

Universidade do Minho  
Escola de Engenharia

Joana Filipa Barros Braz Microcápsulas Magnéticas de Poliamida 6 para Imobilização Proteica

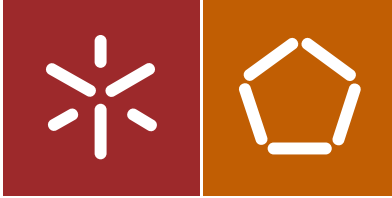
Joana Filipa Barros Braz

Microcápsulas Magnéticas de Poliamida 6  
para Imobilização Proteica

UMinho | 2016

abril de 2016





Universidade do Minho  
Escola de Engenharia

Joana Filipa Barros Braz

Microcápsulas Magnéticas de Poliamida 6  
para Imobilização Proteica

Dissertação de Mestrado  
Ciclo de Estudos Integrados Conducentes ao  
Grau de Mestre em Engenharia de Polímeros

Trabalho efetuado sob a orientação de  
Professor Doutor Zlatan Denchev  
Doutora Nadya Dencheva

## DECLARAÇÃO

Nome: Joana Filipa Barros Braz

Endereço eletrónico: braz.joana@gmail.com

Telemóvel: 914474630

Número do Bilhete de Identidade: 13631923

Título da dissertação:

Microcápsulas Magnéticas de Poliamida 6 para Imobilização Proteica

Orientador(es):

Professor Doutor Zlatan Denchev

Doutora Nadya Dencheva

Ano de conclusão: 2016

Designação do Mestrado:

Mestrado Integrado em Engenharia de Polímeros

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

# Agradecimentos

A conclusão desta dissertação de Mestrado não seria possível sem a orientação, apoio e motivação de diversas pessoas. A elas gostaria de expressar-lhes o meu profundo agradecimento.

Em primeiro lugar ao meu orientador, Professor Doutor Zlatan Denchev, por proporcionar a realização deste projeto de investigação e pela confiança depositada no meu trabalho. A sua disponibilidade permanente, empenho, ensinamentos transmitidos e amizade foram fundamentais.

À minha Co-Orientadora, Doutora Nadya Dencheva, manifesto o meu reconhecimento pela arte de ensinar as melhores técnicas e práticas laboratoriais, a sua perseverança incansável é deveras inspiradora e estimulante. Agradeço ainda a simpatia, ajuda e sobretudo a paciência demonstrada.

Ao Engenheiro Maurício Malheiro sempre paciente, diligente e disponível para garantir a operacionalidade dos diversos equipamentos usados.

Quero também agradecer aos meus amigos pelo companheirismo e amizade demonstrada. Em particular à Joana Silva com quem partilhei momentos memoráveis em Erasmus, pelas horas despendidas comigo e pelos momentos de fuga à falta de inspiração.

Uma menção especial ao Paulo Alves por tolerar as minhas frustrações e me encorajar a desafiar as dificuldades encontradas, estando sempre a meu lado disponível com um sorriso no rosto.

Por fim, mas não menos importante, não posso esquecer o afeto e apoio incondicional da minha família, é com enorme orgulho que posso afirmar que tenho os melhores pais do mundo. Um profundo e sincero obrigado por apoiarem todas as minhas decisões, as boas e as menos acertadas, e proporcionarem a realização deste curso, que foi sem dúvida uma experiência inesquecível e enriquecedora.



## Resumo

A presente dissertação de mestrado apresenta um método de produção de microcápsulas de poliamida 6, vazias e contendo nos seus núcleos cargas úteis magnéticas, que permitam a imobilização de proteínas.

As microcápsulas foram sintetizadas por polimerização aniônica da  $\epsilon$ -caprolactama em solução, na presença das partículas de ferro e óxido de ferro em diferentes percentagens. Através deste processo, obtiveram-se microestruturas altamente porosas. Sobre elas, foram enxertadas ramificações de poli(ácido acrílico) (PAA) por polimerização radicalar, introduzindo desta forma mais grupos carboxílicos na sua estrutura. Seguiu-se a imobilização da proteína albumina de soro bovino (BSA) em todas as microcápsulas, referências e funcionalizadas, com e sem a presença de um composto de carbodiimida como ativador.

