

Fernanda Hoelscher

**DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA DE FILMES E
NANOPARTÍCULAS DE POLI(TIOÉTER-ESTER)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Sayer

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araujo

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Hoelscher, Fernanda

Degradação Hidrolítica de Filmes e Nanopartículas de Poli (Tioéter-Ester)
/ Fernanda Hoelscher ; orientadora, Claudia Sayer ; coorientador, Pedro Henrique Hermes de Araujo. Florianópolis – SC – 2016.
96 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referência

1. Engenharia Química. 2. Poly(thioether-ester). 3. Nanoparticles. 4. Degradation. 5. Hydrolysis. I. Sayer, Claudia. II. de Araujo, Pedro Henrique Hermes. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Fernanda Hoelscher

**DEGRADAÇÃO HIDROLÍTICA DE FILMES E
NANOPARTÍCULAS DE POLI(TIOÉTER-ESTER)**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 18 de Março de 2016.

Prof.^a Cíntia Soares, Dr.^a.
Coordenadora do Curso

Prof.^a Claudia Sayer, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Pedro Henrique Hermes de Araújo, Dr.
Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof. Marco Di Luccio, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Aleksandra Valério, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Débora de Oliveira, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que mesmo a distância estavam sempre presentes no meu dia a dia, me dando forças para sempre buscar mais, por todo amor, compreensão e por entenderem minha ausência. Aos meus irmãos, Rafael e Vitor, por todo companheirismo, amizade, paciência e carinho. Amo vocês.

Aos meus orientadores, Claudia Sayer e Pedro Henrique Hermes de Araujo, pela confiança depositada em mim, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por todo conhecimento a mim repassado, pela amizade, flexibilidade, ensinamentos e pela paciência.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Processos (LCP) pela amizade, companheirismo, risadas, troca de ideias, pelo aprendizado diário e por toda ajuda.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) pelas análises de MEV realizadas. Ao Laboratório de Polímeros e Compósitos (POLICOM) pelas análises de FTIR-ATR. Ao Laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos (PROFI) pelas análises de DSC.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, em especial ao LCP, por todos os recursos disponibilizados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

*«Ce n'est pas parce que les choses sont
difficiles que nous n'osons pas, c'est parce
que nous n'osons pas qu'elles sont difficiles »*

Sénèque

RESUMO

Materiais poliméricos sintéticos biodegradáveis apresentam-se como uma alternativa na substituição de polímeros naturais, uma vez que podem ser sintetizados de modo a apresentar as características desejadas para diversas aplicações finais. Estes materiais têm se mostrado promissores para a liberação sustentada de fármacos e, dentre os mecanismos de síntese, as polimerizações via reações de adição tiol-eno, utilizando como base monômeros com ligações α , ω -dieno diéster de origem renovável, têm chamado a atenção uma vez que permitem a adição de grupos funcionais desejados na cadeia polimérica e ainda a adição do grupo tiol ao dieno contribui para um maior grau de degradabilidade do material. Neste contexto, nanopartículas e filmes de poli(tioéter-éster) foram obtidas e então avaliadas quanto ao seu potencial de degradação à 37 °C em meio com ácido clorídrico (HCl) (0,01 M, pH 2,8) e solução tampão fosfato (PBS) (0,2 M, pH 7,4) com e sem adição da enzima lipase B de *Candida Antarctica*. As nanopartículas foram sintetizadas por polimerização em miniemulsão via tiol-eno utilizando dois monômeros: α , ω -dieno diéster diundeca-10-enoato de dianidro-D-glucitila (DGU) proveniente de fonte renovável (óleo de mamona e amido) e o monômero derivado de óleo vegetal α , ω -dieno diéster 1,3-propileno diundeca-10-enoato (Pd10e). Para as partículas oriundas de DGU, obteve-se tamanho de partícula em intensidade de 190 nm e índice de polidispersão (PdI) de 0,18, Tm de 64 °C, com propriedades de polímero semi cristalino e massa molar ponderal média de 20 kDa. As nanopartículas oriundas do monômero Pd10e revelaram tamanho de 150 nm e PdI de 0,1, com uma Tm de 70 °C, apresentando comportamento de dupla fusão cristalina e massa molar de 38 kDa. A degradação destes materiais em meio enzimático foi acentuada para as nanopartículas, comprovando a hidrólise através da diminuição na intensidade da banda característica da ligação éster por análises de grupos funcionais e a formação de alguns produtos. Análises de massa molar mostraram que as nanopartículas oriundas do monômero Pd10e apresentaram uma degradação mais rápida, reduzindo 90% o valor da massa molar logo ao entrar em contato com a enzima, quando comparado ao sintetizado com o DGU, que foi de 90% em 240 horas, devido a sua estrutura molecular. Em meio ácido, também pôde-se observar redução de massa molar, sendo 14% maior a redução de massa molar das nanopartículas oriundas do Pd10e quando comparado com as oriundas de DGU também degradadas em meio ácido, durante 3 meses. Para o meio com PBS, não foram encontradas alterações durante 3

meses de estudo, sendo necessários maiores tempo de degradação. As nanopartículas de poli(tioéter-éster) provenientes de fontes renováveis mostraram-se biodegradáveis e promissoras para estudo na liberação sustentada de fármacos.

Palavras-chave: Poli(tioéter-éster), Nanopartículas, biodegradação; Hidrólise; Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Biodegradable synthetic polymeric materials are presented as a good alternative in replacement of natural polymers, since it can be synthesized in order to have desired characteristics to many final applications. These materials have shown promising to sustained drug release and, between mechanisms of synthesis, polymerizations via thiol-ene, using α , ω -diene diester monomers from renewable sources have drawn attention. Its reactions allow the desired functional groups addition into polymeric chain, i.e., ester, ether, amine groups; plus the addition of thiol group to diene contributes to a higher biodegradability degree of synthesized material. In this context, nanoparticles and films of poly (thioether-ester) were obtained in laboratory and then, evaluated as its potential degradation at 37°C in acid medium with hydrochloric acid (HCl) (0.01M, pH 2.8), phosphate buffer solution (PBS) (0.2M, pH 7.4) without and with addition of the lipase B enzyme of *Candida Antarctica*. Nanoparticles were synthesized by polymerization in miniemulsion via thiol-ene using two renewable monomers α , ω -diene diester diundec-10-enoate of dianidre-D-glucitile (DGU) from castor oil and starch, and a monomer from vegetable oil α , ω -diene diester 1,3-propylene diundec-10-enoate (Pd10e). Particle average size of the DGU nanoparticles were 190 nm and polydispersity index (PdI) of 0.18, with a melting point of 64°C and thermic behavior of a polymer semi-crystalline and molar mass of 20 kDa. Nanoparticles from Pd10e had a particle size of 150 nm and PdI of 0.1, with melting point of 70°C showing double crystalline melting and molar mass of 38 kDa. In formation of polymeric films was used bulk polymerization with DGU monomer. The degradation of these materials was accentuated for nanoparticles in enzymatic medium, showing the hydrolysis of ester bonds and also the direct influence of surface area in polymeric material degradation, in comparison to the polymeric films, which did not show weight loss even after three months of degradation assay. Molar mass analysis indicated that the polymer derived from Pd10e presented a faster degradation, obtaining 90% of molar mass reduction in first contact with the enzyme, when compared to polymer from DGU, which had a mass loss of 90% in 240 hours, due its molecular structure. In acid medium, also could be observed a molar weight reduction, which had a higher reduction, around 14%, for Pd10e nanoparticles in comparison of those from DGU, also in acid medium, during 3 months. In PBS medium was not found alterations, with necessity of higher degradations periods.

Key-words: Poly(thioether-ester); Nanoparticles; Degradation, Hydrolysis; Enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do mecanismo de hidrólise para o PLA e PLGA.	31
Figura 2 - Mecanismo da reação de adição tiol-eno.....	39
Figura 3 - Estruturas moleculares dos monômeros (a)DGU e (b)Pd10e40	
Figura 4 - Diferença entre nanocápsulas e nanoesferas.....	42
Figura 5 - Esquema do procedimento da polimerização em miniemulsão	44
Figura 6 - Estruturas moleculares do polímero oriundo do (a)DGU e (b) Pd10e.....	48
Figura 7 - Esquema do procedimento de preparo e polimerização em miniemulsão.	50
Figura 8- Distribuição do tamanho de partícula para as polimerizações em miniemulsão via reações tiol-eno para o P1. Razão DGU:Bu(SH) ₂ 1:1.....	54
Figura 9 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas sintetizadas via reações tiol-eno para P1. Razão molar DGU:Bu(SH) ₂ 1:1.	54
Figura 10 – Espectros de FTIR-ATR para os polímeros M01 e M02. Reação durante 4 horas, a 80 °C. Razão DGU- Bu(SH) ₂ 1:1.....	55
Figura 11 - Curva de DSC do polímero P1.	56
Figura 12 - Distribuição do tamanho de partículas para as polimerizações em miniemulsão via reações tiol-eno do P2. Razão Pd10e:Bu(SH) ₂ 1:1.	57
Figura 13 – Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas de P2 sintetizadas via reações tiol-eno. Razão molar Pd10e:Bu(SH) ₂ 1:1.	58
Figura 14 - Curva de DSC do polímero P1.	58
Figura 15 - Espectro ATR-FTIR do polímero P2.....	59
Figura 16 - Tamanho de partícula e dispersão em função do tempo de degradação para látices do P1 (a) M02 em meio enzimático com CalB (5% enzima em relação ao polímero) (b) M01 meio com PBS (0,2 M, pH 7,4) e HCl (0,01 M; pH 2,8).	64
Figura 17 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as amostras do P1 após degradação (a) partículas em meio com PBS (12 semanas); (b) partículas em meio com HCl (12 semanas); (c) partículas em meio enzimático (240h).....	66
Figura 18 - Decréscimo no valor da massa molar ponderal (Mw) do polímero P1 em (a) meio com enzima Lipase CalB (b) meio com PBS e HCl.....	66

Figura 19 - Distribuição da Massa Molar (sinal normalizado) em função do tempo de retenção do polímero inicial P1 e após degradação. Meio de degradação com enzima CalB (relação enzima/polímero 5%).	68
Figura 20 - Distribuição da Massa Molar (sinal normalizado) em função do tempo de retenção para polímero inicial, P1, e após degradação. Meio de degradação com PBS (0,2M, pH 7,4).....	68
Figura 21 - Distribuição da Massa Molar (sinal normalizado) em função do tempo de retenção para polímero inicial, P1, e após degradação. Meio de degradação com HCl (0,01M, pH 2,8).	69
Figura 22 - Espectros FTIR-ATR do polímero inicial P1 e após degradação. Degradação foi avaliada em 37 °C, pH 7,4, relação enzima/polímero 5% (m/m).	70
Figura 23 - Espectros FTIR-ATR do polímero inicial P1 e após degradação em meio com HCl (pH 2,8) e PBS (pH 7,4). Degradação foi avaliada em 37°C.	70
Figura 24 – Curvas de Calorimetria Diferencial de Varredura mostrando as temperaturas de fusão cristalina para o polímero P1 antes e após degradação nos diferentes meios estudados.....	71
Figura 25 - Perda de massa para os filmes de DGU degradados (a) Meio enzimático; (b) Meio com PBS e HCl.....	72
Figura 26 - Tamanho de partícula (Dp) e dispersão (PdI) em função do tempo de tempo de degradação para os látices de P2 (a) meio enzimático com CalB (7% enzima em relação ao polímero; atividade enzimática 2 U/g) (b) meio com PBS (0,2 M, pH 7,4) e HCl (0,01 M; pH 2,8).	73
Figura 27 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as amostras de P2 após degradação; (a) meio com PBS (12 semanas); (b) meio com HCl (12 semanas); (c) meio com CalB (48 horas)	74
Figura 28 - Decréscimo no valor da massa molar ponderal (Mw) para o P2 em (a) meio com Calb e (b) HCl.....	75
Figura 29 - Distribuição da massa molar (sinal normalizado) em função do tempo de retenção do polímero P2 antes após degradação. Meio de degradação Enzima CalB (relação enzima/polímero 7%).....	76
Figura 30 - Distribuição da massa molar (sinal normalizado) em função do tempo de retenção do polímero P2 antes após degradação. Meio de degradação com PBS (0,2 M; pH 7,4)	76
Figura 31 - Distribuição da massa molar (sinal normalizado) em função do tempo de retenção do polímero P2 antes após degradação. Meio de degradação com HCl (pH 2,8).	77
Figura 32 - Espectros FTIR-ATR do polímero P2 antes e após degradação em meio com CalB. Degradação foi avaliada em 37 °C, pH 7,4, relação enzima/polímero 7%.....	77

Figura 33 - Espectros FTIR-ATR do polímero P2 antes e após degradação em meio PBS e HCl. Ensaio realizado em 37°C.78

Figura 34 – Curvas de calorimetria diferencial de varredura para o polímero P2 antes e após degradação nos diferentes meios estudados.78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulação da polimerização em miniemulsão utilizando como monômero DGU. Razão molar DGU-Bu(SH) ₂ 1:1.....	49
Tabela 2- Formulação da polimerização em miniemulsão utilizando como monômero Pd10e. Razão Molar Pd10e-Bu(SH) ₂ 1:1.....	50
Tabela 3 - Formulação da polimerização em massa utilizando como monômero DGU. Razão molar DGU-Bu(SH) ₂ 1:1.....	51
Tabela 4 - Valores de massa molar média numérica e ponderal obtidos para dois látices sintetizados a 80 °C por 4 h via polimerização em miniemulsão.	53
Tabela 5 - Tamanho de partícula e dispersão obtidos por DLS antes e após polimerização a 80 °C por 4 horas para as miniemulsões. Relação DGU:Bu(SH) ₂ 1:1. Desvio obtido do próprio equipamento, n= 3.....	53
Tabela 6 - Valores do diâmetro de partícula e dispersão, antes e polimerização em banho termostático a 80 °C por 4 horas. Relação Pd10e:Bu(SH) ₂ 1:1. Desvio obtido do próprio equipamento, n= 3....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIBN	2,2-azo-bis-isobutironitril
Bu(SH) ₂	1,4 - Butanoditiol
DGU	Diundec- 10-enoato de dianidro-D-glucitila
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
D _p	Diâmetro de partícula (nm)
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura (<i>Differential scanning calorimetry</i>)
FTIR- ATR	Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada com Transformada de Fourier
HCl	Ácido clorídrico
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel (<i>Gel Permeation Chromatography</i>)
kDa	Quilodalton
Lut.	Lutensol
LCP	Laboratório de Controle de Processos
M _n	Massa molar média numérica (Da; g/mol)
M _w	Massa molar média ponderal (Da; g/mol)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Min.	Minutos
P1	Poli-co-dianidro-D-glucitila-diundeca-10-enoato-co-1,4-butanoditiol
P2	Poli-co-1,3-propileno-diundeca-10-enoato-co-1,4-butanoditiol
NPs	Nanopartículas
PdI	Índice de Polidispersão
PBS	Solução tampão fosfato
T _m	Temperatura de fusão
THF	Tetrahidrofurano
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
W _f	Massa final
W _i	Massa inicial
W _l	Perda de Massa

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	25
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVOS	26
1.1.1 Objetivos Específicos	26
CAPÍTULO II	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 DEGRADAÇÃO DE MATERIA IS POLIMÉRICOS SINTÉTICOS	29
2.1.1 Hidrólise	32
2.1.2 Hidrólise Enzimática	35
2.2 POLIMERIZAÇÃO VIA REÇÕES TIOL-ENO	38
2.3 DEGRADAÇÃO DE POLÍMEROS SINTETIZADOS VIA REAÇÕES TIOL-ENO	40
2.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	42
2.5 POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO	43
2.6 POLIMERIZAÇÃO EM MASSA	45
2.7 CONSIDERAÇÕES REFERENTES AO ESTADO DA ARTE	45
CAPÍTULO III	47
3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS E FILMES POLIMÉRICOS DE POLI (TIOÉTER-ESTER)	47
3.1 INTRODUÇÃO	47
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	47
3.2.1 Material	47
3.2.2 Métodos	49
3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	51
3.3.1 Tamanho Médio das Partículas de Poli(tioéter-éster)	51

3.3.2 Massas Molares do Poli(tioéter-éster)	51
3.3.3 Propriedades Térmicas do Poli(tioéter-éster)	51
3.3.4 Análise dos Grupos Funcionais do Poli(tioéter-éster)	52
3.3.5 Morfologia das Nanopartículas de Poli(tioéter-éster)	52
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.4.1 Síntese das NP's de P1	52
3.4.2 Polimerização em Massa	56
3.4.3 Síntese das NP's de poli(tioéter-éster) oriundas do monômero Pd10e	56
3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
CAPÍTULO IV	61
4 DEGRADAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS E FILMES POLIMÉRICOS DE POLI (TIOÉTER-ÉSTER)	61
4.1 INTRODUÇÃO	61
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	61
4.2.1 Material	61
4.2.2 Métodos	62
4.2.3 Caracterização das amostras	63
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.3.1 Influência das condições de degradação no tamanho, dispersão, massa molar e morfologia das nanopartículas Oriundas do Monômero DGU	64
4.3.2 Degradação dos filmes poliméricos oriundos do monômero DGU	71
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
CAPÍTULO V	81
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
5.1 CONCLUSÃO	81

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
APÊNDICE	91

1 INTRODUÇÃO

Materiais poliméricos sintéticos degradáveis têm sido utilizados em diferentes áreas como no tratamento de águas residuais, produtos biotecnológicos, alimentícios e na área médica, na engenharia de tecido ósseo e em materiais de implante temporário (ZANETTI-RAMOS *et al.*, 2006; MAHAPATRO; SINGH, 2011). Nos últimos anos, estes polímeros têm sido extensivamente utilizados na área farmacêutica, na qual são desenvolvidos para a liberação sustentada de fármacos, devido às propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade que apresentam (RYDHOLM; ANSETH; BOWMAN, 2007).

A biodegradabilidade de um material pode ser definida como a decomposição gradual da cadeia polimérica, sob uma atividade biológica específica, com a formação de produtos que são facilmente metabolizados e eliminados do corpo humano (LEJA; LEWANDOWICZ, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2015) ou ainda, degradando em diferentes componentes, como dióxido de carbono, água e inorgânicos pela ação de processos enzimáticos (GOGOLEWSKI, 1992; LEJA; LEWANDOWICZ, 2010).

O conhecimento dos mecanismos de degradação do material polimérico e a avaliação dos parâmetros que o afetam tem importância crucial para tornar o sistema de liberação mais eficaz (DUNNE; CORRIGAN; RAMTOOLA, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2015). Entre estes parâmetros, estão a estrutura química do material, a área superficial, o meio em que se processa a degradação, entre outros, podendo o mecanismo de degradação ocorrer por hidrólise ou ainda ser catalisado por enzimas, sendo dependente também do local de aplicação desejado.

Diversos trabalhos tem relatado o uso de poliésteres alifáticos, como o poli (ácido lático), o poli (l-ácido lático) e o poli (D-ácido lático), o copolímero poli (ácido-lático-co-glicólico) e a policaprolactona demonstrando seu potencial de degradabilidade (PARK, 1995; DUNNE; CORRIGAN; RAMTOOLA, 2000; CHAWLA; AMIJI, 2002; PANYAM; LABHASETWAR, 2003; ZWEERS *et al.*, 2004; MOHAMMAD; REINEKE, 2013; BAIER *et al.*, 2014). Para isto, diferentes meios como ácido, básico, diferentes temperaturas (PARK, 1995; BELBELLA *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 2013) e uso de enzimas (biodegradação) (CHEN; BEI; WANG, 2000; CHAWLA; AMIJI, 2002; PENG *et al.*, 2010; BAIER *et al.*, 2014) têm sido estudados.

