

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

MARIANA SILVA E SILVA DE OLIVEIRA

Formação de vesículas por diferentes técnicas a partir de um copolímero anfipático

Lorena
2019

MARIANA SILVA E SILVA DE OLIVEIRA

Formação de vesículas por diferentes técnicas a partir de um copolímero anfipático

Monografia apresentada à Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Engenheira
Química

Orientador: Prof. Dr. Fábio Herbst Florenzano

Versão original

Lorena
2019

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)

Oliveira, Mariana Silva e Silva de
Formação de vesículas por diferentes técnicas a
partir de um copolímero anfipático / Mariana Silva e
Silva de Oliveira; orientador Fábio Herbst
Florenzano. - Lorena, 2019.
69 p.

Monografia apresentada como requisito parcial
para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia
Química - Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo. 2019

1. Polimerossomo. 2. Polímeros. 3. Raft. 4.
Nanorreatores. 5. Vesículas poliméricas. I. Título.
II. Florenzano, Fábio Herbst, orient.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe Cláudia Silva e Silva e à minha irmã Maria Eduarda Silva e Silva pelo apoio incondicional que me deram quando souberam que meu trabalho de conclusão de curso seria na verdade um começo para a carreira acadêmica. Aos meus avós Enio Rubens Silva e Josette Marlene Silva e Silva que são meus grandes exemplos de professores a vida inteira.

Agradeço sobremaneira ao meu orientador Fábio Herbst Florenzano e à doutoranda Cláudia Salim que foram exímios em me orientar no caminho mais adequado para este projeto, pelo tempo que investiram em mim e por terem sido tão receptivos desde o começo. Eu não poderia ter mestres melhores. Eles me apresentaram o tema de polimerossomos e cada vez mais enxergo o avanço que estes podem trazer para a sociedade.

Agradeço também aos meus amigos, principalmente às minhas amigas da república, pela atenção com que me ouviram falar sobre o presente projeto e pelo interesse na pesquisa que estou desenvolvendo, além de terem sido as melhores companhias durante a minha jornada na USP.

Agradeço a todos os funcionários da EEL que possibilitaram tanto a realização deste projeto quanto a minha graduação na Engenharia Química.

RESUMO

OLIVEIRA, M. S. S. **Formação de vesículas por diferentes técnicas a partir de copolímeros anfipáticos**. Orientador: Prof. Dr. Fábio Herbst Florenzano. 2019. 68 p. Projeto de Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Materiais poliméricos possuem muitas aplicações e são cada vez mais empregados em diferentes setores da indústria. Alguns polímeros são biocompatíveis e, por isso, podem ser estudados como carreadores de fármacos ou para diagnósticos de doenças. Estudos recentes vêm comprovando a possibilidade de empregar os polímeros como materiais interessantes para a área farmacológica por servirem como base para a formação de polimerossomos: vesículas formadas por bicamadas de copolímeros anfifílicos em meio aquoso. Esse sistema, com interior aquoso, pode aprisionar conteúdos e liberá-los sob estímulos como a temperatura, pH, íons e outros. As aplicações dos polimerossomos podem ser diversas, como invólucros de cosméticos, de nutrientes, de drogas terapêuticas, material genético, descontaminação de corpos d'água e inclusive como nanorreatores, quando possuem membranas de permeabilidade seletiva para que substratos desejáveis acessem o conteúdo encapsulado e reajam com ele, dentro da vesícula. Neste trabalho foi estudada a formação de agregados poliméricos vesiculares por diferentes métodos, dentre eles a troca de solventes, Hidratação de Filme e Extrusão para a formação dos polimerossomos o copolímero: (PDMAEMA-co-PHEMA)-*b*-PS previamente sintetizado. Comparou-se as vesículas poliméricas formadas pelas três técnicas. Os materiais foram caracterizados com relação aos diâmetros hidrodinâmicos médio das partículas e, a partir disso, foi escolhido o método de formação e as condições mais adequadas. A técnica de troca de solventes, associada com a técnica de extrusão, apresentou resultados satisfatórios comprovados por microscopia eletrônica de varredura. A técnica de hidratação de filme mostrou grande dispersão do tamanho das partículas. Já a extrusão realizada, causou impacto negativo nas partículas. Observou-se que, para a maioria das técnicas, agregados com grandes diâmetros foram favorecidos durante as formações.

Palavras-chave: Polimerossomo. Polímeros RAFT. Nanorreatores. Vesículas poliméricas.

ABSTRACT

OLIVEIRA, M. S. S. **Vesicle formation by various techniques starting from an amphiphilic copolymer**. Advisor: Prof. Dr. Fábio Herbst Florenzano. 2019. 68 p. Graduation Thesis – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Polymeric materials have a lot of applications and are increasingly used in different industrial sectors. Some polymers are biocompatible and, therefore, can be studied as drugs nanocarriers or diseases diagnostic. Recent reports are proving that polymers can be applied in pharmaceutical treatments, because they can assemble in polymersomes forms: vesicles with a bilayer membrane made of amphiphilic copolymers in aqueous medium. This system, with a hollow and aqueous interior, is able to aprisionate certain contents and release them as soon as they get triggered by temperature, pH, ionic substances, and others. Polymersomes applications can be diversified, like encapsulating cosmetics, nutrients, therapeutical drugs, water corps decontamination and as nanoreactors, the latest when they can be selective permeable by desirable substances and let the reaction goes in its hollow interior. This work intends to study, replicate and report the various techniques to form polymersomes, including mainly solvent switch, film hidratation and extrusion using the copolymer: (PDMAEMA-co-PHEMA)-*b*-PS previously synthesized. In this work the author compare the vesicles made by each technique. The results were characterized by the hydrodynamic medium diameter and polydispersity. Therefore, one technique was chosen to have the best performance and was used in the most appropriate conditions. The solvent switch method, in association with extrusion, showed auspicious results including images from an electronic microscope.

The film hydration technique showed large particle size dispersion. The extrusion had a negative impact upon the particle dispersion extruded. It was observed that, for the mayor methods, large aggregates were formed, signaling the existence of other morphologies rather than vesicles.

Key-words: Polymersome. RAFT Polymers. Nanoreactor. Polymer Vesicles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia das vesículas do Polímero PS ₃₁₀ -b-PAA ₅₂ na presença de diferentes volumes de água.....	20
Figura 2 – A) Expansão volumétrica de um lipídeo com aumento da temperatura (°C); B) Expansão volumétrica de um polimerossomo (obtido por hidratação de filme) com aumento da temperatura (°C).....	22
Figura 3 – Formação do polimerossomo de PMPC-b-PDPA em pH alcalino.....	23
Figura 4 – Eletrodos revestidos por uma fina camada de copolímeros ligados ao gerador de campo elétrico.....	24
Figura 5 – Placas eletrolíticas para eletroformação.	25
Figura 6 – Gotículas de emulsão em contato com filme polimérico formando vesículas. ..	27
Figura 7 – Esquema representativo da formação de vesículas pelo método microfluído. A) Representação lateral; B) Representação frontal mostrando a abertura para saída dos fluidos.	27
Figura 8 – Representação gráfica de uma jateadora de tinta adaptada para Nanoimpressão.	29
Figura 9 - Extrusor de lipossomos	30
Figura 10 – CTA Tiocarbonílico.	33
Figura 11 - Estrutura molecular dos polímeros PDMAEMA, PHEMA e PS.....	36
Figura 12 – Esquema simplificado de um Espetrômetro de Luz.	37
Figura 13 – Esquema gráfico de um Microscópio Eletrônico de Varredura.	38
Figura 14 – Fluxograma do procedimento do método de troca de solventes.	43
Figura 15 – Tubos contendo os sete experimentos de troca de solventes finalizados.	44
Figura 16 – Fluxograma do procedimento do método da hidratação de filme.	44
Figura 17 – Formação de filme polimérico em um béquer de vidro, para técnica de hidratação de filme.	45
Figura 18 – Filme polimérico seco na parede de um béquer.	45
Figura 19 – Fluxograma do procedimento do método de extrusão.	46
Figura 20 – Seringas acopladas a um filtro de membrana nanoporosa.	46
Figura 21 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 273,1 nm e PDI 0,230 para a Amostra 1 (Concentração 20 µg/µL e pH 4).....	51

Figura 22 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 1366 nm e PDI 0,547 para a Amostra 2 (Concentração 200 µg/µL e pH 4).....	51
Figura 23 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 236,5 nm e PDI 0,139 para a Amostra 3 (Concentração 20 µg/µL e pH 8).....	51
Figura 24 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 884,1 nm e PDI 0,258 para a Amostra 4 (Concentração 200 µg/µL e pH 8).....	52
Figura 25 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 802 nm e PDI 0,451 para a Amostra 5 (Concentração 110 µg/µL e pH 6).....	52
Figura 26 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 1487 nm e PDI 0,546 para a Amostra 6 (Concentração 110 µg/µL e pH 6).....	52
Figura 27 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 1485 nm e PDI 0,245 para a Amostra 7 (Concentração 110 µg/µL e pH 6).....	53
Figura 28 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 146,6 nm e PDI 1 para a Amostra 1 (Tempo de agitação de 1 dia e concentração 0,5 µg/µL).....	55
Figura 29 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 252,6 nm e PDI 0,632 para a Amostra 2 (Tempo de agitação de 3 dias e concentração 0,5 µg/µL).	55
Figura 30 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 373,2 nm e PDI 1 para a Amostra 3 (Tempo de agitação de 1 dia e concentração 1,5 µg/µL).....	56
Figura 31 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 462,5 nm e PDI 0,291 para a Amostra 4 (Tempo de agitação de 3 dias e concentração 1,5 µg/µL) para a Amostra 4 (Tempo de agitação de 3 dias e concentração 1,5 µg/µL).....	56

Figura 32 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 271,4 nm e PDI 1 para a Amostra 5 (Tempo de agitação de 2 dias e concentração 1,0 µg/µL).....	56
Figura 33 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 257,4 nm e PDI 0,849 para a Amostra 6 (Tempo de agitação de 2 dias e concentração 1,0 µg/µL).	57
Figura 34 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 269,7 nm e PDI 0,268 para a Amostra 7 (Tempo de agitação de 2 dias e concentração 1,0 µg/µL).	57
Figura 35 – Imagens dos resultados da Troca de Solventes, obtidas por Microscopia Óptica de Contraste de Fase. As setas indicam morfologias de cerca de 100 nm com interior oco, característica que, no microscópio, confere com escura à partícula.	59
Figura 36 – Imagens obtidas por MEV para resultados obtidos por A) Hidratação de filme; B) Troca de solventes; C) Troca de solventes + extrusão; D) Troca de solventes + extrusão + sonicação.....	60
Figura 37 - Gráfico de Pareto para A) Troca de Solventes; B) Hidratação de Filme.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Matriz do planejamento fatorial 2^2 para troca de solventes	41
Tabela 2 – Variáveis independentes codificadas e decodificadas para o planejamento fatorial 2^2 da técnica troca de solventes	41
Tabela 3 – Matriz do planejamento experimental 2^2 para hidratação de filme.	42
Tabela 4 – Variáveis independentes e níveis codificados e decodificados para a técnica de hidratação de filme.....	42
Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial 2^2 para a técnica de extrusão.	42
Tabela 6 – Variáveis independentes codificadas e decodificadas para técnica de extrusão	43
Tabela 7 – Diâmetros hidrodinâmicos obtidos por DLS em equipamento da marca Malvern.	49
Tabela 8 – Diâmetros hidrodinâmicos obtidos por DLS em equipamento da marca Brookhaven.	50
Tabela 9 – Diâmetro final médio calculado para os experimentos de Troca de Solventes .	50
Tabela 10 – Diâmetros hidrodinâmicos obtidos por DLS em equipamento da marca Malvern.	53
Tabela 11 – Diâmetros hidrodinâmicos obtidos por DLS em equipamento da marca Brookhaven.	54
Tabela 12 – Diâmetros hidrodinâmicos obtidos por DLS em equipamento da marca Brookhaven com diluição de 5x.	54
Tabela 13 – Diâmetro final médio calculado para os experimentos de Hidratação de filme	54
Tabela 14 – Diâmetros hidrodinâmicos dos experimentos 1 e 3 utilizando o método de Extrusão	58
Tabela 15 – Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade (obtida por DLS em um Brookhaven) das partículas extrudadas uma vez em membrana nanoporosa de PTFE hidrofílica da marca Analítica.....	58
Tabela 16 – DLS do experimento 6 de hidratação de filme após 4 dias desde o preparo. ..	62
Tabela 17 - Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade para o experimento final.....	64

LISTA DE SIGLAS

ATRP	Atom-Transfer Radical Polymerization
CTA	Agente de transferência de cadeia
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
LCST	Temperatura crítica inferior de solubilização
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
PAA	Poli (ácido acrílico)
PBD	Poli (butadieno)
PDI	Polidispersidade
PDMAEMA	Poli (metacrilato de 2-(dimetilamino etila)
PDPA	Poli (difelinamina)
PEG	Poli (etilenoglicol)
PEO	Poli (etilenóxido)
PHEMA	Poli (2-metacrilato de hidroxietil)
PIC	Complexo Poliiônico
PISA	Automontagem induzida por polimerização
PMPC	Poli [2-(metacriloiloxi)etil fosforilcolina]
PPS	Poli (sulfeto de propileno)
PS	Poliestireno
RAFT	Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer
RDRP	Polimerização por desativação reversível de radicais
T _g	Temperatura de transição vítrea
THF	Tetrahidrofurano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Contextualização	14
1.2 Objetivo Geral	15
1.3 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Vesículas poliméricas.....	16
2.2 Técnicas de formação de vesículas	18
2.2.1 Método da troca de solventes	19
2.2.2 Métodos livres de solvente orgânico	21
2.2.3 Método da automontagem induzida por polimerização (PISA)	25
2.2.4 Método da automontagem por indução centrífuga	26
2.2.5 Método microfluído	27
2.2.6 Método na nanoimpressão	28
2.2.7 Método de extrusão	29
2.3 Aplicações de vesículas poliméricas/polimerossomos.....	30
2.4 Técnicas de polimerização	32
2.4.1 Características principais dos blocos do copolímero.....	35
2.5 Caracterização das vesículas	36
2.5.1 Espalhamento de Luz Dinâmico	36
2.5.2 Microscopia	37
2.6 Planejamento de Experimentos	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Materiais.....	40
3.2 Procedimentos	40
3.2.1 Planejamento dos Experimentos por DOE	40
3.2.2 Método de troca de solventes	43
3.2.3 Método da hidratação de filme	44
3.2.4 Método de extrusão	45
3.2.5 Caracterização das vesículas	47

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Caracterização por DLS	49
4.1.1 Caracterização por DLS após método Troca de Solventes.....	49
4.1.2 Caracterização por DLS após método Hidratação de filme	53
4.1.3 Caracterização por DLS após método de Extrusão	57
4.2 Microscopias	58
4.3 Influência das variáveis.....	60
4.4 Escolha do experimento final.....	62
5 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

A contribuição dos conhecimentos químicos na área da saúde é algo muito relevante. Um dos temas mais atuais que vem acrescentando melhorias às soluções já existentes são os nanomateriais como transportadores de fármacos. Há algumas décadas, os lipossomos trouxeram certa revolução para a farmacocinética quando foram usados como carreadores de fármacos, mostrando uma alternativa bastante superior à dispersão dos compostos ativos livres em soluções. Isso porque possuem uma bicamada lipídica extremamente similar a das membranas celulares e podem isolar a droga de macrófagos e outras organelas que consomem o composto antes que este chegue ao local desejado, além de reduzirem a toxicidade que o fármaco teria em outros tecidos. A versatilidade do lipossomo em encapsular compostos hidrofílicos e hidrofóbicos é muito relevante para o leque de aplicações que pode ter. Ao longo dos anos os lipossomos foram estudados e aplicados em tratamentos que se utilizam das vias nasais e pulmonares, recobrando implantes e até mesmo em tratamento contra células cancerígenas (LE MEINS; SANDRE; LECOMMANDOUX, 2011; MOZAFARI, 2007).

Recentemente, um material chamado polimerossomo, análogo em estrutura ao lipossomo, vem sendo desenvolvido. O que diverge o polimerossomo do lipossomo é que a unidade básica que compõe a bicamada da vesícula é um copolímero com blocos polares e blocos apolares que se autoagregam quando solubilizados. Os copolímeros anfifílicos também podem se agregar em outras morfologias, como por exemplo micelas e filamentos. Um dos atrativos da vesícula é encapsular compostos hidrofóbicos na porção central da bicamada e compostos hidrofílicos no interior da vesícula. Do ponto de vista farmacológico, se torna interessante por poder conter proteínas na membrana em contato com o meio externo, além dos fármacos isolados dentro da vesícula (FETSCH et al., 2016; RIEGER, 2015).

Além de aplicações como carreadores de medicamentos, os polimerossomos também podem ser usados como nanorreatores, pois podem permitir a entrada seletiva de substâncias de interesse que irão reagir com o composto encapsulado. Protegendo a reação das variações do meio externo, pode-se contribuir para sua eficiência, pois elimina a influência de outras substâncias ou condições externas. Existem ainda pesquisas desenvolvidas com polímeros que possam mudar de conformação de acordo com mudanças no meio de dissolução, sejam elas de temperatura, pH e/ou presença de íons, apresentando assim um comportamento responsivo e inteligente (ZHU et al., 2017).

A síntese de copolímeros que irão compor polimerossomos, foi em muito facilitada por métodos sintéticos como a RAFT (do inglês, *Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*). Além de admitir uma ampla gama de monômeros, a técnica RAFT permite um crescimento mais homogêneo das cadeias poliméricas formadas, com distribuições mais estreitas de massa molar, além de aprimorar a síntese de copolímeros em blocos (FLORENZANO, 2016).