Todos os materiais obtidos foram caracterizados morfologicamente através da microscopia ótica de campo claro e microscopia eletrônica de varrimento, e, termicamente através de calorimetria diferencial de varrimento e termogravimetria.

Nas microcápsulas funcionalizadas, com PAA, foi investigada a quantidade de grupos carboxílicos incorporados por titulação potenciométrica e espectroscopia eletrônica de transformada de Fourier, apresentando em ambos os estudos alterações significativas no teor destes grupos.

A imobilização da proteína BSA nas microcápsulas, referências e funcionalizadas, foi averiguado por espectroscopia UV-visível. A percentagem de proteína imobilizada nas microcápsulas atinge os 80%, sendo avaliada segundo o efeito: das partículas magnéticas e suas percentagens, da funcionalização, da presença de ativador e do tempo de imobilização.

Adicionalmente, o enxerto de ramificações de PAA nas microcápsulas possibilitou o seu comportamento inteligente, apresentando suscetibilidade ao pH do meio que os envolve. O estudo de espectroscopia UV-visível mostrou que de acordo com o pH do meio, o PAA altera a conformação das suas macromoléculas abrindo ou fechando os poros das microcápsulas, e, conseqüentemente libertando ou retendo o seu conteúdo.

Os resultados obtidos nesta tese permitem concluir que as novas microcápsulas magnéticas e funcionalizadas podem ser potencialmente úteis numa série de aplicações no ramo da biomedicina e biotecnologia.





# Abstract

This master's dissertation presents a method to produce polyamide 6 microcapsules, empty and containing in their cores magnetic payloads, that allow the immobilization of proteins.

The microcapsules were synthesized by suspension anionic polymerization of  $\epsilon$ -caprolactam, carried out in the presence of iron and iron oxide particles in different percentages. Through this process, highly porous microstructures were obtained. On top of the microcapsules branches of polyacrylic acid (PAA) were grafted by radical polymerization, thereby introducing more carboxyl groups in its structure. This was followed by bovine serum albumin (BSA) immobilization over all microcapsules, both synthesized and functionalized, with and without an addition of a carbodiimide compound as an activator.

All the materials obtained were characterized morphologically by optical microscopy and scanning electron microscopy, and thermally analysed by differential scanning calorimetry and thermogravimetry.

In the functionalized microcapsules, containing PAA, the amount of carboxyl groups incorporated was determined by potentiometric titration and Fourier transform infrared spectroscopy, showing by both methods significant changes in the carboxylic groups content.

The BSA immobilization upon the microcapsules, synthesized and functionalized, was examined by UV-visible spectroscopy. The percentage of protein immobilized in the microcapsules reaches 80%, being evaluated as a function of the following parameters: magnetic particles type and its percentage, functionalization, the presence of an activator and immobilization time.

It was shown that, the grafting of PAA allowed the microcapsules to have stimuli responsive behaviour, showing susceptibility to pH of the environment surrounding them. The UV-visible spectroscopy study showed that according to the medium pH, the PAA alters the conformation of their macromolecules leading to opening or closing of the microcapsules pores, thereby releasing or retaining their contents.

The initial results obtained in this thesis allowed the conclusion that the new magnetic and COOH-functionalized microcapsules could be potentially useful in a number of applications in medicine and biotechnology.



# Índice

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>3</b>
1.1	MICROENCAPSULAÇÃO	3
1.2	MICROCÁPSULAS DE POLIAMIDA	4
1.3	POLIMERIZAÇÃO ANIÓNICA ATIVADA NA PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS DE PA6	6
1.4	PROTEÍNAS	8
1.5	IMOBILIZAÇÃO PROTEICA	10
1.6	MÉTODOS DE CONJUGAÇÃO DE PROTEÍNA-POLÍMERO	13
1.7	APLICAÇÕES DA CONJUGAÇÃO PROTEÍNA-POLÍMERO	17
1.7.1	<i>Suscetibilidade a Estímulos Externos</i>	17
1.7.2	<i>Transporte de Fármacos</i>	17
1.7.3	<i>Outras aplicações</i>	18
1.8	CONJUGADOS SUSCETÍVEIS AO PH	19
1.9	OBJETIVOS	21
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>27</b>
2.1	SÍNTESE DAS MICROCÁPSULAS DE APA6 E APA6/MAGNÉTICA	27
2.1.1	<i>Materiais</i>	27
2.1.2	<i>Procedimento experimental</i>	28
2.1.3	<i>Designação das amostras referência</i>	29
2.2	FUNCIONALIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE APA6 E APA6/MAGNÉTICA	30
2.2.1	<i>Materiais</i>	30
2.2.2	<i>Procedimento experimental</i>	30
2.2.3	<i>Designação das amostras funcionalizadas</i>	31
2.3	IMOBILIZAÇÃO DE BSA NAS MICROCÁPSULAS	31
2.3.1	<i>Materiais</i>	32
2.3.2	<i>Procedimento experimental</i>	32
2.3.3	<i>Designação das amostras com imobilização proteina</i>	33
2.4	SUSCETIBILIDADE AO PH	33
2.4.1	<i>Materiais</i>	34
2.4.2	<i>Procedimento experimental</i>	34
2.5	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	34

