estudo preliminar de inserção dos grupos reativos isocianato nas cadeias de pululana usando fenilisocianato (Pul-FI) e nas cadeias de PEG usando MDI e HDI (PEG-NCO). A Tabela 1 apresenta as siglas e as condições experimentais utilizadas em cada reação de enxertia e a Figura 10 ilustra as estruturas dos copolímeros.

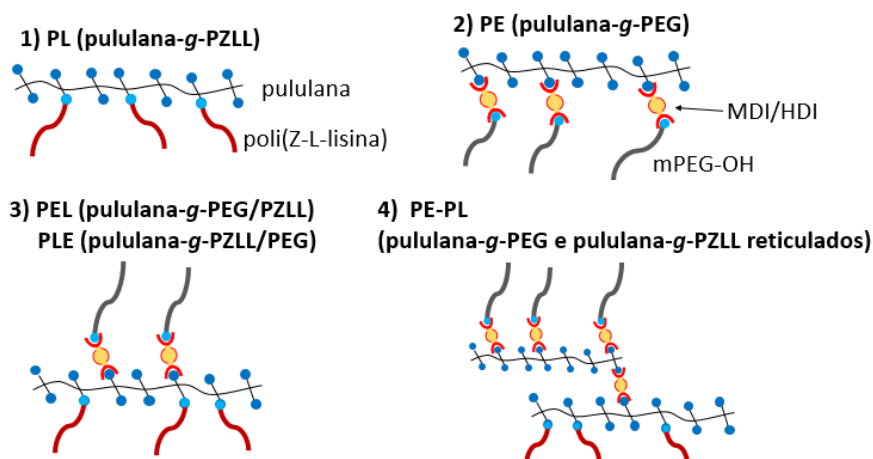
Tabela 1 - Siglas e condições experimentais utilizadas nas sínteses dos copolímeros.

Sigla	Copolímeros sintetizados e condições experimentais
PL	Pululana- <i>g</i> -PZLL (DMSO, t.a., 24 h, 400 rpm)
Pul-FI	Pululana funcionalizada com fenilisocianato (DMSO, tolueno, 65 °C, 24 h, 400 rpm)
PEG-NCO	PEG funcionalizado com MDI (PEG-NCO-1) (tolueno, 80 °C, 3 h, 400 rpm) PEG funcionalizado com HDI (PEG-NCO-2) (tolueno, 70 °C, 1 h, 400 rpm)
PE	Pululana- <i>g</i> -PEG (MDI) (DMSO, tolueno, 70 °C, 48 h, 650 rpm) Pululana- <i>g</i> -PEG (HDI) (DMSO, 70 °C, 25 h, 650 rpm)
PEL	Pululana- <i>g</i> -PEG/PZLL Etapa 1: Pululana- <i>g</i> -PEG (HDI, DMSO, 70 °C, 24 h, 650 rpm); Etapa 2: enxertia da PZLL (t.a., 24 h, 400 rpm).
PLE	Pululana- <i>g</i> -PZLL/PEG Etapa 1: Pululana- <i>g</i> -PZLL (DMSO, t.a., 24 h, 400 rpm).; Etapa 2: enxertia do PEG (HDI, 70 °C, 4/16 h, 650 rpm).
PE-PL	Pululana- <i>g</i> -PEG e Pululana- <i>g</i> -PZLL reticulados Etapas 1 e 2: Copolímeros pululana- <i>g</i> -PZLL e pululana- <i>g</i> -PEG, feitos separadamente; Etapa 3: formação das reações entrecruzadas entre os dois copolímeros usando HDI (DMSO, 70 °C, 1 h, 650 rpm).

Fonte: Próprio autor.

Após a síntese, os copolímeros foram caracterizados quanto à sua estrutura por RMN, FTIR e DSC, e seu comportamento de autoagregação foi avaliado por CMC. Foram produzidas partículas destes copolímeros por diálise, seu diâmetro, polidispersidade e estabilidade foram avaliados por DLS e sua morfologia por AFM. As formulações com menor variação de tamanho e menor polidispersidade foram utilizadas para fazer encapsulação de indometacina, a eficiência de encapsulação foi avaliada por espectroscopia UV-Visível.

Figura 10 - Representação esquemática dos copolímeros sintetizados.



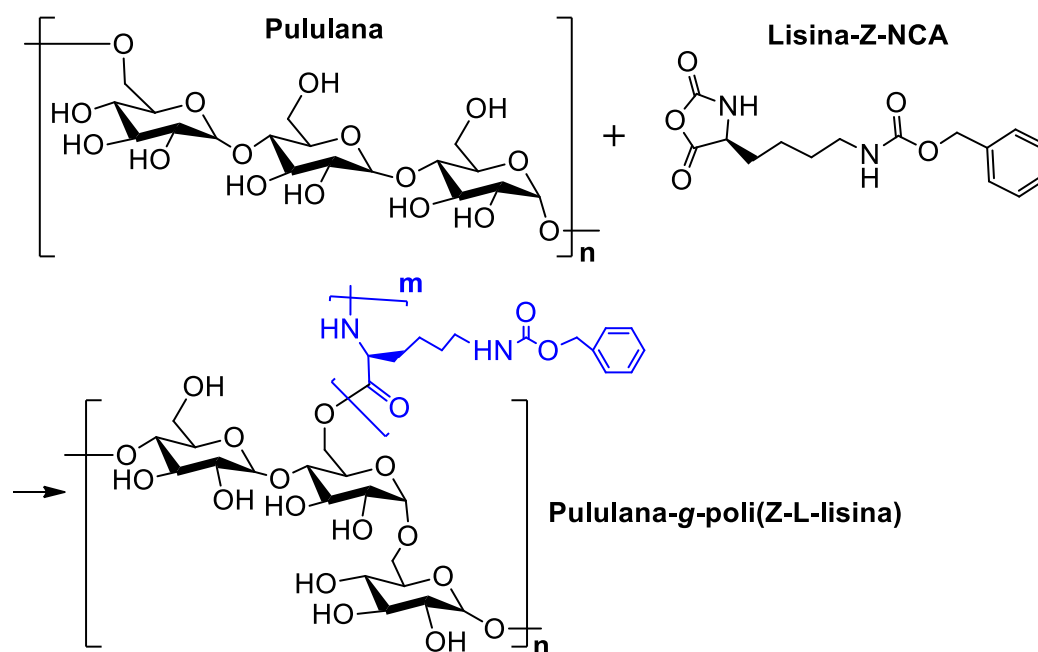
Fonte: Próprio autor.

4.2.1 Síntese de pululana-g-poli(Z-lisina)

Com auxílio de funil, pululana (1,00 g) foi adicionada a um balão de fundo redondo de 100 mL de duas bocas, contendo agitador magnético e DMSO (20 mL). Em seguida, o balão foi adaptado em sistema sob agitação, mas sem aquecimento (t.a.= 24-30 °C), com bolhômetro e sob fluxo de N₂ gasoso até completa solubilização da pululana. A lisina-Z-NCA foi adicionada em diferentes quantidades visando obter copolímeros com diferentes graus de hidrofobicidade. Para o copolímero PL10 foi adicionado 0,1 g (10% em massa em relação à pululana), para o PL20 foi 0,2 g (20% em massa), e para o PL30 foi 0,3 g (30% em massa). O fluxo de nitrogênio foi mantido por 1h e depois retirado, o meio reacional foi mantido sob agitação por 24 h. O meio foi transferido para a membrana de diálise usando DMSO. A diálise foi realizada em água destilada (2000 mL) por 2 dias, trocando a água 2 vezes ao dia. O material dialisado foi, então, congelado com N₂ líquido e seco por liofilização (Liofilizador: JJ Científica) abaixo de -50 °C.

A representação esquemática da reação esperada entre pululana e lisina-Z-NCA está apresentada na Figura 11. Essa metodologia foi adaptada da metodologia proposta por Park *et al.* (2012).

Figura 11 – Esquema da reação para obtenção de pululana-*g*-poli(Z-L-lisina) (Pul-*g*-PZLL).



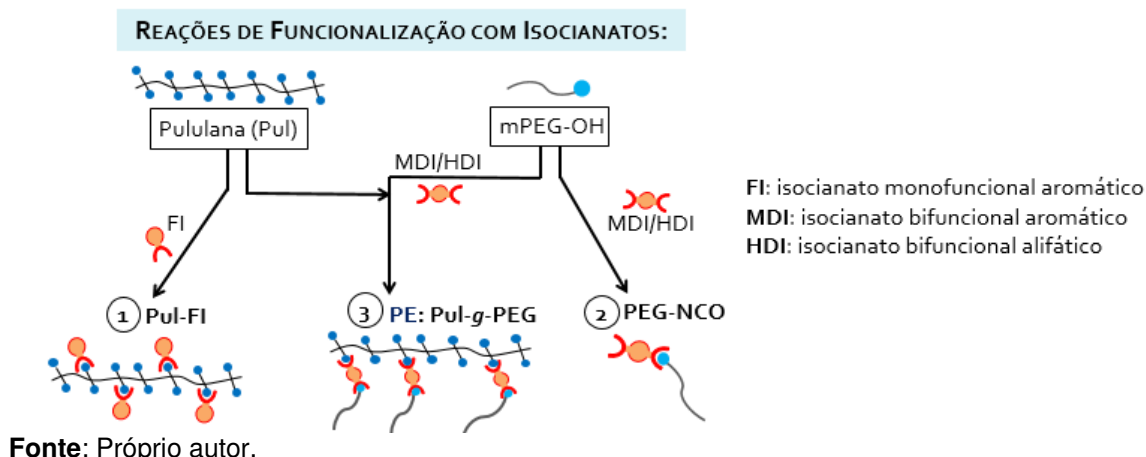
Fonte: Próprio autor.

4.2.2 Avaliação preliminar da inserção de grupos reativos isocianato na pululana e no mPEG-OH

A reação entre a pululana e fenilisocianato (FI) foi conduzida com o propósito de buscar um entendimento do mecanismo e da eficiência de funcionalização da pululana com grupos reativos. O FI, neste caso, foi usado como um modelo monofuncional do MDI – que é bifuncional e, portanto, de maior complexidade. Em seguida, realizou-se a modificação química do mPEG-OH com MDI (composto sólido de fácil manuseio) e posteriormente com HDI (líquido), visando obter uma estrutura do tipo mPEG-NCO, passível de reação direta com as hidroxilas da pululana. Uma terceira condição foi avaliada, considerando a reação direta entre pululana, MDI (ou HDI) e mPEG-OH.

A Figura 12 ilustra a sequência das reações realizadas nesta etapa.

Figura 12 - Representação esquemática das reações realizadas no estudo preliminar de funcionalização com isocianatos.



4.2.2.1 Modificação da pululana com fenilisocianato (Pul-FI)

Com o auxílio de funil, pululana ($0,1950 \text{ g}$, $1,6 \times 10^{-3} \text{ mmol}$) foi adicionada a um balão de fundo redondo de uma boca e de 50 mL , contendo agitador magnético, e o solvente de reação. O balão foi adaptado em sistema com condensador/tubo de secagem e em banho de glicerina aquecido a $65 \text{ }^\circ\text{C}$. O meio reacional foi mantido sob agitação e aquecimento para solubilizar a pululana e, então, o fenilisocianato (FI) foi adicionado lentamente, com o auxílio de uma seringa. A reação foi mantida sob aquecimento ($65 \text{ }^\circ\text{C}$) e agitação por 24 h . Em seguida, todo o conteúdo do balão foi vertido no solvente de tratamento para promover a precipitação da pululana modificada. O precipitado foi removido por filtração a vácuo usando sistema com funil de Büchner e kitassato, depois foi seco em estufa até $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (adaptado de SHIBATA *et al.*, 2001). As quantidades estão especificadas na Tabela 2.

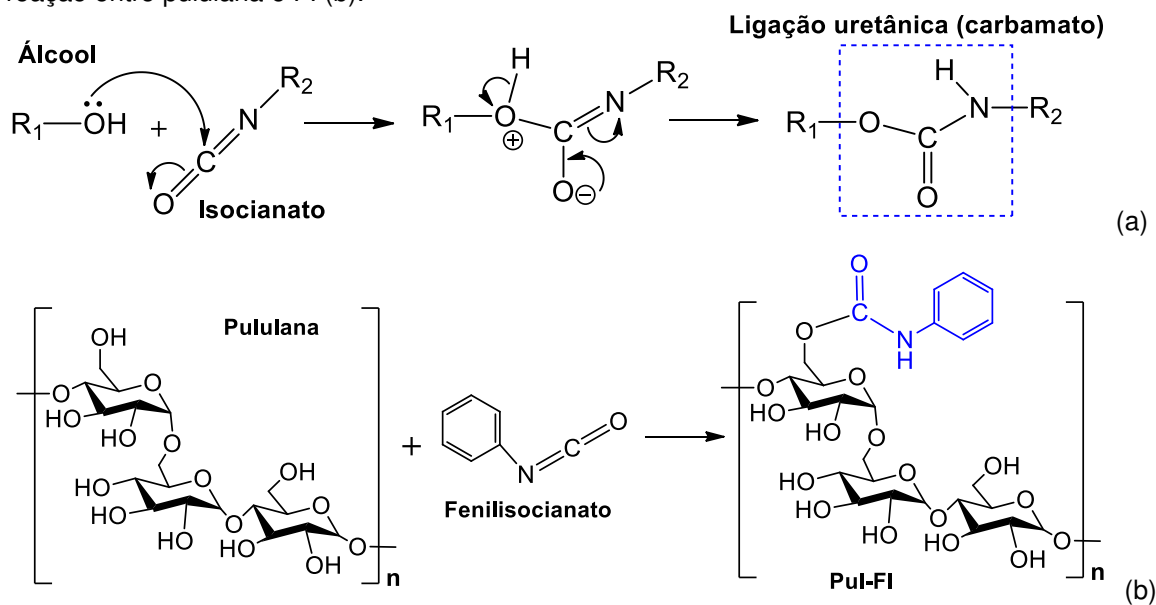
Tabela 2 - Condições experimentais utilizadas nas reações Pul-FI.

	Pul-FI 1	Pul-FI 2
Solvente de reação	DMSO (15 mL) e tolueno (5 mL)	DMSO (15 mL) e peneira molecular (5 mL)
Fenilisocianato (FI)	$1,4 \text{ mL}$ ($12,5 \text{ mmol}$)	$1,6 \text{ mL}$ ($14,3 \text{ mmol}$)
Solvente de tratamento	Etanol t.a. (100 mL) + geladeira (<i>overnight</i>)	Água gelada (250 mL)

Fonte: Próprio autor.

A reação entre grupos hidroxila e isocianato leva à formação de uma função uretânica (também chamada carbamato), tal mecanismo foi usado como chave para as reações envolvendo a enxertia do PEG. A representação esquemática da reação esperada entre pululana e FI está apresentada na Figura 13.

Figura 13 - Mecanismo de reação entre álcool e isocianato (a) e representação esquemática da reação entre pululana e FI (b).



Fonte: Próprio autor.

Em ambos os casos (Pul-FI 1 e Pul-FI 2), o cálculo do grau de substituição (GS) foi determinado a partir dos espectros de RMN ^1H dos produtos: usaram-se as integrais dos picos referentes aos H aromáticos (A: 6,5-7,5 ppm), e referentes aos CH glicosídicos e OH glicosídicos (B: 3-6 ppm) segundo a Equação 1 proposta por Shibata *et al.* (2001).

$$GS = \frac{10A}{(A+5B)} = \frac{10 \int H_{\text{aromáticos}}}{(\int [H_{\text{aromáticos}}] + 5 \int [CH_{\text{glicosídicos}} + OH_{\text{glicosídicos}}])} \quad (1)$$

4.2.2.2 Síntese do PEG-NCO

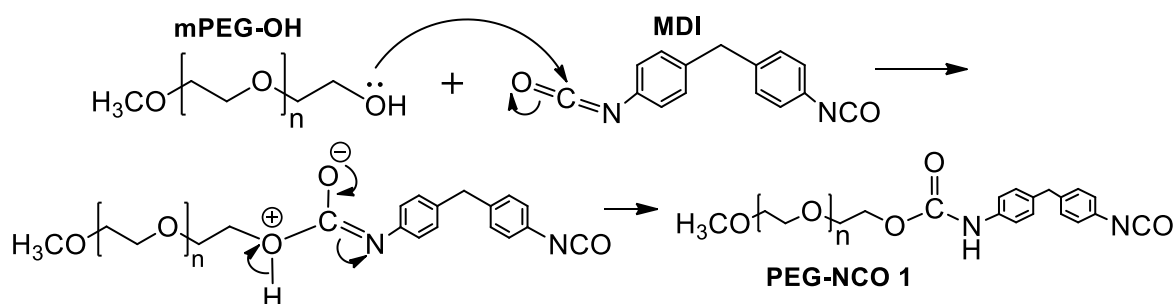
Reação do PEG com MDI: PEG-NCO-1

Com auxílio de funil, mPEG-OH 5000 (6,0128 g, 1,2 mmol) foi adicionado a um balão de fundo redondo de 100 mL e de uma boca, contendo agitador magnético, e em seguida foram adicionados tolueno (18 mL, previamente seco usando peneira molecular) e MDI (0,3444 g, 1,3 mmol). O balão foi adaptado em

sistema com condensador/bolhômetro e em banho de glicerina aquecido a 80 °C, com fluxo constante de nitrogênio borbulhando no interior do meio reacional. O sistema foi mantido sob agitação e aquecimento por 3h. Ao final deste período, o balão foi retirado do aquecimento, resfriado e adicionou-se éter de petróleo gelado (80 mL). O balão foi mantido em temperatura ambiente até o dia seguinte. O precipitado formado foi filtrado a vácuo em funil de Büchner com kitassato, e lavado com mistura de tolueno e acetona 1:1 (80 mL). O produto foi seco em estufa a 40 °C por 10 min, e em seguida permaneceu em repouso em capela de exaustão até o dia seguinte. O procedimento de secagem foi concluído em estufa a vácuo a 25 °C para posterior caracterização do produto (PEG-NCO-1).

A representação esquemática da reação esperada entre mPEG-OH e MDI está apresentada na Figura 14. Essa metodologia foi adaptada de Li *et al.* (2012).

Figura 14 - Mecanismo de reação para obtenção de polietilenoglicol funcionalizado com isocianato (PEG-NCO 1) do MDI.



Fonte: Próprio autor.

Reação do PEG com HDI: PEG-NCO-2

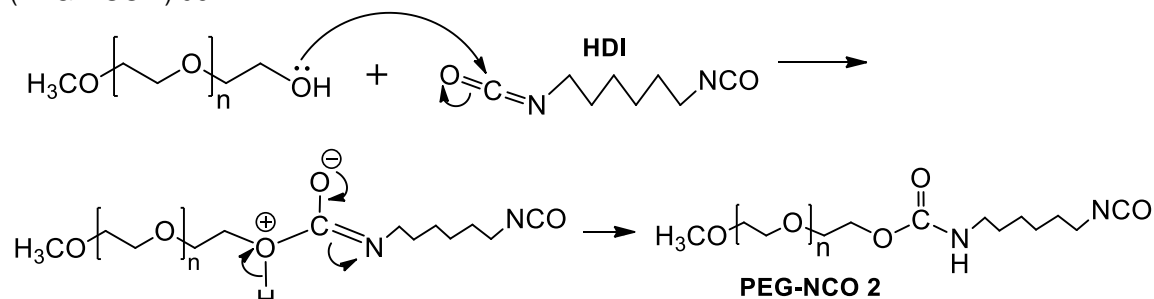
Para a obtenção do PEG-NCO usando HDI (PEG-NCO-2), duas proporções molares de PEG/HDI foram utilizadas: [1:2] e [1:5].

Em um balão de fundo redondo com duas bocas de 50 mL contendo agitador magnético, adicionou-se tolueno (1,2 mL para 1:2; 3 mL para 1:5) e HDI (0,336 g, 2 mmol para [1:2]; 0,841 g, 5 mmol para [1:5]), em seguida, o balão foi adaptado em sistema com condensador/bolhômetro e mantido sob fluxo de N₂ gasoso. O balão foi imerso em banho de glicerina aquecido a 70 °C, a seguir uma solução previamente preparada de mPEG-OH 2000 (2 g, 1 mmol) em tolueno (7 mL) foi adicionada por gotejamento ao longo de 1,5 h. Após o final da adição, a reação foi mantida sob agitação e aquecimento por 1h. O balão foi retirado do aquecimento e

o meio foi vertido em éter gelado (100 mL) para precipitar o composto desejado (PEG-NCO-2), que depois foi filtrado e seco em estufa a 25 °C por 3h para posterior caracterização do produto.

A representação esquemática da reação esperada entre mPEG-OH e HDI está apresentada na Figura 15. Essa metodologia foi adaptada de Li *et al.* (2012).

Figura 15 - Mecanismo de reação para obtenção de polietilenoglicol funcionalizado com isocianato (PEG-NCO 2) do HDI.



Fonte: Próprio autor.

Um resumo das condições experimentais para síntese do PEG-NCO está descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Resumo das condições experimentais para síntese de PEG-NCO.

	PEG-NCO-1 (aromático)	PEG-NCO-2 (alifático)
Diisocianato	MDI: 0,3444 g, 1,3 mmol (adicionado no começo)	HDI [1:2]: 0,336 g, 2 mmol HDI [1:5]: 0,841 g, 5 mmol (adicionado no começo)
mPEG-OH	PEG 5000: 6,0128 g, 1,2 mmol (adicionado no começo)	PEG 2000: 2 g, 1 mmol (adicionado vagorosamente como uma <u>solução em tolueno*</u>)
Solvente de reação: Tolueno	18 mL, previamente seco usando peneira molecular	[1:2]: 1,2 mL + 7* mL [1:5]: 3 mL + 7* mL
Temperatura/Tempo	80 °C, 3h	70 °C, 1,5* h + 1h
Precipitação: Éter gelado	80 mL	100 mL
Lavagem	Mistura de tolueno e acetona 1:1 (80 mL)	—

Fonte: Próprio autor.

4.2.3 Síntese de pululana-g-PEG

Duas metodologias foram avaliadas para a síntese do copolímero PE: uma usando MDI (diisocianato aromático sólido) e outra usando HDI (diisocianato alifático líquido).

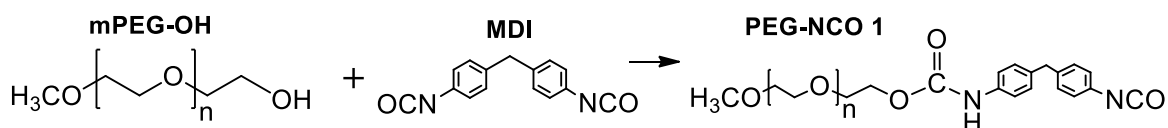
Enxertia do PEG usando MDI (aromático): PE-1

Com auxílio de funil, mPEG-OH 5000 (2,0248 g, 0,4 mmol) foi adicionado a um balão de fundo redondo de uma boca de 100 mL contendo agitador magnético e, em seguida, foram adicionados tolueno (6 mL, previamente seco usando peneira molecular) e MDI (0,2859 g, 1,1 mmol). O balão foi adaptado em sistema com condensador/tubo de secagem e em banho de glicerina aquecido a 70 °C. O meio reacional foi mantido sob agitação e aquecimento por cerca de 2h, em seguida foram adicionados pululana (0,1030 g, $8,6 \times 10^{-4}$ mmol) e DMSO (3 mL, previamente seco usando peneira molecular). A reação foi mantida sob agitação e aquecimento por 48 h. O balão foi retirado do aquecimento e armazenado vedado por alguns dias. O meio reacional foi diluído com etanol (10 mL) e transferido para membrana de diálise. A membrana de diálise foi deixada em etanol (500 mL) por 24 h, e o etanol foi trocado duas vezes a cada 24 h. Finalmente, o etanol foi substituído por água destilada (2000 mL), trocada por três vezes em intervalos de 24 h. A mistura reacional foi então centrifugada para remover o excesso de solvente e liofilizada.

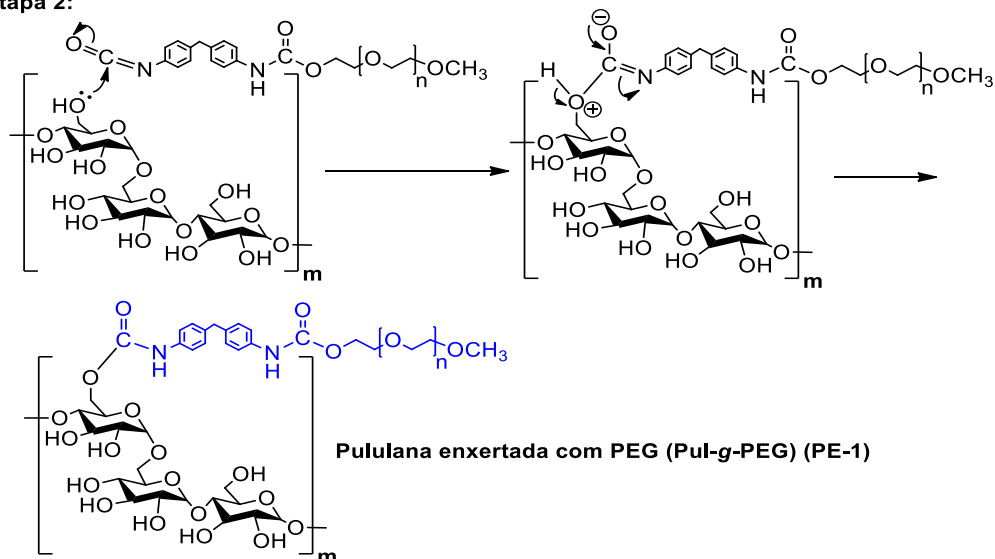
A representação do mecanismo esperado para a reação entre pululana, MDI e mPEG-OH está apresentada na Figura 16.

Figura 16 - Mecanismo de reação para obtenção de pululana-*g*-polietilenoglicol (Pul-*g*-PEG) usando MDI. Etapa 1: Obtenção de polietilenoglicol funcionalizado com isocianato do MDI (PEG-NCO). Etapa 2: Reação de PEG-NCO e pululana.

Etapa 1:



Etapa 2:



Fonte: Próprio autor.

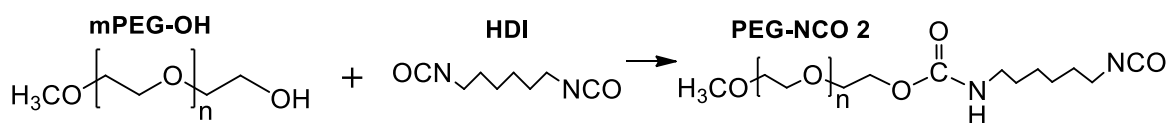
Enxertia do PEG usando HDI (alifático): PE-2

Com auxílio de funil, mPEG-OH 2000 (1,25 g, 0,6 mmol) foi adicionado a um balão de fundo redondo de duas bocas de 100 mL contendo agitador magnético e DMSO (2 mL), em seguida, o balão foi adaptado em sistema com condensador/bolhômetro e em banho de glicerina aquecido a 70 °C e então HDI (0,2 mL, 0,2094 g, 1,2 mmol) foi adicionado gota a gota ao meio reacional mantendo sob agitação e aquecimento por cerca de 45 min, em seguida foi adicionada a solução de pululana (1 g, $8,3 \times 10^{-3}$ mmol) em DMSO (30 mL), 2 mL por vez para manter a temperatura interna da reação e prevenir a aglomeração da pululana. A reação foi mantida sob agitação e aquecimento por 25 h. O balão foi retirado do aquecimento e armazenado vedado por alguns dias. O meio reacional foi transferido para membrana de diálise. A diálise foi realizada em água destilada (2000 mL) por 2 dias, trocando a água 2 vezes ao dia. O material dialisado foi então seco por liofilização.

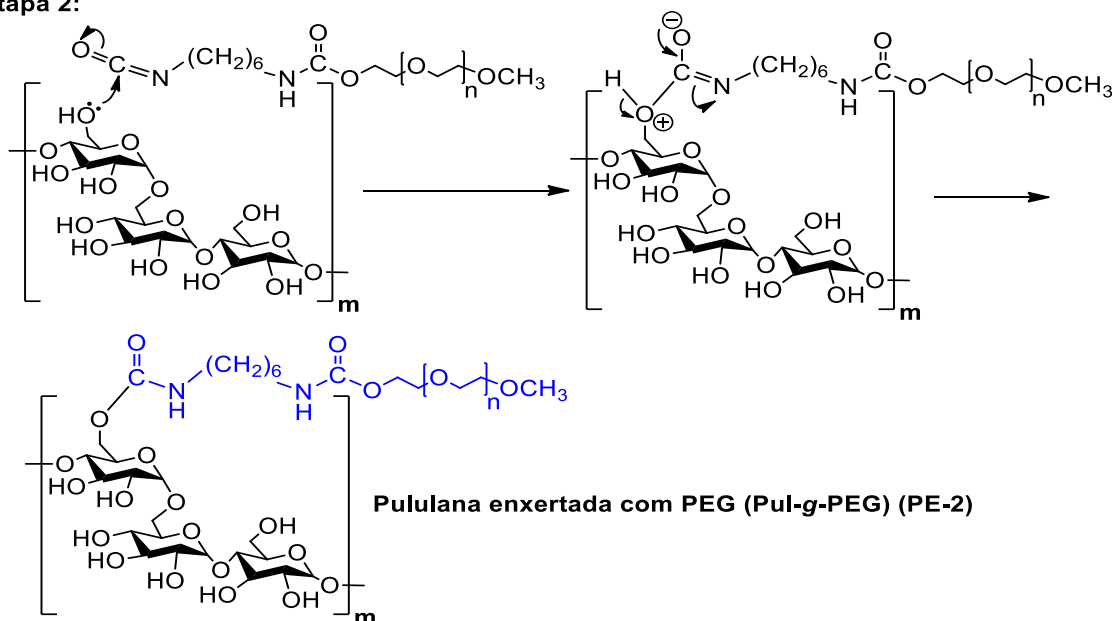
A representação esquemática da reação esperada entre pululana, HDI e mPEG-OH está apresentada na Figura 17.

Figura 17 - Mecanismo de reação para obtenção de pululana-*g*-polietilenoglicol (Pul-*g*-PEG) usando HDI. Etapa 1: Obtenção de polietilenoglicol funcionalizado com isocianato do HDI (PEG-NCO). Etapa 2: Reação de PEG-NCO e pululana.

Etapa 1:



Etapa 2:



Fonte: Próprio autor.

Um resumo das condições experimentais das sínteses do copolímero PE está descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Resumo das condições experimentais para síntese dos copolímeros PE.

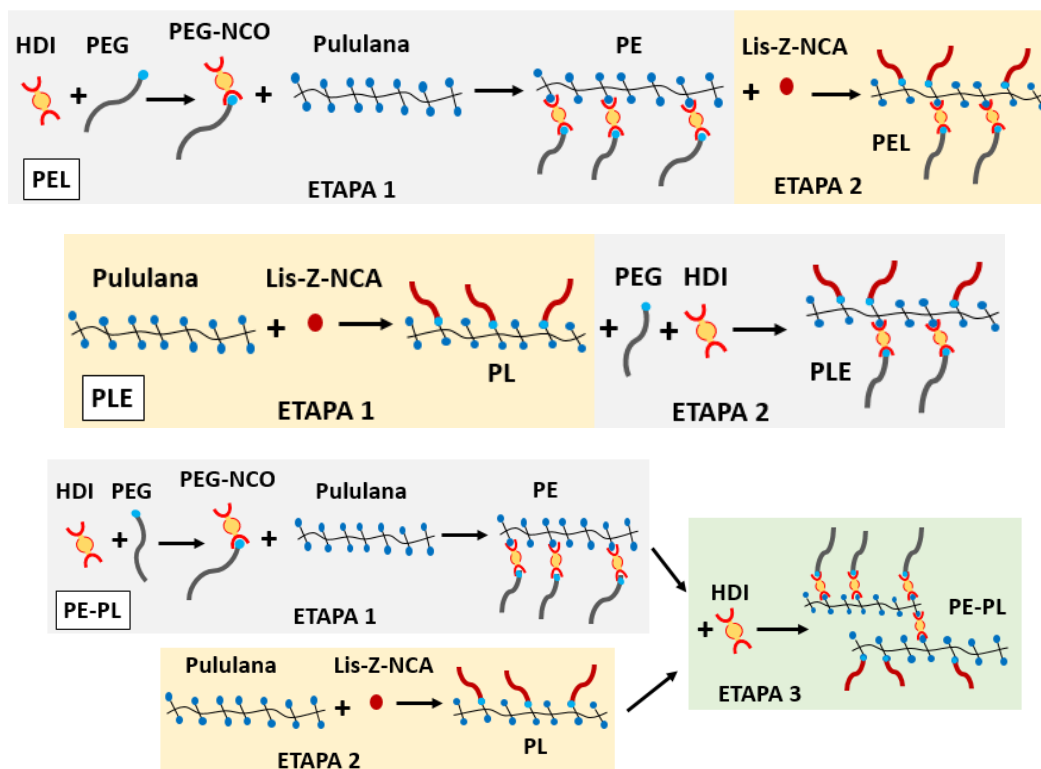
	PE-1 (aromático)	PE-2 (alifático)
mPEG-OH	PEG 5000: 2,0248 g, 0,4 mmol (adicionado no começo)	PEG 2000: 1,25 g, 0,6 mmol (adicionado no começo)
Solvente de reação	Tolueno: 6 mL DMSO (Sol. Pul)*: 3 mL	DMSO: 2 mL DMSO (Sol. Pul)*: 30 mL
Diisocianato	MDI [1:3]: 0,2859 g, 1,1 mmol (adicionado no começo)	HDI [1:2]: 0,2 mL, 0,2094 g, 1,2 mmol (adicionado por gotejamento)
Pululana	0,1030 g, $8,6 \times 10^{-4}$ mmol (adicionada como uma <u>solução em DMSO*</u>)	1 g, $8,3 \times 10^{-3}$ mmol (adicionada lentamente como uma <u>solução em DMSO*</u>)
Temperatura/ Tempo	70 °C, 2 h Após Sol. Pul: 70 °C, 48h	70 °C, 45 min Após Sol. Pul: 70 °C, 25 h
Diálise	Etanol: 0,5 L/troca, 2 trocas em 24 h Água destilada: 2000 mL/troca, 6 trocas em 48 h	Água destilada: 2000 mL/troca, 4 trocas em 48 h
Secagem	Centrifugação e liofilização	Liofilização

Fonte: Próprio autor.

4.2.4 Síntese de copolímeros de enxertia da pululana com PZLL e PEG: PEL, PLE e PE-PL

Os copolímeros com enxertia de PEG e PZLL nas mesmas cadeias de pululana foram sintetizados de duas formas diferentes: i) primeiro a enxertia de PEG e depois de PZLL (copolímero PEL); ii) primeiro a enxertia de PZLL e depois de PEG (copolímero PLE). Uma terceira via foi estudada fazendo enxertia em cadeias de pululana distintas e depois reticulando essas cadeias (copolímero PE-PL). As representações esquemáticas das estruturas esperadas são apresentadas nas Figura 18.

Figura 18 - Representação esquemática da sequência de síntese e das estruturas dos copolímeros PEL, PLE e PE-PL.



Fonte: Próprio autor.

4.2.4.1 Síntese do copolímero PEL

ETAPA 1 (enxertia de PEG): Com auxílio de funil, mPEG-OH 2000 (1,25 g, 0,6 mmol) e DMSO (4 mL) foram adicionados a um balão de fundo redondo de duas bocas de 100 mL contendo agitador magnético, o balão foi adaptado em sistema com condensador/tubo de secagem e a outra boca foi fechada com septo de borracha. O meio reacional foi mantido sob agitação e aquecimento em banho de glicerina a 70 °C e sob fluxo de nitrogênio gasoso ao longo de todo o processo. Após a dissolução do PEG, foi adicionado o HDI (0,2 mL, 0,2094 g, 1,2 mmol) com uma seringa. Após 1,5h, foi adicionada lentamente, 2 mL por vez, usando uma seringa a solução de pululana (1 g, $8,3 \times 10^{-3}$ mmol) em DMSO (30 mL) previamente preparada para manter a temperatura do meio reacional em 70 °C. A reação permaneceu sob aquecimento e agitação por 24h.

ETAPA 2 (enxertia de PZLL): O balão foi retirado do sistema de aquecimento, vedado com septo e resfriado até temperatura ambiente (t.a.) em um banho de água. Após o resfriamento, foi adicionada a lisina-Z-NCA (0,3 g) e a boca do balão

foi novamente vedada com septo, o meio reacional foi mantido sob agitação e fluxo de nitrogênio, um bolhometro foi adaptado no septo. O fluxo de nitrogênio foi retirado após 1h, o meio reacional foi mantido sob agitação em t.a. por 67h.

O meio reacional foi transferido para membrana de diálise, a qual foi deixada em água destilada (2000 mL) por 12h; a água da diálise foi trocada duas vezes a cada 24h ao longo de 3 dias. O material foi então liofilizado e posteriormente caracterizado por RMN e FTIR.

4.2.4.2 Síntese dos copolímeros PLE

ETAPA 1 (enxertia de PZLL): Com auxílio de funil, DMSO (20 mL) e pululana (1 g, $8,3 \times 10^{-3}$ mmol) foram adicionados a um balão de fundo redondo de duas bocas de 50 mL contendo agitador magnético, as bocas do balão foram vedadas com septo de borracha e ele foi adaptado em sistema mantido sob agitação e leve aquecimento em banho de glicerina a 40 °C até completa dissolução da pululana. Após o resfriamento do meio reacional até temperatura ambiente (t.a.), foi adicionada a lisina-Z-NCA (0,3 g, 0,9 mmol) e a boca do balão foi novamente vedada com septo, o meio reacional foi mantido sob agitação e fluxo de nitrogênio, um bolhometro foi adaptado no septo. O fluxo de nitrogênio foi retirado após 1h, o meio reacional foi mantido sob agitação em t.a. por 24h.

ETAPA 2 (enxertia de PEG): Com auxílio de funil, mPEG-OH 2000 (1,25 g, 0,6 mmol) foi adicionado ao balão, que a seguir foi adaptado em outro sistema com condensador/tubo de secagem. O meio reacional foi mantido sob agitação e aquecimento em banho de glicerina a 70 °C e sob fluxo de nitrogênio gasoso ao longo de todo o processo. Após a dissolução do PEG, foi adicionado o HDI (0,2 mL, 0,2094 g, 1,2 mmol) gota-a-gota com uma seringa. A reação permaneceu sob aquecimento e agitação (para PLE-1: 16 h; para PLE-2: 4 h). Devido à diferença nos aspectos dos produtos finais de cada reação, duas diferentes metodologias de tratamento foram utilizadas.

Tratamento para copolímero PLE solúvel em DMSO: O balão foi retirado do aquecimento e, após o resfriamento do meio reacional, foi transferido para membrana de diálise, a qual foi deixada em água destilada (2000 mL) por 12h, que

foi trocada duas vezes a cada 24h ao longo de 3 dias. O material foi seco por liofilização e posteriormente caracterizado por RMN e FTIR.

Tratamento para copolímero PLE insolúvel em DMSO: Após resfriamento, o meio reacional foi transferido com uma espátula para um frasco e mantido em temperatura ambiente. Partes desse material foram tratadas utilizando diferentes solventes para garantir a remoção do DMSO. O copolímero bruto foi macerado com auxílio de espátula na presença do solvente de tratamento escolhido, filtrado e o procedimento foi repetido algumas vezes (conforme Tabela 5). O material foi então seco em estufa a 50 °C.

Tabela 5 - Diferentes tratamentos com solventes usados para o copolímero PLE insolúvel em DMSO.

Tratamento	Solventes utilizados	Massa de amostra
1	2 mL clorofórmio (3x)	1,7 g
2	2 mL DMSO (3x) e 5 mL água destilada (4x)	0,7 g
3	2 mL DMSO (3x), 2 mL clorofórmio (2x) e 5 mL água destilada (3x)	0,7 g
4	2 mL DMSO (2x), 5 mL água destilada (2x), diálise em água destilada (por 2 dias)	2,5 g
5	10 mL água destilada (15x) com auxílio do vórtex	3 g

Fonte: Próprio autor.

Um resumo das condições experimentais das sínteses dos copolímeros PEL e PLE está descrito na Tabela 6.

Tabela 6 - Resumo das condições experimentais para síntese dos copolímeros PEL e PLE.

	PEL	PLE
mPEG-OH 2000	1,25 g, 0,6 mmol (adicionado no começo da Etapa 1)	1,25 g, 0,6 mmol (adicionado no começo da Etapa 2)
Solvente de reação	DMSO (PEG+HDI): 4 mL DMSO (Sol. Pul)*: 30 mL	DMSO: 20 mL
Diisocianato HDI [1:2]	0,2 mL, 0,2094 g, 1,2 mmol (adicionado por gotejamento na Etapa 1)	0,2 mL, 0,2094 g, 1,2 mmol (adicionado por gotejamento na Etapa 2)
Pululana	1 g, $8,3 \times 10^{-3}$ mmol (adicionada como uma <u>solução em DMSO*</u> na Etapa 1)	1 g, $8,3 \times 10^{-3}$ mmol (adicionada no começo da Etapa 1)
Lisina-Z-NCA	0,3 g, 0,9 mmol (Etapa 2)	0,3 g, 0,9 mmol (Etapa 1)

(Continua)

(Conclusão)

Tabela 6 - Resumo das condições experimentais para síntese dos copolímeros PEL e PLE.

	PEL	PLE
Temperatura/ Tempo	Etapa 1 (PEG): 70 °C, 1,5 h (PEG + HDI) Após Sol. Pul*: 70 °C, 24 h Etapa 2 (PZLL): t.a., 67 h	Etapa 1 (PZLL): t.a., 24 h Etapa 2 (PEG): PLE-1: 70 °C, 16 h PLE-2: 70 °C, 4 h
Tratamento final	Diálise em água destilada (2000 mL/troca, 6 trocas em 36 h) e liofilização	PLE insolúvel em DMSO: Solventes PLE solúvel em DMSO: Diálise em água destilada (2000 mL/troca, 6 trocas em 36 h) e liofilização

Fonte: Próprio autor.

4.2.4.3 Síntese de copolímero reticulado a partir de pululana enxertada com PEG (PE) e pululana enxertada com PZLL (PL): PE-PL

A síntese do copolímero reticulado foi feita a partir de dois copolímeros de enxertia preparados separadamente: i) pululana enxertada apenas com polietilenoglicol (PE) e ii) pululana enxertada apenas com polilisina(Z) (PL). A seguir, estes dois copolímeros foram reticulados utilizando HDI.

ETAPA 1: Síntese do copolímero PE (Pul-g-PEG) feita igual a Etapa 1 de síntese do copolímero PEL.

ETAPA 2: Síntese do copolímero PL (Pul-g-PZLL) feita igual a Etapa 1 de síntese do copolímero PLE.

ETAPA 3: Reticulação dos copolímeros de enxertia PE e PL para obtenção de um copolímero de bloco.

O meio reacional da etapa 2 (PL) foi vertido dentro do meio da etapa 1 (PE) com auxílio de um funil. O balão foi adaptado novamente no mesmo sistema da reação PE e mantido sob agitação, aquecimento a 70 °C e fluxo de nitrogênio gasoso. A seguir, foram adicionadas duas gotas de uma solução de HDI em DMSO (10% v/v) usando uma seringa. A reação permaneceu sob aquecimento, agitação e fluxo de nitrogênio por 1h.

O balão foi retirado do aquecimento e após resfriamento o meio reacional foi transferido para membrana de diálise, a qual foi deixada em água destilada (2000

mL) por 12h, que foi trocada duas vezes a cada 24h ao longo de 3 dias. O material foi então seco por liofilização e posteriormente caracterizado por RMN e FTIR.

4.2.5 Caracterizações

4.2.5.1 Cromatografia em camada fina (TLC)

Diferentes sistemas de revelação (solução aquosa de sulfato cérico e ácido sulfúrico, solução alcoólica de vanilina e ácido sulfúrico, e radiação ultravioleta de comprimento de onda de 254 nm) e diferentes eluentes (acetona/hexano 1:1, etanol, acetona e água destilada) foram testados. Mais detalhes sobre TLC estão no Apêndice A.

Preparo dos reveladores

Solução aquosa de sulfato cérico e ácido sulfúrico (CHAPLIN; KENNEDY, 1994): Adicionaram-se 5 mL de uma solução 0,1 mol.L⁻¹ de sulfato cérico a 100 mL de uma solução de ácido sulfúrico 15% v/v. Solução alcóolica de vanilina e ácido sulfúrico (DELLOYD's[...], 2019): Dissolveu-se 1 g de vanilina em 40 mL de etanol e a seguir adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado.