Muitos métodos estão sendo desenvolvidos para a formação das vesículas poliméricas e alguns deles serão percorridos com mais profundidade neste estudo. É importante salientar que todos os métodos utilizam-se da interação dos grupos hidrofílicos (que compõe a superfície externa do polimerossomo) e hidrofóbicos com os solventes em que se solubilizam (tanto água quanto solventes orgânicos), contando também com forças externas (agitação, ondas eletromagnéticas, entre outras), e isso muitas vezes resulta em uma indução do auto arranjo. Além disso, pode-se levar em consideração a temperatura em que será realizado o método, devido às propriedades térmicas das cadeias poliméricas (ZHU et al., 2017).

Para contribuir com a crescente investigação acerca deste pertinente tema, viu-se a necessidade de comparar os resultados obtidos por algumas técnicas de formação de vesículas escolhidas de acordo com a disponibilidade e acesso aos equipamentos necessários. Com isso, os conhecimentos sobre polímeros e análises experimentais adquiridos ao longo da graduação em Engenharia Química, associados a diversas publicações e resultados angariados por cientistas ao longo das últimas duas décadas, poderão dar continuidade ao investimento intelectual e financeiro já aplicado até aqui com o objetivo de colaborar com avanços na área da saúde e da tecnologia química.

1.1 Contextualização

Muitas inovações partem do universo da Engenharia Química, o universo que busca nobres soluções que dependem de conhecimento químico e matemático profundos para sanar o core do problema. Com o desenvolvimento da sociedade, novos problemas surgem sistematicamente, exigindo dos engenheiros, além de constante atenção às novidades do mundo, criatividade e ampla consciência da sua atividade profissional. À exemplo de algumas dessas questões, podemos citar: inovações na área da saúde, mitigações para impactos ambientais em regiões muito urbanizadas, novidades para áreas rurais se tornarem mais produtivas e mais preocupadas com o equilíbrio de toda a biota, descoberta de

alternativas para materiais que usam matérias-primas escassas, entre outras. Percebe-se que a Engenharia Química é claramente uma ferramenta para o desenvolvimento social, possibilitando ao ser humano viver bem em uma sociedade moderna.

Com o objetivo de ampliar as aplicações e obter avanços tecnológicos e na saúde, pesquisadores vêm utilizando sistemas análogos aos lipossomos, os polimerossomos. Por possuírem membranas com menos interações fisiológicas, estes apresentam maior resistência aos compostos presentes no organismo. Também há a possibilidade de sintetizar membranas com permeabilidade seletiva, permitindo a entrada somente de substâncias desejáveis para dentro da vesícula; podendo adquirir uma resistência cerca de dez vezes maior do que de lipossomos. Os polimerossomos também são mais estáveis termicamente e, no geral, mais resistentes (LEE et al., 2001).

1.2 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é estudar e produzir vesículas poliméricas a partir de copolímeros anfifílicos por diferentes técnicas, comparando as características dos polimerossomos formados.

1.3 Objetivos específicos

- Gerar vesículas a partir de um copolímero anfipático pré sintetizado, usando diferentes metodologias;
- Estudar a influência da metodologia de formação de vesículas no tamanho do polimerossomo obtido;
- Caracterizar as vesículas formadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico;
- Comparar os resultados obtidos com cada uma das técnicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vesículas poliméricas

As vesículas poliméricas, também conhecidas como polimerossomos, são agregados de copolímeros anfipáticos, que atualmente têm recebido muito destaque devido às inúmeras aplicações que podem ter na área farmacêutica (SHUM; KIM; WEITZ, 2008), de saúde (CHEN et al., 2015) e tecnológica (NAPOLI et al., 2004a, 2004b). As vesículas poliméricas também estão sendo desenvolvidas para apresentarem comportamento inteligente, tal como a liberação em condições específicas pré-determinadas de temperatura, pH ou disponibilidade de íons. A liberação do seu conteúdo e a especificidade dessa atividade têm grande aplicação em diversos processos, a exemplo da liberação de fármacos encapsulados nessas vesículas, ou outros conteúdos como catalisadores, enzimas e material genético (BLANAZS; ARMES; RYAN, 2009).

Os copolímeros dos quais as vesículas são formadas, são, geralmente, sintetizados via Polimerização por Desativação Reversível de Radicais (RDRP). A já citada RAFT é uma variante de RDRP e contempla a utilização de um agente de transferência de cadeia. Este agente faz a função de se ligar reversível e sistematicamente aos monômeros (previamente iniciados) presentes na solução, ou seja, se liga e se separa das cadeias facilitando o crescimento destas, pausando e retomando a polimerização. Dessa forma, os blocos poliméricos vão sendo formados de forma mais controlada e previsível, formando copolímeros de elevados pesos moleculares e em tempo hábil (MATYJASZEWSKI; DAVIS, 2003).

Para que os copolímeros sejam passíveis de serem transformados em vesículas, há que se atentar à razão volumétrica final entre os blocos hidrofóbicos e hidrofílicos. Quando corretamente ajustada, a razão entre os blocos pode fornecer flexibilidade para a cadeia e promover a espessura adequada para a membrana (KITA-TOKARCZYK et al., 2005). Outros fatores importantes para formar preferencialmente vesículas (ao invés de outros possíveis agregados, como micelas esféricas e cilíndricas) são as interações intra e intermoleculares, além da temperatura em que é feita a síntese (OLTRA; NAIR; DISCHER, 2014).

Uma forma de prever ou modelar qual conformação será privilegiada a partir de um copolímero é usando a Equação (1) para determinar o parâmetro de empacotamento (p) do polímero:

$$p = \frac{v}{a_o * l_c} \quad (1)$$

Em que v é o volume das cadeias de hidrocarbonetos, a_o é a área ótima do grupo hidrofílico e l_c é o comprimento crítico do grupo hidrofílico. Para p menor que $1/3$, a preferência é de formar micelas esféricas; Para valores de p entre $1/3$ e $1/2$, observam-se prioritariamente micelas cilíndricas; Para p entre $1/2$ e 1 , vê-se a conformação de vesículas ser priorizada; Para p muito próximo a 1 , bicamadas planas; Para p maior que 1 , estruturas inversas (SOO; EISENBERG, 2004).

Além do tamanho das vesículas, outras diversas características também podem ser modeladas visando os objetivos da aplicação em pauta. A rigidez da membrana de um polimerossomo, por exemplo, será diretamente proporcional ao grau de polimerização do grupo hidrofóbico, ou seja, quanto maior a massa molar desse bloco, maior sua rigidez (k_c , rigidez à flexão); isso porque a massa molar influencia também diretamente na espessura que terá a membrana do polimerossomo. Outra correlação muito interessante já relatada é da influência da T_g (Temperatura de Transição Vítrea) do bloco hidrofóbico e da sua polaridade relativa na permeabilidade da membrana. As possíveis interações do meio externo com a membrana da vesícula podem ser favorecidas através do controle da densidade de empacotamento e do grau de polimerização do bloco hidrofílico. Quanto menos densas e empacotadas, mais fáceis de serem permeadas (BLANAZS; ARMES; RYAN, 2009; NAPOLI et al., 2004a). Essas possíveis modelagens fazem com que os polimerossomos sejam cada vez mais atrativos e convenientes para as aplicações de interesse, conquistando espaço para aprimorar a performance das reações ou inovar na forma de solucionar os problemas atuais.

Uma combinação muito interessante, elaborada por Napoli et al. (2004a), foi a formação de vesículas a partir do copolímero tipo ABA, composto do grupo hidrofóbico PPS (poli (sulfeto de propileno)) e do grupo hidrofílico PEG (poli (etileno glicol)). Esse copolímero gerou uma vesícula com comportamento inteligente perante agentes oxidantes presentes no meio em que se encontra. O grupo sulfeto presente no bloco hidrofóbico, quando em contato com agentes oxidantes, se oxida a sulfóxido e, posteriormente, a sulfona, aumentando

gradualmente sua polaridade. É por isso que a vesícula de PEG-PPS-PEG se degradará quando inserida nos fluidos extracelulares, ricos em oxigênio, podendo agir como nanocarreadoras de fármacos, como biossensores ou biodetectoras. Essa vesícula também se mostrou extremamente estável, devido à altíssima hidrofobicidade do grupo PPS, enquanto que o bloco de PEG confere à vesícula resistência à adsorção de proteínas e baixa toxicidade. O método usado para a formação dessas vesículas foi o de hidratação de filme, um método livre de solventes, seguido de extrusão através de membranas nanoporosas (NAPOLI et al., 2004a).

2.2 Técnicas de formação de vesículas

Muitas técnicas para formação de vesículas utilizando polímeros anfipáticos em bloco foram executadas ao longo das últimas duas décadas. Nesse trabalho serão apresentados os seguintes métodos, alguns estudados por Zhu et al. (2017):

- Troca de solventes;
- Métodos livres de solventes;
- Automontagem induzida por polimerização (PISA);
- Automontagem por indução centrífuga;
- Microfluídica;
- Nanoimpressão;
- Extrusão

Dentro desses seis métodos citados, os métodos livres de solventes possuem quatro técnicas possíveis, totalizando um estudo de dez técnicas para compor o presente trabalho. No estudo de Zhu et al. (2017), encontra-se uma conclusão de que o mecanismo para formação das vesículas não é simples o suficiente para ser resumido, o que traz ao leitor a ciência de que é necessário analisar exaustivamente o resultado de experimentos que alteram variáveis independentes e associá-los a imagens através de microscópios eletrônicos, para confirmar a presença de esferas ocas com membranas de bicamada. Ainda assim, softwares específicos já foram desenvolvidos e estão sendo usados como ferramenta para corroborar com o entendimento desses mecanismos.

As técnicas de troca de solventes, hidratação de filme e extrusão, além de estudadas, foram reproduzidas e relatadas neste trabalho. Os experimentos e seus resultados estão descritos nos itens 3 e 4.

Além dos métodos para formação de vesículas, também serão aqui abordados os métodos para comprovação da morfologia e tamanho das vesículas, a fim de caracterizar o material formado e confirmar que a morfologia desejada foi gerada. Conhecendo a fundo os métodos de análise, pode-se formar uma opinião robusta e embasada para a comparação dos resultados de cada técnica que gera vesículas. Além disso, os métodos que visam formar vesículas durante a polimerização (método de PICsomas e PISA) não serão matéria de análise, visto que os copolímeros já estarão prontos previamente à realização dos experimentos.

2.2.1 Método da troca de solventes

Este é um método simples, que se baseia na interação dos blocos do copolímero (bloco hidrofílico e bloco hidrofóbico) primeiramente com um solvente orgânico e polar, adequado para solubilizar os dois blocos, tal como tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), clorofórmio, entre outros, e posteriormente com a água, que faz o papel de precipitador do bloco hidrofóbico (ZHU et al., 2017). A conformação de vesícula se dá quando a solução orgânica evapora e o copolímero interage com a solução aquosa. A quantidade de água adicionada ao sistema irá impactar diretamente no tamanho das vesículas que serão formadas (SOO; EISENBERG, 2004).

Cornelissen et al. (1998), Jenekhe e Chen (1998), Schenning et al. (1998), entre outros, utilizaram-se dessa técnica para formar vesículas a partir de copolímeros anfipáticos. Cada um destes pesquisadores partiu de um copolímero diferente, obtendo tamanhos de vesículas também diferentes, trazendo grande contribuição para possíveis correlações entre a natureza dos copolímeros e as morfologias obtidas nas vesículas. Delinear esta correlação é extremamente desejável para os estudiosos da área, visto que quanto mais previsível, mais fácil a escolha do copolímero e da técnica adequados à aplicação em pauta.

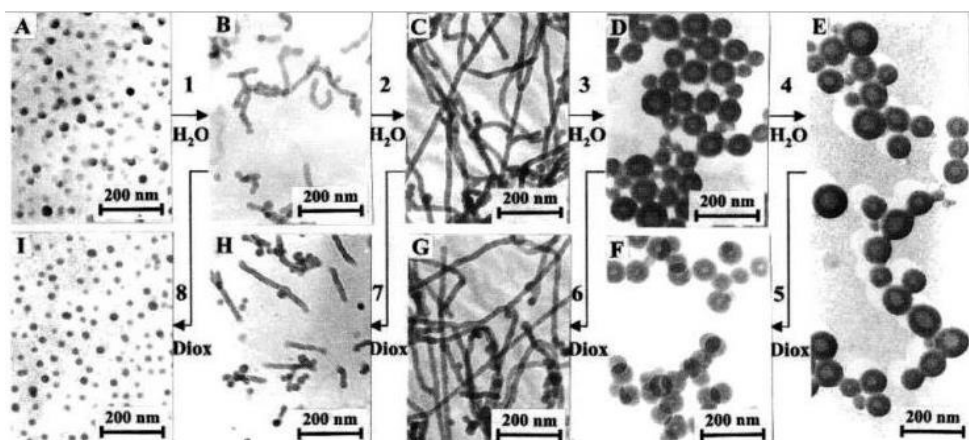
Reunindo os resultados obtidos pelos citados pesquisadores e outros, Shen e Eisenberg (2002) montaram um diagrama de fases que relaciona o volume de água na mistura com as morfologias encontradas utilizando a técnica da troca de solventes, indicando que quanto mais água no sistema, mais vesículas são encontradas. Nesse mesmo trabalho é demonstrado que as morfologias resultantes do auto agregação dos copolímeros vão de esferas a hastes e pôr fim a vesículas, conforme aumenta-se, gradualmente, a

proporção de água no sistema. Inclusive, é demonstrado por estes autores que as morfologias obtidas encontram-se, possivelmente, em equilíbrio termodinâmico, visto que pode-se obter mais morfologias puras retirando ou adicionando água de um sistema com mistura de conformações, a exemplo: pode-se obter mais vesículas quando se adiciona mais água a um sistema onde tem-se uma mistura de vesículas e hastes.

A detecção dessas morfologias, no trabalho de Shen e Eisenberg (2002), foi adquirida através de imagens obtidas pela análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Essas imagens foram registradas ao longo do experimento em que se adicionou água ou 1,4-dioxano à mistura obtida após realizada a técnica de troca de solventes no copolímero fracionado PS₃₁₀-b-PAA₅₂, como pode-se confirmar na Figura 1.

A Figura 1 mostra a transição de morfologias do polímero PS₃₁₀-b-PAA₅₂ na concentração inicial de 1,00% m/m, detectadas por MET. O índice (A) mostra a imagem da morfologia esférica quando em solução de 9,1% m/m de água; Já o índice (B) mostra pequenas hastes poliméricas à 11,5% m/m de água; (C) hastes maiores à 14,0% m/m de água; (D) vesículas à 28,0% m/m de água; (E) vesículas maiores à 40 % m/m de água; (F) vesículas menores à 29% m/m de água depois de adicionar dioxano na mistura E; (G) morfologia de hastes em grandes tamanhos à 14% m/m de água após constante adição de dioxano na amostra F; (H) hastes menores à 11,8% m/m de água obtida com adição de dioxano na amostra G; (I) esferas à 9,5% m/m de água com adição final de dioxano na amostra G.

Figura 1 – Morfologia das vesículas do Polímero PS₃₁₀-b-PAA₅₂ na presença de diferentes volumes de água.



Fonte: Shen e Eisenberg (2002).

2.2.2 Métodos livres de solvente orgânico

Os métodos livres de solventes são muito interessantes do ponto de vista da aplicação das vesículas formadas. Isso porquê muitas vezes os solventes orgânicos podem ser entendidos como contaminantes, por exemplo no organismo dos seres vivos. Ainda que possam ser removidos posteriormente à formação das vesículas, um método livre de solventes orgânicos poupa recursos e também tempo de preparo, ganhando vantagem como técnica superior, visando a peculiaridade da aplicação (ZHU et al., 2017).

O processo livre de solvente pode ser realizado por inchaço do filme ou da massa polimérica, por automontagens induzidas tanto no momento da polimerização quanto posteriormente por força centrífuga, pelo método de eletroformação e outros, à exemplo: por sonicação (procedimento que utiliza de ondas sonoras) ou também por extrusão, gerando em todos os casos vesículas gigantes e monodispersas. Muitos autores produziram resultados e discussões acerca desses métodos, analisando não somente suas eficácias nas produções das vesículas com cada método, mas também verificando as propriedades mecânicas e químicas das vesículas formadas (LEE et al., 2001).

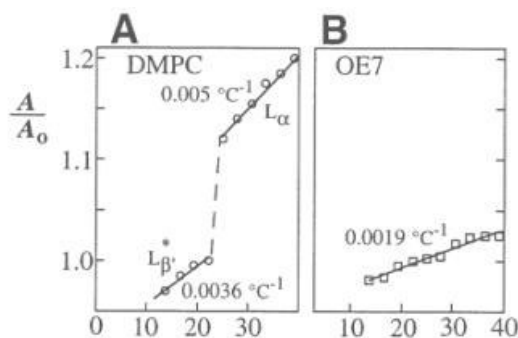
2.2.2.1 Método da hidratação de filme

O método da hidratação de filme consiste na formação de um filme polimérico e posterior hidratação do mesmo. A hidratação é usualmente feita com uma solução aquosa de sacarose, mas também pode ser feita com água destilada, deionizada ou com soluções tamponadas. O filme polimérico é formado distribuindo-se uniformemente o copolímero solubilizado em solvente orgânico nas paredes de um frasco de vidro. Depois, deixa-se o frasco sob condições favoráveis à evaporação do solvente, por tempo suficiente até que todo o solvente deixe o filme. Em seguida, já pode ser adicionada a solução aquosa sob agitação, induzindo, assim, a formação das vesículas, não na parede do frasco, mas sim dentro da solução (LEE et al., 2001).