Na síntese de materiais poliméricos sintéticos degradáveis, o processo de polimerização via reações tiol-eno utilizando monômeros

renováveis com ligações α,ω -dieno diéster, como éster, éter e amida na cadeia principal tem se destacado nos últimos anos (RYDHOLM; ANSETH; BOWMAN, 2007; TÜRÜNÇ; MEIER, 2013). Estas reações consistem em uma polimerização radicalar na qual ocorre a adição entre um ditiol e um dieno e têm sido discutida na síntese dos polímeros por aumentar a degradabilidade do material pelas ligações sulfeto formadas e pela possibilidade de inclusão de grupos funcionais na cadeia polimérica (HOYLE; LEE; ROPER, 2004; LOWE, 2009; TÜRÜNÇ; MEIER, 2013).

Visando o encapsulamento na matriz polimérica e a liberação sustentada de fármacos, o desafio do trabalho proposto está em avaliar a degradabilidade de dois materiais poliméricos sintetizados via reações tiol-eno com diferentes áreas superficiais em diferentes meios de degradação, avaliando os principais parâmetros que influenciam este processo e caracterizar o material quanto aos grupos funcionais presentes, tamanho médio em intensidade (D_p), dispersão (PdI), morfologia das partículas e massa molar.

1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo degradar, em diferentes condições, nanopartículas de poli(tioéter-éster) sintetizadas a partir da polimerização em miniemulsão via reações tiol-eno e filmes de poli(tioéter-éster) produzidos a partir de polímeros sintetizados pela polimerização em massa, também via reação de adição tiol-eno, tendo como base monômeros de origem renovável sintetizados em laboratório.

1.1.1 Objetivos Específicos

1 – Sintetizar nanopartículas (NPs) de poli(tioéter-éster) utilizando os monômeros α , ω -dieno diéster diundeca-10-enoato de dianidro-D-glucitila (DGU) proveniente de fonte renovável (óleo de mamona e amido) e o monômero derivado de óleo vegetal α , ω -dieno diéster 1,3-propileno diundeca-10-enoato (Pd10e), ambos sintetizados pelo grupo de pesquisa. Para tal, o processo de polimerização em miniemulsão foi empregado via reações tiol-eno, utilizando formulações anteriormente avaliadas e caracterização das NPs.

2 – Preparar filmes de poli(tioéter-éster) a partir dos polímeros sintetizados via reações de adição tiol-eno em massa utilizando como monômero o DGU.

3 – Verificar se estes materiais poliméricos são degradáveis frente a diferentes condições de degradação: meio ácido, básico e com adição de enzimas.

4 – Comparar os resultados de degradação em termos de massa molar para os filmes e nanopartículas.

5 – Confrontar os resultados obtidos para os dois látices de poli (tioéter-éster) sintetizados a partir do monômero DGU e do monômero Pd10e degradados em função de massa molar, tamanho de partícula em intensidade (D_p) e a sua dispersão (PdI), grupos funcionais presentes e morfologia das partículas.

Para facilitar a compreensão e ambientar o leitor com o assunto proposto, o presente trabalho foi dividido em seis capítulos, sendo apresentada no Capítulo I, uma breve introdução e os objetivos gerais e específicos do tema proposto. O Capítulo II traz a fundamentação teórica necessária para o desenvolvimento da dissertação abordando a degradação de materiais poliméricos, conceitos sobre biodegradabilidade, hidrólise e hidrólise enzimática, polimerização via reações de adição tiol-eno, bem como a degradação de polímeros sintetizados por essa reação de adição, e ainda, os processos de polimerização em miniemulsão e em massa. O Capítulo III apresenta os materiais e métodos referentes à síntese das nanopartículas e filmes poliméricos de poli (tioéter-éster) bem como os resultados referentes à caracterização destes materiais. O estudo da degradação hidrolítica e hidrólise enzimática das NPs e filmes poliméricos, incluindo os materiais e métodos utilizados e os resultados, são descritos no Capítulo IV. O Capítulo V apresenta as conclusões gerais e sugestões para trabalhos futuros que complementem o presente estudo. Por fim, o Capítulo VI, traz as referências bibliográficas citadas ao longo do trabalho.

CAPÍTULO II

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre os assuntos relacionados ao presente trabalho. Inicialmente, serão abordados conceitos sobre degradabilidade, degradação hidrolítica e hidrólise na presença de enzimas (biodegradação) de filmes e nanopartículas, sendo feita uma breve revisão sobre trabalhos de degradação já realizados com polímeros degradáveis. A polimerização em miniemulsão via reações de adição tiol-eno utilizando monômeros com ligações α , ω -dieno diéster tem sido vista nos últimos anos como uma ferramenta eficaz na obtenção de materiais poliméricos biodegradáveis, permitindo a inserção de novos grupos funcionais, como por exemplo, éter, éster, amida na cadeia polimérica e ligações sulfeto advindas do grupo tiol, conferindo degradabilidade ao material. Conceitos de nanopartículas poliméricas (NPs), as técnicas de preparação de sistemas poliméricos, dando ênfase para polimerização em miniemulsão e para e polimerização em massa, ambas realizadas via reações tiol-eno serão ainda discutidos.

2.1 DEGRADAÇÃO DE MATERIAIS POLIMÉRICOS SINTÉTICOS

Materiais poliméricos sintéticos degradáveis, como poliuretanas, polianidridos, poliésteres, têm sido utilizados em diferentes áreas nos últimos anos como em tratamento de águas residuais, produtos biotecnológicos, alimentícios e na área médica, na engenharia de tecido ósseo e em materiais de implante temporário (TIARKS; LANDFESTER; ANTONIETTI, 2001; ZANETTI-RAMOS *et al.*, 2006; MAHAPATRO; SINGH, 2011). Estes polímeros apresentam vantagens frente aos naturais, podendo ser sintetizados por várias técnicas de polimerização (ex. em emulsão, em suspensão, em dispersão, em microemulsão, em miniemulsão, em massa ou interfacial), possibilitando a inclusão de grupos funcionais desejados ao polímero, sendo possível modular as características finais do material e serem, geralmente, biologicamente inertes (TIARKS; LANDFESTER; ANTONIETTI, 2001; NAIR; LAURENCIN, 2007; VALERIO, 2014).

Na síntese destes materiais, parâmetros como a degradabilidade e o grau de biocompatibilidade (ausência de toxicidade) devem ser

levados em conta na escolha do material polimérico a ser utilizado, sendo estes dependentes da aplicação desejada.

De acordo com Mahapatro & Song (2011) e Gonçalves *et al.*, (2015) a degradação é definida como a quebra hidrolítica ou hidrólise via enzimática, também denominada de biodegradação, das ligações poliméricas levando à formação de oligômeros e em seguida, monômeros. Ainda, segundo a *American Society for Testing and Materials* (ASTM) e outros autores, polímeros biodegradáveis são aqueles capazes de serem decompostos em diferentes componentes, como inorgânicos, dióxido de carbono, metano, biomassa e água (GOGOLEWSKI, 1992; LEJA; LEWANDOWICZ, 2010; GONÇALVES *et al.*, 2015) através da ação de processos enzimáticos, que são facilmente eliminados através das vias metabólicas do corpo humano (GONÇALVES *et al.*, 2015).

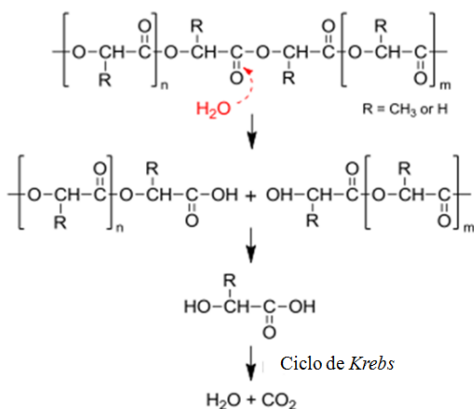
Em aplicações biomédicas, o termo degradação designa uma decomposição gradual, quebra das ligações do material polimérico, sob uma atividade biológica específica, onde estes materiais apresentam a vantagem de funcionar por um determinado período e em seguida serem degradados e eliminados do corpo humano através das vias metabólicas (ZWEERS *et al.*, 2004; AZEVEDO; REIS, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2015). Neste caso, não deve ser causador de inflamações ou reações tóxicas no local de aplicação, o tempo de degradação do material deve coincidir com o tempo de cura e/ou regeneração e os produtos de degradação devem ser facilmente metabolizados e eliminados pelo corpo humano (NAIR; LAURENCIN, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2015).

Muitas definições são encontradas na literatura diferindo ainda entre degradação e erosão sendo o processo via erosão frequentemente definido como a perda de massa do material polimérico (GOPFERICH, 1996). A erosão é ainda distinguida entre processo de erosão de superfície ou pelo mecanismo de degradação em massa (GOPFERICH, 1996; ZWEERS *et al.*, 2004), processos dependentes da taxa de difusão da água na matriz polimérica.

A erosão de superfície ocorre a uma taxa constante e é comum em polímeros altamente hidrofóbicos, sendo limitada à camada superficial, com a degradação do polímero sendo mais rápida que a difusão de água na matriz (GOPFERICH, 1996; ZWEERS *et al.*, 2004; LUCAS *et al.*, 2008). A degradação em massa dos polímeros é caracterizada pela hidrólise das ligações químicas no interior do material, seguindo três etapas: hidratação, degradação e solubilização, com a difusão de água na matriz polimérica sendo mais rápida que

solubilização dos oligômeros (GONÇALVES *et al.*, 2015). Fragmentos do polímero inteiro são quebrados e ocorrem mudanças na massa molar (ZWEERS *et al.*, 2004; LUCAS *et al.*, 2008). Este processo ocorre frequentemente para polímeros como o poli (ácido láctico) (PLA) e poli (ácido-láctico-co-glicólico) (PLGA) (GOPFERICH, 1996; LEMOINE *et al.*, 1996) os quais são degradados em ácido láctico e glicólico. O mecanismo de hidrólise para o PLGA e para o PLA é mostrado na Figura 1.

Figura 1 - Esquema do mecanismo de hidrólise para o PLA e PLGA.



Fonte: Adaptado de Gonçalves *et al.* (2015).

Já para a Policaprolactona (PCL), Chen *et al.*, (2000) observaram o mecanismo de degradação por erosão de superfície para micropartículas maiores que 13 μm degradadas em solução tampão fosfato (PBS) com e sem adição da enzima Lipase de *Pseudomonas*, enquanto que Lemoine *et al.*, (1996) e Musyanovych *et al.*, (2008) reportaram degradação ocorrendo em massa para nanopartículas com tamanho entre 130 nm e 250 nm degradadas em solução de PBS em diferentes temperaturas.

O estudo da degradação dos materiais poliméricos para aplicações biomédicas e farmacêuticas são em sua maioria realizados *in vitro* incubando o material em solução tampão fosfato (pH 7,4) a 37 °C com o intuito de aproximar o máximo possível às condições fisiológicas de degradação. Porém, o uso de enzimas e outras espécies reativas são também encontrados, favorecendo um melhor entendimento dos

mecanismos de degradação que ocorrem realmente *in vivo* (AZEVEDO; REIS, 2005).

Nas últimas três décadas muitos poliésteres alifáticos, como o PLA, incluindo o poli (1-ácido láctico) (PLLA) e o poli (D-ácido láctico) (PDLA), o copolímero poli (ácido-láctico-co-glicólico) (PLGA), e a PCL e seus copolímeros têm sido amplamente estudados e apresentam-se cada vez mais promissores em diferentes aplicações devido às suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (CHAWLA; AMIJI, 2002; SINHA *et al.*, 2004; PENG *et al.*, 2010; BAIER *et al.*, 2014). Estes polímeros apresentam ligações éster na cadeia polimérica, que quando expostas a diferentes meios, sofrem hidrólise, formando subprodutos que são metabolizados pelo corpo ou então eliminados pelo mesmo (CHANDRA; RUSTGI, 1998; RYDHOLM; ANSETH; BOWMAN, 2007). Eles apresentam tempo de meio vida podendo variar de alguns dias para anos, sendo utilizados na medicina em implantes, suturas reabsorvíveis e liberação sustentada de fármacos.

Entre os fatores que afetam os estudos *in vitro* de degradação do polímero estão a estrutura química que depende da escolha do monômero, método de síntese, composição, cristalinidade e hidrofobicidade do polímero, a massa molar (GOGOLEWSKI, 1992), a presença de impurezas e as condições do ambiente em que se processa a degradação, podendo este ser em meio aquoso, ácido, alcalino, em condições oxidativas e/ou ainda na presença de enzimas, dependente ainda da temperatura, do pH e das amostras serem mantidas incubadas sob agitação ou não (ALEXIS, 2005; MUSYANOVYCH *et al.*, 2008; CAUICH-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2015; JASINSKI *et al.*, 2016; AZEVEDO & REIS, 2005). A área de superfície apresenta-se também como parâmetro crucial neste entendimento, e estudos contraditórios para um mesmo polímero já foram reportados (SINHA *et al.*, 2004).

2.1.1 Hidrólise

A hidrólise é definida como a quebra das ligações poliméricas pela difusão gradual da água na matriz polimérica (WILLIAMS; ZHONG, 1994; AZEVEDO; REIS, 2005). A hidrólise de polímeros ocorre facilmente em polímeros hidrofílicos com ligações hidrolisáveis, e dificilmente em polímeros hidrofóbicos sem ligações hidrolisáveis. Inicialmente, a água difunde-se na matriz polimérica, o que leva a pequenas alterações na massa e nas propriedades mecânicas, como

resistência à tração, com aumento da rugosidade na superfície. Em seguida, ocorre a quebra das ligações poliméricas facilmente hidrolisáveis, formando oligômeros e monômeros, com redução da massa molar e da porosidade (AZEVEDO; REIS, 2005).

Diversos trabalhos da literatura realizaram o estudo da degradação, principalmente de nanopartículas e microesferas poliméricas, na presença de solução tampão PBS, com pH 7,4. Porém, a degradação dos polímeros pode também ser catalisada por ácidos, bases, enzimas e sais, uma vez que no corpo humano encontram-se diferentes tipos de enzimas e diferentes valores de pH, dependendo do local de aplicação desejado (PARK, 1995; PANYAM; LABHASETWAR, 2003; AZEVEDO; REIS, 2005).

Zweers *et al.*, (2004) avaliaram o efeito da composição do polímero na taxa de degradação das nanopartículas, utilizando um copolímero PEO-PLGA, PDLLA E PLGA, preparadas pela técnica *salting out* com 138 nm, 248 nm e 230 nm, respectivamente. A degradação foi avaliada em PBS, 37 °C, sendo estudada a quantidade de ácido lático e glicólico formados e a massa molar por cromatografia de permeação em gel (GPC). O copolímero PEO-PLGA foi o que apresentou maior taxa de degradação, em 8 semanas, quando comparado com o PLGA que degradou em 10 semanas e o PDLLA mostrou poucos sinais de redução de massa molar em 2 anos. Isto ocorreu em razão da fácil hidrólise da ligação éster entre o PEO-PLGA, e a hidrofiliabilidade do ácido glicólico. O copolímero apresentou agregação das partículas durante a degradação, com distribuição de tamanho multimodal, o que não ocorreu para os outros dois polímeros estudados.

Em contrapartida, Park (1995), observou que nas microesferas, os produtos ácidos (ácido lático e glicólico) de degradação necessitam um maior tempo para serem difundidos para o meio, devido à espessura da camada polimérica ocorrendo uma degradação autocatalítica. Ele observou ainda diferentes temperaturas de degradação (5, 25, 37 e 45 °C) reportando que em temperaturas maiores, taxas de degradação mais elevadas foram observadas, com um período de indução sendo apresentado nas temperaturas mais baixas. O mesmo foi observado por Dunne *et al.*, (2000), avaliando diferentes tamanhos de partícula de PLGA (< 50 µm, < 20 µm e < 1 µm), preparadas pela técnica de evaporação de solvente, onde os autores observaram também este efeito autocatalítico, onde as partículas com tamanho maior apresentaram uma maior taxa de degradação quando comparadas as < 1 µm.

Park (1995) reportou ainda o efeito da composição de copolímeros de PLGA em estudo da degradação durante 53 dias de

microesferas (<10 μm) também em meio PBS (pH 7,4) e mantidas a 37 °C. O autor verificou a presença de duas temperaturas de transição vítrea no copolímero durante a degradação, o que sugere domínios diferentes na microesfera e observou que a degradação ocorreu preferencialmente na região amorfa. Apesar de o PLGA apresentar em muitos estudos degradação em massa, alguns trabalhos mais recentes reportaram que ocorre uma degradação heterogênea nestes polímeros, resultante de um processo autocatalítico pelos produtos ácidos gerados durante degradação. Através de análises de GPC foi observado ainda que com o tempo de degradação, a curva de distribuição de massa molar é deslocada para massas menores, indicando a degradação pela redução da massa molar do material. Microesferas de PLGA com relação molar ácido láctico: glicólico 50:50 e 70:30 degradaram mais rápido que os copolímeros 80:20 e 90:10, levando novamente à conclusão que quanto maior a fração de ácido glicólico no copolímero, maior será a taxa de degradação da partícula.

Contrariando o encontrado por Park (1995) e Dunne *et al.*, (2000), Panyam *et al.*, (2003) avaliaram a influência do tamanho, nanopartículas com 100 nm e micropartículas com 1 e 10 μm , na degradação *in vitro* (PBS, pH 7,4) de PLGA (50:50) com albumina de soro bovino encapsulada, através da técnica de emulsificação/evaporação de solvente. Os autores observaram uma degradação mais rápida ocorrendo para as nanopartículas, o que foi explicado como sendo resultado da neutralização dos grupos ácidos formados como produtos da degradação pela albumina encapsulada. Da mesma forma Leimann *et al.*, (2013) observaram degradação (caracterizada pela redução da massa molar) muito mais acentuada de nanopartículas poliméricas de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV), com tamanhos iniciais de 91 nm e 151 nm, do que de micropartículas do mesmo polímero, com tamanhos iniciais de 33 μm e 58 μm .

Mohammad & Reineke (2013) investigaram a degradação *in vitro* (solução de PBS, incubadas a 37 °C) e *in vivo* em fígado, baço e pulmões, seguido pela administração intravenosa em ratos, de nanopartículas de PLGA (50:50), M_w 44 kDa, com tamanho médio de 200 e 500 nm preparadas por difusão de solvente e nanoprecipitação, respectivamente. Os autores observaram que a degradação ocorreu através da quebra das ligações éster presentes, com decréscimo na massa molar. As NPs menores tiveram uma maior degradação *in vivo* no fígado e no baço, enquanto que as com 500 nm, apresentaram taxa de degradação semelhante *in vitro* e *in vivo* no fígado, sendo mais lenta nos

pulmões. Foi observada uma redução de massa molar de 36% no fígado e 30% no baço ao final da degradação para ambos os tamanhos de partícula.