4.2.5.2 Espectroscopia de infravermelho (FTIR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os reagentes de partida e os copolímeros foram analisados por FTIR e RMN. As análises de espectroscopia de infravermelho (FTIR) foram conduzidas de duas formas: i) em um espectrômetro PerkinElmer Spectrum 100 com módulo de ATR (reflectância total atenuada) (Laboratório de Plasma da Universidade Estadual Paulista, *campus* de Guaratinguetá), nas condições de 16 escaneamentos e com resolução de 1 cm⁻¹, ii) a amostra dissolvida em solvente apropriado foi espalhada entre duas pastilhas de cloreto de sódio (NaCl) e analisada um espectrômetro PerkinElmer modelo Spectrum Two, no modo transmitância e condições de 64 escaneamentos e resolução de 1 cm⁻¹ (LOQ-EEL-USP). As análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de próton (¹H) e de carbono (¹³C) foram conduzidas em um espectrômetro Varian Mercury 300 MHz (RMN ¹H 300 MHz e RMN ¹³C 75 MHz) (LOQ-EEL-USP) e em um Bruker (RMN ¹H 500 MHz) (da Central Analítica da USP) usando DMSO-d₆ ou CDCl₃ como solvente

analítico. Para auxiliar na interpretação dos espectros de RMN, foram utilizadas simulações geradas pelo software ChemDraw 19.0. Para auxiliar nas atribuições dos sinais e na interpretação dos espectros de RMN e de FTIR foram utilizadas simulações geradas pelo software ChemDraw 19.0, e também comparações com Silverstein *et al.* (2015).

4.2.5.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

Uma amostra (5 mg) de cada material foi analisada por DSC no equipamento TA Instruments – Waters LLC, Modelo Q20 (LOQ-EEL-USP). As análises foram realizadas sob atmosfera de ar sintético e nitrogênio, ambos com fluxo de 50 mL/min, e uma taxa de 10 °C/min. A faixa de temperatura utilizada para os copolímeros foi de -50 a 110 °C na primeira corrida e de -50 a 250 °C na 2ª corrida, enquanto para as formulações e misturas copolímero/indometacina foi de -50 a 250 °C (uma única corrida).

4.2.5.4 Determinação da concentração micelar crítica (CMC) por espectroscopia de fluorescência

Uma solução inicial de pireno (sonda de fluorescência) em acetona foi preparada a 3 mmol/L e a partir dela obteve-se a diluição 1 (0,06 mmol/L). Então 20 balões de análise foram preparados transferindo alíquotas da diluição 1 de forma que a concentração final de pireno fosse 6×10^{-7} mol/L. Após a evaporação completa da acetona, diferentes alíquotas de uma solução polimérica aquosa (0,025 mg/mL) previamente preparada foram adicionadas aos balões de análise e o volume foi completado com água destilada de forma a obter uma concentração polimérica diferente em cada balão. Após a adição, os balões foram deixados em repouso por pelo menos 24h para que a solução polimérica entrasse em equilíbrio com a sonda antes de realizar a análise. As leituras foram realizadas em um fluorímetro Eclipse (Varian, USA) (LOQ-EEL-USP) utilizando comprimento de onda de excitação de 300-360 nm e emissão de 390 nm, abertura de fenda de 5 nm. A partir destes dados, foi plotado um gráfico usando log da concentração (no eixo x) e razão entre intensidades de emissão (I_{337}/I_{333}) (no eixo y). O formato do gráfico é uma curva assintótica, cujo valor da CMC é dado pelo ponto onde as linhas de tendência se cruzam.

4.2.6 Produção de partículas por diálise e estudo de estabilidade

Para produzir partículas, os copolímeros anfifílicos (PL, PEL, PLE e PE-PL) foram dissolvidos em DMSO em diferentes razões copolímero/solvente (mg/mL) (parâmetro A). Essa solução foi então transferida para uma membrana de diálise, e dialisada por 3 dias em água destilada (2000 mL) (a troca da água foi feita 2 vezes ao dia).

As soluções de partículas foram analisadas por medição de diâmetro hidrodinâmico (Dh) por DLS logo após o final da diálise (dia 1), uma fração das soluções foi guardada em geladeira (4 °C) para verificar a estabilidade das partículas. As frações guardadas foram analisadas por DLS ao longo de 30 dias (dias 1, 5, 15 e 30), a variação do tamanho das partículas e da polidispersidade foi avaliada, sendo que todas soluções ficaram em banho de ultrassom por 10 min antes de serem analisadas por DLS.

4.2.6.1 Medição de diâmetro de partícula por Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A solução contendo as partículas foi colocada na cubeta do equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern) (LOQ-EEL-USP). É possível selecionar diferentes valores (ou faixas) de pH para medição do tamanho de partículas, bem como usar variação de temperatura. As respostas de interesse são o diâmetro hidrodinâmico (Dh) e polidispersidade (PDI). As análises foram feitas em triplicata.

4.2.6.2 Microscopia de força atômica (AFM)

Uma gota de uma suspensão de nanopartículas em água foi gotejada sobre um disco de mica e após a evaporação da água, as partículas secas foram analisadas por AFM (XE7 Park Systems) (LOQ-EEL-USP) usando software SmartScan. As varreduras foram feitas em áreas distintas de 5x5 µm da mica para cada amostra e usando taxa de scan de 1 Hz, cantilever contato (PPP-CONTSCR 10M) no modo contato. As microscopias foram estudadas para estimar o diâmetro e a morfologia das partículas secas.

4.2.7 Incorporação de indometacina nas partículas de pululana-g-poli(Z-lisina)

Para produzir as formulações com fármaco encapsulado, tanto o copolímero quanto o fármaco (indometacina) foram dissolvidos em DMSO em diferentes razões copolímero/solvente (mg/mL) (parâmetro A) e fármaco/copolímero (mg/mg) (parâmetro B). Essa solução foi então transferida para uma membrana de diálise, e dialisada por 24 h em água destilada (2000 mL) (a troca da água foi feita 2 vezes).

As soluções de partículas foram analisadas para medição de tamanho por DLS logo após o final da diálise (dia 1), uma fração das soluções foi guardada em geladeira (4 °C) para verificar a estabilidade das partículas.

4.2.7.1 Eficiência de encapsulação (EE%)

Curvas de absorvância da indometacina

Uma solução-mãe foi preparada dissolvendo 3-4 mg de indometacina em 50 g de solvente (DMSO ou etanol). Retirando alíquotas dessa solução-mãe foram preparadas outras 9 soluções mais diluídas usando a seguinte proporção em relação à concentração máxima (solução-mãe): 1, 1,5, 2, 3, 5, 10, 15, 30 e 60%. A absorvância (ABS) de cada solução foi medida fazendo uma varredura de 190-600 nm no espectrofotômetro UV-Visível (Shimadzu UV-1800) (LOQ-EEL-USP). A curva de calibração foi obtida pela linearização dos dados plotados usando os valores de ABS_{319} em função da concentração (mg/g).

Estimativa da eficiência de encapsulação

Para estimar a eficiência de encapsulação (EE%) da indometacina (INDO) nas formulações, uma sequência de soluções foi preparada e lida em espectrofotômetro na faixa $\lambda=190-600$ nm. Foram utilizadas curvas de calibração da absorvância da INDO em diferentes solventes (DMSO, etanol) para estimar as concentrações lidas.

Para cada formulação, uma amostra de 2 mg foi solubilizada em 5 g de DMSO. O resultado de cada formulação (FI) foi comparado com as leituras de absorvância (ABS) de outras três soluções: de polímero (P), de INDO (I), de mistura polímero e INDO (PI) preparadas nas mesmas condições (mesmo parâmetro B). A

finalidade é comparar a influência de cada um dos componentes (copolímero e fármaco) na absorvância final da formulação, sendo que a solução I foi preparada para ter a mesma concentração de INDO presente caso EE%=100%, enquanto a solução PI foi preparada para simular o que seria a EE%=100%. As quantidades utilizadas para cada solução estão na Tabela 7.

Tabela 7 - Soluções concentradas preparadas para cada teste de eficiência de encapsulação.

Soluções concentradas	Formulação (mg)	Copolímero (mg)	Indometacina (mg)	DMSO (mg)
FI: Formulação	2,0	-	-	5,0
P: Copolímero	-	1,0	-	5,0
I: Indometacina	-	-	1,0	5,0
PI: Mistura copolímero e indometacina	-	1,0	1,0	5,0

Fonte: Próprio autor.

A seguir, foram preparadas as diluições de cada uma dessas quatro soluções concentradas, FI, P, I, PI, usando 1 g da solução concentrada e diluindo em 10 g de DMSO, obtendo no final as soluções diluídas: FI_{dil.}, P_{dil.}, I_{dil.} e PI_{dil.}. As absorvâncias (Abs₃₁₉) das diluições foram convertidas em massa utilizando a curva de calibração para os cálculos.

A EE% foi calculada usando 3 abordagens diferentes: i) estimativa da INDO encapsulada utilizando a curva de calibração e comparação com a INDO inicial (Equação 2); ii) subtração da absorvância do copolímero da absorvância da INDO encapsulada (Abs₃₁₉[FI_{dil.}] - Abs₃₁₉[P_{dil.}]) para obter a Abs₃₁₉[FI_{dil.}*] a ser utilizada na estimativa da INDO Encapsulada* (Equação 3); iii) comparação da INDO encapsulada (FI_{dil.}) com sua respectiva mistura copolímero/INDO (PI_{dil.}), que foi definida como EE = 100% (Equação 4).

$$EE_{FI} = \frac{\text{INDO Encapsulada}}{\text{INDO inicial}} = \frac{m \text{ FI}_{dil}}{m \text{ INDO inicial}} \times 100 \quad (2)$$

$$EE_{(FI-P)} = \frac{(\text{INDO Encapsulada} - \text{Polímero})}{\text{INDO inicial}} = \frac{\text{INDO Encapsulada}^*}{\text{INDO inicial}} = \frac{m \text{ FI}_{dil}^*}{m \text{ INDO inicial}} \times 100 \quad (3)$$

$$EE'_{FI} = \frac{\text{INDO Encapsulada}}{\text{copolímero/INDO}} = \frac{m \text{ FI}_{dil}}{m \text{ PI}_{dil}} \times 100 \quad (4)$$

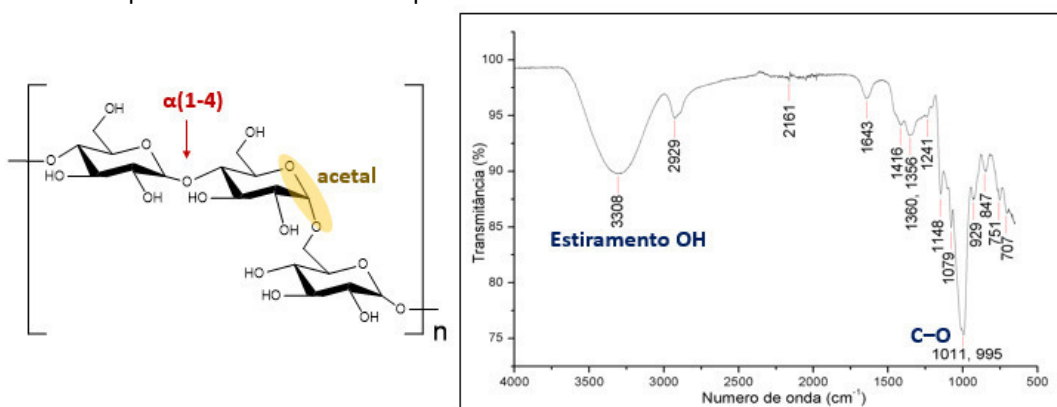
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese de pululana-g-poli(Z-lisina) (PL)

Para a correta interpretação dos resultados de caracterização dos copolímeros, os reagentes de partida foram caracterizados. As Figuras 18 e 19 mostram, respectivamente, os espectros de FTIR e de RMN ^1H da pululana comercial, e as Figuras 20 e 21 mostram respectivamente, os espectros de FTIR e de RMN ^1H da lisina-Z-NCA, ambos são os reagentes de partida para esta síntese.

No espectro de FTIR-ATR da pululana (Figura 19), observaram-se uma banda média larga típica de hidroxila (3308 cm^{-1}), uma banda de estiramento -CH (2929 cm^{-1}), de estiramento O-C-O e água absorvida (1643 cm^{-1}), vibrações acopladas de -OH e -CH (1418 e $1380, 1358\text{ cm}^{-1}$), vibração da ligação C-O da glicose ($1011, 995\text{ cm}^{-1}$), além de outras bandas que confirmam a estrutura glicosídica como: configuração α e ligação $\alpha(1-4)$ (847 e 1148 cm^{-1} , respectivamente).

Figura 19 - Espectro de FTIR-ATR da pululana.

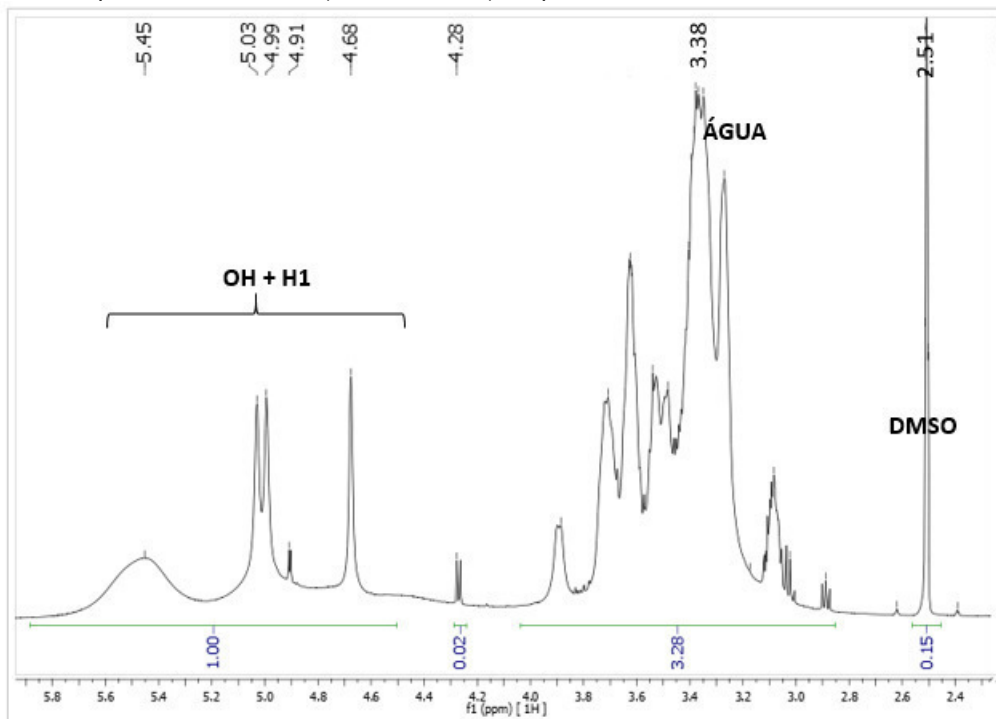


Fonte: Próprio autor.

O espectro de RMN ^1H da pululana (Figura 20) contém os sinais típicos de OH glicosídico e H_1 glicosídico entre 5,7 e 4,3 ppm. Outros sinais são mascarados pelo sinal intenso de água em 3,40 ppm. A atribuição dos picos da pululana não é simples, uma vez que as cadeias de pululana apresentam fortes ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (CARVALHO *et al.*, 2022) e que os sinais dos hidrogênios da cadeia têm deslocamentos químicos próximos e por interagirem entre si geram multiplicidades que se sobrepõem tornando o espectro bastante

complexo. As ligações de hidrogênio podem afetar inclusive o acesso às hidroxilas e conseqüentemente o rendimento das reações.

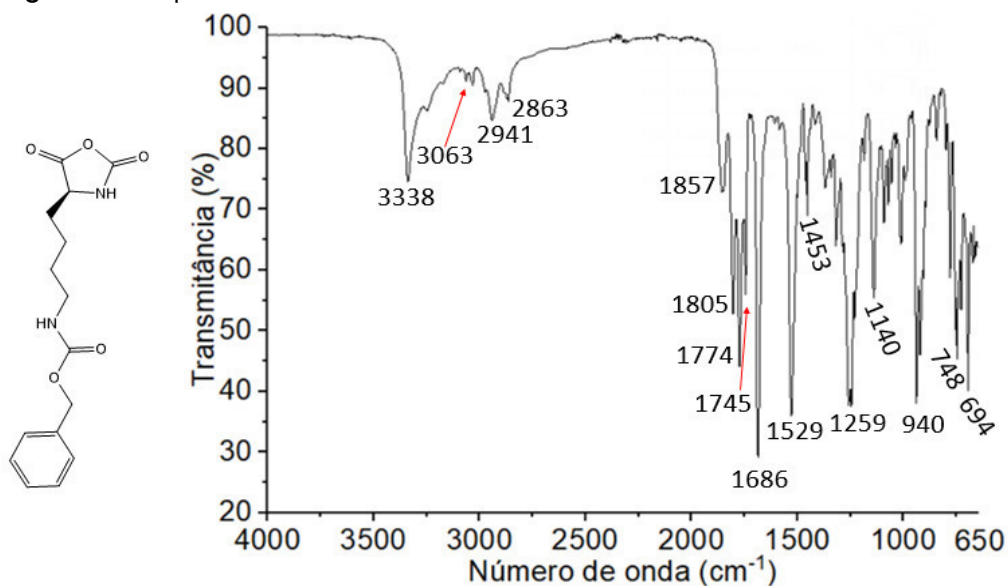
Figura 20 - Espectro de RMN ^1H (em DMSO-d_6) da pululana.



Fonte: Próprio autor.

No espectro de FTIR-ATR da lisina-Z-NCA (Figura 21), são visíveis as bandas de NH (3338 cm^{-1}), CH aromático (3063 cm^{-1}) e C=O do grupo Z (1686 cm^{-1}); e as duas carbonilas do anidrido cíclico (1857 e 1805 cm^{-1}).

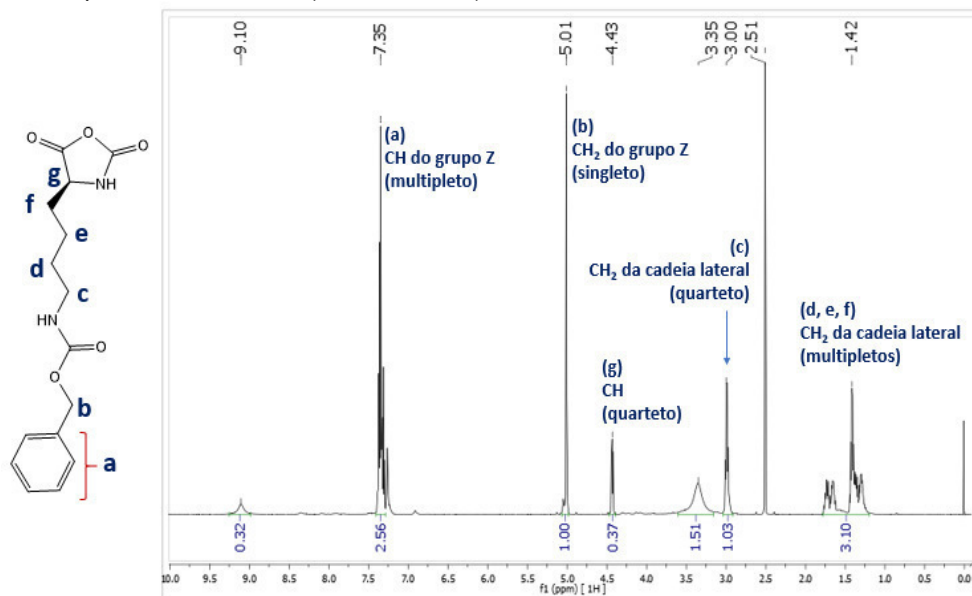
Figura 21 - Espectro de FTIR-ATR da lisina-Z-NCA.



Fonte: Próprio autor.

No espectro de RMN ^1H da lisina-Z-NCA (Figura 22), observaram-se os picos de CH aromático do grupo Z (ca. 7,35 ppm), CH do anel de anidrido (4,43 ppm), grupos metileno da cadeia lateral (3,00 e ca. 1,42 ppm) e grupo metileno do grupo Z (5,01 ppm).

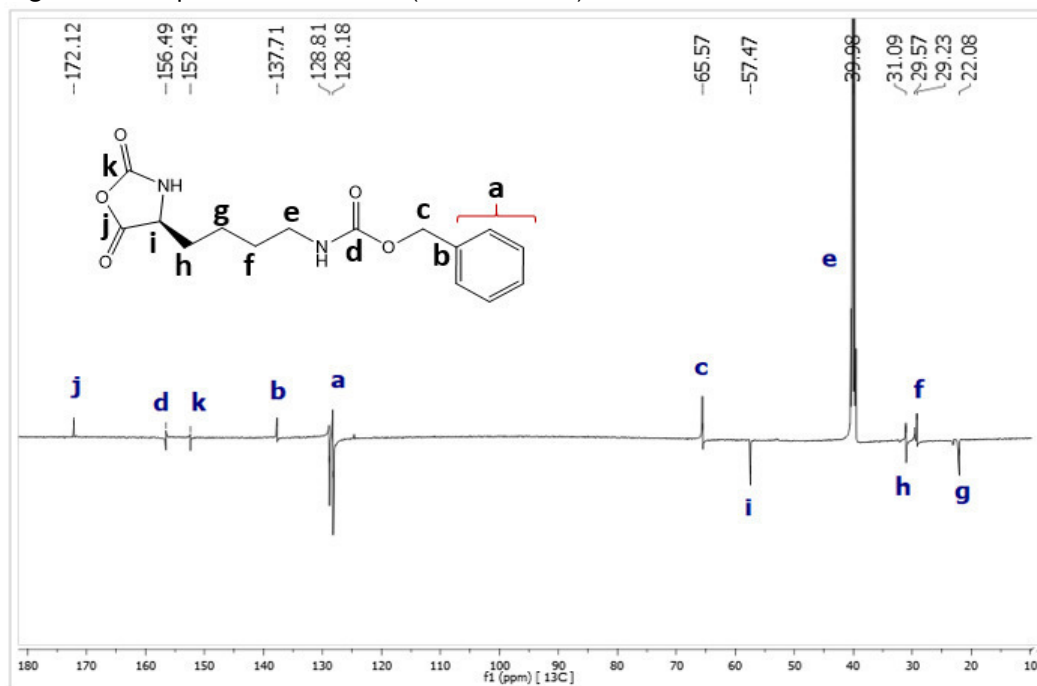
Figura 22 - Espectro de RMN ^1H (em DMSO- d_6) da lisina-Z-NCA.



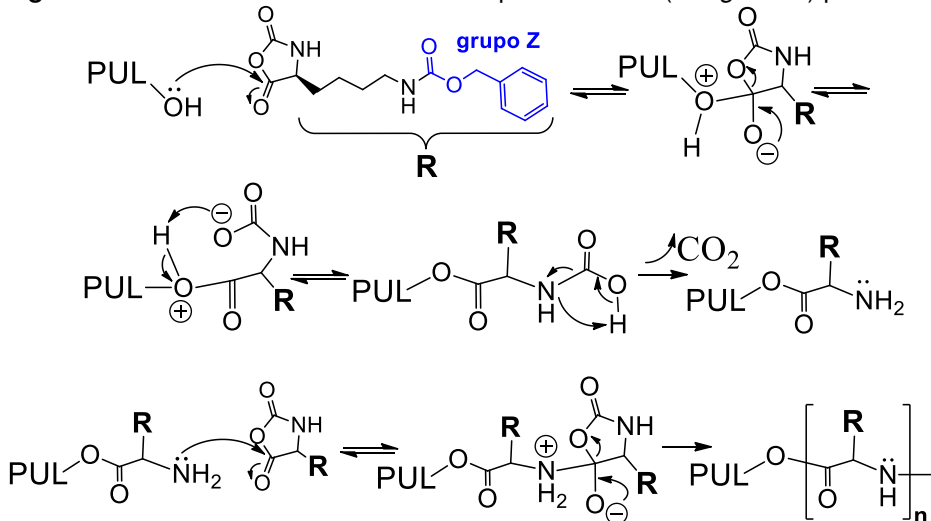
Fonte: Próprio autor.

No espectro de RMN ^{13}C da lisina-Z-NCA (Figura 23), observaram-se os picos do grupo Z: CH aromático (ca. 128 ppm), carbono quaternário (Cq) (137,71 ppm) e CH_2 (65,57 ppm); das carbonilas em 156,49 (grupo Z), 172,12 e 152,43 ppm (anidrido) e dos metilenos (40 e 22-31 ppm).

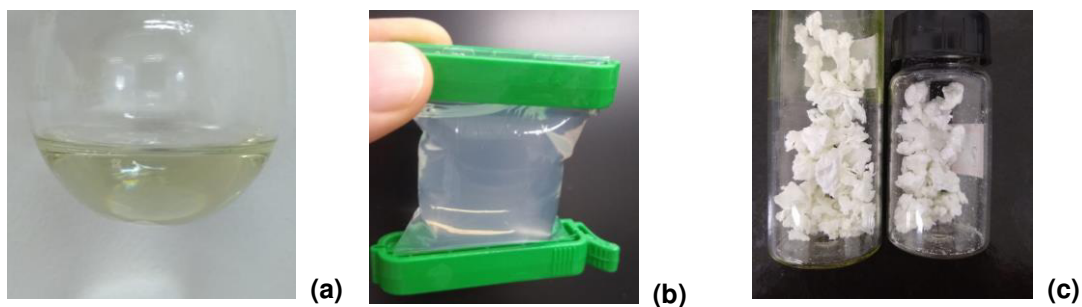
A síntese dos copolímeros PL (Pul-*g*-PZLL) ocorreu via polimerização por abertura de anel (ROP) da L-lisina-Z-NCA em temperatura ambiente iniciada pelas hidroxilas da pululana conforme o mecanismo apresentado na Figura 24. Os copolímeros foram nomeados conforme o teor (% m/m) de lisina enxertada na cadeia: PL10, PL20 e PL30. Em todas as reações, o meio reacional final apresentou-se como uma solução homogênea levemente amarelada; já o aspecto após diálise variou conforme a hidrofobicidade, PL10 (10% de lisina, portanto o copolímero menos hidrofóbico) apresentou-se como um líquido branco, enquanto PL30 como uma gosma branca gelatinosa. Após liofilização, o aspecto obtido foi de uma espuma branca (Figura 25).

Figura 23 - Espectro de RMN ^{13}C (em DMSO-d_6) da lisina-Z-NCA.

Fonte: Próprio autor.

Figura 24 - Mecanismo da síntese dos copolímeros PL (Pul-g-PZLL) por abertura de anel.

Fonte: Próprio autor.

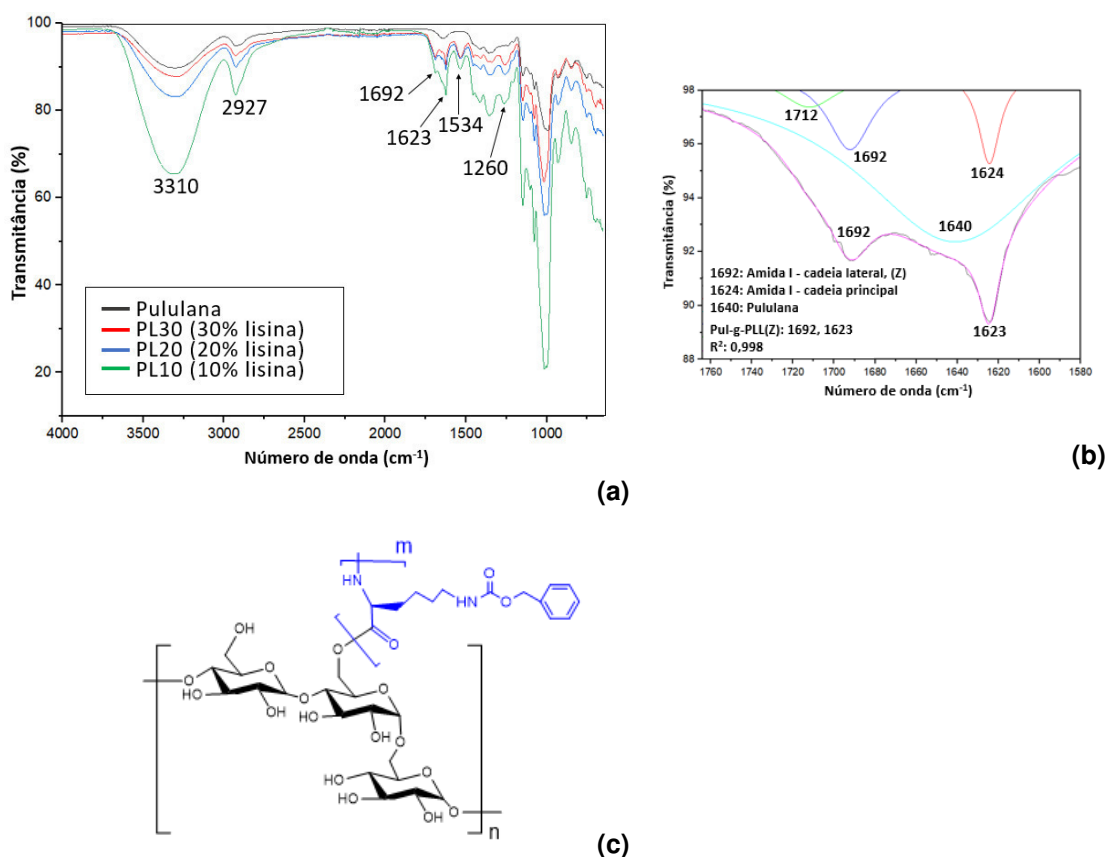
Figura 25 - Síntese dos copolímeros PL: final da reação do PL30 (a), PL10 após diálise (b), PL30 e PL20 secos por liofilização (c).

Fonte: Próprio autor.

Analisando e comparando os espectros de FTIR-ATR da pululana e dos seus copolímeros (Figura 26a), as bandas mais evidentes presentes nos copolímeros são da estrutura da cadeia principal da pululana – 3310 cm^{-1} (estiramento de OH) e 1000 cm^{-1} (estiramento C-O). O aparecimento de bandas em 1692 cm^{-1} de C=O de amida I (grupo Z da cadeia lateral) e em 1623 cm^{-1} uma banda mais intensa de amida I (cadeia principal) indicam a formação do copolímero Pul-*g*-PZLL.

É notável o aumento da intensidade do pico em 1692 cm^{-1} em comparação com o em 1623 cm^{-1} conforme aumenta o teor de lisina no copolímero. A análise da deconvolução da região entre 1764 e 1580 cm^{-1} também mostra a contribuição da banda de pululana (O-C-O, 1644 cm^{-1}) além dos dois picos de amida (Figura 26b).

Figura 26 - Espectros de FTIR-ATR da pululana e seus copolímeros PL10, PL20 e PL30 (10, 20, 30% lisina) (a); deconvolução da região 1764 - 1580 cm^{-1} do PL20 (b); estrutura dos copolímeros Pul-*g*-PZLL.



Fonte: Próprio autor.

É possível estimar a conformação dos polímeros de poli(lisina) de acordo com as frequências de vibração das bandas de amida. Mirtič e Grdadolnik (2013) estudaram a conformação de PLL 31 kDa em diferentes solventes e encontraram

as seguintes bandas para folhas β -pregueadas de PLL agregadas em água: 1692, 1618 (amida I), 1530 (amida II) e 1219-1222 cm^{-1} (amida III). No caso dos copolímeros deste trabalho, as bandas encontradas foram: amida I (1692, 1623 cm^{-1}) e amida II (1534 cm^{-1}), que podem sugerir uma conformação similar, apesar da banda de amida III ter sido encontrada em um valor superior, 1260 cm^{-1} .

Como as intensidades dos sinais são proporcionais à quantidade de amostra analisada, e a quantidade pode variar conforme as amostras, uma forma mais precisa de avaliação da variação de intensidade das bandas de interesse pode ser feita comparando razões de intensidade ao invés de valores absolutos, desta forma pode-se desconsiderar o fator da massa de amostra analisada. Pode-se calcular a razão entre as transmitâncias das bandas características (ex. grupos OH, NH) e a banda em 1000 cm^{-1} (CO da cadeia principal da pululana), e comparar essas razões para os diferentes copolímeros. A redução dos grupos hidroxila disponíveis na pululana, devido à enxertia com PZLL, pode ser observada pela razão A (razão OH/CO, calculada usando T_{3310} e T_{1000}), enquanto o aumento do teor de lisina pelo aumento da razão B (razão grupos metileno/cadeia principal, calculada usando T_{2927} e T_{1000}) (Tabela 8).

Tabela 8 - Razão de sinais do FTIR mostrando o aumento do grau de substituição dos copolímeros PL.

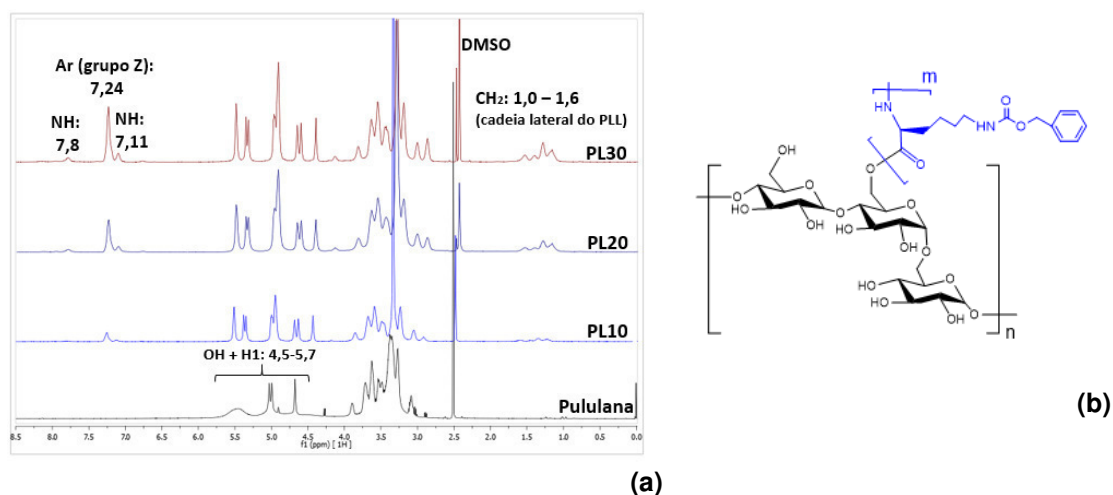
	T_{3010} (OH)	T_{2927} (CH ₂)	T_{1000} (CO, cadeia principal)	razão OH/CO *	razão CH ₂ /CO **
PL10	65,5	83,7	21,1	0,44	0,13
PL20	83,3	89,9	56,2	0,38	0,23
PL30	87,9	92,6	66,1	0,36	0,22

Notas: *Razão OH/CO = $(100 - T_{3310})/(100 - T_{1000})$; **razão CH₂/CO = $(100 - T_{2927})/(100 - T_{1000})$.

Fonte: Próprio autor.

Analisando e comparando os espectros de RMN ¹H da pululana e dos seus copolímeros (Figura 27a), notam-se os picos característicos da pululana (2,7-5,5 ppm) presentes nos copolímeros porém com diferentes intensidades e multiplicidades indicando que houve modificação na estrutura, quando comparado com a pululana in natura. Os picos dos enxertos de PZLL aparecem em 7,8 ppm (NH da cadeia principal de PLL), 7,11, 7,24 ppm (NH da cadeia lateral e CH aromático do grupo Z), e 1,0-1,6 ppm (quatro grupos metileno da cadeia lateral).

Figura 27 - Espectros de RMN ^1H da pululana e dos copolímeros PL10, PL20, PL30 (em DMSO-d_6) (a); estrutura dos copolímeros Pul-*g*-PZLL (b).



Fonte: Próprio autor.

O grau de substituição (GS) dos copolímeros pode ser estimado por RMN ^1H (CARVALHO *et al.*, 2022). A pululana tem 3 hidroxilas disponíveis por resíduo de glicose, logo seu GS máximo é 3. Para a equação, é importante considerar que: i) os sinais dos grupos hidroxila e dos H_1 da pululana aparecem juntos entre 5,7-4,5 ppm e que os outros hidrogênios da pululana aparecem entre 4,0-3,0 ppm; ii) para cada substituição de uma OH na cadeia de pululana teremos 5 hidrogênios aromáticos (do grupo Z); iii) o sinal do metileno (2H) do grupo Z irá aparecer em 5,01 ppm e precisa ser considerado já que aparece dentro da região de OH e H_1 . A equação é: $\frac{A}{5x} = \frac{B}{(3-x)+1+2x}$; sendo x o valor de GS. A é a integral de 7,25-7,21 ppm (H aromático), B é a integral de 5,7-4,3 ppm (OH, H_1 e metileno do grupo Z), portanto $\text{GS} = \frac{-4A}{(A-5B)}$. Para PL10 tem-se $\text{GS}=0,055$ (1,8% das hidroxilas disponíveis substituídas), para PL20 $\text{GS}=0,117$ (3,9% das hidroxilas disponíveis substituídas), e para PL30 $\text{GS}=0,204$ (6,8% das hidroxilas disponíveis substituídas).

5.2 Funcionalização da pululana e do PEG com grupos isocianato

As primeiras reações (Pul-FI) visaram modificar parte das hidroxilas presentes nas cadeias de pululana por grupos isocianato, tendo em vista a alta reatividade desses grupos, necessária para as reações de enxertia posteriores. Essas reações foram realizadas conforme metodologia proposta por Shibata *et al.*

(2001), visando obter um grau de substituição (GS) das hidroxilas por grupos isocianato próximo a 1,5.

Como a pululana é um material hidrofílico e que possui uma alta interação com água, no caso das reações aqui descritas, há que se avaliar se tal característica pode levar à formação de subprodutos indesejados, e/ou à redução do rendimento dos produtos, uma vez que grupos isocianato (-NCO) reagem prontamente com hidroxilas (-OH) - inclusive às da água. Este estudo está apresentado no Apêndice C.

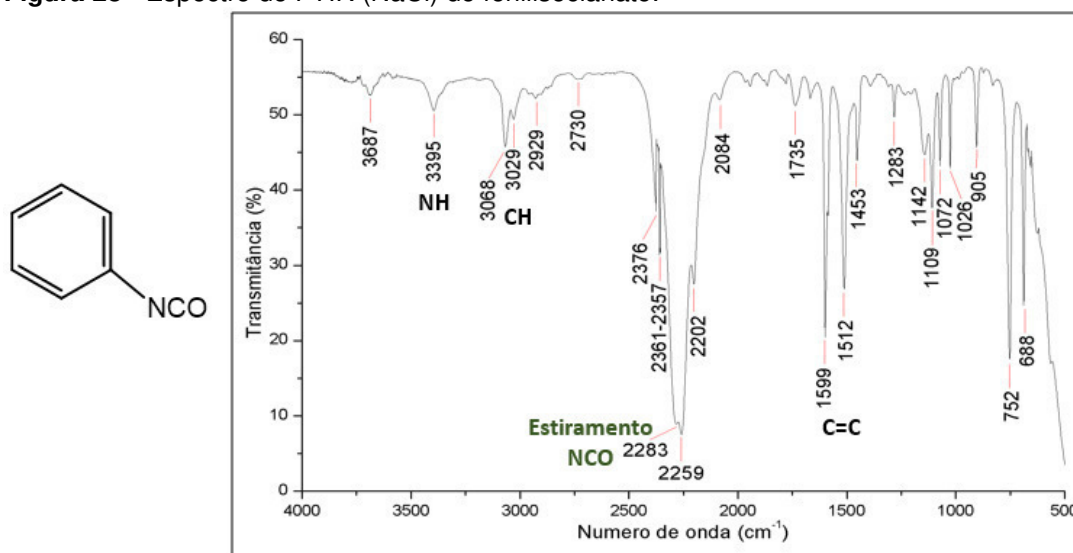
Ainda, de acordo com Shibata *et al.* (2001), a pululana é solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), piridina e água. Tendo em vista a impossibilidade de usar água como solvente dada a natureza da reação química empregada, foram avaliadas reações com tolueno/DMSO e apenas DMSO. Apesar do DMSO ser um solvente higroscópico, que também agrega água ao meio reacional, ele permite a solubilização dos reagentes e dos produtos finais. Para verificar a extensão da influência da umidade presente no solvente, duas estratégias foram testadas, sem secagem prévia (Pul-FI 1) e com secagem (Pul-FI 2) dos reagentes de partida.

5.2.1 Reação da pululana com fenilisocianato (Pul-FI)

Para auxiliar na análise dos espectros dos compostos Pul-FI, analisou-se o fenilisocianato puro primeiro. As Figuras 28, 29 e 30 mostram, respectivamente, os espectros de FTIR, de RMN ^1H e ^{13}C do fenilisocianato comercial.

No espectro de FTIR-ATR do fenilisocianato (Figura 28), observam-se uma banda forte de estiramento -NCO ($2283, 2259\text{ cm}^{-1}$) – esta banda é normalmente encontrada próxima de 2270 cm^{-1} (KARAK, 2017), banda de NH (3395 cm^{-1}), bandas de estiramento C=C ($1599, 1512\text{ cm}^{-1}$) e sinais de CH aromático ($3068, 3029\text{ cm}^{-1}$).

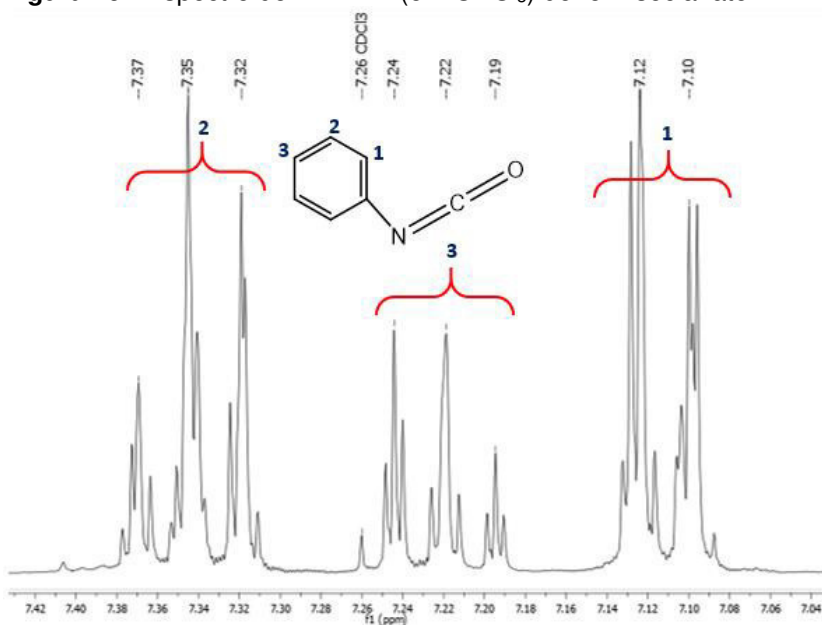
Figura 28 - Espectro de FTIR (NaCl) do fenilisocianato.



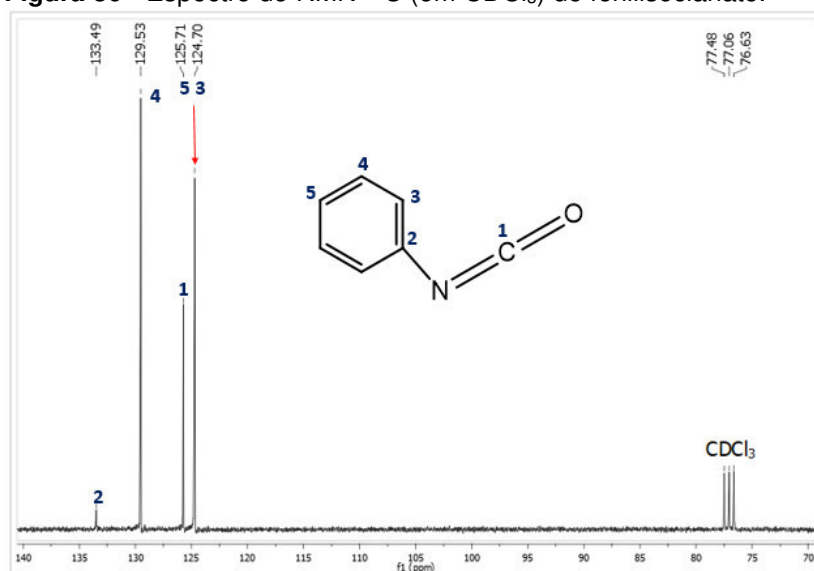
Fonte: Próprio autor.

No espectro de RMN ^1H do fenilisocianato (Figura 29), observam-se os sinais dos H aromáticos em 7,35 ppm (meta), 7,22 ppm (para), 7,11 ppm (orto) do fenilisocianato. No espectro de RMN ^{13}C (Figura 30), observam-se os sinais do Cq isocianato em 125,71 ppm, do Cq aromático em 133,49 ppm, e dos H aromáticos em 129,53 ppm (meta), 125,71 ppm (para), 124,70 ppm (orto).