No trabalho realizado por Lee et al. (2001), foram obtidas vesículas a partir dos seguintes polímeros: PEO-PEE (polietilenóxido-polietileno) e PEO-PBD (polietilenóxido-polibutadieno). Essas vesículas foram capazes de encapsular e manter encapsulada a proteína mioglobina e também hemoglobina. Neste experimento também resistiram à solução de plasma sanguíneo e aos leucócitos e confirmaram uma maior estabilidade térmica dos

polimerossomos se comparadas a lipossomos, vide Figura 2. Nesta figura, pode-se perceber que o polimerossomo possui uma expansão volumétrica linear, que não possui uma temperatura crítica em que a vesícula se expande de maneira anormal.

Figura 2 – A) Expansão volumétrica de um lipídeo com aumento da temperatura (°C); B) Expansão volumétrica de um polimerossomo (obtido por hidratação de filme) com aumento da temperatura (°C).



Fonte: Lee et al. (2001).

2.2.2.2 Método de ajuste do pH em água pura

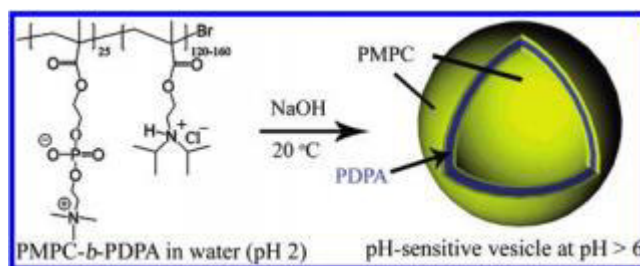
Para a formação de vesículas pelo método de ajuste de pH, necessita-se de copolímeros que sejam responsivos a essa variável. A suscetibilidade à protonação ou desprotonação de algum dos blocos que compõe a membrana das vesículas impacta em sua solubilidade, ocasionando o rompimento da vesícula quando protonados (DU et al., 2005).

Um exemplo disso é o trabalho realizado por Du et al. (2005). Eles formaram polimerossomos a partir do copolímero poli [2-(metacrilóxi) etilfosforilcolina]-b-poli [2-(diisopropilamina) metacrilato de etila], PMPC-b-PDPA, que apresenta grupos aminas terciários no bloco PDPA. Este grupo amina, em meio aquoso cujo pH esteja abaixo de 6,0, se torna protonado (pK_a de aproximadamente 6,3) e, por isso, mostra comportamento hidrofílico. Entretanto, se solubilizado em pH igual ou acima de 6, desprotona-se e passa a ser hidrofóbico.

Utilizando-se dessa propriedade que alguns polímeros têm de serem pH responsivos, a técnica de preparação das vesículas pede que primeiro solubilize-se o copolímero em uma solução ácida, possivelmente com ácido clorídrico (HCl), e lentamente a alcalinize com hidróxido de sódio (NaOH), até que o pH atinja valor próximo de 7,0, desprotonando os grupos aminas do bloco PDPA, mudando sua polaridade e, consequentemente, ocasionando a formação dos polimerossomos (DU et al., 2005).

O trabalho de Du et al. (2005), também relata a influência do tamanho dos blocos hidrofílicos e hidrofóbicos em associação com o pH da solução para que seja possível a formação das vesículas. Uma representação da formação dessa vesícula pode ser observada na Figura 3.

Figura 3 – Formação do polimerossomo de PMPC-b-PDPA em pH alcalino.



Fonte: Du et al. (2005).

Outro exemplo de polimerossomo elaborado por essa técnica está no trabalho de Chen et al. (2015). Partindo do copolímero tribloco poli (óxido de etileno)-b-poli [2-(diisopropilamina)metacrilato de etila]-b-poli (ácido acrílico), PEO₄₃-b-PDPA₇₆-b-PAA₁₇, foram formadas as vesículas poliméricas simplesmente ajustando o pH da solução aquosa em que o copolímero estava com soluções aquosas de NaOH, partindo do pH inicial de 1,75 até atingir o valor de 7,0.

2.2.2.3 Método de PICsomos

A palavra PIC vem da abreviação de *Polyion Complex*, em português Complexo Poli-iônico. Portanto, o PICsomo é uma vesícula feita de copolímeros que apresentam regiões de cargas positivas e negativas não adjacentes. A proposta deste método é formar vesículas poliméricas a partir de blocos de copolímeros com cargas opostas, apenas solubilizando-os em meio aquoso. A vantagem desta técnica é que descarta a necessidade de se ter um copolímero anfipático (com membrana recheada por blocos hidrofóbicos), aumentando a permeabilidade da membrana à solutos hidrofílicos. Além disso, é uma técnica com condições menos agressivas, permitindo maior gama de compostos que podem ser encapsulados (KOIDE et al., 2006).

2.2.2.4 Método da eletroformação

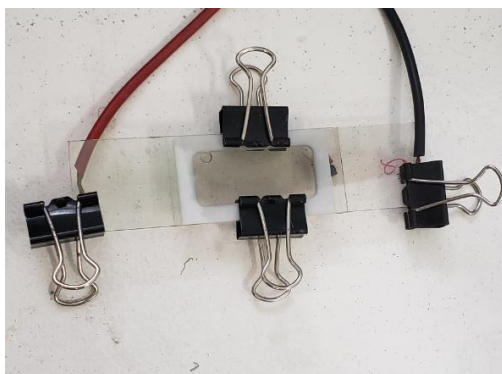
A formação de vesículas por eletroformação – método criado por Menger e Angelova (1998) – consiste em revestir a superfície de dois eletrodos (de Platina, por exemplo) com os copolímeros de interesse, formando sobre eles uma membrana lamelar polimérica. Isto pode ser possível quando se espalha uma fina camada de solução de copolímeros solubilizados em solvente orgânico e, logo após, se evapora todo o solvente, depositando o copolímero sobre a superfície do eletrodo. Feito o revestimento, submergem-se as placas eletrolíticas em um recipiente com água destilada (de maneira que fiquem bem próximas), conectando os eletrodos à um gerador de campo elétrico com corrente alternada. Fotos das placas eletrolíticas em ação foram obtidas pela autora ao participar do experimento em laboratório (Figura 4 e Figura 5). O que acontece no início do funcionamento do gerador é o aparecimento de vibrações ocasionadas pelo movimento eletrostático da água sob a influência do campo elétrico. Essas vibrações tem sentido perpendicular à superfície do eletrodo e faz com que o copolímero que o reveste comece a se descolar de sua parede (BATTAGLIA; RYAN, 2006; DISCHER et al., 1999; MENDER; ANGELOVA, 1998).

Figura 4 – Eletrodos revestidos por uma fina camada de copolímeros ligados ao gerador de campo elétrico.



Fonte: Própria autora.

Figura 5 – Placas eletrolíticas para eletroformação.



Fonte: Própria autora.

Além disso, o campo elétrico também tem influência sobre um outro fator muito importante para a dinâmica desta técnica: as interações de difusão da água na membrana anfipática e difusão do copolímero na água. Com esta técnica, os coeficientes de difusão de ambas as facetas se tornam mais estáveis, mostrando um gradiente de concentração estável. Isso faz com que as vesículas também se tornem mais estáveis, chegando a resistirem por vários dias ou até semanas e sejam formadas logo nos primeiros momentos, sem muita espera (DISCHER et al., 1999).

Em muitos relatos, este método possibilitou a formação de vesículas gigantes (DISCHER et al., 1999; MENDER; ANGELOVA, 1998). Isso porque o gradiente de concentração polimérica que se forma na interface da água com o filme polimérico para esta técnica é estável durante toda a eletroformação, e isso faz com que a barreira de energia para formar a conformação vesicular não seja um obstáculo (BATTAGLIA; RYAN, 2006).

2.2.3 Método da automontagem induzida por polimerização (PISA)

Método que torna possível a formação de vesículas utilizando soluções com concentrações poliméricas maiores do que as usadas pelas outras metodologias. O princípio é elaborar um bloco hidrofílico composto de blocos com cadeias longas e cadeias curtas do homopolímero escolhido. As cadeias maiores serão direcionadas para compor a membrana externa, enquanto as cadeias menores irão compor a membrana interna da vesícula. Para sintetizar um bloco hidrofílico com dois monômeros em sua composição, é necessário o uso de um macro-CTA (GONZATO et al., 2014).

Inicialmente, um polímero hidrofílico é elaborado em solução aquosa, para depois fazer crescer (com a ajuda de um macro-CTA) a cadeia hidrofóbica que irá compor o

segundo bloco, formando o copolímero anfifílico. É durante o crescimento da cadeia hidrofóbica que o copolímero começa a se agregar na morfologia de vesícula quando nas condições adequadas para tal (RIEGER, 2015). Rieger (2015) relatou em seu trabalho diversas variáveis que influenciam o copolímero a se auto arranjar em vesículas, tais como o parâmetro de empacotamento do copolímero, a concentração de monômero utilizada, a natureza química do agente macro-CTA, o solvente utilizado e outros.

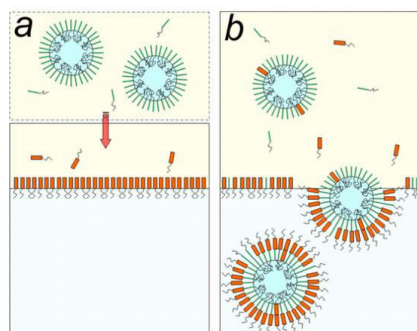
2.2.4 Método da automontagem por indução centrífuga

Induzir a formação de vesículas por força centrífuga também trouxe como resultado vesículas gigantes. A vantagem desta técnica é possibilitar a formação de vesículas gigantes a partir de copolímeros com alta T_g, situação em que técnicas como a de hidratação de filme ou eletroformação não são bem-sucedidas (MABROUK et al., 2009a). No trabalho realizado por Marguet, Sandre e Lecommandoux (2012), esta técnica foi utilizada para formar vesículas gigantes que encapsulassem outras vesículas de nanodimensão, de forma maneira a imitar a estrutura de organelas estruturais.

O protocolo desta técnica rege que duas soluções de polaridades diferentes, uma com solvente orgânico (que pode ser tolueno) contendo os copolímeros, e outra solução aquosa de glicose ou então sacarose (em diversos relatos a concentração citada foi de 380 mOsm), entrem em contato e sejam emulsificadas, ou por agitação manual ou por repetidas pipetagens. Há relatos de que adicionando-se um pouco de dextrano à solução de glicose ou sacarose, atinge-se maior eficiência com a técnica (MABROUK et al., 2009b). Em outro tubo (um de centrífuga), coloca-se a solução aquosa glicosídica e por cima gentilmente coloca-se a solução orgânica contendo os copolímeros. É imprescindível que não seja agitada e que fique descansando por um período, deixando que o gradiente de concentração entre as fases se estabilize. O passo seguinte é adicionar, lentamente, a solução emulsificada àquela que não sofreu emulsificação e, logo imediatamente, levar o tubo para ser centrifugado (MABROUK et al., 2009b; MARGUET; SANDRE; LECOMMANDOUX, 2012).

Quando se adiciona a emulsão no tubo que contém as duas fases, gotículas de emulsão invertidas se formam e são elas que dão origem aos polimerossomos. Portanto, quando o tubo é submetido à centrífuga, as vesículas formadas se precipitam na fase inferior do tubo (MABROUK et al., 2009b). A Figura 6 mostra uma representação de como isso acontece.

Figura 6 – Gotículas de emulsão em contato com filme polimérico formando vesículas.



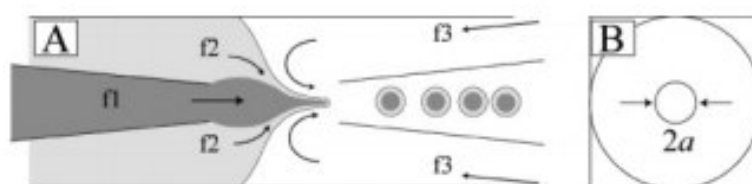
Fonte: Mabrouk et al. (2009b).

2.2.5 Método microfluído

Para este método, é necessário um aparato especial: dois tubos capilares, de secção circular e afunilados na ponta, inseridos um dentro do outro, são posicionados dentro de um terceiro tubo, com diâmetro ainda maior, dessa vez de secção quadrada. Outro tubo encontra-se posicionado próximo aos dois tubos de secção redonda, pouco depois de onde acaba o afunilamento, que desempenha a função de coletar as gotículas de dupla emulsão que serão formadas. Uma representação desse aparato é mostrada na Figura 7 (LORENCEAU et al., 2005; SHUM; KIM; WEITZ, 2008)

Dentro de cada tubo desse insere-se um fluido diferente, representados pelas legendas f1, f2 e f3 na figura. O fluido inserido no tubo mais interno é o conteúdo que a vesícula deve encapsular. O fluido f2, inserido no maior tubo redondo, é o solvente orgânico contendo os copolímeros que irão compor a bicamada da vesícula. Já o fluido f3 é o fluido que irá solubilizar os polimerossomos formados, ou seja, o meio em que serão inseridos. Como mostra a Figura 7, f1 e f2 correm no mesmo sentido, enquanto f3 é em fluxo contrário (LORENCEAU et al., 2005).

Figura 7 – Esquema representativo da formação de vesículas pelo método microfluído. A) Representação lateral; B) Representação frontal mostrando a abertura para saída dos fluidos.



Fonte: Lorenceau et al. (2005).

O ajuste dos fluxos que passam pelos três tubos do aparato é de extrema importância para a formação adequada dos polimerossomos. É preciso um fluxo moderado dos dois fluidos mais internos para que seja alcançado um gotejamento uniforme, em que gotículas de dupla emulsão (água envolvida por óleo) se formam logo na entrada do tubo coletor. Caso os fluxos estejam em mais alta velocidade, gotículas assimétricas serão formadas em um ponto mais adiante dentro do tubo coletor; este último resultado é chamado de jateamento. Além disso, os fluxos de f1 e f2 podem ser regulados para gerar uma ou mais gotículas de fluido interno envolvidas pela camada externa de fluido orgânico com os copolímeros. O último passo é aguardar a evaporação completa do solvente orgânico que solubiliza os copolímeros, para que reste somente a bicamada polimérica. Foi relatada a formação de 100 a 7000 gotículas por segundo formadas por esta metodologia (LORENCEAU et al., 2005; SHUM; KIM; WEITZ, 2008).

É importante que o solvente orgânico escolhido para solubilizar o copolímero cumpra os seguintes requisitos: ser um bom solvente para todos os blocos que compõe o copolímero, seja volátil e crie uma tensão superficial entre a gotícula e o fluido mais externo, possibilitando aos polímeros tempo o suficiente para que se arranjam na conformação de bicamada (LORENCEAU et al., 2005). Para o fluido externo, é interessante uma solução com certa viscosidade, para que seja possível o ajuste do fluxo. No trabalho de Lorenceau et al. (2005), foi usado como fluido mais externo uma mistura de 80% (v/v) de glicerol com água destilada e como solvente para os copolímeros (f2) uma mistura de THF (excelente solvente para os dois blocos do copolímero utilizado) com tolueno (solvente apolar que não se mistura bem com a água).

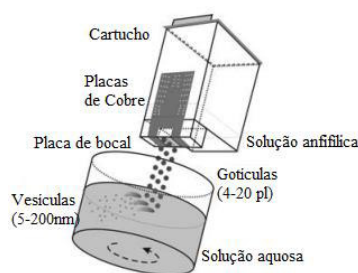
O principal parâmetro para esta técnica é a concentração de copolímeros presentes na fase orgânica. Ela deve ser alta o suficiente para garantir que os copolímeros recubram as duas superfícies que ficam em contato com a água. Um excesso nessa concentração não compromete a formação da vesícula, mas promove uma membrana mais espessa (HAYWARD et al., 2006).

2.2.6 Método na nanoimpressão

Outro dispositivo capaz de produzir vesículas poliméricas, é a impressora à jato de tinta, cujo esquema gráfico se encontra na Figura 8. Essas impressoras são adaptadas para segurar o cartucho, em posição fixa e estável, acima de um recipiente. Dentro do cartucho é inserido o solvente orgânico juntamente com os copolímeros que formarão a membrana de

vesícula; O recipiente com solução aquosa (que receberá as gotículas “impressas” pela impressora à jato) fica em constante agitação. A dinâmica desta impressora faz com que essa metodologia forneça um alto controle sobre a reprodutibilidade dos resultados (HAUSCHILD et al., 2005).

Figura 8 – Representação gráfica de uma jateadora de tinta adaptada para Nanoimpressão.



Fonte: Hauschild et al. (2005).

O trabalho de Hauschild et al. (2005), relata a dependência proporcional que o tamanho das vesículas tem da concentração de copolímeros inserida no cartucho. Outra observação é sobre a evolução da morfologia, que se inicia em formatos parecidos com discos e conforme avança em estabilidade, se fecha para formar as vesículas. É importante ressaltar que uma gota não irá se transformar em um único polimerossomo. Caso assim fosse, as vesículas seriam da grandeza de micrometros e não de nanômetros como foi observado pelas imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (HAUSCHILD et al., 2005).

No trabalho de Radulescu et al. (2003), este foi o método escolhido para formar vesículas que encapsulassem a droga quimioterápica Paclitaxel. Os resultados foram satisfatórios, visto que observou-se homogeneidade no tamanho das vesículas formadas por este processo, situação de extremo interesse para aplicações terapêuticas.

