

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

CRISTIANA BITTAR ALBANUS

**ESTERIFICAÇÃO DA AMILOPECTINA E
OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POR
PRECIPITAÇÃO EM MISTURAS BINÁRIAS**

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

CRISTIANA BITTAR ALBANUS

**ESTERIFICAÇÃO DA AMILOPECTINA E
OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POR
PRECIPITAÇÃO EM MISTURAS BINÁRIAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
junto à atividade de ensino “Projeto
Tecnológico” do Curso de Química
Industrial, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Químico Industrial

Profa. Dra. Nádyá Pesce da Silveira
Orientador

Prof. Dr. Marco Antônio Ceschi
Co-orientador

Porto Alegre, 2011

*"A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, que me proporcionou estar constantemente rodeada por pessoas especiais e que contribuíram, e muito, para essa realização.

A professora Nádyá Pesce da Silveira pela orientação e confiança, por acreditar no meu empenho e capacidade, e pelo carinho e respeito com que sempre me tratou.

Ao professor Marco Antônio Ceschi, por todo o conhecimento e experiências transmitidos, pela confiança e boa vontade em ensinar.

Ao pessoal do laboratório E118, em especial: Gisele e Alexandre que, se fosse possível, seriam também meus coorientadores pelo apoio fundamental na realização deste trabalho.

À minha grande amiga desde a primeira viagem de trem juntas, Tamires, pelos muitos momentos especiais que passamos, pelo companheirismo e pela amizade verdadeira.

Às colegas que caminharam junto comigo nos momentos de estudo e lazer: Bárbara, Bibi e Andressa.

Às melhores brasileiras que eu poderia ter encontrado no Canadá: Flávia, Mari, Amanda, Dani e Lívia pelas muitas risadas e pelo apoio intenso quando a saudade da família batia. Vocês foram a minha família lá. "I'll be there for you".

I thank Jan for the good times and the help with many reports. And so I want to thank Courtney for being the best roomy I could have had.

Ao Guilherme Costi, um irmão que a UFRGS me trouxe.

Ao pessoal do Lanagro pelo apoio, compreensão, pela amizade e pelos "cafés filosóficos" que me ensinaram que na prática a teoria é outra.

À minha tia Alice e ao meu tio Luís, pelo carinho de sempre, e por me cuidarem em muitos fins de semana durante a minha infância.

À minha tia Valéria e tio Júlio pelo carinho e apoio dado em todos os momentos, incluindo nos mais difíceis.

Aos meus primos-irmãos: Juliana, Gabriel, Thamiris, Thaís e Davi pelos muitos momentos que nunca serão esquecidos.

Aos meus avós, dindos e pais, Enivalda e Jorge por criarem o melhor ambiente familiar que poderia existir, pelos ensinamentos e pelo amor.

Ao maior companheiro da minha vida, ao melhor amigo que se tornou o melhor namorado, Thomaz. Agradeço pelo amor, pelo apoio e por estar sempre ao meu lado me fazendo realmente feliz.

Ao meu pai, João Luiz, que me proporcionou a oportunidade do estudo.

E finalmente, ao meu anjo da guarda, que me guia e ilumina meu caminho com muito amor e dedicação, minha mãe Clarice Bittar. Por me ensinar o valor da família e da fé, e por sempre torcer e me ajudar a “voar alto”.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	06
2. ESTADO DA ARTE.....	08
2.1. AMILOPECTINA.....	08
2.2. DERIVATIZAÇÃO DE AÇÚCARES.....	09
2.3. NANOPARTÍCULAS.....	11
2.3.1. Produção de Nanopartículas.....	11
2.3.1.1. Produção de nanopartículas por precipitação em um não-solvente... 11	
2.4. PARTÍCULAS PADRÃO DE REFERÊNCIA DE TAMANHO.....	14
2.4.1. Produção de Nanopartículas Monodispersas de Látex Padrão.....	15
3. OBJETIVOS.....	19
4. PROPOSTA TECNOLÓGICA.....	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5.1. MATERIAIS.....	22
5.1.1. Polímero de Amilopectina (pAmyl).....	22
5.1.2. Ácido esteárico.....	22
5.1.3. DCC.....	23
5.1.4. DMAP.....	23
5.1.5. Solventes.....	23
5.1.6. Membrana para Diálise.....	23
5.2. MÉTODOS.....	24
5.2.1. Graftização do pAmyl.....	24
5.2.2. Purificação do pAmyl grafitizado (pAmyl-D).....	26
5.2.2.1. Diálise por membrana.....	26
5.2.2.2. Liofilização.....	27
5.2.3. Precipitação das Nanopartículas em um Não-Solvente.....	27
5.2.4. RMN ¹ H.....	29
5.2.5. Infravermelho.....	29
5.2.6. Espalhamento de Luz Dinâmico.....	30
5.2.7. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
6.1. REAÇÃO DE GRAFTIZAÇÃO.....	33
6.1.1. Análise de RMN ¹ H.....	33
6.1.2. Análise de Infravermelho.....	35
6.2. FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	39
6.2.1. Análise Visual.....	39
6.2.2. Espalhamento de Luz Dinâmico.....	41
6.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	45
6.3. Análise de Custos.....	48
6.4. Propostas Futuras.....	52
6.4.1. Adição de um Agente Reticulante.....	52
6.4.2. Ultracentrifugação.....	52
6.4.3. Estudo das propriedades mecânicas e Térmicas do pAmyl-D.....	52
6.4.4. Estudo de novas morfologias com graus de substituição da reação de esterificação diferentes e ácidos graxos diferentes.....	53
7. CONCLUSÃO CRÍTICA.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1. APRESENTAÇÃO

O uso de fontes renováveis para preparar novos materiais tem atraído crescente atenção nas últimas décadas. Polissacarídeos estão entre os mais intensivamente estudados precursores, em particular a celulose, a quitina e o amido, pois são abundantes e disponíveis em quase todos os lugares do mundo, são renováveis, biodegradáveis, baratos, e podem ser quimicamente modificados a uma variedade muito grande de estruturas macromoleculares com uma ampla gama de propriedades e aplicações¹.

Microesferas como padrão de tamanho tem sido utilizadas em uma variedade de aplicações incluindo estimativa de tamanho de partículas e células, como controle de instrumentos e calibrações. Padrões de tamanho de partículas podem ser usados para validar instrumentos de dimensionamento através de suas faixas dinâmicas. Eles são adequados para uso em verificações de rotina como em calibração de instrumentos, correções, e no apoio às boas práticas, como as publicadas pela ISO, Internacional ASTM, CEN, e outras organizações². Além disso, o uso de material de referência permite a padronização de resultados entre as execuções, instrumentos e laboratórios, e também ao longo do tempo.

No início da década de 80, a *Community Bureau of Reference* (BCR) introduziu as primeiras partículas padrão de referência de tamanho, as partículas de referência de quartzo. Concomitantemente com a produção destes padrões, houve o surgimento do Espalhamento de Luz de Baixo Ângulo (*Low Angle Laser Scattering- LALLS*), ou Difração a Laser, como um método de análise de tamanho de partícula. Com o avanço dessas técnicas de análise, as partículas de quartzo se mostravam, até então, com formato aleatório e propriedades ópticas que poderiam afetar a difração no instrumento³. Por essa necessidade de calibração periódica e confiável dos instrumentos de análise desenvolvidos, surgem então partículas padrão de tamanho de látex, monodispersas e que são as mais utilizadas até hoje, podem ser produzidas por diferentes processos e possuem estreita faixa de distribuição.

Visando, então, a importância que hoje se tem em um processo químico de se conseguir matérias primas renováveis, de extrema abundância, fácil extração, que ao final do processo gerem produtos biodegradáveis, e que ainda tenham baixo custo, esse projeto propõe uma alternativa ao uso do látex como padrão de tamanho, através da sua substituição por partículas de um polímero de amilopectina grafitizada. Tal polímero será obtido através de uma reação de hidrofobização da amilopectina comercial utilizando um ácido graxo como substituinte. As partículas do novo polímero grafitizado serão então obtidas com sua precipitação em um não-solvente (solvente polar) e purificadas por diálise e liofilização.

2. ESTADO DA ARTE

2.1 AMILOPECTINA

Plantas armazenam amido dentro de organelas específicas chamadas amiloplastos. Quando energia é requerida para o trabalho celular, a planta hidroliza o amido com o auxílio da enzima amilase, resultando em unidades de glicose.

O amido é encontrado em numerosos produtos de base agrícola e, além do seu papel essencial como um alimento, tem sido explorado em seu estado bruto ou após modificações em importantes processos industriais por exemplo, como aditivo na fabricação de papel e como uma espécie de adesivo⁴. Sua estrutura é composta de dois polissacarídeos: a amilose e a amilopectina, sendo suas estruturas estão representadas na Figura 1.

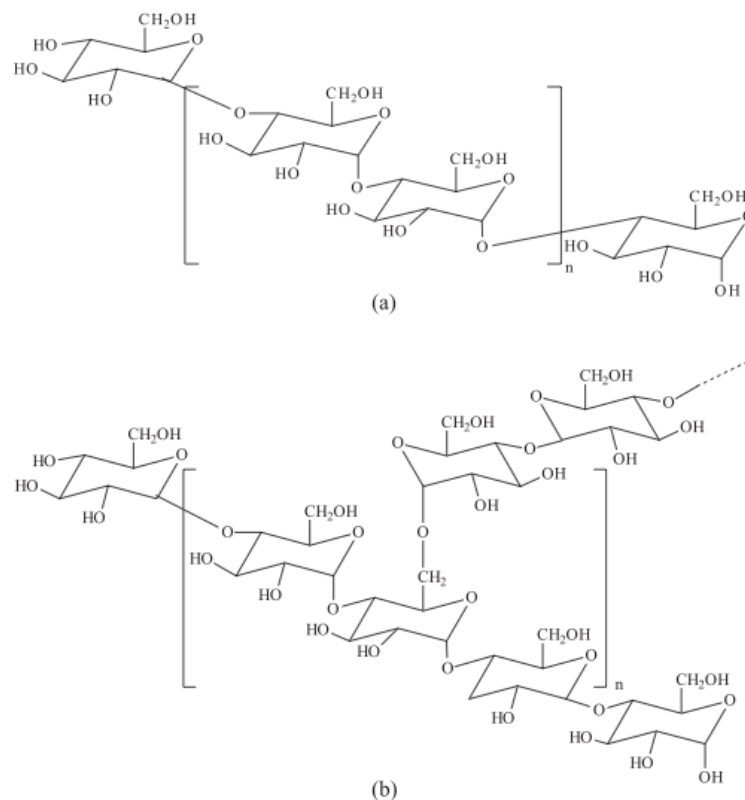


Figura 1. Em (a) está representada a estrutura molecular da amilose, enquanto que em (b) a da amilopectina.

A amilose é um polímero linear de unidades de anidroglicose unidas através de ligações α -1,4 glicosídicas. Já a amilopectina é um polissacarídeo com uma estrutura variável composta de unidades de glicose linearmente ligadas do tipo α -1,4 com ocasionais α -1,6 que fornecem pontos de ramificação. Cada molécula de amilopectina pode conter de 100 000 a

200 000 unidades de glicose, e cada ramo tem cerca de 20 ou 30 unidades de comprimento, de modo que essas moléculas formam um emaranhado com formato quase esférico⁵.

Sabe-se que a amilopectina tem uma massa molar bastante elevada (107–109 g/mol), entretanto ainda há muito a estudar sobre a distribuição da mesma.

Esses dois tipos de ligações que constituem a amilopectina, fornecem características de uma molécula solúvel em água e que pode ser rapidamente degradada, pois tem muitos pontos terminais devido às numerosas ramificações. Em contraste, a amilose contém muito poucas ligações α -1,6, portanto poucas ramificações, o que faz com que seja hidrolisada mais lentamente, tenha maior densidade e seja mais insolúvel em água⁶.

Levando-se em consideração que para formação de nanopartículas de polímeros pela técnica de precipitação em não-solvente, o polímero deve conter uma parte polar - que tenha afinidade com o não-solvente - e uma parte apolar que seja insolúvel, um polímero que contenha uma fração maior de amilopectina do que de amilose é mais apropriado para tal finalidade.

O amido é feito de cerca de 70% em peso de amilopectina, embora varie dependendo da fonte. Amidos com diferentes razões de amilose/amilopectina são de interesse desde que os dois componentes se comportam de forma muito diferente tanto em termos tecnológicos quanto nutricionais.

As diferentes razões de amilose/amilopectina no amido afetam sua gelatinização, bem como suas propriedades de cristalização e sua reatividade em reações de derivatização.

Granule bound starch synthase (GBSS), é uma enzima encontrada nas plantas que é responsável pela síntese da amilose. A supressão da GBSS resulta em um amido com alta porcentagem de amilopectina. Por outro lado, quando se quer que o biopolímero contenha alta quantidade de amilose (mais de 60%), deve-se inibir simultaneamente duas enzimas que são responsáveis pela ramificação – *starch-branching enzymes*, SBE1 e SBE2⁷.

2.2 DERIVATIZAÇÃO DE AÇÚCARES

Nos últimos tempos, o amido e seus derivativos vem sendo usados para a preparação de materiais biodegradáveis com potenciais aplicações em um grande número de áreas como a medicina, farmácia, agricultura, biologia, proteção e remediação ambiental, entre outras.

O desenvolvimento de novos materiais à base de amido tem ganhado muito interesse nos últimos anos. Ultimamente esses estudos estão bastante focados na preparação de amidos

termoplásticos, com ou sem a mistura de outro polímero, e na síntese de amidos quimicamente modificados para infinitas aplicações.

Dada a presença predominante de grupos hidroxila no amido e nos seus componentes - amilose e amilopectina - o foco de atenção para tais modificações químicas é obviamente em sua transformação com diversos reagentes, incluindo esterificação e eterificação⁴.

Reações de esterificação em amido são muito bem documentadas. Os primeiros acetatos de amido foram já descritos na literatura em 1865 (Schuetzenberger, 1865)⁴.

Em meados do século passado, muito trabalho nesse campo foi feito por vários grupos nos Estados Unidos da América, principalmente pelos pesquisadores Mullen e Pascu em 1942 e Whistler e Hilbert em 1944. Whistler foi o que mais contribuiu para a literatura nessa área, fazendo novos derivativos, principalmente de amido e seus polímeros constituintes, mas também de outros polissacarídeos⁸.

Um passo importante e também uma síntese comum de acetatos de amido foram mencionados por Marcos e Mehl-Retter (1972). Eles descreveram a reação utilizando ácido acético anidro como um solvente reativo e induziram a acetilação usando uma solução aquosa de hidróxido de sódio (isso significou que ao longo dos anos, o tempo de reação poderia ser diminuído cada vez mais). Biswas et al. (2008) descrevem a acetilação do amido em 2 minutos de reação feita em um forno de microondas utilizando-se iodo como catalisador. Porém, visando-se a utilização de ésteres de amido em escala industrial, sua síntese deve ser mantida tão simples e econômica quanto possível. Para isso necessita-se de um baixo excesso de reagente, um tempo de reação curto, temperatura de reação moderada e que ainda seja economicamente viável⁹.

A maneira mais simples para esterificação do amido é a utilização de anidrido acético. Mas mesmo uma reação de 15 horas sob 140°C de amido com anidrido acético resulta em acetato de amido com grau de substituição baixo e quantidade de acetato de apenas 8,7%. É necessária a utilização de um ativador para conferir um alto grau de substituição e consequentes boas propriedades mecânicas⁹.