Figura 29 - Espectro de RMN ^1H (em CDCl_3) do fenilisocianato.



Fonte: Próprio autor.

Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C (em CDCl_3) do fenilisocianato.

Fonte: Próprio autor.

Reação sem secagem prévia dos reagentes (Pul-FI 1)

Após cerca de 20 min do início do aquecimento da solução de pululana em DMSO, observou-se a formação de um gel transparente no fundo do balão, que desapareceu após a adição do FI. Ao final das 24 h de reação, obteve-se uma solução com coloração ligeiramente amarelada. A precipitação em etanol resultou na formação de um sólido branco (Figura 31a) que, após resfriamento e filtração, pôde ser isolado. Após secagem em estufa a $65\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 31b) e cuidadosa raspagem, obteve-se 68 mg de um pó branco finamente particulado (Figura 31c), que foi dissolvido em DMSO-d_6 para análise por RMN ^1H .

A Figura 32 apresenta os espectros comparados de RMN ^1H do composto Pul-FI 1, da pululana e do FI. Observa-se a presença de ressonâncias alargadas com tendência para desaparecimento na linha base em 9,62 e 9,54 ppm, que são típicos de carbamatos (SILVERSTEIN *et al.*, 2015).

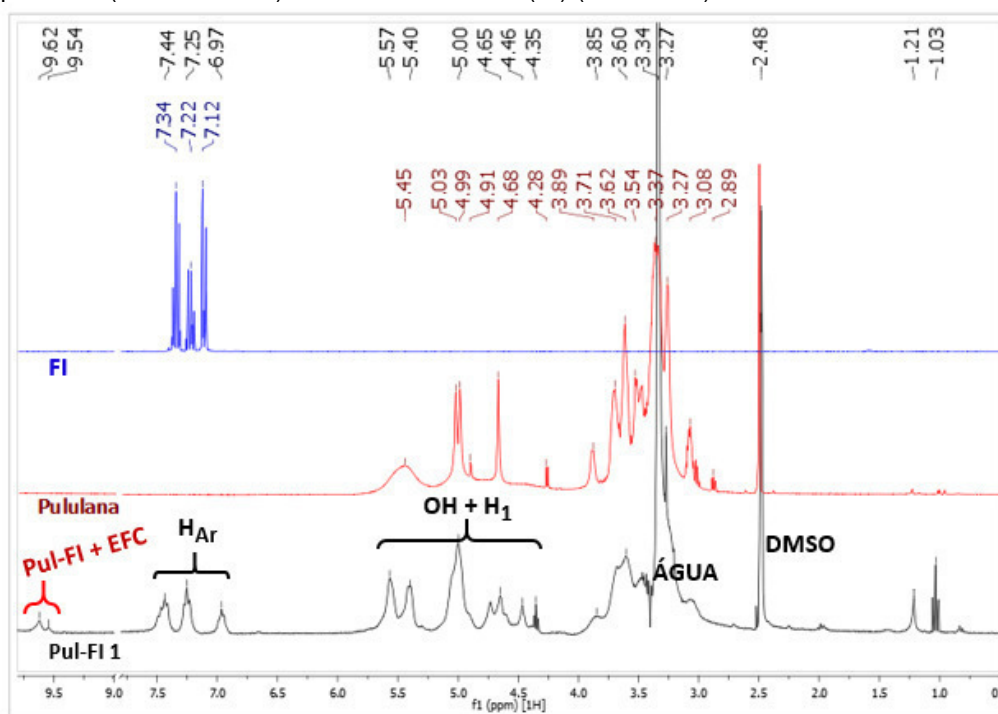
Comparando com a análise do composto produzido por Shibata *et al.* (2001) (ca. 9,6 ppm) – mesma reação com condições ligeiramente diferentes – e de alguns subprodutos comuns obtidos nessa reação, como etilfenilcarbamato (EFC) (9,54 ppm) e 1,3-difenilureia (DFU) (8,65 ppm) (espectros dos subprodutos no Apêndice C), é possível inferir que a ressonância presente em 9,62 ppm é característica da ligação uretânica entre a pululana e o fenilisocianato, indicando a formação do composto desejado.

Figura 31 - Produto bruto da reação Pul-FI 1: (a) precipitado em etanol, (b) seco em papel de filtro na estufa, (c) produto bruto isolado.



Fonte: Próprio autor.

Figura 32 - Comparação dos espectros de RMN ^1H do composto Pul-FI 1 (em DMSO-d_6), da pululana (em DMSO-d_6) e do fenilisocianato (FI) (em CDCl_3).



Fonte: Próprio autor.

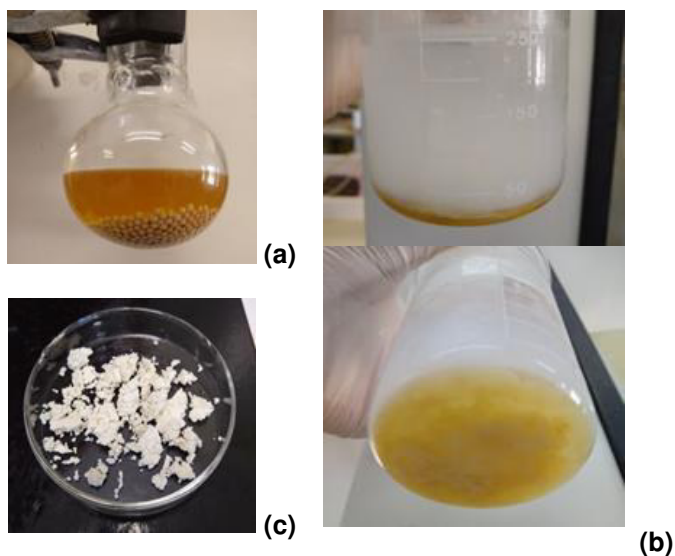
Os outros sinais no espectro são dos H aromáticos (7,44, 7,25, 6,97 ppm), dos H glicosídicos e OH glicosídicos (entre 5,57 e 3,60 ppm) da pululana, de água residual (pico intenso na região 3,34–3,27 ppm), e de DMSO não deuterado presente no DMSO-d_6 (2,48 ppm). A presença de etilfenilcarbamato (EFC) na amostra indica que havia uma quantidade de fenilisocianato ainda não reagido ao final da reação, e que ao verter o meio reacional em etanol durante o tratamento e manter essa mistura armazenada (mesmo em geladeira), favoreceu-se a formação deste subproduto. Aparentemente não houve formação de 1,3-difenilureia (DFU) em quantidade considerável, o que seria indicado pela presença de sinal em 8,65 ppm. O valor de GS calculado foi de 0,29, o que corresponde à conversão de

aproximadamente 10% das funções hidroxila em funções carbamato (calculado pela Equação 1).

Reação em presença de peneira molecular (Pul-FI 2)

Após 24 h da adição do FI, o meio foi vertido em água destilada gelada, formando uma quantidade de precipitado amarelado que coalesceu no fundo do béquer (Figura 33a e 33b). O material foi precipitado em água pois, de acordo com Shibata *et al.* (2001), para GS=1,5 a pululana modificada com fenilisocianato se torna insolúvel neste solvente. A suspensão foi homogeneizada com o auxílio de uma espátula e filtrada a vácuo. Em seguida, o sólido foi separado, lavado com água e filtrado novamente. Após secagem em estufa a 40 °C, obteve-se 1,6133 g de um material sólido de coloração branca (Figura 33c), caracterizado por FTIR, RMN ^1H e ^{13}C .

Figura 33 - Produto Pul-FI 2 (a) ao final da reação, (b) precipitado em água destilada gelada, e (c) após secagem.



Fonte: Próprio autor.

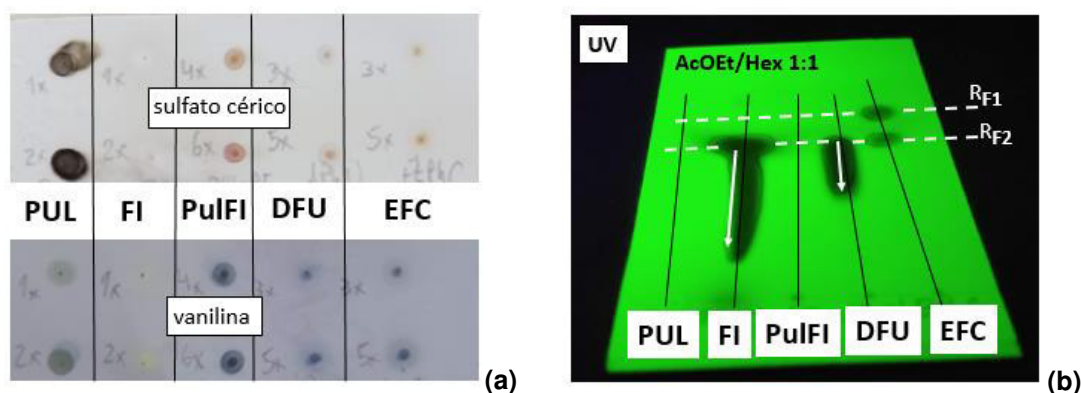
De acordo com a análise por TLC, verificou-se que a melhor condição de separação e resolução das manchas foi obtida usando como eluente acetato de etila/hexano 1:1, os resultados estão resumidos no Quadro 5 e na Figura 34. Apesar de não ter sido possível acompanhar diretamente a formação do composto desejado por TLC, nela observou-se o desaparecimento do reagente de partida FI e o aparecimento de manchas de subprodutos, ou seja, possibilitou um acompanhamento indireto da reação.

Quadro 5 - Resultados de TLC (coloração conforme tipo de revelador e RF) dos reagentes, subprodutos e produto final da reação Pul-FI.

Compostos	Solução aquosa de sulfato cérico e ácido sulfúrico	Solução alcoólica de vanilina e ácido sulfúrico	UV	R _F
Pululana (Pul)	Cinza escuro	Verde musgo	X	-
Fenilsocianato (FI)	Aura incolor	Aura amarelada	✓	0,07-0,58
Pululana modificada com FI (Pul-FI)	Marrom rosado	Azul acinzentado	X	-
1,3-difenilureia (DFU)	Marrom rosado	Azul acinzentado	✓	0,34-0,58
Etilfenilcarbamato (EFC)	Marrom rosado	Azul acinzentado	✓	0,58, 0,74

Fonte: Próprio autor.

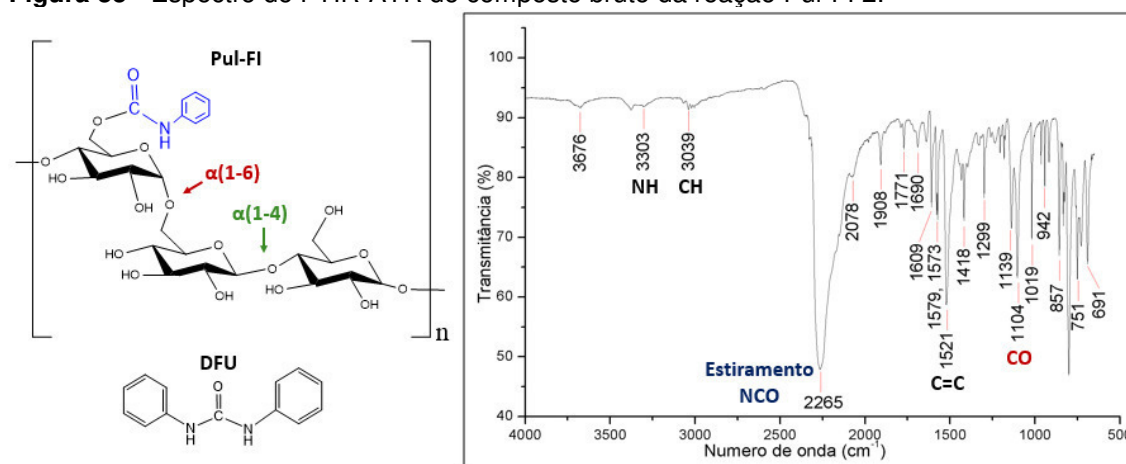
Figura 34 - Resultados de TLC dos reagentes, subprodutos e produto final da reação Pul-FI 1: revelação química (a), visualização sob luz UV (b).



Fonte: Próprio autor.

A Figura 35 apresenta o espectro de FTIR do composto bruto da reação Pul-FI 2.

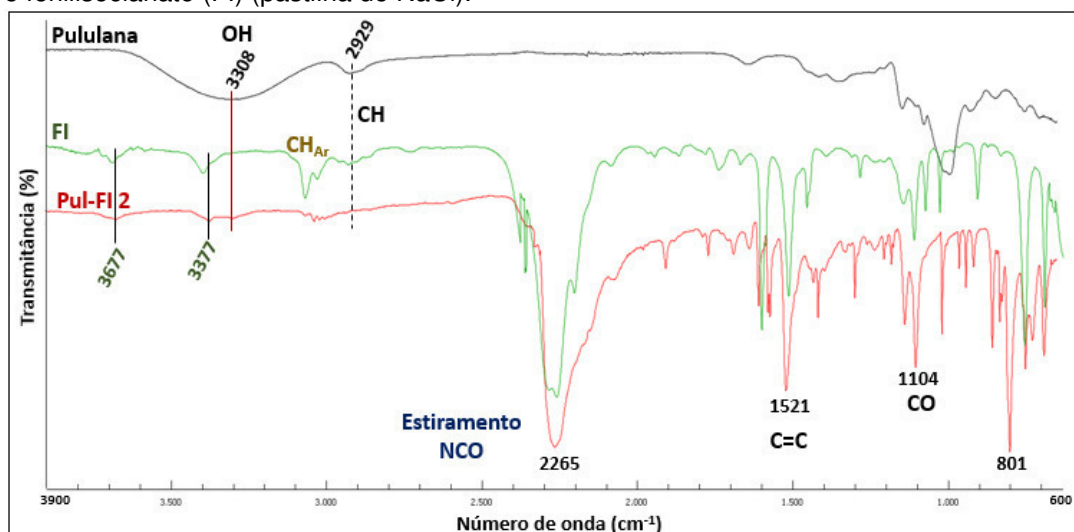
Figura 35 - Espectro de FTIR-ATR do composto bruto da reação Pul-FI 2.



Fonte: Próprio autor.

É possível observar a presença de uma banda forte e larga de -NCO em 2265 cm^{-1} (próxima das bandas provenientes do FI em 2283 e 2259 cm^{-1}), de bandas de CH Aromático, e a ausência de banda de hidroxila na mesma região (3308 cm^{-1}). A ausência de banda característica de hidroxila apenas se justificaria se a maioria das hidroxilas da pululana estivessem substituídas (o que não foi o caso, de acordo com resultados de RMN), ou se quase não houvesse pululana na amostra e sim praticamente apenas DFU – o que é o mais provável. Também se observa um sinal de estiramento C=C (1521 cm^{-1}). Na Figura 36, os espectros de FTIR do composto Pul-FI 2 (ATR), pululana (ATR) e fenilisocianato (NaCl) são apresentados para fins de comparação.

Figura 36 - Comparação entre os espectros de FTIR do composto Pul-FI 2 (ATR), pululana (ATR) e fenilisocianato (FI) (pastilha de NaCl).

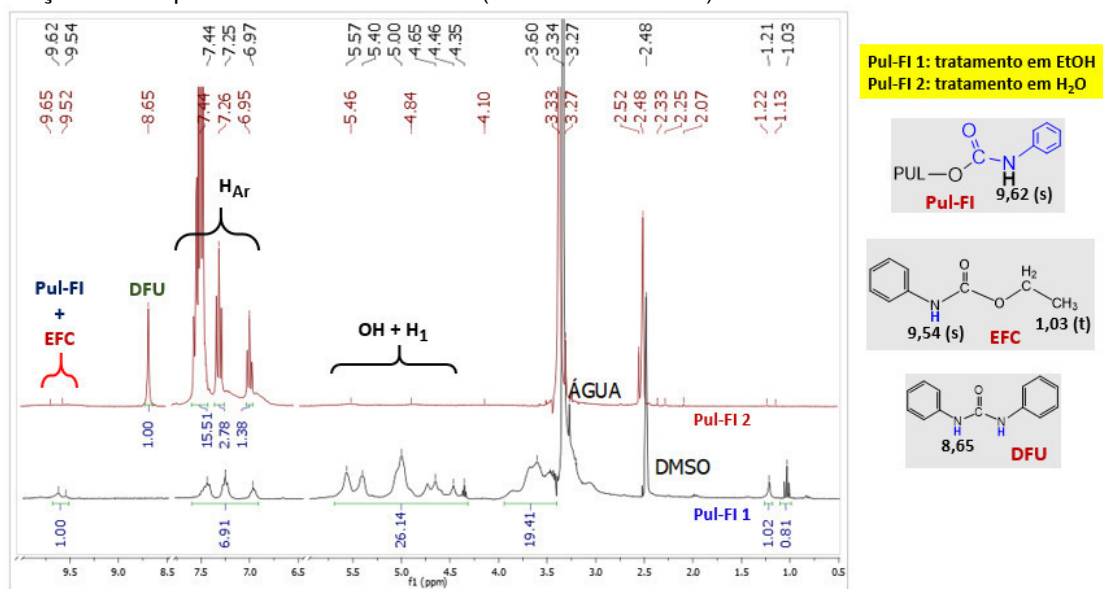


Fonte: Próprio autor.

Comparando o espectro de FTIR do Pul-FI 2 com os de seus reagentes, observa-se mais claramente o desaparecimento da banda larga típica de hidroxila (3308 cm^{-1}) oriunda da pululana, a presença de uma banda forte de estiramento -NCO (2265 cm^{-1}) e uma banda forte C=C (1521 cm^{-1}).

A Figura 37 apresenta os espectros de RMN ^1H dos produtos de reação entre pululana e fenilisocianato (Pul-FI 1 e Pul-FI 2). A análise do espectro de RMN ^1H do composto Pul-FI 2 mostra a presença de um sinal singlete em $8,65\text{ ppm}$ e de múltiplos sinais característicos de H aromáticos em $7,44$, $7,26$ e $6,95\text{ ppm}$. Além disso é nítida a quase ausência de sinais de -OH e H glicosídicos da pululana.

Figura 37 - Comparação dos espectros de RMN ^1H (em DMSO-d_6) dos compostos obtidos das reações entre pululana e fenilisocianato (Pul-FI 1 e Pul-FI 2).



Fonte: Próprio autor.

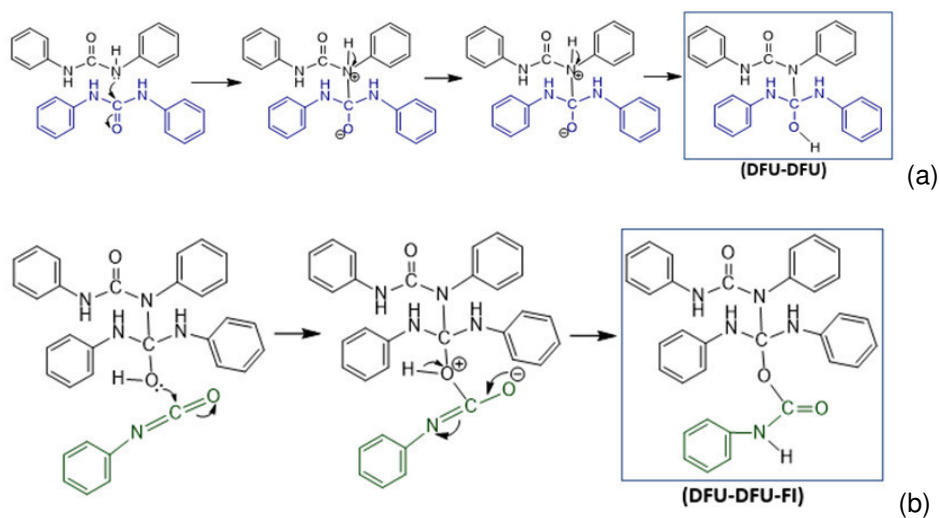
Comparando ambos os espectros, é possível apontar indícios de formação do composto desejado (pululana modificada com fenilisocianato) no caso da reação Pul-FI 1, enquanto o espectro proveniente da reação Pul-FI 2 indica basicamente sinais característicos de DFU. A princípio, é possível atribuir esse resultado à presença de uma grande quantidade de isocianato residual no meio reacional ao final das 24h de reação, o que é corroborado pelo baixo GS da reação Pul-FI 1. Logo, uma vez que o meio foi vertido em água (solvente de tratamento usado no caso do Pul-FI 2), o FI residual foi convertido a DFU via reação de hidrólise.

Contudo, apesar dos esforços para manter o meio reacional com a menor quantidade de umidade possível, não se pode excluir a possibilidade da formação de DFU ter ocorrido inclusive durante as 24h de reação devido à presença de umidade. Na reação Pul-FI 1, por outro lado, a quantidade de DFU produzida foi comparativamente menor.

Outra possibilidade em relação à formação de subprodutos via hidrólise é que a DFU reaja entre si e com fenilisocianato formando oligômeros de DFU. Em geral, entende-se como oligômero compostos com $\text{MW} < 10$ kDa, ou que contenham de 10 a 100 unidades de repetição. Essa hipótese foi verificada e confirmada por Shibata *et al.* (2001), via análise de cromatografia de permeação em gel (GPC), que indicou a presença da pululana modificada, DFU e de oligômeros. Os possíveis

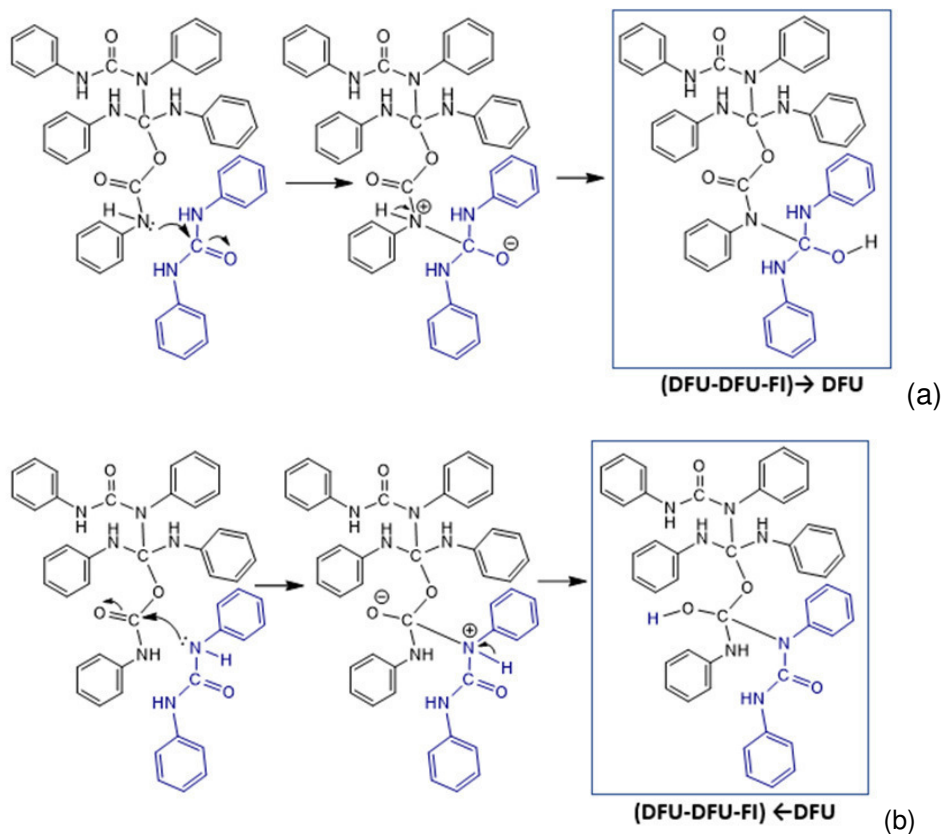
mecanismos envolvidos na formação do oligômero estão apresentados nas Figuras 38 e 39.

Figura 38 - Mecanismo de formação de oligômero de DFU. (a) Etapa 1: Ligação entre duas DFU via ataque nucleofílico, (b) Etapa 2: ataque nucleofílico no fenilisocianato (FI).



Fonte: Próprio autor.

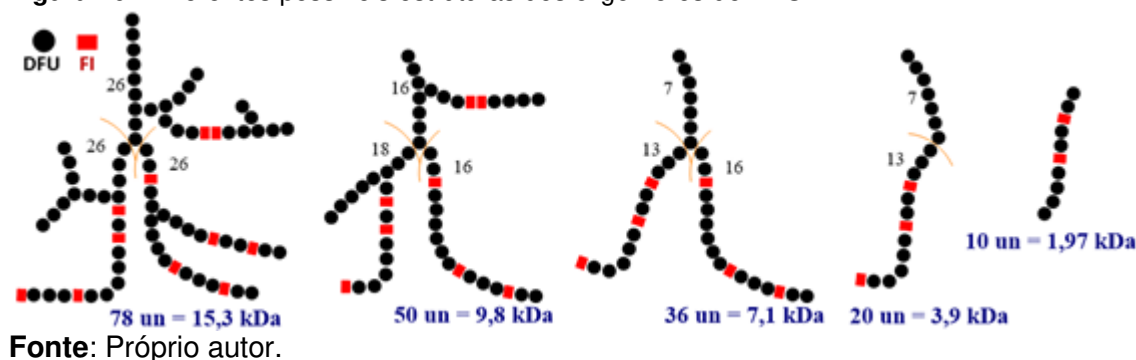
Figura 39 - Mecanismo de formação de oligômero de DFU. Duas rotas possíveis para Etapa 3: (a) Ataque nucleofílico na DFU, ou (b) ataque nucleofílico da DFU.



Fonte: Próprio autor.

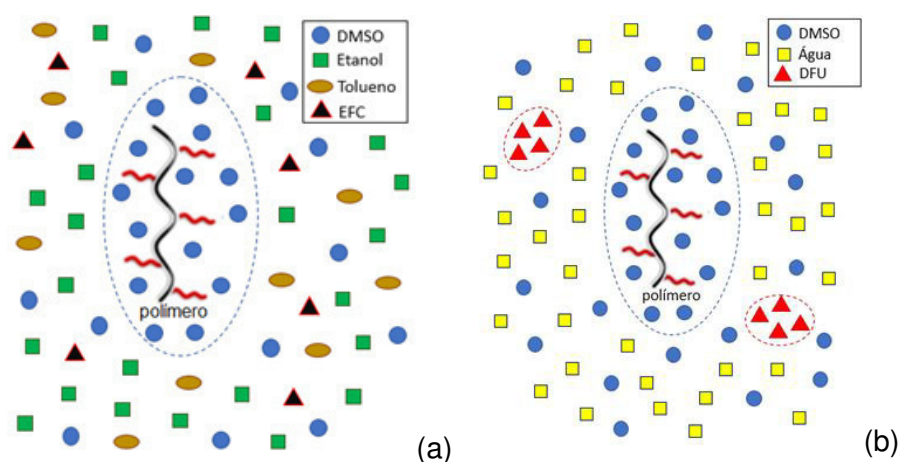
Algumas possíveis variedades estruturais nos oligômeros estão ilustradas na Figura 40. Considerando a interferência de aspectos como impedimento estérico, é mais provável que as estruturas de oligômeros sejam majoritariamente lineares ou com poucas ramificações.

Figura 40 - Diferentes possíveis estruturas dos oligômeros de DFU.



Um dos motivos que pode explicar a baixa formação de DFU na reação Pul-FI 1 (sem secagem prévia de reagentes/solventes) é a presença do tolueno, que não solubiliza nem a pululana e nem seu derivado modificado, e nem é miscível em água. Nesse caso, o tolueno permaneceria miscível no DMSO impedindo que água fosse absorvida, enquanto o DMSO formaria uma camada de solvatação ao redor dos polímeros, conforme ilustrado na Figura 41.

Figura 41 - Representação dos componentes das reações Pul-FI 1 (a) e Pul-FI 2 (b).



Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos mostram que independente dos solventes escolhidos para a reação ou tratamento, sempre haverá dificuldades na preparação e separação do composto desejado devido à presença de umidade e de reagente residual (FI), tornando o processo mais dispendioso. Na reação Pul-FI 1, apesar da

reduzida formação de subprodutos (comparando com a reação Pul-FI 2), o tratamento que consiste em verter em etanol leva à obtenção de um composto intumescido (parcialmente solúvel) e conseqüentemente à perda de material na etapa de filtração. Na reação Pul-FI 2, obteve-se praticamente apenas subprodutos (DFU).

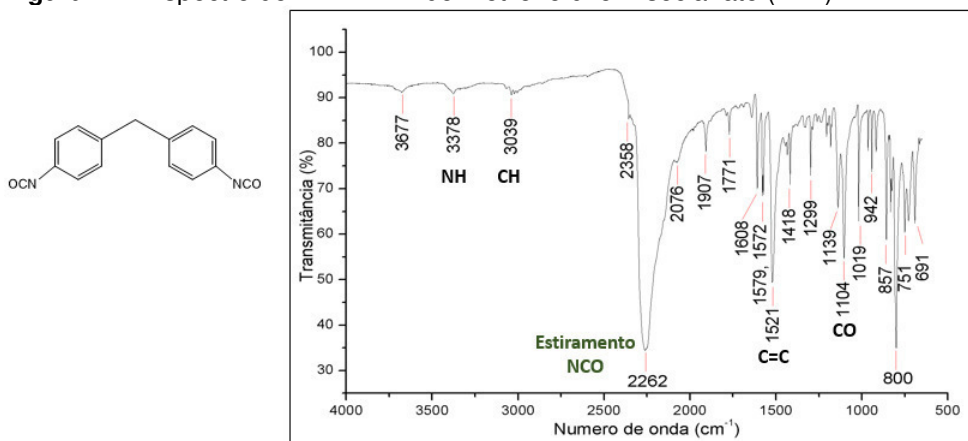
Outra possibilidade para a separação do composto desejado (Pul-FI) seria a realização de uma segunda etapa de tratamento do composto bruto seco que consistiria em lavagem com solvente adequado para solubilizar e remover apenas os subprodutos (como acetona para remover DFU). Os testes de solubilidade estão descritos no Apêndice D.

5.2.2 Funcionalização do PEG com diisocianatos (PEG-NCO)

Inicialmente, caracterizaram-se os reagentes de partida (diisocianatos e PEGs) por FTIR e RMN. As Figuras 42 e 43 apresentam os espectros de FTIR-ATR do MDI e do HDI, respectivamente; e a seguir os seus espectros de RMN são apresentados nas Figuras 44 e 45 (^1H) e Figuras 46 e 47 (^{13}C), respectivamente.

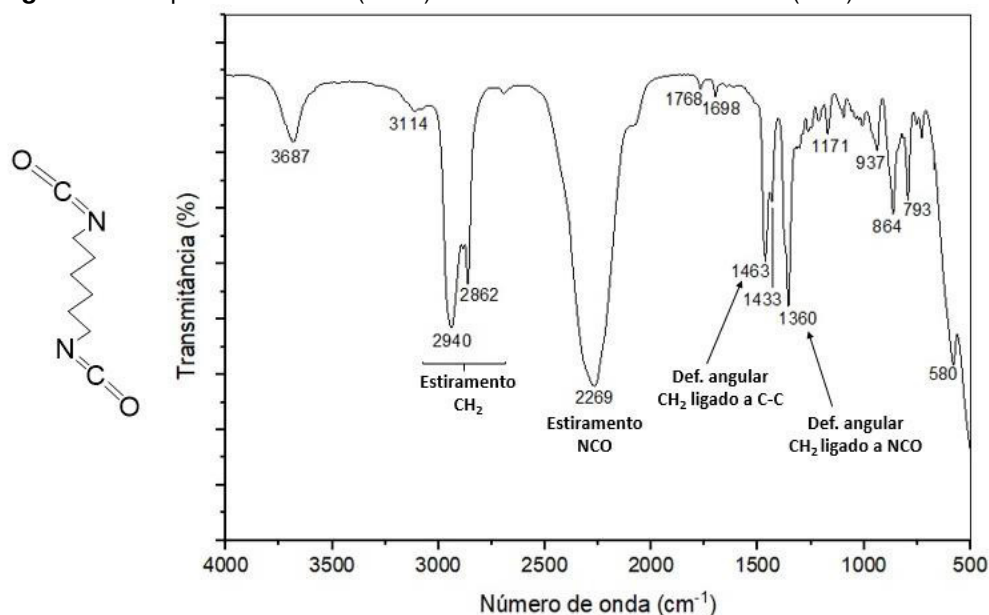
Nos espectros de FTIR-ATR do MDI e HDI (Figuras 42 e 43), observam-se uma banda forte e larga de estiramento NCO (2262 cm^{-1} para MDI, e 2269 cm^{-1} para HDI); banda forte de C=C no MDI em 1521 cm^{-1} , bandas de NH (3378 cm^{-1} para MDI; 3687 cm^{-1} para HDI) e de CH (3309 cm^{-1} para MDI; 2940 e 2862 cm^{-1} para HDI), e bandas em 1463 e 1360 cm^{-1} dos grupos metileno do HDI (estiramento e deformação angular).

Figura 42 - Espectro de FTIR-ATR do metileno difenilisocianato (MDI).



Fonte: Próprio autor.

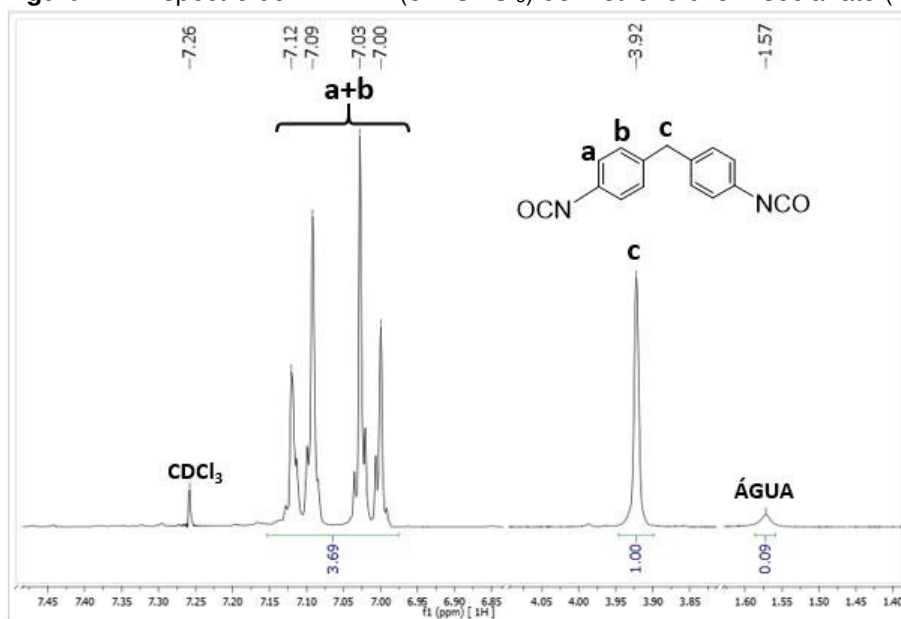
Figura 43 - Espectro de FTIR (NaCl) do hexametileno diisocianato (HDI).



Fonte: Próprio autor.

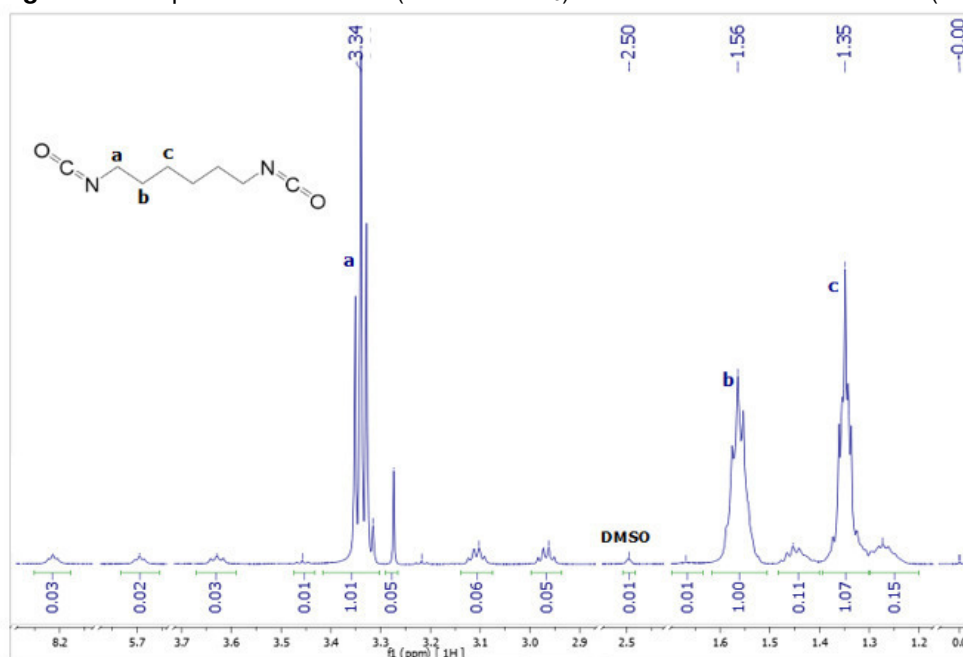
No espectro de RMN ^1H do MDI (Figura 44), observam-se os sinais dos H aromáticos em 7,11 ppm e 7,02 ppm, sinal do grupo metileno em 3,92 ppm. No espectro do HDI (Figura 45), observam-se os sinais dos grupos metileno em 3,34, 1,56 e 1,35 ppm.

Figura 44 - Espectro de RMN ^1H (em CDCl_3) do metileno difenilisocianato (MDI).



Fonte: Próprio autor.

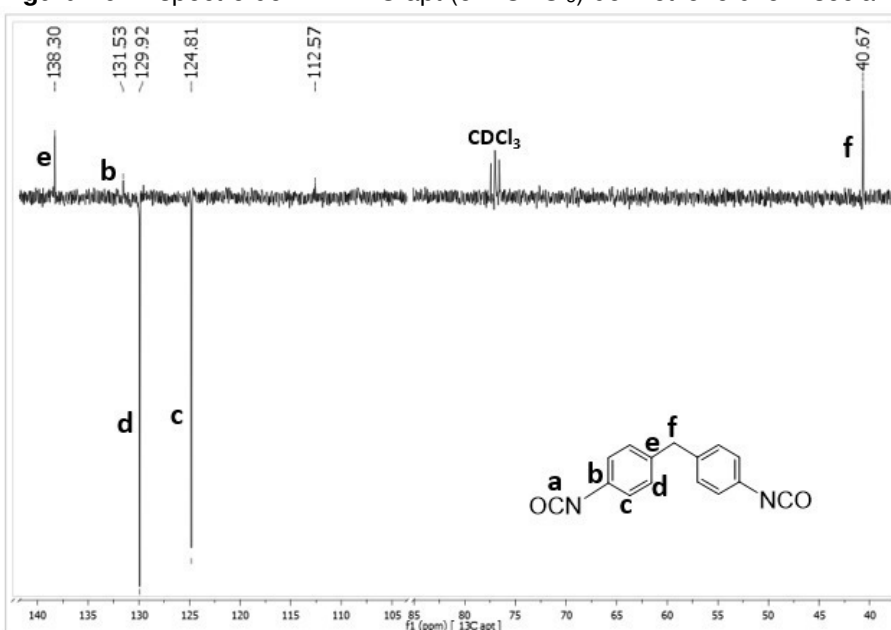
Figura 45 - Espectro de RMN ^1H (em DMSO-d_6) do hexametileno diisocianato (HDI).



Fonte: Próprio autor.

No espectro de RMN ^{13}C apt do MDI (Figura 46), observam-se os sinais dos Cq aromáticos em 138,30 ppm e 131,53 ppm, sinais dos H aromáticos em 129,92 ppm e 124,81 ppm, sinal do grupo metileno em 40,67 ppm. A faixa de sinal típica esperada para isocianato é de 115 a 135 ppm, e observou-se um sinal em 112,57 ppm.

Figura 46 - Espectro de RMN ^{13}C apt (em CDCl_3) do metileno difenilisocianato (MDI).

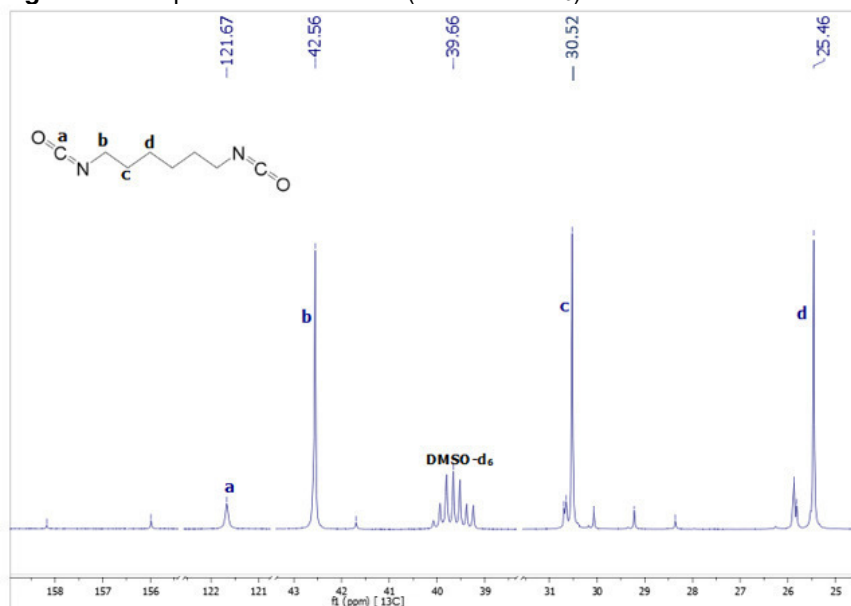


Fonte: Próprio autor.

No espectro do HDI (Figura 47), observaram-se os sinais dos grupos metileno em 42,56, 30,52 e 25,46 ppm e do Cq em 121,67 ppm. Também são

visíveis, assim como no RMN ^1H , outros picos derivados da reação do HDI com umidade do solvente deuterado. Há um estudo mais detalhado sobre o efeito da umidade no solvente deuterado descrito no Apêndice B.

Figura 47 - Espectro de RMN ^{13}C (em DMSO-d_6) do hexametileno diisocianato (HDI).

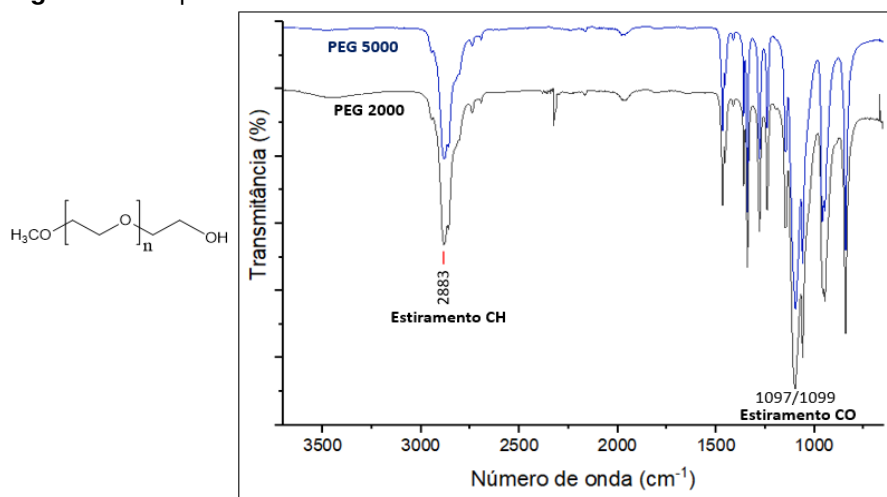


Fonte: Próprio autor.

No teste de solubilidade, o MDI mostrou-se solúvel em tolueno, clorofórmio, acetona, acetato de etila, DMSO e THF. Os resultados deste teste estão detalhados no Apêndice D.

As Figuras 48, 49 e 50 mostram, respectivamente, os espectros comparados de FTIR, de RMN ^1H e ^{13}C do mPEG-OH 5000 (PEG 5000) e do mPEG-OH 2000 (PEG 2000) comerciais.

Figura 48 - Espectros de FTIR-ATR do mPEG-OH 5000 e mPEG-OH 2000.