2.2.7 Método de extrusão

O método de extrusão é mais comumente utilizado como passo adicional após a execução de outra técnica para formar polimerossomos, principalmente após hidratação de filme. Consiste em passar a solução resultante contendo polimerossomos por uma membrana nanoporosa de policarbonato (material inerte aos polímeros e reagentes) por diversas vezes (CERRITELLI et al., 2005). Um exemplo de um sistema adequado para executar esta técnica está na Figura 9.

Figura 9 - Extrusor de lipossomos



Fonte: Avestin (2019).

Segundo Fetsch et al. (2016) passar a solução com agregados de copolímeros pelo filtro de polycarbonato adiciona forças mecânicas de cisalhamento ao sistema, diminuindo o tamanho dos agregados e aumentando a homogeneidade da distribuição de tamanhos. O principal impacto é sobre os agregados maiores, o que torna este método muito interessante para técnicas que partem de formação de filme, como eletroformação ou hidratação de filme, visto que se observam muitos agregados e até mesmo pedaços de massa polimérica na solução resultante. Fetsch et al. (2016) não observou resquícios de material polimérico retido no filtro. Para constatar se houve perda de material, pode ser realizada a pesagem do filtro antes e após a aplicação da técnica.

O filtro de polycarbonato pode ser de vários tamanhos. Fetsch et al. (2016) comparou os resultados obtidos com filtros de 5 μm e 1,2 μm , mas relatou que não houve impacto significativo sobre o tamanho das vesículas formadas nem sobre a dispersão de tamanhos.

2.3 Aplicações de vesículas poliméricas/polimerossomos

Desde os primeiros relatos de copolímeros arranjados morfologicamente em vesículas, associam-se os usos destes em sistemas biológicos. Isso porque os polimerossomos muito se assemelham a lipossomos, sendo considerados como estruturas biomiméticas, ou seja, que têm como referência estruturas já existentes na natureza há bilhões de anos. Essa semelhança dos polimerossomos com os lipossomos direciona sobremaneira a sua aplicação dentro de organismos vivos, causa nobre e sempre em pauta, que contribui para o avanço da farmacologia e da medicina como um todo (MOZAFARI, 2007).

Tendo isso em vista, os polimerossomos já foram estudados e aplicados como carreadores de substâncias de maneira inteligente, transportando e liberando conteúdos

encapsulados quando encontram determinados gatilhos presentes no meio, sejam gatilhos de temperatura, pH, íons ou outros recentemente em pauta, como campo elétrico, campo magnético, moléculas de açúcar e ultrassom (POWER-BILLARD; SPONTAK; MANNERS, 2004). Tais estímulos estão muito presentes nos organismos, fazendo com que as vesículas poliméricas sejam matéria de diversos estudos recentes que visam aprimorar os tratamentos médicos disponíveis hoje em dia.

Dentre as aplicações mais abordadas, encontram-se: a) o transporte e liberação de substâncias de forma inteligente; b) ação como nanorreatores, permitindo a permeabilidade seletiva de certos compostos que podem reagir com o conteúdo encapsulado nas vesículas; c) diagnóstico de doenças; d) tratamento de células com desordens genéticas;

A função de veículo de substâncias que as vesículas podem assumir foi abordada anteriormente, no trabalho feito por Napoli (2004b); a vesícula feita no referido trabalho, de dibloco PEG-PPS, pode ser aplicada no transporte da enzima glicose oxidase, que transforma a glicose em ácido glucônico e por isso tem larga utilização na indústria de alimentos e outras como terapia de reposição enzimática e de higiene bucal (TANNER et al., 2011). Um outro trabalho que comprova a capacidade das vesículas de responderem à estímulos externos liberando conteúdos encapsulados foi realizado por Power-Billard, Spontak e Manners (2004). Eles geraram vesículas com unidades de ferroceno no bloco hidrofílico (PFS, poliferrocenilsilano), compostos que respondem a reações redox de forma reversível, abrindo e fechando a cadeia de acordo com oxidações sequenciais e reduções. Essa capacidade de oxidação reversível do copolímero específico usado nas vesículas foi comprovada por um estudo de voltametria cíclica na presença de cloreto de sódio (NaCl), gerando apenas uma única onda como resposta (NARDIN et al., 2000).

Além da propriedade essencial dos polimerossomos de encapsular e liberar substâncias, outra característica interessante é a de permitir a permeabilidade seletiva de determinadas moléculas dispersas no meio para dentro do interior das vesículas. Isso faz com que o material central deste estudo tenha a potencial função de ser um nanorreator. Os nanorreatores, por definição, são inoculadoras nanométricas isoladas onde podem ocorrer reações químicas. Dentro de um polimerossomo, isoladas do ambiente externo, reações catalisadas podem ocorrer quando o meio de dispersão oferecer empecilhos para a melhor eficiência da reação em questão. Outra função acessória já relatada em trabalhos anteriores é a possibilidade de encaixar proteínas nas membranas externas dos polimerossomos, possibilitando a atividade *in situ* (GRZELAKOWSKI et al., 2009). Portanto, pode-se alcançar a permeabilidade seletiva da membrana vesicular tanto através da modelagem de

poros nanométricos (quando o composto de interesse tiver um tamanho menor do que os outros também dispersos no meio) quanto através da inserção de canais de proteínas, que fazem a função de seletoras de acordo com a sua natureza e também promovem a comunicação do meio externo com o interior da vesícula.

Relatos de algumas enzimas encapsuladas foram citados no trabalho de Tanner et al. (2011). Dentre eles, está a enzima beta-lactamase, que hidrolisa os anéis beta-lactâmicos presentes em diversos antibióticos, como a ampicilina. Essa reação pode comprovar a atividade da enzima isolada e averiguar a resistência que terá ao medicamento em questão (TANNER et al., 2011). Outro exemplo de enzima isolada em nanorreatores poliméricos foi a fosfatase ácida, no trabalho de Grzelakowski et al. (2009). Este relato foi o pioneiro no que diz respeito a reações enzimáticas imobilizadas dentro de vesículas poliméricas, comprovando a eficiência da permeabilidade seletiva da membrana, permitindo a entrada do substrato ELF 97, desfosforilizado com sucesso dentro da cavidade do polimerossomo.

2.4 Técnicas de polimerização

A matéria de composição das vesículas que foram formadas são copolímeros em bloco com radicais polares e apolares, ou seja, anfipáticos. Tais copolímeros foram sintetizados previamente através da técnica de polimerização conhecida como RAFT, por ser, dentre muitas técnicas disponíveis para elaborar polímeros, a que mostra melhor resultado para formação de polimerossomos a partir de copolímeros anfipáticos (FLORENZANO, 2016).

Diversas formas de se sintetizar polímeros foram desenvolvidas ao longo dos anos, técnicas essas que foram classificadas por Carothers (1929) de acordo com a reação responsável pelo crescimento da cadeia, se de substituição ou de adição. Cada uma das técnicas tem mecanismos particulares e consequentes limitações, sendo estudadas por diversos pesquisadores e tendo seus resultados comprovados e registrados.

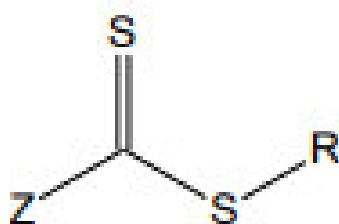
A técnica que foi usada para sintetizar os copolímeros usados neste trabalho se utiliza de reações de adição na presença de um controlador, enquadrando-se na família das Polimerizações por Desativação Reversível de Radicais (RDRP). Elas são úteis quando se tem a necessidade de manter controle sobre o crescimento da cadeia, possibilitando que se manipule a polimerização para que seja atingida a massa molar desejada como resultado. Isso é possível porque os agentes controladores da polimerização reagem com os monômeros

e as cadeias já formadas minimizando a terminação da polimerização (processo que faria com que a reatividade cessasse e, portanto, pausasse o crescimento das cadeias terminadas). Existem várias RDRP's com diferentes tipos de reações radicalares; as mais utilizadas são a de Transferência de Átomo (ATRP, do inglês *Atom-Transfer Radical Polymerization*) e, a mais recente, de Adição-Fragmentação (RAFT, do inglês *Reversible Adiction-Fragmentation Chain Transfer*) (FLORENZANO, 2016).

A RAFT é uma polimerização em que são usados agentes transferidores de cadeias, chamados CTA's (*Chain Transfer Agent*, do inglês), que possibilitam a homogeneidade em nível molecular durante o crescimento das cadeias poliméricas e também um possível reinício da polimerização de um polímero já purificado. Os CTA's têm características que proporcionam um equilíbrio entre as reações diretas e inversas da polimerização, conferindo a possível reversibilidade que dá nome à técnica. Para melhor entendimento, CTA's são os grupos Tiocarbonílicos; eles possuem dois radicais (Z e R), vide

Figura 10, que devem ser escolhidos de acordo com os monômeros a serem trabalhados. O radical Z irá impactar na velocidade das reações de adição e fragmentação, atraindo os elétrons durante as adesões, enquanto que o radical R, mais estável que o monômero em propagação, direciona as clivagens para a ligação S-R, permitindo que as cadeias cresçam de maneira uniforme (MOAD; RIZZARDO; THANG, 2009).

Figura 10 – CTA Tiocarbonílico.

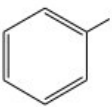
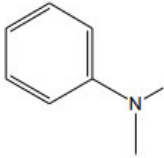
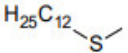


Fonte: Própria autora.

Alguns exemplos de possíveis grupos Z's estão ilustrados no Quadro 1. A função desse grupo é possibilitar o ataque do radical (monômeros e cadeias iniciados) à dupla ligação C=S, como um ativador da transferência de elétrons e facilitador da adição. Por isso é imprescindível que o grupo Z seja um bom receptor de elétrons. Entretanto, o grupo Z deve ser escolhido de acordo com os monômeros que serão polimerizados, porque deve ser menos reativo do que este. Do contrário, irá tornar o radical centrado no carbono mais estável e, por

consequente, irá retardar significativamente o processo de polimerização, que necessita que a dupla do carbono terciário retorne ao átomo de enxofre, transferindo para outra posição a cadeia radicalar que se ligou ao CTA (FLORENZANO, 2016).

Quadro 1 – Radicais Z's adequados para CTA's.

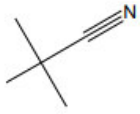
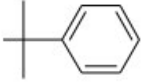
Radical	Nome
	Fenil
	n-fenil-n-metil
	tiododecil

Fonte: Própria autora.

Quanto ao grupo R, sua função é de se clivar assim que a dupla ligação do carbono se refaz com o enxofre. Quando o grupo R é liberado como radical na solução, o monômero pode se ligar em sua posição, transferindo a cadeia para uma posição mais estável. Para que a clivagem do R seja possível, este deve ser um radical mais estável do que o monômero iniciado. Caso contrário, a cadeia radicalar que atacou a dupla C=S será liberada novamente na solução e R permanecerá ligado ao CTA, aumentando a probabilidade de radicais se encontrarem e terminarem definitivamente a polimerização daquela cadeia, caracterizando o insucesso da RAFT (FLORENZANO, 2016). Grupos interessantes para R estão ilustrados no

Quadro 2.

Quadro 2 – Grupos R's para CTA's

Radical	Nome
	2-ciano-2-propil
	cianometil
	dimetilbenzil

Fonte: Própria autora.

2.4.1 Características principais dos blocos do copolímero

Os blocos do copolímero utilizado neste trabalho são de: PDMAEMA, PS, PHEMA.

O PDMAEMA [poli (metacrilato de 2-(dimetilamino etila)] é um homopolímero que pode ser interessante para várias aplicações, pois mostra comportamento responsivo aos estímulos de pH e temperatura, sofrendo alterações em sua polaridade e, por conseguinte, em sua solubilidade. Devido à baixa LCST (temperatura de solução crítica) deste homopolímero em soluções aquosas, com um pequeno aumento de temperatura ele pode se precipitar da solução. A LCST do PDMAEMA em água deionizada a concentrações que variam de 0,1 a 0,5% m/m de polímero estão em um range entre 50 °C e 38 °C, respectivamente. Entretanto, se alterarmos também o pH da solução aquosa, incluiremos outra variável que impacta na solubilidade deste homopolímero. Em soluções ácidas o homopolímero fica todo ionizado e solubilizado, mas, à medida que se aumenta o pH, mais hidrofóbico o polímero se torna e vai diminuindo a temperatura em que sua solubilidade cai drasticamente (ZHANG; MARIC, 2011).

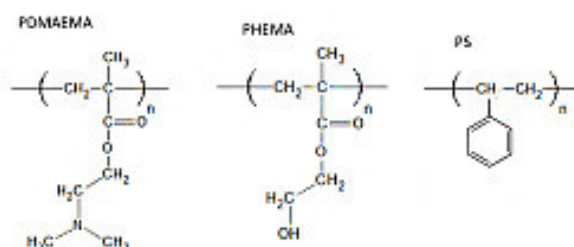
O homopolímero PS (poliestireno) é um composto muito hidrofóbico, sendo excelente para compor o grupo “de recheio” da bicamada. Enquanto homopolímero, pode formar filmes poliméricos bastante resistentes, como o látex (BRAGA; LEITE; GALEMBECK, 2003). É um polímero muito usado na indústria, para fazer copos descartáveis e algumas embalagens, portanto é produzido em abundância e de fácil acesso.

Outro homopolímero que foi usado na composição dos copolímeros anfipáticos é o PHEMA, poli (2-metacrilato de hidroxietil). É um material muito conhecido por ser

biocompatível, hemocompatibilidade e pela sua hidrofilia, tornando-o interessante para aplicações na área farmacológica e também terapêutica. Aplicações da PHEMA já foram relatadas para fabricação de pele artificial (YOUNG; WU; TSOU, 1998) e córnea artificial (LOU; VAN COPPENHAGEN, 2001). Por sua característica hidrofílica, o polímero PHEMA apresenta a propriedade de incorporar água entre suas cadeias, ou seja, quando na presença de umidade, absorve água e incha, sendo capaz de formar géis esponjas (LOU; VAN COPPENHAGEN, 2001).

A estrutura molecular destes polímeros está ilustrada na Figura 11, a seguir:

Figura 11 - Estrutura molecular dos polímeros PDMAEMA, PHEMA e PS



Fonte: Própria autora.

2.5 Caracterização das vesículas

A caracterização das vesículas pode ser realizada por diversos métodos. A seguir foi explanado sobre as técnicas de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e sobre alguns tipos de microscopia.

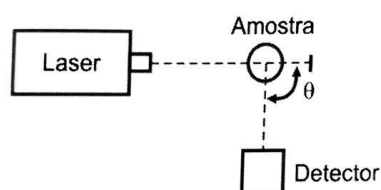
2.5.1 Espalhamento de Luz Dinâmico

DLS é a análise de Espalhamento de Luz Dinâmico, que fornece o diâmetro médio e hidrodinâmico das partículas e a porcentagem de uniformidade dos tamanhos. Para isso, usam-se fontes de raio laser que incidem luz sobre a amostra solubilizada em um solvente, que comumente é água ou solvente orgânico (mas que pode ser outro que solubilize bem o analito) e analisa a intensidade que o analito emite a radiação recebida dentro de um intervalo de microssegundos. Essa intensidade irá variar de acordo com o movimento Browniano

realizado pelas partículas dissolvidas, que será maior conforme maior for o diâmetro destas (CANEVAROLO JR., 2004).

Uma representação simplificada do Espectrômetro de Luz está na Figura 12. A amostra é inserida em celas de vidro ou de quartzo, localizadas dentro de uma cuba, imersas em um líquido para termostatização e *index matching*. Um detector posicionado a um ponto abaixo da amostra, com possibilidade de ajuste angular (Θ), é responsável por fazer a varredura das radiações emitidas pelas partículas quando recebem luz em comprimentos de onda específicos. Junto ao detector são colocados correlacionadores, que traduzem as radiações lidas nas variáveis de equações de autocorrelação, que resultam nos dados citados anteriormente e outros mais. Para isso, deve-se determinar previamente o índice de refração da fase móvel, sua viscosidade e o incremento do índice de refração específico do soluto (CANEVAROLO JR., 2004).

Figura 12 – Esquema simplificado de um Espetrômetro de Luz.



Fonte: Canevarolo Jr. (2004).

A intensidade da luz espalhada pelo tempo analisado (aqui em microssegundos) possui valores muito pequenos. Ainda que sejam usadas fontes de laser que emitam luz em comprimentos de onda baixos (para aumentar a intensidade da luz espalhada), os correlacionadores traduzem a intensidade em uma transformada de Fourier, usando como eixo o domínio do tempo e não as intensidades lidas (CANEVAROLO JR., 2004). Os equipamentos disponíveis no mercado podem variar em número de canais que possuem, no tempo de espera entre uma leitura e outra e no ângulo em que o detector está da amostra.

2.5.2 Microscopia

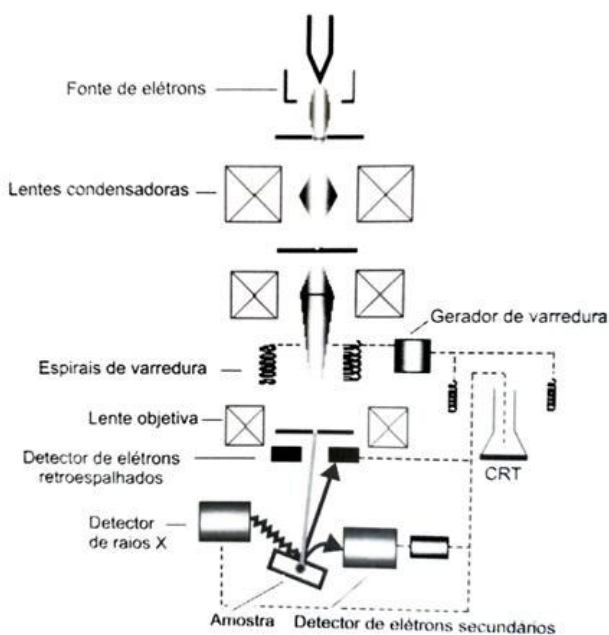
A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um excelente método de se obter imagens da superfície das amostras analisadas. Quando se diz respeito a amostras de grandezas nanométricas, esta análise ganha vantagens na resolução obtida, se comparada aos microscópios ópticos. Isso porque se utiliza da incidência de um feixe de elétrons (ao invés

de um feixe de luz) sobre a amostra. Portanto, essa análise será fundamental para comprovar a formação da estrutura vesicular desejada (CANEVAROLO JR., 2004).