2.5.1	<i>Microscopia ótica de campo claro</i> .....	34
2.5.2	<i>Microscopia eletrônica de varrimento</i> .....	35
2.5.3	<i>Calorimetria diferencial de varrimento</i> .....	36
2.5.4	<i>Análise Termogravimétrica</i> .....	37
2.5.5	<i>Espetroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier</i> .....	37
2.5.6	<i>Titulação Potenciométrica</i> .....	38
2.5.7	<i>Espetroscopia de UV-visível</i> .....	39
<b>3</b>	<b>APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
3.1	MICROCÁPSULAS REFERÊNCIA.....	45
3.1.1	<i>Resultados da síntese de microcápsulas de APA6 e APA6/magnética</i> .....	45
3.1.2	<i>Microscopia ótica de campo claro</i> .....	46
3.1.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varrimento</i> .....	50
3.1.4	<i>Calorimetria diferencial de varrimento</i> .....	54
3.1.5	<i>Análise termogravimétrica</i> .....	60
3.3	MICROCÁPSULAS FUNCIONALIZADAS .....	62
3.3.1	<i>Microscopia ótica de campo claro</i> .....	62
3.3.2	<i>Microscopia eletrônica de varrimento</i> .....	66
3.3.3	<i>Espetroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier</i> .....	67
3.3.4	<i>Titulação potenciométrica</i> .....	70
3.3.5	<i>Calorimetria Diferencial de Varrimento</i> .....	71
3.3.6	<i>Análise Termogravimétrica</i> .....	76
3.4	MICROCÁPSULAS COM BSA IMOBILIZADA.....	78
3.4.1	<i>Microscopia ótica de campo claro</i> .....	78
3.4.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varrimento</i> .....	80
3.4.3	<i>Porcentagem de imobilização de BSA</i> .....	83
3.4.4	<i>Espetroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier</i> .....	86
3.4.5	<i>Calorimetria Diferencial de Varrimento</i> .....	89
3.4.6	<i>Análise termogravimétrica</i> .....	96
3.5	SUSCETIBILIDADE AO PH .....	99
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>105</b>
<b>5</b>	<b>PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>111</b>

6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	113
7	ANEXOS .....	126



## Listas de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

AA	Ácido Acrílico
AAROP	Polimerização aniônica ativada por abertura de ciclo
APA6	Poliâmida 6 aniônica
ATC	Compensador automático de temperatura
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Albumina de Soro Bovino
BPO	Peróxido de Benzoila
CDI	Carbodiimida
COOH	Grupo funcional carboxílico
DCE	Diâmetro do Circulo Equivalente
DEP	Departamento de Engenharia de Polímeros
DL	Dilactamato
DSC	Calorimetria Diferencial de Varrimento
EDAX	Microanálise por espectroscopia de dispersão de energia de raios X
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
Fe	Ferro
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Óxido de Ferro
FTIR	Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier
HSA	Albumina de Soro Humano
IC	Imobilização Com Ativador
IS	Imobilização Sem Ativador
IPC	Instituto de Polímeros e Compósitos
MCs	Microcápsulas
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico
NaOH	Hidróxido de sódio