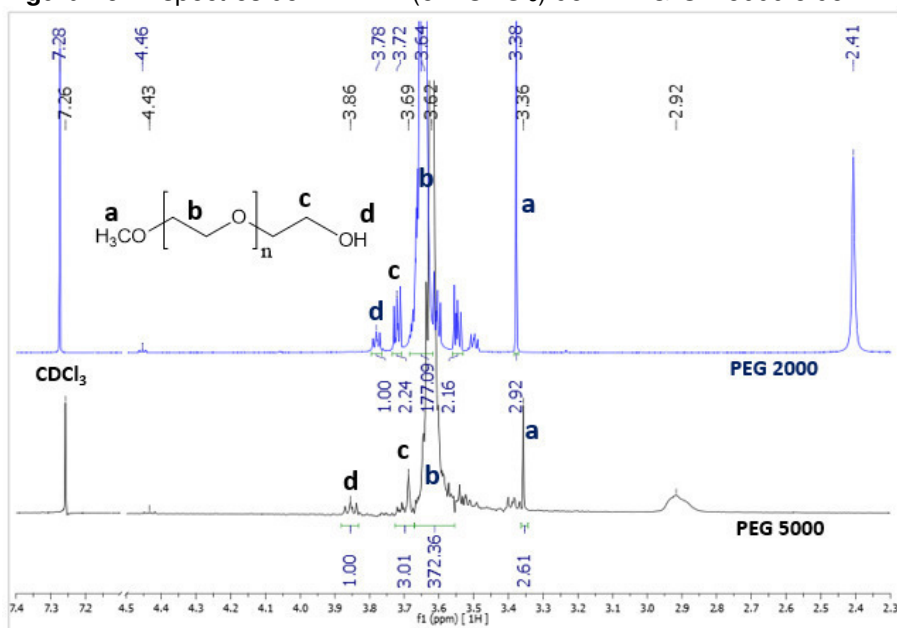


Fonte: Próprio autor.

Nos espectros de FTIR-ATR do PEG 5000 e do PEG 2000 (Figura 48), observam-se uma banda média de estiramento CH (2883 cm^{-1}), bandas médias de deformação angular CH ($1466, 1360\text{ cm}^{-1}$) e banda intensa de estiramento CO (em 1097 cm^{-1} para PEG 5000 e 1099 cm^{-1} para PEG 2000).

Nos espectros de RMN ^1H dos PEGs (Figura 49), observaram-se o sinal do grupo metoxila em 3,36 (PEG 5000) e 3,38 ppm (PEG 2000), do grupo $-\text{CH}_2$ mais próximo à hidroxila em 3,69 (PEG 5000) e 3,72 ppm (PEG 2000), um pico largo em 3,62 (PEG 5000) e 3,64 ppm (PEG 2000) proveniente dos grupos metileno no meio da cadeia polimérica, e da hidroxila em 3,86 (PEG 5000) e 3,78 ppm (PEG 2000).

Figura 49 - Espectros de RMN ^1H (em CDCl_3) do mPEG-OH 5000 e do mPEG-OH 2000.

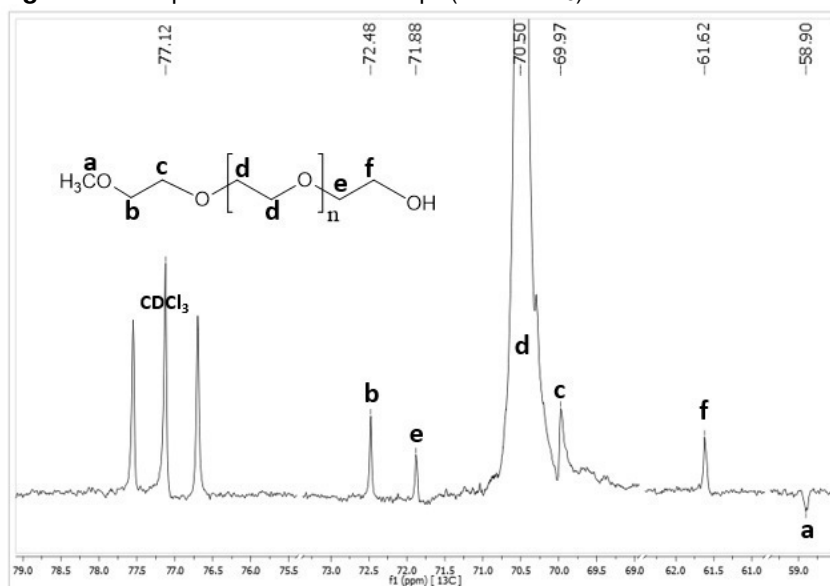


Fonte: Próprio autor.

No espectro de RMN ^{13}C do PEG 5000 (Figura 50), observam-se os sinais de $-\text{CH}_2$ mais próximos à hidroxila em 61,62 e 71,88 ppm, um pico largo em 70,50 ppm dos grupos metileno no meio da cadeia polimérica, um sinal de $-\text{CH}_2$ próximo da metoxila em 72,48 e 69,97 ppm, e o sinal de $-\text{CH}_3$ da metoxila em 58,90 ppm.

No teste de solubilidade, mPEG-OH 5000 mostrou-se solúvel em água destilada e clorofórmio. Os resultados deste teste estão detalhados no Apêndice D.

Figura 50 - Espectro de RMN ^{13}C apt (em CDCl_3) do mPEG-OH 5000.

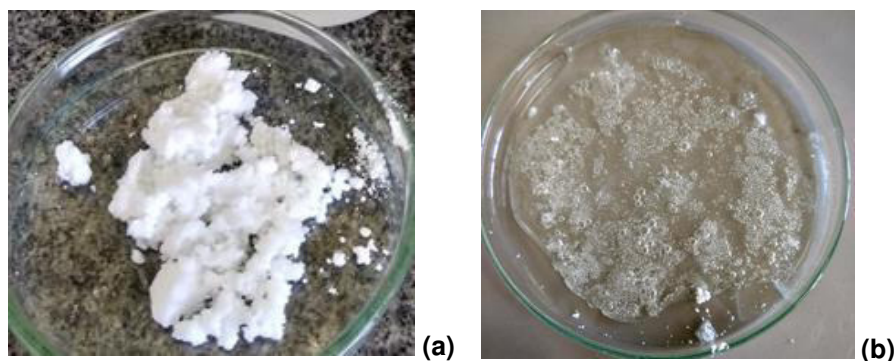


Fonte: Próprio autor.

FUNCIONALIZAÇÃO DO PEG COM MDI (aromático): PEG-NCO-1

A Figura 51 apresenta o material obtido após procedimento de síntese do PEG-NCO-1 (usando MDI e mPEG-OH 5000), e a Figura 52 os espectros comparados de RMN ^1H de MDI, mPEG-OH 5000 e PEG-NCO-1. Nesta reação, esperava-se obter PEG funcionalizado com grupo NCO na ponta, porém subprodutos podem ter sido gerados devido a reações do MDI com umidade (Apêndice C).

Figura 51 - Material obtido após reação de síntese do PEG-NCO-1 (MDI). (a) Produto filtrado, (b) produto após 10 minutos de secagem em estufa.

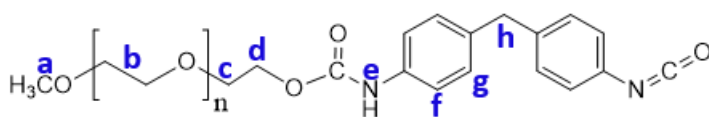
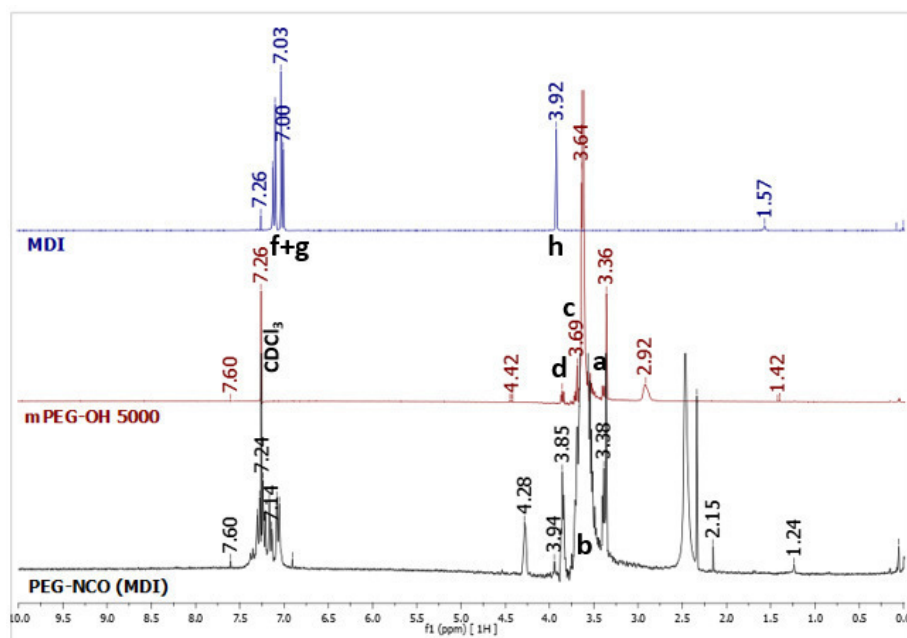


Fonte: Próprio autor.

Observando o espectro de RMN ^1H do PEG-NCO-1 e comparando-o com os espectros de mPEG-OH 5000 e MDI (Figura 52), observa-se a presença dos sinais dos H aromáticos entre 7,12 ppm e 7,00 ppm, do grupo metileno do MDI em 3,94

ppm, um pico largo em 3,62 ppm dos grupos metileno no meio da cadeia polimérica do PEG, os sinais dos grupos metileno próximos da função carbamato em 3,85 e 3,64 ppm, da metoxila em 3,38 ppm. Também é visível sinal de CH₃ do tolueno em 2,34 ppm e de H aromáticos. A presença de sinal de tolueno no produto tratado mostra como pode ser complexa a etapa de tratamento para garantir a total remoção dos solventes de reação.

Figura 52 - Comparação dos espectros de RMN ¹H de MDI, mPEG-OH 5000 e PEG-NCO-1 (em CDCl₃).



Fonte: Próprio autor.

O sinal do grupo carbamato não foi identificado, o que pode ser devido à baixa ocorrência de ligações entre o PEG e o MDI ou à própria característica da função nitrogenada, pois funções carbamato e amidas primárias e secundárias normalmente possuem uma taxa de troca de prótons baixa, por isso o pico costuma ser alargado e pode desaparecer na linha base, além de causar acoplamento com os prótons adjacentes, e conseqüentemente desdobramentos dos picos destes prótons (SILVERSTEIN *et al.*, 2015), o que poderia justificar a presença de tantos picos na região de H aromáticos. Em compostos de estrutura relativamente semelhante (PEG enxertado via função arilisocianato), análises de FTIR foram capazes de apontar a presença de bandas referentes a ligações carbamato na

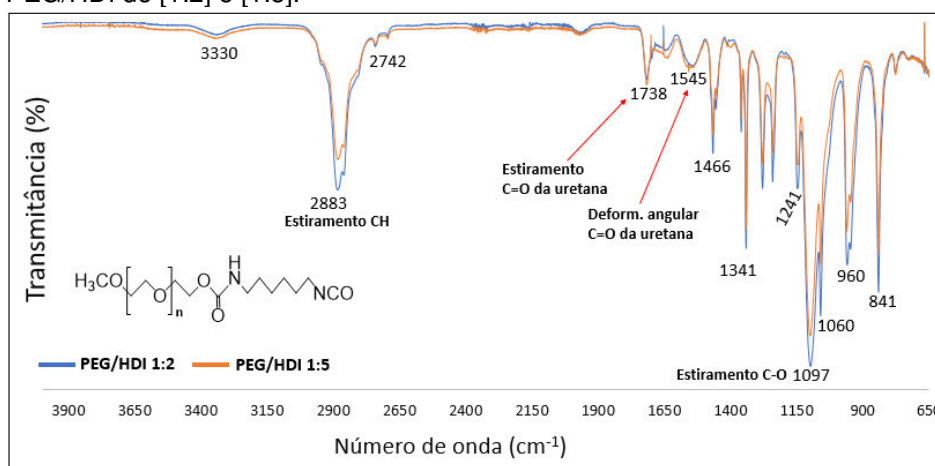
região entre 1727-1713 cm^{-1} e de estiramento -NCO em 2267 cm^{-1} (BIEDERMANN *et al.*, 2011).

Análises de FTIR poderiam ajudar a confirmar a formação do composto de interesse de fato, o que foi possível em estrutura análoga baseada em quitosana (enxertada com diisocianato alifático) que levou à formação de bandas características de deformação -NH entre 1641-1602 cm^{-1} (LI *et al.*, 2012).

FUNCIONALIZAÇÃO DO PEG COM HDI (alifático): PEG-NCO-2

Quanto à síntese do PEG-NCO-2 (usando HDI e mPEG-OH 2000), no espectro de FTIR (Figura 53), observam-se bandas de estiramento e deformação de C=O da uretana em 1738 e 1545 cm^{-1} , respectivamente. Entretanto, como não foi observado pico de NCO (ca. 2270 cm^{-1}), mesmo usando uma razão molar PEG/HDI [1:5], indicando que possivelmente a função isocianato se degradava rapidamente, optou-se por realizar a reação de enxertia utilizando esse PEG-NCO de forma *one-pot*, ou seja, sem uma etapa de purificação do intermediário (PEG-NCO) antes de enxertá-lo na pululana.

Figura 53 - Espectros de FTIR-ATR do PEG-NCO 2 (utilizando HDI) nas proporções molares de PEG/HDI de [1:2] e [1:5].



Fonte: Próprio autor.

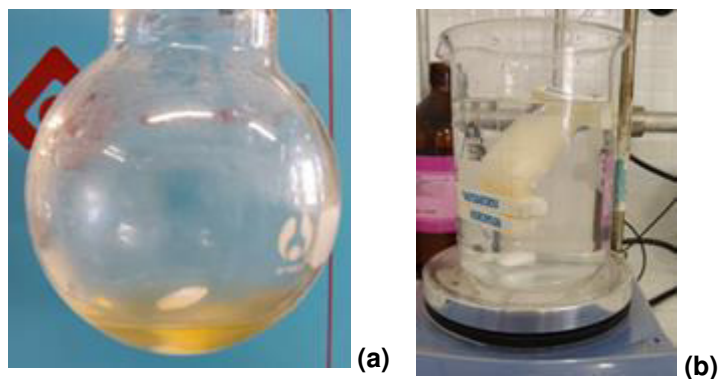
5.3 Síntese de pululana-g-poli(etilenoglicol) (PE)

Duas metodologias foram avaliadas para síntese do copolímero PE: uma com diisocianato aromático (MDI) e outra com diisocianato alifático (HDI).

5.3.1 Enxertia do PEG com MDI (aromático): PE-1

A Figura 54 mostra o material obtido após procedimento de síntese do Pul-g-PEG (PE-1). Nesta reação, optou-se por fazer o tratamento usando diálise ao invés de precipitação com solvente para reduzir perda de material.

Figura 54 - Material obtido após reação PE-1 (Pul-g-PEG) (a), sistema de diálise usado para tratamento (b).

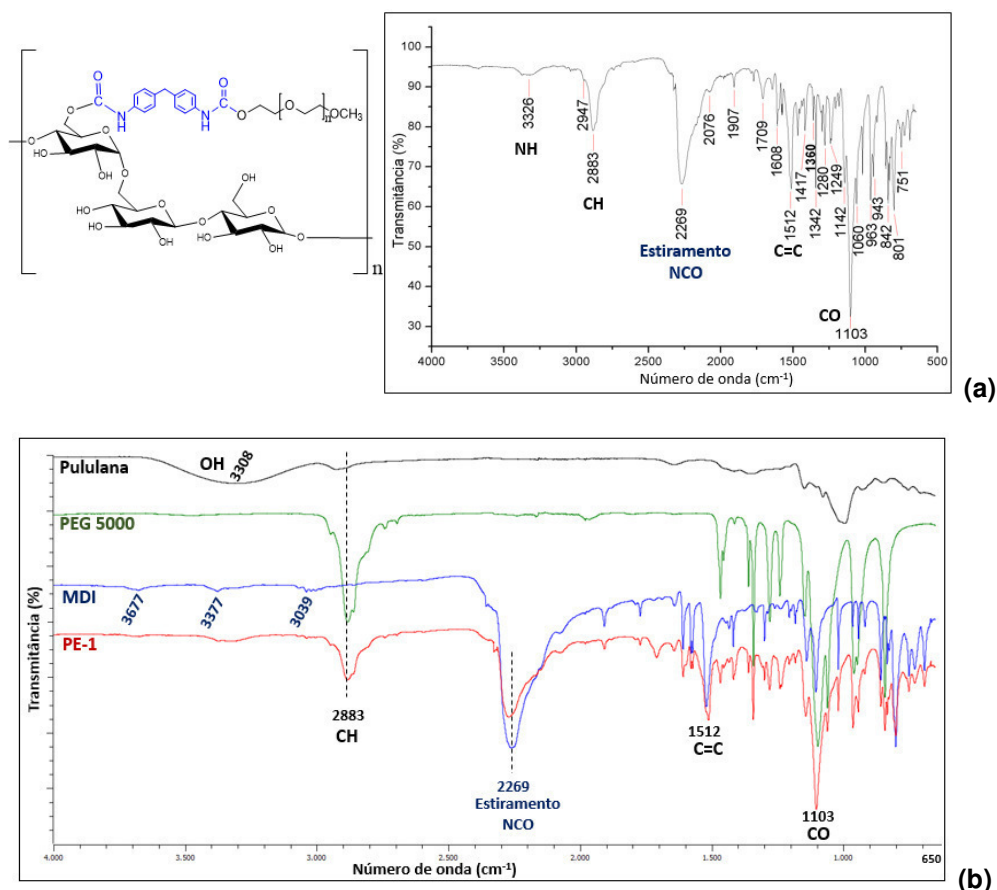


Fonte: Próprio autor.

A seguir são apresentados os espectros de FTIR do PE-1 (Figura 55a) e dele comparado com seus reagentes de partida (Figura 55b) e na Figura 56 os de RMN ^1H . Comparando o espectro de FTIR do composto PE-1 com os espectros da pululana, do mPEG-OH 5000 e do MDI, observa-se a presença de banda forte de estiramento -NCO (2269 cm^{-1}) e de carbamato (1709 cm^{-1}).

Em compostos de estrutura relativamente semelhante (mPEG-OH enxertado via função arilisocianato), foram observados sinais de carbamato na região $1727\text{--}1713\text{ cm}^{-1}$ e de estiramento -NCO em 2267 cm^{-1} (BIEDERMANN *et al.*, 2011). Também estão presentes bandas de estiramento de -CH₂ do mPEG-OH (2883 cm^{-1}), banda de C=C (1512 cm^{-1}), estiramento de -CO (1103 cm^{-1}), estiramento NH (ca. 3377 cm^{-1}) e leve abaulamento na região onde se esperava encontrar banda de hidroxila (região de 3300 cm^{-1}). A ausência de banda de OH não seria esperada, a menos que os grupos -OH disponíveis na pululana tenham sido completamente reagidos, ou que a proporção de pululana no polímero enxertado seja baixa.

Figura 55 - Espectro de FTIR-ATR do composto PE-1 (Pul-g-PEG) (a) e comparação com os espectros oriundos da pululana, do mPEG-OH 5000 e do MDI comerciais (b).



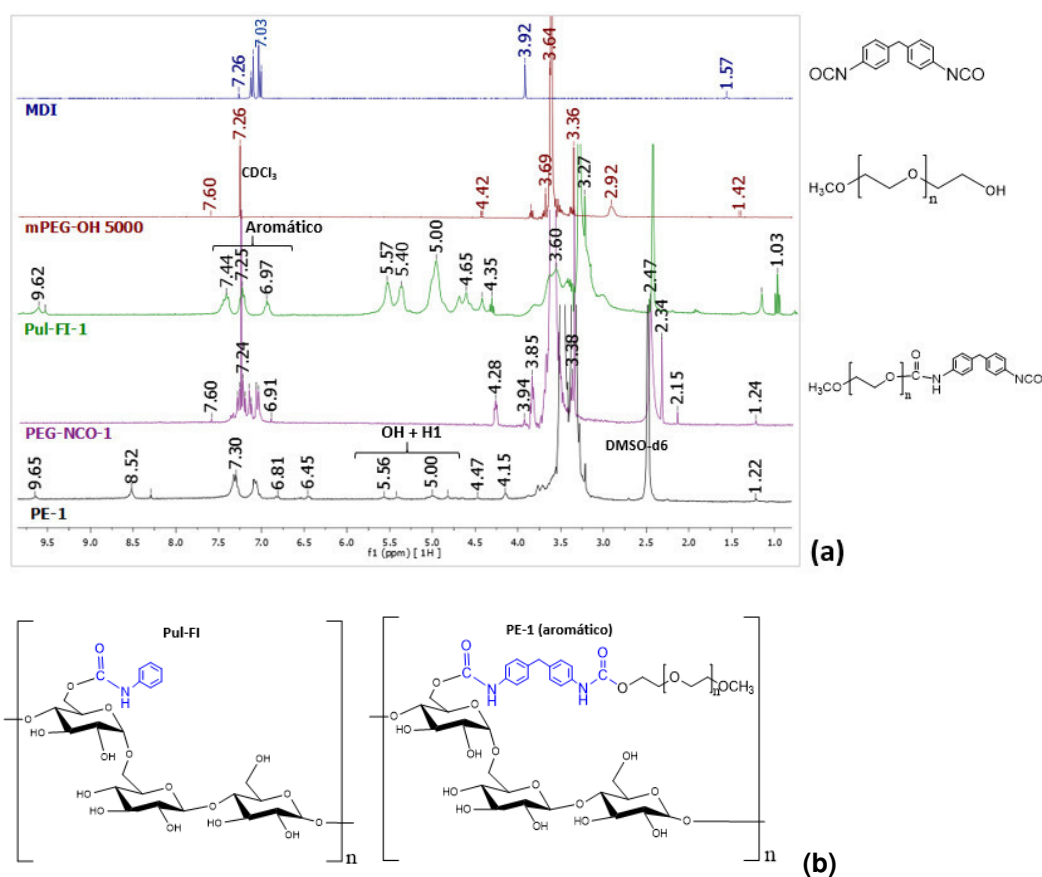
Fonte: Próprio autor.

Ao analisar o espectro de RMN ^1H do composto tratado PE-1 (Pul-g-PEG) (Figura 56) em comparação com os espectros dos reagentes MDI e mPEG-OH 5000 e com o espectro do composto Pul-FI 1 (pululana modificada com fenilisocianato), pode-se destacar algumas ressonâncias: (i) singlete em 9,65 ppm, que pode ser atribuído à ligação uretânica entre pululana e MDI, uma vez que os sinais em 9,62 e 9,54 ppm presentes no espectro Pul-FI 1 são também de funções carbamato (nos compostos Pul-FI 1 e EFC, respectivamente); (ii) dois sinais singlete em 8,52 e 8,29 ppm, que possivelmente são de derivados provenientes da hidrólise do MDI, já que a DFU proveniente da hidrólise do fenilisocianato tem sinal singlete em 8,65 ppm (espectro de RMN da DFU no Apêndice C).

Também estão presentes: (iii) sinais característicos de CH aromático e de CH amina aromática em 7,30, 7,10, 6,81, 6,45 ppm, novamente indicando a formação de subprodutos de hidrólise do MDI (mais detalhes no Apêndice C); (iv) sinais fracos de OH e H glicosídicos da pululana entre 5,56 e 4,15 ppm; (v) sinal

intenso de água na faixa de 3,48-3,34 ppm; (vi) sinal do DMSO não-deuterado presente no DMSO-d₆. Notou-se a ausência do pico característico de tolueno em 2,34 ppm, indicando que a diálise em etanol e, posteriormente em água, foi mais efetiva na purificação do que a precipitação em solvente utilizada nas reações Pul-FI.

Figura 56 - Comparação dos espectros de RMN ¹H do MDI (CDCl₃), mPEG-OH 5000 (CDCl₃), compostos Pul-FI 1 (DMSO-d₆) e PE-1 (produto tratado) (DMSO-d₆) (a), estruturas do Pul-FI 1 e do PE-1.



Fonte: Próprio autor.

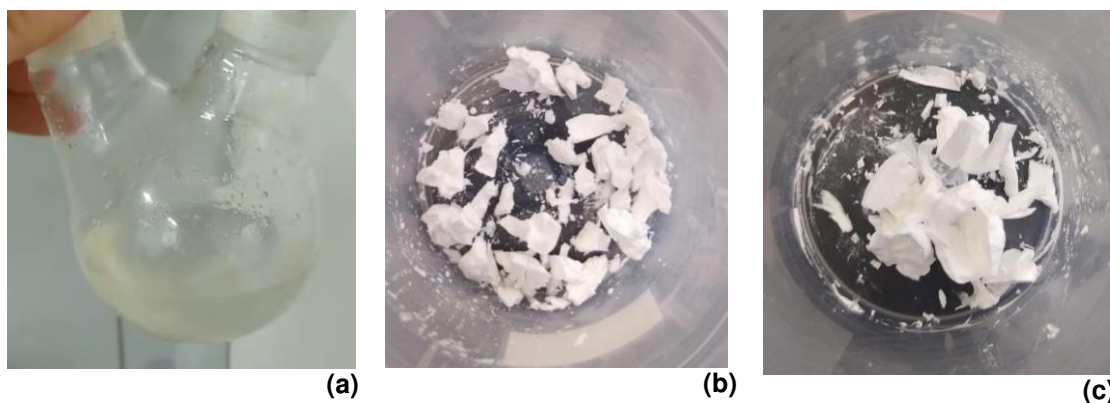
A presença do sinal de água no espectro é indício de duas possibilidades: presença de hidroxilas livres na pululana não substituídas e/ou absorção de água pelo solvente deuterado. Para verificar a segunda possibilidade, um estudo da presença de umidade no solvente deuterado (DMSO-d₆) e sua influência nos espectros de RMN ¹H foi conduzido mostrando que há umidade suficiente no DMSO-d₆, mesmo quando ampolas foram utilizadas, e que esta umidade pode inclusive degradar alguns compostos mais sensíveis (como isocianatos, isso foi observado nos espectros de RMN do HDI) e por isso o ideal seria usar outros

solventes deuterados sempre que possível. Os detalhes deste estudo estão no Apêndice B.

5.3.2 Enxertia do PEG com HDI (alifático): PE-2

O produto da síntese *one-pot* de pululana enxertada com PEG-NCO 2 (na proporção [1:2]) foi chamado PE-2. Ao final da reação, o meio estava turvo, viscoso e levemente esbranquiçado. O aspecto visual após diálise era de um líquido branco, que se tornou um material branco após a liofilização. Observou-se que a forma de liofilizar (volume da solução polimérica utilizada, forma de congelamento) pode levar a aspectos diferentes do material seco como espuma, pellet quebradiço, pellet duro (Figura 57).

Figura 57 - Síntese do copolímero PE-2 (Pul-*g*-PEG): final da reação (a), polímero seco com aspecto duro (b) e com aspecto de espuma (c).



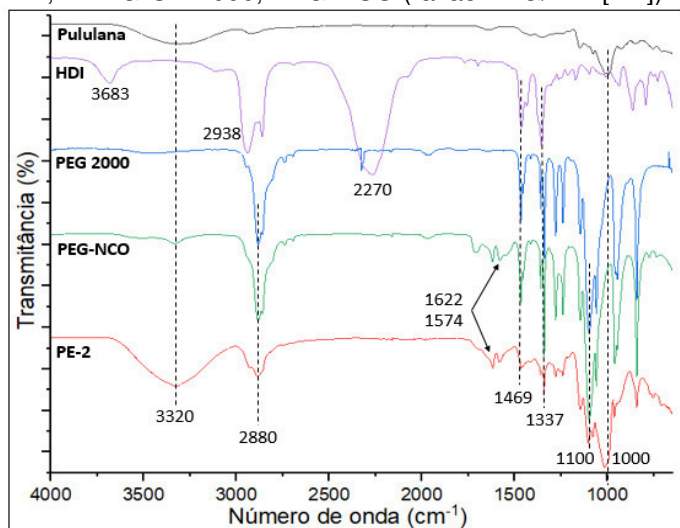
Fonte: Próprio autor.

Os espectros de FTIR e RMN do copolímero PE-2 estão nas Figuras 58 e 59. No espectro de FTIR, são visíveis as bandas de OH e CO da pululana (3320 e 1000 cm^{-1}), de estiramento de CH e CO do PEG (2880 e 1100 cm^{-1}), bandas em 1469 e 1337 cm^{-1} presentes tanto no HDI, quanto no PEG e no PEG-NCO (de CH vizinho a CO) e bandas de amida do PEG-NCO (1622 e 1574 cm^{-1}).

Os espectros de RMN ^1H do copolímero PE-2, da pululana e do mPEG-OH 2000 estão comparados na Figura 59, enquanto na Figura 60 estão comparados os espectros do PE-1 (feito com MDI aromático) e do PE-2 (feito com HDI alifático). No espectro do PE-2, observam-se os picos de OH e H1 em $4,5$ - $5,7$ ppm, e dos H glicosídeos ao redor de $3,3$ ppm, todos da cadeia de pululana, o pico mais

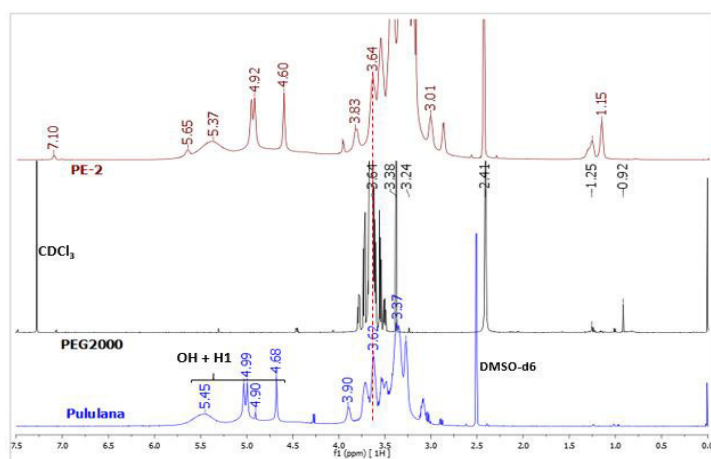
característico do PEG (grupos metileno) em 3,64 ppm aparece sobreposto ao pico da pululana.

Figura 58 - Espectro de FTIR-ATR do PE-2 (Pul-*g*-PEG) comparado com os espectros da pululana, HDI, mPEG-OH 2000, PEG-NCO (razão PEG/HDI [1:2]).

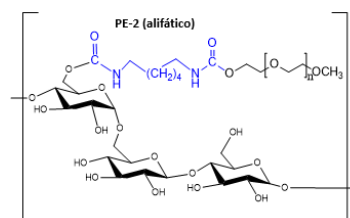


Fonte: Próprio autor.

Figura 59 - Espectro de RMN ¹H do PE-2 (Pul-*g*-PEG) comparado com a pululana e mPEG-OH 2000 (a), estrutura do PE-2 (b).



(a)

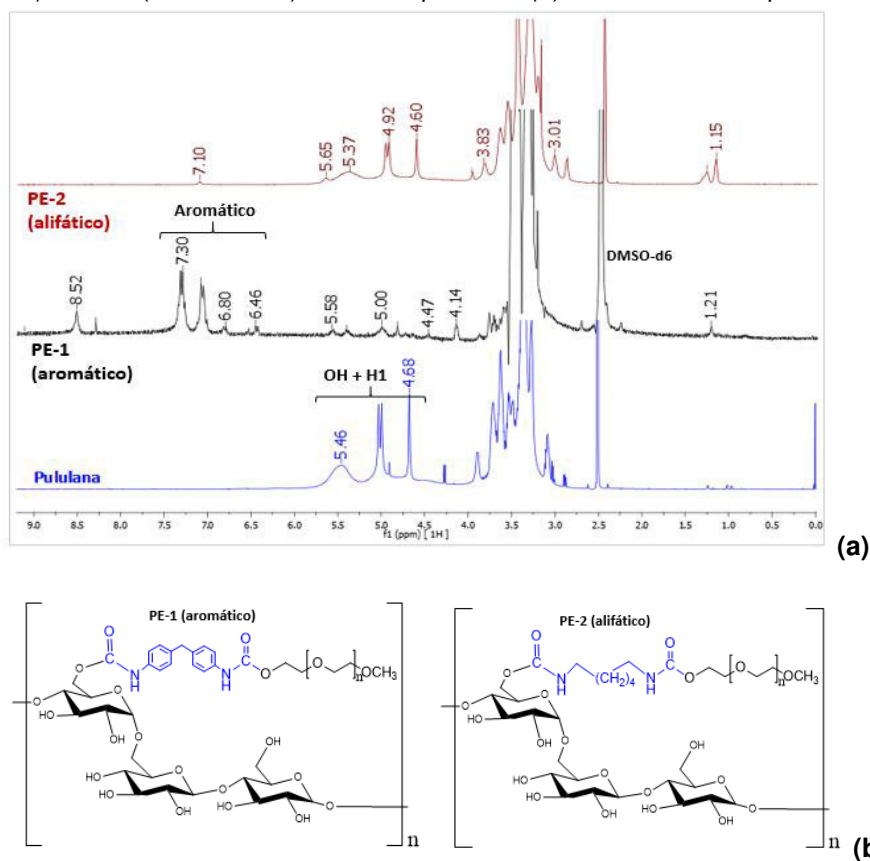


(b)

Fonte: Próprio autor.

Comparando os espectros do PE-2 (feito com diisocianato alifático) e do PE-1 (feito com diisocianato aromático), observam-se que os picos de OH e H1 (entre 4,5-5,7 ppm) têm sinal bem menos intensos no PE-1 do que no PE-2 indicando a possibilidade de um maior grau de substituição no PE-1, também nota-se um pico em 8,52 ppm possivelmente de NH, enquanto em PE-2 os picos de NH são visíveis apenas com grande ampliação.

Figura 60 - Comparação dos espectros de RMN ^1H dos copolímeros Pul-*g*-PEG — PE-1 (usando MDI) e PE-2 (usando HDI) — com a pululana (a); estrutura dos copolímeros PE-1 e PE-2 (b).



Fonte: Próprio autor.

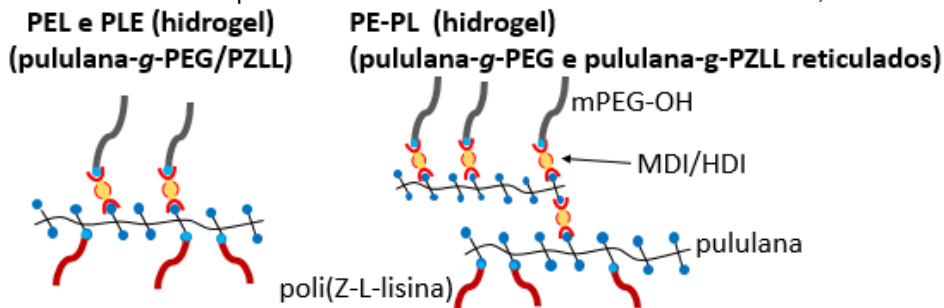
Para estimar o grau de substituição (GS) por RMN ^1H dos copolímeros com enxertia de PEG é importante considerar que: i) os sinais dos grupos hidroxila e dos H_1 da pululana aparecem juntos entre 5,7-4,5 ppm e que os outros hidrogênios da pululana aparecem entre 4,0-3,0 ppm; ii) para cada substituição de uma OH na cadeia de pululana teremos 8 hidrogênios aromáticos (7,4-7,0 ppm) dos enxertos de PEG usando MDI (caso do PE-1); iii) para cada OH substituído teremos 4 grupos metileno (8H) (1,7-1,0 ppm) dos enxertos de PEG usando HDI (caso do PE-2). A equação é: $\frac{A}{8x} = \frac{B}{(3-x)+1}$; sendo x o valor de GS. A é a integral de 7,4-7,0 ppm (PE-1) ou a integral de 1,35-1,10 ppm (PE-2), B é a integral de 5,7-4,5 ppm (OH e H_1), portanto $\text{GS} = \frac{A}{2B+1}$. Para PE-1 o valor de $\text{GS}=0,6$ (20% das hidroxilas disponíveis substituídas) e para PE-2 $\text{GS}=0,05$ (1,6% das hidroxilas disponíveis substituídas).

Considerando que a caracterização do PE-2 foi mais clara em relação à obtenção do composto desejado, essa metodologia foi escolhida para ser utilizada na enxertia de PEG nas cadeias de pululana nas próximas etapas do trabalho.

5.4 Síntese de copolímeros de pululana enxertada com polietilenoglicol e poli(Z-lisina)

Diferentes rotas de reação foram utilizadas para avaliar o melhor método de produzir os copolímeros com ambos enxertos, PEG e PZLL. Duas rotas foram estudadas inicialmente, uma enxertando PEG primeiro e depois PZLL, este copolímero foi chamado PEL; na outra rota foram realizados os enxertos na ordem inversa e o copolímero foi chamado PLE (Figura 61).

Figura 61 - Estruturas dos copolímeros com enxertos de PEG e de PZLL: PEL, PLE e PE-PL.

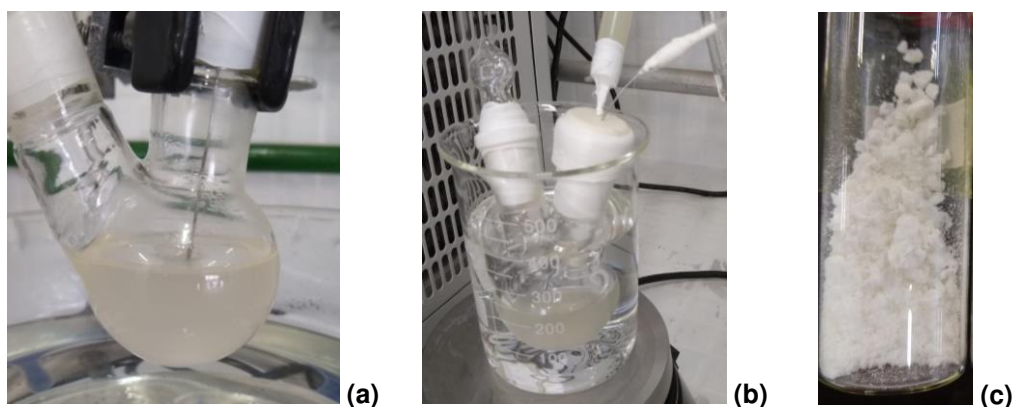


Fonte: Próprio autor.

Na síntese do PEL, a primeira reação (enxerto do PEG) foi feita em temperatura elevada (70 °C) e a segunda em temperatura ambiente. O meio reacional observado no final foi uma solução líquida homogênea amarelada, após a diálise o aspecto era de um líquido branco viscoso, que se tornou um pó branco após a liofilização (Figura 62).

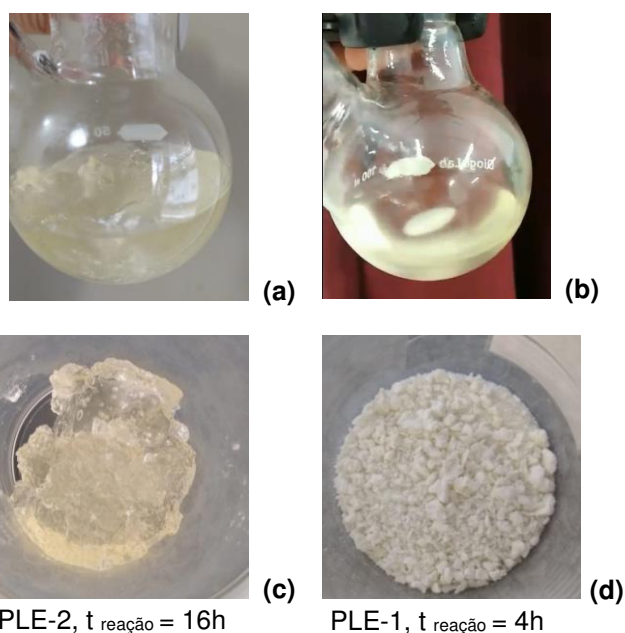
Na síntese do PLE, a primeira reação (enxerto da PZLL) foi feita em t.a. e a segunda em temperatura elevada. Neste caso, houve uma grande diferença nos materiais obtidos de acordo com o tempo da segunda reação. Após 4h de reação (PLE-2), o meio reacional final estava turvo, homogêneo, pouco viscoso e levemente amarelado, depois da diálise seu aspecto foi de gosma branca, se tornando uma espuma branca quebradiça após a liofilização. Enquanto o material obtido após 16h de reação foi um hidrogel bastante firme (PLE-1) com aspecto de gelatina dura lembrando silicone (Figura 63).

Figura 62 - Síntese do copolímero PEL: 1ª etapa (a), 2ª etapa (b), PEL liofilizado (c).



Fonte: Próprio autor.

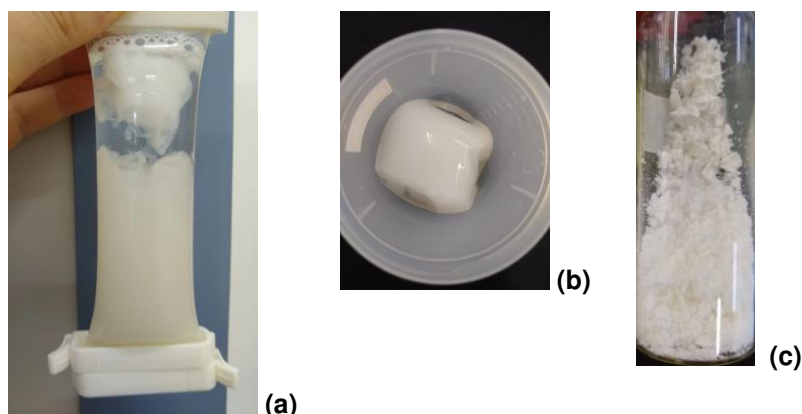
Figura 63 - Síntese dos copolímeros PLE-1 e PLE-2: final da reação do PLE-1 (a), final da reação do PLE-2 (b), PLE-1 após ser retirado do balão (c), PLE-2 liofilizado.



Fonte: Próprio autor.

Uma outra rota de síntese foi estudada para produzir um copolímero com ambos enxertos, porém em cadeias distintas (PE-PL), este seria um copolímero reticulado dos copolímeros enxertados separadamente com PEG (PE) e com PZLL (PL). O meio reacional final estava turvo, homogêneo, levemente amarelado; após a diálise, o aspecto era de gelatina branca firme, e depois da liofilização, tornou-se um sólido branco bastante duro de partir com espátula (Figura 64).

Figura 64 - Síntese do copolímero PE-PL: durante a diálise (a), depois da diálise (b), PE-PL liofilizado (c).



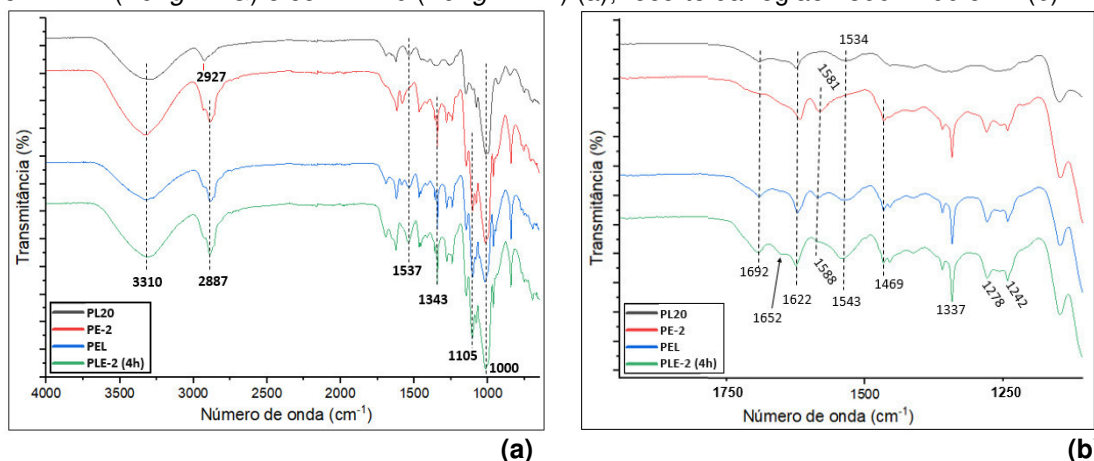
Fonte: Próprio autor.

A caracterização destes 4 copolímeros (PEL, PLE-1, PLE-2 e PE-PL) está descrita a seguir. Primeiramente, foram analisados PEL e PLE-2 para comparar a diferença entre a sequência de enxertia utilizada — PEL: PEG e depois PZLL; PLE-2: PZLL e depois PEG. A seguir, foram comparados PLE-1 e PLE-2 que foram sintetizados pela mesma via, porém em tempos de reação diferentes. Finalmente, analisou-se PE-PL comparando-o com PEL e PLE-2.

Os espectros de FTIR e RMN ^1H dos compostos PEL e PLE-2 estão apresentados nas Figura 64 e 65. Os espectros de FTIR de PEL e PLE-2 são muito semelhantes entre si, são visíveis as bandas de hidroxila e de CO da cadeia de pululana (3310 e 1000 cm^{-1}), banda de CH e CO do PEG (2887 e 1105 cm^{-1}) e pequeno ombro da cadeia de PZLL (2927 cm^{-1}), bandas de amida em (1622 , 1537 cm^{-1}), banda de CH vizinho a CO de PZLL (1343 cm^{-1}). Contudo, existe uma região (1780 - 1487 cm^{-1}) com uma distinção entre os dois espectros: uma banda mais intensa em 1588 cm^{-1} presente em PEL e uma pequena banda em 1652 cm^{-1} presente apenas em PLE-2 (Figura 65).