Belbella *et al.*, (1996) avaliaram as mudanças na massa molar e na sua dispersão na degradação de nanoesferas de PDLA obtidas através de nanoprecipitação com tamanho de partícula de 100 nm, em diferentes valores de pH: 2,2, 4,2, 6, 7,4, 8,4 e 10,1 e em diferentes temperaturas: -18 °C, 4 °C e 37 °C, sendo este último estudo em solução tampão com pH 10,1. O grupo observou que a hidrólise foi muito mais rápida em condições ácidas e alcalinas, quando comparado ao meio neutro, propondo um mecanismo de hidrólise com quebra aleatória das cadeias poliméricas, levando à formação de oligômeros insolúveis e baixa produção de ácidos. Para o meio alcalino, foi observada uma quebra sequencial das ligações éster da cadeia polimérica, e formação de uma maior quantidade de produtos ácidos liberados. Foi verificado ainda, que as partículas permaneceram estáveis na temperatura de 4 °C, sendo que altas temperaturas aceleraram o processo da degradação.

2.1.2 Hidrólise Enzimática

Enzimas são catalisadores biológicos que afetam a degradação dos polímeros através da hidrólise das ligações presentes (TIETZ; SHUEY, 1993; CHANDRA; RUSTGI, 1998; AZEVEDO; REIS, 2005). Seu uso possui vantagens frente a catalisadores químicos, como elevada eficiência catalítica e alto grau de especificidade (CHAWLA; AMIJI, 2002; KRAJEWSKA, 2004), o que faz com que não sejam perturbadas por reações paralelas, não ocorrendo à formação de subprodutos indesejáveis, com a eliminação da necessidade de processos de separação e purificação. Sua quimiosseletividade permite atuar somente em um grupo funcional, ocorrendo catálise enzimática através da ligação do substrato ao sítio ativo e devido a sua regioseletividade, conseguem detectar grupos funcionais iguais em diferentes locais da estrutura tridimensional (KRAJEWSKA, 2004; CHIARADIA, 2015).

Por mostrarem-se altamente seletivas, cada grupo de enzimas possui diferentes ações. Algumas, como hidroxilases e oxigenases modificam os substratos através de um mecanismo via radicais livres (oxidação biológica) enquanto outras, como proteases e hidrolases, seguem um mecanismo com rotas alternativas, ocorrendo hidrólise biológica pela quebra de ligações dos grupos funcionais (CHANDRA; RUSTGI, 1998).

No grupo das hidrolases, destacam-se as lipases, utilizadas devido a sua quimiosseletividade na hidrólise enzimática de materiais poliméricos. Lipases são glicoproteínas que apresentam aproximadamente 450 aminoácidos (UPPENBERG *et al.*, 1994). Apresentam-se como enzimas capazes de catalisar a hidrólise e a síntese de ligações éster, amida, gorduras e óleos (GAN *et al.*, 1997; HERZOG; MÜLLER; DECKWER, 2006; PENG *et al.*, 2010; CIPOLATTI *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2015a). No corpo humano estão presentes em vários órgãos, principalmente no pâncreas e estômago.

Entre as lipases, apresenta-se a Lipase B de *Candida antarctica*, produzida pela fermentação do microrganismo *Candida sp.* Esta apresenta massa molar de 33 kDa (WIEMANN *et al.*, 2009), pode atuar em uma ampla faixa de valores de pH, apresenta alta estabilidade, opera sob temperaturas brandas de reação, é altamente específica e quando utilizada como catalisadora de reações, apresenta vantagens como maior eficiência e menor consumo de energia (UPPENBERG *et al.*, 1994; CIPOLATTI *et al.*, 2014; CHIARADIA, 2015).

Nas reações de hidrólise catalisadas enzimaticamente, inicialmente têm-se a difusão da enzima da solução para a superfície da matriz polimérica, seguida pela ligação do substrato ao sítio ativo da enzima. Ocorre então a hidrólise das ligações catalisadas enzimaticamente e a difusão dos produtos de degradação para a solução. Isto se dá em etapas, formando inicialmente oligômeros e em maiores tempos de degradação a formação de unidades monoméricas apresentando como subprodutos, no caso de poliésteres, ácidos caboxílicos, álcoois e hidroxiácidos. Para o caso de polímeros altamente cristalinos, a degradação segue principalmente o processo de degradação por erosão de superfície uma vez que enzimas possuem tamanho relativamente grande o que dificulta a difusão na matriz polimérica. O mecanismo de degradação enzimática depende ainda de fatores como a composição química do polímero, peso molecular, cristalinidade, área de superfície e parâmetros de processo (AZEVEDO; REIS, 2005; HERZOG; MÜLLER; DECKWER, 2006).

Suzuki e Tokiwa (1977) foram os pioneiros no ataque enzimático a poliésteres, observando que lipases comerciais e esterases são capazes de degradar poliésteres alifáticos sintéticos, como por exemplo, a PCL.

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido efetuados com poliésteres alifáticos, vários deles utilizando lipases. Dentre as lipases capazes de degradar o PCL, estão a *Rhizopus delemer*, *Rhizopus arrhizus* e de *Pseudomonas* (PENG *et al.*, 2010), sendo já reportado por Chawla & Amiji (2002) e Musyanovych *et al.*, (2008) que devido às

propriedades de hidrofobicidade e alta cristalinidade, este polímero não é passível de degradação somente em meio com PBS. Em estudo de degradação realizado por Chawla & Amiji (2002) com nanopartículas (100 a 300 nm) de PCL preparadas pela técnica de deslocamento de solvente, com alta massa molar (>10 kDa), foi reportado que utilizando a lipase de *Pseudomonas* a redução na massa molar foi de quase 100% em 36 h e em meio com solução PBS não foi observada redução significativa da massa molar em 140 dias de estudo. Foi observado ainda, que a cristalinidade do polímero aumentou com o aumento da massa molar.

Peng *et al.*, (2010) estudaram a degradação de filmes do homopolímero PCL e de filmes formados a partir de diferentes copolímeros baseados em PCL, com massa molar entre 40 e 200 kDa. O estudo da degradação ocorreu em meio com solução PBS (0,05 mol/L, pH 7,4) com e sem adição da enzima lipase de pâncreas de porco. Os autores concluíram que copolímeros com estrutura porosa apresentaram uma taxa de degradação maior que aqueles filmes obtidos por compressão e que a lipase de pâncreas de porco foi efetiva para degradar copolímeros de PCL, porém não houve degradação do homopolímero PCL.

Chen, em 1999, preparou micropartículas de PCL com tamanho de 13,4 μm através da técnica de emulsificação-evaporação de solvente utilizando diferentes estabilizadores e comparou a degradação destas com a degradação de filmes de PCL preparados por técnica de *casting*. Foi utilizado meio com solução PBS (pH 7,4) a 37 °C, com e sem adição de lipase para as micropartículas e avaliadas mudanças na morfologia das micropartículas e na massa molar. O autor observou decréscimo na massa molar de ambas as amostras, sendo de 26,7%, para as micropartículas na presença da enzima, 11,8% maior que sem enzima durante 7 semanas de estudo, sugerindo um processo de degradação homogêneo. A morfologia também foi avaliada e nas micropartículas sem enzima, não houve alteração mesmo após 9 semanas de degradação, confirmando a alta cristalinidade do PCL. Na presença de enzimas, a superfície polimérica ficou porosa já na terceira semana de degradação.

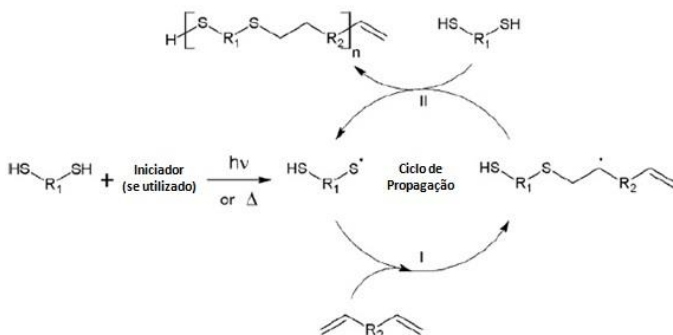
Baier *et al.*, (2014) sintetizaram NPs de PLLA com tamanho na faixa de 90-280 nm, estabilizadas com diferentes surfactantes e com o agente antimicrobiano octenidina encapsulado. O grupo avaliou a degradação *in vitro* em solução de PBS, pH 8, com e sem a adição da enzima *Protease K*. Após 40 dias as partículas incubadas com a enzima se encontravam completamente desintegradas.

A degradação enzimática destes materiais poliméricos é fortemente afetada pelas condições de polimerização e o tipo de monômero utilizado, parâmetros que definem a estrutura polimérica formada (RYDHOLM; BOWMAN; ANSETH, 2005). Modificações químicas realizadas comprometem a habilidade de a enzima reconhecer o substrato. A taxa de degradação enzimática também é diretamente afetada pelo ponto de saturação da enzima, concentração na qual nenhum aumento da degradação é observado, mesmo quando mais enzima é adicionada ao meio, decorrente do decréscimo da área superficial do polímero quando degradado (AZEVEDO; REIS, 2005). Outros dois fatores que definem a taxa com que o material é degradado, incluem a incubação das amostras sob agitação ou não, o que permite um maior contato enzima-substrato acelerando a hidrólise enzimática e a área superficial do material, uma vez que quanto maior, maior será a quantidade de enzima por área de superfície polimérica (CHANDRA; RUSTGI, 1998; AZEVEDO; REIS, 2005; HERZOG; MÜLLER; DECKWER, 2006).

2.2 POLIMERIZAÇÃO VIA REÇÕES TIOL-ENO

Reações tiol-eno consistem na reação de adição entre um ditiol e um dieno via radicais livres. O mecanismo cinético da reação é apresentado na Figura 2. As reações de polimerização via adição tiol-eno ocorrem seguindo três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação, o tiol se decompõem em radicais tiil, pela perda de um átomo de hidrogênio para um dos radicais livres gerados. Esta etapa pode ser termo ou foto iniciada, com ou sem a presença de um iniciador (LOWE, 2009; JASINSKI *et al.*, 2016). Na etapa de propagação (I), o radical tiil gerado ataca uma das duplas ligações C=C do dieno, formando um radical β -carbono, sendo este processo reversível. Este radical gerado pode retirar outro átomo de hidrogênio de um tiol (II) resultando em um tio éter e um novo radical tiil, propagando a cadeia. Por fim, o número de combinações entre os radicais tiil e os radicais β -carbono levam à terminação. (HOYLE; BOWMAN, 2010; TÜRÜNÇ; MEIER, 2013; CARDOSO, 2015; MACHADO, 2015; JASINSKI *et al.*, 2016).

Figura 2 - Mecanismo da reação de adição tiol-eno.



Fonte: Adaptado de Machado (2015).

Estas reações tiol-eno destacam-se por apresentar altos rendimentos, serem conduzidas em condições brandas, geralmente em água, com baixa formação de subprodutos, por apresentar uma polimerização rápida com melhores características de degradabilidade e por resultar em poli (tioéter-éster) com características semicristalinas (HOYLE; BOWMAN, 2010; JASINSKI *et al.*, 2016).

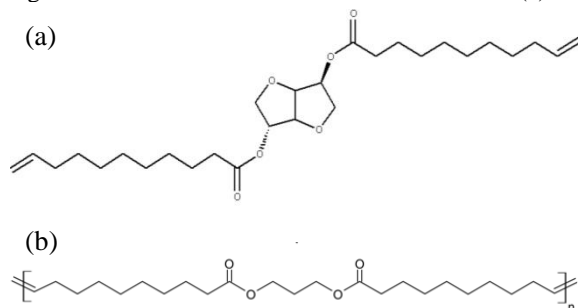
Jasinski *et al.*, (2014) reportaram a formação do primeiro látex com nanopartículas de poli (tioéter-éster) sintetizadas através da fotopolimerização em miniemulsão via reações de adição tiol-eno. Os autores obtiveram nanopartículas semicristalinas (55% de cristalinidade) com diâmetro de 130 nm e temperatura de transição vítrea de $-63\text{ }^\circ\text{C}$.

Machado *et al.*, (2016) realizaram a síntese do monômero α,ω -dieno diéster diundeca-10-enoato de dianidro-D-glucitila (DGU), estrutura molecular apresentada na Figura 3(a), proveniente de fontes renováveis (óleo de mamona e do amido). Foram realizadas reações de polimerização em miniemulsão e em massa, copolimerizadas com 1,4-Butanoditiol ($\text{Bu}(\text{SH})_2$) testando diferentes condições de reação como tipo e quantidade de surfactante e de iniciador e temperaturas de reação. Foi obtido um polímero linear semicristalino, com grau de cristalinidade de 36%, T_m de aproximadamente $62\text{ }^\circ\text{C}$, com M_w de 11 kDa, em reação terminada com 1% mol AIBN em relação ao 1,4-butanoditiol, por 4 h a $80\text{ }^\circ\text{C}$.

Cardoso (2015) sintetizou o monômero 1,3 propileno-diundeca-10-enoato (Pd10e) proveniente de óleo vegetal e realizou reações de polimerização em miniemulsão via reações ADMET para obtenção de NPs. As reações foram realizadas em diferentes temperaturas, variando

as concentrações de iniciador, surfactantes e razão dieno: tiol. A Figura 3(b) apresenta a estrutura molecular do monômero Pd10e.

Figura 3 - Estruturas moleculares dos monômeros (a)DGU e (b)Pd10e



Fonte: MACHADO (2016) e CARDOSO (2015), respectivamente.

Dando sequência ao trabalho realizado por Machado (2016) e por Cardoso (2015), o presente estudo focou na degradação *in vitro* das nanopartículas e filmes poliméricos obtidos utilizando estes monômeros α,ω -diene diéster sintetizados pelos autores. Estes polímeros apresentam-se promissores na liberação sustentada de fármacos, devido a sua potencial degradabilidade advinda da inserção do grupo funcional éster e do grupo sulfeto inserido através da polimerização com $\text{Bu}(\text{SH})_2$. Na literatura, não foram encontrados até o presente momento estudos da degradação de poli(tioéter-éster) oriundos de monômeros renováveis.

2.3 DEGRADAÇÃO DE POLÍMEROS SINTETIZADOS VIA REAÇÕES TIOL-ENO

Alguns trabalhos recentes têm realizado a degradação de polímeros sintetizados a partir das reações de adição tiol-eno. WU *et al.* (2015) sintetizaram nanopartículas através de policondensação direta catalisada com a enzima CalB, obtendo polímeros poli(β -tioéter-éster) (PTE) e copolímeros poli(β -tioéter-éster-co- ϵ -caprolactona) e ainda, reportaram a degradação *in vitro* virando o pH do meio (pH 7,4, 5,0 e 3,8) à 37 °C. Foram avaliadas mudanças na massa molar numérica média (M_n) e dispersão do polímero com o tempo de degradação e dos produtos de degradação por análise de RMN. O grupo de pesquisa identificou que a curva de distribuição de massas molares foi deslocada para massas molares menores em condições ácidas e nos espectros de RMN foi observado um aumento no sinal dos prótons referente ao grupo

CH₂OH nas extremidades da cadeia polimérica, sugerindo a hidrólise das ligações éster presentes. Já em condições fisiológicas, estes permaneceram estáveis. O grupo observou ainda que a degradação do homopolímero PTE foi mais rápida em meio ácido, devido à menor cristalinidade quando comparado ao copolímero, sugerindo o potencial destes materiais para aplicações biomédicas.

O grupo de pesquisas de Bowman tem se dedicado desde 2005 ao estudo da degradação de polímeros tioéter-éster e tiol- acrilatos. Em 2005, Reddy, Anseth & Bowman avaliaram a polimerização de hidrogéis tiol-acrilatos observando que devido à dupla ligação carbono dos grupos acrilato estas reações se processam de acordo com dois mecanismos de polimerização: em cadeia e em etapas. Comprovaram ainda que é possível obter polímeros com perfis de degradação específicos variando a estequiometria tiol:grupos funcionais acrilato, o que possibilita um controle cinético da reação de degradação, a qual ocorre pela fácil hidrólise do grupo éster presente na cadeia polimérica.

Em 2007, Rydhlom, Anseth & Bowman avaliaram a influência da distância entre os grupos sulfeto e o grupo funcional éster em acrilatos, concluindo que a diminuição do número de carbonos entre os grupos de 2 para 1 e o aumento do pH do meio de degradação de 7,8 para 8, levou a um aumento na taxa de hidrólise da ligação éster em 4 vezes.

Jasinski *et al.* (2016) reportaram a degradação de dois látex de poli(tioéter-éster) com 20% em massa de polisulfeto, oriundos da copolimerização do dialil ftalato com 2,2-(etileno dióxido) etanoditiol (EDDT), formando um polímero (P1) com grupo fenil e outro (P2) a partir da copolimerização do dialil adipato, com EDDT, para posterior utilização como nanocarreadores. A degradação foi estudada em ambiente oxidativo com solução de peróxido de hidrogênio (10% wt) e em solução de ácido clorídrico (pH 2), através de análises de espectrofotometria UV/Vis. Dependendo das condições oxidativas, poli(tio éteres) hidrofóbicos podem ser oxidados para sulfóxidos polares, conduzindo a uma maior solubilidade da cadeia polimérica em água e quando em contato com solventes hidrofílicos, atuam como ótimos nanocarreadores capazes de se decompor sob stress oxidativo, liberando o fármaco encapsulado. Ambos os meios de degradação mostraram-se efetivos na degradação dos látices formados, sendo a hidrólise mais efetiva no caso do P1 e as condições oxidativas favoreceram a degradação do polímero P2, obtendo-se uma solução completamente transparente em um dia de estudo.

Em suma, materiais poliméricos sintetizados via reações de polimerização tiol-eno mostraram boa degradabilidade decorrente da quebra gradual das ligações sob atividade biológica. Polímeros tiol-eno ainda necessitam ser estudados, no que diz respeito à degradação e biocompatibilidade para aplicações na área biomédica. O presente trabalho apresenta-se como pioneiro no estudo da degradação de materiais poliméricos sintetizados via reações tiol-eno utilizando como base monômeros renováveis.

2.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas poliméricas podem ser sintetizadas utilizando uma variedade de materiais, como proteínas, polissacarídeos, e polímeros sintéticos. A escolha do polímero a ser utilizado é dependente das características finais desejadas, como a aplicação, o tamanho de partícula, distribuição do tamanho, do fármaco que se deseja encapsular, do grau de biodegradação e compatibilidade do polímero para com o fármaco (MAHAPATRO; SINGH, 2011).

Dependendo da maneira como são produzidas, o termo nanopartículas, pode designar segundo Landfester (2006) e Rezende *et al.*, (2003) nanoesferas e nanocápsulas as quais diferem entre si pela estrutura organizacional que apresentam como pode ser visto na Figura 4.

Figura 4 - Diferença entre nanocápsulas e nanoesferas



Fonte: Adaptado de (BØE, 2013)

Nanoesferas são constituídas por uma matriz polimérica sólida, na qual o fármaco pode ficar retido na superfície ou encapsulado na partícula, não havendo núcleo oleoso. Por outro lado as nanocápsulas são formadas por uma membrana polimérica que possui um núcleo de líquido, podendo este ser oleoso ou aquoso, onde o fármaco encontra-se uniformemente disperso ou ainda adsorvido na matriz polimérica.

(LANDFESTER, 2006; MOHANRAJ; CHEN, 2006; RAO; GECKELER, 2011; PERES, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2015).