NH <sub>2</sub>	Grupo funcional amina
PA	Poliamida
PAA	Poli(ácido acrílico)
PAA-G	Enxerto de ramificações de poli(ácido acrílico)
PAMC	Microcápsulas de Poliamida 6
PA6	Poliamida 6
PEG	Poli(etileno)glicol
pKa	Constante de dissociação
SEM	Microscopia Eletrônica de Varrimento
TGA	Análise Termogravimétrica
UV-VIS	Espetroscopia UV-Visível
VB <sub>12</sub>	Vitamina B <sub>12</sub>
ε-CL	ε-Caprolactama
$\chi_c$	Grau de cristalinidade
$\phi$	Esfericidade
$\alpha$ e $\gamma$	Formas cristalinas associadas ao polimorfismo da poliamida 6
$\Delta H_f$	Variação da entalpia de fusão
$\Delta H_f^0$	Variação da entalpia de fusão de uma amostra 100% cristalina
$\Delta H_c$	Variação da entalpia de cristalização
$\Delta H_{1+2}$	Variação da entalpia de fusão
$\Delta R$	Diferença entre resíduos
$R_{FD}$	Resíduo no final da degradação
$R_{r/f}$	Resíduo no final da degradação das microcápsulas referência ou funcionalizadas
$T_c$	Temperatura de cristalização
$T_f$	Temperatura de fusão
$T_g$	Temperatura de transição vítrea



$T_1$	Temperatura de descongelção da água nos poros superficiais
$T_2$	Temperatura de descongelção da água nos poros profundos
$T_{10\%}$	Temperatura onde se regista 10% de perda de massa por TGA
$T_{V\text{ máx.}}$	Temperatura em que a velocidade de degradação foi máxima
$V_{\text{máx.}}$	Velocidade de degradação máxima



# Índice de Figuras

Figura 1 – Constituição de uma microcápsula sem poros, e com poros superficiais. ....	3
Figura 2 - Mecanismo do período inicial da polimerização aniônica ativada por abertura de ciclo.7	
Figura 3 – Período de propagação do mecanismo de polimerização aniônica ativada por abertura de ciclo.....	7
Figura 4 – Estrutura geral dos aminoácidos.....	8
Figura 5 - Os quatro níveis estruturais das proteínas.....	9
Figura 6 - Vista frontal da estrutura de BSA.....	10
Figura 7 - Esquema da reação de reticulação com EDC. ....	16
Figura 8 - Da esquerda para a direita, comportamento das microcápsulas porosas com núcleo magnético perante o pH do meio, quando: $pH > pK_a$ ; $pH < pK_a$ .....	20
Figura 9 - Fluxograma cronológico das etapas desenvolvidas ao longo da dissertação.....	23
Figura 10 - Reação de síntese das microcápsulas de APA6 e APA6/magnética. ....	27
Figura 11 - Da esquerda para a direita: Montagem usada na síntese e funcionalização das microcápsulas; MCs vazias (cor branca), com incorporação de Fe (cor cinza) e com incorporação de $Fe_3O_4$ ; Reação das MCs com partículas magnéticas sob ação de um íman. ....	29
Figura 12 - Reação de polimerização radicalar nas microcápsulas de APA6 e APA6/magnética. ....	30
Figura 13 - Amostras imediatamente antes do ensaio de UV-VIS para a verificação da percentagem de imobilização de BSA nas microcápsulas em estudo.....	40
Figura 14 - Tubos de ensaio com os distintos tipos de microcápsulas mergulhadas na solução de $VB_{12}$ .....	41
Figura 15 - Imagem obtida por microscopia ótica de campo claro das microcápsulas referência de APA6 contendo partículas de ferro no seu interior. ....	47
Figura 16 - Histogramas de frequência do diâmetro do círculo equivalente das microcápsulas referência de APA6. ....	48