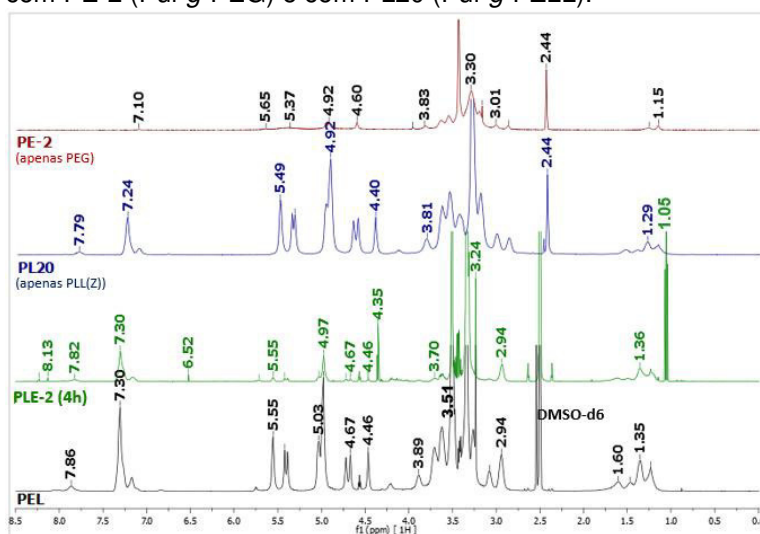
Os espectros de RMN ^1H dos compostos PEL e PLE-2 (4h) estão comparados com os do PE-2 (enxertia apenas de PEG) e PL20 (enxertia apenas de PZLL) na Figura 66, enquanto na Figura 67 observam-se mais detalhadamente apenas os dois copolímeros.

Figura 65 - Espectros de FTIR-ATR dos copolímeros PEL e PLE-2 (Pul-g-PEG/PZLL) comparados com PE-2 (Pul-g-PEG) e com PL20 (Pul-g-PZLL) (a); recorte da região 1800-1200 cm^{-1} (b).



Fonte: Próprio autor.

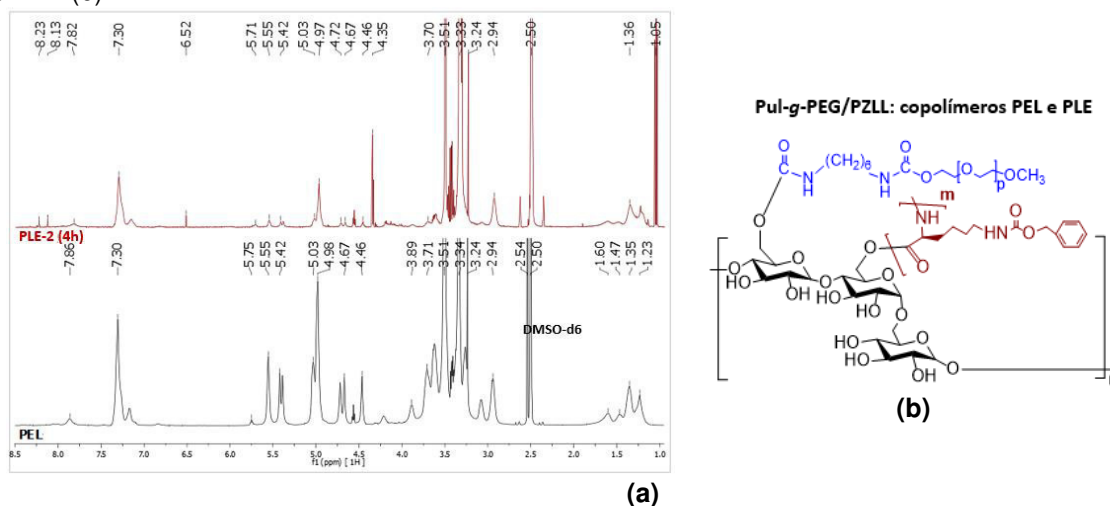
Figura 66 - Espectros de RMN ^1H dos copolímeros PEL e PLE-2 (Pul-g-PEG/PZLL) comparados com PE-2 (Pul-g-PEG) e com PL20 (Pul-g-PZLL).



Fonte: Próprio autor.

Nos espectros do PEL e do PLE-2 observam-se os picos da cadeia de pululana (OH e H1: 4,5-5,7 ppm; H glicosídico: ca. 3,3 ppm) porém com intensidades e formatos distintos. Já os picos de H aromáticos (7,24-7,30 ppm) e de NH (7,79 ppm e acima) apareceram consistentemente em ambos, apesar de haver um número maior de picos para PLE-2. Também notam-se os picos de grupos metileno do enxerto de poli(Z-lisina) (ca. 1,29-1,35 ppm). Nota-se também um pico intenso em 4,35 ppm para PLE-2 não observado tão claramente em PEL e um pico intenso presente apenas em PLE-2 em 1,05 ppm, que poderia ser derivado de reações do HDI com umidade residual presente no meio. O copolímero PEL foi, portanto, considerado o mais próximo da estrutura desejada.

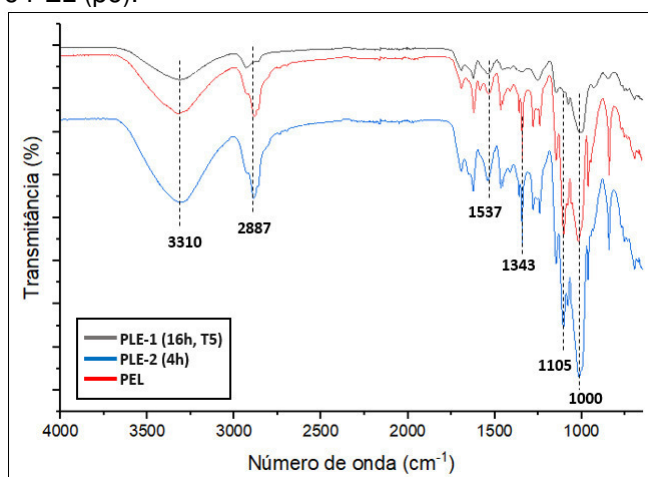
Figura 67 - Espectros de RMN ^1H dos copolímeros PEL e PLE-2 (a), estrutura dos copolímeros PEL e PLE (b).



Fonte: Próprio autor.

Os espectros de FTIR comparados dos copolímeros PLE-1 (16h, hidrogel) e PLE-2 (4h, pó) estão na Figura 68. O espectro de FTIR do PLE-1 é muito similar ao PLE-2 e ao PEL, porém nota-se novamente uma diferença na região $1800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, as diferenças nessa região serão melhor discutidas mais a frente ao apresentar o espectro de FTIR do último copolímero, PE-PL (Figura 69).

Figura 68 - Espectros de FTIR-ATR dos copolímeros Pul-g-PEG/PZLL: PLE-1 (hidrogel), PLE-2 (pó) e PEL (pó).



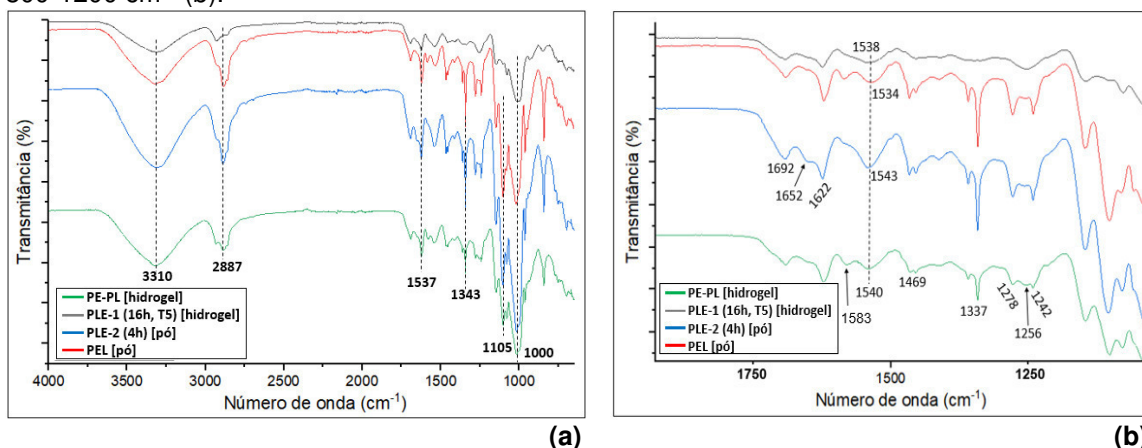
Fonte: Próprio autor.

Como o PLE-1 é insolúvel em todos os solventes normalmente utilizados para RMN ^1H , não foi possível analisá-lo. A discussão mais detalhada sobre os tratamentos e a solubilidade do PLE-1 segue adiante (seção 5.4.1).

Finalmente, comparando os espectros de FTIR dos 4 copolímeros (Figura 69a), nota-se que a distinção mais perceptível entre eles se localiza na região 1800-

1200 cm^{-1} (Figura 69b), demonstrada pela presença ou ausência de bandas, os resultados estão resumidos no Quadro 6.

Figura 69 - Espectros de FTIR-ATR dos 4 copolímeros contendo PEG e PZLL (a), recorte da região 1800-1200 cm^{-1} (b).



Fonte: Próprio autor.

Quadro 6 - Picos de FTIR-ATR presentes nos 4 copolímeros contendo PEG e PZLL, e nos copolímeros PE-2 e PL20, com foco na região 1800-1200 cm^{-1} .

Copolímero	1652	1583	1469	1337	1256
PEL [pó]	*	✓	✓	✓	*
PLE-1 (16h, T5) [hidrogel]	*	—	—	—	✓
PLE-2 (4h) [pó]	✓	*	✓	✓	*
PE-PL [hidrogel]	—	✓	✓	✓	✓
PE-2	—	✓	✓	✓	✓
PL20	—	—	—	—	✓

Notas: * banda quase ausente.

Fonte: Próprio autor.

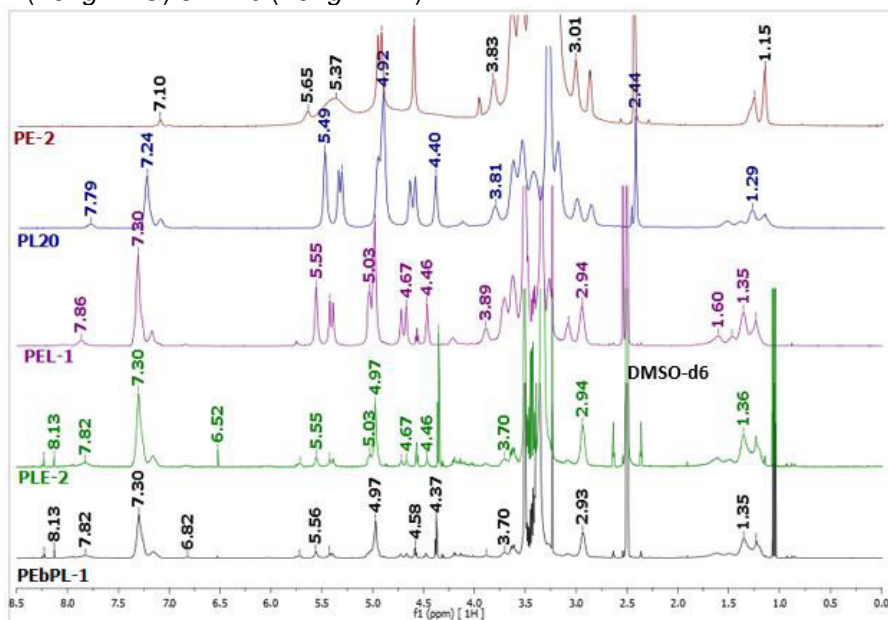
Comparando com a mesma região observando os espectros de FTIR de outros hidrogéis de pululana, um produzido a partir de pululana-HLC (colágeno similar ao humano) (LI *et al.*, 2016) e outro a partir de pululana-*g*-poliacrilamida (SABER-SAMANDARI; GAZI, 2015), notaram-se bandas em 1644 (C=O) e em 1515/1540 (amida) para o hidrogel com HLC, enquanto para o hidrogel com poliacrilamida observaram-se uma banda intensa em 1648/1655 cm^{-1} (NH) e uma banda média em 1448 cm^{-1} (CN). A presença da banda em 1256 cm^{-1} em PLE-1 e PE-PL (os dois hidrogéis) pode indicar uma maior presença dos enxertos de PZLL

nesses copolímeros em relação aos outros, porém também pode estar relacionado à reticulação que foi observada em ambos os copolímeros (especialmente no PLE-1). Esta banda está presente tanto em PE quanto em PL20, porém com intensidades menores.

Considerando que tanto PE-PL quanto PLE-1 apresentaram visíveis sinais de reticulação (devido ao seu aspecto físico e caráter insolúvel) e que PLE-2 não é totalmente solúvel em DMSO (conforme teste de produção de partículas), pode-se supor que todos eles apresentam algum grau de reticulação.

Comparando os espectros de RMN ^1H dos copolímeros PEL e PLE-2 (ambos com enxertia de PEG e PZLL nas mesmas cadeias de pululana) e PE-PL (enxertia de PEG e PZLL em cadeias diferentes) com PE-2 e PL20 (Figura 70), nota-se uma grande similaridade entre PE-PL e PLE-2, isso pode estar relacionado à presença de ligações cruzadas em ambos. Há picos mais intensos em 4,37 ppm em ambos.

Figura 70 - Comparação dos espectros de RMN ^1H dos copolímeros PE-PL, PEL e PLE-2 com PE-2 (Pul-*g*-PEG) e PL20 (Pul-*g*-PZLL).



Fonte: Próprio autor.

Para estimar o grau de substituição (GS) por RMN ^1H dos copolímeros com enxertia tanto de PZLL quanto de PEG é importante considerar que: i) os sinais dos grupos hidroxila e dos H_1 da pululana aparecem juntos entre 5,7-4,5 ppm e que os outros hidrogênios da pululana aparecem entre 4,0-3,0 ppm; ii) para cada substituição de uma OH na cadeia de pululana teremos 5 hidrogênios aromáticos

(do grupo Z) dos enxertos de PZLL; iii) o sinal do metileno do grupo Z irá aparecer em 5,01 ppm e precisa ser considerado já que aparece dentro da região de OH e H₁, iv) para cada OH substituído teremos 4 grupos metileno do HDI entre 1,7-1,0 ppm dos enxertos de PEG, v) os sinais de 3 grupos metilenos da PZLL irão aparecer dentro da faixa de 1,7-1,0 ppm e precisam ser considerados. A equação é: $\frac{A+B}{5x+14x} = \frac{C}{(3-x)+1+2x}$; sendo x o valor de GS. A é a integral de 7,4-7,0 ppm (H aromático), B é a integral de 1,7-1,0 ppm (H metilênicos), C é a integral de 5,7-4,5 ppm (OH, H₁ e metileno do grupo Z), portanto $GS = \frac{4(A+B)}{19C-A-B}$. Para PEL o valor de GS=0,29 (9,7% das hidroxilas disponíveis substituídas), enquanto para PE-PL GS=1,78 (59,3% das hidroxilas disponíveis substituídas), sendo o grau de substituição máximo possível GS_{MÁX}=3. Esse valor elevado de GS era esperado para PE-PL uma vez que o material sofreu reticulação e se tornou um hidrogel (Tabela 9). Para PLE-2, o valor de GS estimado não tem significado prático, e, portanto, foi omitido. Isso se deve ao fato da equação ter sido desenvolvida para uma estrutura diferente (muito menos substituída) da obtida em PLE-2, a qual contém uma elevada quantidade de substituições na cadeia de pululana, o que se observa pelo valor quase ausente da área C (0,01) (poucas OH disponíveis) e elevado de B (1,67) (muitos grupos metilênicos).

Tabela 9 - Grau de substituição (GS) dos copolímeros com enxertia de PEG: PEL e PE-PL.

	A ∫7,4-7,0 ppm	B ∫1,7-1,0 ppm	C ∫5,7-4,5 ppm	GS
PEL	1,0	1,08	2,60	0,29
PE-PL	1,0	1,53	0,17	1,78

Fonte: Próprio autor.

5.4.1 Testes de solubilidade e tratamento do PLE-1 (hidrogel)

Como o copolímero PLE-1 não era mais solúvel em DMSO ao final da reação, tendo se transformado em um material gelatinoso rígido dentro do balão, ele foi removido com espátula e a sua solubilidade foi avaliada em diferentes solventes orgânicos e diferentes formas de tratamento foram testadas.

O copolímero se mostrou insolúvel em todos os solventes testados, mudando apenas seu comportamento de acordo com o solvente. Os resultados estão resumidos no Quadro 7, as Figuras 71 e 72 mostram o aspecto visual do

PLE-1 nos diferentes solventes. Notou-se que um menor grau de reticulação (GS=1,77) levou a um hidrogel solúvel em DMSO, PE-PL, mas insolúvel em água; enquanto um maior grau de reticulação levou a um material insolúvel inclusive em DMSO, PLE-1. O grau de intumescimento (GI) foi determinado para estes dois copolímeros comparando a massa intumescida em DMSO ou água destilada com a massa seca (50 mg), $GI = \frac{(m \text{ intumescida} - m \text{ seca})}{m \text{ seca}} \times 100$. Para PLE-1, $GI_{\text{DMSO}}=2900\%$ e $GI_{\text{H}_2\text{O destilada}}=550\%$. Para o copolímero PE-PL, $GI_{\text{H}_2\text{O destilada}}=589\%$.

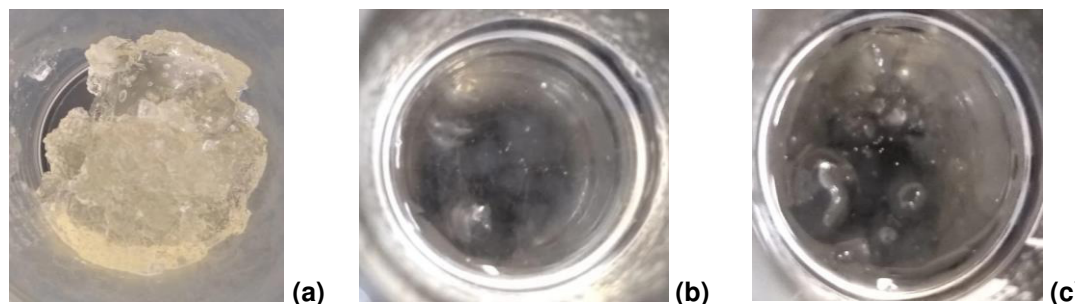
Quadro 7 - Teste de solubilidade e grau de intumescimento do PLE-1 (hidrogel).

Solventes *	Solubilidade	Aspecto visual e grau de intumescimento (GI)
Água destilada	Insolúvel	Dispersa pouco, GI=550%
Água destilada (70 °C)	Insolúvel	Dispersa mais que em água (t.a.)
Etanol	Insolúvel	Dispersa menos que em água (t.a.)
Acetona	Insolúvel	Aglomera e fica rígido
DMSO	Insolúvel	Transparente e intumescido, GI=2900%
DMF	Insolúvel	Transparente e intumescido
Clorofórmio	Insolúvel	Dispersa pouco
THF	Insolúvel	Não dispersa, e ao apertar amassa e forma filme
Acetato de etila	Insolúvel	Similar ao resultado em acetona e THF

Notas: * temperatura ambiente (t.a.) = 23 °C.

Fonte: Próprio autor.

Figura 71 - PLE-1 no final da reação (a), após ser dispersado em DMSO e em DMF no teste de solubilidade (b) e (c).

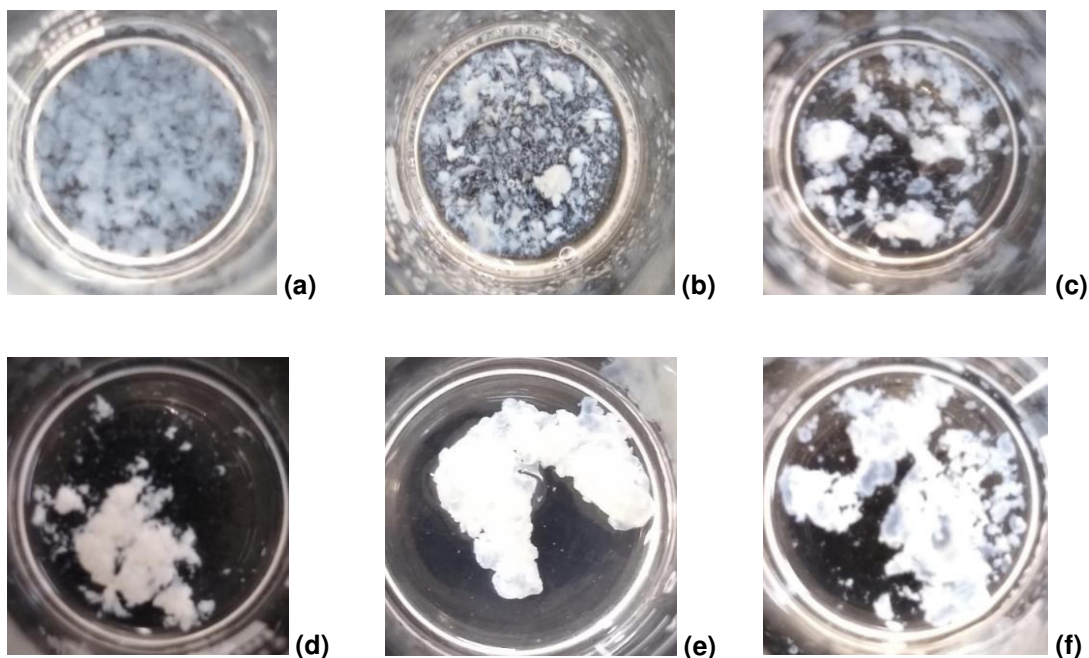


Fonte: Próprio autor.

Considerando a insolubilidade do copolímero, outras rotas de tratamento foram consideradas. Ele foi disperso em diferentes solventes (ou sequência de solventes) para garantir a remoção de DMSO e possíveis subprodutos de baixa

massa molecular e depois seco em estufa. Os resultados estão resumidos no Quadro 8.

Figura 72 - Teste de solubilidade do PLE-1 em solventes: clorofórmio (a), água (b), etanol (c), acetona (d), acetato de etila (e), THF (f).



Fonte: Próprio autor.

Quadro 8 - Tratamento do PLE-1 com solventes

	Tratamentos	Aspecto visual dos materiais secos
T1	Clorofórmio	Flocos pequenos meio grudentos levemente amarelados
T2	DMSO e água	Flocos pequenos soltos levemente transparentes
T3	DMSO, clorofórmio e água	Flocos pequenos soltos brancos
T4	DMSO, água e diálise	Flocos pequenos soltos brancos
T5	Água e vortex	Flocos pequenos soltos amarelados

Fonte: Próprio autor.

A seguir, foi avaliado o comportamento dos materiais já secos após o tratamento T1 (apenas solvente orgânico) e o tratamento T4 (solvente orgânico e água) na presença de água e DMSO (Quadro 9, Figura 73) e foi feita análise de FTIR dos produtos T4 e T5 (apenas água), que mostrou não haver distinção entre os espectros, além de não haver presença de bandas típicas do DMSO indicando que ambos tratamentos foram efetivos (Figura 74).

Quadro 9 - Comportamento dos produtos T1 e T4 (copolímero PLE-1) em presença de água e DMSO.

	Solvente	Aspecto visual
T1	Água	Flocos pequenos brancos reidratados
T4	Água	Flocos médios brancos reidratados
T1	DMSO	Absorveu até ficar transparente (aspecto turvo)
T4	DMSO	Absorveu até ficar transparente (aspecto turvo)

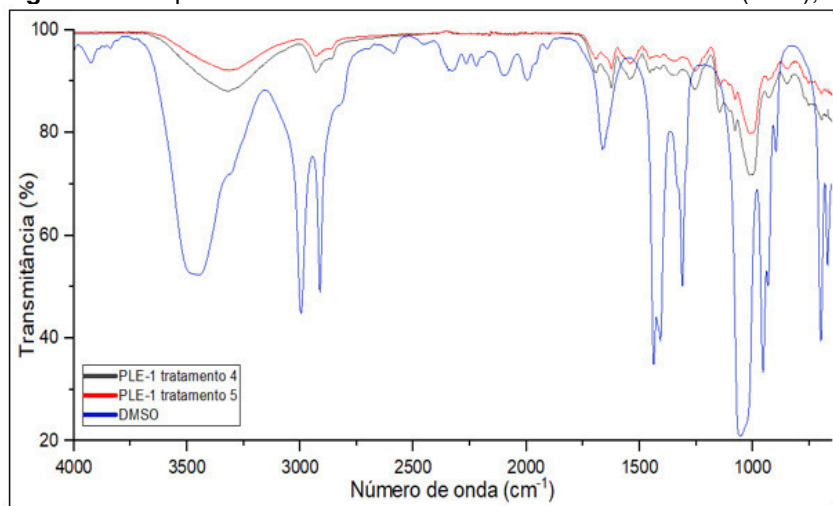
Fonte: Próprio autor.

Figura 73 - PLE-1 tratamentos T1 e T4 em presença de água.



Fonte: Próprio autor.

Figura 74 - Espectros de FTIR do PLE-1 tratamentos T4 e T5 (ATR), e do DMSO (NaCl).



Fonte: Próprio autor.

5.5 Produção de nanopartículas usando copolímeros de pululana

Inicialmente o caráter anfifílico dos copolímeros Pul-*g*-PZLL (PL10, PL20, PL30) e Pul-*g*-PEG/PZLL (PEL) foi avaliado pelo teste de concentração micelar crítica (CMC), a seguir foram produzidas e estudadas as suas nanopartículas (NPs), assim como as NPs dos copolímeros Pul-*g*-PEG/PZLL (PLE-2), e Pul-*g*-PEG reticulado com Pul-*g*-PZLL (PE-PL). As NPs foram preparadas em diferentes razões copolímero/solvente (parâmetro A) por diálise e sua estabilidade foi acompanhada por 30 dias medindo o diâmetro hidrodinâmico (Dh) e a

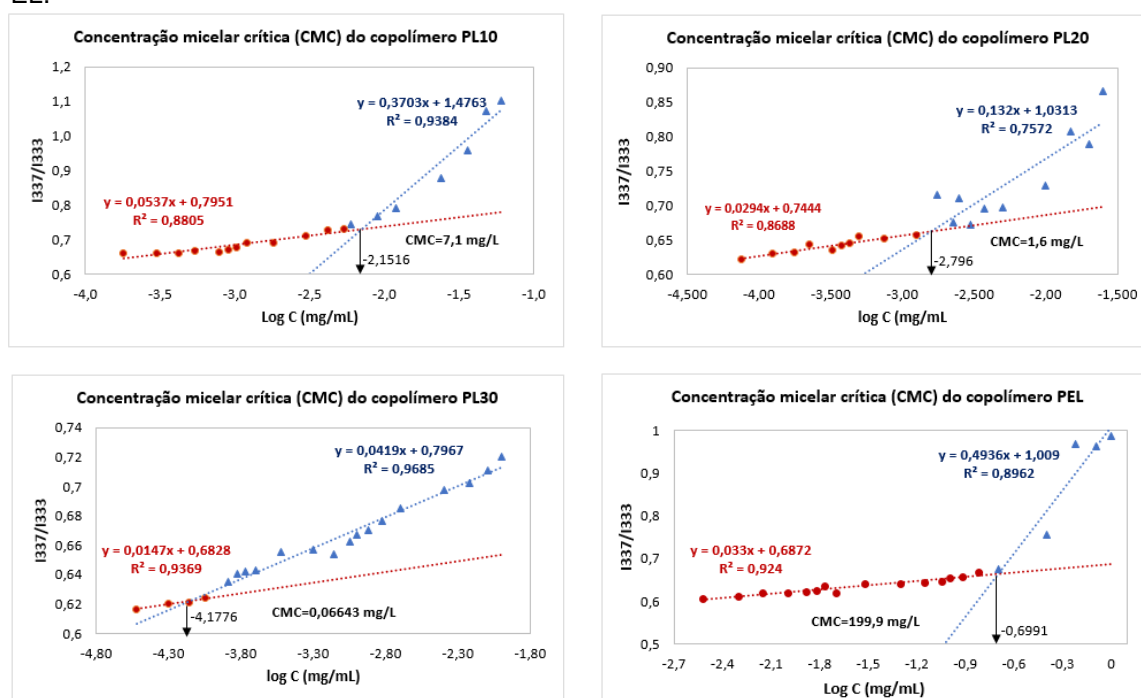
polidispersidade (PDI) das nanopartículas por DLS. Para as formulações com fármaco incorporado, foram utilizadas diferentes razões fármaco/copolímero (parâmetro B).

5.5.1 Nanopartículas dos copolímeros PL10, PL20 e PL30

Os resultados obtidos no teste de CMC para os copolímeros com enxertia apenas de PZLL foram de 7,1 mg/L para PL10, 1,6 mg/L para PL20 e 0,066 mg/L para PL30, enquanto para PEL foi de 199,9 mg/L (Figura 75). Observou-se que conforme aumenta o teor de PZLL nas cadeias, mais hidrofóbico o copolímero se torna e menor é o valor da sua CMC, ou seja, menos copolímero é necessário para atingir o grau mínimo necessário para que suas cadeias se autoagreguem formando micelas.

Comparando os valores de CMC dos copolímeros PL com copolímeros similares produzidos por Park *et al.* (2012), nota-se que os copolímeros Pul-g-PZLL – sintetizados neste projeto – são mais hidrofóbicos (têm menor valor de CMC) que os copolímeros Pul-g-PLL quando comparando teores de lisina semelhantes, isso é especialmente notório nos copolímeros com menores graus de enxertia (Tabela 10).

Figura 75 - Cálculo da concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros PL10, PL20, PL30 e PEL.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 10 - Concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros PL.

% lisina (m/m)	CMC Pul-g-PZLL ¹ (mg/L)	CMC Pul-g-PLL ² (mg/L)	CMC Pul-DEAE-g-PZLL ³ (mg/L)
5%	-	100	-
10%	PL10: 7,1	50	-
15%	-	3	-
20%	PL20: 1,6	1	-
25%	-	-	PDL25: 2
30%	PL30: 0,066 [PEL: 199,9]*	-	-
40%	-	-	PDL40: 1,6
55%	-	-	PDL55: 0,8

Notas: Mn pululana: ¹ 120 kDa (este trabalho), ² 62 kDa (Park *et al.*, 2012), ³ 120 kDa (Carvalho *et al.*, 2022); *PEL: Pul-g-PEG/PZLL com 30% lisina.

Fonte: Próprio autor.

Como o grupo Z representa ca. 43% da massa nos enxertos de PZLL, para comparar com enxertos de PLL o mais adequado é comparar PL10 (7,1 mg/L) com Pul-g-PLL-5% (100 mg/L) e PL20 (1,6 mg/L) com Pul-g-PLL-10% (50 mg/L).

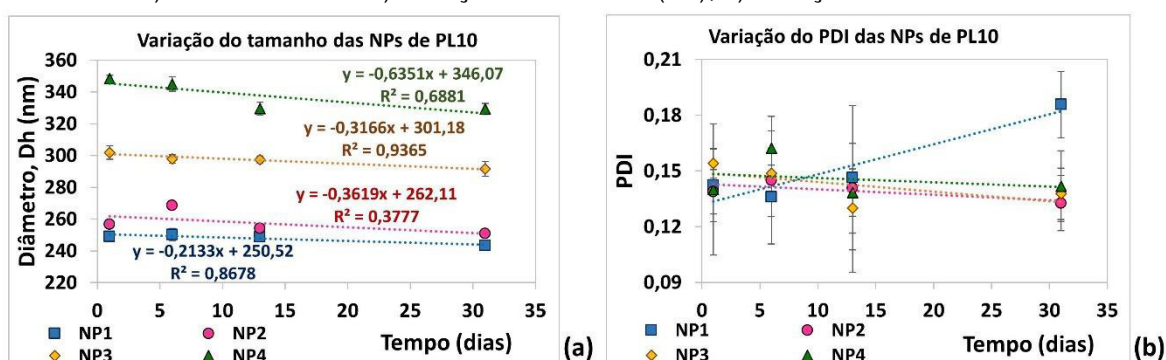
Observando os valores de CMC dos copolímeros anfifílicos Pul-DEAE-g-PZLL (abreviado como PDL) estudados por Carvalho *et al.* (2022) – sintetizados usando Pul 120 kDa, $GS_{DEAE}=0,15$ – nota-se que, como o teor de PZLL é bastante elevado, eles exibiram baixíssima CMC: 2 mg/L para PDL25, 1,6 mg/L para PDL40, e 0,8 mg/L para PDL55. A CMC observada foi semelhante (1,6 mg/L) para os copolímeros PL20 e PDL40 comprovando que a presença do grupo Z influencia bastante na hidrofobicidade dos copolímeros. Observou-se também que a enxertia de DEAE nas cadeias de pululana ajuda a balancear a hidrofobicidade pois é uma estrutura hidrofílica, o mesmo foi observado no copolímero PEL cujo valor de CMC é bastante elevado (199,9 mg/mL) mesmo contendo 30% de PZLL, o que se deve à enxertia de PEG2000.

De acordo com Gaucher *et al.* (2010), para que um carreador micelar polimérico seja eficaz, ele deve resistir à rápida dissociação na diluição após a administração, e a CMC pode ser usada como um indicativo neste caso. A presença de regiões altamente hidrofóbicas no núcleo micelar geralmente confere maior estabilidade, o que se reflete em valores mais baixos de CMC. Considerando, por exemplo, os volumes no trato gastrointestinal, uma CMC inferior a 135 mg/L deve

ser suficiente para resistir a uma rápida dissociação após administração oral, portanto todos os copolímeros PL preparados aqui são candidatos promissores para esta aplicação.

A seguir foram preparadas as NPs dos copolímeros PL e sua estabilidade foi avaliada. As nanopartículas de PL10 (Figura 76 e Tabela 11) apresentaram diâmetro (Dh) estável (variação de tamanho de 1,2-3%) e pouca variabilidade de polidispersidade (valor mais alto de PDI=0,15) em todas condições estudadas ao longo do teste de estabilidade. Os diâmetros medidos aumentaram conforme a razão copolímero/solvente utilizada.

Figura 76 - Teste de estabilidade de nanopartículas para o copolímero PL10 (Pul-g-PZLL contendo 10% de lisina) durante 30 dias. a) variação de diâmetro (Dh); b) variação de PDI.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 11 - Resultados do teste de estabilidade de nanopartículas para o copolímero PL10 (Pul-g-PZLL contendo 10% de lisina) durante 30 dias: Diâmetro médio (Dh) e PDI.

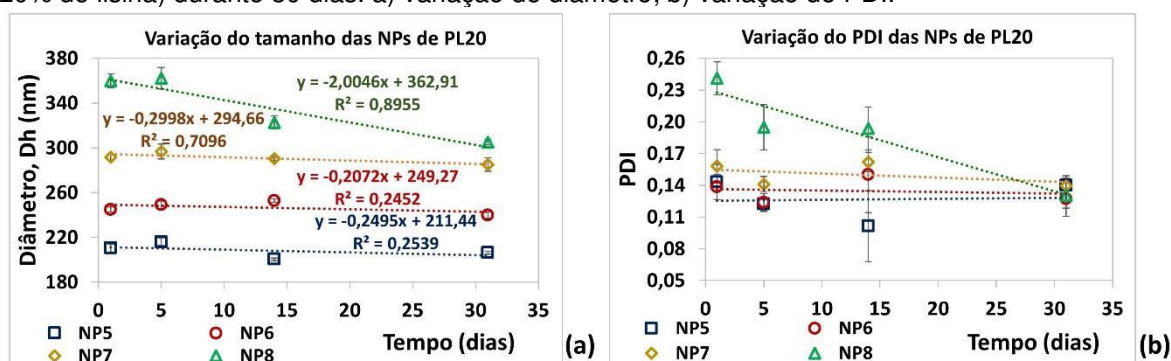
Formulação	Razão Copolímero/Solvente (mg/mL)	Dh (nm) (PDI) (30 dias)	Diâmetro médio, Dh (nm) (PDI)			
			Dia 1	Dia 6	Dia 13	Dia 31
NP1	0,2	248 ± 3 (0,15 ± 0,02)	249 ± 1 (0,142)	250 ± 4 (0,136)	249 ± 3 (0,146)	243 ± 3 (0,186)
NP2	0,5	258 ± 8 (0,139 ± 0,005)	256,6 ± 0,8 (0,139)	269 ± 2 (0,145)	254 ± 3 (0,141)	251 ± 1 (0,133)
NP3	1,0	297 ± 4 (0,14 ± 0,01)	302 ± 4 (0,154)	298 ± 3 (0,149)	297 ± 2 (0,130)	291 ± 5 (0,138)
NP4	2,5	338 ± 10 (0,14 ± 0,01)	348 ± 2 (0,140)	345 ± 5 (0,162)	329 ± 4 (0,138)	329 ± 4 (0,142)

Fonte: Próprio autor.

Para as razões 0,2, 0,5, 1,0 e 2,5 mg/mL, os diâmetros e PDI médios foram de 248 ± 3 nm (PDI=0,15), 258 ± 8 nm (PDI=0,139), 297 ± 4 nm (PDI=0,14), 338 ± 10 nm (PDI=0,14), respectivamente.

Para as nanopartículas de PL20, as formulações mais estáveis em tamanho (variação de 1,6-3,2%) e de menor variação de PDI foram as de razão copolímero/solvente de 0,2, 0,5 e 1,0 mg/mL, cujos diâmetros e PDI médios foram de 208 ± 7 nm (PDI=0,13), 247 ± 6 nm (PDI=0,14) e 291 ± 5 nm (PDI=0,15). Para a razão mais elevada (parâmetro A=2,5), houve uma maior variação de diâmetro (8,4%) ao longo dos 30 dias do teste de estabilidade, assim como maiores variações de PDI: 337 ± 28 nm, (PDI=0,19). Os resultados estão resumidos na Figura 77 e Tabela 12.

Figura 77 - Teste de estabilidade de nanopartículas para o copolímero PL20 (Pul-g-PZLL contendo 20% de lisina) durante 30 dias. a) variação de diâmetro; b) variação de PDI.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 12 - Resultados do teste de estabilidade de nanopartículas para o copolímero PL20 (Pul-g-PZLL contendo 20% de lisina) durante 30 dias: Diâmetro médio (Dh) e PDI.

Formulação	Razão Copolímero/Solvente (mg/mL)	Dh (nm) (PDI) (30 dias)	Diâmetro médio, Dh (nm) (PDI)			
			Dia 1	Dia 5	Dia 14	Dia 31
NP5	0,2	208 ± 7 (0,13 \pm 0,02)	210 ± 4 (0,143)	216 ± 3 (0,122)	200 ± 1 (0,101)	206 ± 2 (0,140)
NP6	0,5	247 ± 6 (0,14 \pm 0,01)	245 ± 2 (0,138)	249 ± 3 (0,124)	253 ± 2 (0,150)	240 ± 3 (0,127)
NP7	1,0	291 ± 5 (0,15 \pm 0,01)	292 ± 3 (0,158)	297 ± 7 (0,141)	290 ± 2 (0,162)	285 ± 6 (0,139)
NP8*	2,5	337 ± 28 (0,19 \pm 0,05)	360 ± 6 (0,241)	362 ± 10 (0,195)	323 ± 6 (0,194)	305 ± 2 (0,130)

Notas: *A amostra foi diluída (1:10) antes de ser analisada.

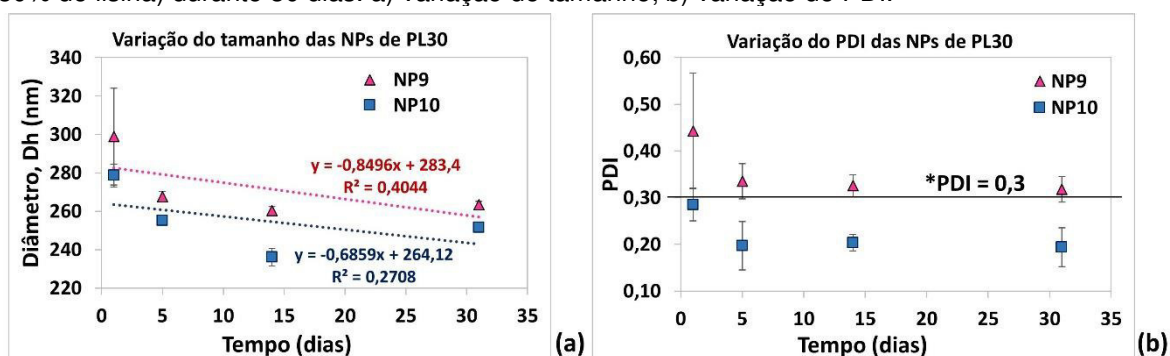
Fonte: Próprio autor.

As nanopartículas de PL10 são maiores que as de PL20 nas mesmas condições (248 nm vs. 208 nm, 258 nm vs. 247 nm, 297 nm vs. 291 nm, 338 vs. 337 nm), isso é condizente com o caráter menos hidrofóbico de PL10 (devido ao

seu menor teor de lisina), o que torna necessária uma maior quantidade de cadeias do copolímero para que haja formação das micelas comparativamente.

Quanto às nanopartículas de PL30 (Figura 78 e Tabela 13), por ser um copolímero bastante hidrofóbico e de baixa CMC, duas razões copolímero/solvente menores (0,05 e 0,1 mg/mL) foram testadas visando obter nanopartículas de tamanho até 300 nm, uma vez que esta faixa de tamanho apresentou maior estabilidade para as partículas de PL10 e PL20 (menor PDI e menor variação de tamanho).

Figura 78 - Teste de estabilidade de nanopartículas para copolímero PL30 (Pul-g-PZLL contendo 30% de lisina) durante 30 dias. a) variação de tamanho; b) variação de PDI.



Notas: *A linha mostra PDI=0,3 acima do qual os sistemas particulados para liberação de fármacos são considerados com alta heterogeneidade (Zhang; Kosaraju, 2007).

Fonte: Próprio autor.

Tabela 13 - Resultados do teste de estabilidade de nanopartículas para o copolímero PL30 (Pul-g-PZLL contendo 30% de lisina) durante 30 dias: Diâmetro médio (Dh) e PDI.

Formulação	Razão Copolímero/Solvente (mg/mL)	Dh (nm) (PDI) (30 dias)	Diâmetro médio, Dh (nm) (PDI)			
			Dia 1	Dia 5	Dia 14	Dia 31
NP9	0,1	255 ± 18 (0,22 ± 0,04)	279 ± 6 (0,285)	255 ± 1 (0,197)	236 ± 5 (0,204)	252 ± 3 (0,194)
NP10	0,05	273 ± 18 (0,36 ± 0,06)	299 ± 25 (0,443)	268 ± 3 (0,335)	260 ± 2 (0,326)	263 ± 2 (0,318)

Fonte: Próprio autor.

Para as formulações com PL30, o Dh e PDI médios foram de 255 ± 18 nm (PDI=0,22) e 273 ± 18 nm (PDI=0,36). A variação de tamanho foi de 7% para ambas formulações. O tamanho das nanopartículas reduziu com o aumento da concentração.

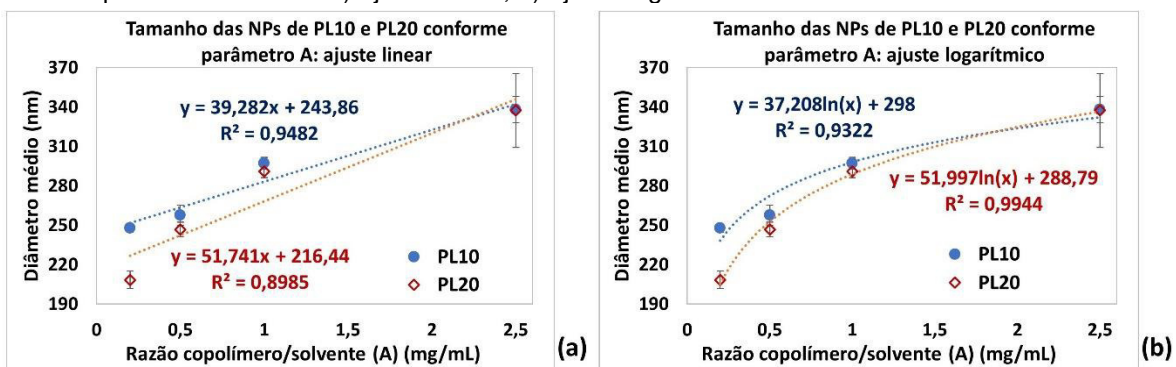
Observou-se a precipitação de material durante o estudo de estabilidade das formulações de PL30, além disso o tamanho das partículas variou consideravelmente mais nas formulações de PL30 (7%) do que nas formulações

mais estáveis dos outros dois copolímeros (ca. 1-3% para PL10 e PL20). Para a formulação NP10, o valor alto de PDI indica alta polidispersidade ($PDI > 0,3$) – conforme Zhang e Kosaraju (2007), $PDI > 0,3$ é uma indicação de alta heterogeneidade em sistemas particulados para liberação de fármacos.