Os elétrons emitidos pela fonte (um filamento de tungstênio) incidem sobre a amostra gerando interações com o núcleo dos átomos nela presentes. As interações podem ser elásticas (sem alterar a energia cinética) ou inelásticas (alterando a energia cinética) e, em ambos os casos, modificam a trajetória dos elétrons que saem da fonte. O resultado dessas interações ocasiona efeitos de retroespalhamento, no caso do espalhamento elástico, e efeitos secundários como emissões de elétrons provenientes da amostra, raios X, entre outros, no caso do espalhamento inelástico, contribuindo para a formação da imagem superficial do analito e subseqüentes informações sobre ele (CANEVAROLO JR., 2004).

A Figura 13 mostra os componentes que um microscópio de varredura possui. Assim que o feixe de elétrons é emitido pela fonte, as lentes condensadoras e as bobinas de varredura ajustam o diâmetro e deflexão do feixe para que este incida com um diâmetro adequado para a análise nanométrica do material. Cada um dos efeitos consequentes das interações entre os elétrons da fonte e o núcleo dos átomos geram sinais elétricos, que são captados por um tubo de raios catódicos (CRT), o responsável pela varredura de todos os sinais (CANEVAROLO JR., 2004).

Figura 13 – Esquema gráfico de um Microscópio Eletrônico de Varredura.



Fonte: Canevarolo Jr. (2004).

2.6 Planejamento de Experimentos

Neste trabalho foi utilizada a estatística DOE (do inglês, *Design of Experiments*) para determinar o número de experimentos para cada técnica e para definir como as variáveis independentes seriam usadas, a fim de se determinar as melhores condições. As variáveis independentes são definidas pelo próprio pesquisador, que possui o conhecimento prévio para estimar quais fatores podem ter mais impacto sobre os resultados. A estatística DOE é um modelo já presente no software Minitab, que permite, além de planejar os experimentos, inserir os resultados obtidos e gerar gráficos que medem o impacto que as variáveis independentes têm sobre eles.

Com DOE é possível explorar novos processos, interpretar processos existentes e aprender mais sobre eles, além de otimizar a pesquisa realizando um número mínimo de experimentos para poder interpretá-los com um bom alicerce. Fatores quantitativos (variáveis como velocidade, temperatura, pH, etc.) e qualitativos (matérias primas, catalisadores, fornecedores) podem ser analisados como variáveis independentes de um experimento por DOE e, para amenizar ou até mesmo remover quaisquer vieses dos processos, os princípios de randomização, replicação e blocagem são utilizados por essa estatística. Com a inserção dos resultados e as consequentes análises fornecidas pelo software Minitab, pode-se obter melhorias na performance funcional dos produtos, reduzir a variabilidade excessiva de um processo, reduzir taxas de refugo e retrabalho, reduzir o tempo de desenvolvimento de um produto, entre outros benefícios (ANTONY, 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia escolhida para desenvolver esse estudo foi o tipo Pesquisa Experimental. Através de experimentos e caracterizações realizados nos laboratórios da Escola de Engenharia de Lorena, foi relatado sobre o decorrer da experiência de se formar vesículas poliméricas e sobre os resultados observados com as análises pós-experimentos.

3.1 Materiais

Copolímero usado para a formação das vesículas: (PDMAEMA-co-PHEMA)-b-PS, de massa molar numérica igual a 45432 g/mol, PDI igual a 1,96 e proporção de 1:1,25 para os blocos hidrofílicos e hidrofóbicos.

O solvente utilizado para este copolímero foi: tetrahidrofurano (THF).

Para preparar diferentes pH foram usados os reagentes: Ácido clorídrico, hidróxido de sódio. A solução tampão em que foi feita a hidratação de filme era uma solução Fosfato de pH 7.

Um filtro nanoporoso para seringa de Nylon poro de 0,45 μm e diâmetro de 25 mm da marca Sigma-Aldrich foi utilizado para realizar a técnica de extrusão. Outro filtro nanoporoso para seringa, da marca Analítica de PTFE hidrofílico de poro 0,22 μm e de diâmetro de 25 mm foi necessário.

3.2 Procedimentos

3.2.1 Planejamento dos Experimentos por DOE

Após a realização dos experimentos de cada técnica, um último experimento com a técnica e condições de melhor performance foi realizado a cargo de averiguar a reprodutibilidade e o resultado. As três técnicas foram desenvolvidas no Laboratório de Polímeros que se encontra no Campus 2 da Escola de Engenharia de Lorena. O planejamento de experimentos foi feito no software Minitab®, utilizando a estatística de DOE (do inglês, Design of Experiments) com fatorial completo 2^2 e triplicata no ponto central, para medir a margem de erro, gerando um total de sete experimentos mínimos para cada técnica de formação de vesículas. As variáveis independentes foram determinadas levando-se em conta as particularidades de cada metodologia. A variável de resposta é o diâmetro

hidrodinâmico médio (D_H), mas a polidispersidade dos tamanhos (PDI) também foi levada em conta; ambos fornecidos pela análise de DLS. Um último experimento foi realizado com a técnica que produziu melhor resultado, com ajuste das variáveis de melhor desempenho, totalizando vinte e dois experimentos.

Para a técnica de troca de solventes foi usado o Planejamento de Experimentos mostrado na Tabela 1. Os valores usados para cada um dos níveis estão explanados na Tabela 2.

Tabela 1 – Matriz do planejamento fatorial 2^2 para troca de solventes

Experimento	Concentração de Copolímero ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	pH
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Fonte: Própria autora.

Tabela 2 – Variáveis independentes codificadas e decodificadas para o planejamento fatorial 2^2 da técnica troca de solventes

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Concentração de Copolímero	20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	110 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
pH	4	6	8

Fonte: Própria autora.

Para a técnica de hidratação de filme foram escolhidas as seguintes variáveis independentes: tempo de agitação e concentração do copolímero. A

Tabela 3 mostra o Planejamento de Experimento Fatorial Completo escolhido e a Tabela 4 mostra os três níveis codificados e decodificados.

Tabela 3 – Matriz do planejamento experimental 2^2 para hidratação de filme.

Experimento	Tempo de agitação (dias)	Concentração de Copolímero ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Fonte: Própria autora.

Tabela 4 – Variáveis independentes e níveis codificados e decodificados para a técnica de hidratação de filme.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Tempo de agitação	1 dia	2 dias	3 dias
Concentração de Copolímero	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Fonte: Própria autora.

Também para a técnica de extrusão foi realizado um Planejamento de Experimento com Fatorial Completo 2^2 , explanados na Tabela 5 e

Tabela 6.

Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial 2^2 para a técnica de extrusão.

Experimento	Número de Passagens	Sonicação (min)
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Fonte: Própria autora.

Tabela 6 – Variáveis independentes codificadas e decodificadas para técnica de extrusão

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Número de Passagens	3	7	11
Sonicação	1 min	7 min	15 min

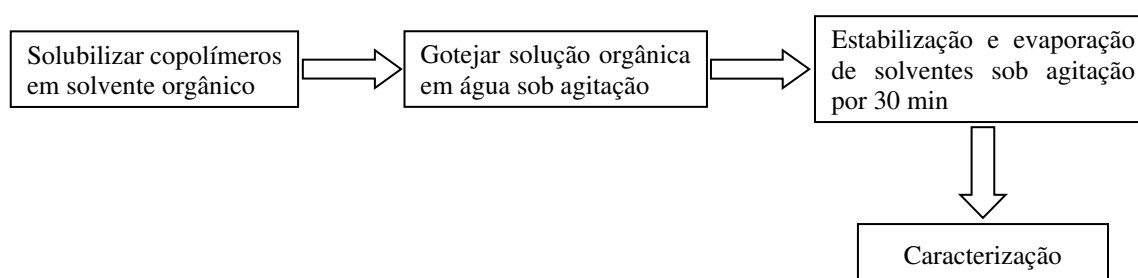
Fonte: Própria autora.

3.2.2 Método de troca de solventes

O fluxograma do procedimento experimental do método de troca de solventes está na

Figura 14.

Figura 14 – Fluxograma do procedimento do método de troca de solventes.



Fonte: Própria autora.

Em primeira instância, preparou-se 500 μL de cada uma das soluções poliméricas referentes aos três níveis, pesando-se 0,01 g de copolímero para a solução mais diluída, 0,045 para a solução dos pontos centrais e 0,1 g de copolímero para a solução mais concentrada.

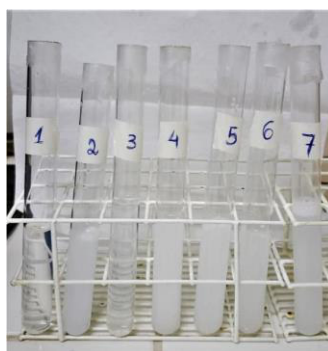
Após preparar as três soluções, preparou-se também as soluções aquosas de pH 4, 6 e 8 ajustados com soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio. Após preparadas, passou-se 10 mL das soluções aquosas para Erlenmeyers de 50 mL e, sob agitação, gotejou-

se 100 μL das soluções poliméricas com uma seringa da marca Hamilton, cuja capacidade é 50 μL , nas combinações que estão de acordo com o planejamento do experimento realizado.

Após os 100 μL serem gotejados, as soluções ficaram trinta minutos sob agitação para estabilização das vesículas para a evaporação do solvente residual. Passado o tempo, as soluções finais foram guardadas em tubos de ensaio, para futuramente serem caracterizadas.

Uma foto de como ficaram ao final dos sete experimentos está apresentada na Figura 15.

Figura 15 – Tubos contendo os sete experimentos de troca de solventes finalizados.

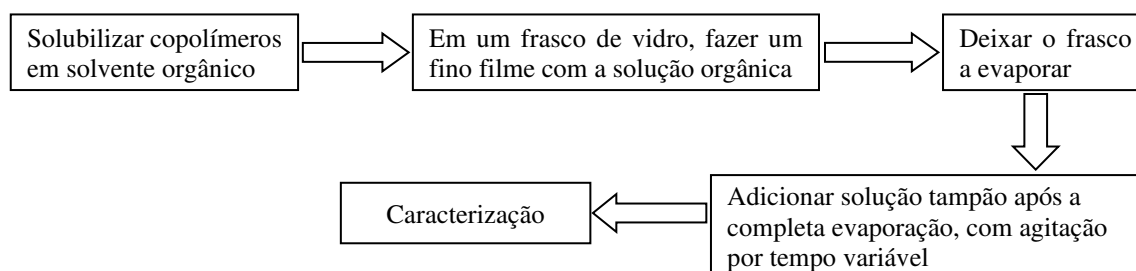


Fonte: Própria autora.

3.2.3 Método da hidratação de filme

O fluxograma do procedimento experimental do método da hidratação de filme está na Figura 16.

Figura 16 – Fluxograma do procedimento do método da hidratação de filme.



Fonte: Própria autora.

Em primeiro lugar foram preparadas as três soluções de copolímero de concentrações diferentes, todas com THF. Foi pesado 1,3 mg de copolímero para 2,6 mL do solvente para a concentração de menor nível, 2,5 mg para 2,5 mL de solvente para a concentração dos pontos centrais e 4,3 mg para 2,9 mL para a concentração de maior nível. Depois de

completamente solubilizados, foram feitos finos filmes poliméricos nas paredes de béqueres de vidro, utilizando as soluções preparadas, com auxílio de uma pipeta Pasteur, assim como mostra a

Figura 17.

Figura 17 – Formação de filme polimérico em um béquer de vidro, para técnica de hidratação de filme.



Fonte: Própria autora.

Depois, deixou-se os béqueres secando na capela por cerca de trinta minutos, para evaporação completa do solvente. Uma vez secos (imagem do filme seco na parede do béquer na Figura 18) 10 mL da solução tampão de pH 7 foi colocada dentro dos béqueres, com agitação magnética de 600 rpm durante o período de 1, 2 ou 3 dias, de acordo com o planejamento do experimento. Quando atingidos os tempos estipulados, as soluções foram guardadas e, posteriormente, caracterizadas pelo método de DLS.

Figura 18 – Filme polimérico seco na parede de um béquer.

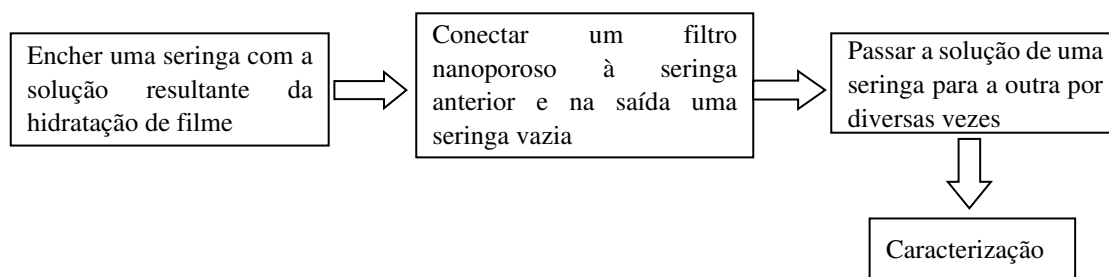


Fonte: Própria autora.

3.2.4 Método de extrusão

O fluxograma do procedimento experimental do método de extrusão está na Figura 19.

Figura 19 – Fluxograma do procedimento do método de extrusão.



Fonte: Própria autora.

A técnica de extrusão foi realizada utilizando-se a solução obtida por hidratação de filme que apresentou resultados mais promissores. Para determinar qual seria essa amostra, traçou-se um gráfico de Pareto (que será apresentado no item 4) relacionando-se os diâmetros hidrodinâmicos médios de cada um dos experimentos com a influência das variáveis independentes. Observou-se que a concentração era o principal fator de impacto. Retornando aos resultados obtidos por DLS, constatou-se que com menores concentrações, melhores eram os resultados; visto que para maiores concentrações os diâmetros das partículas se apresentavam bem maiores do que o esperado para vesículas poliméricas pela técnica citada, acusando possivelmente a formação de agregados. Portanto, a Amostra 1 obtida por hidratação de filme foi escolhida para ser extrudada em membrana nanoporosa.

O filtro de Nylon de poro 0,45 μm para seringa foi acoplado a uma seringa de capacidade de 25 mL e, logo abaixo da saída do filtro, outra seringa (sem o êmbolo) foi posicionada, com outro filtro acoplado à sua extremidade, assim como mostra a Figura 20.

Figura 20 – Seringas acopladas a um filtro de membrana nanoporosa.



Fonte: Própria autora.

Dessa forma, garantiu-se a menor perda possível do material extrudado, visto que logo após passar pela membrana, o conteúdo poderia ser, em seguida, extrudado novamente. Para começar a extrusão, a seringa superior foi preenchida com 25 mL da solução da Amostra 1. Após três passagens pela membrana, retirou-se quantidade suficiente para duas caracterizações por DLS (aproximadamente 4 mL) e separou-se em dois béqueres diferentes. Estes béqueres foram identificados como 1 e 3. A solução que ficou na seringa passou mais quatro vezes pelas membranas e novamente foi separada, dessa vez em quantidade suficiente para três caracterizações (as triplicatas do ponto central). Os béqueres foram identificados como 5, 6 e 7. As seringas foram esvaziadas. Mais 10 mL da Amostra 1 da hidratação de filme foram colocados na seringa superior e passados quinze vezes pela membrana. A solução resultante foi colocada em béqueres identificados como 2 e 4. Todos os sete béqueres foram levados para o ultrassom, para serem sonicados.

3.2.5 Caracterização das vesículas

A seguir, foram apresentados os tipos de análises feitas dos resultados obtidos por cada técnica de formação de polimerossomos.

3.2.5.1 Análises por Microscopia

Dois microscópios foram utilizados para visualizar as partículas formadas com as técnicas escolhidas. Um microscópio ótico invertido de lente objetiva e um microscópio

eletrônico de varredura. Para ambas as análises de microscopia as amostras foram analisadas in natura.

As análises no microscópio invertido foram realizadas no Instituto de Farmacologia da Unifesp de São Paulo (INFAR), no laboratório da Prof^a Dr^a Karin do Amaral Riske em um microscópio Zeiss Axiovert 200 equipado com uma câmera digital sCMOS PCO.edge 4.2 e com objetivas de 10x, 20x, 40x e 63x.

As análises de MEV foram realizadas no campus DEMAR da EEL-USP em um microscópio da marca Hitachi®, modelo TM 3000. As amostras produzidas serão colocadas diretamente sobre um braquilete® (superfície metálica polida) e lidas sob vácuo.

3.2.5.2 DLS

Dois espectrômetros foram utilizados nas análises é um Brookhaven Instrument Corp, Zeta Plus/BI-PALS, localizado no DEMAR (EEL-USP), e um Zetasier Nano ZS Malvern Panalytical, localizado no DEQUI (EEL-USP).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As soluções resultantes de cada técnica (sete experimentos para cada uma) foram analisadas em dois equipamentos que realizam DLS, isso porque um deles oferece a vantagem de estar geograficamente mais próximo e à disposição, enquanto que o outro equipamento tem como vantagem fornecer gráficos da distribuição dos tamanhos obtidos a cada leitura. Estes gráficos estão apresentados nas Figuras 21 a 34 e mostram linhas de cores diferentes para cada uma das triplicadas realizadas para cada amostra. Além disso, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), e também de contraste de fase, complementando assim a análise de DLS que fornece o raio hidrodinâmico médio das partículas em dispersão.