Figura 17 - histogramas de frequência da esfericidade das microcápsulas referência de APA6.	49
Figura 18 - Imagens SEM das partículas magnéticas, da esquerda para a direita, Fe e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .	51
Figura 19 - Imagens SEM das microcápsulas referência vazias de APA6 a várias ampliações.	51
Figura 20 - Imagens SEM das microcápsulas referência de APA6 com incorporação de 3% de Fe a várias ampliações.	52
Figura 21 - Imagens SEM microcápsulas referência de APA6 com incorporação de 3% de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> a várias ampliações.	53
Figura 22 - Gráfico EDAX sobre as partículas magnéticas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .	54
Figura 23 - Gráficos EDAX sobre dois pontos de uma microcápsulas de APA6 com Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> incorporado. Da esquerda para a direita: gráfico do ponto Z1 na superfície da microcápsula, gráfico do ponto Z2 no interior do poro.	54
Figura 24 - Curvas de DSC das microcápsulas referência de APA6 durante o primeiro e segundo aquecimento.	56
Figura 25 - Curvas de DSC das microcápsulas referência de APA6 durante o arrefecimento.	57
Figura 26 - Curvas DSC a temperaturas baixas realizado às microcápsulas referência de APA6. Da esquerda para a direita: curva ilustrativa dos picos em estudo e curvas obtidas nas microcápsulas.	59
Figura 27 - Curvas do TGA realizado às microcápsulas referência de APA6. Da esquerda para a direita: curvas integrais da degradação térmica e velocidade de degradação térmica correspondente.	61
Figura 28 - Histogramas de frequência do diâmetro do círculo equivalente das microcápsulas de APA6 funcionalizadas.	63
Figura 29 - Histogramas de frequência da esfericidade das microcápsulas de APA6 funcionalizadas.	64
Figura 30 - Imagens SEM das microcápsulas vazias funcionalizadas a várias ampliações.	66
Figura 31 - Imagens SEM das microcápsulas funcionalizadas com incorporação de 3% de Fe a várias ampliações.	67

Figura 32 - Imagem SEM das microcápsulas funcionalizadas com incorporação de 3% de $Fe_3O_4$ a várias ampliações. ....	67
Figura 33 - Espectros FTIR-ATR das microcápsulas vazias referência e funcionalizadas. ....	68
Figura 34 - Espectros FTIR-ATR de comparação entre as microcápsulas referência e as respectivas microcápsulas funcionalizadas. ....	69
Figura 35 - Curvas de DSC das microcápsulas funcionalizadas de APA6 durante o primeiro e segundo aquecimento. ....	72
Figura 36 - Curvas do DSC realizado às microcápsulas funcionalizadas de APA6 durante o arrefecimento. ....	74
Figura 37 - Curvas do DSC a temperaturas baixas realizado às microcápsulas de APA6 funcionalizadas. ....	75
Figura 38 - Curvas do TGA realizado às microcápsulas funcionalizadas de APA6. Da esquerda para a direita: curvas integrais da degradação térmica e curva de velocidade de degradação térmica correspondentes. ....	77
Figura 39 - Imagens SEM das microcápsulas vazias funcionalizadas, e com BSA imobilizada na presença de ativador, várias ampliações. ....	81
Figura 40 - Imagens SEM das microcápsulas com incorporação de 3% de Fe funcionalizadas e com BSA imobilizada com ativador, várias ampliações. ....	82
Figura 41 - Imagens SEM das microcápsulas com incorporação de 3% de $Fe_3O_4$ , funcionalizadas e com BSA imobilizada com ativador, várias ampliações. ....	82
Figura 42 - Imagens SEM das microcápsulas com incorporação de 3% de Fe, referência e com BSA imobilizada com ativador, várias ampliações. ....	83
Figura 43 - Imagens SEM das microcápsulas com incorporação de 3% de $Fe_3O_4$ referência e com BSA imobilizada com ativador, várias ampliações. ....	83
Figura 44 - Percentagem de imobilização de BSA entre 3h e 48h. A - Imobilização com ativador nas microcápsulas funcionalizadas; B - Imobilização com ativador nas microcápsulas referência; C - Imobilização sem ativador nas microcápsulas funcionalizadas; D - Imobilização sem ativador nas microcápsulas referência. ....	84

Figura 45 - Percentagem de imobilização da BSA, com (IC) e sem (IS) ativador, durante as três primeiras horas do processo. ....	85
Figura 46 - Espectros FTIR-ATR comparando as microcápsulas funcionalizadas, microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada com ativador, e a proteína BSA. ....	86
Figura 47 - Espectros FTIR-ATR comparando: microcápsulas funcionalizadas, microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada com (IC) e sem (IS) ativador, e a proteína BSA .....	87
Figura 48 - Espectros FTIR-ATR comparando: microcápsulas referência, microcápsulas referência e com BSA imobilizada com (IC) e sem (IS) ativador, e a proteína BSA. ....	89
Figura 49 - Curvas do DSC a temperaturas baixas realizado às microcápsulas referência e funcionalizadas, cuja imobilização ocorreu com (IC) e sem (IS) ativador.....	96
Figura 50 - Curvas do TGA realizado às microcápsulas referência e funcionalizadas, cuja imobilização ocorreu com (IC) e sem (IS) ativador. Comparação entre as curvas de degradação térmica e curvas de velocidade de degradação térmica correspondentes. ....	98
Figura 51 - Liberação da vitamina B <sub>12</sub> perante o meio com pH 2 e pH 7. ....	100