2.3 NANOPARTÍCULAS

Nanopartícula é um termo que define ambas nanoesferas e nanocápsulas. Nanoesferas tem sua estrutura do tipo matriz. Já as nanocápsulas são sistemas vesiculares com uma

cavidade consistindo em de um núcleo líquido interior rodeado por uma membrana polimérica, assim como ilustra a Figura 2.

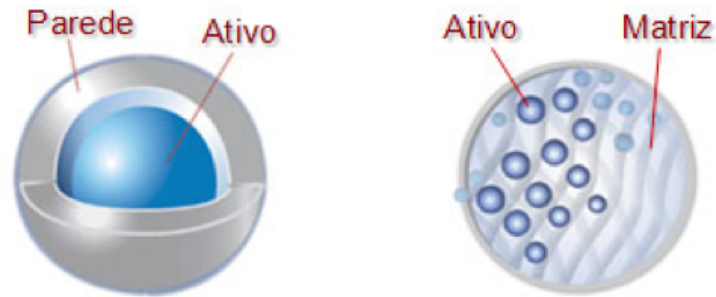


Figura 2. À esquerda uma representação de nanocápsula e à direita de nanoesfera, ambas transportando algum princípio ativo (fármaco, etc). Retirado de http://www.ital.sp.gov.br/cereal_chocotec/news/4/microencapsulacao.php

2.3.1 Produção de nanopartículas

Existem diversas maneiras nas quais nanopartículas são produzidas. O processo utilizado dependerá principalmente do tipo de polímero que será a base da mesma.

Nanopartículas podem ser preparadas através da polimerização de um monômero principalmente pelas técnicas de polimerização em emulsão ou miniemulsão, polimerização interfacial e policondensação interfacial. Já no caso de nanopartículas preparadas a partir de polímeros pré-formados, as principais técnicas utilizadas em polímeros sintéticos são emulsificação seguida de evaporação de solvente, deslocamento de solvente seguido de deposição interfacial, emulsificação seguida de difusão de solvente, e através do efeito *salting-out* em polímeros sintéticos. Em polímeros naturais, as técnicas utilizadas são a de emulsificação externa em óleo e principalmente a de precipitação de macromoléculas em não-solvente¹⁰.

2.3.1.1 Precipitação de nanopartículas em um não-solvente

A técnica de precipitação de polímeros em não-solvente para formação de partículas esféricas de tamanho nano ou micrométrico é amplamente utilizada em diversas áreas da química, biologia, medicina, bioquímica, etc. Esta técnica é explorada desde os anos 70, e vem sendo aprimorada desde então.

Processos de precipitação em não-solvente são largamente utilizados na indústria. Esses processos são baseados no uso de dois solventes que são completamente miscíveis. O soluto que se quer fazer as nano/micropartículas deve ser solúvel no primeiro solvente, mas insolúvel no segundo solvente. Assim portanto, a adição de um não-solvente induz a formação de uma solução de dois líquidos e a supersaturação e precipitação do soluto.

A principal vantagem do processo é que esse não exige aumento de temperatura e, portanto, pode ser útil na formação de nanopartículas de polímeros e macromoléculas sensíveis ao calor¹⁰.

Existem vários métodos pelos quais o mecanismo de formação de nanopartícula é procedido. Um deles e o mais simples, é adicionar pequenas gotas da solução do polímero no solvente miscível sobre o não-solvente em branda agitação. Também existem mecanismos mais sofisticados sendo recentemente propostos, nos quais são utilizados fluidos supercríticos como não-solvente, ou até mesmo gases. Abaixo, a Figura 3 mostra um equipamento industrial adaptado para precipitação de nanopartículas utilizando-se CO₂ supercrítico como não-solvente¹¹.

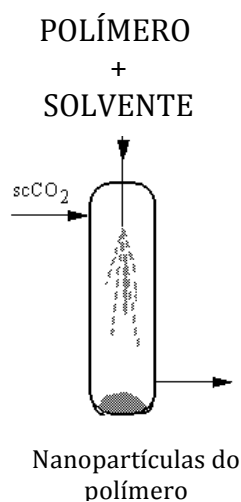


Figura 3. Fluxograma industrial de precipitação de nanopartículas utilizando um fluido supercrítico como não-solvente¹¹.

No fluxograma mostrado acima, a solução de polímero passa por um dispositivo que forma microgotas como em um *spray*, e é levado a um tanque onde entra em contato com o fluido supercrítico não-solvente¹¹. O polímero sofre um mecanismo de “enrugamento” por causa da má afinidade com o não-solvente, formando então as nano/micropartículas. A Figura 4 apresenta a foto de microscopia eletrônica de varredura de nanopartículas de amoxicilina precipitadas pela técnica de não-solvente utilizando-se CO₂ supercrítico.

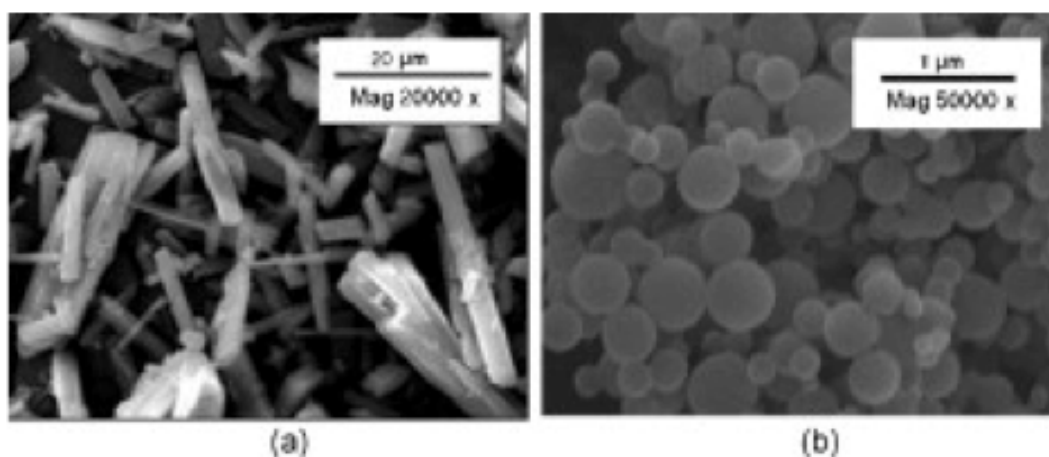


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de amoxicilina. Em (a) a amoxicilina não foi processada, e em (b) a mesma foi precipitada utilizando-se CO₂.

O método mais comum para o preparo de nanopartículas inclui a solubilização de polímeros em um solvente orgânico, seguida pela dispersão em meio aquoso, ocasionalmente com algum estabilizador, e juntamente com energia fornecida por agitação do sistema. As partículas podem ser comercializadas ao final do processo, como uma suspensão ou em forma de um pó seco e fino, entretanto no último caso, muito cuidado deve ser tomado para que a estrutura das nanopartículas não seja afetada com a retirada do não-solvente. Esse mecanismo tem sido proposto, na formação de nanocarreadores de fármacos em alternativa a sistemas coloidais. A Figura 5 mostra um esquema da formação de nanopartículas de carreadores que encapsulam um dado fármaco, ambos fármaco e polímero encapsulador são solúveis no primeiro solvente, mas insolúveis em meio aquoso¹².

Quando encontrado o par solvente/não-solvente ideal para um tal polímero o tamanho da partícula pode ser modificado através de mudanças físicas, como a velocidade de agitação do antisolvente na hora da adição da solução de polímero, o tamanho da gota de solução adicionada, a velocidade de adição das gotas, e principalmente a concentração de polímero na solução.

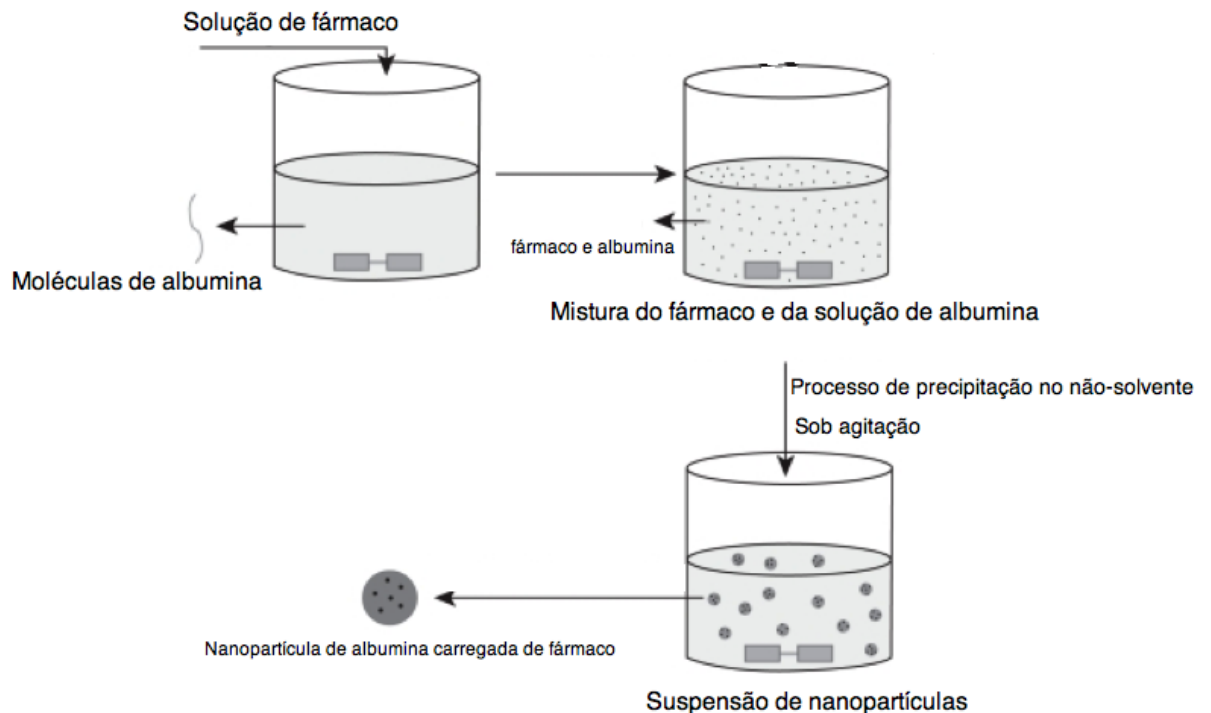


Figura 5. Esquema de formação de nanocarreadores de fármacos usando-se o método de precipitação em não-solvente, sob agitação¹².

2.4 PARTÍCULAS PADRÃO DE REFERÊNCIA DE TAMANHO

NIST (*Nacional Institute of Standards and Technology*) introduziu microesferas padrão polidispersas de vidro em 1965. As técnicas de laser estavam se tornando um dos mais populares métodos de análise de tamanho de partícula, mas a calibração utilizando padrões de quartzo se mostrou inaceitável devido ao alto desvio de instrumento para instrumento. Como algumas das variações foram atribuídas à forma irregular e às propriedades do quartzo o *Bureau Communautaire de Référence*, em Bruxelas, mais comumente conhecido como *Bureau of Certified Reference* (BCR), lançou um novo conjunto de padrões de referência esféricas de poliestireno, revolucionando o mercado de partículas padrão de tamanho¹³.

Hoje, essas partículas são as mais utilizadas em todos os tipos de análise e são produzidas e certificadas principalmente pela NIST, que tem à venda padrões rastreáveis de tamanho constituídos por esferas de poliestireno monodisperso disponível em diâmetros que variam de 40 nm a 175 nm. As suspensões são convenientemente embaladas em frascos conta-gotas com 1% de sólidos, e cada frasco é fornecido com um certificado de rastreabilidade.

2.4.1 Produção de nanopartículas monodispersas de látex padrão

Partículas esféricas monodispersas de látex podem ser preparadas através de uma reação de polimerização em emulsão, onde os principais componentes para este processo são o monômero, um meio de dispersão (usualmente a água), um agente emulsificante (surfactante) e um iniciador solúvel no solvente. O processo inicia-se com o monômero sendo disperso em uma emulsão aquosa, com o auxílio do agente emulsificante, formando então pequenas partículas cujos diâmetros variam entre 1-100 μm . De acordo com o mecanismo proposto por Xia e colaboradores¹⁴, muitas moléculas do surfactante existem como micelas com aproximadamente 10 nm de diâmetro e podem ser “inchadas” pelo monômero. A formação dos polímeros de látex tem início com a decomposição do iniciador solúvel em água, onde uma grande quantidade de radicais livres primários é gerada. Esses radicais polimerizam uma pequena quantidade do monômero que se encontra dissolvido na fase aquosa, resultando na formação de núcleos oligoméricos, que se apresentam na forma de minúsculas partículas. Subseqüentemente, estes núcleos “entram” nas micelas e eventualmente crescem em partículas maiores até que todo o monômero dissolvido em cada micela seja completamente consumido. Ao mesmo tempo, o monômero encapsulado em gotas da emulsão atua como um reservatório, fornecendo uma reserva de unidades para que haja a repetição do ciclo de crescimento das cadeias poliméricas, através de um processo de difusão. O crescimento dos polímeros de látex termina no ponto em que todos os monômeros tenham sido consumidos¹⁴.

Para um polímero de látex que tem um tamanho de 100 nm, existem aproximadamente 1000 cadeias macromoleculares emaranhadas como espirais formando a esfera. Cada cadeia começa e termina com um grupo funcional formado pela decomposição do radical iniciador. Nos casos em que o persulfato de potássio é utilizado como iniciador da reação, a superfície do polímero de látex preparado apresenta um grupo sulfato carregado negativamente como grupo terminal da cadeia polimérica. A utilização da técnica de polimerização de emulsão tem possibilitado a preparação, em grande quantidade de esferas monodispersas de polímeros como o polimetilmetacrilato (PMMA) e o poliestireno (PS), onde o tamanho das esferas poliméricas de látex pode ser perfeitamente controlado em uma faixa que varia de 20 nm até aproximadamente 1 μm .

A Figura 6, mostra o mecanismo de polimerização em emulsão para a formação das nanopartículas monodispersas de poliestireno de acordo com a teoria proposta por Fikentscher e Harkins.