Dependendo da área de aplicação, do polímero empregado e do fármaco que se deseja encapsular as propriedades físicas e químicas das nanopartículas podem ser otimizadas pela seleção do método e condições de preparação (MOHANRAJ; CHEN, 2006; RAO; GECKELER, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2015). Os métodos de preparo das NPs mais usuais são: 1) dispersão dos polímeros pré-formados, utilizado frequentemente na preparação de nanopartículas biodegradáveis nas técnicas de nanoprecipitação, emulsificação/evaporação de solvente, emulsificação/difusão do solvente, *salting out*; 2) polimerização dos monômeros, processo no qual os monômeros são polimerizados em meio heterogêneo para formação das nanopartículas poliméricas como na polimerização em emulsão, miniemulsão e microemulsão (MAHAPATRO; SINGH, 2011; RAO; GECKELER, 2011; PERES, 2012); 3) Coacervação ou gelificação iônica para polímeros hidrofílicos, método que envolve a mistura de duas fases líquidas (MOHANRAJ; CHEN, 2006; RAO; GECKELER, 2011). Recentes estudos têm focado na polimerização em miniemulsão via reações tiol-eno para formação de nanopartículas e hidrogéis como técnica robusta e versátil (REDDY; ANSETH; BOWMAN, 2005; JASINSKI *et al.*, 2014).

Neste trabalho, será abordada a técnica de polimerização em miniemulsão, a qual oferece vantagens: como a possibilidade de encapsulação de compostos simultaneamente com a síntese, além de apresentar fácil manipulação das propriedades, como tamanho de partícula e características de superfície, obtenção de morfologia definida e flexibilidade em relação à escolha da matriz polimérica, que por sua vez pode controlar as características da degradação. Será abordada ainda, a técnica de polimerização em massa para a síntese de poli(tioéter-éster) para a preparação de filmes poliméricos.

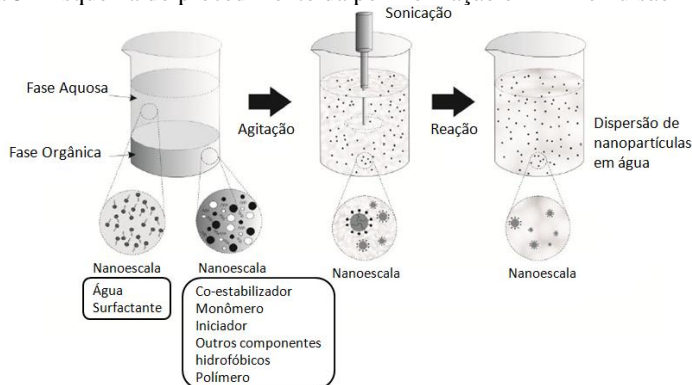
2.5 POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO

Miniemulsões são classicamente definidas como sendo dispersões de gotas de monômero estabilizadas, formadas a partir de da utilização de um sistema de cisalhamento intenso, onde é possível a obtenção de partículas com tamanho na faixa de 50 a 500 nm (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002).

São sistemas heterofásicos, constituídos por uma fase aquosa (contínua), que contém água e surfactante, e uma fase orgânica dispersa,

na qual estão presentes monômero e o co-estabilizador ou também chamado de agente de pressão osmótica (TIARKS; LANDFESTER; ANTONIETTI, 2001; VALERIO, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2015; MACHADO, 2015). Nas reações via radicais livres o iniciador pode ser adicionado tanto na fase contínua como na fase dispersa. O esquema da polimerização em miniemulsão é mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema do procedimento da polimerização em miniemulsão



Fonte: Adaptado de (GONÇALVES *et al.*, 2015)

Inicialmente, a fase orgânica e a fase aquosa são misturadas, através de um sistema de agitação, formando uma macroemulsão. Após, a miniemulsão é obtida através de um sistema de cisalhamento, utilizando, por exemplo, um ultrassonicador, evitando a formação de micelas (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; RAO; GECKELER, 2011).

O surfactante tem o intuito de minimizar a coalescência das gotas e sua concentração livre na fase aquosa deve ser acima da CMC. O co-estabilizador age de forma a retardar a degradação difusional (também chamada “*Ostwald Ripening*”) das gotas menores, resultando em uma miniemulsão cineticamente estável (ASUA, 2002).

A polimerização em miniemulsão se diferencia da polimerização em emulsão, uma vez que as gotas submicrométricas de monômero apresentam-se como o lócus da polimerização, agindo como nanoreatores da polimerização e não requerendo transferência de massa do monômero através da fase contínua (ANTONIETTI; LANDFESTER, 2002; PERES, 2012).

2.6 POLIMERIZAÇÃO EM MASSA

A polimerização em massa (*bulk*) consiste em uma reação homogênea capaz de produzir polímeros com o mínimo de contaminação e com baixo custo no processo de síntese. Neste tipo de polimerização têm-se o uso de monômero que pode ser iniciado quimicamente, pelo uso de iniciadores, na presença de radiação ou ainda termicamente, sendo que neste último caso, tem-se apenas a presença do monômero e do polímero. Nenhum solvente é adicionado ao processo. Nesta reação, a viscosidade do sistema aumenta rapidamente, a medida que a conversão aumenta, o que pode acarretar em problemas na mobilidade das moléculas e afetar a polimerização (ODIAN, 2004).

2.7 CONSIDERAÇÕES REFERENTES AO ESTADO DA ARTE

A utilização de materiais poliméricos sintéticos biodegradáveis vem sendo cada vez mais estudada, com foco principalmente na área biomédica para liberação sustentada de fármacos. A síntese de nanopartículas e filmes utilizando monômeros α,ω -dieno diéster de origem renovável via reações de adição tiol-eno permite a inclusão de grupos funcionais na cadeia polimérica e a adição do grupo sulfeto, tornando estes materiais com potencial biodegradável e ainda, biocompatíveis.

O estudo da degradação destes materiais de origem renovável obtidos por estas reações de adição encontra-se ainda escasso, sendo necessário um maior aprofundamento deste comportamento *in vitro* para cada tipo de material polimérico. Assim, torna-se de extrema importância conhecer todos os parâmetros que possuem efeito direto no mecanismo de degradação, como a área superficial, o tipo de polímero utilizado e as condições do meio em que se processa a degradação, podendo esta ocorrer via hidrólise ou ainda na presença de enzimas.

Neste sentido, este trabalho apresenta o primeiro estudo de degradação *in vitro* realizado utilizando nanopartículas e filmes oriundos do monômero DGU e nanopartículas oriundas do monômero Pd10e, ambos de origem renovável.

CAPÍTULO III

3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS E FILMES POLIMÉRICOS DE POLI (TIOÉTER-ÉSTER)

3.1 INTRODUÇÃO

Nesta seção serão descritas as metodologias e as formulações utilizadas nas reações de polimerização em miniemulsão via reações tiol-eno, visando à formação de nanopartículas de poli (tioéter-éster) utilizando como monômeros α,ω -diene diéster diundeca-10-enoato de dianidro-D-glucitila (DGU) proveniente de fonte renovável (óleo de mamona e amido) e monômero derivado de óleo vegetal α,ω -diene diéster 1,3-propileno diundeca-10-enoato (Pd10e). A polimerização em massa via reações tiol-eno também foi realizada, com intuito de obter filmes de poli (tioéter-éster) oriundos do monômero DGU. As nanopartículas obtidas via polimerização em miniemulsão foram caracterizadas por análises de massa molar, diâmetro médio em intensidade e dispersão das partículas, morfologia, temperatura de fusão cristalina e grupos funcionais presentes. Os filmes sintetizados a partir da polimerização em massa foram caracterizados por massa molar.

A síntese de nanopartículas utilizando processos de polimerização via reações de adição tiol-eno apresenta-se como uma área ainda pouco explorada principalmente no que se refere a polímeros obtidos por estas reações tendo como base monômeros de origem renovável. Estas reações de adição apresentam-se promissoras nas áreas farmacêutica e biomédica uma vez que permitem a obtenção de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis pela inclusão de grupos funcionais desejados na cadeia polimérica e também do grupo sulfeto incorporado ao material polimérico pela reação com o radical tiil (AMATO; FLYNT; PATTON, 2014; JASINSKI et al., 2014; MACHADO; SAYER; ARAUJO, 2016).

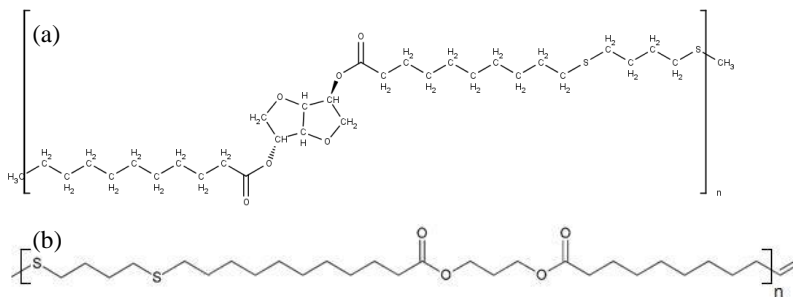
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Material

Nas reações de polimerização via reações de adição tiol-eno foram utilizados como monômeros α,ω -diene diéster diundeca-10-enoato de dianidro-D-glucitila (DGU) e 1,3-propileno diundeca-10-enoato (Pd10e) os quais foram sintetizados em laboratório por Machado

(2016) e Cardoso (2015), respectivamente. As estruturas moleculares dos polímeros obtidos estão apresentadas na Figura 6, sendo a Figura 6(a), o polímero Poli-co-dianidro-D-glucitila-diundeca-10-enoato-co-1,4-butanoditiol, oriundo do DGU que será chamado no presente trabalho de P1 e representado na Figura 6(b) o polímero derivado do monômero Pd10e, Poli-co-1,3-propileno-diundeca-10-enoato-co-1,4-butanoditiol, que será mencionado como P2. Como iniciador, nas reações de polimerização, foi utilizado 2,2-azo-bis-isobutironitril (AIBN, 98%, Vetec) recristalizado com metanol e seco a vácuo em laboratório. Lutensol AT80 (massa molar 3,8 kDa, BASF) e Lutensol AT50 (massa molar 2,8 kDa, BASF) que consistem em um álcool graxo etoxilado com 80 e 50 unidades de óxido de etileno, respectivamente, foram utilizados como surfactantes nas reações em miniemulsão. 1,4 Butanoditiol ($\text{Bu}(\text{SH})_2$) foi utilizado em ambas as polimerizações (razão molar DGU – $\text{Bu}(\text{SH})_2$ 1:1). Tetrahidrofurano (THF, Vetec) foi utilizado como solvente para formação dos filmes da polimerização em massa e para realização das análises de cromatografia de permeação em gel (GPC). Água destilada foi utilizada em todos os experimentos. Todos os solventes, com exceção do AIBN, foram utilizados como recebidos.

Figura 6 - Estruturas moleculares do polímero oriundo do (a)DGU e (b) Pd10e.



Fonte: MACHADO (2016) e CARDOSO (2015), respectivamente.

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Síntese das nanopartículas de P1

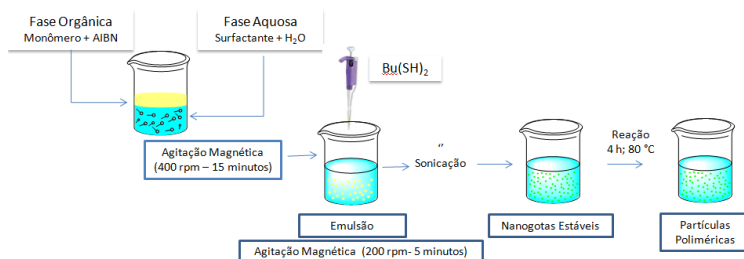
As reações de síntese das nanopartículas seguiram metodologia proposta por Machado (2016). Inicialmente, para preparação da fase aquosa, o surfactante Lutensol AT50 foi solubilizado em água destilada e agitado a 150 rpm por 5 min. A fase orgânica, composta de AIBN e DGU, foi preparada com a dissolução do iniciador no monômero DGU sob agitação magnética (150 rpm) por aproximadamente 15 min. Em seguida, a fase aquosa foi misturada à fase orgânica e mantida sob agitação magnética (300 – 400 rpm) para a formação de uma emulsão grosseira. Após esta etapa, foi adicionado o $\text{Bu}(\text{SH})_2$ e o sistema foi agitado por 5 min adicionais a 200 rpm. A formulação foi preparada para obter uma estequiometria tiol-eno 1:1 e é apresentada Tabela 1.

Tabela 1 - Formulação da polimerização em miniemulsão utilizando como monômero DGU. Razão molar DGU- $\text{Bu}(\text{SH})_2$ 1:1.

DGU (g)	AIBN (g)	$\text{Bu}(\text{SH})_2$ (mL)	H_2O (g)	AT50 (g)
1	0,0034	0,216	5	0,15

Em seguida, esta mistura foi sonicada utilizando um dispersor ultrassônico (Dispersor ultrassônico modelo 500 da marca Fischer Scientific (400W) com uma ponteira de ½”) durante 2 min, sendo usado um regime de pulso de 10 s e 5 s de pausa, com uma amplitude de 70%. Utilizou-se banho de gelo para minimizar o aumento de temperatura durante o processo de dispersão. A mistura foi então transferida para tubos de ensaio e inserida em banho termostático a 80 °C por 4 h para a polimerização. Um esquema simplificado do processo de preparo e polimerização em miniemulsão é apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Esquema do procedimento de preparo e polimerização em miniemulsão.



Fonte: Autor

3.2.2.2 Síntese das nanopartículas de P2

As reações de síntese das nanopartículas seguiram metodologia proposta) e Cardoso (2015). A preparação da miniemulsão utilizando o monômero Pd10e seguiu a mesma metodologia utilizada no procedimento 3.2.1.1, modificando-se o surfactante utilizado, que neste caso foi o Lutensol AT80 e as condições de sonicação, sendo 4 min, com regime de pulso 10 s on e 2 s off e amplitude de 60%. A formulação utilizada foi otimizada por Cardoso (2015) e está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2- Formulação da polimerização em miniemulsão utilizando como monômero Pd10e. Razão Molar Pd10e-Bu(SH)₂ 1:1.

Monômero (g)	AIBN (g)	Bu(SH) ₂ (mL)	H ₂ O (g)	AT80 (g)
2,0	0,008	0,600	20,0	0,60

3.2.2.3 Formação dos filmes de P1

Inicialmente o monômero DGU e o iniciador AIBN foram adicionados em um béquer e submetidos à agitação magnética (300 rpm) até completa solubilização do iniciador no monômero. Em seguida, o sistema foi polimerizado com Bu(SH)₂ (razão molar Bu(SH)₂-DGU 1:1) e agitado (200 rpm) por 5 min. O produto formado foi transferido para ampolas de vidro e inserido em banho termostático a 80 °C, por 4 h, para polimerização. A formulação utilizada (Tabela 3) foi anteriormente testada e otimizada por Machado (2016). Por fim, para formação dos filmes, o polímero formado foi solubilizado em THF e então levado a estufa de convecção forçada, por 48 horas, em placas de petri.

Tabela 3 - Formulação da polimerização em massa utilizando como monômero DGU. Razão molar DGU-Bu(SH)₂ 1:1.

Monômero DGU (g)	Iniciador AIBN (g)	Bu(SH) ₂ (mL)
1	0,0034	0,240

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.3.1 Tamanho Médio das Partículas de Poli(tioéter-éster)

As medidas do tamanho de partícula em intensidade (D_p) e a sua dispersão (PdI) foram realizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando equipamento da *Malvern Instruments, Zetasizer Nano S*. Para realização das leituras, 0,1 mL de amostra preparada pela técnica de polimerização em miniemulsão foi adicionada em cubeta de vidro e diluída com 1,5 mL de água destilada. As medidas foram realizadas em triplicata.

3.3.2 Massas Molares do Poli(tioéter-éster)

Para determinação das massas molares M_n e M_w (massa molar média numérica e ponderal, respectivamente) as amostras foram analisadas por GPC (modelo LC-20A, Shimadzu). O equipamento conta com um detector de índice de refração RID-10A, injetor automático SIL-20A, um forno CTO-20A e duas colunas recheadas com esferas de copolímero estirenodivinilbenzeno PLgel Mini MIX 250 x 4,6 mm dispostas em série, com uma pré coluna PLgel 5 μ m Mini MIX-C Guard 50 x 4 mm. A calibração do equipamento foi realizada com padrões de poliestireno com massas molares de 580 até 9,8x10⁶ g/mol.

Para realização das análises, 20 mg da amostra seca foram diluídos em 4 mL de THF e então a amostra foi filtrada com um filtro de nylon (0,45 μ m de diâmetro de poro e 25 mm de diâmetro). As amostras foram levadas ao equipamento e as análises foram efetuadas a 40 °C, utilizando como eluente THF, com uma vazão volumétrica de 0,3 mL/min.

3.3.3 Propriedades Térmicas do Poli(tioéter-éster)

As análises de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foram efetuadas em equipamento (Perkin-Elmer, modelo 400) disponível no Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos

(PROFI), do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC. Foram utilizados 10 mg de amostra. Primeiramente, foi removido o histórico térmico através de um aquecimento de -10 a 150 °C, com uma taxa de aquecimento de 20°C/min, seguido por um resfriamento de 150 a -10 °C, também a uma taxa de 20 °C/min. As análises foram realizadas em atmosfera inerte, com uma vazão de nitrogênio de 50 mL/min, de -10 a 150 °C, com uma taxa aquecimento de 10 °C/min e a T_m foi obtida na segunda corrida de aquecimento, através dos picos endotérmicos encontrados.

3.3.4 Análise dos Grupos Funcionais do Poli(tioéter-éster)

Com o objetivo de verificar os grupos funcionais presentes nas amostras foram realizadas análises por Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada com Transformada de Fourier (ATR-FTIR) em aparelho da marca Bruker, modelo TENSOR 27 disponível no laboratório de Materiais (LABMAT), do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC. As amostras de polímero seco foram analisadas com uma resolução de 4 cm^{-1} , em uma faixa de número de onda no intervalo de 4000-600 cm^{-1} com 32 varreduras, utilizando ponteira de Seleneto de Zinco (ZnSe).

3.3.5 Morfologia das Nanopartículas de Poli(tioéter-éster)

Para avaliar a morfologia das NPs e as modificações ocorridas nas mesmas durante o processo de degradação, análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em equipamento da marca JEOL, modelo JSM-6390LV, com filamento de tungstênio, alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para esta análise, as amostras foram diluídas em água destilada a uma concentração de 0,05% de sólidos. Posterior a esta etapa, uma gota da amostra já diluída foi colocada em *stub* e deixou-se secar por 24 h a temperatura ambiente. Então, os *stubs* foram recobertos com uma fina camada de ouro e analisados.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Síntese das NP's de P1

As nanopartículas sintetizadas pela polimerização em miniemulsão via reações tiol-eno oriundas do monômero DGU,

apresentaram massas molares M_n e M_w (massa molar média numérica e ponderal, respectivamente) apresentadas na Tabela 4. Mostraram ainda tamanho médio das gotas em intensidade e sua dispersão apresentadas na Tabela 5 para reações de polimerização em miniemulsão realizados em duplicata. Todas as reações de polimerização em miniemulsão foram conduzidas a 80 °C por 4 horas.

Tabela 4 - Valores de massa molar média numérica e ponderal obtidos para dois látices sintetizados a 80 °C por 4 h via polimerização em miniemulsão.

Reação	M_n (kDa)	M_w (kDa)
M01	8,8	19,7
M02	9,1	21,5

Tabela 5 - Tamanho de partícula e dispersão obtidos por DLS antes e após polimerização a 80 °C por 4 horas. Relação DGU:Bu(SH)₂ 1:1. Desvio obtido do próprio equipamento, n= 3.