4.1 Caracterização por DLS

4.1.1 Caracterização por DLS após método Troca de Solventes

Os diâmetros hidrodinâmicos médios obtidos para os sete experimentos de Troca de Solventes estão na Tabela 7 e 8. As medidas foram realizadas em triplicata, para averiguar a reprodutibilidade dos resultados. Os resultados em vermelho são resultados que a autora julgou estarem em discordância, ou seja, representarem uma porção muito pequena da amostra, e por isso não foram considerados no cálculo da média e do desvio padrão. A escolha foi baseada na ciência de que, para cada leitura, pequenas frações da amostra são lidas e, em alguns casos, estas frações estão povoadas com partículas de tamanhos que não se referem à média da amostra num geral.

Tabela 7 – Diâmetros hidrodinâmicos obtidos por DLS em equipamento da marca Malvern.

Exp	Conc.	pH	Diâmetro (nm)			Média - Malvern (nm)	Desvio Padrão
1	-1	-1	266,9	262,2	266,8	265,30	2,1924
2	1	-1	1255	1285	1366	1302,00	46,8828
3	-1	1	237,5	243,7	236,5	239,23	3,1847
4	1	1	1336	1328	1092	1332,00	4,0000
5	0	0	1892	1833	1457	1862,50	29,5000
6	0	0	1493	1914	1487	1490,00	3,0000
7	0	0	2161	1590	1485	1537,50	52,5000

Fonte: Própria autora.

Tabela 8 – Diâmetros hidrodinâmicos obtidos por DLS em equipamento da marca Brookhaven.

Exp	Conc.	pH	Diâmetro (nm)			Média - Brookhaven (nm)	Desvio Padrão
1	-1	-1	296,4	296,8	302	298,40	2,5508
2	1	-1	1153,1	1033,6	1000,4	1017,00	16,6000
3	-1	1	282,6	286,3	288,4	285,77	2,3977
4	1	1	1087,6	1201,8	1109,9	1133,10	49,4239
5	0	0	1556,5	1538,4	1547,45	1547,45	7,3893
6	0	0	1298	1589,8	1443,9	1516,85	72,9500
7	0	0	1379,4	1451,3	1710,9	1415,35	35,9500

Fonte: Própria autora.

A Tabela 9 mostra o diâmetro hidrodinâmico médio utilizado como resposta para o planejamento do experimento, que foi calculado usando as médias obtidas por cada equipamento.

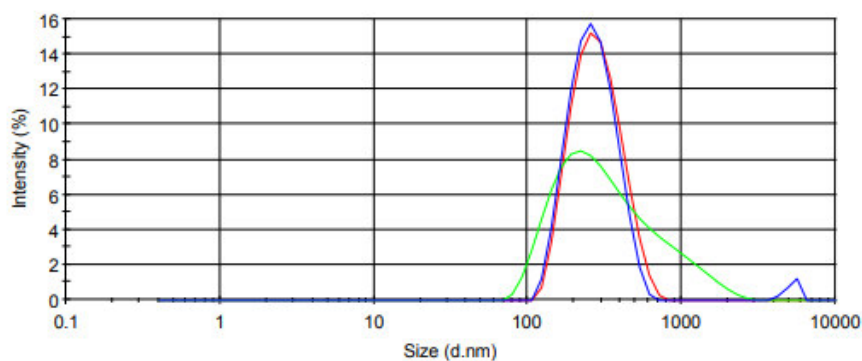
Tabela 9 – Diâmetro final médio calculado para os experimentos de Troca de Solventes

Experimento	Malvern	Brookhaven	Diâmetro Médio (nm)
1	265,30	298,40	281,85 ± 16,5500
2	1302,00	1017,00	1159,5 ± 142,5000
3	239,23	285,77	262,5 ± 23,2667
4	1332,00	1133,10	1232,55 ± 99,4500
5	1862,50	1547,45	1704,97 ± 157,5250
6	1490,00	1516,85	1503,42 ± 13,4250
7	1537,50	1415,35	1476,42 ± 61,0750

Fonte: Própria autora.

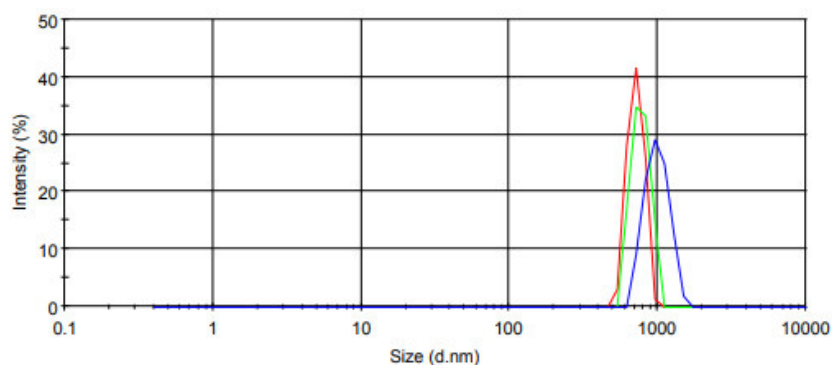
As Figuras 21 a 27 apresentam os gráficos com linhas de cores diferentes para cada uma das triplicadas realizadas para cada amostra obtida por troca de solventes.

Figura 21 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 273,1 nm e PDI 0,230 para a Amostra 1 (Concentração 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e pH 4).



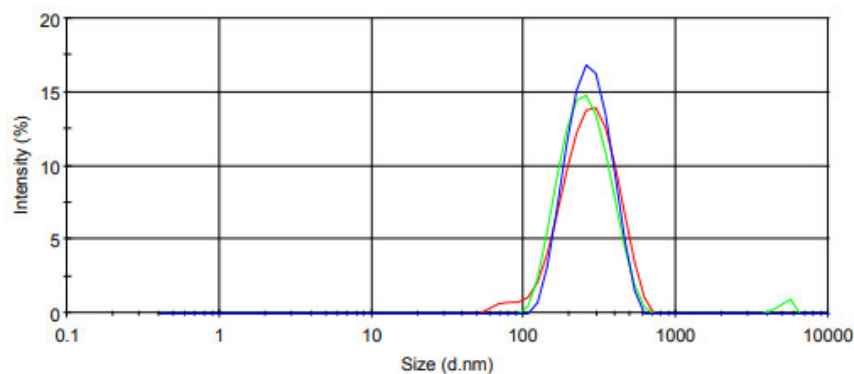
Fonte: Própria autora.

Figura 22 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 1366 nm e PDI 0,547 para a Amostra 2 (Concentração 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e pH 4).



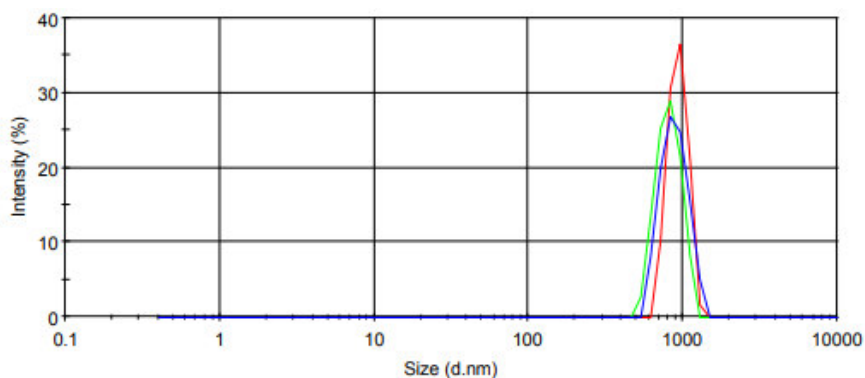
Fonte: Própria autora.

Figura 23 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 236,5 nm e PDI 0,139 para a Amostra 3 (Concentração 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e pH 8)



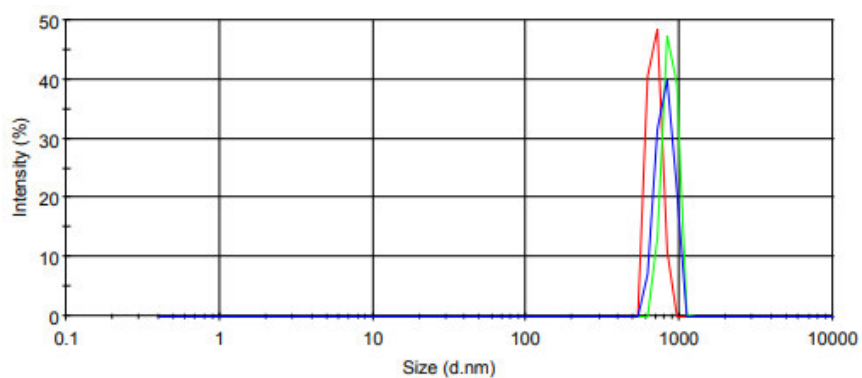
Fonte: Própria autora.

Figura 24 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 884,1 nm e PDI 0,258 para a Amostra 4 (Concentração 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e pH 8).



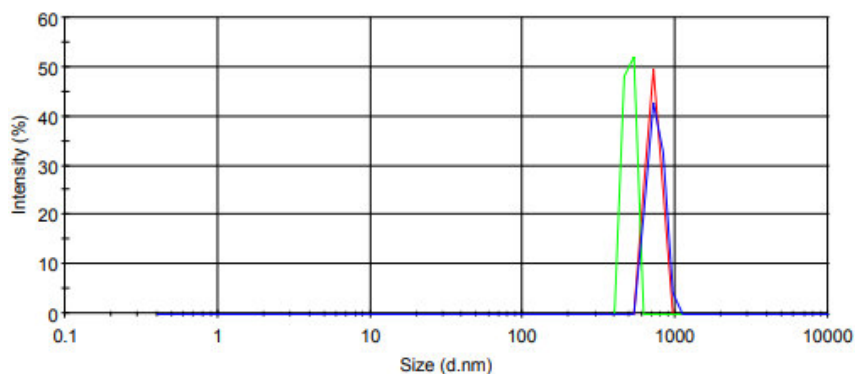
Fonte: Própria autora.

Figura 25 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 802 nm e PDI 0,451 para a Amostra 5 (Concentração 110 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e pH 6).



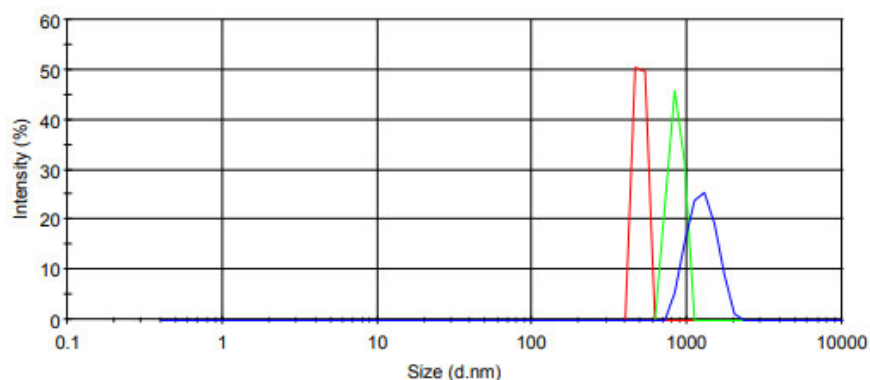
Fonte: Própria autora.

Figura 26 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 1487 nm e PDI 0,546 para a Amostra 6 (Concentração 110 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e pH 6).



Fonte: Própria autora.

Figura 27 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 1485 nm e PDI 0,245 para a Amostra 7 (Concentração 110 µg/µL e pH 6).



Fonte: Própria autora.

4.1.2 Caracterização por DLS após método Hidratação de filme

Os diâmetros hidrodinâmicos também foram medidos para os sete experimentos realizados utilizando o método de hidratação de filme. Nas Tabela 10, 11 e 12 podemos observar os dados fornecidos por dois equipamentos para cada um dos sete experimentos de hidratação de filme. Novamente, os resultados destacados em vermelho foram deixados à parte dos cálculos da média e do desvio padrão, em função de se referirem, muito provavelmente, à uma parcela pouco representativa da amostra total ou então a morfologias que não sejam de vesículas. A Tabela 13 apresenta o diâmetro médio final calculado.

Tabela 10 – Diâmetros hidrodinâmicos obtidos por DLS em equipamento da marca Malvern.

Exp	Tempo Agitação	Conc.	Diâmetro (nm)			Média - Malvern (nm)	Desvio Padrão
1	-1	-1	602,7	652	949,2	627,35	24,6500
2	1	-1	676,7	708,3	1086	692,50	15,8000
3	-1	1	1233	1692	2396	1462,50	229,5000
4	1	1	512,3	521,1	516,4	516,60	3,5954
5	0	0	425,2	487,65	446,25	453,03	25,9424
6	0	0	404	550,5	481,9	516,20	34,3000
7	0	0	446,4	424,8	410,6	427,27	14,7190

Fonte: Própria autora.

Tabela 11 – Diâmetros hidrodinâmicos obtidos por DLS em equipamento da marca Brookhaven.

Exp	Tempo Agitação	Conc.	Diâmetro (nm)			Média - Brookhaven (nm)	Desvio Padrão
1	-1	-1	385,2	405,7	375	388,63	12,7662
2	1	-1	500,8	561,9	570	565,95	4,0500
3	-1	1	737,8	731,1	706,1	725,00	13,6414
4	1	1	532	543,7	549,1	541,60	7,1372
5	0	0	386,3	393,5	409,2	396,33	9,5611
6	0	0	396	408,3	433,2	412,50	15,4745
7	0	0	376,6	378,7	385,2	380,17	4,4837

Fonte: Própria autora.

Tabela 12 – Diâmetros hidrodinâmicos obtidos por DLS em equipamento da marca Brookhaven com diluição de 5x.

Exp	Tempo Agitação	Conc.	Diâmetro (nm)			Média - Brookhaven com diluição de 5x (nm)	Desvio Padrão
1	-1	-1	352,9	349,8	465,9	389,53	1,5500
2	1	-1	348,4	360,9	387,6	365,63	16,3496
3	-1	1	783,5	832,6	808,05	808,05	20,0450
4	1	1	476,7	504,5	513,6	498,27	15,6959
5	0	0	338,5	349,15	431	372,88	5,3250
6	0	0	268,4	275,5	374,6	306,17	3,5500
7	0	0	408,6	422,8	487,4	439,60	7,1000

Fonte: Própria autora.

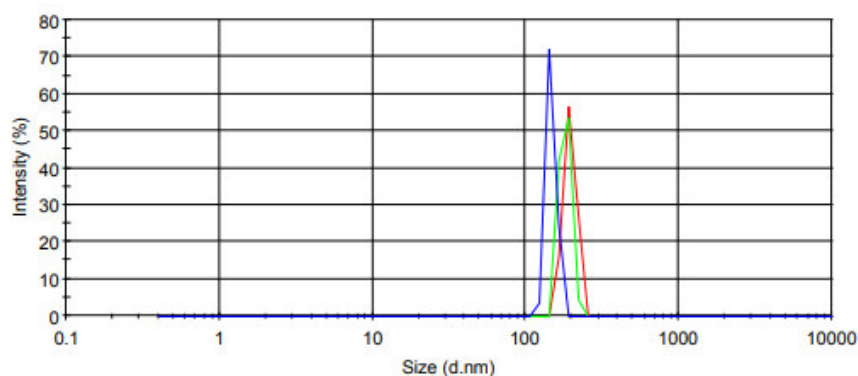
Tabela 13 – Diâmetro final médio calculado para os experimentos de Hidratação de filme

Experimento	Malvern (nm)	Brookhaven (nm)	Brookhaven com diluição de 5x (nm)	Diâmetro Médio (nm)
1	627,35	388,63	389,53	389,08 ± 0,4500
2	692,50	565,95	365,63	541,36 ± 100,1583
3	1462,50	725,00	808,05	766,52 ± 41,5250
4	516,60	541,60	498,27	518,82 ± 17,7604
5	453,03	396,33	270,20	373,19 ± 76,4133
6	478,80	412,50	306,17	399,15 ± 71,1061
7	427,27	380,17	439,60	415,68 ± 25,6100

Fonte: Própria autora.

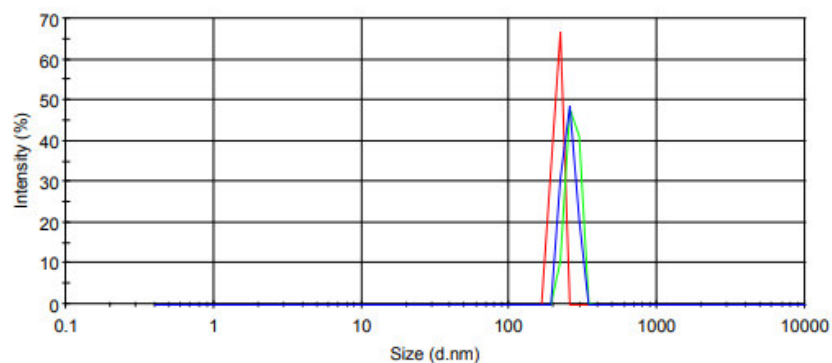
As Figuras 28 a 34 apresentam os gráficos com linhas de cores diferentes para cada uma das triplicadas realizadas para cada amostra obtidas pela técnica de hidratação de filme.