Os resultados de tamanho médio das nanopartículas de PL10 e PL20 foram testados por regressão linear e regressão logarítmica (Figura 79). Os resultados da correlação linear foram de $R^2=0,9482$ (PL10) e $R^2=0,8985$ (PL20), porém o ajuste logarítmico se mostrou ainda mais adequado para PL20 com $R^2=0,9322$ (PL10) e $R^2=0,9944$ (PL20) (Tabela 14). É possível utilizar essas equações para preparar partículas dentro da faixa de 208-338 nm conforme a razão copolímero/solvente (parâmetro A) utilizada.

É perceptível que quanto maior a razão A, mais semelhantes são os tamanhos das NPs para PL10 (337 nm) e PL20 (338 nm), o que indica que existe um limite a partir do qual as partículas podem começar a se agregar, causando variações no tamanho e na PDI (Figuras 79). No entanto, NPs de concentrações muito baixas ($A < 0,2$) exibiram maior variação no tamanho e na PDI, principalmente no Dia 1 (Figuras 78). Em geral, as NPs com menor PDI e menor variação de tamanho foram preparadas com $0,2 \leq A \leq 1,0$.

Figura 79 - Diâmetro das nanopartículas dos copolímeros PL10, PL20 e PL30 de acordo com a razão copolímero/solvente: a) ajuste linear, b) ajuste logarítmico.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 14 – Ajuste linear e logarítmico do diâmetro médio (nm) (y) vs. razão copolímero/solvente (mg/mL) (x).

Copolímero	Ajuste linear	Ajuste logarítmico
PL10	$y = 39,28x + 243,86; R^2=0,9482$	$y = 37,208 \ln(x) + 298; R^2=0,9322$
PL20	$y = 51,741x + 216,44; R^2=0,8985$	$y = 51,997 \ln(x) + 288,79; R^2=0,9944$

Fonte: Próprio autor.

Diferentes formulações desses copolímeros (PL10, PL20 e PL30) com indometacina foram preparadas e sua estabilidade foi avaliada. As formulações testadas e tamanho médio das nanopartículas são mostrados na Tabela 15 e Figura 80. Nas primeiras, FI1 e FI2, foi usado PL20 com alta razão copolímero/solvente (A=2,0 e 1,0 mg/mL), notou-se precipitação já durante a diálise; durante o período do teste de estabilidade, a medida de tamanho variava dependendo da forma que a amostra era obtida (apenas o sobrenadante sem agitar o frasco vs. após agitar o frasco). As medidas obtidas do sobrenadante foram bem mais estáveis, sendo de 263 ± 8 nm (PDI=0,17) para FI1 e de 316 ± 32 nm (PDI=0,21) para FI2. Entretanto, após a agitação, as medições indicaram a presença de micropartículas de faixa de tamanho acima da capacidade de medição do equipamento (5000 nm): FI1_{agitado}: 44 ± 29 μ m e PDI = $0,9 \pm 0,2$; FI2_{agitado}: 28 ± 11 μ m e PDI = $0,21 \pm 0,07$. Portanto, as formulações seguintes foram preparadas em concentrações mais baixas para estudar sua estabilidade na faixa nanométrica.

Tabela 15 - Formulações contendo indometacina preparadas com PL10, PL20 e PL30 e usadas no teste de estabilidade.

Formulação	Copolímero usado, razão copolímero/solvente (A)	Razão Indometacina/copolímero (B)	Diâmetro médio, Dh (nm) (PDI)
FI1	PL20, 2,0 mg/mL	0,7 mg/mg	263 ± 8 (0,17 \pm 0,03)*
FI2	PL20, 1,0 mg/mL	0,7 mg/mg	316 ± 32 (0,21 \pm 0,07)*
FI3	PL20, 0,2 mg/mL	0,6 mg/mg	268 ± 16 (0,16 \pm 0,03)
FI4	PL20, 0,1 mg/mL	1,3 mg/mg	264 ± 18 (0,26 \pm 0,02)
FI5	PL10, 0,2 mg/mL	0,7 mg/mg	238 ± 5 (0,25 \pm 0,02)
FI6	PL10, 0,1 mg/mL	1,4 mg/mg	220 ± 5 (0,17 \pm 0,02)
FI7	PL30, 0,1 mg/mL	1,1 mg/mg	221 ± 6 (0,17 \pm 0,04)
FI8	PL30, 0,04 mg/mL	1,0 mg/mg	259 ± 14 (0,29 \pm 0,04)
FI9	PL10, 1,0 mg/mL	1,0 mg/mL	24 ± 19 μ m (0,7 \pm 0,2) **
F10	PL10, 0,5 mg/mL	1,5 mg/mL	73 ± 7 μ m (1) **
F11	PL20, 1,0 mg/mL	1,0 mg/mL	19 ± 30 μ m (0,9 \pm 0,2) **

Notas: *no sobrenadante, **liofilizado no Dia 1.

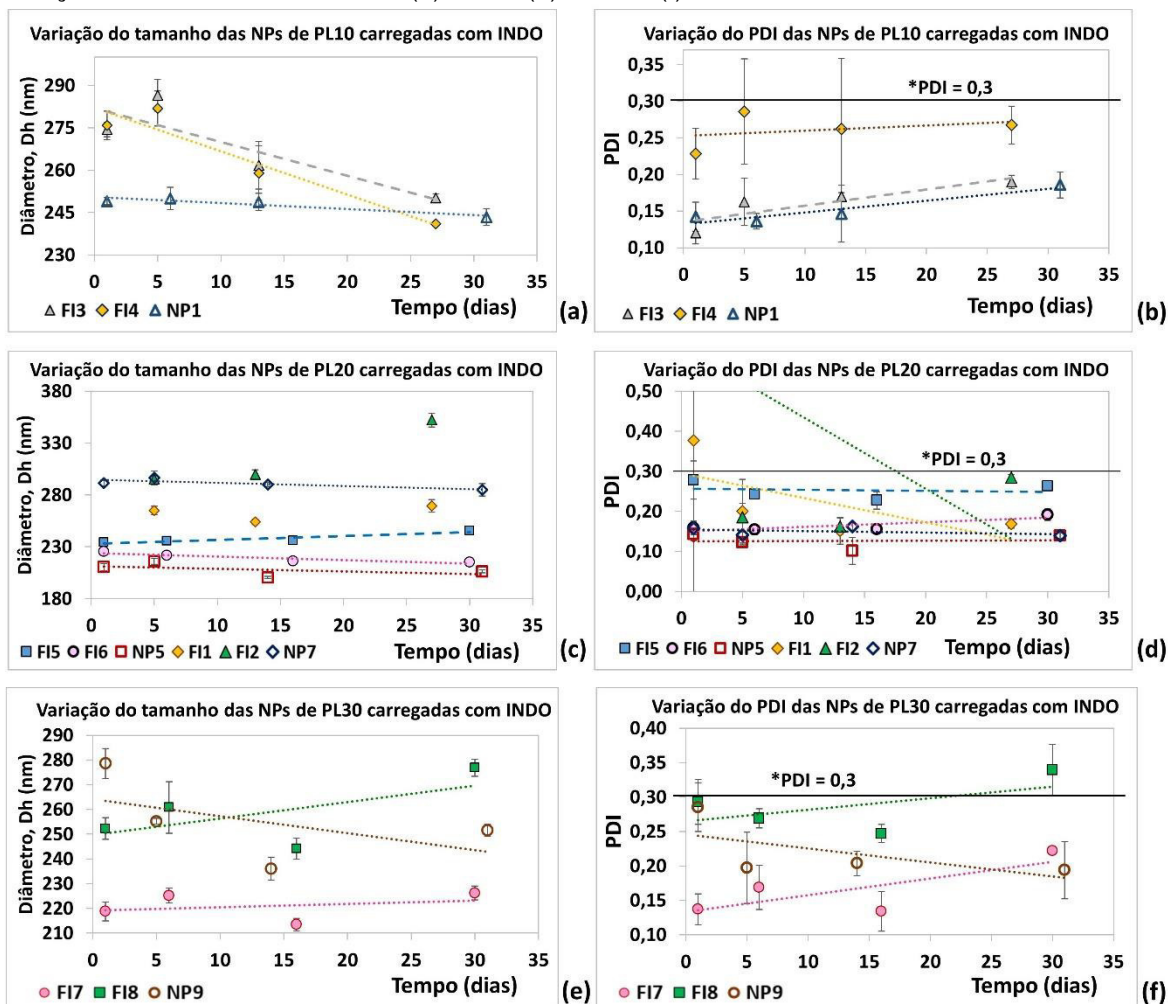
Fonte: Próprio autor.

Para as formulações com PL10, notou-se uma redução do Dh das NPs com tempo, sendo a redução ligeiramente mais rápida na formulação FI6 com maior razão fármaco/copolímero (parâmetro B=1,4) enquanto as NPs sem fármaco

encapsulado ($B=0$) preparadas nas mesmas condições (parâmetro $A=0,2$) mantiveram tamanho estável ao longo do tempo. Essa redução de tamanho é um indicativo da liberação do fármaco incorporado nas NPs ao longo do tempo (Tabela 13, Figura 80a).

Com as formulações com PL20, houve um comportamento similar de redução de D_h para a formulação FI4 com maior teor de fármaco ($B=1,3$), entretanto observou-se um aumento no D_h das NPs da formulação FI3 com menor concentração de fármaco ($B=0,6$) e maior concentração polimérica ($A=0,2$). Quanto à polidispersidade, de forma geral a tendência tanto para PL10 quanto PL20 foi um ligeiro aumento da PDI com o tempo, sendo que todas permaneceram abaixo do limite de $PDI=0,3$ (Tabela 13, Figura 80b).

Figura 80 - Teste de estabilidade de nanopartículas para as formulações contendo indometacina dos copolímeros durante 30 dias: variação de diâmetro das NPs de PL10 (a), PL20 (c) e PL30 (e); variação de PDI das NPs de PL10 (b), PL20 (d) e PL30 (f).



Notas: *A linha mostra $PDI=0,3$ acima do qual os sistemas particulados para liberação de fármacos são considerados com alta heterogeneidade (Zhang; Kosaraju, 2007).

Fonte: Próprio autor.

Para as formulações com PL30, notou-se um comportamento irregular: para o copolímero puro (NP9) o Dh reduziu, enquanto para a formulação preparada com menor concentração de copolímero/solvente (FI8, $A=0,04$) o Dh aumentou e para a outra, com maior concentração (FI7, $A=0,1$) permaneceu mais estável. O PDI variou para todas as formulações, caindo para as NPs do copolímero puro ($B=0$), e subindo para as duas formulações com indometacina encapsulada (Tabela 15, Figura 80c). As formulações FI9-FI11 foram preparadas para avaliar a eficiência de encapsulação e liofilizadas no Dia 1.

O parâmetro A não influenciou o PDI em valores intermediários ($A = 0,5-1,0$), porém houve um efeito mais perceptível em concentrações mais baixas, especialmente nas NPs de PL30. Quanto à influência no tamanho, o parâmetro A parece ser mais significativo que o parâmetro B. Considerando as formulações FI5, FI1 e FI2 (PL20) de concentração de INDO semelhante ($B = 0,6-0,7$), quanto maior a razão A, maior o tamanho médio das NPs. Para as formulações de copolímeros diferentes, mas com valores A e B semelhantes, FI3 (PL10) vs. FI5 (PL20) ($A = 0,2/B = 0,6$) e FI4 (PL10) vs. FI6 (PL20) ($A = 0,1/B = 1,3$), os NPs baseados em PL20 foram menores em média (30 e 44 nm menores, respectivamente), o que indica que a hidrofobicidade desempenha um papel importante, conforme discutido para os valores de CMC. A influência da incorporação de INDO nos tamanhos médios de partículas foi aparentemente menos significativa para a maioria das condições avaliadas (variação de cerca de 30 nm na comparação de NPs com e sem INDO). Em geral, os tamanhos tendem a aumentar (por exemplo, NP1 vs. FI3 e NP5 vs. FI5), no entanto, para uma razão A mais elevada ($A \geq 1$), o efeito foi muito mais perceptível com partículas dentro da faixa micrométrica.

5.5.2 Nanopartículas dos copolímeros PEL, PLE-2 e PE-PL

As NPs de PEL foram preparadas usando 4 razões copolímero/solvente (parâmetro A) diferentes: 0,2, 0,5, 1,0 e 2,5 mg/mL (Tabela 16 e Figura 81). O tamanho e PDI médios foram de 241 ± 14 (PDI=0,37), 266 ± 14 (PDI=0,32), 304 ± 25 (PDI=0,28), 404 ± 57 (PDI=0,19), respectivamente. A variação de tamanho foi de 5-8% para todas formulações, exceto para $A=2,5$ que teve variação de 14%. Quanto à polidispersidade, as formulações com as menores partículas apresentaram maiores valores de PDI. Uma hipótese desse comportamento é que

ele esteja relacionado à alta hidrofobicidade do copolímero, uma vez que ele foi preparado usando a mesma quantidade de PZLL que o copolímero PL30.

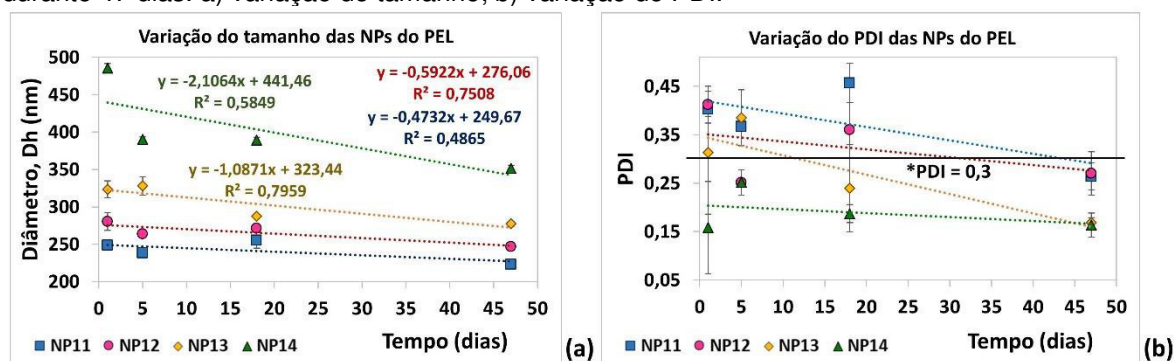
Tabela 16 - Resultados do teste de estabilidade de nanopartículas para o copolímero PEL (Pul-g-PEG/PZLL) durante 47 dias.

Formulação	Razão Copolímero/Solvente (mg/mL)	Dh (nm) (PDI) (30 dias)	Diâmetro médio, Dh (nm) (PDI)			
			Dia 1	Dia 5	Dia 18	Dia 47
NP11	0,2	241 ± 14 (0,37 ± 0,08)	248,4 (0,403)	238,2 (0,367)	255,4 (0,457)	222,9 (0,264)
NP12	0,5	266 ± 14 (0,32 ± 0,08)	280,3 (0,412)	263,6 (0,251)	271,4 (0,360)	246,8 (0,270)
NP13	1,0	304 ± 25 (0,28 ± 0,09)	323,5 (0,313)	328,0 (0,385)	287,6 (0,240)	277,5 (0,169)
NP14	2,5	404 ± 57 (0,19 ± 0,04)	485,6 (0,159)	390,1 (0,252)	389,2 (0,187)	351,3 (0,164)
FI12 *	1,0	--	99 ± 87 µm ** (0,9 ± 0,2)	--	--	--

Notas: * formulação com INDO encapsulada (A=1,0; B=1,0), ** liofilizado no Dia 1.

Fonte: Próprio autor.

Figura 81 - Teste de estabilidade de nanopartículas para copolímero PEL (Pul-g-PEG/PZLL) durante 47 dias. a) variação de tamanho; b) variação de PDI.



Notas: *A linha mostra PDI=0,3 acima do qual os sistemas particulados para liberação de fármacos são considerados com alta heterogeneidade (Zhang; Kosaraju, 2007).

Fonte: Próprio autor.

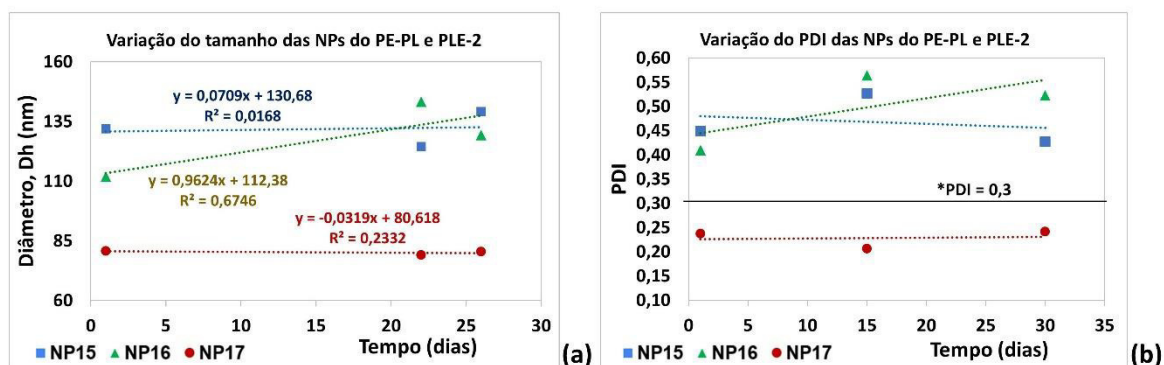
As NPs de PE-PL foram preparadas usando 2 razões copolímero/solvente (parâmetro A) diferentes: 0,5 e 1,0 mg/mL. O tamanho e PDI médios foram de 132 ± 7 (PDI=0,46) e 128 ± 16 (PDI=0,49) e a variação de tamanho foi de 5 e 12%, respectivamente. As NPs de PLE-2 foram preparadas usando A=1,0, sendo o tamanho e PDI médios de $80,1 \pm 0,9$ (PDI=0,23) e a variação de tamanho de apenas 1% (Tabela 17, Figura 82). Os resultados mostram maior variabilidade de PDI para a condição mais concentrada com o copolímero mais reticulado (NP16).

Tabela 17 - Resultados do teste de estabilidade de nanopartículas para os copolímeros PE-PL e PLE-2 durante 30 dias.

Formulação, Copolímero usado	Razão Copolímero/Solvente (mg/mL)	Dh (nm) (PDI) (30 dias)	Diâmetro médio, Dh (nm) (PDI)			
			Dia 1	Dia 5	Dia 22	Dia 26
NP15, PE-PL	0,5	132 ± 7 (0,46 ± 0,05)	132,0 (0,449)	-	124,4 (0,527)	139,1 (0,427)
NP16, PE-PL	1,0	128 ± 16 (0,49 ± 0,08)	111,8 (0,410)	-	143,2 (0,564)	129,3 (0,523)
NP17, PLE-2	1,0	80,1 ± 0,9 (0,23 ± 0,02)	80,7 (0,237)	-	79,1 (0,206)	80,5 (0,241)

Fonte: Próprio autor.

Figura 82 - Teste de estabilidade de nanopartículas para os copolímeros PE-PL (Pul-g-PEG e Pul-g-PZLL reticulados) e PLE-2 (Pul-g-PEG/PZLL) durante 26 dias. a) variação de tamanho; b) variação de PDI.



Notas: *A linha mostra PDI=0,3 acima do qual os sistemas particulados para liberação de fármacos são considerados com alta heterogeneidade (Zhang; Kosaraju, 2007).

Fonte: Próprio autor.

5.6 Morfologia das nanopartículas

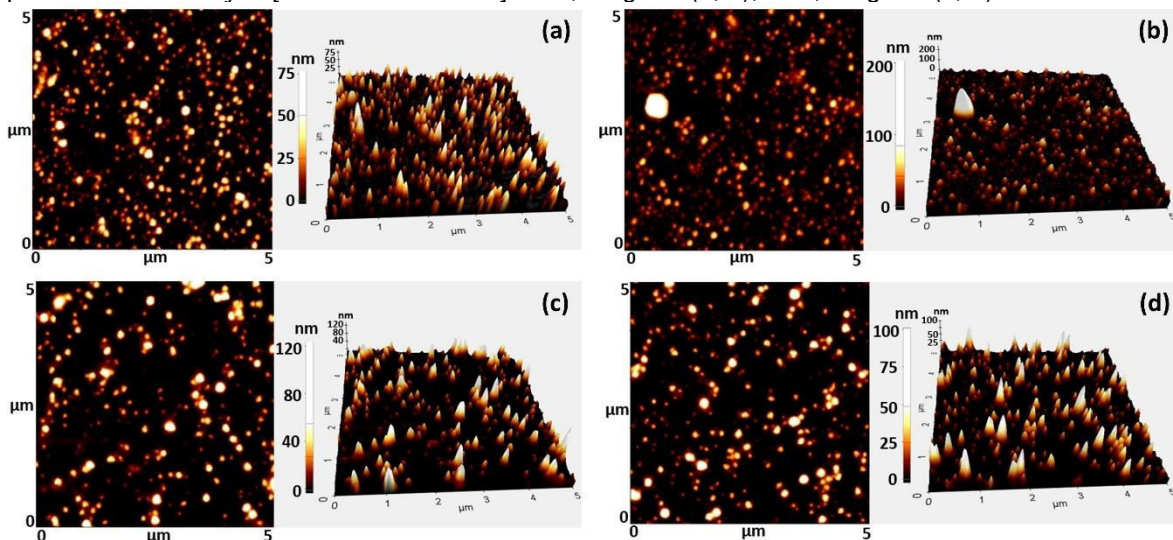
A compreensão da morfologia e do tamanho das nanopartículas é crucial pois são fatores que sabidamente influenciam o comportamento delas no corpo, sabe-se que o formato e a agregação das partículas afetam a atividade biológica delas. Como nanopartículas são complexas quanto à sua estrutura e química de superfície, é recomendável que se use técnicas de caracterização cujos princípios de medição sejam diferentes para que funcionem de forma complementar. Portanto, uma técnica complementar para as medições por DLS, que possui a vantagem de avaliar as nanopartículas suspensas em meio aquoso, é a microscopia por AFM, que permite o estudo das partículas em si e delas em estado de agregação. (SAKAI-KATO *et al.*, 2020). Como uma investigação preliminar, algumas das suspensões de NPs de PL10 e PL20 sem INDO mais promissoras

foram selecionadas devido à sua maior estabilidade (menor variação no tamanho e baixo PDI) para o estudo da morfologia das partículas secas via AFM. Cada copolímero foi estudado em duas razões copolímero/solvente (parâmetro A) diferentes, e as varreduras foram realizadas em áreas diferentes da mica para cada amostra usando a taxa de scan de 1 Hz.

A análise da morfologia das nanopartículas secas por AFM mostrou que as dos copolímeros PL (Pul-*g*-PZLL) possuem formato esférico (ou quase esférico no caso do PL20), o mesmo foi observado por Park *et al.* (2012) para NPs de Pul-*g*-PLL e por Ravi *et al.*, (2014) para NPs de pululana acetato carregadas com lopinavir. Enquanto as dos polímeros PEL, PLE-2 e PE-PL que contêm enxertos de PEG não têm um formato definido. A faixa de variação de diâmetro médio das nanopartículas secas de PL é de 20-100 nm, com poucas partículas de tamanho maior (até 200 nm).

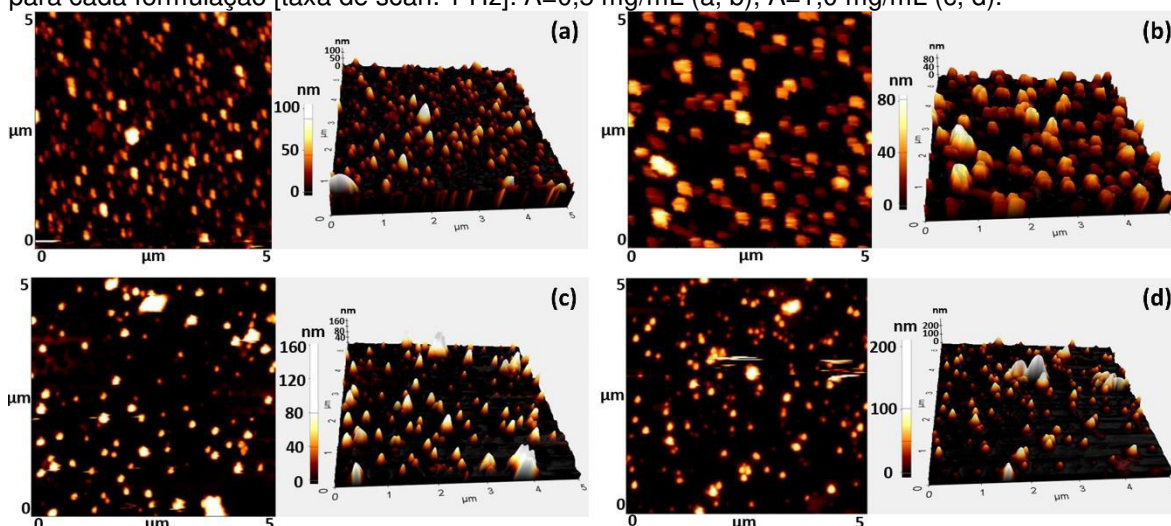
Para as formulações usando o copolímero PL10 A=0,5 e 1,0 mg/mL (Figura 83), a variação de tamanho médio foi de 20-75 nm e de 25-100 nm, respectivamente. Para o copolímero PL20 com A=0,5 e 1,0 mg/mL (Figura 84), a variação de diâmetro médio foi de 30-100 nm e de 30-80 nm, respectivamente.

Figura 83 - Microscopias por AFM das formulações com PL10 em duas áreas distintas de 5x5 μm para cada formulação [taxa de scan: 1 Hz]: A=0,5 mg/mL (a, b), A=1,0 mg/mL (c, d).



Fonte: Próprio autor.

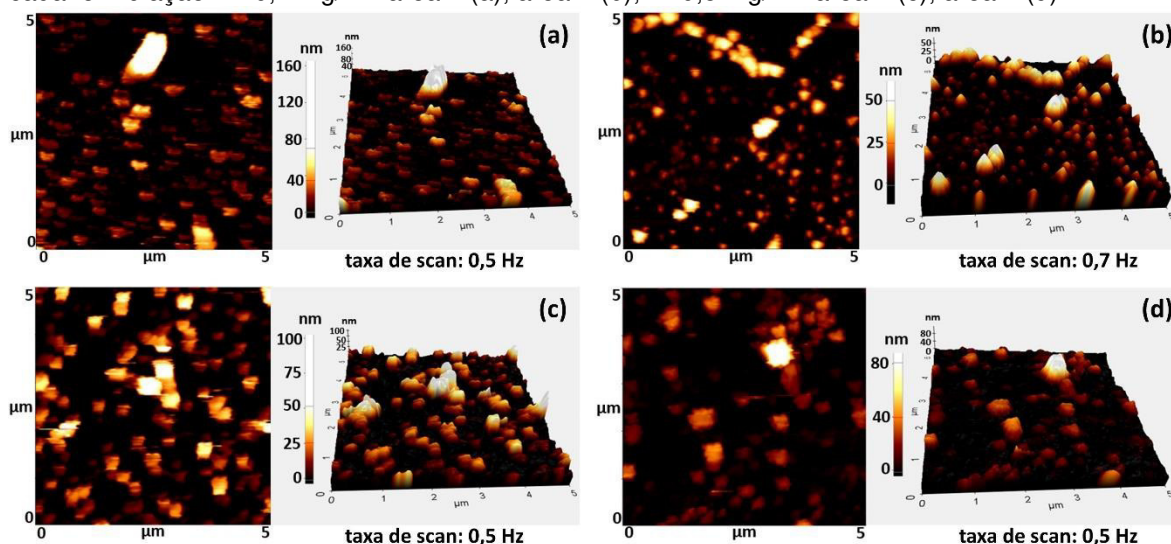
Figura 84 - Microscopias por AFM das formulações com PL20 em duas áreas distintas de 5x5 μm para cada formulação [taxa de scan: 1 Hz]: A=0,5 mg/mL (a, b), A=1,0 mg/mL (c, d).



Fonte: Próprio autor.

Para os copolímeros com PEG, a taxa de scan foi reduzida em alguns casos para melhorar a qualidade das micrografias. Para o copolímero PEL com A=0,1 e 0,5 mg/mL (Figura 85), a variação de diâmetro médio foi de 20-160 nm (taxa de scan=0,5-0,7 Hz) e de 20-100 nm (taxa de scan=0,5 Hz), respectivamente.

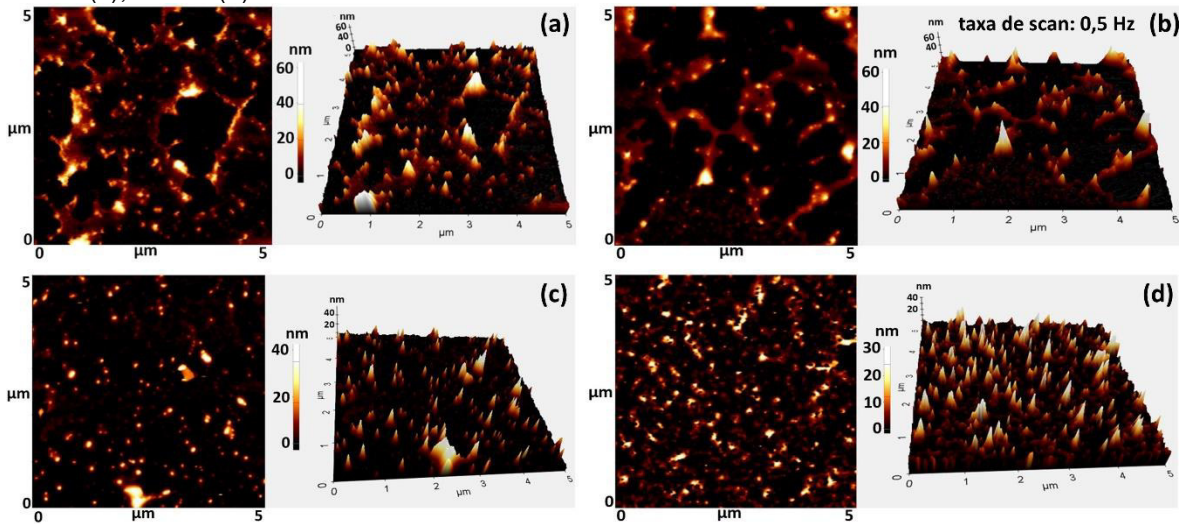
Figura 85 - Microscopia por AFM das formulações do PEL em duas áreas distintas de 5x5 μm para cada formulação: A=0,1 mg/mL área 1 (a), área 2 (b); A=0,5 mg/mL área 1 (c), área 2 (d).



Fonte: Próprio autor.

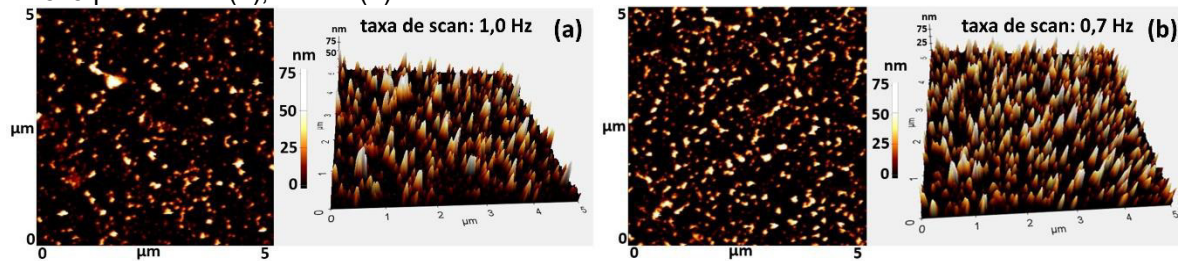
Para os copolímeros PE-PL e PLE-2, a morfologia foi bastante distinta, lembrando uma rede. Para o copolímero PE-PL com A=0,5 e 1,0 mg/mL (Figura 86), a variação de diâmetro médio foi de 10-60 nm (taxa de scan=0,5 Hz) e de 10-40 nm, respectivamente. Para PLE-2 (A=1,0 mg/mL), a variação foi de 10-75 nm (Figura 87).

Figura 86 - Microscopia por AFM das formulações do PE-PL (hidrogel) em duas áreas distintas de 5x5 μm para cada formulação [taxa de scan: 1 Hz]: A=0,5 mg/mL área 1 (a), área 2 (b); A=1,0 mg/mL área 1 (c), área 2 (d).



Fonte: Próprio autor.

Figura 87 - Microscopia por AFM da formulação do PLE-2 (A=1,0 mg/mL) de duas áreas distintas de 5x5 μm : área 1 (a), área 2 (b).



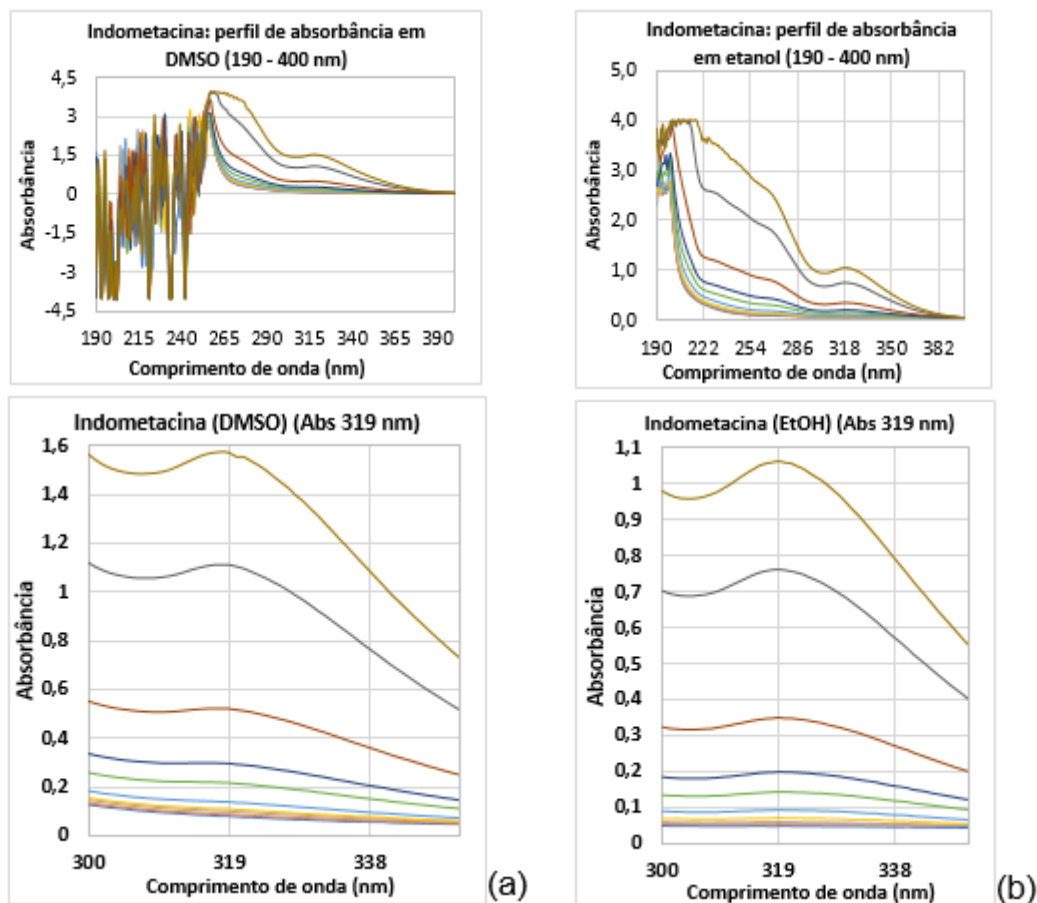
Fonte: Próprio autor.

5.7 Encapsulação de indometacina em copolímeros de pululana

5.7.1 Eficiência de encapsulação

A curva de calibração usada para indometacina foi feita em DMSO e em etanol (que é um solvente muito mais barato), ambas em massa. Apesar de existir uma diferença entre os perfis de absorvância da indometacina em DMSO e em etanol (especialmente no caso do DMSO abaixo de 260 nm), os formatos dos perfis se assemelham a partir de 280 nm para DMSO e 250 nm para etanol: há uma queda na absorvância e então um leve aumento ao redor de 319 nm (Figura 88).

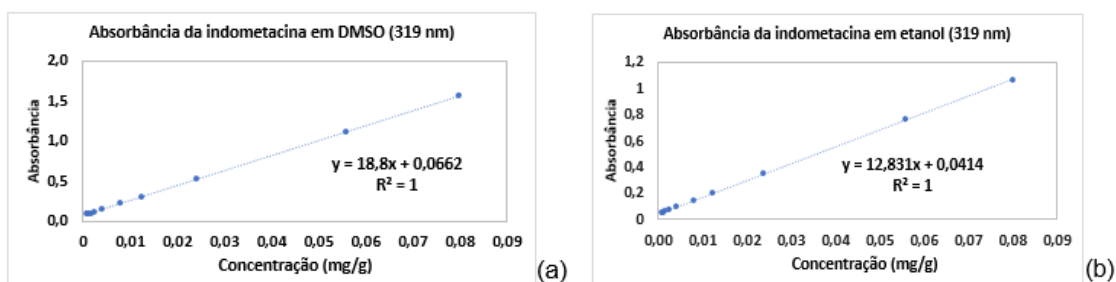
Figura 88 - Perfis de absorvância das soluções de indometacina (190 - 400 nm) em: DMSO (a) e etanol (b).



Fonte: Próprio autor.

As curvas de calibração foram preparadas utilizando as medições em 319 nm (Figura 89). Há uma diferença significativa na absorvância entre as duas soluções, o que é indicado pela diferença entre os coeficientes angulares (DMSO=18,8 e EtOH=12,831), sendo que a solução em DMSO apresenta 46% mais absorvância.

Figura 89 - Curvas de calibração da absorvância (319 nm) da solução de indometacina em: DMSO (a) e em etanol (b).



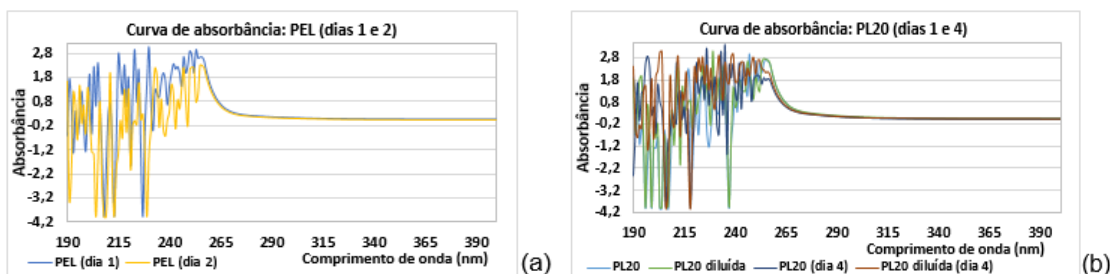
Fonte: Próprio autor.

A curva de calibração também foi feita em DMSO por volume (Curva: $y=22,396.x + 0,0189$, $R^2=0,9787$). Entretanto apesar da preparação ser mais dispendiosa, é aconselhável trabalhar com a preparação por massa pois ela é muito mais precisa.

Os testes de eficiência de encapsulação (EE%) foram realizados medindo a absorção da indometacina em 319 nm. Para comparação, além das formulações (F) foram realizados testes controle com: copolímero puro (P), indometacina pura (I), mistura de copolímero puro e indometacina (PI) na mesma condição que foi preparada a formulação, e também com as suas respectivas diluições na razão 1:10 (F_{dil} , P_{dil} , I_{dil} , PI_{dil}). Para a determinação da eficiência de encapsulação, apenas as NPs preparadas com PL10, PL20 e PEL foram utilizadas devido à sua maior estabilidade geral.

Primeiramente, considerando que DMSO por ser um solvente higroscópico irá absorver umidade do ambiente, um estudo foi realizado para verificar a intensidade de interferência comparando as curvas de absorbância das soluções logo após preparo e ao longo dos dias seguintes (dia 2 e dia 4). Os resultados mostram que há uma mudança mais perceptível na região abaixo de 260 nm, que já é uma região mais densa de variação de absorbância, tanto para os copolímeros com apenas enxerto de PZLL quanto para os com enxerto de PZLL e PEG (Figura 90).

Figura 90 - Curvas de absorbância de copolímeros puros de pululana enxertada com PEG e poli(Z-lisina) (PEL) nos dias 1 e 2 (a) e apenas com poli(Z-lisina) (PL20) nos dias 1 e 4 (b).

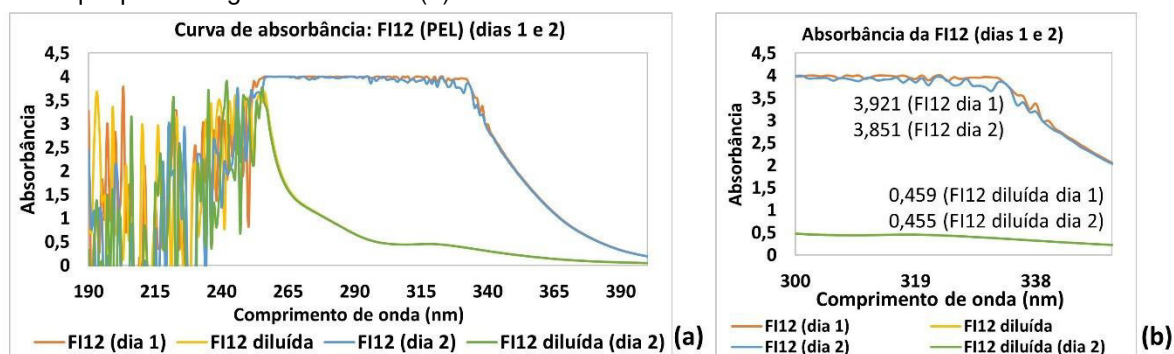


Fonte: Próprio autor.

Também foram comparadas as curvas de absorbância das formulações contendo indometacina preparadas com os copolímeros PL20 (F111) e PEL (F112) (Figuras 91 e 92). Quando o valor da absorbância é muito elevado não é possível fazer comparações precisas, porém pode-se comparar os valores das soluções

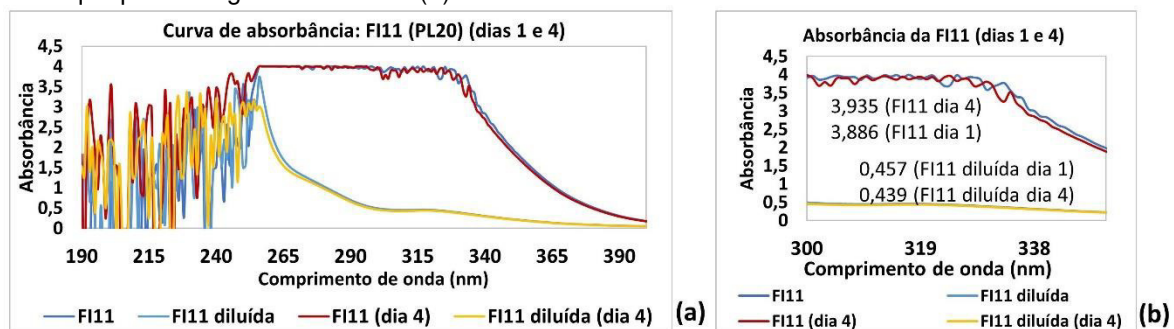
diluídas. Apesar da variação de absorvância ser numericamente pequena em alguns casos (0,005-0,020), é importante verificar que na região de baixa concentração (Abs<0,100) esse valor quando convertido em concentração pode corresponder a uma perda de 20-30% do total de absorvância, provando a hipótese da absorção de umidade pelo DMSO que leva a uma diluição extra da solução gerando a redução da absorvância depois de alguns dias.

Figura 91 - Curvas de absorvância da formulação FI12 (copolímero PEL) nos dias 1 e 2 (a) e destaque para a região de 319 nm (b).



Fonte: Próprio autor.

Figura 92 - Curvas de absorvância da formulação FI11 (copolímero PL20) nos dias 1 e 4 (a) e destaque para a região de 319 nm (b).



Fonte: Próprio autor.

Retornando à curva de absorvância da indometacina em DMSO (319 nm) ($Abs = 18,8.C + 0,0662$), nota-se que o valor mínimo de absorvância esperado para concentração zero é de 0,066, valor na região do que foi medido nas leituras das soluções de copolímeros puros (Tabela 18).