Reação	Dp_0 (nm)	PdI_0	Dp (nm)	PdI
M01	205 ± 3	0,17 ± 0,01	197 ± 4	0,18 ± 0,01
M02	215 ± 2	0,19 ± 0,01	178 ± 1	0,19 ± 0,01

A Figura 8 apresenta a distribuição de tamanho de partícula dos látices M01 e M02. A curva de distribuição se apresentou unimodal para ambas dispersões, mostrando tamanho uniforme das nanopartículas após polimerização.

Este comportamento foi similar ao encontrado por Machado (2015), porém as partículas mostraram-se com tamanho mais uniforme quando comparado as obtidas pelo autor, pelo qual foram observadas duas modas, sendo a segunda referente a macrogotas. O autor atribuiu estas macrogotas a problemas durante a etapa de sonicação.

As NPs de P1 copolimerizadas com Bu(SH)₂, exibiram superfície esférica, Figura 9, confirmando a morfologia encontrada nas primeiras nanopartículas de P1 em análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) realizada por Machado (2015) e corroborando o tamanho de partícula encontrado por DLS, na faixa de 200 - 210 nm.

Figura 8- Distribuição do tamanho de partícula para as polimerizações em miniemulsão via reações tiol-eno para o P1. Razão DGU:Bu(SH)₂ 1:1.

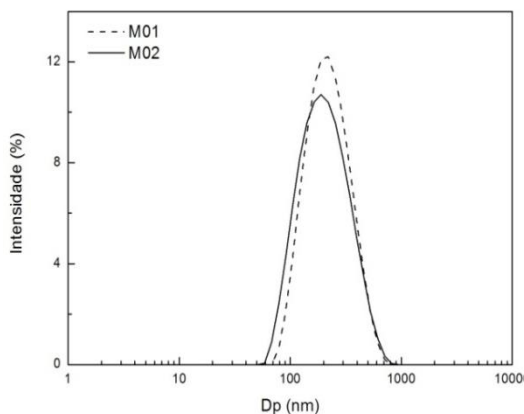
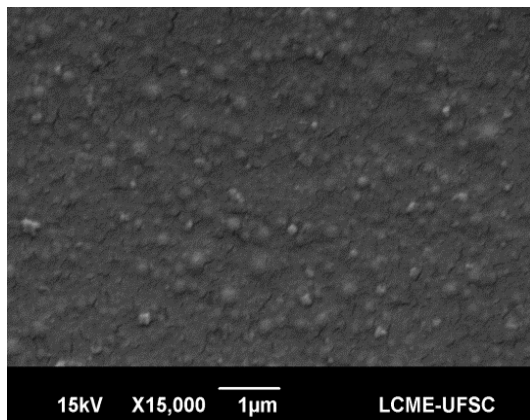


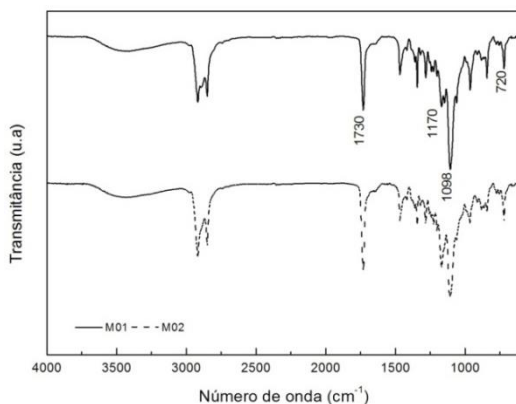
Figura 9 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas sintetizadas via reações tiol-eno para P1. Razão molar DGU:Bu(SH)₂ 1:1.



Através da análise em FTIR-ATR foi possível avaliar os grupos funcionais presentes no polímero, como pode ser visto na Figura 10. A banda característica em 720 cm^{-1} corresponde à vibração das ligações sulfeto (S-C) formadas, provenientes da copolimerização com o Bu(SH)₂, adição do radical tiol à dupla ligação do dieno. Em 1098 cm^{-1} é possível identificar o estiramento das ligações C-O-C respectivas do

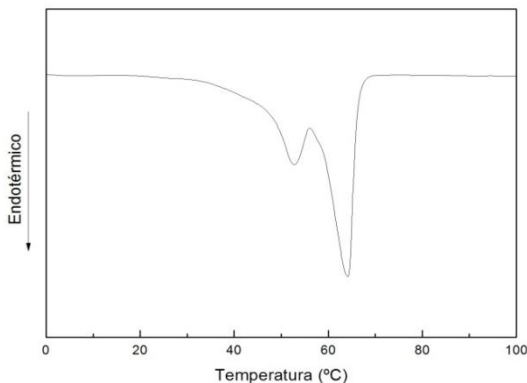
grupo funcional éter. A ligação éster C-O-C está presente em 1170 cm^{-1} e a forte vibração presente em 1730 cm^{-1} corresponde às ligações éster C=O. Este espectro vai de acordo com o de Machado (2016) onde estão presentes os mesmos grupos funcionais após reação de polimerização em miniemulsão via reações tiol-eno. O autor observou ainda antes da reação de polimerização, em 1640 cm^{-1} , um pico referente ao estiramento C=C, sendo este característico do monômero residual DGU. Após a polimerização esta banda já não é mais observada, confirmando a adição dos radicais tiol à dupla ligação, com formação em 720 cm^{-1} das ligações sulfeto. Este mesmo comportamento é apresentado nos espectros obtidos após reação de polimerização em miniemulsão.

Figura 10 – Espectros de FTIR-ATR para os polímeros M01 e M02. Reação durante 4 horas, a 80 °C . Razão DGU- Bu(SH)₂ 1:1.



A temperatura de fusão cristalina da amostra M02 foi analisada por DSC (Figura 11) apresentando uma $T_m = 64\text{ °C}$. caracterizando-se como um polímero semicristalino ligado ao seu comportamento de dupla fusão, no qual na temperatura mais baixa ocorre fusão das regiões com cristais imperfeitos do polímero e próximo a 64 °C tem-se a fusão das regiões cristalinas. Mesmo comportamento de fusão cristalina foi encontrado por Machado *et al.* (2016), confirmando o valor encontrado.

Figura 11 - Curva de DSC do polímero P1.



3.4.2 Polimerização em Massa

Inicialmente, foi efetuada a polimerização em massa via reações de adição tiol-eno obtendo-se um valor de massa molar M_w de 5,1 kDa. Após, os filmes foram formados pelo procedimento descrito no item 3.2.2.3 e inseridos nos meios de degradação. As Tabela 4 ,5 e 6 do Apêndice A apresentam os valores de massa inicial, bem como final dos filmes degradados.

3.4.3 Síntese das NP's de poli(tioéter-éster) oriundas do monômero Pd10e

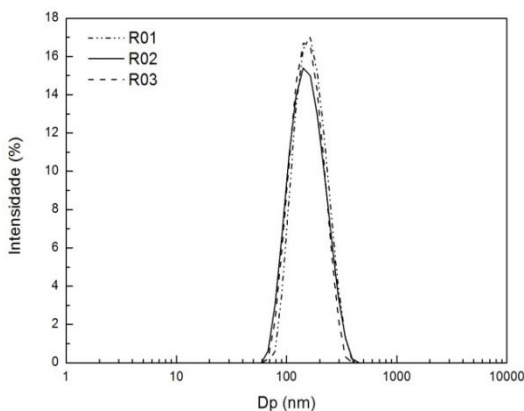
Nanopartículas sintetizadas pela polimerização em miniemulsão via reações tiol-eno, copolimerizadas com $Bu(SH)_2$ utilizando o monômero Pd10e apresentaram tamanho de partícula e dispersão apresentados na Tabela 6 para três reações de polimerização em miniemulsão. O valor de massa molar ponderal média encontrado (M_w) do látice foi de 38 Kda. Estes valores corroboram com os encontrados por Cardoso (2015).

Tabela 6 - Valores do diâmetro de partícula e dispersão, antes e após polimerização a 80 °C por 4 horas. Relação Pd10e:Bu(SH)₂ 1:1. Desvio obtido do próprio equipamento, n= 3.

Reação	Dp ₀ (nm)	PdI ₀	Dp (nm)	PdI
R01	171 ± 1	0,17 ± 0,01	159 ± 1	0,11 ± 0,01
R02	147 ± 1	0,09 ± 0,01	144 ± 1	0,09 ± 0,01
R03	147 ± 1	0,11 ± 0,01	146 ± 1	0,08 ± 0,01

A Figura 12 mostra as curvas de distribuição de tamanhos de partículas unimodais, na qual pode-se ver partículas com tamanho uniforme da mesma forma como observado para as nanopartículas do polímero derivado do DGU.

Figura 12 - Distribuição do tamanho de partículas para as polimerizações em miniemulsão via reações tiol-eno do P2. Razão Pd10e:Bu(SH)₂ 1:1.



Estas NPs também apresentaram morfologia esférica, demonstrada na Figura 13, em análise realizada em MEV e apresentaram uma temperatura de fusão cristalina maior que as sintetizadas com o monômero DGU, obtendo-se um valor de $T_m = 70$ °C, Figura 14. Este polímero caracteriza-se como um polímero semicristalino ligado ao seu comportamento de dupla fusão. Inicialmente, na temperatura de 50 °C ocorre a fusão dos cristais imperfeitos e em 70 °C dos cristais com maior grau de organização.

Figura 13 – Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas de P2 sintetizadas via reações tiol-eno. Razão molar Pd10e:Bu(SH)₂ 1:1.

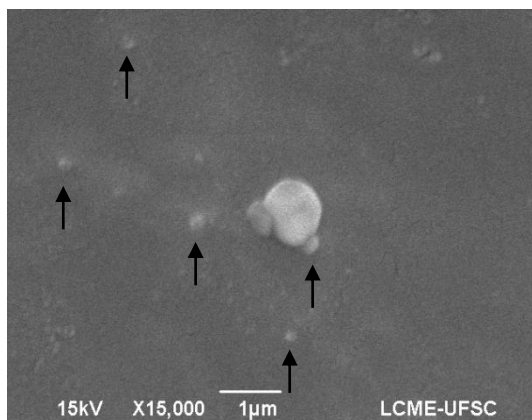
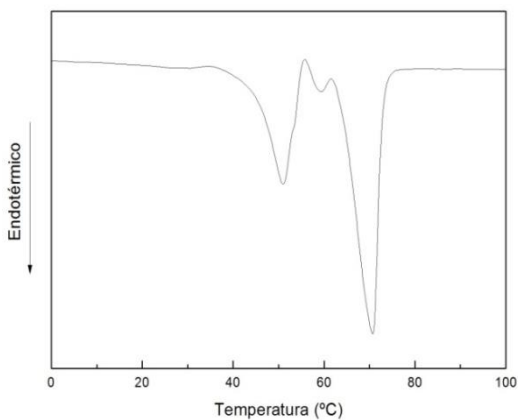
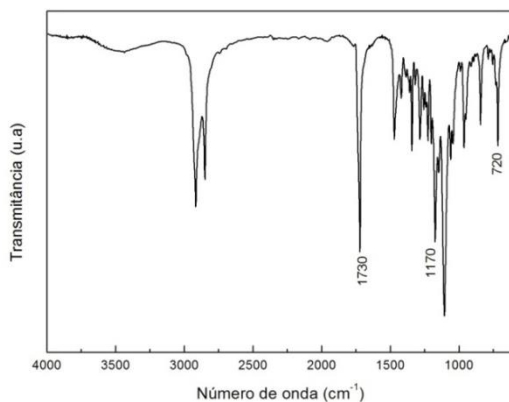


Figura 14 - Curva de DSC do polímero P1.



Os grupos funcionais presentes no polímero seco foram avaliados por análise de FTIR-ATR, sendo o espectro mostrado na Figura 15. Similar ao polímero sintetizado a partir do monômero DGU, o polímero P2 possui em 720 cm^{-1} a vibração característica da ligação S-C caracterizada pela adição do grupo tiol ao dieno e em 1170 cm^{-1} o estiramento da ligação éster C-O-C e a vibração intensa em 1730 cm^{-1} corresponde às ligações éster C=O.

Figura 15 - Espectro ATR-FTIR do polímero P2.



3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inicialmente, neste trabalho foram sintetizadas nanopartículas de poli(tioéter-éster) oriundas do monômero DGU (P1) e do monômero Pd10e (P2) por polimerização em miniemulsão via reações de adição tiol-eno e filmes poliméricos obtidos a partir de polímeros sintetizados pela polimerização em massa. As formulações utilizadas foram anteriormente testadas e otimizadas por Machado (2016) e Cardoso (2015).

Para as nanopartículas do P1, foram obtidas partículas esféricas com 190 nm e dispersão de 0,18, T_m de 64 °C, massa molar ponderal média de 20 kDa. Para as partículas do P2, o polímero apresentou uma T_m de 70 °C, massa molar ponderal média de 38 kDa e um tamanho de partícula em intensidade de 150 nm, com um índice de dispersão de 0,1.

As análises dos grupos funcionais demonstraram a adição do grupo sulfeto ao dieno durante reação de polimerização, em 720 cm^{-1} e a adição do grupo éster em 1170 cm^{-1} evidenciando que as reações de polimerização tiol-eno apresentam-se como uma ferramenta versátil na inclusão dos grupos funcionais como o éster na cadeia principal. Com o objetivo de avaliar a degradabilidade destes polímeros sintetizados, a hidrólise e hidrólise via enzimática destes materiais foi avaliada.

CAPÍTULO IV

4 DEGRADAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS E FILMES POLIMÉRICOS DE POLI (TIOÉTER-ÉSTER)

4.1 INTRODUÇÃO

Este capítulo abordará o método empregado para os ensaios de degradação hidrolítica e hidrólise enzimática das NPs e filmes poliméricos produzidos, descritos no Capítulo III, bem como as técnicas utilizadas para a caracterização destes materiais. De acordo com GREF *et al.* (1994) e WU *et al.* (2005), o estudo da degradação de NPs e filmes poliméricos é de suma importância, uma vez que esses se apresentam como biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicos ao organismo e são passíveis de atuação em aplicações biomédicas, como carreadores para liberação sustentada de fármacos.

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Material

Para os ensaios de degradação das NPs e filmes poliméricos foi utilizado tampão fosfato (PBS), preparado a partir de água destilada, fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4 , P.A 99%, Vetec), fosfato de sódio dibásico anidro (NaH_2PO_4 , P.A 98%, Vetec) e solução ácida preparada a partir de ácido clorídrico (HCl) (Dinâmica, P.A. 36,5%). Lipase B de *Candida antarctica* livre em estado líquido, a qual foi cedida pela Novozymes Latin América Ltda (Araucária, PR, Brasil) foi previamente concentrada e utilizada para medida da atividade enzimática e nos ensaios de degradação. Para a concentração da enzima Lipase B de *Candida antarctica* (CalB), realizada por diálise, foi utilizada solução tampão fosfato (0,2 M). Para medidas de atividade enzimática, foram utilizados palmitato de p-nitrofenila (Sigma-Aldrich, $M_w = 377,52$ g/mol), Na_2CO_3 0,5 N e PBS 0,05 M (pH 7).

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Concentração da Lipase B de *Candida antarctica*

A concentração da Lipase B de *Candida antarctica* (CalB) foi realizada seguindo método descrito por Chiaradia (2015). Esta etapa foi necessária para evitar possíveis interferências durante o estudo da degradação uma vez que a enzima estava em um caldo contendo sorbitol quando recebida. Assim, foi realizada diálise durante 48 h, com auxílio de uma membrana de celulose e tampão fosfato (pH 7,4; 0,2 M). Posterior a essa etapa, as soluções foram congeladas a -80 °C por 24 h e então submetidas ao processo de liofilização para remoção de toda a água livre presente na solução enzimática.

4.2.2.2 Medida da Atividade Enzimática

A atividade enzimática da enzima CalB foi medida através de metodologia descrita por Chiou & Wu (2004). Para isso, 0,1 g da enzima Lipase CalB foi adicionado em uma mistura contendo 1 mL de PBS 0,05 M (pH 7) e 1 mL de uma solução de p-nitrofenil palmitato (pNFP) (5%). A amostra foi incubada em banho termostático à 30 °C durante 5 min. A reação foi terminada com a adição de 2 mL de Na₂CO₃ 0,5 N, seguida pela centrifugação durante 10 min a 10.000 rpm. Em seguida, 0,5 mL do sobrenadante foi diluído 10 vezes em água destilada e analisado em 400 nm em um espectrofotômetro UV/VIS marca HITACHI, modelo U-1900. O valor da atividade da enzima foi realizado em triplicata e o desvio padrão entre as medidas foi calculado. Uma unidade (U) da enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar 1 umol de p-nitrofenol por minuto, nas condições experimentais. Os dados foram calculados através de curva de calibração realizada previamente.

4.2.2.3 Ensaio de Degradação das Nanopartículas de Poli (tioéter-éster)

A degradação foi avaliada adicionando-se 1 mL do produto das polimerizações em miniemulsão (P1 ou P2) em três meios de degradação: 2 mL de uma solução de ácido clorídrico (pH 2,8, 0,01 M) e em 2 mL de solução PBS (pH 7,4, 0,2 M) com e sem adição de 10 mg de enzima CalB. Estes estudos foram realizados a 37 °C em estufa Bacteriológica, modelo SP-101/42, SPLABOR. O comportamento da

degradação em meio ácido e em solução PBS foi avaliado durante três meses e em meio enzimático até completa degradação das NPs.

4.2.2.4 Ensaios de Degradação dos Filmes de Poli (tioéter-éster)

Filmes foram preparados a partir do polímero obtido via polimerização via reações tiol-eno em massa, utilizando como monômero o DGU. Estes, foram cortados em tamanhos de aproximadamente 1,5 x 0,7 cm e inseridos em três meios de degradação: 2 mL de HCl (pH 2,8; 0,01 M), 2 mL de PBS (pH 7,4; 0,01 M) com e sem adição de 10 mg da enzima CalB. Os filmes foram inicialmente pesados em balança da marca MARTE (modelo AY 220, com uma precisão de 0,001 g) e inseridos nos meios de degradação. Os valores de massa molar dos filmes encontram-se nas Tabelas 4 e 5 do Âpendice A.