Figura 28 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 146,6 nm e PDI 1 para a Amostra 1 (Tempo de agitação de 1 dia e concentração 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).



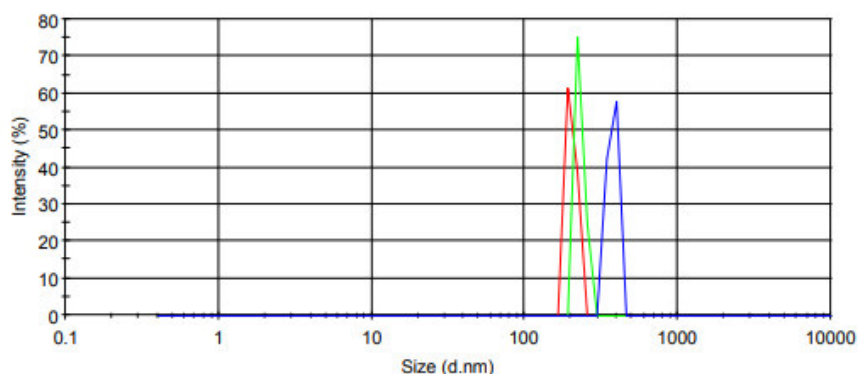
Fonte: Própria autora.

Figura 29 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 252,6 nm e PDI 0,632 para a Amostra 2 (Tempo de agitação de 3 dias e concentração 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).



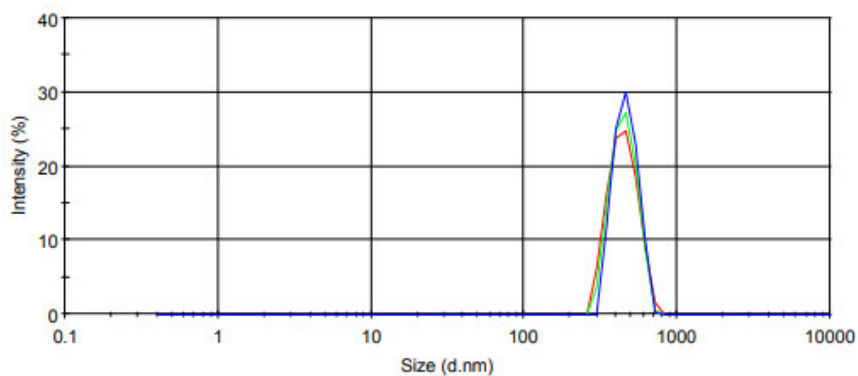
Fonte: Própria autora.

Figura 30 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 373,2 nm e PDI 1 para a Amostra 3 (Tempo de agitação de 1 dia e concentração 1,5 µg/µL).



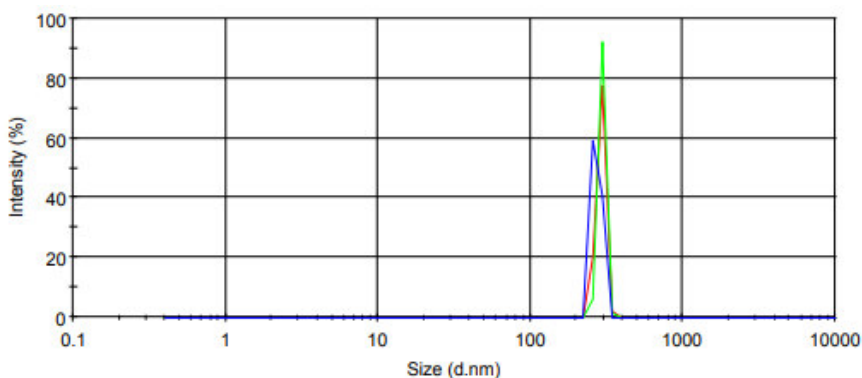
Fonte: Própria autora.

Figura 31 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 462,5 nm e PDI 0,291 para a Amostra 4 (Tempo de agitação de 3 dias e concentração 1,5 µg/µL) para a Amostra 4 (Tempo de agitação de 3 dias e concentração 1,5 µg/µL).



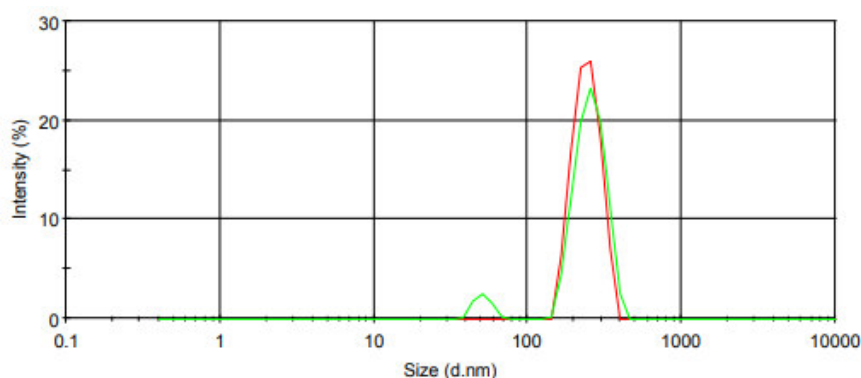
Fonte: Própria autora.

Figura 32 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 271,4 nm e PDI 1 para a Amostra 5 (Tempo de agitação de 2 dias e concentração 1,0 µg/µL).



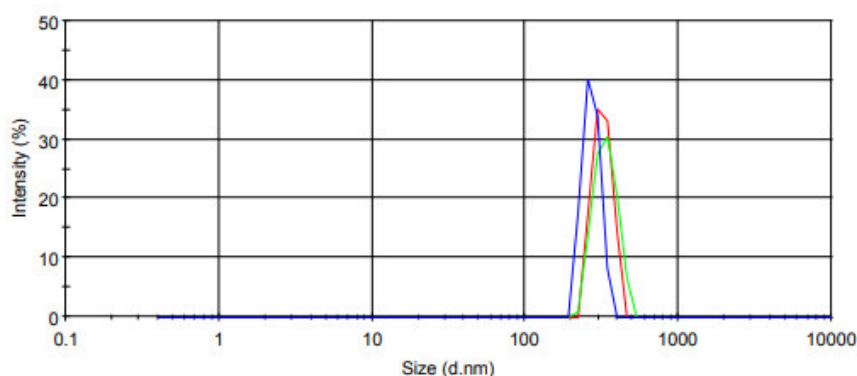
Fonte: Própria autora.

Figura 33 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 257,4 nm e PDI 0,849 para a Amostra 6 (Tempo de agitação de 2 dias e concentração 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).



Fonte: Própria autora.

Figura 34 – Distribuição de tamanhos (nm) por intensidade (%) obtidas por DLS em um Malvern; tamanho 269,7 nm e PDI 0,268 para a Amostra 7 (Tempo de agitação de 2 dias e concentração 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).



Fonte: Própria autora.

4.1.3 Caracterização por DLS após método de Extrusão

Após a realização dos sete experimentos de extrusão, as amostras foram levadas ao DLS Brookhaven localizado no DEMAR, Campus 2 da EEL-USP. Entretanto, o resultado apontado pelo equipamento mostrou que as partículas se quebraram após passar pela membrana nanoporosa, visto que os diâmetros hidrodinâmicos médios fornecidos por DLS estavam sempre menores que 1 nm). As amostras que passaram menos vezes pela membrana foram lidas primeiro e apresentaram os resultados mostrados na Tabela 14 quando analisados por DLS no equipamento Brookhaven.

Tabela 14 – Diâmetros hidrodinâmicos dos experimentos 1 e 3 utilizando o método de Extrusão

Experimento	Nº de Passagens	Sonicação	Diâmetro (nm)			Média - Brookhaven (nm)	Desvio Padrão
1	-1	-1	0	0	1	0,33	0,4714
3	-1	1	0	0	0	0,00	0,0000

Fonte: Própria autora.

Frente a esse resultado, utilizou-se outra membrana, composta de material hidrofílico para fazer a extrusão do resultado por troca de solventes escolhido. Uma passagem pela membrana mostrou resultado bastante satisfatório, com partículas de diâmetro hidrodinâmico mostrados na Tabela 15. A membrana usada foi a de PTFE hidrofílica, poro de 0,22 μm , diâmetro de 25 mm da marca Analítica.

Tabela 15 – Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade (obtida por DLS em um Brookhaven) das partículas extrudadas uma vez em membrana nanoporosa de PTFE hidrofílica da marca Analítica.

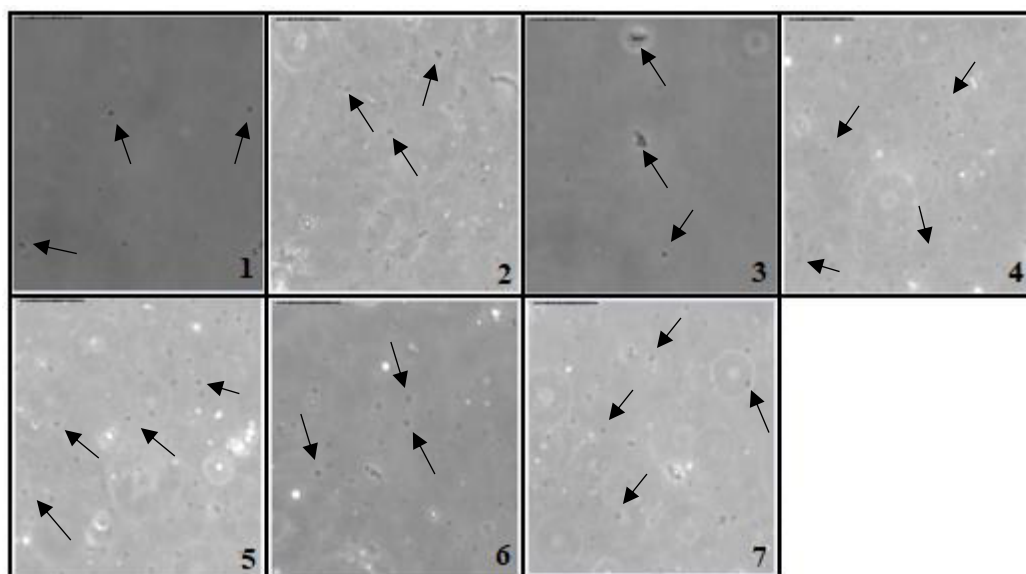
Leitura	Diâmetro Efetivo (nm)	PDI	Diâmetro Médio (nm)	PDI Médio
1	294,6	0,254	265,47	0,3717
2	239,3	0,411		
3	262,5	0,450		

Fonte: Própria autora.

4.2 Microscopias

As sete amostras resultantes da técnica troca de solventes foram analisadas em um microscópio de contraste de fase, invertido e de fluorescência muito usado na visualização de lipossomos gigantes. Na Figura 35 pode-se observar uma imagem para cada uma das amostras. Os pontos mais escuros são fortes indícios de polimerossomos, visto que o interior aquoso não reflete a luz do microscópio. Entretanto, as partículas mais claras indicam agregados poliméricos densos, de interior sólido, inapropriados para serem usados como encapsuladores de substâncias.

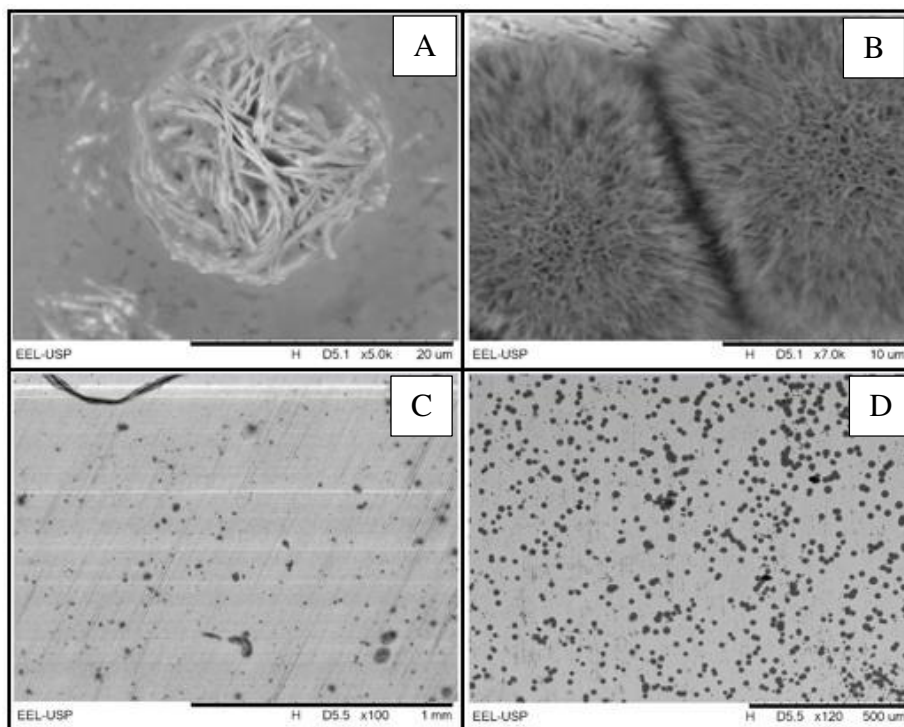
Figura 35 – Imagens dos resultados da Troca de Solventes, obtidas por Microscopia Óptica de Contraste de Fase. As setas indicam morfologias de cerca de 100 nm com interior oco, característica que, no microscópio, confere com escura à partícula.



Fonte: Própria autora.

Imagens de quatro amostras diferentes foram obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) do Campus 2 da EEL-USP. As seguintes amostras foram visualizadas no equipamento: A) Experimento 6 da hidratação de filme; B) Experimento 1 da troca de solventes; C) Experimento 1 da troca de solventes após uma passagem pelo filtro nanoporoso hidrofílico; D) Experimento 1 da troca de solventes após uma passagem pelo filtro nanoporoso hidrofílico e 1 minuto de sonicação em ultrassom. Algumas capturas obtidas pelo microscópio Hitachi TM 3000 estão mostradas na Figura 36.

Figura 36 – Imagens obtidas por MEV para resultados obtidos por A) Hidratação de filme; B) Troca de solventes; C) Troca de solventes + extrusão; D) Troca de solventes + extrusão + sonicação



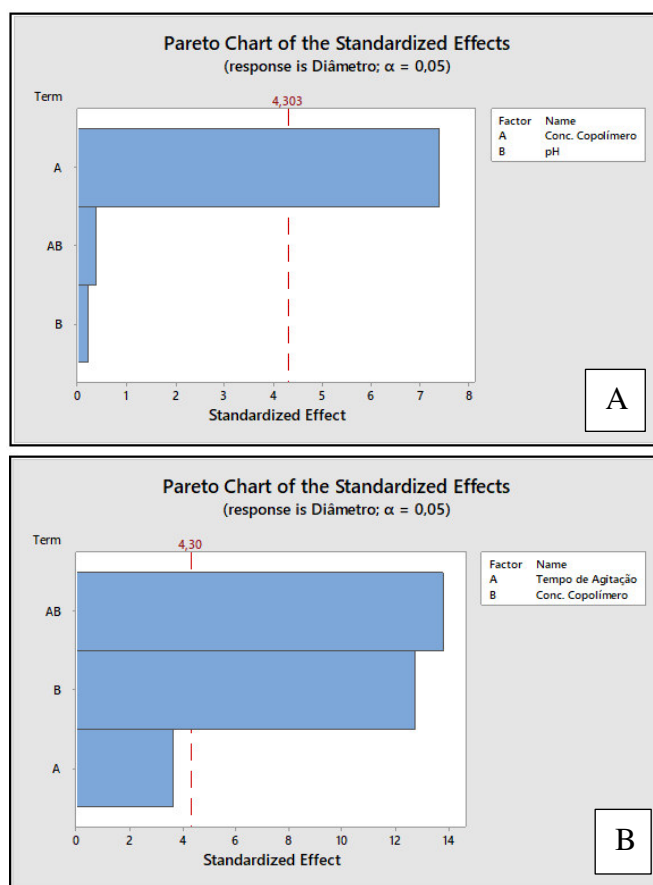
Fonte: Própria autora.

Pode-se observar que as morfologias adquiridas com as técnicas de troca de solventes mais extrusão e acrescidas de um minuto de sonicação são partículas de tamanhos similares e em bastante quantidade, vide Figura 35D. Muito provavelmente por que a adição de forças de cisalhamento a um sistema que contém agregados de tamanhos maiores (Figura 35C), faz com que estes agregados se quebrem e se auto arranjem em outras conformações, como por exemplo em vesículas.

4.3 Influência das variáveis

A análise da influência causada pelas variáveis de cada uma das técnicas foi fornecida por um gráfico de Pareto que traça a correlação entre a resposta escolhida, diâmetro hidrodinâmico médio das partículas, e as variáveis independentes de cada técnica. Plotando no Minitab os diâmetros médios das tabelas 8 e 10, os gráficos de Pareto fornecidos indicaram que, para as duas técnicas (troca de solventes e hidratação de filme) o fator de maior impacto foi a concentração de copolímero utilizada (Figura 37).

Figura 37 - Gráfico de Pareto para A) Troca de Solventes; B) Hidratação de Filme.



Fonte: Própria autora.

Sabendo-se disso e analisando-se os diâmetros médios efetivos resultantes de cada experimento, pode-se dizer que as concentrações de menores valores apresentaram melhores resultados, ou seja, partículas com diâmetros hidrodinâmicos perto de 100 nm. Isso porque este é um valor experimentalmente esperado para vesículas poliméricas, assim como estudado e relatado por Shein e Eisenberg (2002). Além disso, a técnica de troca de solventes se destacou por apresentar diâmetros menores e fornecer vesículas mais estáveis, visto que após poucos dias, algumas amostras de hidratação de filme foram passadas novamente por DLS e mostraram resultados diferentes dos obtidos a princípio (vide Tabela 16), algo que não aconteceu com as amostras obtidas por troca de solventes. Portanto, a técnica que mostrou melhor desempenho foi a de troca de solventes.