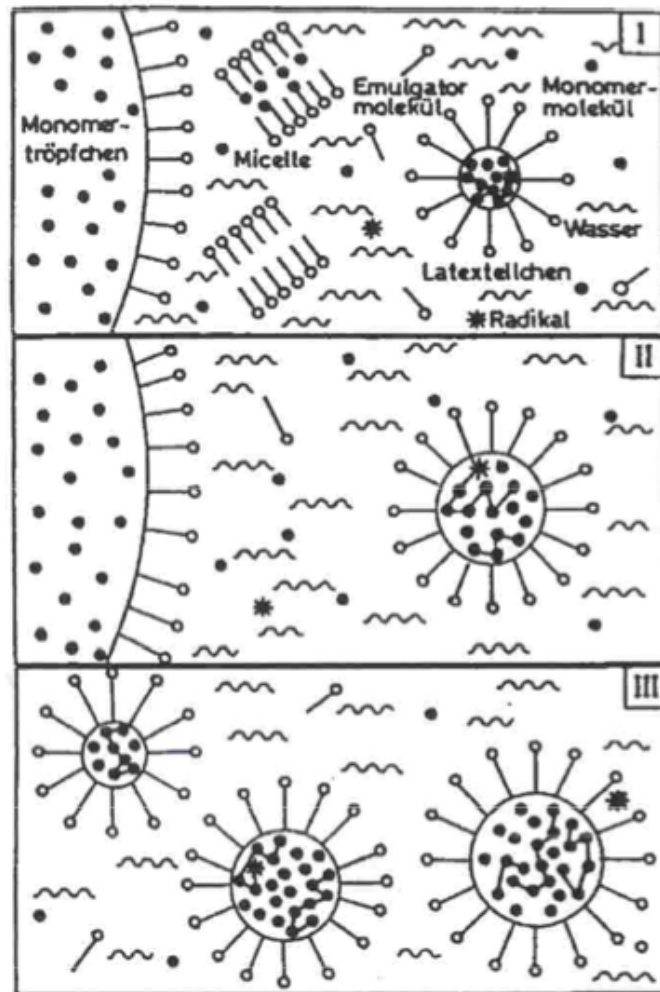


Figura 6. Mecanismo de polimerização em emulsão com a formação de nanopartículas de poliestireno¹⁴.

Na primeira parte da figura, está representado o período de formação das partículas, no qual existem micelas de 5 a 10 nm, gotas de monômeros estabilizados com surfactante (1-10 μm), e o iniciador. O monômero é solubilizado dentro das micelas. O iniciador forma radicais e mais tarde forma oligo-radicais com os pouquíssimos monômeros solúveis em água. Esses oligo-radicais são estabilizados pelo surfactante (micelas inchadas) ou solubilizados em micelas contendo monômero. A polimerização inicia e com ela a formação de pequenas partículas de látex. Já na segunda parte da Figura 6, há a representação do período de crescimento das partículas. Nesse período as partículas de látex crescem até as gotas de monômero em emulsão esgotarem. Com o crescimento da área de superfície da partícula, a mesma adsorve mais moléculas de surfactante, e não mais micelas. A terceira e última parte da figura, representa o período do final da polimerização, no qual o resto dos monômeros nas partículas de látex são polimerizadas.

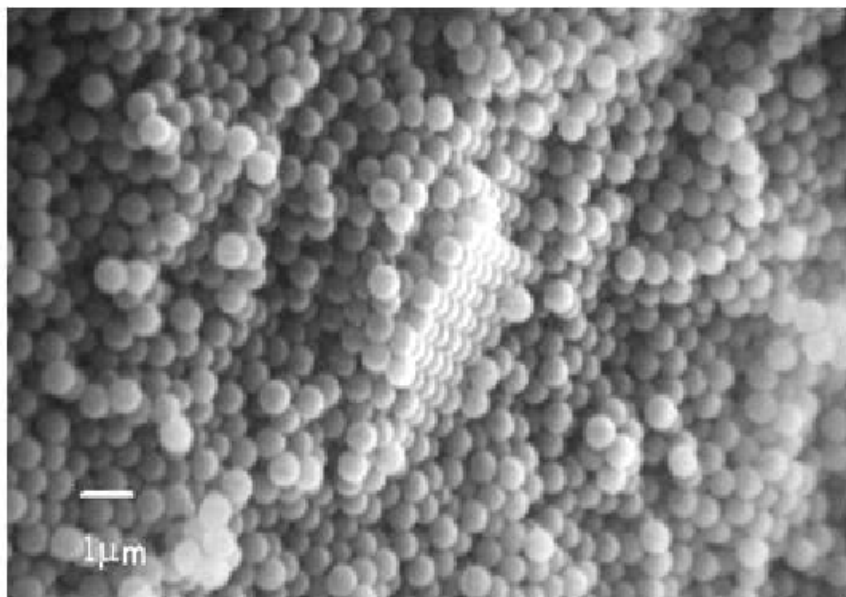


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura de partículas monodispersas de poliestireno produzidas por polimerização em emulsão.

Uma alternativa a polimerização em emulsão que tem sido explorada recentemente é a chamada polimerização em miniemulsão¹⁴.

Polimerização em miniemulsão está atraindo crescente atenção nos últimos poucos anos. Realmente, a versatilidade da técnica e seu potencial para sínteses de novos materiais de valor agregado fascinam ambas comunidades acadêmica e industrial.

Na polimerização em miniemulsão, o monômero se encontra pré-disperso em gotas nanométricas, estabilizado pela combinação de um surfactante com eventualmente um co-estabilizador, seletivamente solúvel na fase orgânica¹⁵. O surfactante tem a função de estabilizar as gotas de monômero, evitando a coalescência das gotas de monômero. Já o co-estabilizador retarda a degradação de Ostwald (degradação difusional), sendo sua escolha um fator fundamental para a estabilidade da formulação. Na primeira etapa do processo de polimerização em miniemulsão, pequenas gotas estáveis são formadas pela dispersão de um sistema contendo a fase dispersa (gotas líquidas, óleo), a fase contínua (fase aquosa), um surfactante e um co-estabilizador (normalmente um hidrófobo). Para que a dispersão ocorra é necessário um mecanismo de alta agitação e ultrassonicação, com o intuito de alcançar um estado estacionário. A Figura 8 representa o mecanismo de formação das gotas até se alcançar o estado estacionário no qual o tamanho das gotículas possuem uma polidispersão muito baixa¹⁵.

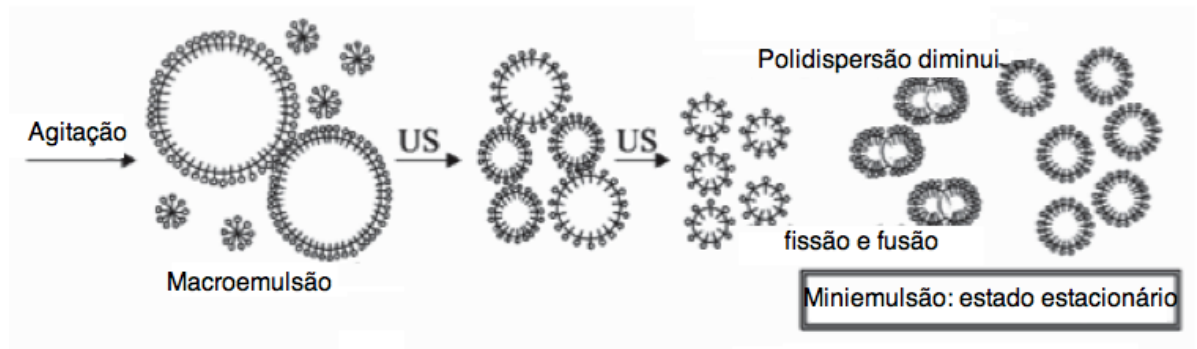


Figura 8. Apresentação da dinâmica de uma miniemulsão até alcançar o estado estacionário.

Já na Figura 9, o mecanismo da polimerização em miniemulsão é demonstrado. Na primeira parte da Figura 9, a fase I é composta por água, surfactante e iniciador e a fase II é composta por óleo e monômero. Já na segunda parte da figura estão representadas as cineticamente estáveis nanogotículas formadas após tratamento com ultrassom, as quais possuem tamanho homogêneo. A última e terceira parte da figura representa a polimerização que ocorre no interior das nanogotas, que também são chamadas de nanoreatores. Ao fim do processo são formadas nanopartículas de látex monodispersas entre 50 e 500 nm de diâmetro.

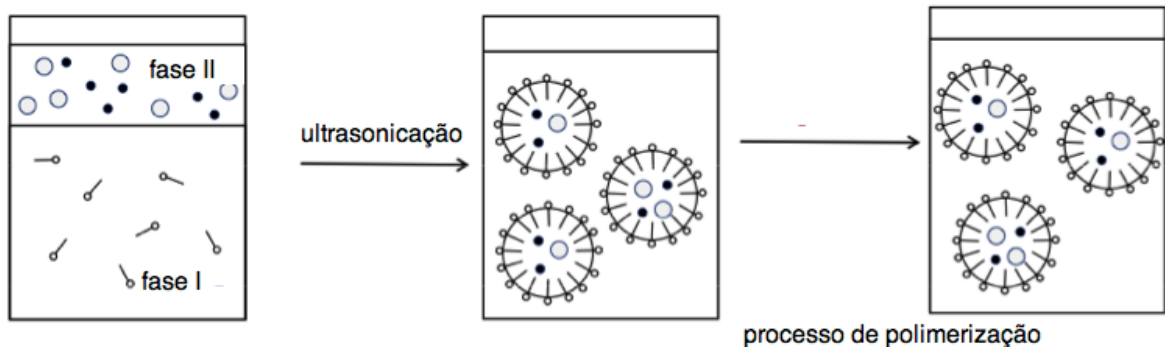


Figura 9. Mecanismo de polimerização em miniemulsão¹⁵.

3. OBJETIVOS

O presente projeto visa a obtenção de nanopartículas monodispersas de um biopolímero de amilopectina esterificado através de uma técnica de precipitação em um não-solvente. Deseja-se obter, então, um produto que possa ser competitivo no mercado de partículas padrão de tamanho com a vantagem de conferir ao produto final a qualidade de ser biodegradável, além de seus reagentes serem provenientes de fontes alternativas sustentáveis de baixo custo e extremamente abundantes na natureza.

4. PROPOSTA TECNOLÓGICA

As mudanças no ambiente dos negócios tem sido bastante profundas, principalmente nos últimos 20 anos, com o avanço do movimento em prol do desenvolvimento sustentável, exigindo das empresas flexibilidade e transparência nas suas ações.

Sustentabilidade representa promover a exploração de áreas ou uso de recursos planetários (naturais ou não) de forma a prejudicar o menos possível o equilíbrio entre o meio ambiente e as comunidades humanas e toda a biosfera que dele dependem para existir. Pode parecer um conceito difícil de ser implementado e, em muitos casos economicamente inviável.

A grande maioria dos novos projetos dessa revolução tecnológica em busca da sustentabilidade é ainda economicamente desfavorável. Entretanto, o presente trabalho propõe um projeto com visão sustentável e que tenha como fontes alternativas matérias primas abundantes e extremamente baratas resultando em uma viabilidade econômica para sua instalação ao final do processo.

As partículas padrão de referência de látex são constituídas principalmente de poliestireno. Essas são produzidas através da polimerização em emulsão do estireno. Por sua vez o estireno é produzido em quantidades industriais a partir do etilbenzeno, o qual é preparado a partir do benzeno e etileno. O etileno esse que provem da indústria petrolífera, uma fonte esgotável que é o principal foco do desenvolvimento de projetos sustentáveis no ramo da química.

Como alternativa a produção de partículas padrão de referência de poliestireno, este projeto sugere sua substituição por partículas de polímero de amilopectina derivatizada, que tem suas matérias primas abundantes e de fontes alternativas ao petróleo – o amido e ácidos graxos. O polímero de amilopectina derivatizada (pAmyl-D) será obtido através de uma reação de esterificação entre o biopolímero de amilopectina e um ácido graxo.

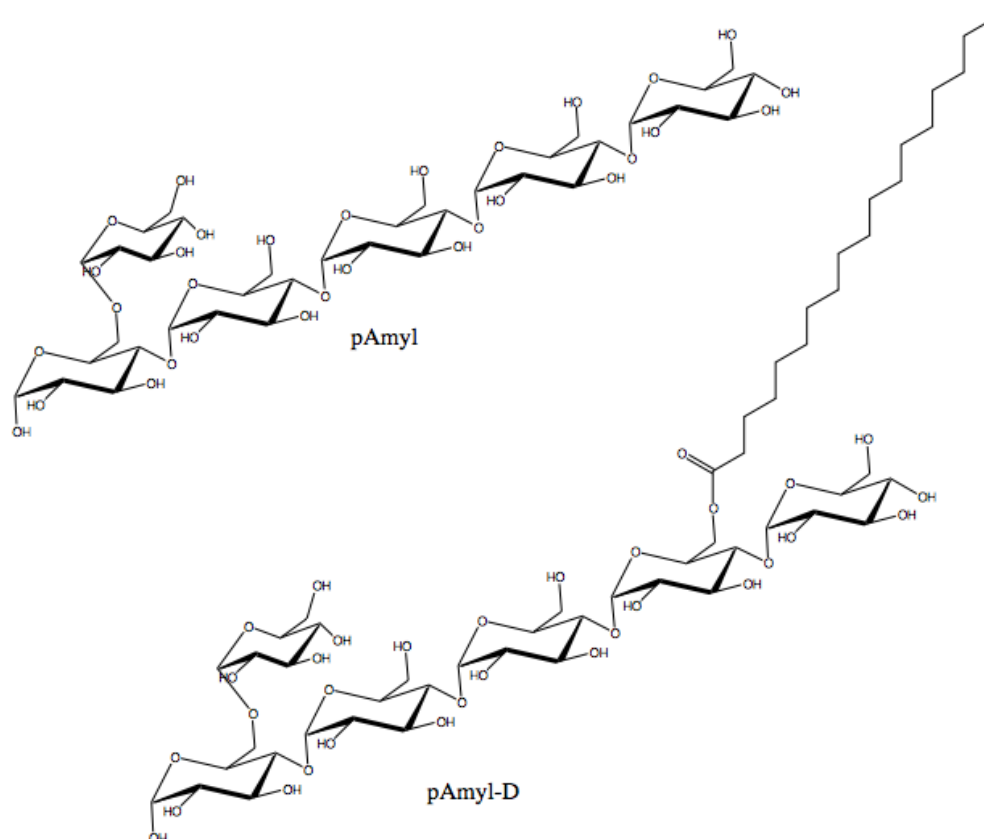


Figura 10. Estruturas de biopolímero de amilopectina (pAmyl) e polímero de amilopectina derivatizada (pAmyl-D)

Além da característica de sustentabilidade, o projeto tem a característica da biodegradabilidade. As partículas de amilopectina derivatizada são totalmente biodegradáveis em meio ambiente favorável ao contrário das partículas de poliestireno. Pois biodegradabilidade e sustentabilidade são os maiores desafios para a sociedade científica nos próximos anos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

5.1.1 Polímero de Amilopectina (pAmyl)

A amilopectina utilizada inicialmente foi fornecida pela CornProducts Brasil, Amido de Milho AMIDEX® 3001. Este é um polímero de amido com porcentagem de amilopectina entre 80 e 100%. Tal grau de amilopectina foi obtido pela empresa pela modificação genética da planta do qual foi extraído o amido. O pAmyl tem também como característica a sua baixa massa molar, ou seja, as cadeias de amilopectina possuem menor quantidade de unidades de glicose, facilitando assim sua organização em forma de nanopartículas quando utilizada a técnica de precipitação em não-solvente.

As principais aplicações desse amido comercial são: acabamento de tecidos, aglomerado de madeira, detergentes, engomagem de fios, enzimas para detergente em pó, fabricação de adesivos para papelão ondulado, fabricação de adesivos à base de água, inseticidas sólidos, papel corrugado, produtos de limpeza em geral, sabão em barra, spray, tablete para vaso sanitário, tabletes desodorantes, entre outros.

O pAmyl tem viscosidade de 1,2564 L/g, determinada no laboratório de bio e macromoléculas da UFRGS por viscosímetro de Ostwald e massa molar de $5,61 \times 10^5$, obtido por espalhamento de luz.