Em determinados intervalos de tempo (1, 2, 4, 5, 7, 8 e 12 semanas) de degradação para o meio com solução PBS e HCl e em intervalor de tempo (6, 12, 24, 48, 336 384, 912 e 1176 h) em meio enzimático os filmes foram retiradas do meio de degradação, lavados com água destilada, secos com papel absorvente e então levados à estufa de convecção forçada por 48 h. Determinou-se então a perda de massa, calculada pela Equação 1, sendo W_l a perda de massa em porcentagem, W_i a massa inicial das amostras e W_f a massa final da amostra seca após a degradação.

$$W_l(\%) = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

4.2.3 Caracterização das amostras

O estudo da degradação das NPs foi realizado através de análises já descritas no Capítulo 3, item 3.3. As técnicas de caracterização utilizadas foram de DLS, na qual acompanhou-se se haveria aumento do tamanho das partículas e/ou da dispersão indicando desestabilização do sistema, análises de GPC foram realizadas para avaliar a redução na massa molar pela hidrólise do material polimérico, análises de FTIR-ATR foram feitas identificando quali- e quantitativamente a composição das amostras após degradadas. Análises de DSC foram realizadas para conhecimento das propriedades térmicas antes e após a degradação e análises de MEV foram efetuadas para identificar a morfologia final

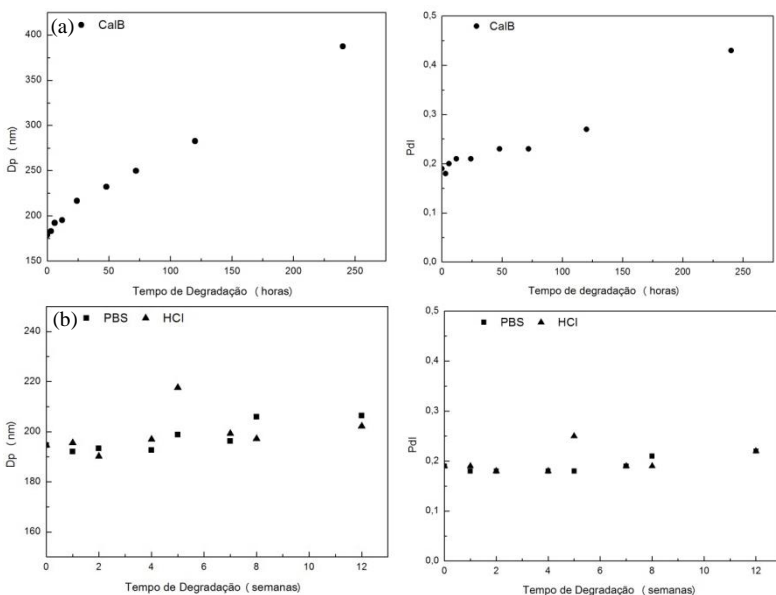
destas partículas. A avaliação da degradação dos filmes poliméricos foi realizada através da perda de massa em balança.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Influência das condições de degradação no tamanho, dispersão, massa molar e morfologia das nanopartículas Oriundas do Monômero DGU

Os látices do P1, M01 e M02, foram inseridos nos três meios de degradação: HCl e solução PBS com e sem adição de enzima. O valor obtido para a atividade da enzima, determinada em triplicata, foi de $2 \pm 0,1$ U/g. Os valores referentes aos gráficos aqui mostrados, podem ser encontrados nas Tabelas 1, 2 e 3 do Apêndice A da presente dissertação. Na Figura 16 é possível visualizar o comportamento do tamanho das partículas e distribuição de tamanho com o tempo de degradação, em relação ao meio de degradação.

Figura 16 - Tamanho de partícula e dispersão em função do tempo de degradação para látices do P1 (a) M02 em meio enzimático com CalB (5% enzima em relação ao polímero) (b) M01 meio com PBS (0,2 M, pH 7,4) e HCl (0,01 M; pH 2,8).



Análises de microscopia eletrônica de varredura das NPs foram realizadas após a degradação para análise da morfologia final das NPs. Em solução tampão fosfato não foi possível observar alteração acentuada da morfologia das NPs, Figura 17(a), e não ocorreu aumento no diâmetro médio das partículas na análise de DLS, Figura 16b. Em meio ácido, foi observado um ligeiro aumento do diâmetro médio das partículas e dispersão das mesmas, chegando a um D_p de 206 ± 2 nm e PDI de $0,22 \pm 0,01$, e poucas partículas puderam ser visualizadas nas imagens de MEV, Figura 17(b). As análises foram realizadas ao final de 12 semanas no meio de incubação.

Em meio enzimático, Figura 16(a), o diâmetro médio das partículas e sua dispersão aumentaram gradualmente, apresentando valores de 387 ± 11 nm e PDI de $0,43 \pm 0,01$ em 240 h. Neste caso, a enzima CalB hidrolisou a ligação éster disponível e uma das possíveis explicações para esse aumento está ligada aos produtos ácidos formados que favorecem a entrada de água nas partículas polimérica intumescendo-as.

A superfície levemente porosa e a morfologia alterada observada, deve-se provavelmente aos produtos gerados durante a degradação enzimática, Figura 17(c). Mesmo comportamento foi encontrado por CHEN *et al.* (2000), quando estudou a degradação de micropartículas de PCL com enzima Lipase e por BAIER *et al.*, (2014) ao degradar nanopartículas de poli (ácido L-láctico) (PLLA) pela ação da enzima proteinase K.

Comparando os valores de massa molar, foi possível observar uma rápida degradação em meio enzimático utilizando Lipase B de *Candida antarctica*, sendo obtido 90% de redução na massa molar (21,5 kDa para 2 kDa) ao final de 240 h de degradação, como mostrado na Figura 18(a). O decréscimo acentuado observado em meio enzimático deve-se à rápida quebra das ligações éster do polímero devido à hidrólise enzimática e os fragmentos de cadeia gerados dissolvem-se na fase aquosa. Em meio ácido, foi verificado um decréscimo gradual da massa molar, chegando a 37% de redução em 12 semanas (19,7 kDa para 12,0 kDa), enquanto que em solução PBS não foi detectada alteração durante o estudo, Figura 18 (b). Os valores de massa molar média ponderada (M_w) e numérica (M_n) em relação ao tempo de degradação estão disponíveis no Apêndice A.

Figura 17 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as amostras do PI após degradação (a) partículas em meio com PBS (12 semanas); (b) partículas em meio com HCl (12 semanas); (c) partículas em meio enzimático (240h).

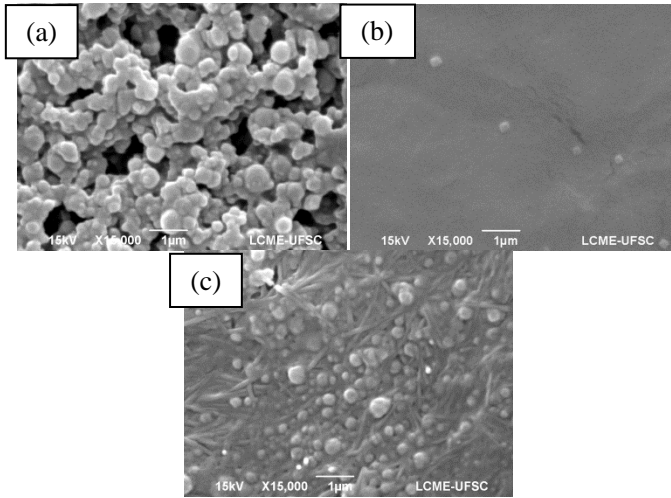
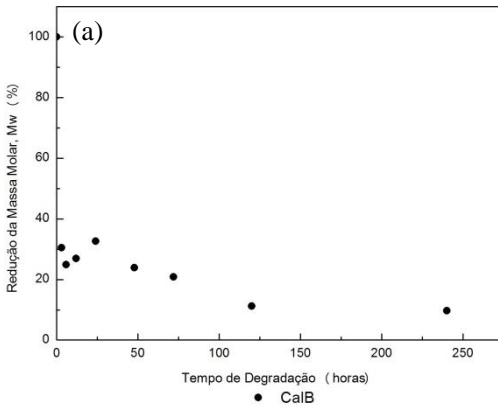
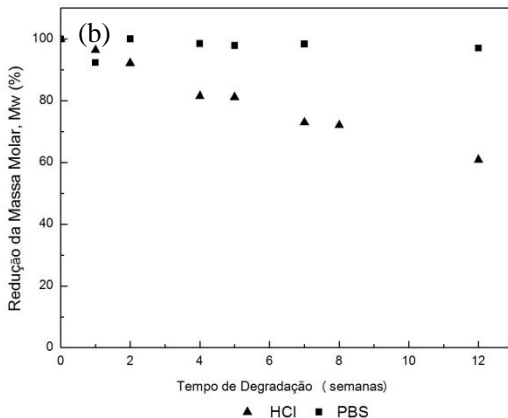


Figura 18 - Decréscimo no valor da massa molar ponderal (M_w) do polímero PI em (a) meio com enzima Lipase CalB (b) meio com PBS e HCl





Comportamento similar é apresentado em um estudo de degradação da Policaprolactona (PCL) por CHAWLA & AMIJI (2002), no qual a degradação do PCL em meio enzimático, utilizando a enzima Lipase de *Pseudomonas* foi de quase 100% em 36 h e em meio básico não foi observada redução significativa de massa molar em 140 dias de estudo, devido à alta hidrofobicidade e cristalinidade deste polímero.

As curvas de distribuição de massa molar podem ser observadas na Figura 19 para meio enzimático, Figura 20 para meio de degradação com PBS e Figura 21 para o meio com HCl. Com a enzima CalB atuando como catalisadora da reação, pode-se observar que já nas 3 h iniciais de degradação ocorreu deslocamento da curva de distribuição da massa molar, sendo deslocada para massas molares molares menores, e após, um deslocamento gradual é observado com o tempo de degradação. Em meio com PBS e HCl, o comportamento apresentado foi similar ao encontrado para Wu *et al.* (2015) ao analisar a degradação do poli(β -tioéter-éster) (PTE) e copolímeros poli(β -tioéter-éster-co- ϵ -caprolactona) em diferentes valores de pH, observando que em condições ácidas houve um deslocamento gradual, como também pode ser visto na Figura 21, com a quebra das ligações formando oligômeros e após, monômeros e em meio PBS não foi observada alteração. Este resultado mostrou-se também consistente com os valores encontrados de massa molar e com as análises de FTIR-ATR.

Figura 19 - Distribuição da Massa Molar (sinal normalizado) em função do tempo de retenção do polímero inicial P1 e após degradação. Meio de degradação com enzima CalB (relação enzima/polímero 5%).

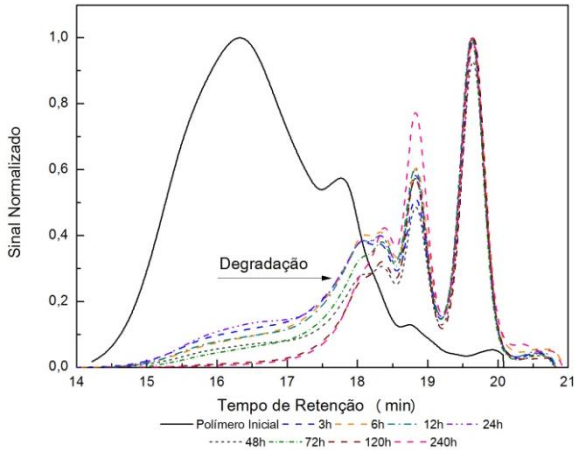


Figura 20 - Distribuição da Massa Molar (sinal normalizado) em função do tempo de retenção para polímero inicial, P1, e após degradação. Meio de degradação com PBS (0,2M, pH 7,4).

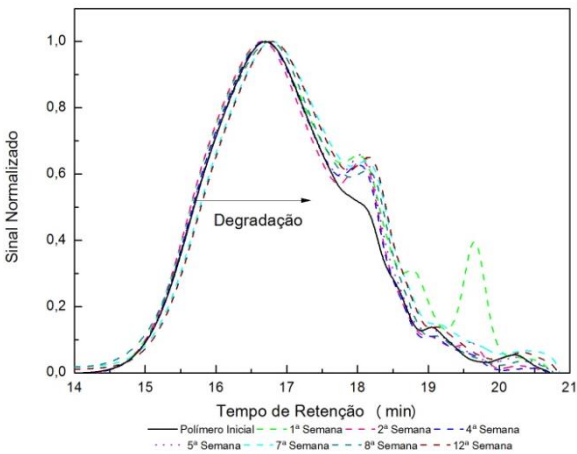
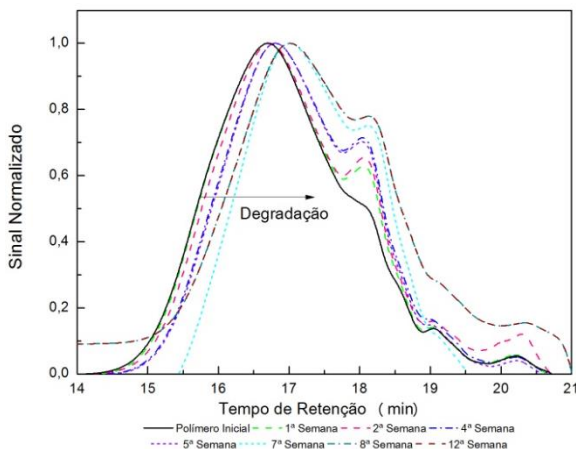


Figura 21 - Distribuição da Massa Molar (sinal normalizado) em função do tempo de retenção para polímero inicial, P1, e após degradação. Meio de degradação com HCl (0,01M, pH 2,8).



Os espectros apresentados na Figura 22 mostram os grupos funcionais presentes ao longo da degradação em meio enzimático. Em 720 cm^{-1} pode ser observado que a intensidade da ligação tioéter, S-C, permanece constante durante a degradação enzimática, porém, é visível uma diminuição na intensidade da banda em 1170 cm^{-1} , o que indica o consumo das ligações éster disponíveis, resultante da hidrólise provocada pela enzima CalB. Observa-se que um pequeno pico é formado em aproximadamente 1610 cm^{-1} já em 3 h de degradação em meio enzimático o que, segundo Stuart (2004), pode ser atribuído a ácido carboxílico desprotonado, um dos possíveis produtos de degradação. Isso pode ser confirmado pela banda que fica mais intensa em 3400 cm^{-1} sendo relatada como formação de hidroxilas.

Nos espectros apresentados na Figura 23, pode-se observar as bandas referentes aos grupos funcionais das partículas degradadas em meio HCl e PBS. A ligação S-C em 720 cm^{-1} permanece inalterada durante a degradação e o pico referente a ligação éster, em 1170 cm^{-1} , fica mais intenso em meio com HCl após as 12 semanas de degradação. Esta ligação ao ser hidrolisada, pode formar como produto álcool, que também possui banda característica nesta região, o que explica seu aumento de intensidade. Em meio PBS, não foi avaliada alteração nas bandas características citadas, o que corrobora as análises anteriores feitas.

Figura 22 - Espectros FTIR-ATR do polímero inicial P1 e após degradação. Degradação foi avaliada em 37 °C, pH 7,4, relação enzima/polímero 5% (m/m).

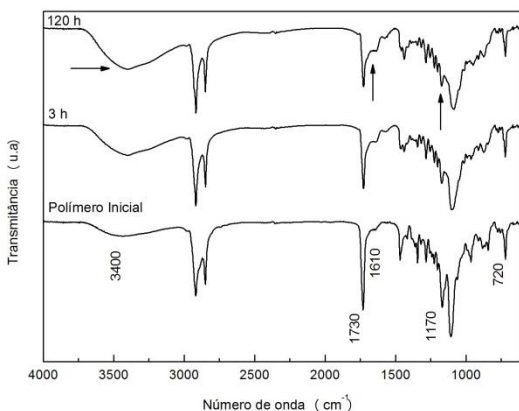
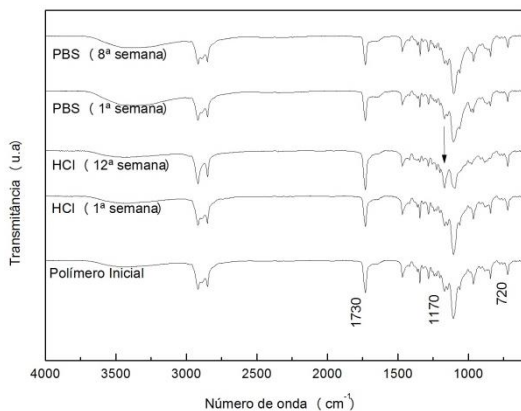
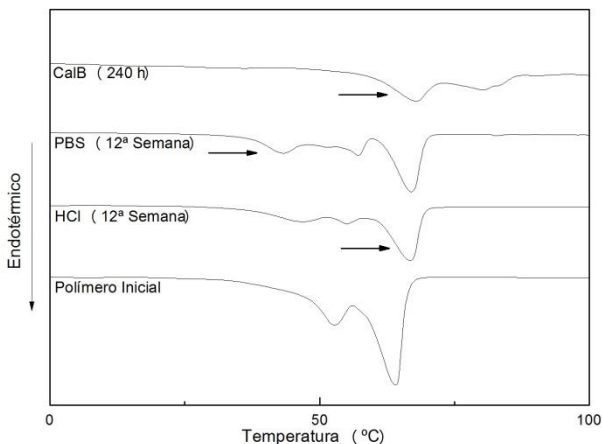


Figura 23 - Espectros FTIR-ATR do polímero inicial P1 e após degradação em meio com HCl (pH 2,8) e PBS (pH 7,4). Degradação foi avaliada em 37°C.



Através da análise de DSC, curva apresentada na Figura 24, é possível ver que no polímero inicial tem-se duas regiões cristalinas, como já discutido anteriormente na caracterização das amostras, típico de polímeros semi cristalinos.

Figura 24 – Curvas de Calorimetria Diferencial de Varredura mostrando as temperaturas de fusão cristalina para o polímero P1 antes e após degradação nos diferentes meios estudados.



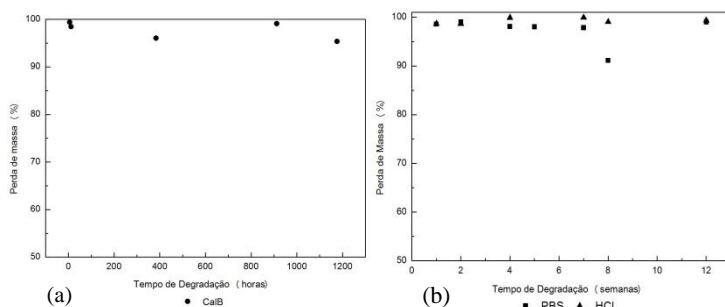
Visualizando o polímero na 12^a semana de degradação em meio HCl é possível ver que o primeiro pico referente aos cristais imperfeitos desaparece, e o pico referente aos cristais organizados, que antes encontrava-se em 65 °C, desloca-se suavemente para a direita, em 67 °C. Isto indica claramente que o polímero sofreu hidrólise ácida, ocorrendo inicialmente a degradação dos cristais imperfeitos. No meio com PBS porém, é possível visualizar um pequeno pico em aproximadamente 43 °C, mostrando que a degradação ocorre mais lentamente, sendo necessário mais de 12 semanas para total degradação do material polimérico. Já com uso de enzimas, em 240 h, pode-se ver que o primeiro pico referente a fase amorfa logo desaparece, restando apenas um pico endotérmico de fraca intensidade em 67 °C, ocorrendo neste caso, rápida hidrólise via enzimática. Este comportamento apresentado indica uma degradação heterogênea no material, o que é confirmado por estudos de Park (1995).

4.3.2 Degradação dos filmes poliméricos oriundos do monômero DGU

O estudo da degradação dos filmes poliméricos preparados a partir do polímero sintetizado em massa foi realizado por perda de massa em balança durante três meses. Os valores estão apresentados no

Apêndice A, Tabelas 4, 5 e 6. Pode-se ver na Figura 25, que durante os três meses de degradação não houve variação no valor de massa para os filmes degradados em PBS e HCl e nem para aqueles degradados no meio com PBS e adição da enzima Lipase CalB. Comparando estes resultados com a degradação das nanopartículas de P1, pode-se ver uma relação direta entre a área superficial e a velocidade com que a degradação ocorre, sendo que quanto maior a área de superfície, mais rápido ocorreu este processo.