Tabela 16 – DLS do experimento 6 de hidratação de filme após 4 dias desde o preparo.

Exp	Diâmetro (nm)			Média - Brookhaven (nm)
6	123,9	117,1	280,5	120,5 ± 3,4000

Fonte: Própria autora.

4.4 Escolha do experimento final

Um último experimento foi realizado, com a técnica de melhor desempenho e as variáveis mais adequadas para ela. Portanto, foi realizada a formação via Troca de Solventes, com a menor concentração e menor pH.

Para a troca de solventes, percebe-se que ao aumentar a concentração do copolímero, aumenta-se sobremaneira a formação de partículas maiores, enquanto que a concentração escolhida como nível mais baixo, mostrou diâmetros esperados. Em todos os casos observou-se baixa dispersão do tamanho das partículas. Como pode ser observada por microscopia, viu-se a presença de partículas esféricas nos diâmetros fornecidos por DLS, além da presença de vários agregados densos nos pontos centrais (morfologias que na microscopia mostram cor bastante clara e refletem à luz). Confirmando que os grandes diâmetros resultantes dos pontos centrais (5, 6 e 7) e das sínteses em que foi usada alta concentração de copolímero (2 e 4) na verdade não se referiam às vesículas ocas e sim a agregados densos.

Para a metodologia de hidratação de filme, observou-se um empecilho da reprodutibilidade da leitura por espalhamento de luz dinâmico, encontrando vez ou outra resultados diferentes de diâmetros médios para a mesma amostra, além de altos valores para a distribuição destes tamanhos. Recorrendo à literatura, este resultado era esperado, visto que o filme polimérico, vez ou outra, pode se descolar da parede em que foi formado e ficar disperso em forma de massa polimérica, e essas massas poliméricas têm formatos aleatórios e, portanto, tamanhos diversos. Também segundo a literatura, o tempo de agitação poderia ter grande impacto. Para este copolímero, não foi tão significativo quando analisado isoladamente (como aconteceu com o impacto da concentração) mas quando associado com esta última variável, mostrou desempenho perceptível. Provavelmente, um maior tempo de agitação beneficie a formação da morfologia desejada; situação coerente com a revisão bibliográfica da técnica.

A última técnica realizada, a de extrusão, foi realizada na sequência da metodologia que apresentava maior dispersão de tamanhos, a de hidratação de filme. Isto porque, na revisão bibliográfica, a técnica de extrusão diminui essa característica das amostras. Entretanto, neste trabalho, a técnica não forneceu resultados promissores. Até mesmo para o menor número de passagens pela membrana não foram obtidas partículas detectáveis pelo equipamento (Brookhaven Zeta Plus/BI-PALS). Os resultados podem ser uma indicação de que as partículas se romperam e ficaram solubilizadas, ou seja, não agrupadas em nenhuma morfologia. Isto porque os diâmetros hidrodinâmicos médios fornecidos não ultrapassaram a medida de 1nm. Uma sugestão para trabalhos futuros a cerca desta metodologia é variar, também, a membrana utilizada na extrusão, além do número de passagens ou até mesmo outro copolímero.

Como proposto, repetiu-se o experimento com diâmetros mais próximos dos encontrados nas literaturas (que é próximo de 100nm): o da Amostra 1 de Troca de Solventes (descrito previamente no planejamento de experimentos) e analisou-se por DLS no equipamento Brookhaven. A cargo de curiosidade, a solução resultante foi passada por um filtro de membrana nanoporosa de Nylon hidrofílico e foi averiguado o efeito sobre o tamanho das partículas e sobre a polidispersidade. Uma última etapa de sonicação foi realizada, afim de analisar o mesmo efeito. Os resultados fornecidos por DLS estão mostrados na Tabela 17. O experimento 1 se refere à troca de solventes sem adição de nenhuma outra técnica; o experimento 2 se refere à troca de solventes e uma passagem por membrana nanoporosa; o experimento 3 se refere à troca de solventes mais extrusão mais sonicação.

Tabela 17 - Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade para o experimento final.

Experimento	Diâmetro (nm)	Média - Brookhaven (nm)	Desvio Padrão	Polidispersidade	Média - Brookhaven	Desvio Padrão
1	241,5	243,63 ± 2,8728	2,8728	0,190	0,1923 ± 0,0339	0,0339
	242,5			0,235		
	246,9			0,152		
2	207,4	208,93 ± 1,0964	1,0964	0,083	0,1027 ± 0,0199	0,0199
	209,5			0,095		
	209,9			0,130		
3	206,3	206,97 ± 0,5312	0,5312	0,166	0,1523 ± 0,0244	0,0244
	207,0			0,173		
	207,6			0,118		

Fonte: Própria autora.

Observa-se que a sonicação final não produziu efeitos significativos na amostra. Entretanto, a extrusão diminuiu em 14,24% o tamanho das partículas e reduziu em 46,6% a polidispersidade média. O impacto sobre a polidispersidade pode ser bastante interessante do ponto de vista da aplicação, visto que favorece a produção de vesículas mais homogêneas.

5 CONCLUSÃO

Com a realização dos experimentos pode-se concluir que os objetivos foram alcançados e que foi possível a formação dos polimerossomos utilizando-se um copolímero anfipático de PDMAEMA-*co*-PHEMA-*b*-PS por meio de três técnicas diferentes. Além disso, também foi observada e analisada a influência dos métodos escolhidos sobre o diâmetro hidrodinâmico das partículas e, posteriormente, traçada uma comparação quanto a esse parâmetro.

Os polimerossomos formados foram observados por microscopia e pôde-se observar a formação da morfologia esférica com relativa baixa polidispersidade de tamanhos através das imagens obtidas. Com a caracterização das sínteses por espalhamento dinâmico de luz, foi possível identificar tanto partículas com diâmetros esperados quanto partículas fora dessa faixa, bem como determinar quão homogêneas eram estas partículas.

Os resultados mostraram que, para o copolímero em questão, a técnica em que se obteve diâmetros hidrodinâmicos médios coerentes com a literatura, além de menores valores de polidispersidade, foi a da troca de solventes e também mostraram que utilizar baixa concentração do copolímero seria mais adequado. Quanto ao pH da solução em que ocorre a dispersão do solvente orgânico, constatou-se pouco impacto, entretanto foi escolhido o menor valor (pH 4) como preferencial. Para a metodologia de hidratação de filme, não foi possível constatar via imagens a presença da morfologia vesicular, entretanto algumas sínteses (5, 6 e 7, que se referem aos pontos centrais) se mostraram promissoras no que se refere ao diâmetro médio das partículas e a polidispersidade, quando usadas concentrações médias do copolímero para a formação do filme. Enquanto isso, com a técnica de extrusão (associada ao planejamento de experimentos para ela) não se obteve o sucesso esperado. É possível que a membrana utilizada não tenha sido adequada ou que as características do copolímero não sejam compatíveis com a quantidade de passagens realizada.

Por fim, o último experimento realizado, com a técnica de troca de solventes e uma posterior extrusão e sonicação mostrou resultados auspiciosos que foram comprovados por microscopia eletrônica de varredura. Para o copolímero utilizado, pode-se dizer que essa combinação de técnicas e variáveis foi bem sucedida.

REFERÊNCIAS

- AVESTIN. **LiposoFast**. 2019. Disponível em: <https://www.avestin.com/liposome%20extruders.htm>. Acesso em: 05 jul. 2019.
- BATTAGLIA, G.; RYAN, A. J. Pathways of polymeric vesicle formation. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 21, p. 10272-10279, 2006.
- BLANAZS, A.; ARMES, S. P.; RYAN, A. J. Self-assembled block copolymer aggregates: From micelles to vesicles and their biological applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 30, n. 4-5, p. 267-277, 2009.
- BRAGA, M.; LEITE, C. A. P.; GALEMBECK, F. Hydrophobic polymer modification with ionic reagents: Polystyrene staining with water-soluble dyes. **Langmuir**, v. 19, n. 18, p. 7580-7586, 2003.
- CANEVAROLO JR, S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 1. ed. São Paulo: Artliber, 2004. 448 p.
- CAROTHERS, W. H. Studies on polymerization and ring formation. I. An introduction to the general theory of condensation polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 51, n. 8, p. 2548-2559, 1929.
- CERRITELLI, S. et al. Thermodynamic and kinetic effects in the aggregation behavior of a poly(ethylene glycol-b-propylene sulfide-b-ethylene glycol) ABA triblock copolymer. **Macromolecules**, v. 38, n. 18, p. 7845-7851, 2005.
- CHEN, J. et al. EpCAM-antibody-labeled noncytotoxic polymer vesicles for cancer stem cells-targeted delivery of anticancer drug and siRNA. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 6, p. 1695-1705, 2015.
- CORNELISSEN, J. J. L. M. et al. Helical superstructures from charged poly(styrene)-poly(isocyanodipeptide) block copolymers. **Science**, v. 280, n. 5368, p. 1427-1430, 1998.
- DISCHER, B. M. et al. Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. **Science**, v. 284, n. 5417, p. 1143-1146, 1999.
- DU, J. et al. pH-sensitive vesicles based on a biocompatible zwitterionic diblock copolymer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 51, p. 17982-17983, 2005.
- ERHARDT, R. et al. Amphiphilic Janus micelles with polystyrene and poly(methacrylic acid) hemispheres. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 11, p. 3260-3267, 2003.
- FETSCH, C.; GAITZSCH, J.; MESSENGER, L.; BATTAGLIA, G.; LUXENHOFER, R. Amphiphilic block copolypeptoids – micelles, worms and polymersomes. **Scientific Reports**, v. 6, n. 33491, 2016.

FLORENZANO, F. H. **Polimerização via radical controlada e caracterização avançada de polímeros na construção de novos materiais poliméricos funcionais**. 2016. 50 p. Tese (Livre-docência) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.

FRAZER, R. Q. et al. PMMA: an essential material in medicine and dentistry. **Journal of Long-Term Effects of Medical Implants**, v. 15, n. 6, p. 629-639, 2005.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 1004 p.

GONZATO, C., et al. Rational synthesis of low-polydispersity block copolymer vesicles in concentrated solution via polymerization-induced self-assembly. **Journal of the American Chemical Society** v. 136, n. 31, p. 11100-11106, 2014.

GRZELAKOWSKI, M. et al. Immobilized protein-polymer nanoreactors. **Small**, v. 5, n. 22, p. 2545-2548, 2009.

HAUSCHILD, S. et al. Direct preparation and loading of lipid and polymer vesicles using inkjets. **Small**, v. 1, n. 12, p. 1177-1180, 2005.

HAYWARD, R. C. et al. Dewetting instability during the formation of polymersomes from block-copolymer-stabilized double emulsions. **Langmuir**, v. 22, n. 10, p. 4457-4461, 2006.

JENEKHE, S. A.; CHEN, X. L. Self-assembled aggregates of rod-coil block copolymers and their solubilization and encapsulation of fullerenes. **Science**, v. 279, n. 5358, p. 1903-1907, 1998.

KENNEDY, J. A.; TAYLOR, A. W. Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 995, n. 1-2, p. 99-107, 2003.

KITA-TOKARCZYK, K.; GURMELARD, J.; HAEFELE, T.; MEIER, W. Block copolymer vesicles – using concepts from polymer chemistry to mimic biomembranes. **Polymer**, v. 46, n. 11, p. 3540-3563, 2005.

KOIDE, A. et al. Semipermeable polymer vesicle (PICsome) self-assembled in aqueous medium from a pair of oppositely charged block copolymers: physiologically stable micro-/nanocontainers of water-soluble macromolecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 18, p. 5988-5989, 2006.

LE MEINS, J.-F.; SANDRE, O.; LECOMMANDOUX, S. Recent trends in the tuning of polymersomes' membrane properties. **European Physical Journal E**, v. 34, n. 14, p. 1-34, 2011.

LEE, J. C. et al. Preparation, stability, and in vitro performance of vesicles made with diblock copolymers. **Biotechnology and bioengineering**, v. 73, n. 2, p. 135-145, 2001.

LEITE, J. A. **Estudo do perfil químico de apreensões de maconha por RMN de ^1H e outras técnicas analíticas**. 2017. 222 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2017.

LORENCEAU, E. et al. Generation of polymersomes from double-emulsions. **Langmuir**, v. 21, n. 20, p. 9183-9186, 2005.

LOU, X.; VAN COPPENHAGEN, C. Mechanical characteristics of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels crosslinked with various difunctional compounds **Polymer International**, v. 50, n. 3, p. 319-325, 2001.

MABROUK, E.; CUVELIER, D.; BROCHARD-WYART, F.; NASSOY, P.; LI, M. Bursting of sensitive polymersomes induced by curling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 18, p. 7294-7298, 2009a.

MABROUK, E.; CUVELIER, D.; PONTANI, L.; XU, B.; LÉVY, D.; KELLER, P.; BROCHARD-WYART, F.; NASSOY, P.; LI, M. Formation and material properties of giant liquid crystal polymersomes. **Soft Matter**, v. 5, n. 9, p. 1870-1878, 2009b.

MARGUET, M.; SANDRE, O.; LECOMMANDOUX, S. Polymersomes in "gelly" polymersomes: toward structural cell mimicry. **Langmuir**, v. 28, n. 4, p. 2035-2043, 2011.

MATYJASZEWSKI, K.; XIA, J. Atom transfer radical polymerization. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 9, p. 2921-2990, 2001.

MATYJASZEWSKI, K.; DAVIS, T. P. **Handbook of radical polymerization**. 1st ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003. 936 p.

MENGER, F. M.; ANGELOVA, M. I. Giant vesicles: imitating the cytological processes of cell membranes. **Accounts of Chemical Research**, v. 31, n. 12, p. 789-797, 1998.

MOAD, G.; RIZZARDO, E.; THANG, S. H. Living radical polymerization by the RAFT process – a second update. **Australian Journal of Chemistry**, v. 62, n. 11, p. 1402-1472, 2009.

MOZAFARI, M. R. **Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications**. 1st ed. Victoria: Springer, 2007. 162 p.

NAPOLI, A.; BOERAKKER, M. J.; TIRELLI, N.; NOLTE, R. J. M.; SOMMERDIJK, N. A. J. M.; HUBBELL, J. A. Glucose-oxidase based self-destructing polymeric vesicles. **Langmuir**, v. 20, n. 9, p. 3487-3491, 2004a.

NAPOLI, A.; VALENTINI, M.; TIRELLI, N.; MÜLLER, M.; HUBBELL, J. A. Oxidation-responsive polymeric vesicles. **Nature Materials**, v. 3, n. 3, p. 183-189, 2004b.

NARDIN, C. et al. Nanoreactors based on (polymerized) ABA-triblock copolymer vesicles. **Chemical Communications**, n. 15, p. 1433-1434, 2000.

OLTRA, N. S.; NAIR, P.; DISCHER, D. E. From stealthy polymersomes and filomicelles to "self" peptide-nanoparticles for cancer therapy. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 5, p. 281-299, 2014.

POWER-BILLARD, K. N., SPONTAK, R. J.; MANNERS, I. Redox-active organometallic vesicles: aqueous self-assembly of a diblock copolymer with a hydrophilic polyferrocenylsilane polyelectrolyte block. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 43, n. 10, p. 1260-1264, 2004.

RADULESCU, D.; SCHWADE, N.; WAWRO, D. Uniform paclitaxel-loaded biodegradable microspheres manufactured by ink-jet technology. THE WINTER SYMPOSIUM AND 11TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN DRUG DELIVERY SYSTEMS, 11., 2003, Salt Lake City. **Proceedings...** Salt Lake City: MicroFab Technologies, Inc., 2003. p. 1-5.

RIEGER, J. Guidelines for the synthesis of block copolymer particles of various morphologies by RAFT dispersion polymerization. **Macromolecular Rapid Communication**, v. 36, n. 16, p. 1458-1471, 2015.

SCHENNING, A. P. H. J. et al. Amphiphilic dendrimers as building blocks in supramolecular assemblies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 30, p. 8199-8208, 1998.

SHEN, H.; EISENBERG, A. Morphological phase diagram for a ternary system of block copolymer PS₃₁₀-b-PAA₅₂/Dioxane/H₂O. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 44, p. 9473-9487, 2002.

SHUM, H. C.; KIM, J. W.; WEITZ, D. A. Microfluidic fabrication of monodisperse biocompatible and biodegradable polymersomes with controlled permeability. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 29, p. 9543-9549, 2008.

SOO, P. L.; EISENBERG, A. Preparation of block copolymer vesicles in solution. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 42, n. 6, p. 923-938, 2004.

TANNER, P. et al. Polymeric vesicles: from drug carriers to nanoreactors and artificial organelles. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 1039-1049, 2011.

YOUNG, C. D.; WU, J. R.; TSOU, T. L. High-strength, ultra-thin and fiber-reinforced pHEMA artificial skin. **Biomaterials** v. 19, n. 19, p. 1745-1752, 1998.

ZHANG, L.; EISENBERG, A. Multiple morphologies of "crew-cut" aggregates of polystyrene-b-poly(acrylic acid) block copolymers. **Science**, v. 268, n. 5218, p. 1728-1731, 1995.

ZHANG, C.; MARIC, M. Synthesis of stimuli-responsive, water-soluble poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate/styrene] statistical copolymers by nitroxide mediated polymerization. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1398-1422, 2011.

ZHU, Y. et al. Polymer vesicles: mechanism, preparation, application, and responsive behavior. **Progress in Polymer Science**, v. 64, p. 1-22, 2017.