5.1.2 Ácido esteárico

Para a reação de derivatização (esterificação) do pAmyl o ácido carboxílico utilizado foi o ácido esteárico da marca Aldrich, com pureza de no mínimo 95% e massa molar 284 g. Sua fórmula molecular e estrutura seguem abaixo, na Figura 1.


Ácido Esteárico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$	
-----------------	----------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------

Figura 11. Estrutura e fórmula molecular do ácido esteárico.

5.1.3 Diciclocarbodiimida

O agente acoplador utilizado na reação de esterificação foi o DCC, diciclocarbodiimida da marca Aldrich, com pureza de no mínimo 98%, cuja fórmula molecular e estrutura estão representados a seguir.

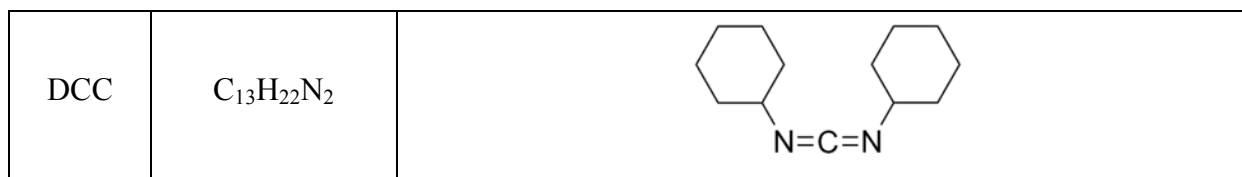


Figura 12. Estrutura e fórmula molecular do DCC

5.1.4 Dimetilaminopiridina (DMAP)

O catalisador utilizado na reação de esterificação do pAmyl foi dimetilaminopiridina (DMAP) da marca ACROS, com pureza de 99% e massa molar de 122,17 g. A fórmula e estrutura molecular do DMAP são dadas abaixo, na Tabela 2.

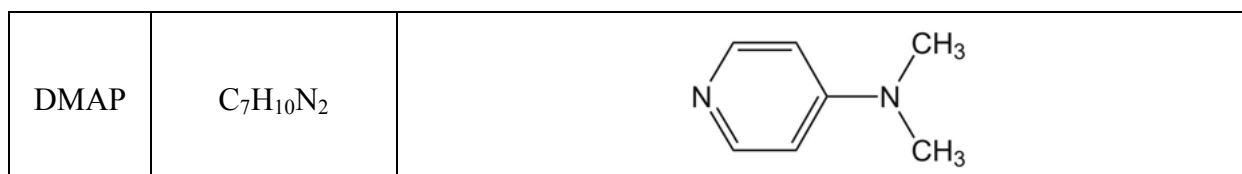


Figure 13. Estrutura e fórmula molecular do DMAP.

5.1.5 Solventes

O solvente utilizado na reação de esterificação do pAmyl, foi o dimetilsulfóxido (DMSO).

Depois de purificado e seco, o polímero de amilopectina derivatizado (pAmyl-D) foi solubilizado em acetona para posterior precipitação das nanopartículas em um não-solvente – água destilada.

5.1.6 Membrana para diálise

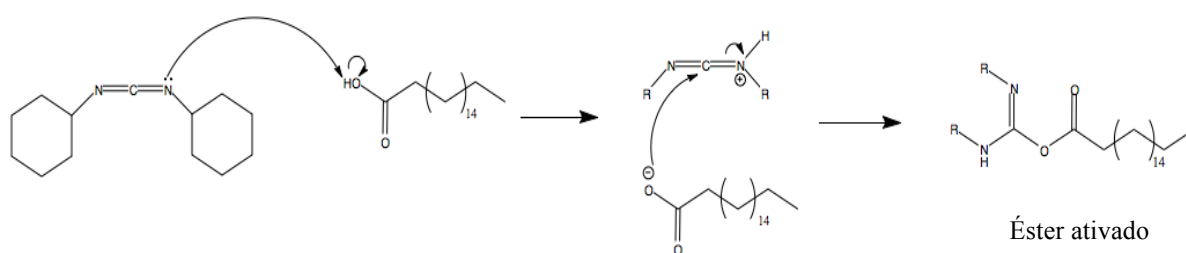
A primeira etapa de purificação do pAmyl-D foi feita por diálise por membrana, cuja membrana utilizada foi da marca Fisherbrand®Dialysis Tubing com massa molar de corte (MWCO – *Molar Weight Cut-off*) entre 12000 e 14000.

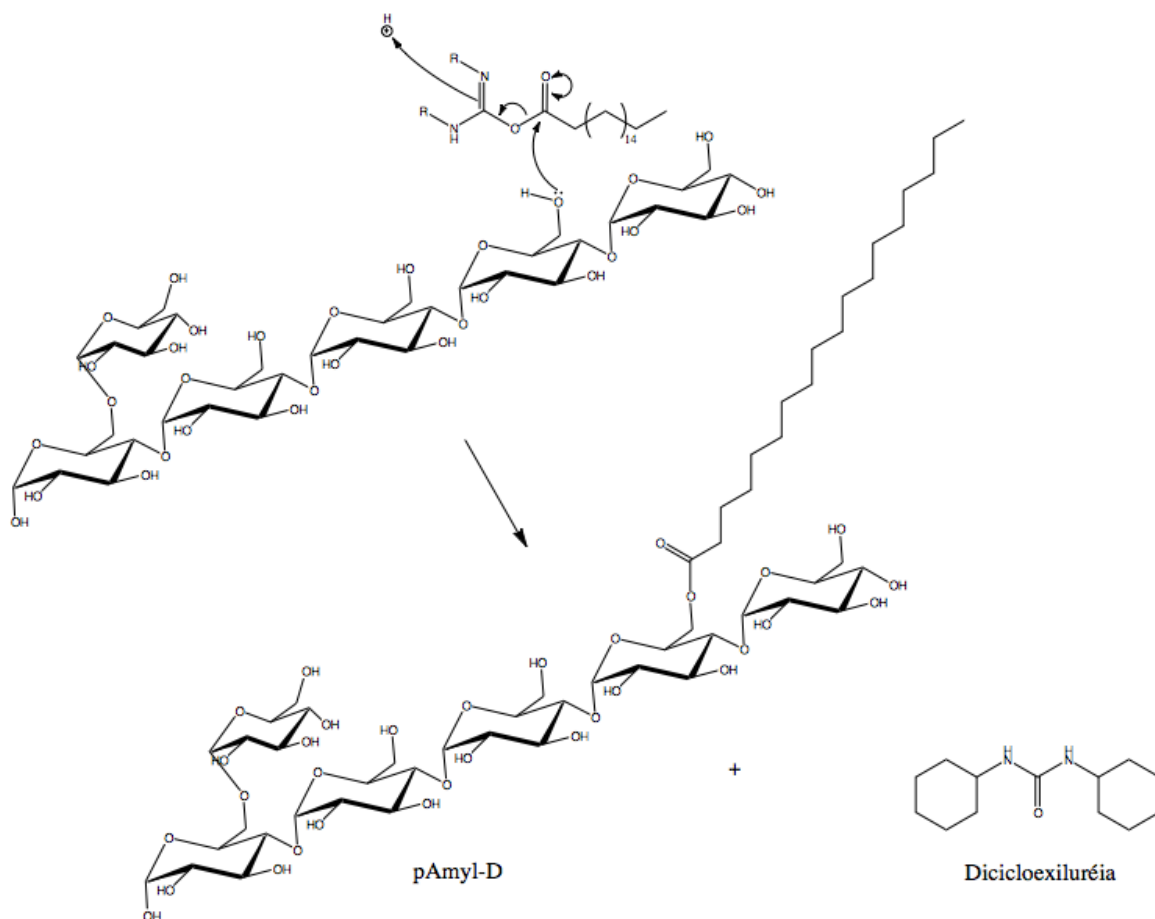
5.2 MÉTODOS

5.2.1 Grafitação do pAmyl

A reação de derivatização do pAmyl ocorreu através de uma reação entre um ácido carboxílico - ácido esteárico - e o grupo hidroxila das unidades de glicose do pAmyl. Essa é uma reação de esterificação e se deu em solvente DMSO com o reagente de acoplamento DCC e o catalisador DMAP¹⁶.

Como o pAmyl não tem uma regularidade na quantidade de unidades de glicose por molécula, ou seja não tem uma massa molar exata e sim média, a proporção estequiométrica entre a quantidade de pAmyl e a de ácido esteárico foi feita calculando-se a massa de um mol de ácido (284 g) para seis moles de unidades de glicose (972 g). Essa é a proporção que acreditou-se ser ideal para posteriormente haver a formação das nanopartículas no processo de precipitação em não-solvente. Considerando-se essa proporção de esterificação 1:6, a cada seis unidades de glicose uma hidroxila será esterificada, conforme o mecanismo de reação a seguir, representado pelo Esquema 1.





Esquema 1. Mecanismo da reação de esterificação do pAmyl¹⁶.

O éster ativado é formado na reação do ácido esteárico com o agente acoplador DCC. O produto é chamado éster ativado pois a substituição de qualquer nucleófilo irá liberar facilmente uréia como grupo de saída.

No esquema 1 é mostrado o mecanismo da reação de esterificação do pAmyl que é dado pela reação do éster ativado anteriormente pelo DCC e do pAmyl. Os produtos finais sendo, então, o polímero de amilopectina derivatizado (pAmyl-D) e o subproduto dicitloexiluréia.

Usando DMSO como solvente da reação, foi primeiramente dissolvido o pAmyl e, após a solubilização total desse, adicionados o ácido esteárico, o DCC e o DMAP nas quantidades demonstradas na tabela abaixo.

Tabela 1. Relação das quantidades de reagentes utilizados da reação de graftização do pAmyl.

	Número de mols	Quantidade
pAmyl	0,2*	198,7 mg
Ácido Esteárico	0,2	57 mg
DCC	0,2	51 mg
DMAP	-	4,7 mg
DMSO	-	5 mL

* 198,7 mg de pAmyl correspondem a 0,2 mols considerando-se hipoteticamente que o pAmyl possui 6 unidades de glicose em sua estrutura. Essa hipótese é utilizada somente para efetuar o cálculo da proporção entre a quantidade de hidroxilas e de ácido esteárico.

Os reagentes foram adicionados a um balão volumétrico de 25 mL sob atmosfera inerte de nitrogênio e deixados sob agitação magnética por aproximadamente 48h.

5.2.2 Purificação do pAmyl-D

5.2.2.1 Diálise por membrana

A primeira etapa de purificação do pAmyl derivatizado, que engloba a sua separação do solvente, dos catalisadores, subprodutos e ácidos foi feita pela técnica de diálise por membrana, utilizando-se uma membrana. Este é um processo físico químico pelo qual duas soluções de concentrações diferentes são separadas por uma membrana semipermeável e após um certo tempo as espécies passam pela membrana para igualar as concentrações. Isso ocorre pelo mecanismo de difusão, no qual o fluxo de soluto se dá de acordo com o gradiente de concentração, sendo transferida massa de um local de maior para um de menor concentração¹⁷.

A solução reacional foi posta dentro da membrana semiseletiva e então mergulhada em água destilada por aproximadamente 3 dias. Devido ao peso molecular dos componentes da solução e do tamanho dos poros da membrana, apenas o pAmyl-D fica retido dentro da membrana, enquanto o solvente DMSO, o subproduto uréia, o catalisador regenerado DMAP e o restante da molécula com massa molecular menor do que 16000g/mol ultrapassam a membrana e são descartados.

5.2.2.2 Liofilização

A segunda etapa de purificação do produto foi realizada por liofilização do mesmo. Essa é uma técnica que remove a água e solventes de substâncias previamente congeladas pelo processo de sublimação, que ocorre quando a temperatura e a pressão parcial do vapor da água são inferiores às do ponto triplo da mesma (610 Pa à temperatura de 0,01 °C, para a água pura)¹⁸.

A secagem de um produto geralmente causa alguma perda de atividade ou algum outro dano ao material. A liofilização, então, é um método de secagem que reduz significativamente esses danos, secando o produto por sublimação após um prévio congelamento e em seguida submetendo-o a uma pressão negativa. Por esse motivo, a liofilização é usada quando se quer purificar materiais delicados e sensíveis ao calor.

Esse processo foi feito em um liofilizador TermoFisher modelo Micromoduly YO-115 na Central Analítica do Instituto de Química da UFRGS. O conteúdo que restou no interior da membrana de diálise foi transferido para um balão volumétrico apropriado para o equipamento e submetido a um prévio e rápido congelamento utilizando-se nitrogênio líquido, e então submetido a liofilização durante aproximadamente 10 horas.

5.2.3 Precipitação de nanopartículas em não-solvente

Como abordado anteriormente, para a precipitação de macromoléculas sob a forma de nanopartículas, a técnica mais utilizada é a de precipitação em não-solvente (*desolvation*). Nessa técnica, a macromolécula (pAmyl-D nesse caso) é dissolvida em um solvente com o qual tenha afinidade (solvente 1) e então essa solução é gotejada sobre um não-solvente sob agitação (solvente 2).

Portanto, é importante encontrarmos a relação ideal entre solvente 1 e solvente 2. O não-solvente utilizado foi água destilada, pois a reação de graftização do pAmyl foi uma reação de hidrofobização do polímero. Enquanto que para o solvente 1, foram testados isopropanol e acetona.

Como a concentração do polímero no solvente 1 no momento de adição ao solvente 2 é uma das variáveis mais prováveis que afetam o tamanho das nanopartículas, foram feitas 2 concentrações diferentes para cada tipo de solvente 1.

- Sistema Isopropanol/Água

Primeiramente, foi feita uma solução de 10 mg/mL de pAmyl-D em isopropanol. Para isso, foram adicionados 10 mg do polímero em 10 mL de isopropanol. Dessa solução, foi retiradas uma alíquota para o preparo de uma solução mais diluída: 5 mg/mL. Resultando, então, em duas soluções como mostra a tabela abaixo.

Tabela 2. Relação das soluções de pAmyl-D em isopropanol.

	Concentração de pAmyl-D
IsoA	10 mg/mL
IsoB	5 mg/mL

Com uma pipeta Pasteur adicionou-se 2 mL da solução IsoA, gota a gota a uma velocidade média de 1 gota/s, em um Erlenmeyer de 25 mL contendo 5 mL de água destilada sob agitação branda. Repetiu-se o procedimento para a solução IsoB.

- Sistema Acetona/Água

O procedimento de precipitação de nanopartículas em não-solvente para o sistema acetona/água foi análogo ao do sistema isopropanol/água. Resultando em duas soluções como mostrado na tabela abaixo.

Tabela 3. Relação das soluções de pAmyl-D em acetona.

	Concentração de pAmyl-D
AceA	10 mg/mL
AceB	5 mg/mL

Repetiu-se o procedimento de adição das soluções IsoA e IsoB para as soluções AceA e AceB em 5 mL de água destilada sob agitação branda.

As soluções de pAmyl-D IsoA, IsoB, AceA e AceB deram origem então a quatro soluções de possíveis nanopartículas de pAmyl-D em água: IsoA-n, IsoB-n, AceA-n e AceB-n, respectivamente.

5.2.5 Análise de H^1 -RMN

A verificação do sucesso da reação de esterificação do pAmyl foi realizada através da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1 H).

Foram analisados por RMN 1 H o polímero de partida – pAmyl – e o produto da reação – pAmyl-D – utilizando-se o aparelho Varian - VNMRS, operando na frequência de 300MHz. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm.