Figura 25 - Perda de massa para os filmes de P1 degradados (a) Meio enzimático; (b) Meio com PBS e HCl



4.3.3 Influência das condições de degradação no tamanho, dispersão e morfologia das partículas para o polímero oriundo do Pd10e

As nanopartículas sintetizadas via polimerização tiol-eno em miniemulsão utilizando o monômero Pd10e apresentaram tamanho de partícula e dispersão mostrados na Figura 26. Os valores referentes aos gráficos aqui discutidos são apresentados nas tabelas 7, 8 e 9 do Apêndice A desta dissertação. A morfologia final destas NPs também foi verificada e está mostrada na Figura 27. Pode-se observar que no meio de degradação com PBS, Figura 27(a), não ocorreu diferença na morfologia e por análises de DLS, Figura 26(b), obteve-se um valor constante durante todo o tempo de degradação para Dp e PdI, mesmo comportamento que para as NPs oriundas do monômero DGU. Em meio ácido, poucas partículas puderam ser observadas (Figura 27(b)), e da mesma maneira que em meio PBS, teve-se um comportamento de Dp e PdI constantes demonstrado na Figura 26(b). Já em meio enzimático, o aumento no tamanho de partícula e da dispersão ocorreu muito mais rápido do que para o polímero oriundo do monômero DGU descrito

anteriormente, obtendo-se um valor de D_p de 409 ± 62 e PdI de $0,8 \pm 0,11$ em 4,5 h de estudo mostrados na Figura 26(a). As partículas em meio enzimático apresentaram formação de agregados, alterando a morfologia e obtendo superfície rugosa. O aumento no tamanho das partícula deve-se ao intumescimento das partículas e a degradação é mais acentuada quando comparada as nanopartículas de P1, devido a cadeia polimérica possuir menos impedimentos, sendo mais aberta e de maior acesso para ataque enzimático.

Figura 26 - Tamanho de partícula (D_p) e dispersão (PdI) em função do tempo de tempo de degradação para os látices de P2 (a) meio enzimático com CalB (7% enzima em relação ao polímero; atividade enzimática 2 U/g) (b) meio com PBS (0,2 M, pH 7,4) e HCl (0,01 M; pH 2,8).

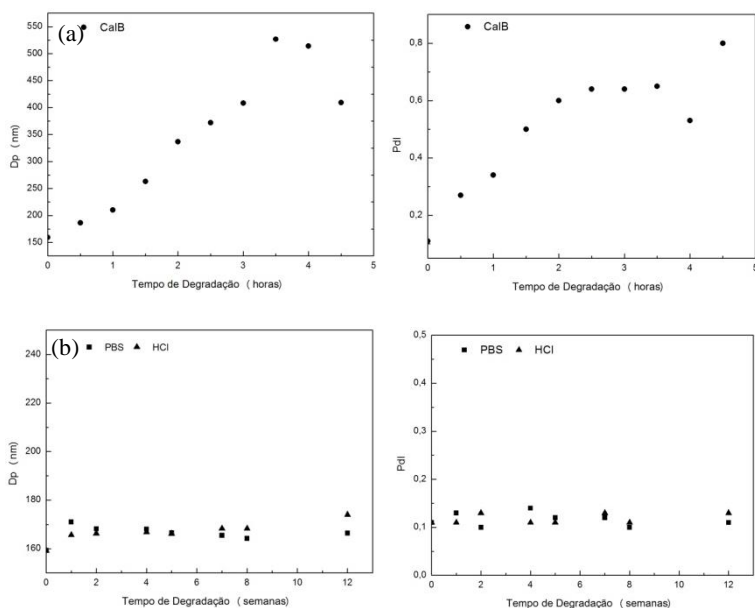
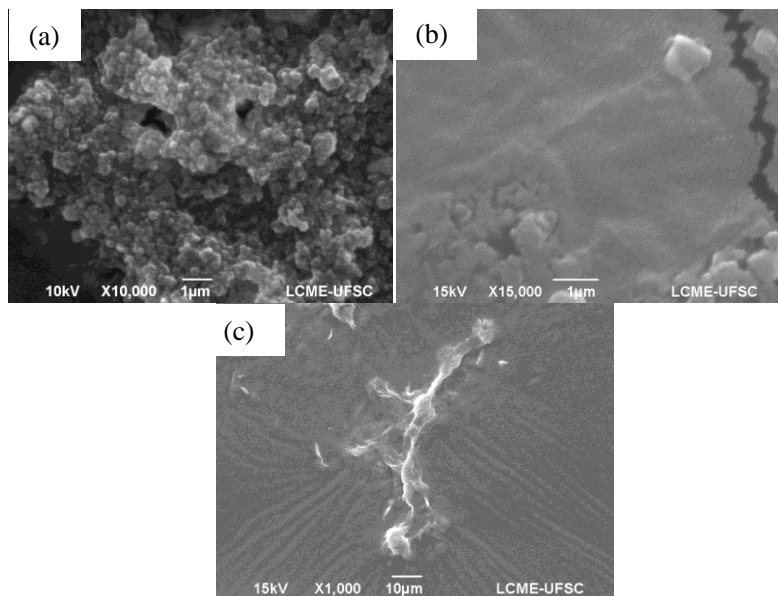


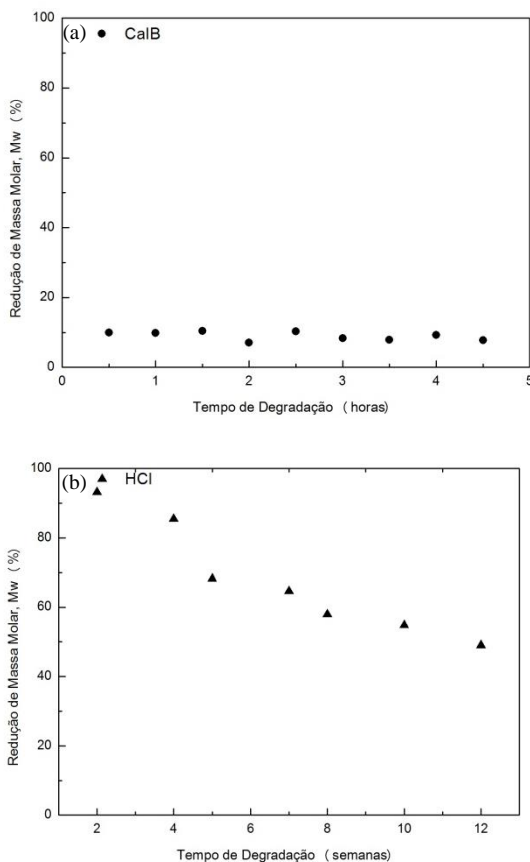
Figura 27 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as amostras de P2 após degradação; (a) meio com PBS (12 semanas); (b) meio com HCl (12 semanas); (c) meio com CalB (48 horas)



Através das análises de massa molar, foi possível comparar a sua redução nestas nanopartículas. Na Figura 28(a), em meio enzimático é observada uma redução da massa molar de 90% já nos primeiros 30 min de degradação, enquanto que para o polímero P1, este decréscimo foi de 90% apenas em 240 h de estudo. Esta hidrólise enzimática rápida que foi observada para as partículas de P2 deve-se a sua estrutura molecular a qual possui menos impedimentos ao ataque enzimático, confirmando o discutido na presente revisão, que a estrutura do polímero influencia diretamente na taxa de degradação. Após 5 h de degradação, não foi mais observada diferença na massa molar do polímero, como mostrado na Tabela 9, do apêndice A.

Para as amostras inseridas no meio com HCl, esta redução na massa molar foi de 51% nos três meses de degradação, demonstrado na Figura 28(b), sendo 14% maior que para o polímero P1 degradado em meio ácido. Já para o meio em PBS, não ocorreram alterações na massa molar.

Figura 28 - Decréscimo no valor da massa molar ponderal (Mw) para o P2 em (a) meio com Calb e (b) HCl.



A Figura 29 mostra o gráfico de distribuição de massa molar para o meio com enzima CalB (atividade 2 U/g). É possível observar o deslocamento das curvas de distribuição para massas molares menores, indicando a degradação do polímero, o que mostra que ocorreu a quebra das ligações poliméricas, com formação de oligômeros e monômeros. Para as amostras em meio com HCl, Figura 31, o mesmo comportamento foi encontrado, o que também corrobora o comportamento encontrado para o polímero P1. Para as partículas degradadas em PBS, Figura 30, não foram observadas alterações.

Figura 29 - Distribuição da massa molar (sinal normalizado) em função do tempo de retenção do polímero P2 antes após degradação. Meio de degradação Enzima CalB (relação enzima/polímero 7%).

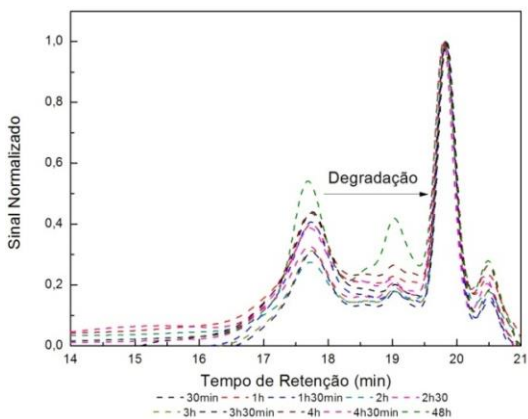


Figura 30 - Distribuição da massa molar (sinal normalizado) em função do tempo de retenção do polímero P2 antes após degradação. Meio de degradação com PBS (0,2 M; pH 7,4)

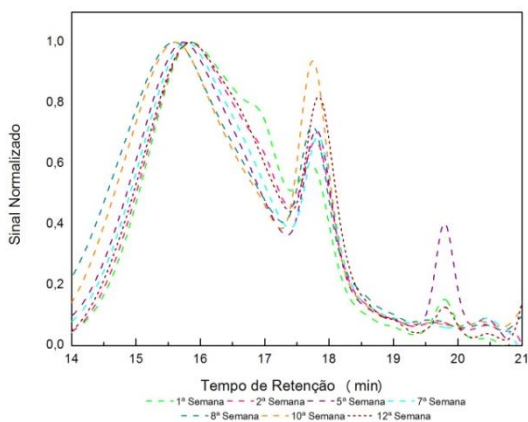


Figura 31 - Distribuição da massa molar (sinal normalizado) em função do tempo de retenção do polímero P2 antes após degradação. Meio de degradação com HCl (pH 2,8).

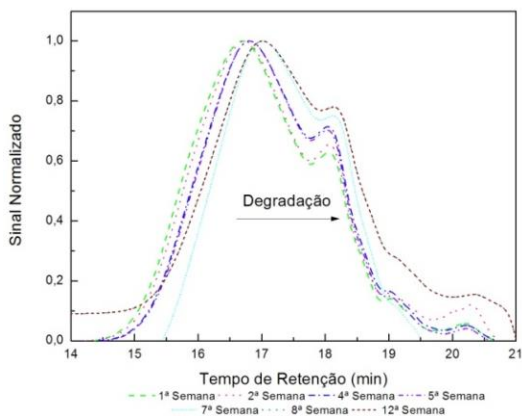
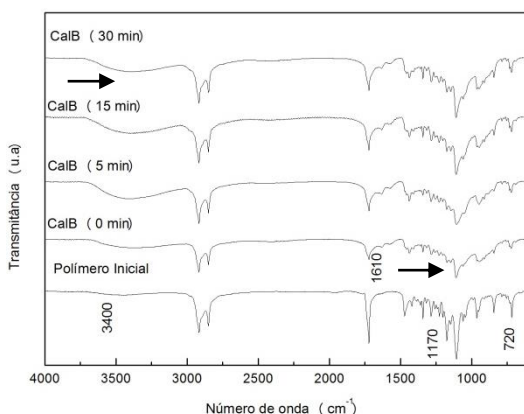


Figura 32 - Espectros FTIR-ATR do polímero P2 antes e após degradação em meio com CalB. Degradação foi avaliada em 37 °C, pH 7,4, relação enzima/polímero 7%.



Através de análise dos grupos funcionais presentes, antes e após a degradação da amostra em meio enzimático, Figura 32, é possível observar imediatamente em $t = 0$, quando o polímero entra em contato com a enzima, que ocorre a diminuição da intensidade da ligação éster, em 1170 cm^{-1} . Em 1610 cm^{-1} um pico é formado, podendo este ser característico de ácido carboxílico desprotonado, o que também pode ser

confirmado pelo surgimento de uma banda mais larga em 3400 cm^{-1} pela formação de hidroxila. A ligação tioéter (S-C) está presente em 720 cm^{-1} .

Figura 33 - Espectros FTIR-ATR do polímero P2 antes e após degradação em meio PBS e HCl. Ensaio realizado em 37°C .

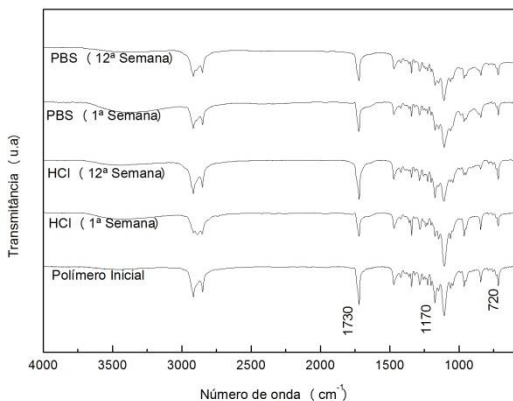
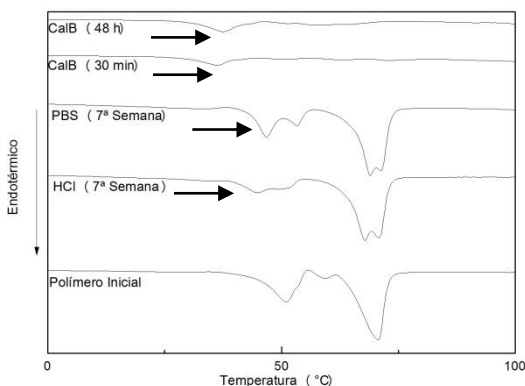


Figura 34 – Curvas de calorimetria diferencial de varredura para o polímero P2 antes e após degradação nos diferentes meios estudados.



Na Figura 33, apresentam-se os espectros obtidos para as NPs em meio com HCl e PBS, nas primeiras e últimas semanas de degradação. A ligação advinda da adição do grupo tiol ao dieno permanece constante em 720 cm^{-1} enquanto que, para o meio com HCl na 12ª semana, ocorre

aumento da banda característica em 1170 cm^{-1} o que pode ser ligado a formação de álcool, que também possui comprimento de onda nesta faixa. Já para a amostra em meio PBS, não foram visualizadas alterações.

Nas curvas de DSC, Figura 34, determinadas para o polímero P2 é possível ver comportamento similar ao encontrado para o P1. Para a amostra degradada em HCl, tem-se a degradação da região amorfa, em $50\text{ }^\circ\text{C}$ mais acentuada quando comparado as partículas em meio PBS, o que é explicado pela rápida hidrólise ácida que ocorre nas regiões com cristais imperfeitos em meio com ácido clorídrico. Em meio enzimático, pode-se identificar que em 30 min de degradação, o polímero já foi totalmente degradado, restando apenas um pequeno pico em 36°C , sendo a degradação enzimática mais acentuada quando comparada ao polímero P1.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reação de polimerização em miniemulsão via reações tiol-eno utilizando como base monômeros de origem renovável mostrou-se como um processo versátil para a obtenção de polímeros degradáveis.

A degradação foi avaliada em meio com ácido clorídrico (HCl) (0,01M, pH 2,8) e em solução tampão fosfato (PBS) (0,2M, pH 7,4) com e sem adição da enzima Lipase B de *Candida antarctica*. As nanopartículas oriundas dos dois monômeros mostraram-se suscetíveis a hidrólise em meio ácido e sofreram rápida biodegradação na presença da enzima CalB, comportamento que não foi encontrado no material degradado em solução PBS. O polímero P2 mostrou ainda, uma degradação mais rápida quando comparado ao P1. No filme, não foram observadas diferenças nos três meios estudados, comprovando que a área de superfície é fator determinante na degradação.

Comprovou-se ainda para as nanopartículas, a hidrólise das ligações éster na presença de enzimas, tornando este material biodegradável e a adição das ligações sulfeto, comprovada por aumentar a degradabilidade de acrilatos, sugerindo seu potencial na liberação sustentada de fármacos.

CAPÍTULO V

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÃO

As partículas de Poli-co-1,3-propileno-diundeca-10-enoato-co-1,4-butanoditiol apresentaram uma degradação mais acelerada em meio enzimático quando comparadas as nanopartículas oriundas do Poli-co-dianidro-D-glucitila-diundeca-10-enoato-co-1,4-butanoditiol. Isto se deve à estrutura do polímero, que mostra-se mais aberta e de acesso fácil para ocorrer a degradação. Para ambos ocorreu alteração da morfologia inicial das NPs e aumento do tamanho das partículas ocasionado pelos produtos formados com diminuição na intensidade da ligação éster, comprovando a hidrólise enzimática pela quebra destas ligações

Em meio ácido, também observou-se uma perda de massa 14% superior para as partículas do polímero oriundo do monômero Pd10e, quando comparado as oriundas do DGU, durante 3 meses de estudo. Em solução PBS não foi observada alteração para ambos materiais poliméricos. As análises de distribuição de massa molar e de comportamento térmico durante a degradação, corroboraram estes resultados. Os filmes também derivados de DGU, não mostraram perda de massa mesmo após 3 meses em meio de degradação ácido, básico e com adição de enzimas, indicando que a área de superfície é parâmetro crucial na degradação destes materiais, necessitando maiores tempos de estudo para a degradação.

As nanopartículas de poli(tioéter-éster) derivadas de monômeros de origem renovável mostraram-se como polímeros com alto potencial para uso na liberação sustentada de fármacos devido à degradabilidade frente a meio enzimático e ácido apresentada, sendo o primeiro trabalho realizado com partículas de origem renovável. Porém, estudos dos produtos de degradação ainda devem ser efetuados para posterior encapsulamento e estudo de liberação sustentada de fármaco.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar os produtos de degradação obtidos por análise de HPLC;
- Realizar encapsulamento de fármacos nas nanopartículas poliméricas;
- Testes de liberação *in vitro* dos fármacos encapsulados na matriz polimérica.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXIS, F. Factors Affecting the Degradation and Drug-Release Mechanism of Poly(lactic acid) and Poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)]. **Polymer International**, v. 54, n. 1, p. 36–46, 2005.

AMATO, D. N. V. N. D. V. D.; FLYNT, A. S.; PATTON, D. L. D. Functional, Sub-100 nm Polymer Nanoparticles via Thiol–ene Miniemulsion Photopolymerization. **Polym. Chem.**, p. 5625–5632, 2014.

ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. Polyreactions in Miniemulsions. **Progress in Polymer Science**, v. 27, p. 689–757, 2002.

ASUA, J. M. Miniemulsion Polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 7, p. 1283–1346, 2002.

AZEVEDO, H. S.; REIS, R. L. Understanding Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate. In: CRC PRESS LLC (Ed.). **Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. p. 177–202.

BAIER, G.; CAVALLARO, A.; FRIEDEMANN, K.; MÜLLER, B.; GLASSER, G.; VASILEV, K.; LANDFESTER, K. Enzymatic Degradation of Poly (L-lactide) Nanoparticles Followed by the Release of Octenidine and their Bactericidal Effects. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.10, p. 131-139, 2014..

BELBELLA, A.; VAUTHIER, C.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. In Vitro Degradation of Nanospheres from Poly(D,L-lactides) of Different Molecular Weights and Polydispersities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, n. 1-2, p. 95–102, 1996.

BØE, A. G. Degradation and Stability of PBCA and POCA Nanoparticles. Dissertação de Mestrado. Norwegian University of Science and Technology, 2013.

CARDOSO, P. M. Polimerização em Miniemulsão de Monômeros Derivados de Óleos Vegetais. Qualificação de Doutorado. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

CAUICH-RODRÍGUEZ, J. V et al. Degradation of Polyurethanes for

Cardiovascular Applications. In: **Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications**, cap. 3, p. 51–82, 2013.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Pergamon Biodegradable Polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 97, p. 1273–1335, 1998.