Tabela 18 - Absorbância em 319 nm das soluções de PL20 e PEL.

	Dia 1	Dia 2	Dia 4
PL20	0,069	-	0,061
PL20 diluída	0,066	-	0,059
PEL	0,072	0,069	-
PEL diluída	0,068	0,065	-

Fonte: Próprio autor.

Para estimar a eficiência de encapsulação (EE%) das formulações preparadas (A=1,0 e B=1,0 para todas formulações, mudando apenas o copolímero), utilizou-se novamente a curva da indometacina pura em DMSO (em 319 nm), porém os resultados obtidos para as formulações (EE_{FI}) mostram EE%>100% em algumas das formulações (FI11 e FI12), mesmo depois de descontado o valor do polímero puro livre (EE_(FI - P)) mostrando a influência da presença do copolímero (Tabela 19).

Tabela 19 - Eficiência de encapsulação das formulações FI9-FI12 (A:1,0/B=1,0).

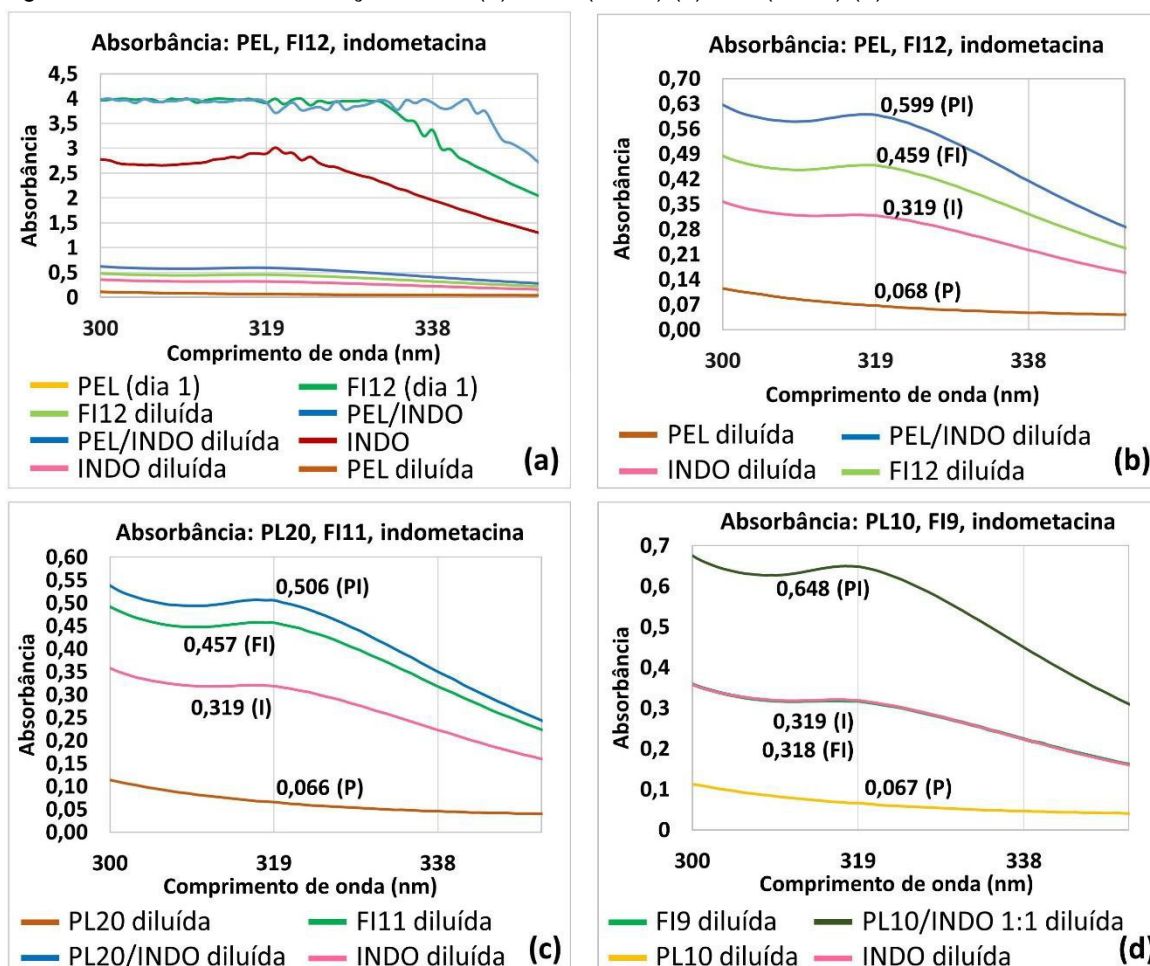
	Abs (319 nm)		Eficiência de Encapsulação (%)	
	Abs _{FI} ¹	Abs _P ²	EE _{FI} ³	EE _(FI - P) ⁴
FI9	0,318	0,067 (PL10)	76,3%	68,9%
FI11	0,457	0,066 (PL20)	106,8%	106,8%
FI12	0,459	0,069 (PEL)	108,3%	107,5%

Notas: ¹ Abs_{FI}: absorbância da formulação (indometacina encapsulada no polímero) diluída; ² Abs_P: absorbância do polímero puro livre diluído; ³ EE_{FI}: eficiência de encapsulação da formulação estimada usando a curva da indometacina em DMSO; ⁴ EE_(FI - P): eficiência de encapsulação da formulação descontando a absorção do polímero puro livre.

Fonte: Próprio autor.

Devido a isso, soluções foram preparadas para comparar a absorbância de indometacina pura (I), da formulação (FI) e de um controle (PI) contendo copolímero e indometacina nas mesmas proporções das formulações (mesmo parâmetro B) simulando a condição EE%=100% de cada formulação (Figura 93). As eficiências de encapsulação estimadas pela comparação com o controle PI foram 43,3% (FI9), 88,9% (FI11) e 73,7% (FI12) (Tabela 20).

Figura 93 - Curvas de absorvância da formulação FI12 (copolímero PEL1) (a) e destaques para a região de 319 nm das formulações FI12 (b), FI11 (PL20) (c), FI9 (PL10) (d).



Fonte: Próprio autor.

Tabela 20 - Eficiência de encapsulação das formulações FI9-FI12 (A:1,0/B:1,0) comparando com os controles PI.

	Abs (319 nm)		Eficiência de Encapsulação (%)
	Abs _{FI} ¹	Abs _{PI} ²	
FI9 (PL10)	0,318	0,648	43,3%
FI11 (PL20)	0,457	0,506	88,9%
FI12 (PEL)	0,459	0,599	73,7%

Notas: ¹ Abs_{FI}: absorvância da formulação (indometacina encapsulada no polímero) diluída; ² Abs_{PI}: absorvância do controle contendo copolímero e indometacina diluída; ³ EE'_{FI}: eficiência de encapsulação da formulação estimada pela comparação com o controle PI (que equivale a EE%=100%) diluído.

Fonte: Próprio autor.

Para efeito de comparação, os tamanhos e EE% de nanopartículas à base de pululana e quitosana são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Tamanhos de nanopartículas e eficiência de encapsulação (EE) de formulações à base de pululana e quitosana carregadas com diferentes princípios ativos.

Material usado: ingrediente ativo	Tamanho de partícula e [PDI] Eficiência de encapsulação (%)	Referências
Pululana- <i>g</i> -PZLL: indometacina	208-338 nm EE = 43-88%	Este trabalho
Pululana- <i>g</i> -PCL: indometacina	220-273 nm [0,08-0,143] EE = 33%	CARVALHO <i>et al.</i> , 2021b.
Pululana- <i>g</i> -PLL: DNA plasmidial pEGFP-N1	60-520 nm —	PARK <i>et al.</i> , 2012.
Pululana acetato: lopinavir	197 nm [<0,2] EE ~75%	RAVI <i>et al.</i> , 2014.
Pululana acetato conjugada com folato: cumarina 6	272-370 nm [0,308-0,386] —	JIANG <i>et al.</i> , 2022.
Pululana-SA-HA-NI: erlotinibe	84 nm [0,248] EE = 94%	BERA <i>et al.</i> , 2021.
DBAP-Pululana octanoato: diclofenaco	203,4 ± 0,8 nm [0,073 ± 0,006] EE = 74%	CONSTANTIN <i>et al.</i> , 2020.
PCL-PVAc-PEG/D- Tre/T80: indometacina	130 nm [0,241] EE > 80%	SIPOS <i>et al.</i> , 2022.
Quitosana: —	52-400 nm [0,06-0,40] —	ABDEL-HAFEZ; HATHOUT; SAMMOUR, 2014.
Quitosana: indometacina	321-675 nm [0,115-0,215] EE = 56-79%	ABUL KALAM <i>et al.</i> , 2016.
Quitosana: quetiapina fumarato	131 ± 8 nm [0,25] EE = 89 ± 4%	SHAH <i>et al.</i> 2016.

Fonte: Próprio autor.

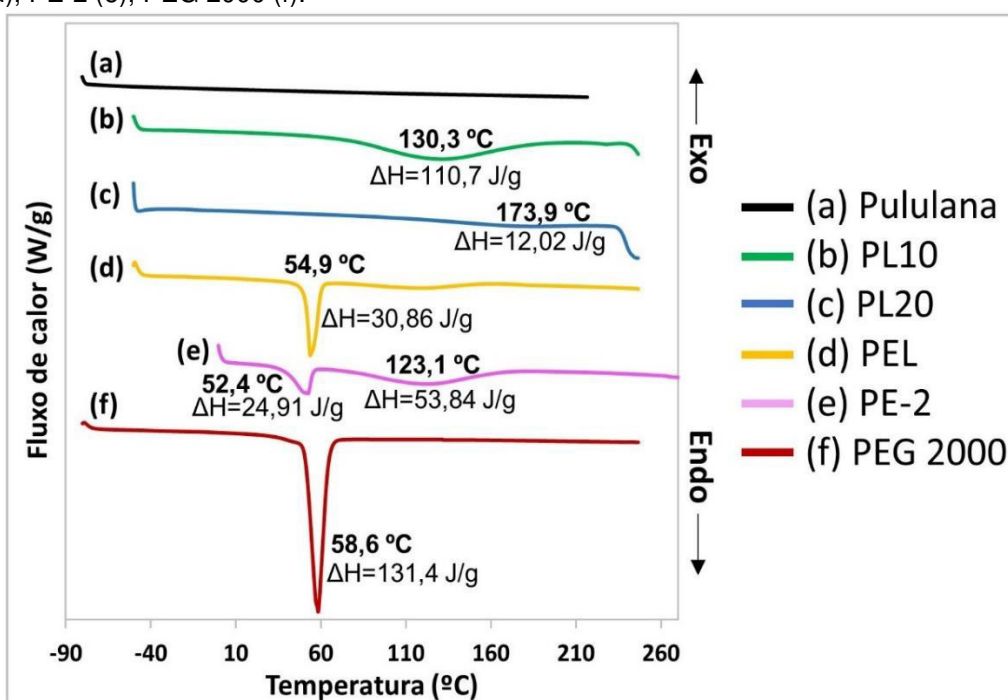
Carvalho *et al.* (2021b) prepararam NPs carregados com indometacina usando pululana-*g*-PCL e avaliaram a liberação controlada de uma formulação (A=1,5; B=0,67; Dh=208,6 nm, PDI=0,128, EE=35%), o que levou a bons resultados de liberação de drogas *in vitro*. Carvalho *et al.* (2022) e Park *et al.* (2012) prepararam copolímeros anfífilicos de pululana enxertados com cadeias PZLL e PLL, respectivamente. Essas NPs foram testadas em termos de citotoxicidade utilizando células L929 MEF e HepG2, respectivamente, e resultados negativos em ambos os casos indicam o potencial de tais materiais para serem aplicados como plataformas em sistemas de liberação de fármacos.

5.7.2 DSC dos copolímeros e das formulações com fármaco encapsulado

Para verificar se a incorporação da indometacina nas partículas dos copolímeros pode ser visualizada pela modificação das propriedades térmicas e cristalinas da indometacina, foram analisados os copolímeros puros, a indometacina pura, as formulações com fármaco encapsulado e misturas de copolímero/fármaco nas mesmas proporções das formulações (mesmo parâmetro B).

Como os copolímeros deste trabalho são baseados em pululana, que é um polissacarídeo hidrofílico, é de se esperar que haja presença de moléculas de água interagindo nas cadeias. Portanto, as análises de DSC foram realizadas seguindo a seguinte lógica: i) para os copolímeros puros: duas corridas seguidas, a primeira de -50 a 110 °C para eliminação de água e a segunda de -50 a 250 °C (Figuras 94 e 96), ii) para as formulações e misturas copolímero/fármaco: uma corrida única de -50 a 250 °C (Figura 95). Os resultados foram então comparados entre si.

Figura 94 - Termogramas de DSC dos copolímeros de pululana: pululana (a), PL10 (b), PL20 (c), PEL (d), PE-2 (e), PEG 2000 (f).



Fonte: Próprio autor.

Analisando o termograma de DSC da pululana, não se observaram eventos térmicos (a literatura reporta 178 °C para Tg da pululana) (RATTO; SCHNEIDER,

1998³ *apud* SHIBATA *et al.*, 2001). Para PL10 e PL20 foram observados picos endotérmicos que se reduziram em intensidade com o aumento do grau de enxertia de PZLL. O mesmo pico também aparece nos outros copolímeros (PE-2 e PEL).

Nos copolímeros que possuem enxertia de PEG, o pico de fusão (T_m) do PEG 2000 (em 58,6 °C) caiu para ca. 52-55 °C, bem como houve uma redução significativa da entalpia de fusão (ΔH) após a enxertia das cadeias de PEG na pululana. A redução do grau de cristalinidade (GC) pode ser estimada pela equação $GC(\%) = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \times 100$, sendo que ΔH_m^0 é a entalpia de fusão para o polímero totalmente cristalino, assim, para PE-2 o grau de cristalinidade é de 18,9% e para PEL é 23,5%.

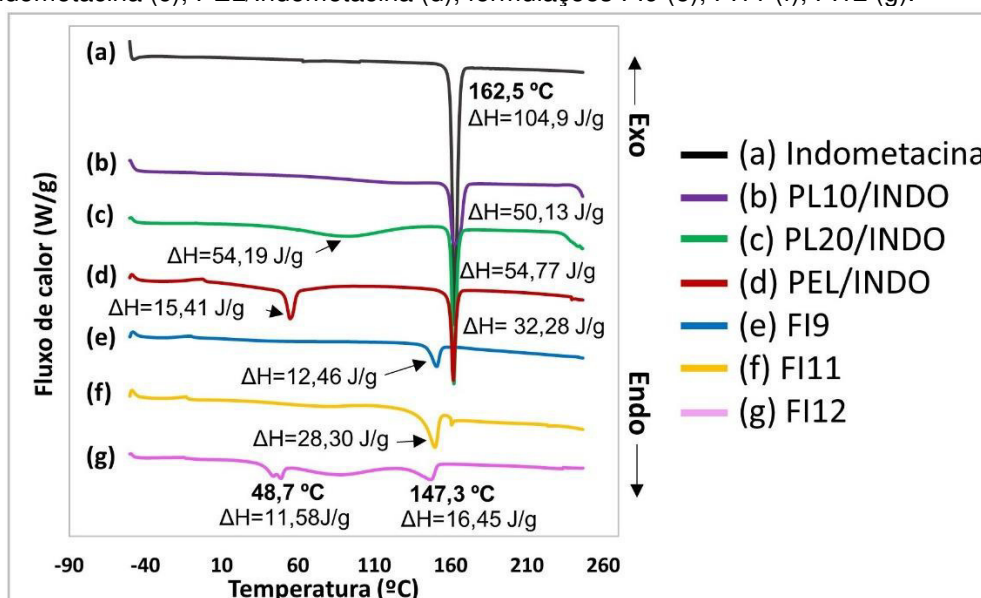
A indometacina pura possui pico de fusão (T_m) em 162,5 °C com elevada entalpia de fusão, enquanto as misturas contendo o fármaco apesar de terem T_m no mesmo ponto possuem entalpias inferiores. Nas formulações com a indometacina encapsulada, observou-se uma queda do pico de fusão para 147-147,3 °C e uma ainda maior redução da entalpia de fusão, indicando a redução do grau de cristalinidade do fármaco como consequência da incorporação do fármaco nas cadeias do copolímero. Isto pode ser devido à amorfização parcial da INDO ou a uma forte interação entre o fármaco e as cadeias poliméricas hidrofóbicas. O mesmo comportamento foi observado por Bera *et al.* (2021) ao encapsular o medicamento erlotinibe (pouco solúvel) usando um copolímero anfifílico à base de pululana (succinil pululana-*g*-6-(2-nitroimidazol)-hexilamina), cujas NPs mostraram excelente eficiência de encapsulação (94%). O GC do fármaco estimado para as formulações foi de 7,7% para FI9 (PL10), 26,9% para FI11 (PL20) e 15,7% para FI12 (PEL) (Figura 95), que é compatível com o teor de fármaco presente em cada formulação, 43,3% (FI9), 88,9% (FI11) e 73,7% (FI12), quanto maior o teor de indometacina, maior o grau de cristalinidade.

Comparando os termogramas de DSC dos copolímeros com enxertia de PEG2000 (Figura 96), nota-se a presença do pico de fusão do PEG (54,9 °C) em todos os copolímeros, porém em uma temperatura menor (45,7 a 53,4 °C), exceto no PLE-1. Em todos copolímeros, a entalpia de fusão é significativamente inferior à

³ RATO, J. A.; SCHNEIDER, N. The effect of water interactions on the thermal transition behavior of pullulan. **Polymeric Materials Science and Engineering**, v. 79, p. 469-470, 1998.

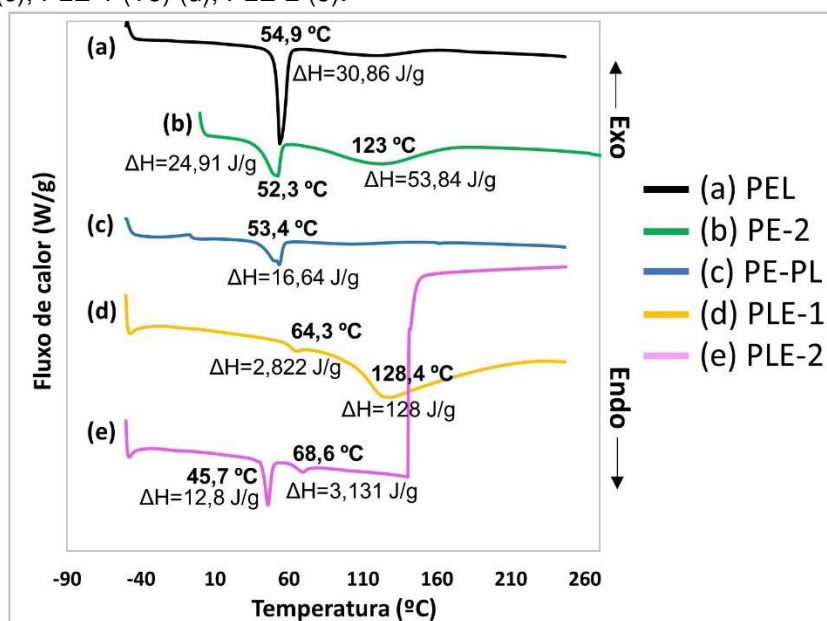
do PEG antes da enxertia, mostrando a redução das propriedades cristalinas. Também se observou a presença de picos exotérmicos possivelmente de recristalização da indometacina (entre -14 e -10°C) que estão presentes apenas nas formulações e não nas misturas.

Figura 95 - Termogramas de DSC das formulações com indometacina encapsulada (FI9, FI11, FI12) e das misturas copolímero/fármaco: indometacina pura (a), misturas PL10/Indometacina (b), PL20/Indometacina (c), PEL/Indometacina (d), formulações FI9 (e), FI11 (f), FI12 (g).



Fonte: Próprio autor.

Figura 96 - Termogramas de DSC dos copolímeros de pululana com enxertia de PEG: PEL (a), PE-2 (b), PE-PL (c), PLE-1 (T5) (d), PLE-2 (e).



Fonte: Próprio autor.

Portanto, pode-se inferir que a indometacina foi incorporada na estrutura polimérica nas formulações, uma vez que houve uma queda de ca. 10 °C no pico esperado para indometacina nas formulações, o que não foi observado na simples mistura com os copolímeros, também se observou a presença de picos possivelmente de recristalização da indometacina (entre -14 e -10 °C) que estão presentes nas formulações, porém não nas misturas.

6 CONCLUSÕES

Três copolímeros Pul-*g*-PZLL foram preparados com diferentes graus de enxertia (PL10, PL20 e PL30). A seguir, o melhor resultado para a enxertia do PEG na pululana foi obtido com HDI e PEG 2000 via reação *one-pot*, uma vez que o grupo isocianato é bastante sensível à umidade e essa combinação permitiu um melhor controle do processo. Observou-se que o tratamento com diálise é mais eficiente para a remoção dos solventes de reação que o processo de precipitação com solvente, portanto essa foi a metodologia adotada na síntese dos copolímeros seguintes.

Os copolímeros com ambos enxertos, de PZLL e de PEG, nas cadeias de pululana foram obtidos por 3 rotas diferentes (1, 2 e 3) levando à obtenção de copolímeros distintos. A rota 1 (com enxertia de PEG primeiro) formou o copolímero desejado – Pul-*g*-PEG/PZLL – chamado PEL. Já a rota 2 (enxertia de PZLL primeiro) levou à obtenção de dois materiais distintos – chamados PLE – de acordo com o tempo de reação, com menos tempo (4 h) obteve-se um pó (PLE-2) e com mais tempo (16h) um hidrogel (PLE-1) indicando que o diisocianato atuou como agente de reticulação além da sua função inicialmente prevista como conector do PEG na cadeia de pululana. Na rota 3 (enxertia de PEG e PZLL em cadeias distintas de pululana e posterior conexão dessas cadeias), o material obtido – chamado de PE-PL – também foi um hidrogel, porém com características bastante diferentes do PLE-1. Todos copolímeros foram caracterizados e confirmados por RMN ¹H e FTIR, exceto o PLE-1 que por ser totalmente insolúvel não pôde ser analisado por RMN.

O caráter anfifílico dos copolímeros PL10, PL20, PL30 e PEL foi confirmado pelo teste da Concentração micelar crítica (CMC) provando a influência da enxertia de cadeias hidrofóbicas (polilisina) e hidrofílicas (PEG) na CMC, quanto mais hidrofóbico o copolímero menor é o valor da CMC e quanto mais hidrofílico maior a CMC.

Os copolímeros PL10, PL20 e PEL foram estudados mais extensamente na produção de partículas por diálise, sem e com indometacina incorporada, usando diferentes razões copolímero/DMSO (parâmetro A) e indometacina/copolímero (parâmetro B). Os resultados de DLS indicam alta estabilidade para partículas sem fármaco incorporado (baixa variação de tamanho) e distribuição de tamanho

bastante homogênea ($PDI < 0,2$) e na escala nanométrica (241 a 404 nm); porém, com a incorporação de indometacina a polidispersidade aumenta e a faixa de tamanho passa para a escala micrométrica para $A > 0,5$. Entre os copolímeros avaliados, PL10 e PL20 se demonstraram mais promissores dentro dos parâmetros estudados para encapsulação de INDO. Os melhores resultados foram obtidos para $0,2 \leq A \leq 1,0$, enquanto a razão B não demonstrou tanta influência no tamanho e PDI quanto a razão A dentro da faixa avaliada.

A morfologia observada por AFM das partículas secas de PL10 e PL20 foi esférica enquanto para os copolímeros contendo enxertos de PEG (PEL, PLE-2 e PE-PL) o formato não é bem definido.

Quanto à incorporação de indometacina nas cadeias dos copolímeros PL10, PL20 e PEL, os testes por espectroscopia UV-Visível demonstraram elevado teor de fármaco presente nas formulações liofilizadas (43,3 a 88,9%). As análises de DSC também indicam que houve incorporação de indometacina nos copolímeros, uma vez que se observou a queda do pico de fusão (de 162 para 147 °C) e a redução da cristalinidade do fármaco (para 7,7 a 26,9%), o que não foi visualizado nas misturas de polímero e fármaco.

Os resultados deste trabalho mostram o potencial de aplicação dos copolímeros anfifílicos Pul-g-PZLL e Pul-g-PEG/PZLL e suas nanopartículas na encapsulação de indometacina, e possivelmente de outros fármacos ou ativos hidrofóbicos, como os da classe II, e, a partir da sua otimização, sua potencial aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar as sínteses dos copolímeros com enxertia de PZLL e PEG, verificando o efeito de diferentes proporções de cada um dos enxertos nas propriedades do copolímero final, como seu grau de anfifilicidade, o tamanho das partículas obtidas e sua estabilidade, testar outras metodologias para produção de partículas além da nanoprecipitação por diálise, fazer a encapsulação de um fármaco hidrofóbico e avaliar o perfil de liberação.
- Estudar as reações de síntese que produziram os hidrogeis, realizar as caracterizações destes materiais e avaliar para alguma aplicação biomédica.
- Estudar as partículas quando estão na faixa micrométrica, como varia sua polidispersidade, fazer encapsulação de fármacos hidrofóbicos e avaliar o perfil de liberação.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAFEZ, S. M.; HATHOUT, R. M.; SAMMOUR, O. A. Towards better modeling of chitosan nanoparticles production: Screening different factors and comparing two experimental designs. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 334–340, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.11.041>

ABUL KALAM, M. *et al.* Optimizing indomethacin-loaded chitosan nanoparticle size, encapsulation, and release using Box–Behnken experimental design. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 329–340, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.033>

AHMAD, N. *et al.* Quantification and Evaluations of Catechin Hydrate Polymeric Nanoparticles Used in Brain Targeting for the Treatment of Epilepsy. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 203, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030203>

AKIYOSHI, K. *et al.* Self-assembly of polymer amphiphiles: thermodynamics of complexation between bovine serum albumin and self-aggregate of cholesterol-bearing pullulan. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 112, n. 2–3, p. 91–95, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(96\)03560-1](https://doi.org/10.1016/0927-7757(96)03560-1)

AKIYOSHI, K. *et al.* Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilization of insulin. **Journal of Controlled Release**, v. 54, p. 313–320, 1998. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00017-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00017-0)

ALY, A. A.; EL-BISI, M. K. Grafting of polysaccharides. In: THAKUR, V. K. (ed.). **Biopolymer Grafting: Synthesis and Properties**. Elsevier, 2018.

ATANASE, L. I.; DESBRIERES, J.; RIESS, G. Micellization of synthetic and polysaccharides-based graft copolymers in aqueous media. **Progress in Polymer Science**, v. 73, p. 32–60, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.06.001>

BAHARIFAR, H. *et al.* Preparation of PEG-grafted chitosan/streptokinase nanoparticles to improve biological half-life and reduce immunogenicity of the enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 181–189, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.157>

BARTOS, C. *et al.* Study of sodium hyaluronate-based intranasal formulations containing micro- or nanosized meloxicam particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 491, n. 1–2, p. 198–207, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.046>

BASU, P. *et al.* Polymeric hydrogel based systems for vaccine delivery: A review. **Polymer**, v. 230, p. 124088, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124088>

BERA, H. *et al.* Hypoxia-responsive pullulan-based nanoparticles as erlotinib carriers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 764–774, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.122>

BERTRAND, N. *et al.* Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 66, p. 2-25, 2014.

BHALANI, D. V. *et al.* Bioavailability Enhancement Techniques for Poorly Aqueous Soluble Drugs and Therapeutics. **Biomedicines**, v. 10, n. 9, p. 2055, 23 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092055>

BHATIA, S. **Systems for Drug Delivery**. Springer International Publishing, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41926-8>

BIEDERMANN, F. *et al.* Postpolymerization Modification of Hydroxyl-Functionalized Polymers with Isocyanates. **Macromolecules**, v. 44, n. 12, p. 4828–4835, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/ma2008018>

BISWAS, S. *et al.* Recent advances in polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 184–202, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.031>

BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 941-951, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>

BLASS, B. E. The drug discovery process: From ancient times to the present day. In: _____. **Basic Principles of Drug Discovery and Development**. 2. ed.: Elsevier, 2021. p. 43–110. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817214-8.00002-6>

BOERS TRILLES, V. *et al.* PNS3 Brazilian Pharmaceutical Industry: The Impact of Public Policies Aimed at Fostering Local Manufacturing. **Value in Health Regional Issues**, v. 19, p. S63, 2019.

BOSCH, F.; ROSICH, L. The Contributions of Paul Ehrlich to Pharmacology: A Tribute on the Occasion of the Centenary of His Nobel Prize. **Pharmacology**, v. 82, n. 3, p. 171–179, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1159/000149583>

BRAUNGARDT, S.; VAN DEN BERGH, J.; DUNLOP, T. Fossil fuel divestment and climate change: Reviewing contested arguments. **Energy Research & Social Science**, v. 50, p. 191–200, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.erss.2018.12.004>

BRUNEEL, D.; SCHACHT, E. Chemical modification of pullulan: 1 Periodate oxidation. **Polymer**, v. 34, n. 12, p. 2628-2632, 1993a. DOI: [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(93\)90600-F](https://doi.org/10.1016/0032-3861(93)90600-F)

BRUNEEL, D.; SCHACHT, E. Chemical modification of pullulan: 2. Chloroformate activation. **Polymer**, v. 34, n. 12, p. 2633-2637, 1993b. DOI: [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(93\)90601-6](https://doi.org/10.1016/0032-3861(93)90601-6)

BRUNEEL, D.; SCHACHT, E. Chemical modification of pullulan: 3. Succinylation. **Polymer**, v. 35, n. 12, p. 2656-2658, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(94\)90395-6](https://doi.org/10.1016/0032-3861(94)90395-6)

BRUNEEL, D.; SCHACHT, E. Enzymatic Degradation of Pullulan and Pullulan Derivatives. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 10, n. 4, p. 299–312, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1177/088391159501000402>

CARVALHO, L. T. *et al.* Synthesis of amphiphilic pullulan-graft-poly(ϵ -caprolactone) via click chemistry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 701–711, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.207>

CARVALHO, L. T. *et al.* Recent advances in the production of biomedical systems based on polyhydroxyalkanoates and exopolysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1514-1539, 2021a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.025>

CARVALHO, L. T. *et al.* Development of pullulan-based carriers for controlled release of hydrophobic ingredients. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 45, p. 51344, 2021b. DOI: <https://doi.org/10.1002/app.51344>

CARVALHO, L. T. *et al.* Preparation and characterization of cationic pullulan-based polymers with hydrophilic or amphiphilic characteristics for drug delivery. **Reactive and Functional Polymers**, v. 181, p. 105441, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105441>

CASTRO, K. C. *et al.* Drug-loaded polymeric nanoparticles: a review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 71, n.1, p. 1–13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1798436>

CHAE, S. Y. *et al.* Deoxycholic acid-conjugated chitosan oligosaccharide nanoparticles for efficient gene carrier. **Journal of Controlled Release**, v. 109, p. 330–344. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.040>

CHAPLIN, M. F.; KENNEDY, J. F. (Ed.). **Carbohydrate analysis: a practical approach**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1994.

CHI, Z.; ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 2-3, p. 206–211, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00119-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00119-4)

CONSTANTIN, M. *et al.* Smart nanoparticles based on pullulan-g-poly(N-isopropylacrylamide) for controlled delivery of indomethacin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 698–708, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.064>

CONSTANTIN, M. *et al.* Pullulan derivative with cationic and hydrophobic moieties as an appropriate macromolecule in the synthesis of nanoparticles for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 4487–4498, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.064>

COOWANITWONG, I. *et al.* Slow Release Formulations of Inhaled Rifampin. **The AAPS Journal**, v. 10, n. 2, p. 342–348, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9044-5>

CUTRONE, G. *et al.* Comb-like dextran copolymers: A versatile strategy to coat highly porous MOF nanoparticles with a PEG shell. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, p. 115085, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115085>

DANDIĆ, A. *et al.* Review of characteristics and analytical methods for determination of indomethacin. **Reviews in Analytical Chemistry**, v. 41, n. 1, p. 34–62, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1515/revac-2022-0032>

DAVIS, M. E.; CHEN, Z.; SHIN, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 9, p. 771–782, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrd2614>

DELLOYD's Lab Tech resources reagents and solutions. Visualizing agents for TLC and PC. Disponível em: http://delloyd.50megs.com/spray_reagents.html. Acesso em: 01 ago. 2019.

DENG, L. *et al.* A strategy for oral chemotherapy via dual pH-sensitive polyelectrolyte complex nanoparticles to achieve gastric survivability, intestinal permeability, hemodynamic stability and intracellular activity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 97, p. 107–117, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.10.010>

DIN, F. *et al.* Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 7291–7309, 2017.

DOUGHERTY, C. Indomethacin-Induced Headache: Causing the Problem You Are Trying to Solve. **Current Pain and Headache Reports**, v. 25, n. 11, p. 72, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11916-021-00986-9>

EYRING, V. *et al.* Human influence on the climate system. In: MASSON-DELMOTTE, V. (ed.) **Climate Change 2021: The Physical Science Basis**. Contribution of Working Group I to the Sixth 41 Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, 2021. p. 202. In Press

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p. 16–20, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/nn900002m>

FEGZKÓ, T. Polymeric nanotherapeutics acting at special regions of body. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 64, p. 102597, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102597>

FLORENCE, A. T. "Targeting" nanoparticles: the constraints of physical laws and physical barriers. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 2, p. 115-124, 2012.

FRASER, C. G.; JENNINGS, H. J. A glucan from *Tremella mesenterica* NRRL-Y6158. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 1804–1807, 1971. DOI: <https://doi.org/10.1139/v71-297>

FREITAS, F. *et al.* Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1674-1683, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.092>

FRICAIN, J. C. *et al.* A nano-hydroxyapatite – Pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 34, p. 2947-2959, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.049>

GANIE, S. A.; RATHER, L. J.; LI, Q. A review on anticancer applications of pullulan and pullulan derivative nanoparticles. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, p. 100115, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100115>

GAUCHER, G. *et al.* Polymeric micelles for oral drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 2, p. 147–158, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.06.007>

GHOSH, B.; BISWAS, S. Polymeric micelles in cancer therapy: State of the art. **Journal of Controlled Release**, v. 332, p. 127-147, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.016>

HASNAIN, M. S.; NAYAK, A. K. (ed.). **Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications**. Academic Press, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2018-0-01566-2>

HASUDA, H. *et al.* Synthesis of photoreactive pullulan for surface modification. **Biomaterials**, v. 26, p. 2401-2406, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.065>

HE, C.; LIU, D.; LIN, W. Self-assembled core-shell nanoparticles for combined chemotherapy and photodynamic therapy of resistant head and neck cancers. **ACS Nano**, v. 9, n. 1, p. 991-1003, 2015.

HILARES, R. T. *et al.* Exopolysaccharide (pullulan) production from sugarcane bagasse hydrolysate aiming to favor the development of biorefineries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 169-177, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.038>

HIPÓLITO-NÁJERA, A. R. *et al.* Interaction of indomethacin–cyclodextrins in water by UV–Vis and ITC. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 95, n. 1–2, p. 55–62, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10847-019-00915-9>

JEONG, Y.-I. *et al.* Adriamycin release from self-assembling nanospheres of poly(DL-lactide-co-glycolide)-grafted pullulan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 322, n. 1–2, p. 154–160, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.05.020>

JHAVERI, A. M.; TORCHILIN, V. P. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 1-26, 2014.

JIANG, Y. *et al.* SOD1 nanozyme salvages ischemic brain by locally protecting cerebral vasculature. **Journal of Controlled Release**, v. 213, p. 36–44, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.021>

JIANG, Z. *et al.* Placental cell translocation of folate-conjugated pullulan acetate non-spherical nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 216, p. 112553, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112553>

JIN, Y. *et al.* Goblet cell-targeting nanoparticles for oral insulin delivery and the influence of mucus on insulin transport. **Biomaterials**, v. 33, n. 5, p. 1573–1582, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.075>

JUNG, S-W *et al.* Self-assembled polymeric nanoparticles of poly(ethylene glycol) grafted pullulan acetate as a novel drug carrier. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, p. 562-569, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02980132>

KAISER, J. Combining targeted drugs to stop resistant tumors. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1542-1545, 2011.

KANDASAMY, G.; MAITY, D. Multifunctional theranostic nanoparticles for biomedical cancer treatments - A comprehensive Review. **Materials Science and Engineering C**, v. 127, p. 112199, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112199>

KANENIWA, N.; OTSUKA, M.; HAYASHI, T. Physicochemical characterization of indomethacin polymorphs and the transformation kinetics in ethanol. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 8, p. 3447–3455, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.33.3447>

KARAK, N. **Biobased smart polyurethane nanocomposites: from synthesis to applications**. [s.l.] RSC, 2017.

KENAKIN, T. P. The Drug Discovery Process. In: **A Pharmacology Primer**. Elsevier, 2019. p. 323–371. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813957-8.00011-4>

KHADEMI, F. *et al.* Are chitosan natural polymers suitable as adjuvant/delivery system for anti-tuberculosis vaccines? **Microbial Pathogenesis**, v. 121, p. 218–223, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.035>

KINCH, M. S.; KRAFT, Z.; SCHWARTZ, T. 2021 in review: FDA approvals of new medicines. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 8, p. 2057–2064, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.04.010>

KROCHTA, J. M.; DE MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51, p. 61–74, 1997.

KWON, I. K. *et al.* Analysis on the current status of targeted drug delivery to tumors. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 2, p. 108–114, 2012.

KYCIA, K. *et al.* Pullulan as a potential enhancer of Lactobacillus and Bifidobacterium viability in synbiotic low fat yoghurt and its sensory quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 128, p. 109414, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109414>

LAHA, B.; MAITI, S. Design of Core-Shell Stearyl Pullulan Nanostructures for Drug Delivery. **Materials Today: Proceedings**, v. 11, p. 620–627, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.03.019>

LAUTENSCHLÄGER, C. *et al.* PEG-functionalized microparticles selectively target inflamed mucosa in inflammatory bowel disease. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 578–586, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.09.016>

LEATHERS, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 5–6, p. 468–473, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1386-4>

LEE, B. K.; YUN, Y. H.; PARK, K. Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities. **Chemical Engineering Science**, v. 2, p. 158–164, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.06.042>

LEE, C. *et al.* Long-acting inhalable chitosan-coated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles containing hydrophobically modified exendin-4 for treating type 2 diabetes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2975, 2013a. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S48197>

LEE, J. *et al.* Biodegradable nanogel based on all-trans retinoic acid/pullulan conjugate for anti-cancer drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 43, n. 1, p. 63–69, 2013b. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s40005-013-0055-6>

LEMECHKO, P. *et al.* Designing exopolysaccharide-graft-poly(3-hydroxyalkanoate) copolymers for electrospun scaffolds. **Reactive and Functional Polymers**, v. 73, n. 1, p. 237–243, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.10.012>

LEVINSON, A. D. Cancer therapy reform. **Science**, v. 328, n. 5975, p. 137, 2010.

LI, X. *et al.* Dynamic and static light scattering studies on self-aggregation behavior of biodegradable amphiphilic poly(ethylene oxide)poly[(R)-3-hydroxybutyrate]-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solution. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 5920-5926, 2006.

LI, R. *et al.* Copolymerization of Chitosan Selectively Grafted by Polyethylene glycol as DNA Delivery Vectors. *In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOMEDICAL ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY*, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1109/iCBEB.2012.116>

LI, H. *et al.* High drug loading pH-sensitive pullulan-DOX conjugate nanoparticles for hepatic targeting. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, p. 150-159, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.34680>

LI, X. *et al.* HLC/pullulan and pullulan hydrogels: their microstructure, engineering process and biocompatibility. **Materials Science & Engineering C**, v. 58, p. 1046–1057, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.039>

LI, M. *et al.* Multiple-therapy strategies via polysaccharides-based nano-systems in fighting cancer. **Carbohydrate Polymers**, v. 269, p. 118323, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118323>

MAEDA, H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond. **Journal of Controlled Release**, v. 164, p. 138-144, 2012.

MAISEL, K. *et al.* Effect of surface chemistry on nanoparticle interaction with gastrointestinal mucus and distribution in the gastrointestinal tract following oral and rectal administration in the mouse. **Journal of Controlled Release**, v. 197, p. 48–57, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.10.026>

MAITI, S.; JANA, S. (ed.) **Polysaccharide Carriers for Drug Delivery**. Woodhead Publishing, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2017-0-02351-0>

MCINTYRE, D. D.; VOGEL, H. J. Nuclear Magnetic Resonance Studies of Homopolysaccharides Related to Starch. **Starch - Stärke**, v. 43, n. 2, p. 69–76, 1991.

MENG, X. *et al.* Self-immolative micellar drug delivery: The linker matters. **Nano Research**, v. 11, n. 12, p. 6177–6189, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2134-5>

MERCK. Solvent Miscibility Table, 2022a. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/purification/solvent-miscibility-table>. Acesso em 03 fev. 2022.

MERCK. Solubility Rules: Solubility of Common Ionic Compounds, 2022b. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical->

[documents/technical-article/materials-science-and-engineering/solid-state-synthesis/solubility-rules-solubility-of-common-ionic-compounds](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101962). Acesso em: 03 fev. 2022.

MERT, H.; ÖZKAHRAMAN, B.; DAMAR, H. A novel wound dressing material: Pullulan grafted copolymer hydrogel via UV copolymerization and crosslinking. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 60, p. 101962, Dec. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101962>

MIRTIČ, A.; GRDADOLNIK, J. The structure of poly-L-lysine in different solvents. **Biophysical Chemistry**, v. 175–176, p. 47–53, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.02.004>

MISHRA, B.; SUNEETHA, V. Biosynthesis and hyper production of Pullulan by a newly isolated strain of *Aspergillus japonicus*-VIT-SB1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 2045–2052, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1629-9>

MISHRA, B.; ZAMARE, D.; MANIKANTA, A. Selection and Utilization of Agro-industrial Waste for Biosynthesis and Hyper-Production of Pullulan: A Review. In: VARJANI, S. *et al.* (eds) **Biosynthetic Technology and Environmental Challenges. Energy, Environment, and Sustainability**. Singapore: Springer, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9_6

MITSUHASHI, M.; YONEYAMA, M.; SAKAI S. Growth promoting agent for bacteria containing pullulan with or without dextran. Canadian Patent CA2007270A1, 1990.

MOCHIDA, Y. *et al.* Bundled assembly of helical nanostructures in polymeric micelles loaded with platinum drugs enhancing therapeutic efficiency against pancreatic tumor. **ACS Nano**, v. 8, p. 6724–6738, 2014.

MORAES, R. M. **Síntese de copolímeros em bloco, anfifílicos, termossensíveis, e preparação de micro/nanopartículas poliméricas para liberação controlada de fármacos**. Tese (Doutorado em Ciências) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

MURA, S.; NICOLAS, J.; COUVREUR, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. **Nature Materials**, v. 12, n. 11, p. 991–1003, 2013.

MURDANDE, S. B. *et al.* Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals: I. A thermodynamic analysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1254–1264, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.21903>

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Polymer Science and Engineering: The Shifting Research Frontiers**. Washington, DC: The National Academies Press, 1994. DOI: <https://doi.org/10.17226/2307>

NAYAK, A. K. *et al.* Synthesis and Characterization of Graft Copolymers of Plant Polysaccharides. In: THAKUR, V. K. (ed.). **Biopolymer Grafting: Synthesis and Properties**. Elsevier, 2018.

NICOLAOU, K. C. The Chemistry-Biology-Medicine Continuum and the Drug Discovery and Development Process in Academia. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 9, p. 1039–1045, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.07.020>

NISHIKAWA, T.; AKIYOSHI, K.; SUNAMOTO, J. Supramolecular Assembly between Nanoparticles of Hydrophobized Polysaccharide and Soluble Protein Complexation between the Self-Aggregate of Cholesterol-Bearing Pullulan and α -Chymotrypsin. **Macromolecules**, v. 27, n. 26, p. 7654-7659, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1021/ma00104a021>

OKADA, K. *et al.* Digestion and fermentation of pullulan. **Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi**, v. 43, p. 23-29, 1990. DOI: <https://doi.org/10.4327/jsnfs.43.23>

OKADA, R.; MATSUKAWA, S.; WATANABE, T. Hydration structure and dynamics in pullulan aqueous solution based on ^1H NMR relaxation time. **Journal of Molecular Structure**, v. 602–603, p. 473–483, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(01\)00728-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(01)00728-1)

PALMEIRA FILHO, P. L, CAPANEMA, L. X. L. A indústria farmacêutica nacional: desafios rumo à inserção global. In: Além, A. C; Giambiagi, F. (orgs). **O BNDES em um Brasil em Transição**. Rio de Janeiro: BNDES; 2010. 2010; p. 307- 318.