As amostras foram preparadas utilizando 14 mg de cada polímero em tubos de RMN com DMSO deuterado. A partir dos espectros, pode-se concluir se a reação foi bem sucedida ou não.

5.2.6 Análise pelo Infravermelho (FTIR)

Outra técnica utilizada na verificação do sucesso da reação foi a espectroscopia na região do infravermelho, a qual é a maneira mais prática para a análise qualitativa dos compostos estudados.

A espectroscopia no infravermelho é baseado no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências vibracionais específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula. Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico. Se a molécula receber radiação eletromagnética com a mesma energia de uma dessas vibrações, então a radiação será absorvida desde que sejam atendidas determinadas condições. Para que uma vibração apareça no espectro IV, a molécula precisa sofrer uma variação no seu momento dipolar durante o movimento rotacional ou vibracional¹⁹.

Nessa etapa foi utilizado o espectrômetro Varian modelo 640-IR operando no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} . As amostras de pAmyl e pAmyl-D foram prensadas em pastilhas de KBr em uma proporção de 1:100 em peso e, então, a análise foi procedida.

5.2.7 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

No espalhamento quase-elástico são consideradas as pequenas variações de intensidade da luz espalhada, resultantes das flutuações do índice de refração da solução dentro do volume de espalhamento. As flutuações do índice de refração podem ser resultantes da difusão translacional das moléculas ou partículas em solução ou suspensão, o denominado movimento browniano. Essas flutuações podem ser correlacionadas e avaliadas em termos de vários processos de relaxação através de uma função de correlação temporal, obtida por um correlador, caracterizando a espectroscopia de correlação de fótons, mais conhecida com Espalhamento de Luz Dinâmico (Dynamic Light Scattering – DLS)^{20,21}.

Com medições dessas flutuações do índice de refração é obtido o coeficiente de difusão aparente (D_{ap}) e conseqüentemente, através de uma extrapolação para concentração zero, obtemos o coeficiente de difusão à diluição infinita D_0 . Com D_0 , o raio hidrodinâmico R_h das partículas é facilmente obtido através da relação de Stokes-Einstein:

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura e η a viscosidade do solvente. De forma hipotética, o raio hidrodinâmico define o raio de uma esfera rígida que difunde com a mesma velocidade da partícula que está sendo examinada pelo Espalhamento de Luz Dinâmico^{20,21}.

Assim, então, pode ser determinado o raio das nanopartículas sintetizadas. Para tanto, retirou-se uma alíquota de 1 mL das soluções IsoA-n e AceA-n, 2mL das soluções IsoB-n e AceB-n e em seguida todas foram diluídas em 10 mL de água ultrapura. Essas soluções foram colocadas em cubetas de quartzo e então encaminhadas para análise no equipamento de espalhamento de luz que consiste de um laser He-Ne de 35 mW e comprimento de onda de 632,8 nm, modelo 127 da Spectra-Physics acoplado a um goniômetro BI-200M versão 2.0 e com correlador digital BI-9000AT da Brookhaven Instruments, do laboratório de Bio&Macromoléculas da UFRGS.

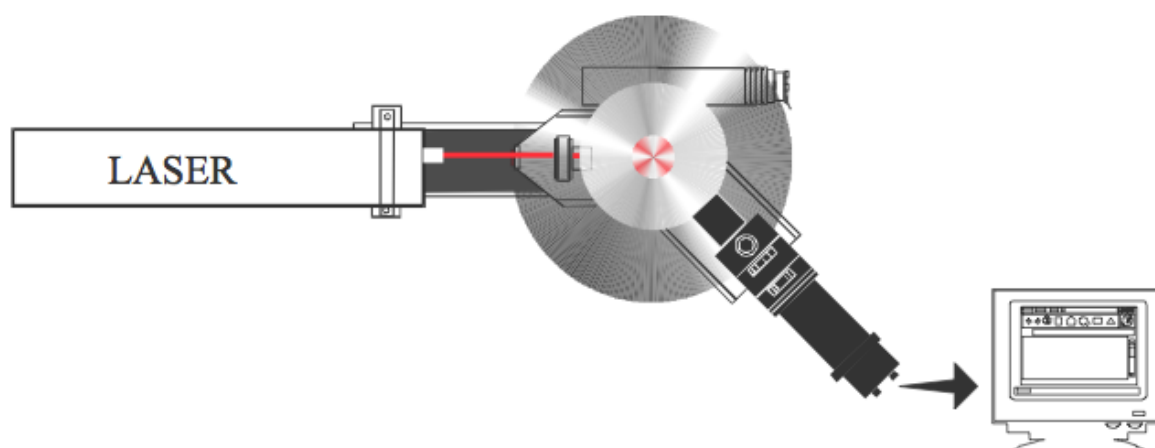


Figura 14. Vista superior do equipamento de espalhamento de luz. O laser incide sobre a amostra localizada no centro do goniômetro. A luz espalhada em determinado ângulo é coletada e amplificada pela fotomultiplicadora que envia os dados ao computador.

5.2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é, geralmente, usado para o estudo de estruturas superficiais ou subsuperficiais de amostras com dimensões relativamente grandes. As análises feitas por MEV têm alta profundidade de foco, o que significa ter diferentes relevos da amostra simultaneamente em foco. Alta resolução também é uma das principais características desta análise, que garante obter ampliação de detalhes próximos sem perda de nitidez.

A preparação das amostras e a obtenção das imagens são relativamente simples. Materiais não condutores, como a maioria dos polímeros, requerem, em geral, apenas revestimentos condutivos ou o uso de baixa voltagem de aceleração do feixe. A montagem da amostra é feita sobre suportes metálicos, utilizando adesivos condutivos, tais como fitas de carbono ou suspensões coloidais de prata ou carbono. O revestimento da amostra por um filme condutor tem o objetivo de evitar o acúmulo de carga negativa, no caso de a mesma ser formada por um material não condutor. A camada de metal deve ser suficientemente contínua e fina ($< 20\text{nm}$) para que a superfície da amostra não seja mascarada, porém deve ser adequada para conduzir o excesso de carga negativa. Os metais mais utilizados são o ouro e platina, o alumínio e o carbono²².

Este estudo foi realizado através de análise por Microscopia Eletrônica de Varredura, em equipamento MEV JSM 6060 no Centro de Microscopia Eletrônica – CME – da UFRGS.

Foram gotejadas, as soluções de nanopartículas de pAmyl derivatizado sobre superfícies metálicas condutoras (*stubs*) e deixados para secagem em dessecador sob temperatura ambiente durante dois dias, então a mesma foi metalizada com ouro (procedimento realizado pelos técnicos do CME) e a análise foi procedida.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 REAÇÃO DE GRAFTIZAÇÃO

6.1.1 Análise de H^1 -RMN

O RMN de próton da amilopectina, assim como da maioria dos açúcares, é muito irregular e não possui os picos bem definidos para cada tipo de hidrogênio. Isso se deve ao fato de a amilopectina ter muitas hidroxilas e então, ter muitas ligações de hidrogênio entre suas moléculas e provavelmente intramoleculares também, dificultando a identificação dos picos.

O que mais se espera quando se compara os espectros de RMN de próton do pAmyl e do pAmyl-D se a reação de esterificação foi bem sucedida, é notar um surgimento de picos característicos de hidrogênio ligado a carbonos saturados nesse último, devido as longas cadeias de carbono saturado provenientes da esterificação do pAmyl com ácido esteárico, e a diminuição dos sinais de hidrogênio ligados a grupos R-OH.

Comparando os espectros do pAmyl e do pAmyl-D, representados pelas Figuras 11 e 12 respectivamente, pode-se afirmar que ocorreu uma diminuição da área dos picos situados entre 4,5 e 5,6 ppm que representam os hidrogênios dos grupos R-OH. Isso se deve à diminuição da quantidade de hidrogênios desses grupos devido à esterificação de algumas dessas hidroxilas, como se pode ver na Figura 10 (comparação entre as estruturas).

Ao mesmo tempo que há uma diminuição dos sinais dos hidrogênios das hidroxilas, há um aumento no sinal dos hidrogênios de carbono saturado localizados em aproximadamente 2,5 ppm, como esperado devido as longas cadeias de ácido graxo substituídas no polímero.

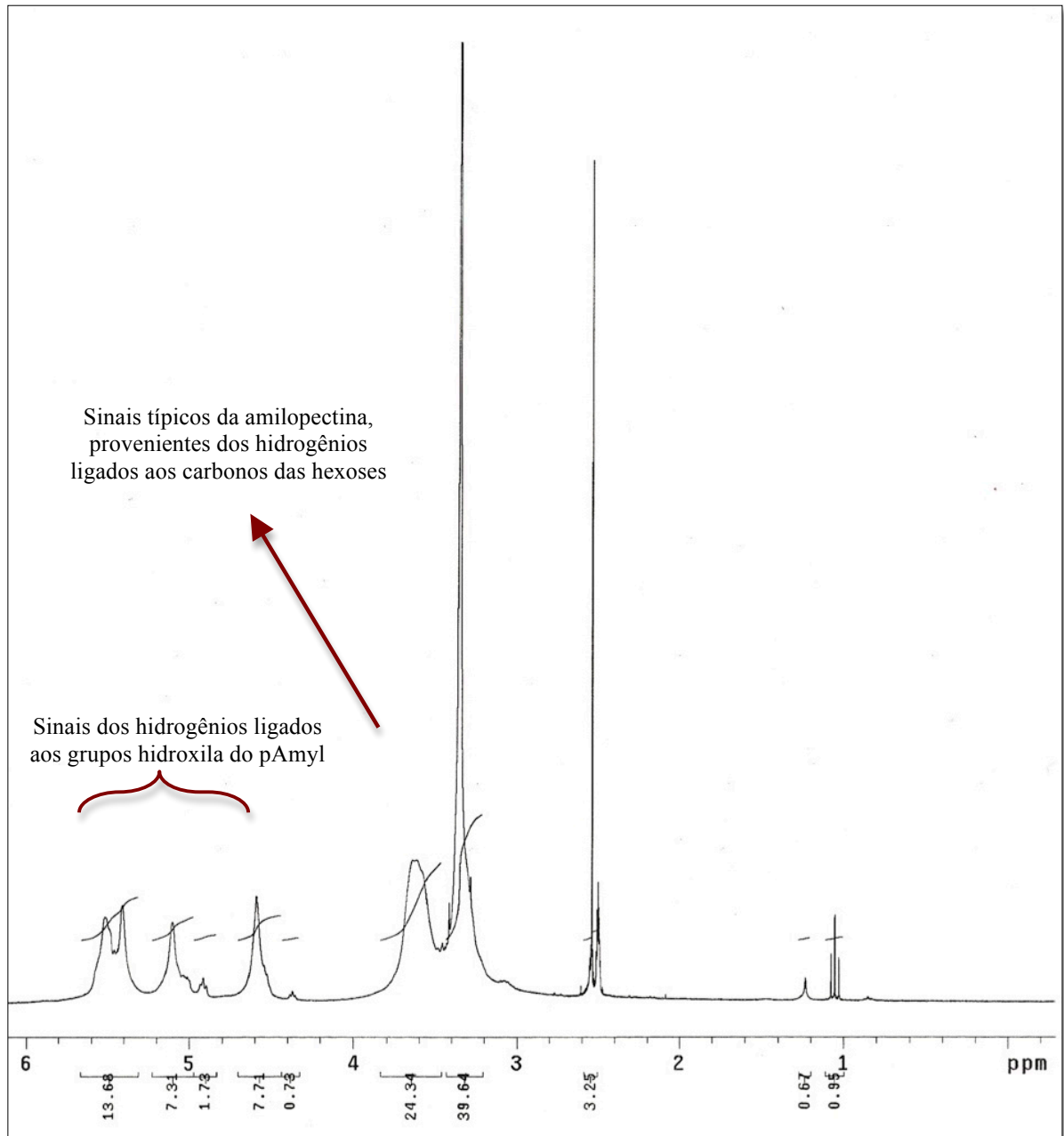


Figura 15. Análise de RMN de próton do pAmyl.

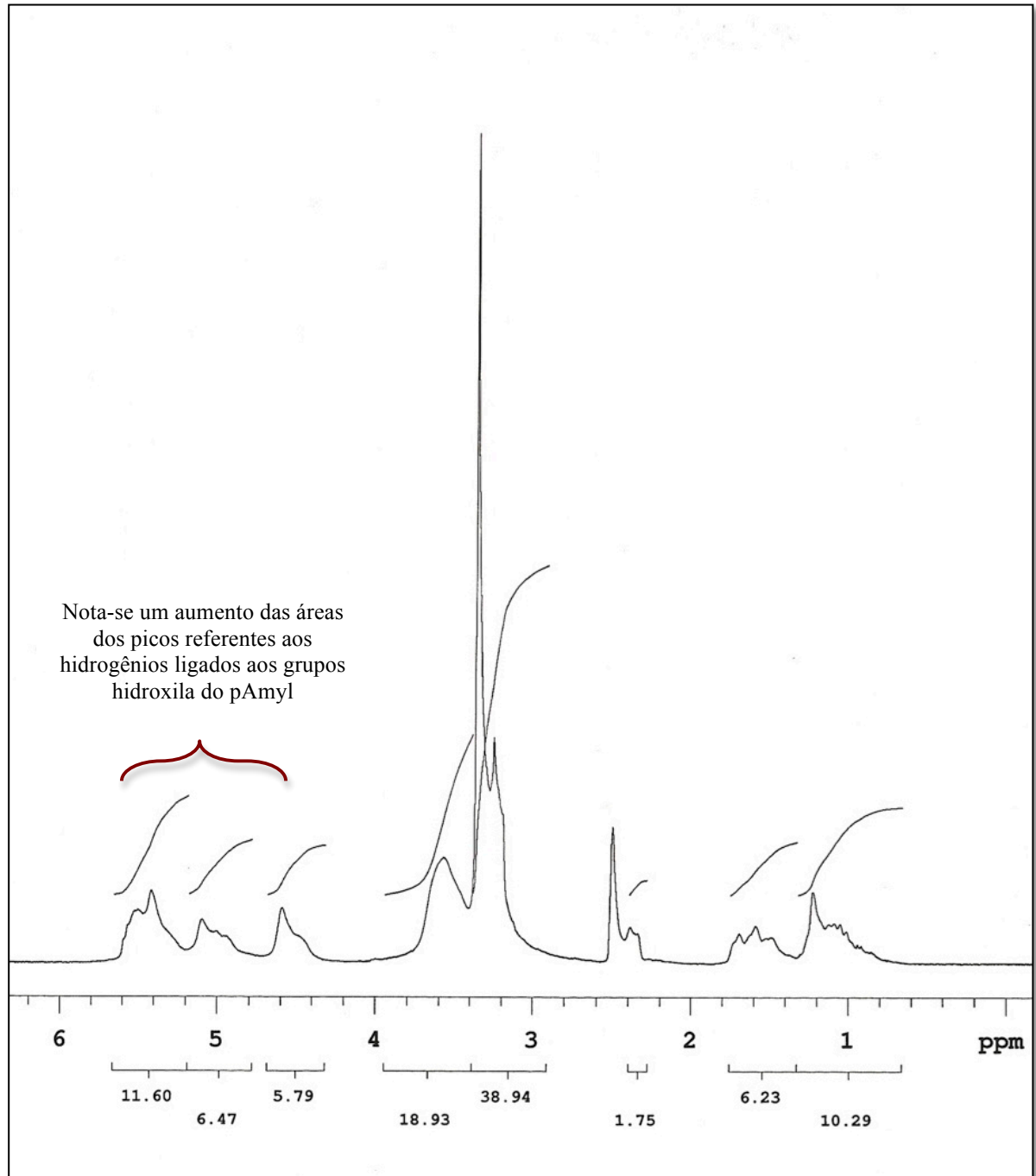


Figura 16. Análise de RMN de próton do pAmyl-D.