CHAWLA, J. S.; AMIJI, M. M. Biodegradable Poly (ϵ -caprolactone) Nanoparticles for Tumor- Targeted Delivery of Tamoxifen. **International journal of pharmaceuticals**, v. 249, p. 127–138, 2002.

CHEN, D. R.; BEI, J. Z.; WANG, S. G. Polycaprolactone Microparticles and their Biodegradation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 67, n. 3, p. 455–459, 2000.

CHIARADIA, V. Síntese de Nanopartículas Magnéticas de Poli(ureia-uretano) e Aplicação Como Suporte na Imobilização da Lipase B de *Candida Antarctica*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

CHIOU, S. H.; WU, W. T. Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Chitosan with Activation of the Hydroxyl Groups. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 197–204, 2004.

CIPOLATTI, E. P.; VALÉRIO, A.; NICOLETTI, G.; THEILACKER, E.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; NINOW, J. L.; DE OLIVEIRA, D. Immobilization of *Candida Antarctica* Lipase B on PEGylated poly(urea-urethane) Nanoparticles by Step Miniemulsion Polymerization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 109, p. 116–121, 2014.

DUNNE, M.; CORRIGAN, O. I.; RAMTOOLA, Z. Influence of Particle Size and Dissolution Conditions on the Degradation Properties of Polylactide-co-glycolide Particles. **Biomaterials**, v. 21, n. 16, p. 1659–1668, 2000.

GAN, Z.; LIANG, Q.; ZHANG, J.; JING, X. Enzymatic Degradation of Poly(ϵ -caprolactone) Film in Phosphate Buffer Solution Containing Lipases. **Polymer Degradation and Stability**, v. 56, n. 2, p. 209–213, 1997.

GOGOLEWSKI, S. Resorbable Polymers for Internal Fixation. **Clinical materials**, v. 10, n. 1-2, p. 13–20, 1992.

GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V.; STEINMACHER, F. R.;

- PERES, L. B.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. Biodegradable Polymer Nanoparticles. In: **Biodegradable Polymer: New Biomaterial Advancement and Challenges**, cap. 3, p. 359–404, 2015.
- GOPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, 1996.
- HERZOG, K.; MÜLLER, R.-J.; DECKWER, W.-D. Mechanism and kinetics of the enzymatic hydrolysis of polyester nanoparticles by lipases. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 10, p. 2486–2498, out. 2006.
- HOYLE, C. E.; BOWMAN, C. N. Thiol-ene click chemistry. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 9, p. 1540–1573, 2010.
- HOYLE, C. E.; LEE, T. Y.; ROPER, T. Thiol-enes: Chemistry of the Past with Promise for the Future. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, n. 21, p. 5301–5338, 2004.
- JASINSKI, F.; LOBRY, E.; TARABLSI, B.; CHEMTOB, A.; CROUTXÉ-BARGHORN, C.; NOUEN, D. Le; CRIQUI, A. Light-Mediated Thiol-ene Polymerization in Miniemulsion: A Fast Route to Semicrystalline Polysulfide Nanoparticles. **ACS Macro Letters**, v. 3, n. 9, p. 958–962, 2014.
- JASINSKI, F.; RANNÉE, A.; SCHWEITZER, J.; FISCHER, D.; LOBRY, E.; CROUTXÉ-BARGHORN, C.; SCHMUTZ, M.; LE NOUEN, D.; CRIQUI, A.; CHEMTOB, A. Thiol–Ene Linear Step-Growth Photopolymerization in Miniemulsion: Fast Rates, Redox-Responsive Particles, and Semicrystalline Films. **Macromolecules**, v. 49, n. 4, p. 1143–1153, 2016.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126–139, 2004.
- LANDFESTER, K. Synthesis of Colloidal Particles in Miniemulsions. **Annual Review of Materials Research**, v. 36, n. 1, p. 231–279, ago. 2006.
- LEJA, K.; LEWANDOWICZ, G. Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers - A Review. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 19, n. 2, p. 255–266, 2010.
- LEMOINE, D.; FRANCOIS, C.; KEDZIEREWICZ, F.; PREAT, V.;

HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Stability Study of Nanoparticles of Poly(ϵ -caprolactone), Poly(D,L-lactide) and Poly(D,L-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v. 17, n. 22, p. 2191–2197, 1996.

LOWE, A. B. Thiol-ene “click” Reactions and Recent Applications in Polymer and Materials Synthesis. **Polym. Chem.**, v. 1, n. 1, p. 17–36, 2009.

LUCAS, N.; BIENAIME, C.; BELLOY, C.; QUENEUEDEC, M.; SILVESTRE, F.; NAVA-SAUCEDO, J.-E. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. **Chemosphere**, v. 73, n. 4, p. 429–442, 2008.

MACHADO, T. O. Synthesis of Poly (tioether-ester) Nanoparticles Derived From Renewable Resources via Thiol-ene Polymerization in Miniemulsion. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

MACHADO, T. O.; SAYER, C.; ARAUJO, P. H. H. Thiol-ene polymerisation : A Promising Technique to Obtain Novel Biomaterials. **European Polymer Journal**, 2016.

MAHAPATRO, A.; SINGH, D. K. Biodegradable Nanoparticles are Excellent Vehicle for Site Directed in-vivo Delivery of Drugs and Vaccines. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 55, 2011..

MOHAMMAD, A. K.; REINEKE, J. J. Quantitative Detection of PLGA Nanoparticle Degradation in Tissues Following Intravenous Administration. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2183–2189, 2013.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. June, p. 561–573, 2006.

MUSYANOVYCH, A.; SCHMITZ-WIENKE, J.; MAILÄNDER, V.; WALTHER, P.; LANDFESTER, K. Preparation of Biodegradable Polymer Nanoparticles by Miniemulsion Technique and Their cell Interactions. **Macromolecular Bioscience**, v. 8, n. 2, p. 127–39, 11 fev. 2008.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable Polymers as Biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 762–798, ago. 2007.

ODIAN, G. **Radical Chain Polymerization**. 4^a Ed., v. 58, 61 p.

PANYAM, J.; DALI, M. M.; SAHOO, S. K.; MA, W.; CHAKRAVARTHI, S. S.; AMIDON, G. L.; LEVY, R. J.; LABHASETWAR, V. Polymer Degradation and *In Vitro* Release of a Model Protein from Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Nano- and Microparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 92, n. 1-2, p. 173–187, 2003.

PANYAM, J.; LABHASETWAR, V. Biodegradable Nanoparticles for Drug and Gene Delivery to Cells and Tissue. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 3, p. 329–347, fev. 2003.

PARK, T. G. Degradation of Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres: Effect of Copolymer Composition. **Biomaterials**, v. 16, n. 15, p. 1123–1130, 1995.

PENG, H.; LING, J.; LIU, J.; ZHU, N.; NI, X.; SHEN, Z. Controlled Enzymatic Degradation of Poly(ϵ -caprolactone)-Based Copolymers in the Presence of Porcine Pancreatic Lipase. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 4, p. 643–650, 2010.

PERES, L. B. Obtenção de Nanopartículas de PLLA e Nanopartículas Blenda PLLA/PMMA e PLLA/PS para Incorporação de um Análogo da isoniazida. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

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

REDDY, S. K.; ANSETH, K. S.; BOWMAN, C. N. Modeling of Network Degradation in Mixed Step-Chain Growth Polymerizations. **Polymer**, v. 46, n. 12, p. 4212–4222, 2005.

REZENDE, S.; STANISÇUASKI, S.; LUCCA, L. De; RAFFIN, A. Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para a Administração de Fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

RYDHOLM, A. E.; ANSETH, K. S.; BOWMAN, C. N. Effects of neighboring sulfides and pH on ester hydrolysis in thiol-acrylate photopolymers. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 4, p. 449–455, 2007.

RYDHOLM, A. E.; BOWMAN, C. N.; ANSETH, K. S. Degradable Thiol-Acrylate Photopolymers: Polymerization and Degradation Behavior of an In Situ Forming Biomaterial. **Biomaterials**, v. 26, n. 22,

p. 4495–4506, 2005.

SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1–23, 2004.

STUART, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application*. Sydney: Austrália, University of Technology, 244 p., 2004.

SUZUKI, T.; TOKIWA, Y. 1977 Nature Publishing Group. **Nature**, v. 267, p. 673–678, 1977.

TIARKS, F.; LANDFESTER, K.; ANTONIETTI, M. One-Step Preparation of Polyurethane Dispersions by Miniemulsion Polyaddition. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 39, p. 2520–2524, 2001.

TIETZ, N. W.; SHUEY, D. F. Lipase in serum - The Elusive Enzyme: An Overview. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 746–756, 1993.

TÜRÜNÇ, O.; MEIER, M. A. R. The thiol-ene (click) Reaction for the Synthesis of Plant Oil Derived Polymers. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 1, p. 41–54, 2013.

UPPENBERG, J.; PATKAR, S.; BERGFORS, T.; JONES, T. a. Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of molecular biology**, v. 235, p. 790-792, 1994.

VALÉRIO, A. Síntese de Nanopartículas de Poli(ureia-uretano) via Polimerização em Miniemulsão. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

VALÉRIO, A.; ROCHA, S. R. P.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Degradable polyurethane nanoparticles containing vegetable oils. **Eur. J. Lipid Sci. Technol**, v. 116, p. 24–30, 2014.

WANG, L.; ABEDALWafa, M.; WANG, F.; LI, C. Biodegradable Poly-Epsilon-Caprolactone (PCL) for Tissue Engineering Applications: a Review. **Rev. Adv. Mater. Sci**, v. 34, p. 123–140, 2013.

WIEMANN, L. O.; NIEGUTH, R.; ECKSTEIN, M.; NAUMANN, M.; THUM, O.; ANSORGE-SCHUMACHER, M. B. Composite Particles of Novozyme 435 and Silicone: Advancing Technical Applicability of Macroporous Enzyme Carriers. **ChemCatChem**, v. 1, n. 4, p. 455–462, 2009.

WILLIAMS, D. F.; ZHONG, S. P. Biodeterioration / Biodegradation of

Polymeric Medical Devices In Situ. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, n. 130, p. 95–130, 1994.

WU, W. X.; QU, L.; LIU, B. Y.; ZHANG, W. W.; WANG, N.; YU, X. Q. Lipase-catalyzed Synthesis of Acid-Degradable Poly(thioether ester) and Poly(thioether ester-co-lactone) Copolymers. **Polymer (United Kingdom)**, v. 59, p. 187–193, 2015a.

ZANETTI-RAMOS, B. G.; LEMOS-SENNA, E.; SOLDI, V.; BORSALI, R.; CLOUTET, E.; CRAMAIL, H. Polyurethane Nanoparticles from a Natural Polyol via Miniemulsion Technique. **Polymer**, v. 47, n. 24, p. 8080–8087, nov. 2006.

ZWEERS, M. L. T.; ENGBERS, G. H. M.; GRIJPMMA, D. W.; FEIJEN, J. In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide). **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 100, n. 3, p. 347–56, 10 dez. 2004.

APÊNDICE A

Tabela 1 – Valores de Diâmetro de Partícula (D_p), índice de polidispersão (PDI) e massas molares M_n e M_w (massa molar média numérica e ponderal) das nanopartículas do P1 (reação M01) degradadas em PBS.

Tempo de Degradação (semanas)	D_p (nm)	PDI	M_w (kDa)	M_n (kDa)
0	197 ± 4,2	0,18 ± 0,01	19,7	8,8
1	195 ± 2,7	0,19 ± 0,01	18,2	5,7
2	190 ± 0,9	0,18 ± 0,01	19,7	7,9
4	197 ± 1,9	0,18 ± 0,01	19,4	8,2
5	217 ± 0,3	0,25 ± 0,01	19,3	8,4
7	199 ± 1,2	0,19 ± 0,01	19,4	8,4
8	197 ± 1,0	0,19 ± 0,01	21,0	8,8
12	202 ± 0,7	0,22 ± 0,01	19,1	8,0

Tabela 2 – Valores de Diâmetro de Partícula (D_p), índice de polidispersão (PDI) e massas molares M_n e M_w (massa molar média numérica e ponderal) das nanopartículas do P1 (reação M01) degradadas em HCl (0,01M; pH 2,8)

Tempo de Degradação (semanas)	D_p (nm)	PDI	M_w (kDa)	M_n (kDa)
0	197 ± 4,2	0,18 ± 0,01	19,7	8,8
1	192 ± 0,9	0,18 ± 0,01	19,0	8,4
2	193 ± 1,0	0,18 ± 0,01	18,2	8,6
4	193 ± 1,4	0,18 ± 0,01	16,1	7,4
5	199 ± 3,6	0,18 ± 0,01	16,0	7,4
7	196 ± 1,6	0,19 ± 0,01	14,4	6,8
8	206 ± 1,7	0,21 ± 0,01	14,2	6,6
12	206 ± 2,0	0,22 ± 0,01	12,0	5,7

Tabela 3 – Valores de Diâmetro de Partícula (D_p), índice de polidispersão (PDI) e massas molares M_n e M_w (massa molar média numérica e ponderal) das nanopartículas do P1 (Reação M02) - degradadas em PBS (0,02M; pH 7,4) + Enzima *CalB* (5% relação polímero)

Tempo de Degradação (horas)	D_p (nm)	PDI	M_w (kDa)	M_n (kDa)
0	179 ± 0,8	0,19 ± 0,01	21,5	9,1
3	183 ± 1,3	0,18 ± 0,01	6,6	1,9
6	192 ± 0,3	0,20 ± 0,01	5,4	1,8
12	195 ± 1,2	0,21 ± 0,01	5,8	1,8
24	216 ± 1,6	0,21 ± 0,02	7,0	1,9
48	232 ± 2,2	0,23 ± 0,01	5,1	1,7
72	250 ± 1,9	0,23 ± 0,01	4,5	1,7
120	283 ± 3,6	0,27 ± 0,01	2,4	1,5
240	387 ± 11	0,43 ± 0,01	2,0	1,5

Tabela 4 – Valores da massa dos filmes de P1 inicialmente e após determinados tempos de degradação. Perda de massa foi calculada pela equação 1. Meio com PBS.

Tempo de Degradação (semanas)	W_i (g)	W_f (g)	% W_l (g)
1	0,2140	0,2110	1,40
2	0,1898	0,1880	0,95
4	0,1633	0,1602	1,90
5	0,1767	0,1732	1,98
7	0,2006	0,1963	2,14
8	0,1317	0,1200	8,88
12	0,0715	0,0708	0,98

Tabela 5 – Valores dq massa dos filmes de P1 inicialmente e após determinados tempos de degradação. Perda de massa foi calculada pela equação 1. Meio com HCl.

Tempo de Degradação (semanas)	W_i (g)	W_f (g)	% W_l (g)
1	0,0755	0,0745	1,32
2	0,0513	0,0513	1,35
4	0,1351	0,1351	0,07
5	0,1054	0,1054	-1,25
7	0,1644	0,1644	0,06
8	0,1581	0,1581	0,94
12	0,1086	0,1086	0,64

Tabela 6 - Tabela 4 – Valores da massa dos filmes de P1 inicialmente e após determinados tempos de degradação. Perda de massa foi calculada pela equação 1. Meio com PBS e enzima CalB.

Tempo de Degradação (horas)	W_i (g)	W_f (g)	% W_l (g)
6	0,0794	0,0789	0,62
12	0,0849	0,0836	1,53
336	0,1426	0,1613	-13,1
384	0,1573	0,1511	3,94
912	0,1667	0,1652	0,89
1176	0,1764	0,1682	4,64

Tabela 7 – Valores de Diâmetro de Partícula (D_p), índice de polidispersão (PDI) e massas molares M_n e M_w (massa molar média numérica e ponderal) das nanopartículas de P2, reação R01, degradadas em PBS (0,2M, pH 7,4).

Tempo de Degradação (semanas)	D_p (nm)	PDI	M_w (kDa)	M_n (kDa)
0	159 ± 0,8	0,11 ± 0,01	38,0	18,1
1	171 ± 3,2	0,13 ± 0,01	36,8	11,7
2	168 ± 0,8	0,10 ± 0,01	39,2	14,6
4	168 ± 2,7	0,14 ± 0,06	6,9	5,60
5	166 ± 1,0	0,12 ± 0,01	47,5	8,32
7	165 ± 0,4	0,12 ± 0,01	43,5	16,4
8	164 ± 0,5	0,10 ± 0,01	52,0	16,9
12	166 ± 1,1	0,11 ± 0,01	41,5	12,1

Tabela 8 – Valores de D_p , PDI e massas molares M_n e M_w (massa molar média numérica e ponderal) das nanopartículas de P2, reação R01, degradadas em HCl (0,01M; pH 2,8)

Tempo de Degradação (semanas)	D_p (nm)	PDI	M_w (kDa)	M_n (kDa)
0	159 ± 0,8	0,11 ± 0,01	38,0	18,1
1	166 ± 0,4	0,11 ± 0,01	42,3	14,6
2	166 ± 0,8	0,13 ± 0,01	35,4	13,1
4	167 ± 2,5	0,11 ± 0,03	32,4	10,6
5	166 ± 1,8	0,11 ± 0,01	25,9	9,6
7	168 ± 0,5	0,13 ± 0,01	24,5	8,7
8	168 ± 1,4	0,11 ± 0,02	22,0	10,0
12	174 ± 0,4	0,13 ± 0,02	18,6	5,9

Tabela 9 – Valores de D_p , PDI e massas molares M_n e M_w (massa molar média numérica e ponderal) das nanopartículas de P2, reação R02, degradadas em PBS (0,02M; pH 7,4) + 0,01g Enzima *CalB*

Tempo de Degradação (horas)	D_p (nm)	PDI	M_w (kDa)	M_n (kDa)
0	159 ± 0,8	0,11 ± 0,01	38	18,1
0,5	186 ± 0,4	0,27 ± 0,01	3,7	1,4
1	210 ± 1,4	0,34 ± 0,01	3,7	1,3
1,5	263 ± 0,5	0,50 ± 0,02	3,9	1,4
2	337 ± 29,6	0,60 ± 0,03	2,7	1,1
2,5	372 ± 30,9	0,64 ± 0,06	3,9	1,5
3	408 ± 26,9	0,64 ± 0,03	3,1	1,2
3,5	526 ± 59,8	0,65 ± 0,03	2,9	1,2
4	513 ± 49,51	0,53 ± 0,04	3,5	1,3
4,5	409 ± 62,94	0,80 ± 0,11	2,9	1,2
48	2206 ± 424,9	1,00 ± 0,00	3,4	1,4

Tabela 10 – Valores de D_p , PDI e massas molares M_n e M_w (massa molar média numérica e ponderal) das nanopartículas de P2, reação R03, degradadas em PBS (0,02M; pH 7,4) + 0,01g Enzima *CalB*

Tempo de Degradação (minutos)	D_p (nm)	PDI	M_w (kDa)	M_n (kDa)
Inicial	159 ± 0,8	0,11 ± 0,01	38,0	18,1
0	150 ± 2,1	0,11 ± 0,01	4,2	1,0
5	167 ± 1,0	0,16 ± 0,01	8,3	1,2
10	186 ± 1,4	0,24 ± 0,01	4,3	1,6
15	175 ± 2,5	0,20 ± 0,01	4,3	1,5
20	197 ± 2,2	0,29 ± 0,01	4,3	1,7
25	193 ± 0,2	0,25 ± 0,01	4,1	1,6
30	197 ± 3,7	0,25 ± 0,02	5,5	1,8