PANDEY, A. K. *et al.* Production and applications of pullulan. In: **Biomass, Biofuels, Biochemicals**. Elsevier, 2021. p. 165–221. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-821888-4.00018-6>

PARK, J. S. *et al.* Preparation of pullulan-*g*-poly(L-lysine) and its evaluation as a gene carrier. **Macromolecular Research**, v. 20, n. 7, p. 667–672, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13233-012-0098-y>

PARK, K. True combination therapy using synergistic drug combination. **Journal of Controlled Release**, v. 187, p. 198, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.034>

PATIL, S. B. *et al.* Tailor-made electrically-responsive poly(acrylamide)-graft-pullulan copolymer based transdermal drug delivery systems: Synthesis, characterization, in-vitro and ex-vivo evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, p. 101525, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101525>

PEER, D. *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 12, p. 751-760, 2007.

PETROV, P. T. *et al.* Biosynthesis of pullulan by *Aureobasidium pullulans* strain BMP-97. **Biotechnologia**, n.1, p.36–48, 2002.

POUCHERT, C.; BEHNKE, J. **Aldrich library of ^{13}C and ^1H FT NMR spectra**. Milwaukee: Aldrich Chemical Company, 1993. 2 v.

PRIDGEN, E. M. *et al.* Transepithelial Transport of Fc-Targeted Nanoparticles by the Neonatal Fc Receptor for Oral Delivery. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 213, p. 1–9, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007049>

RAVI, P. R. *et al.* Modified pullulan nanoparticles for oral delivery of lopinavir: Formulation and pharmacokinetic evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 320–328, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.099>

SABER-SAMANDARI, S.; GAZI, M. Pullulan based porous semi-IPN hydrogel: Synthesis, characterization and its application in the removal of mercury from aqueous solution. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 51, p. 143–151, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2015.01.013>

SAKAI-KATO, K. *et al.* Robust Nanoparticle Morphology and Size Analysis by Atomic Force Microscopy for Standardization. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 68, n. 8, p. 791–796, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.c20-00311>

SANNA, V.; PALA, N.; SECHI, M. Targeted therapy using nanotechnology: focus on cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 467, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S36654>

SATOH, K. *et al.* Nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of anticancer drugs. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 6, p. 139, 2008. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6349\(08\)71707-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6349(08)71707-5)

SCHLAUBITZ, S. *et al.* Pullulan/dextran/nHA Macroporous Composite Beads for Bone Repair in a Femoral Condyle Defect in Rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110251, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0110251>

SHAH, B. *et al.* Application of Box-Behnken design for optimization and development of quetiapine fumarate loaded chitosan nanoparticles for brain delivery via intranasal route. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 206–218, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.076>

SHAH, A. *et al.* Nanocarriers for targeted drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 62, p. 102426, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102426>

SHARIATINIA, Z. Big family of nano- and microscale drug delivery systems ranging from inorganic materials to polymeric and stimuli-responsive carriers as well as drug-conjugates. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 66, p. 102790, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102790>

SHIBATA, M. *et al.* Chemical modification of pullulan by isocyanate compounds. **Polymer**, v. 42, p. 59–64, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00321-9](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00321-9)

SHINGEL, K. I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 447–460, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.034>

SILVA, G. O.; ANDREOLI, G. L. M.; BARRETO, J. O. M. Políticas públicas para o desenvolvimento do Complexo Econômico-Industrial da Saúde no Brasil. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 27, n. 1, p. 9-20, 2017. DOI: <https://doi.org/10.51723/ccs.v27i01.82>

SILVERSTEIN, R. M. *et al.* **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 8th. ed. [s.l.] Wiley, 2015.

SINGH, R. S. *et al.* Pullulan: A novel molecule for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 171, p. 102–121, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.089>

SINGH, R. S. *et al.* Recent insights on applications of pullulan in tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 455-462, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.118>

SINGH, R. S.; KAUR, N.; KENNEDY, J. F. Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 217, p. 46-57, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.050>

SINGH, R. S.; SAINI, G. K.; KENNEDY, J. F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 4, p. 515–531, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.01.003>

SIPOS, B. *et al.* Spray-dried indomethacin-loaded polymeric micelles for the improvement of intestinal drug release and permeability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 174, p. 106200, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106200>

SLADEK, S. *et al.* An Enteric-Coated Polyelectrolyte Nanocomplex Delivers Insulin in Rat Intestinal Instillations When Combined with a Permeation Enhancer. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 3, p. 259, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030259>

STENSGAARD DIGET, J. *et al.* Self-assembled nanoparticles based on cyclodextrin-modified pullulan: Synthesis, and structural characterization using SAXS. **Carbohydrate Polymers**, v. 213, p. 403–410, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.106>

SUGUMARAN, K. R.; PONNUSAMI, V. Review on production, downstream processing and characterization of microbial pullulan. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 573–591, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.022>

SUK, J. S. *et al.* PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 99, p. 28–51, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>

TABASUM, S. *et al.* A review on versatile applications of blends and composites of pullulan with natural and synthetic polymers. **International Journal of Biological**

Macromolecules, v. 120, p. 603–632, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.154>

TACHAPRUTINUN, A. *et al.* Acrylate-Tethering Drug Carrier: Covalently Linking Carrier to Biological Surface and Application in the Treatment of Helicobacter pylori Infection. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 11, p. 4239–4248, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm5012618>

THOMAS, S. *et al.* (ed.). **Handbook of Biopolymer-Based Materials**. Wiley-VCH, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/9783527652457>

TIWARI, S. *et al.* Derivatization approaches and applications of pullulan. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 269, p. 296–308, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.04.014>

TSUNODA, S. M. *et al.* Contribution of the Gut Microbiome to Drug Disposition, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Variability. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 60, n. 8, p. 971–984, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40262-021-01032-y>

TU, Y. *et al.* Redox-Sensitive Stomatocyte Nanomotors: Destruction and Drug Release in the Presence of Glutathione. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 26, p. 7620–7624, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201703276>

VALENTOVIC, M. Indomethacin. Em: **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 1–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61929-4>

VERT, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377–410, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>

WANG, X. *et al.* Synergistic chemo-photothermal cancer therapy of pH-responsive polymeric nanoparticles loaded IR825 and DTX with charge-reversal property. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, p. 112164, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124910>

WANG, Z. *et al.* Tuning the architecture of polymeric conjugate to mediate intracellular delivery of pleiotropic curcumin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 90, p. 53-62, 2015.

WANI, S. M. *et al.* Advances in pullulan production from agro-based wastes by *Aureobasidium pullulans* and its applications. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 74, p. 102846, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102846>

WEI, X. *et al.* Pullulan biosynthesis and its regulation in *Aureobasidium* spp. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, p. 117076, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117076>

WOLF, B. W. Use of pullulan as a slowly digested carbohydrate. European Patent Office, EP1513418B1, 2005.

XIE, J. H. *et al.* Advances on Bioactive Polysaccharides from Medicinal Plants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, p. S60-S84, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1069255>

XU, F. *et al.* Development of tannic acid/chitosan/pullulan composite nanofibers from aqueous solution for potential applications as wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 16–24, 2015b. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.081>

XU, X. *et al.* Cancer nanomedicine: From targeted delivery to combination therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 4, p. 223-232, 2015a. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2015.01.001>

YANG, R. *et al.* Biodegradable polymer curcumin conjugate micelles enhance the loading and delivery of low-potency curcumin. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 12, p. 3512-3525, 2012.

YONEYAMA, M. *et al.* Effects of pullulan intake in humans. **Journal of the Japanese Society of Starch Science**, v. 37, n. 3, p. 123–127, 1990.

ZAHOOR, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 4, p. 298–303, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.07.012>

ZHANG, Q. *et al.* Engineering magnetic-molecular sequential targeting nanoparticles for anti-cancer therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 46, p. 6402-6410, 2013.

ZHANG, G. *et al.* pH-responsive PEG-chitosan/iron oxide hybrid nanoassemblies for low-power-assisted PDT/PTT combination therapy. **Nanomedicine**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2217/nnm-2020-0022>

ZHANG, L.; KOSARAJU, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 7, p. 2956–2966, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.04.033>

APÊNDICE A - Cromatografia em camada fina ou delgada (CCF ou TLC)

A cromatografia em camada fina ou delgada (*Thin layer chromatography*, TLC) é uma técnica comumente empregada para monitorar reações orgânicas, visto que possibilita levantar informações sobre a composição de uma dada amostra em tempo real. Esta técnica baseia-se na premissa de que compostos orgânicos de estruturas distintas possuem diferentes polaridades e afinidades pelo eluente utilizado, sendo, portanto, separados conforme são eluídos ao longo da cromatoplaça, e que também devido à diferença em suas estruturas desenvolvem diferentes colorações de acordo com o método de revelação utilizado - que muitas vezes é baseado em reações químicas entre o revelador empregado e grupos funcionais específicos. Logo permitindo uma rápida e prática diferenciação entre os componentes presentes em uma mistura reacional, bem como sua identificação mediante comparação com os resultados obtidos de um padrão conhecido. Porém uma das limitações dessa técnica é que ela é ideal para análise de moléculas pequenas, uma vez que polímeros são estruturas longas e que não conseguem percorrer a placa em sentido contrário à gravidade. Apesar disso, no presente trabalho, a técnica foi importante, principalmente, para monitorar a formação de subprodutos durante as reações de funcionalização da pululana com fenilsocianato.

APÊNDICE B - Influência da umidade presente em solventes deuterados na análise por RMN

Um estudo da absorção de umidade pelo solvente deuterado (DMSO-d₆) e sua influência nos espectros de RMN ¹H foi conduzido em quatro etapas:

- Etapa 1: Três tubos de RMN diferentes foram preparados, de modo que no Tubo 1 foi adicionado dimetilsulfóxido deuterado de uma ampola recém-aberta (DMSO-d₆ ampola), no Tubo 2, foi adicionado dimetilsulfóxido deuterado de um frasco de 75 mL (DMSO-d₆ frasco) já em uso no laboratório – portanto, com traços de água por já ter sido aberto algumas vezes, e no Tubo 3 foram adicionados MDI e dimetilsulfóxido deuterado do frasco (DMSO-d₆ frasco). Todos os tubos foram analisados por RMN ¹H.
- Etapa 2: Uma quantidade de Pul-g-PEG (PEMPU-1) foi previamente dissolvida em DMSO-d₆ ampola e guardada em frasco vedado com parafilme por 3 semanas. A seguir, 3 gotas dessa solução concentrada foram adicionadas ao Tubo 1 (DMSO-d₆ ampola) e ao Tubo 2 (DMSO-d₆ frasco). Os tubos foram analisados por RMN ¹H, e a fim de avaliar o efeito do tempo de acúmulo de sinal nos espectros, foram realizadas análises dos Tubos 1 e 2 com 32 varreduras e 64 varreduras.
- Etapa 3: Para avaliar o efeito da concentração de amostra nos espectros de RMN, outras 3 gotas da solução de Pul-g-PEG foram adicionadas aos Tubos 1 e 2 (totalizando 6 gotas adicionadas em cada tubo). Os tubos foram reanalisados por RMN ¹H.

Em todas as análises, o sinal do DMSO foi considerado como referência (integral = 1,0). O parâmetro utilizado para este estudo foi a razão entre as intensidades de sinal nos espectros de RMN (a razão entre as áreas dos sinais). A Equação 5 foi utilizada para calcular a razão entre a intensidade do sinal da água e do DMSO no mesmo solvente (rS); a Equação 6 foi usada para calcular a razão entre a área do sinal de água no DMSO-d₆ frasco e no DMSO-d₆ ampola (comercializada como livre de umidade) (rW); a Equação 7 foi usada para calcular a diferença entre razões de áreas dos sinais de água (ΔW_0) para comparar a umidade presente em um dado tubo com a condição mais livre de água possível; a Equação 8 foi usada para calcular a razão entre a área do sinal da água e dos picos

mais intensos na região aromática (rC) para comparar a umidade com composto dissolvido no solvente. Este estudo se justifica, pois, a presença de sinal de água impede a visualização de outros sinais importantes para a caracterização de derivados glicosídicos e causa variações nos deslocamentos químicos em RMN ^1H .

$$r_S = \frac{f_{\text{H}_2\text{O}}}{f_{\text{DMSO}}} \quad (5)$$

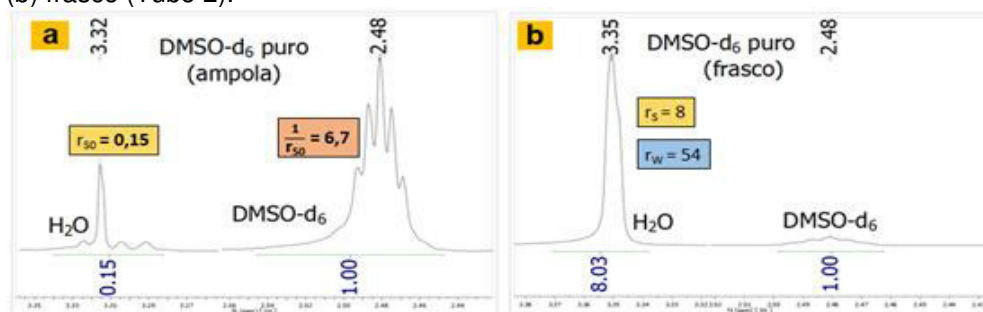
$$r_W = \frac{f_{\text{H}_2\text{O}_{\text{frasco}}}}{f_{\text{H}_2\text{O}_{\text{ampola}}}} \quad (6)$$

$$\Delta_{W0} = r_S - r_{S0} \quad (7)$$

$$r_C = \frac{f_{\text{H}_2\text{O}}}{f_{\text{Aromático}}} \quad (8)$$

Primeiramente, comparando as intensidades de sinal nos dois solventes deuterados puros (rS0 e rS, Figura 97), verificou-se que no DMSO- d_6 ampola (Figura 45a) há 6,7 vezes mais sinal de solvente do que de água, enquanto no DMSO- d_6 frasco (Figura 97b) o sinal de água é 8 vezes mais intenso do que o próprio solvente; logo o solvente DMSO- d_6 frasco tem 54 vezes mais sinal de água do que no DMSO- d_6 ampola. O valor $r_{S0} = 0,15$ foi tomado como o menor valor de intensidade de água possível (ampola recém-aberta).

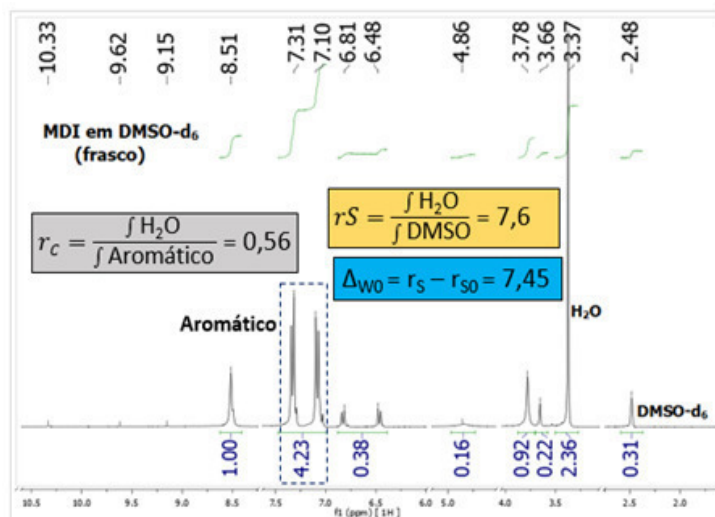
Figura 97 - Comparação entre intensidades de sinal de água no DMSO- d_6 (a) ampola (Tubo 1) e (b) frasco (Tubo 2).



Fonte: Próprio autor.

A seguir, analisou-se o Tubo 3 (MDI em DMSO- d_6 frasco) (Figura 98), e foi possível verificar que o sinal de água era 7,6 vezes mais intenso que o do solvente, e quando comparado com a situação com menor quantidade de umidade possível (rS0) calculou-se 7,45 vezes mais água. A razão entre as áreas dos sinais oriundos de hidrogênios de moléculas de água e de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos ($1/r_C$) foi calculada em 1,78.

Figura 98 - Comparação entre intensidades de sinal de água no Tubo 3 contendo MDI e DMSO-d₆ frasco.



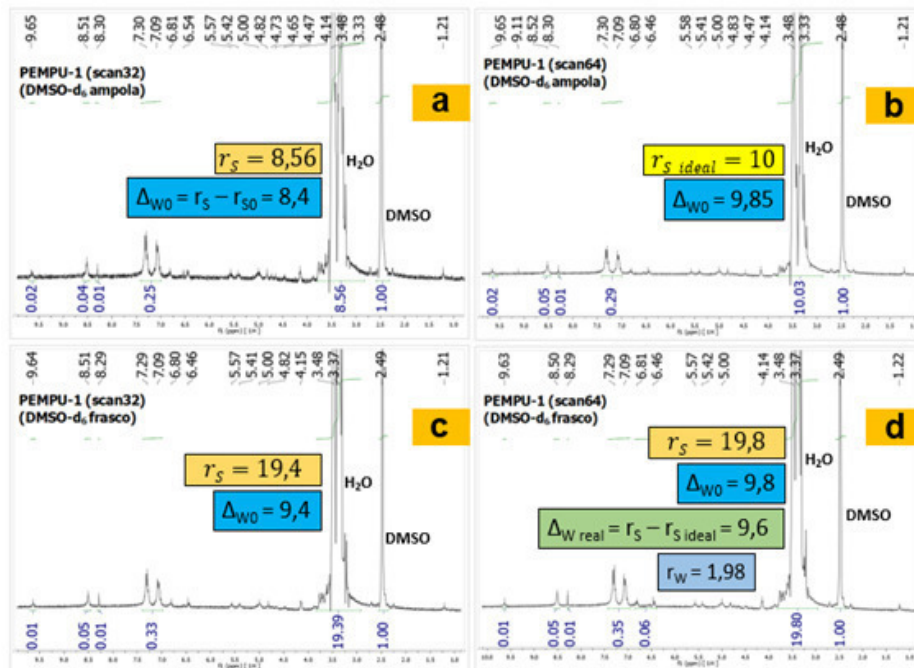
Fonte: Próprio autor.

Na etapa seguinte, foi avaliado o efeito do tempo de acúmulo de sinal, sendo comparados os espectros dos Tubos 1 (amostra Pul-*g*-PEG dissolvida em DMSO-d₆ ampola) e 2 (amostra Pul-*g*-PEG dissolvida em DMSO-d₆ frasco) (Figura 99).

No Tubo 1, após 32 varreduras (Figura 99a), o sinal da água é 8,56 vezes mais intenso que o do solvente e 8,4 vezes mais intenso que o sinal de água no solvente DMSO-d₆ ampola puro (r_{S0} , condição mais anidra possível); quando o espectro foi adquirido com 64 varreduras (Figura 99b), o sinal de água é 10 vezes mais intenso que o do solvente e 9,85 vezes mais intenso do que o sinal da água no DMSO-d₆ ampola puro. Normalmente quanto mais tempo de acúmulo de sinal, melhor é a resolução dos picos e mais preciso é o valor da integral e, portanto, considerou-se a condição com menor umidade e mais tempo de acúmulo de sinal como sendo a ideal. Assim, tomou-se $r_S = 10$ como o valor ideal – significa dizer, em linhas gerais, que o melhor cenário realista possível seria com 10 vezes mais sinal de água que do solvente deuterado.

No Tubo 2, após 32 varreduras (Figura 99c), o sinal de água é 19,4 vezes mais intenso que do solvente e 9,4 vezes mais intenso que o sinal de água no solvente DMSO-d₆ ampola puro (r_{S0} , condição mais anidra possível); quando o espectro foi adquirido com 64 varreduras (Figura 99d), o sinal de água é 19,8 vezes mais intenso que o do solvente e 9,8 vezes mais intenso do que o sinal da água no DMSO-d₆ ampola puro.

Figura 99 - Comparação entre as intensidades do sinal de água no Tubo 1 contendo Pul-g-PEG (PEMPU-1) em DMSO-d₆ ampola após 32 varreduras (a) e 64 varreduras (b), e no Tubo 2 contendo Pul-g-PEG em DMSO-d₆ frasco após 32 varreduras (c) e 64 varreduras (d).

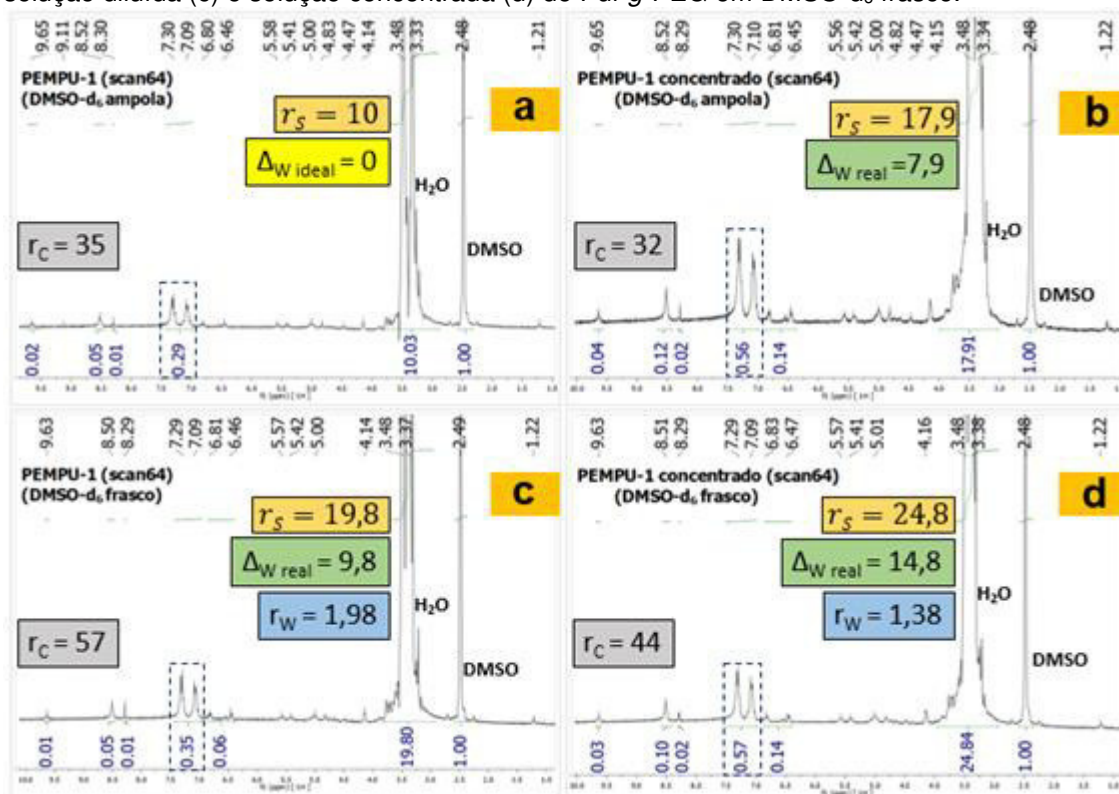


Fonte: Próprio autor.

Comparando com o valor ideal de r_S , o sinal de água é 9,6 vezes mais intenso que o melhor cenário realista possível; comparando apenas sinais de água entre si, tem-se 1,98 vezes mais sinal de água no tubo com DMSO-d₆ frasco que no da ampola.

Finalmente, avaliou-se o efeito da concentração de amostra (Pul-g-PEG) (Figura 100), em análises de RMN ¹H feitas com 64 varreduras. No Tubo 1 (DMSO-d₆ ampola) menos concentrado (Figura 100a), o sinal de água é 10 vezes mais intenso que do solvente. Essa condição – maior tempo de acúmulo de sinal e menor umidade possível ($\Delta W_{real} = r_S - r_{S\ ideal} = 0$), foi considerada ideal. O sinal de água é 35 vezes mais forte que dos picos aromáticos mais intensos. Após dobrar a concentração de Pul-g-PEG (Figura 100b), o sinal de água é 17,9 vezes mais intenso que do solvente (7,9 vezes mais intenso que no chamado “melhor cenário”) e 32 vezes mais intenso que dos picos gerados por hidrogênios ligados a carbonos aromáticos, indicando uma redução na influência da umidade em relação ao composto analisado.

Figura 100 - Comparação entre intensidades de sinal de água no Tubo 1 contendo solução diluída (a) e solução concentrada (b) de Pul-g-PEG (PEMPU-1) em DMSO-d₆ ampola, e no Tubo 2 contendo solução diluída (c) e solução concentrada (d) de Pul-g-PEG em DMSO-d₆ frasco.



Fonte: Próprio autor.

No Tubo 2 (DMSO-d₆ frasco) menos concentrado (Figura 100c), a área do sinal de água é 19,8 vezes maior que a do sinal oriundo do solvente (9,8 vezes maior que o cenário ideal) e 57 vezes maior que a área dos sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos. Comparando apenas as intensidades de sinais de água entre si, a solução preparada com DMSO-d₆ frasco leva a sinal de área 1,98 vezes maior que no DMSO-d₆ ampola. Após dobrar a concentração de Pul-g-PEG no Tubo 2 e reanalisá-lo (Figura 100d), a área do sinal de água passa a ser 24,8 vezes mais intensa que a do solvente, o que corresponde a valores 14,8 vezes maiores que no cenário ideal e 44 vezes maiores que a área dos sinais de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos. Comparando apenas as intensidades de sinais de água entre si, a solução preparada com DMSO-d₆ frasco produz picos 1,38 vezes mais intensos que aquela preparada com DMSO-d₆ ampola.

Pode-se concluir a partir destes resultados que há uma grande diferença no teor de umidade entre os dois tipos de solvente deuterado (DMSO-d₆ ampola e DMSO-d₆ frasco), sendo que o DMSO do frasco possui muito mais umidade em todos os cenários estudados (conforme valores de ΔW e r_w), o que já era esperado

já que o frasco é aberto várias vezes enquanto a ampola é de uso único. A adição de uma amostra previamente solubilizada em DMSO-d₆ ampola (desde que preparada adequadamente e bem vedada) aparentemente não aumenta a umidade dentro dos tubos de RMN, uma vez que a razão entre os sinais de água e dos picos aromáticos (rC) não aumenta, mas sim diminui conforme se adiciona mais amostra.

Como a maior fonte de umidade detectada foi o próprio solvente deuterado, é importante que se estipule uma metodologia padronizada adequada para envio de amostras para análise externa de forma a evitar ao máximo aumentar o teor de água presente. A região onde aparece o pico de água acoberta outros sinais importantes para a caracterização de compostos derivados de polissacarídeos, como de OH e H glicosídicos, sendo preferível enviar a amostra já previamente dissolvida ou até já preparada no tubo de RMN quando possível.

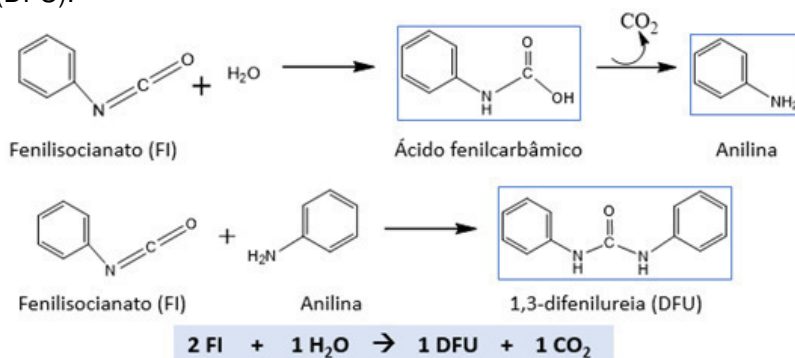
APÊNDICE C - Avaliação de possíveis subprodutos obtidos durante o tratamento das reações com FI e MDI

Considerando os reagentes e solventes utilizados nas etapas de funcionalização da pululana com isocianato, sistemas-controle foram estudados para avaliar a formação de possíveis subprodutos que poderiam estar associados ao produto final, interferindo nas etapas de caracterização. A seguir, os testes realizados estão descritos, considerando reações possíveis entre os componentes das reações Pul-FI, PEG-NCO e PE-1. A solubilidade dos compostos também foi avaliada (Apêndice D).

Reações entre fenilisocianato (FI) e água

Em presença de água, os grupos -NCO do FI podem reagir levando à formação de 1,3-difenilureia (DFU), conforme apresentado na Figura 101.

Figura 101 - Possíveis produtos de hidrólise do fenilisocianato (FI) e formação de 1,3-difenilureia (DFU).

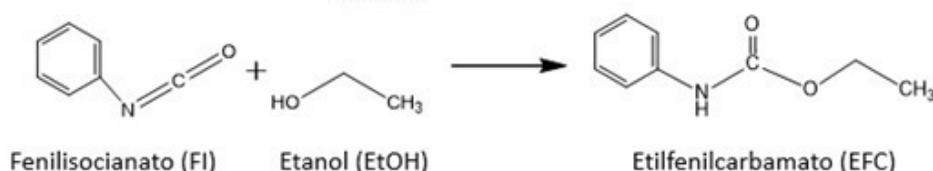


Fonte: Próprio autor.

Para avaliar a extensão desta reação, em um frasco de vidro foram adicionados 5 mL de água destilada e 0,1 mL de fenilisocianato. O frasco foi vedado, agitado e deixado em repouso por 24 h em temperatura ambiente. O composto sólido obtido foi separado, seco em estufa a 65 °C, e caracterizado. Testes de solubilidade da DFU foram realizados com os seguintes solventes à temperatura ambiente: tolueno, água destilada, diclorometano, dimetilsulfóxido, hexano, éter de petróleo, tetrahidrofurano, etanol, acetona, e acetato de etila.

Reações entre fenilisocianato (FI) e etanol

Em presença de álcoois, os grupos -NCO do FI podem reagir levando à formação de etilfenilcarbamato (EFC), conforme apresentado na Figura 102.

Figura 102 - Formação de etilfenilcarbamato (EFC).

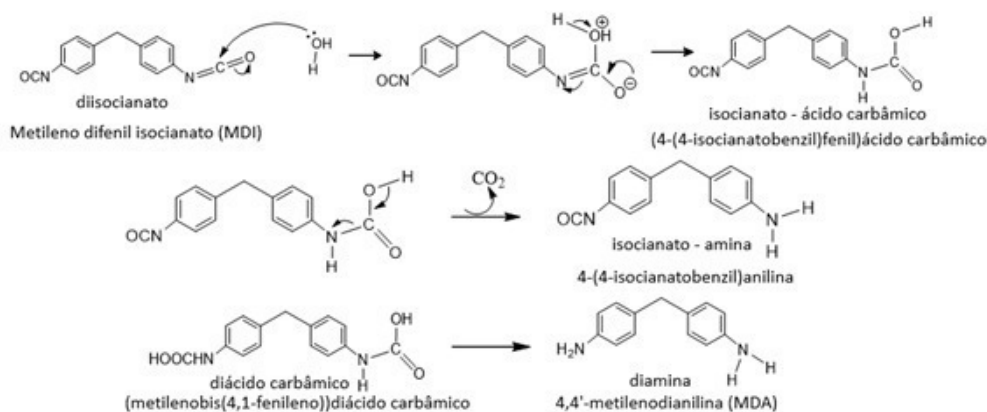
Fonte: Próprio autor.

Para avaliar a extensão desta reação, em um frasco de vidro foram adicionados 5 mL de etanol gelado e 0,1 mL de fenilisocianato. O frasco foi vedado, agitado, e mantido em repouso por alguns dias em geladeira para promover a precipitação do EFC. Em seguida, o frasco permaneceu mais alguns dias destampado sob temperatura ambiente, e foi finalmente seco em estufa a 65 °C.

Reações entre MDI e água

De forma análoga, os testes foram realizados com MDI, isocianato aromático bifuncional, passível de reagir conforme apresentado na Figura 103.

Figura 103 - Possíveis produtos da hidrólise do metileno di(fenilisocianato) (MDI): metileno fenilisocianato-ácido fenilcarbâmico, metileno fenilisocianato-anilina, metileno diácido fenilcarbâmico e metileno dianilina (MDA).



Fonte: Próprio autor.

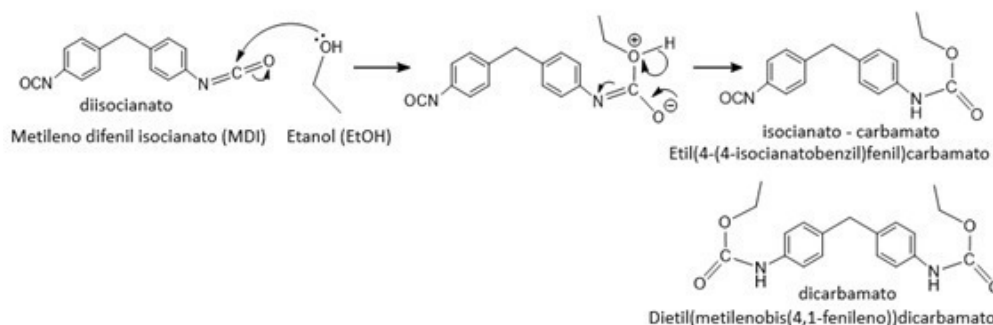
Para avaliar a extensão desta reação, em um frasco de vidro foram adicionados 5 mL de água destilada e 0,1 g de MDI. O frasco foi vedado, agitado, mantido em repouso por 60 h sob temperatura ambiente e, em seguida, por alguns dias em geladeira. A reação foi avaliada apenas visualmente.

Reações entre MDI e etanol

Avaliou-se, aqui, a extensão da ocorrência da reação apresentada na Figura 104, usado neste caso o MDI. Para tanto, em frasco de vidro foram adicionados 5 mL de etanol e 0,1 g de MDI. O frasco foi vedado, agitado e deixado em repouso

por 60h em temperatura ambiente e depois por alguns dias em geladeira. A reação foi avaliada apenas visualmente.

Figura 104 - Produtos da reação do metileno difenil isocianato (MDI) com etanol: metileno fenilisocianato-feniletilcarbamato e metileno di(feniletilcarbamato) (MDEFC).



Fonte: Próprio autor.

Avaliação de possíveis subprodutos obtidos durante o tratamento das reações com isocianato

Reações entre fenilisocianato e água

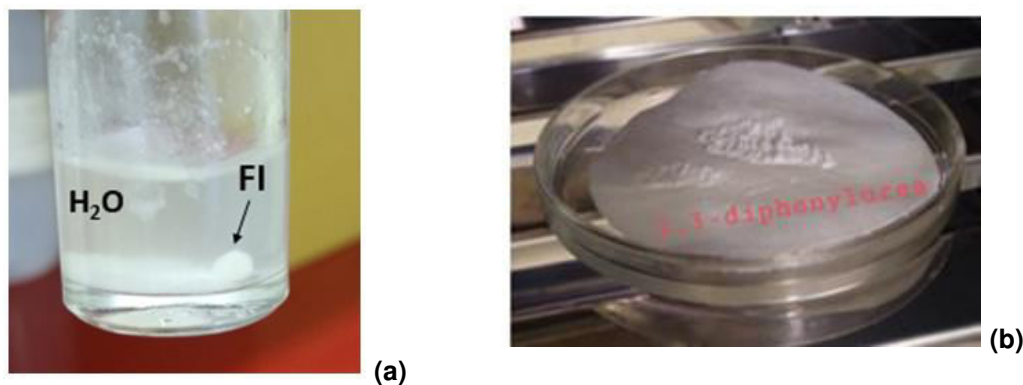
Em presença de água, os grupos -NCO do fenilisocianato (FI) podem reagir levando à formação de difenilureia (DFU) e para avaliar a extensão desta reação, misturou-se apenas água e FI.

Nas primeiras horas de reação, observou-se que as gotas de FI permaneceram imiscíveis na água, e que a reação se processou na interface entre as duas fases (Figura 105a). No dia seguinte, parte desse sólido foi recolhido e seco, resultando em um pó branco (86,7 mg) (Figura 105b) que foi analisado por RMN ^1H (Figura 106). Após teste de solubilidade, verificou-se que o composto obtido foi parcialmente solúvel em clorofórmio, parcialmente solúvel em DMSO, solúvel em acetona e em THF. Parte do composto seco foi reservado para verificar a presença de DFU nas reações de síntese via TLC.

A partir da análise do espectro de RMN ^1H da 1,3-difenilureia (DFU) (Figura 106), observam-se o sinal singleto de -NH da ureia em 8,63 ppm, os sinais de H aromáticos em 7,43, 7,26 e 6,94 ppm, e água em 3,34 ppm.

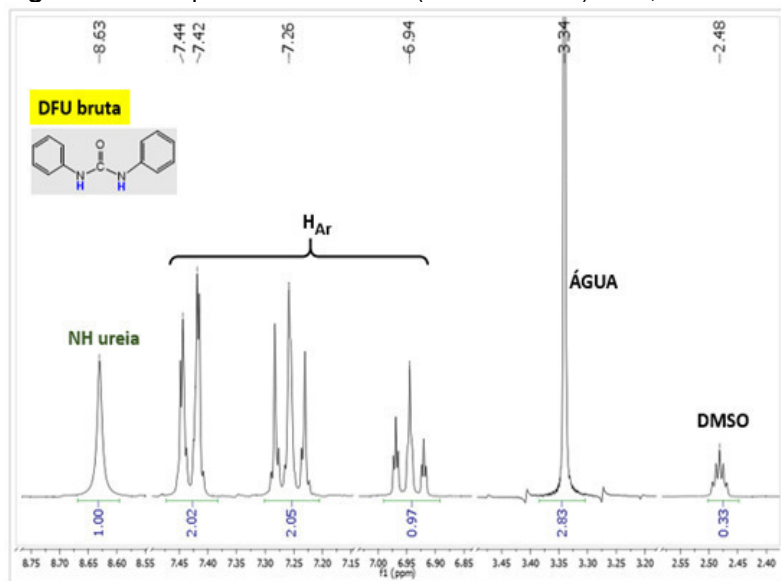
Quanto ao teste de solubilidade, a DFU é solúvel em DMSO, acetona e THF. Os resultados detalhados estão no Apêndice D.

Figura 105 - Reação entre fenilisocianato (FI) e água: gota de FI em água (a), composto DFU isolado e seco (b).



Fonte: Próprio autor.

Figura 106 - Espectro de RMN ^1H (em DMSO-d_6) da 1,3-difenilureia (DFU).



Fonte: Próprio autor.

Reações entre fenilisocianato e etanol

Em presença de álcoois, os grupos $-\text{NCO}$ do fenilisocianato (FI) podem reagir levando à formação de etil fenil carbamato (EFC) (Figura 16). Para avaliar a extensão desta reação, misturou-se apenas etanol e fenilisocianato. Após adição do fenilisocianato no etanol gelado, o aspecto visual observado foi de líquido homogêneo transparente, e nenhuma mudança visual ocorreu mesmo após 24 h em geladeira. Depois de mais alguns dias em geladeira (sem alteração visual), o frasco foi deixado aberto em temperatura ambiente para evaporar parte do solvente e finalmente foi seco em estufa a $65\text{ }^\circ\text{C}$ (mesma temperatura da reação que foi vertida em etanol: Pul-FI 1). Esse composto foi reservado para monitorar as

reações de síntese por TLC. Não foi realizada análise por RMN do etilfenilcarbamato (EFC) puro, porém a simulação espectral usando o software ChemDraw sugere a presença de sinal de NH em 9,15 ppm enquanto experimentalmente um sinal sugestivo em 9,54 ppm foi observado no espectro Pul-FI 1.

Reações entre MDI e água e MDI e etanol

De forma análoga, os testes foram realizados com MDI, isocianato aromático bifuncional, passível de reagir com água e com etanol. Para avaliar a extensão desta reação, misturou-se MDI com água e com etanol, e as reações foram avaliadas visualmente. Após 60 h, a reação entre MDI e água apresentava aspecto de sólido umectado, porém insolúvel; enquanto a reação entre MDI e etanol formou uma suspensão branca. Após o período na geladeira, a reação com água não mudou de aspecto, e a com etanol ficou com aspecto pastoso.

Devido à complexidade envolvida em estudar todos os possíveis subprodutos gerados nas reações paralelas do isocianato, optou-se por utilizar nas etapas seguintes solventes secos por destilação e sistemas com fluxo de nitrogênio gasoso para reduzir ao máximo a interferência de umidade.

APÊNDICE D - Testes de solubilidade

A solubilidade dos reagentes de partida e de alguns subprodutos foi avaliada durante a realização dos experimentos. Estes testes são importantes pois o conhecimento da solubilidade é primordial para o design adequado dos sistemas de reação, bem como para avaliar as possibilidades de purificação dos compostos de interesse.

Alguns compostos foram testados usando solvente em temperatura ambiente e gelado (ca. 4 °C). Os solventes utilizados foram água destilada, tolueno, metanol, clorofórmio, diclorometano, dimetilsulfóxido, hexano, éter de petróleo, tetrahidrofurano, etanol, acetona, acetato de etila.

Os testes foram realizados em frascos vedados com parafilme, aqueles que utilizaram solvente gelado foram mantidos em geladeira. A solubilidade foi avaliada visualmente. Conforme o Quadro 10, compostos considerados solúveis são solubilizados completamente dentro da faixa 1 g para 10-30 mL de solvente, por isso esta foi a faixa de trabalho escolhida para o teste. Para cada teste foi utilizado entre 0,1 e 0,3 g do composto e 3 mL do solvente.

Quadro 10 - Graus de solubilidade.

Grau de solubilidade	Volume de solvente (Dissolve 1g de amostra)
Muito solúvel	< 1mL
Espontaneamente solúvel	1 – 10 mL
Solúvel	10 – 30 mL
Moderadamente solúvel	30 – 100 mL
Levemente solúvel	100 mL – 1 L
Muito levemente solúvel	1 – 10L
Praticamente insolúvel	> 10L

Fonte: adaptado de Merck (2022b).

Os resultados obtidos nos testes de solubilidade do MDI estão descritos no Quadro 11.

Quadro 11 - Teste de solubilidade do MDI em diferentes solventes (a temperatura ambiente e gelados).

Solvente	Solubilidade do MDI e aspecto visual	
	Temperatura ambiente	Gelado
Tolueno	Solúvel, fica levemente turvo após 2 dias	Levemente turvo
Metanol	Bem pouco solúvel (1g em 75mL), solução esbranquiçada com precipitado	-
Clorofórmio	Solúvel (1g em 30mL), após 2 dias levemente turvo	Começa a precipitar
Dimetilsulfóxido	Solúvel, formou material gelatinoso após 2 dias	-
Hexano	Pouco solúvel (1g em 75mL), solução esbranquiçada com precipitado	Igual Hexano (t.a.)
Éter de petróleo	Pouco solúvel (1g em 87,5mL), solução esbranquiçada com precipitado	Insolúvel
Tetrahidrofurano	Solúvel, formou filme branco no vidro após 2 dias, mas solvente continua límpido	-
Etanol	Pouco solúvel (1g em 75mL), solução esbranquiçada com precipitado, intumescido após 2 dias	Pouco solúvel
Acetona	Solúvel, mesmo após 2 dias	Solúvel
Acetato de etila	Solúvel, mesmo após 2 dias	Começa a precipitar

Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos nos testes de solubilidade do PEG 5000 estão descritos no Quadro 12.

Quadro 12 - Teste de solubilidade do mPEG-OH 5000 em diferentes solventes (a temperatura ambiente e gelados).

Solvente	Solubilidade do mPEG-OH e aspecto visual	
	Temperatura ambiente	Gelado
Tolueno	Insolúvel	Insolúvel
Água destilada	Solúvel, porém leva algum tempo e necessita de agitação	Igual água destilada (t.a.)
Clorofórmio	Solúvel	Solúvel
Hexano	Insolúvel	Insolúvel
Éter de petróleo	Insolúvel	Insolúvel
Tetrahidrofurano	Insolúvel, solução levemente turva (+1)	Insolúvel, absorveu solvente e ficou pastoso

(Continua)

(Conclusão)

Quadro 12 - Teste de solubilidade do mPEG-OH 5000 em diferentes solventes (a temperatura ambiente e gelados).

Solvente	Solubilidade do mPEG-OH e aspecto visual	
	Temperatura ambiente	Gelado
Etanol	Insolúvel, solução levemente turva (+2)	Insolúvel
Acetona	Insolúvel, solução levemente turva (+2)	Insolúvel
Acetato de etila	Insolúvel	Insolúvel

Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos nos testes de solubilidade da 1,3-difenilureia (DFU) são apresentados no Quadro 13.

Quadro 13 - Teste de solubilidade da DFU em diferentes solventes (a temperatura ambiente).

Solvente	Solubilidade	Solvente	Solubilidade
Tolueno	Insolúvel	Éter de petróleo	Insolúvel
Água destilada	Insolúvel	Tetrahidrofurano	Solúvel
Diclorometano	Insolúvel	Etanol	Insolúvel
Dimetilsulfóxido	Solúvel	Acetona	Solúvel
Hexano	Insolúvel	Acetato de etila	Insolúvel

Fonte: Próprio autor.