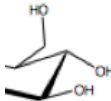
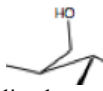

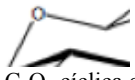
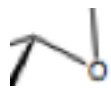
6.1.1 Análise de Infravermelho

Os espectros de infravermelho das amostras de pAmyl e pAmyl-D seguem nas Figuras 14 e 15.

Com a reação de esterificação, espera-se verificar nos espectros de infravermelho do pAmyl-D o aumento do sinal de bandas características de grupamentos $-\text{CH}_2$, e o surgimento de bandas características de grupamentos que compõem o grupo funcional de um éster.

Analisando-se o espectro do pAmyl, identificamos as seguintes bandas, mostradas na Figura 14 e identificadas na Tabela 7:

Tabela 4. Identificação das bandas de absorção do espectro de infravermelho do pAmyl.

Comprimento de onda de absorção (cm^{-1})	Grupo funcional responsável pela absorção	Identificação do grupamento funcional na estrutura do pAmyl
3424	Banda larga característica de grupamentos $-\text{OH}$ com ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares	 <p>Grupamentos hidroxila presentes nas unidades de glicose</p>
2928	Banda devido ao estiramento assimétrico das ligações do grupamento $-\text{CH}$	Grupamentos $-\text{CH}$ presentes nas unidades de glicose
1021 1365	Bandas características de álcoois primários	 <p>Hidroxila ligada ao carbono no grupamento $-\text{CH}_2-\text{OH}$ na unidade de glicose</p>
1083	Bandas características de álcoois secundários	 <p>Grupamentos hidroxilas ligados a carbonos secundários da hexose</p>
1157	Banda característica do das ligações $-\text{O}-\text{C}-\text{O}-$ de um éster	 <p>Ligação $-\text{O}-\text{C}-\text{O}-$ cíclica da hexose</p>  <p>Ligação $-\text{O}-\text{C}-\text{O}-$ alifática efetuando as ligações glicosídicas</p>

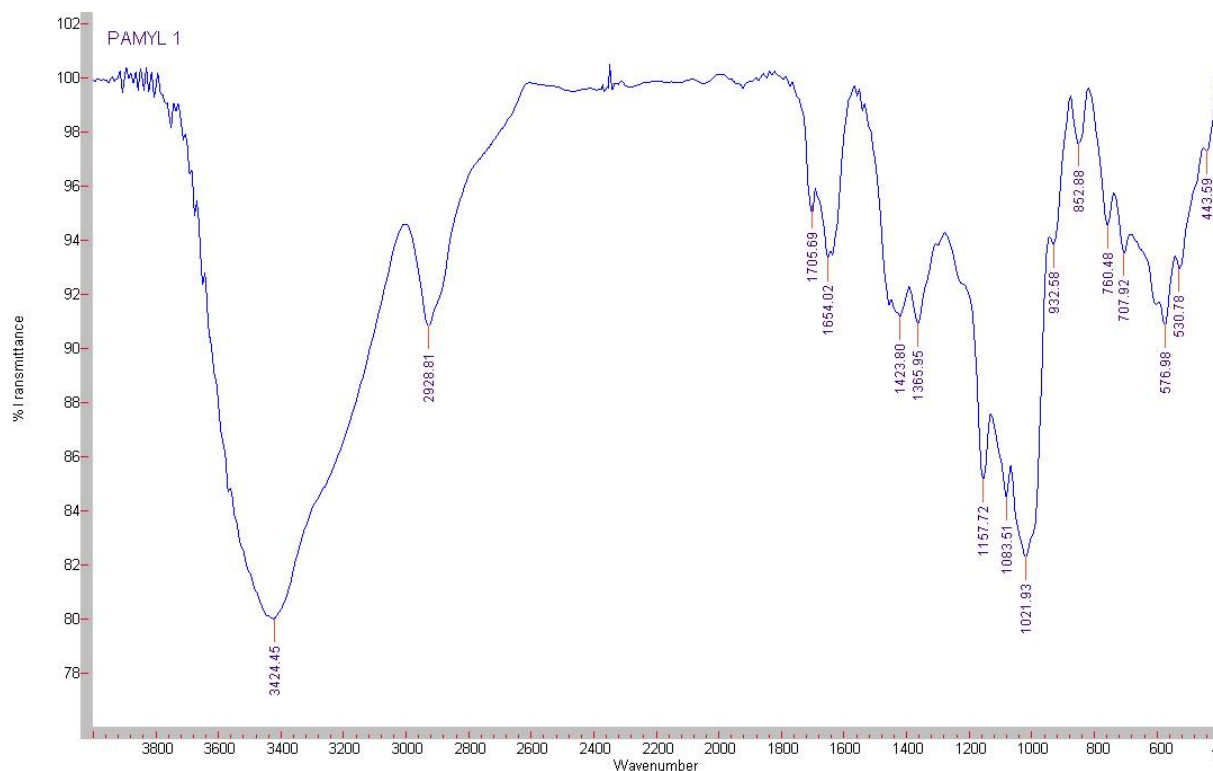
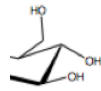
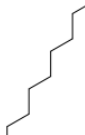


Figura 17. Espectro de infravermelho do pAmyl.

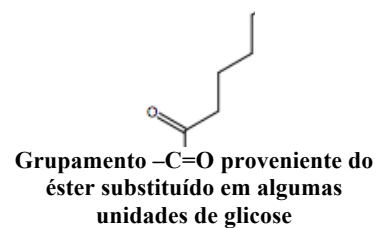
Já analisando-se o espectro do pAmyl-D, identificamos as seguintes bandas, mostradas na Figura 15 e detalhadas na Tabela 8:

Tabela 5. Tabela de identificação das bandas do espectro de infravermelho do pAmyl-D.

Comprimento de onda de absorção (cm ⁻¹)	Grupo funcional responsável pela absorção	Identificação do grupamento funcional na estrutura do pAmyl
3347	Banda larga característica de grupamentos -OH com ligações de hidrogênio somente intermoleculares	 Grupamentos hidroxila presentes nas unidades de glicose
2921	Banda devido ao estiramento assimétrico das ligações do grupamento -CH ₂ linear	 Grupamentos -CH₂ da cadeia carbônica alifática proveniente da esterificação do pAmyl
2849	Banda devido ao estiramento simétrico das ligações do grupamento -CH ₂ linear primários	Mesmos grupamentos dados acima

1657

Bandas características de ligação -C=O
deslocada pois existem muitos
grupos -OH próximos



1024

Banda entre 1000 e 1060 cm^{-1}
proveniente da ligação -C-O de éster
sobreposta pelas bandas características
de álcoois primários

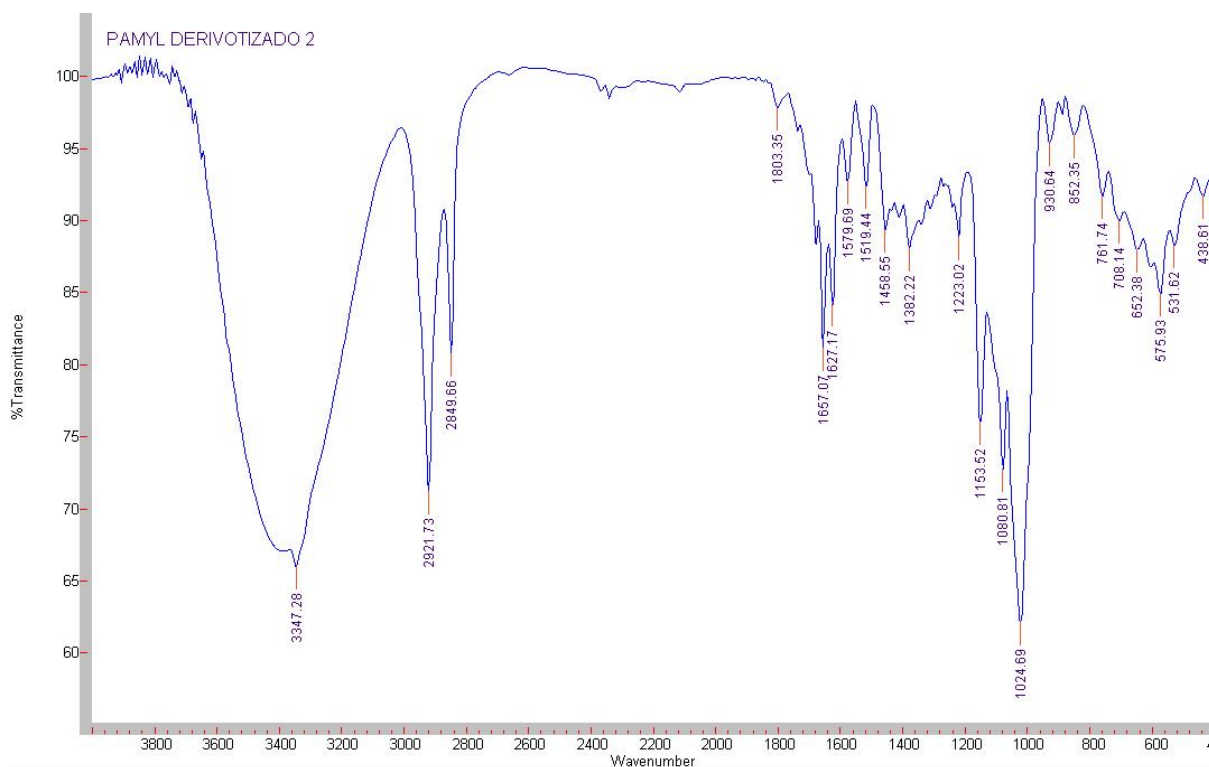
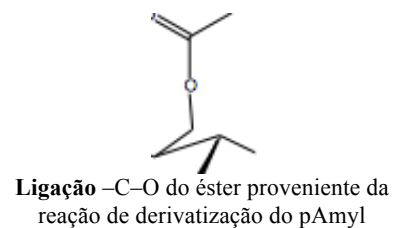


Figura 18. Espectro de infravermelho do pAmyl-D.

Com o conjunto das análises de RMN de próton e de espectroscopia no infravermelho, pode-se concluir que houve a esterificação do pAmyl, ou seja, a reação de derivatização foi bem sucedida nas condições propostas por esse projeto.

6.2 FORMAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

6.2.1 Análise Visual

A primeira análise a ser feita após o preparo das nanopartículas é a análise visual, no qual se analisa a turbidez da solução que contém as nanopartículas. Quando partículas de tamanho submicro estão dispersas em um solvente, essas ficam suspensas e não precipitam, deixando uma aparência permanentemente turva mas ao mesmo tempo translúcida na solução¹².

Dentre as 4 soluções de pAmyl-D que foram precipitadas em água para a formação de nanopartículas, apenas duas delas apresentaram essa turbidez característica de nanopartículas em suspensão. Nas outras duas, houve a formação de um precipitado que decantou enquanto que o líquido permaneceu transparente e incolor sem nenhuma turbidez. Essa relação encontra-se descrita na Tabela 9.

Tabela 6. Relação das soluções que aparentemente formaram nanopartículas de pAmyl-D ou não.

Solução	Aparência após gotejada sobre o não-solvente (água)	Formação de nanopartículas de pAmyl-D
IsoA	Precipitado decantado + água	Não
IsoB	Precipitado decantado + água	Não
AceA	Leve turbidez permanente e translúcida	Sim
AceB	Leve turbidez permanente e translúcida	Sim

Considera-se, então, que ao gotejarmos 2 mL das soluções AceA e AceB em 5 mL de água houve a formação de nanopartículas de pAmyl-D, enquanto que para as soluções IsoA e IsoB não houve a formação das nanopartículas e sim uma precipitação de aglomerados desorganizados do polímero. As Figuras 17 e 18 mostram a turbidez característica de nanopartículas em suspensão das soluções AceA-n e AceB-n. Já a Figura 19 mostra a formação de precipitados aglomerados não organizados da solução de IsoB-n.

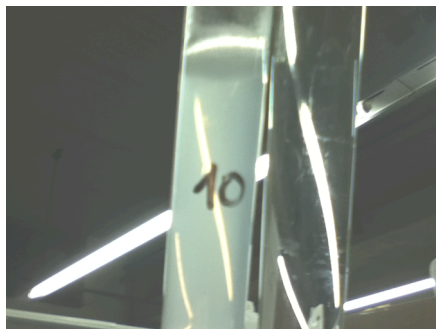


Figura 19. Comparação entre água pura (direita) e uma suspensão de nanopartículas em água, solução AceA-n.



Figura 20. Comparação entre água pura (esquerda) e uma suspensão de nanopartículas em água formada a partir da solução AceB, a solução AceB-n.



Figura 21. Comparação entre água pura (direita) e a solução IsoB-n (esquerda) no qual nota-se o precipitado aglomerado de pAmyl-D ao fundo do tubo de ensaio.

A não formação de nanopartículas a partir das soluções IsoA e IsoB é atribuída ao fato de o sistema isopropanol/água não ser o ideal para tal. O par ideal de solvente/não-solvente encontrado nesse estudo foi, portanto, acetona/água.

6.2.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

A análise foi feita utilizando-se dois softwares diferentes, o programa CONTIN e o HML.

Na análise foi obtida uma curva de uma função de correlação temporal, demonstrada nas Figuras 20 e 21, para as amostras de AceA-n e AceB-n respectivamente.

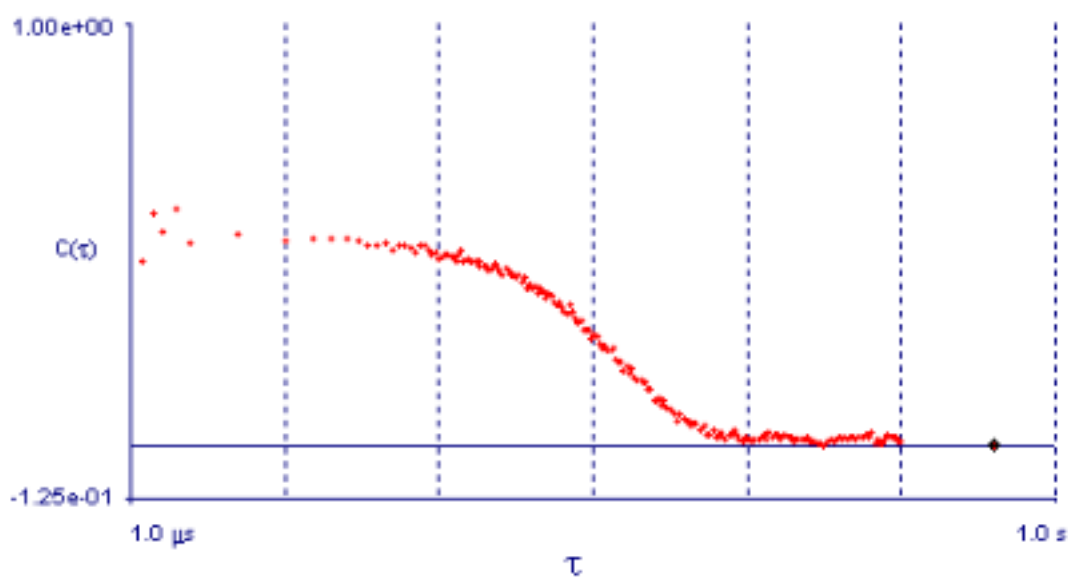


Figura 22. Função de correlação temporal da amostra AceA-n.

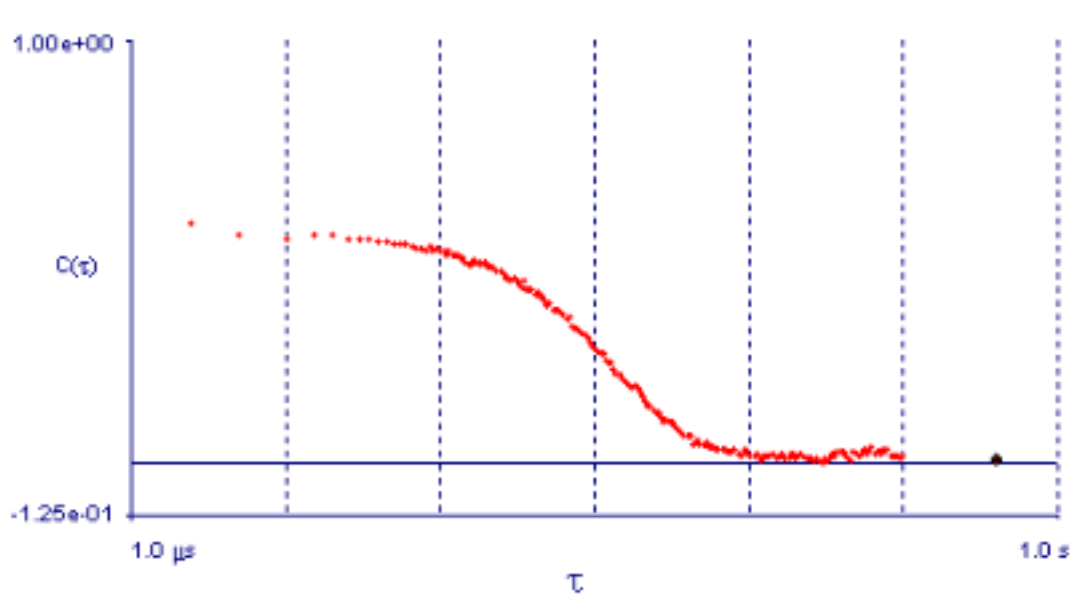


Figura 23. Função de correlação temporal para a amostra AceB-n.

Para determinação dos diâmetros das partículas em suspensão, o software CONTIN faz uma transformada de Fourier e estabelece estatisticamente os possíveis diâmetros e suas probabilidades de ocorrência que tenham mesmo comportamento temporal que as curvas mostradas acima.

Os resultados gerados por esse software estão demonstrados nas Figuras 22 e 23 abaixo.

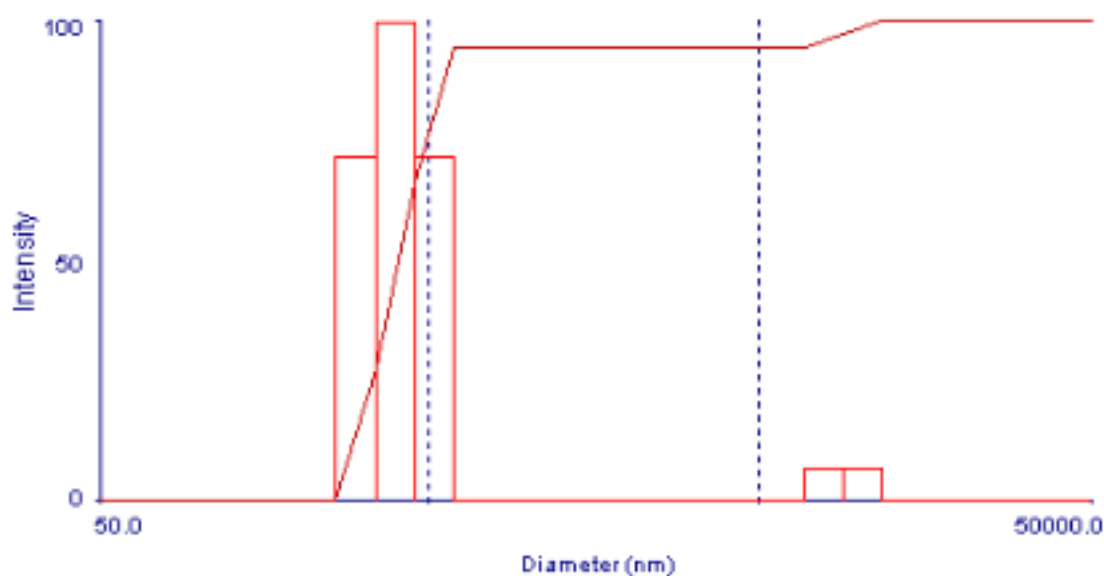


Figura 24. Gráfico de probabilidade de ocorrência *versus* o diâmetro da partícula, para a amostra AceA-n.

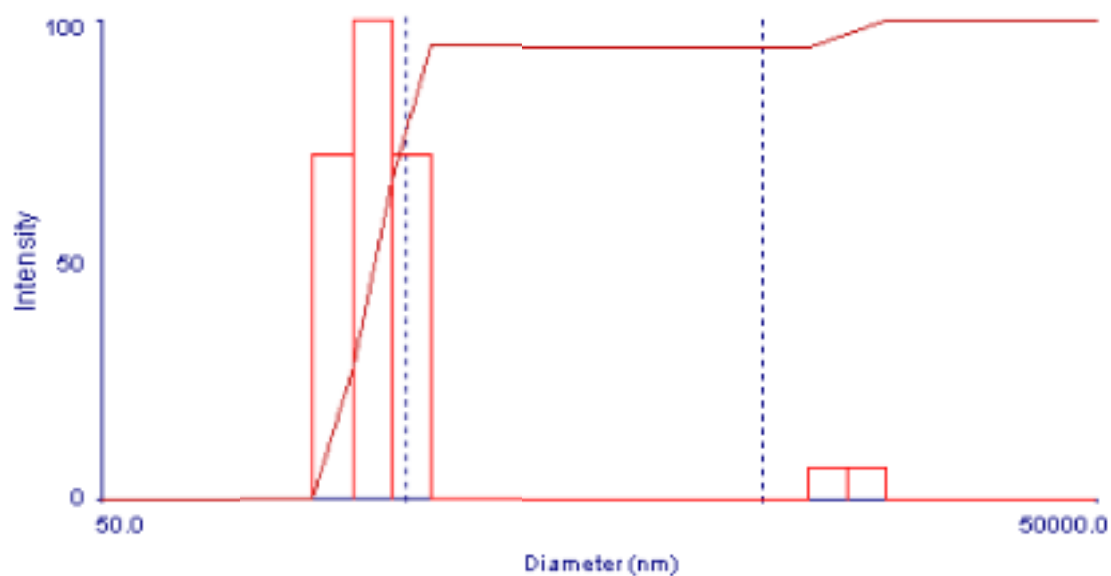


Figura 25. Gráfico de probabilidade de ocorrência *versus* o diâmetro da partícula, para a amostra AceB-n.

d	G(d)	C(d)	d	G(d)	C(d)
130.41	0	0	2576.53	0	95
171.04	0	0	3379.31	0	95
224.34	0	0	4432.22	0	95
294.23	72	28	5813.18	0	95
385.91	100	67	7624.42	7	97
506.15	72	95	10000.00	7	100
663.85	0	95			
870.69	0	95			
1141.97	0	95			
1497.78	0	95			
1964.45	0	95			

Figura 26. Dados do gráfico de probabilidade x diâmetro da partícula, para a amostra AceA-n.

Para determinação dos diâmetros das partículas em suspensão, o software HML prevê um diâmetro efetivo da partícula baseada na média das movimentações difusionais observadas no tempo de análise. Geralmente essa análise gera um diâmetro um pouco maior. Os resultados das análises pelo software HML são demonstrados nas Figuras 26 e 27.

d	G(d)	C(d)	d	G(d)	C(d)	d	G(d)	C(d)
79.31	0	0	2205.63	0	96			
107.30	0	0	2984.19	0	96			
145.18	0	1	4037.57	7	97			
196.42	0	8	5462.77	7	99			
265.75	95	29	7391.06	7	100			
359.56	100	50	10000.00	0	100			
486.48	95	70						
658.20	0	89						
890.54	0	93						
1204.89	0	96						
1630.20	0	96						

Figura 27. Dados do gráfico de probabilidade x diâmetro da partícula para a amostra AceB-n.

STOPPED		Ref Index:	1.331
First Delay:	1.2 μ sec	Samples:	4.9480e+06
Last Delay:	100.0 msec	Atot:	3.7047e+05
Elapsed Time:	00:00:27	A CR (avg.):	15.0 kcps
Wavelength:	632.8 nm	M. Base:	2.7790e+04
Angle:	90.0	C. Base:	2.7738e+04
Temp:	23.0 deg C	Base diff:	0.186%
Liquid:	Water	Eff Dia:	521.7 nm
Viscosity:	0.933 cP	Poly:	0.233

Figura 28. Dados da análise pelo software HML da amostra de AceA-n.

STOPPED		Ref Index:	1.331
First Delay:	2.4 μ sec	Samples:	8.7163e+06
Last Delay:	100.0 msec	Atot:	6.9850e+05
Elapsed Time:	00:00:48	A CR (avg.):	16.0 kcps
Wavelength:	632.8 nm	M. Base:	5.6339e+04
Angle:	90.0	C. Base:	5.5977e+04
Temp:	23.0 deg C	Base diff:	0.646%
Liquid:	Water	Eff Dia:	476.5 nm
Viscosity:	0.933 cP	Poly:	0.222

Figura 29. Dados da análise feita pelo software HML da amostra AceB-n.

Analisando os resultados dados acima, pode-se concluir que a concentração das soluções de pAmyl-D no momento da precipitação em água, tem efeito no tamanho das nanopartículas precipitadas: quanto mais concentrada é a solução de pAmyl-D em acetona, maior será o diâmetro das nanopartículas precipitadas em não-solvente.

O diâmetro medido mais confiável é o analisado pelo software CONTIN, pois é baseado em uma análise estatística dos dados dos movimentos de difusão. Sendo assim os diâmetros hidrodinâmicos mais próximos aos reais são de 385 nm para AceA-n e 359 para AceB-n.

É interessante destacar também que, com a análise de DLS, foi possível observar que as partículas formadas possuem uma polidispersão extremamente baixa. Acredita-se que otimizando o processo de precipitação em não-solvente através de um gotejamento mais controlado da solução de pAmyl/acetona, com volumes de gota iguais, velocidade de gotejamento constante e agitação controlada podem ser obtidas nanopartículas monodispersas de pAmyl.

6.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Como não houve a formação de nanopartículas com as soluções IsoA e IsoB apenas as nanopartículas formadas a partir das soluções AceA e AceB foram analisadas no microscópio.

As Figuras 28 e 29 apresentam imagens obtidas pela análise de Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV – das nanopartículas formadas a partir das soluções AceA e AceB.

Por meio destas imagens é possível corroborar que houve a formação de nanopartículas para o sistema acetona/água AceA e também AceB.

É interessante destacar que as longas cadeias saturadas hidrofóbicas que foram introduzidas ao pAmyl através da reação de esterificação interagem entre si com a presença de água ficando no interior da nanopartícula enquanto que a parte hidrofílica do pAmyl (unidades de glicose não esterificadas) recobre a mesma. Como a análise de MEV é feita em meio seco, as amostras tiveram que ser secadas e assim a interação água-cadeias hidrofóbicas que formava as nanopartículas não existe mais. Em consequência disso, pode-se ver nas Figuras 28 e 29 que algumas nanopartículas começaram a se abrir. Essa é uma hipótese para explicar a cavidade aberta observada das nanopartículas.

Em água, as cadeias poliméricas se “encolhem” tentando expulsar a água das partes hidrofóbicas, formando uma estrutura termodinamicamente mais estável: uma esfera. Outra hipótese para explicar as cavidades destacadas e ao mesmo tempo a irregularidade das esferas, é que em meio aquoso, moléculas de água ficam situadas dentro da estrutura interagindo com as partes hidrofílicas do pAmyl-D. Quando a amostra é secada para análise de MEV, essa água é evaporada e as esferas ficam “murchas”.

Esses problemas de morfologia das nanopartículas podem ser resolvidos, com a proposta futura de adição de um agente reticulante, como por exemplo EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida) logo após a etapa de formação das nanopartículas com a precipitação em não-solvente.

Pode-se notar também que muitas nanopartículas estão deformadas pois estão em processo de gelatinização. Isso se deve ao fato de que a temperatura da amostra se eleva muito durante a análise de MEV, ultrapassando a temperatura de gelatinização do polímero.

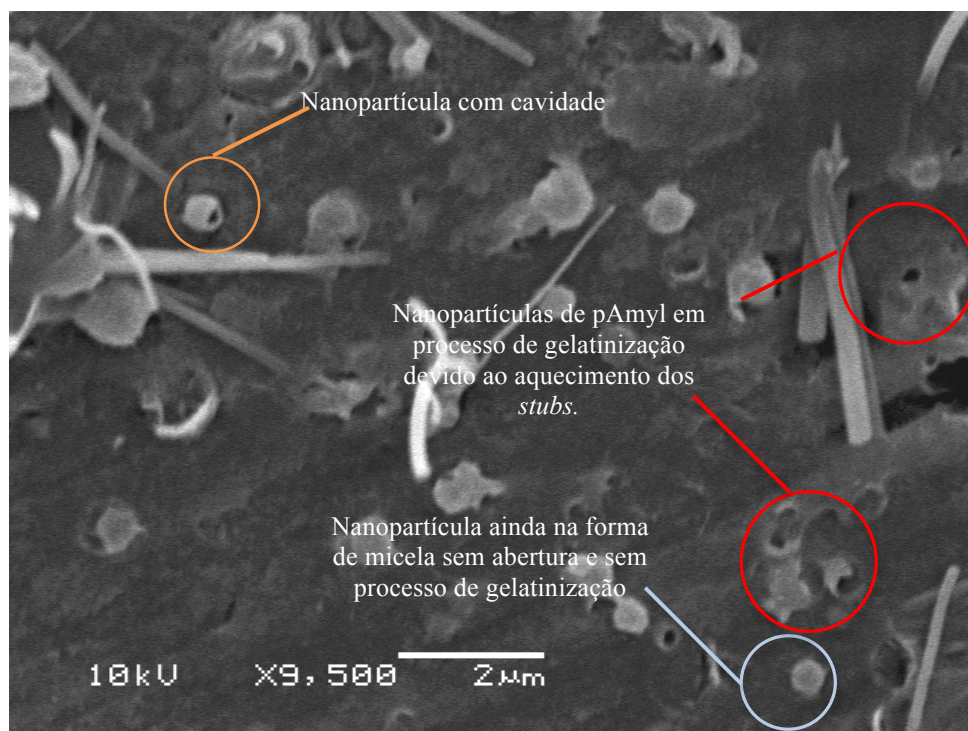


Figura 30. Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas preparadas a partir da solução AceA.



Figura 31. Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de pAmyl-D preparadas a partir da solução AceB.

Pode-se notar também uma concordância entre as análises de DLS e de MEV quanto ao diâmetro efetivo das nanopartículas, AceA tendo 385,91 nm e AceB 359,56 nm.

6.3 COMPARAÇÃO DE CUSTOS

Para serem analisados os custos de produção de ambas as partículas de látex e de pAmyl-D, foram calculadas as quantidades necessárias de reagentes para a preparação de 260g de nanopartículas, mostradas na Tabela 10, foram relacionados os equipamentos necessários, na Tabela 11 e a energia elétrica gasta em cada processo.

Tabela 7. Relação da quantidade de reagentes necessários para produção de 260 g de nanopartículas de latex.

Reagente	Quantidade necessária para produção de 260 g de nanopartículas de látex
Dodecilssulfato de sódio	39 g
Peroxodissulfato de potássio	52 g
Borax	5,2 g
Estireno	234 g
Estireno sulfonato de sódio	26 g

Tabela 8. Relação da quantidade de reagentes necessários para produção de 260 g de nanopartículas de pAmyl-D.

Reagente	Quantidade necessária para produção de 260 g de nanopartículas de pAmyl-D
pAmyl	200 g
Ácido esteárico	60 g
DMSO	4 L
DMAP	2 g
DCC	60 g

Para determinação do custo de cada reagente foi feita uma pesquisa e cotações de preços em diversos fabricantes e distribuidores. Os menores preços encontrados estão apresentados na Tabela 12 a seguir.

Tabela 9. Relação da pesquisa de preços dos reagentes necessários para ambos os processos.

Reagente	Preço (R\$)	Quantidade
Dodecilssulfato de sódio	16,40	100 g
Peroxodissulfato de sódio	218,00	100 g
Bórax	387,00	250 g
Estireno	186,00	1 kg
Estireno sulfonato de sódio	294,00	100 g
pAmyl	0,97	1 kg
Ácido esteárico	17,56	250 g
DMSO	55,00	1 L
DMAP	20,17	5 g
DCC	36,92	100 g

A partir dos valores da Tabela 12 foram calculados os custos de materiais reagentes para cada técnica. Não foi levado em conta o custo de água destilada nem de membrana para diálise, pois ambas as técnicas utilizam quantidades semelhantes. Os resultados dos cálculos estão representados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 10. Relação de custos para preparação de 260 g de nanopartículas de látex.

Reagente	Preço (R\$) para produção de 260 g de nanopartículas de látex
Dodecilssulfato de sódio	6,39
Peroxodissulfato de potássio	113,36
Borax	8,05

Estireno	43,52
Estireno sulfonato de sódio	76,44
TOTAL	R\$ 247,76

Tabela 11. Relação de custos para preparação de 260 g de nanopartículas de pAmyl-D.

Reagente	Preço (BRL) para produção de 260 g de nanopartículas de pAmyl-D
pAmyl	0,20
Ácido esteárico	4,21
DMSO	220,00
DMAP	8,07
DCC	22,15
TOTAL	R\$ 254,63

A relação de equipamentos necessários para cada tipo de processo estão descritos na Tabela 15, juntamente com o menor preço encontrado na pesquisa de cada equipamento.

Tabela 12. Relação e custo de equipamentos necessários para produção de nanopartículas de ambos os processos.

LÁTEX		pAmyl-D	
Equipamentos	Preço (R\$)	Equipamentos	Preço (R\$)
Agitador magnético com aquecimento (capacidade 5L)	R\$ 1067,58	Agitador magnético sem aquecimento (capacidade 5L)	R\$ 409,86
		Liofilizador	R\$ 15.000,00
TOTAL:	R\$ 1067,58	TOTAL:	R\$ 15.409,86

Considerando-se que em média o custo de cada kW.h custa aproximadamente R\$ 0,20, foi calculado o gasto de energia elétrica para cada equipamento elétrico utilizado na produção das nanopartículas dos dois processos.

Tabela 13. Relação de cada equipamento utilizado na produção das nanopartículas com sua potência, tempo de uso, gasto em energia elétrica e custo da mesma.

Equipamento	Potência	Tempo de uso	Energia elétrica	Custo
Agitador magnético com aquecimento	500 W	24 h	12 kW.h	R\$ 2,40
Agitador magnético sem aquecimento	25 W	48 h	1,2 kW.h	R\$ 0,24
Liofilizador	600 W	10 h	6 kW.h	R\$ 1,20

Considerando-se que a capacidade dos agitadores é de 5L, e que nesse volume é possível a produção de aproximadamente os 260 g de nanopartículas, o valor de energia elétrica gasta para a produção de cada 260 g de nanopartículas de látex é de R\$ 2,40.

A capacidade de um liofilizador é de suportar oito recipientes de no máximo 1000 mL. Para não sobrecarregar o equipamento e gerar supostos gastos posteriores, considera-se que o liofilizador trabalhe com metade de sua capacidade, ou seja, 4L, totalizando assim aproximadamente os 260 g de nanopartículas de pAMyl-D. Portanto, somando-se os gastos energéticos do agitador e do liofilizador, o custo para produção de cada 260 g de nanopartículas é de R\$ 0,84 (R\$ 0,24 + R\$ 0,60).

Para analisar as vantagens econômicas dos dois processos, deve-se separar o custo total em: custo fixo, ou seja, custo de equipamentos e instalações, e custo variável, isto é, o custo das matérias primas e energia elétrica que dependem do nível de produção e da demanda.

Se for analisado apenas o custo total, o processo mais vantajoso economicamente é o da produção das nanopartículas de látex, pois na produção das nanopartículas de pAMyl-D há um gasto relativamente grande ao se adquirir um dos equipamentos, o liofilizador.

Entretanto, no momento em que já foram estabelecidas as compras e instalações dos equipamentos de custo fixo, o custo variável dos dois processos são praticamente equivalentes. Isso é uma grande vantagem, pois toda tecnologia desenvolvida hoje em dia

voltada para o cunho ambiental, carrega um alto custo fixo e ao mesmo tempo um alto custo variável, não instigando a vontade dos investidores para a instalação dessas novas tecnologias.

A produção das nanopartículas de pAmyl-D, no entanto, carrega um custo fixo relativamente alto, mas um custo variável extremamente baixo, podendo assim ser interessante ao ver de investidores pois, além de continuar com os mesmos gastos variáveis, apela para a tecnologia sustentável, biodegradável e de fontes alternativas.

6.4 PROPOSTAS FUTURAS

6.4.1 Adição de um agente reticulante

Como discutido previamente, a cavidade das partículas observada pela análise de MEV podem ter sido formadas durante a precipitação das nanopartículas em não-solvente (uma morfologia própria das condições reacionais) ou simplesmente uma abertura das mesmas devido a ausência de água na hora da análise.

Ambas hipóteses do problema podem ser resolvidas adicionando-se algum agente reticulante sob a suspensão de nanopartículas recém formadas. Essa adição promoveria uma reticulação do polímero na superfície da nanoesfera, erradicando o problema da cavidade e ao mesmo tempo erradicando o outro problema que ocorre quando a água é expulsa por secagem - as nanoesferas murcham.

6.4.2 Ultracentrifugação

Para garantir ainda mais a monodispersidade das nanopartículas, além de se otimizar o processo, pode-se ultracentrifugar as suspensões de nanopartículas e dividi-las em diversas alíquotas de diâmetros idênticos cada uma.

Isso é possível pois moléculas e partículas de diferentes massas, ou diferentes tamanhos e formas, em geral, movem com diferentes velocidades em um dado campo centrifugal, isto é, cada partícula ou molécula de um determinado tamanho e massa terá coeficiente de sedimentação diferente das outras.

6.4.3 Estudo da possibilidade de uso como nanocarreador de fármacos

Polissacarídeos anfífilos tem encontrado um a gama grande em aplicações na ciência de colóides, tecnologia ambiental, e engenharias de biotecnologia e biomédicas. Particularmente, eles vem se tornando o foco de muitos pesquisadores pela sua capacidade de formar auto-agregados em soluções aquosas com fim de desenvolver-se carreadores de fármacos eficazes.

Nanocarreadores micelares podem proteger o fármaco contra degradação, controlar a liberação do mesmo, e promover uma boa estabilidade coloidal.

Muitos trabalhos científicos estão envolvendo nanocarreadores de fármacos formados por nanopartículas de amilopectina derivatizada de maneira a torná-la hidrofóbica, principalmente com reação com PLA -poli(ácido láctico). Portanto, uma outra proposta futura seria estudar as propriedades do pAmyl-D como um nanocarreador de fármaco, devido a sua fração hidrofóbica e total compatibilidade biológica.

6.4.3 Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do pAmyl-D

Nos últimos quinze anos, muitos artigos científicos tem sido publicados descrevendo a modificação de amido para torná-lo em um material termoplástico. O amido em si pode ser plastificado com diferentes compostos orgânicos de baixa massa molar para produzir, por exemplo filmes, espumas e peças plásticas. A vantagem do uso de amido nativo para produção de material termoplástico é, obviamente, que esse é biodegradável e é extremamente barato. Mas comparado com polímeros sintéticos, o amido frequentemente demonstra pobres propriedades mecânicas. As principais razões que causam essas pobres propriedades são a sua natural hidrofobicidade e portanto relativamente grande absorvedor de água, assim como a fragilidade do material resultante.

Modificações químicas são necessárias para melhorar significativamente as propriedades mecânicas. A acetilação de amido resulta em boas propriedades termoplásticas de processamento, melhora as propriedades mecânicas e aumenta a hidrofobicidade.

Uma das propostas futuras, é um estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero derivatizado obtido nesse projeto tecnológico, o pAmyl-D, assim como o estudo das propriedades mecânicas de polímeros de amilopectina derivatizados com diferentes ácidos orgânicos com diferentes graus de substituição, utilizando-se a mesma rota sintética proposta nesse projeto.

6.4.4 Estudo de novas morfologias com graus de substituição da reação de esterificação diferentes e ácidos graxos diferentes

Outra proposta para o futuro, é a de um estudo abrangendo a influência na morfologia das nanopartículas quando são variados o grau de substituição da reação de graftização da amilopectina e o tamanho da cadeia do ácido carboxílico substituído. Assim como um estudo da influência da velocidade de agitação, da temperatura e pressão no processo de precipitação das nanopartículas.

7. CONCLUSÕES

Neste projeto, foi obtida com sucesso a derivatização do polímero de amilopectina através de uma reação de esterificação do mesmo. Utilizando, então de técnicas de produção de nanopartículas, foi concluído que através do processo de precipitação em não-solvente foi possível obter as nanopartículas com polidispersão baixa do polímero resultante da reação de derivatização utilizando-se o sistema acetona/água como solvente/não-solvente.

O processo ainda pode ser otimizado, principalmente na parte de custos através de um estudo mais detalhado das condições reacionais da esterificação revendo-se as quantidades dos reagentes mais custosos e determinação do menor tempo de reação. Pode-se concluir que a proposta de substituição das partículas padrão de látex pelas de pAmyl-D é válida e pode ainda ser um processo muito mais barato, após ser feita a otimização da técnica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ENGLAND, J. M., S.M. Lewis, R.M Rowan, R. Thom. Surrogate materials for calibration and control: The use of latex particles as calibrants for red cell volume measurement. *Clin Lab Hematol*, n. 12, p. 55-63, 1990.
- [2] KARAMATA, D., Polystyrene in electron microscopy. *J. Ultrastructure Research*, n.35, p. 201-209, 1970.
- [3] RIDEAL, G.R., The development of new reference standards for size instrument calibration. Brighton, Inglaterra. IChemE, 1998.
- [4] CURVELO, A.A.S.; GANDINI, A.; RÓZ, A.L. Da. Preparation and characterization of cross-linked starch polyurethanes. **Carbohydrate Polymers**. São Paulo. Fevereiro de 2009.
- [5] ATWELL, W. A.; HOSENEY, R. C. Debranching of wheat amylopectin. **Cereal Chem.** 57:12, 1980.
- [6] GREEN, Mark M. Which starch fraction is water-soluble, amylose or amylopectin?. **Journal of Chemical Education**. P. 52, 11, 729-730, Novembro, 1975.
- [7] KARLSSON, M. E.; LEEMAN, A. M. Some physical nutritional characteristics of genetically modified potatoes varying in amylose/amylopectin ratios. **Food Chemistry**, n. 100, p. 136-1476, 2007.
- [8] Contributions of Roy L. Whistler to carbohydrate polymer science. **Carbohydrate Polymers**, n. 83, p. 2022-2026, 2011.
- [9] GRECO, T.; LEHMANN, A.; VOLKERT, B. A comparison of different synthesis routes for starch acetates and the resulting mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, n. 79, p. 571-577, Alemanha, 2010.
- [10] NEUFELD, R.; REIS, C. P.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, n. 2, p. 8-21, 2006.
- [11] MALPANI, A. S. Promising novel approaches for oral delivery of poorly soluble drugs. **Pharmainfo**, Índia, Vol. 7, Issue 4, 2009.
- [12] LI, Q.; LIU, C.; ZHAO, Y.; WANG, Y. Preparation, characterization and targeting of micronized 10-hydroxycamptothecin-loaded folate-conjugated human serum albumin nanoparticles to cancer cells. **Int J Nanomedicine**, vol. 6, p. 397-405, 1990.
- [13] RIDEAL, G.R.; DODDS, J. The development of particle size reference standards. Inglaterra, Apresentado no Congresso Mundias de Tecnologia em Partículas, 1998.

[14] Production of monodisperse latex particles. **Lecture series: Nanoparticle Technology**. Aula ministrada na Otto von Guericke University Magdeburg, Alemanha, 2008.

[15] LORCA, B. S. S. Nanoencapsulação de óleo de andiroba via polimerização dem miniemulsão. Universidade Federal do Rio de Janeiro, fevereiro, 2009.

[16] CLAYDEN, Jonathan; GREEVES, Nick; WARREN, Stuart; WOTHERS, Peter - **Organic chemistry** - Editora Oxford University Press (ISBN: 0198503466), 2002.

[17] Hipertensão é principal causa de diálise - **Folha de S.Paulo**, 10 de março de 2009.

[18] Harris, Tom. "How Freeze-Drying Works" , Agosto de 2002. HowStuffWorks.com. <<http://science.howstuffworks.com/innovation/edible-innovations/freeze-drying.htm>> Acessado em 2 November 2011.

[19] SKOOG, N.O.V., **Princípios de Análise Instrumental**. 6. Ed. Belmont: THOMPSON BROOKS, 2006.

[20] 16. Pereira, F.V. *Comportamento Mesomorfico, Estrutura e Ordenação de Cristais Líquidos Poliméricos em Massa e em Solução: Um Estudo Através de Espalhamento de Luz e Raios-X*. Tese de Doutorado. Porto Alegre: UFRGS, **2004**.

[21] Chu, B. *Laser Light Scattering, Basic Principles and Practice*. San Diego: Academic Press, **1991**.

[22] Silva, P. A.; Nanocompósitos de borrachas termoplásticas do tipo poli(estireno- b-butadieno-b-estireo) - SBS e poli(estireno-butadieno) - SBR, Dissertação de Mestrado, UFRGS, 2007.