# Índice de Tabelas

Tabela 1 - Características dos peptídeos/proteínas e os polímeros sintéticos.....	12
Tabela 2 - Designação das amostras referência. ....	29
Tabela 3 - Designação das amostras obtidas por funcionalização. ....	31
Tabela 4 - Designação das amostras obtidas por imobilização com ou sem ativador presente. .	33
Tabela 5 - Rendimento das reações de síntese das microcápsulas de APA6 e percentagem esperada de incorporação magnética. ....	46
Tabela 6 - Valores médios do diâmetro do círculo equivalente e esfericidade das microcápsulas referência de APA6. ....	50
Tabela 7 - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas referência de APA6 - 1º e 2º Aquecimento. ....	55
Tabela 8 - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas referência de APA6 - arrefecimento. ....	57
Tabela 9 - Resultados numéricos do DSC a temperaturas baixas realizado às microcápsulas referência de APA6. ....	59
Tabela 10 - Resultados numéricos do TGA realizado às microcápsulas referência de APA6.....	61
Tabela 11 - Valores médios do diâmetro do círculo equivalente e esfericidade das microcápsulas de APA6 funcionalizadas. ....	65
Tabela 12 - Teor dos grupos COOH nas microcápsulas funcionalizadas de APA6. ....	70
Tabela 13 - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas funcionalizadas de APA6 - 1º e 2º aquecimento. ....	71
Tabela 14 - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas de APA6 - arrefecimento. ....	73
Tabela 15 - Resultados numéricos do DSC a baixas temperaturas realizado às microcápsulas funcionalizadas de APA6. ....	75

Tabela 16 - Resultados numéricos do TGA realizado às microcápsulas funcionalizadas de APA6. .....	76
Tabela 17 - Valores médios do diâmetro do círculo equivalente e esfericidade das microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada, com e sem ativador. ....	79
Tabela 18 - Valores médios do diâmetro do círculo equivalente e esfericidade das microcápsulas referência e com BSA imobilizada, com e sem ativador. ....	80
Tabela 19 - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada, com e sem ativador - 1 <sup>o</sup> e 2 <sup>o</sup> aquecimento.....	90
Tabela 20 - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada, com e sem ativador - arrefecimento. ....	90
Tabela 21 - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas referência e com BSA imobilizada, com e sem imobilizador - 1 <sup>o</sup> e 2 <sup>o</sup> aquecimento.....	91
Tabela 22 - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas referência e com BSA imobilizada, com e sem ativador - arrefecimento. ....	92
Tabela 23 - Resultados numéricos do DSC a temperaturas baixas realizado às microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada, com e sem ativador. ....	93
Tabela 24 - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas referência e com BSA imobilizada, com e sem ativador. ....	94
Tabela 25 - Resultados numéricos do TGA realizado às microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada, com (IC) e sem (IS) ativador. ....	96
Tabela 26 - Resultados numéricos do TGA realizado às microcápsulas referência e com BSA imobilizada, com (IC) e sem (IS) ativador.....	97



# Capítulo I

## Introdução



# 1 Introdução

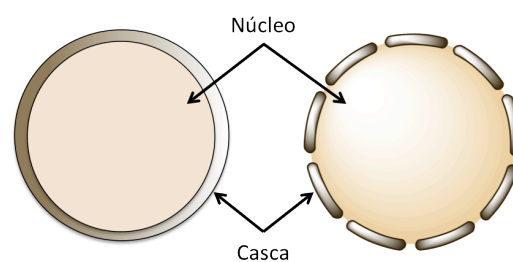
Durante décadas a comunidade de materiais tem-se esforçado para gerar materiais biomiméticos<sup>1</sup> para alcançar características vistas na natureza. As proteínas e os peptídeos são os blocos de construção da natureza, contudo alcançar e manter as suas propriedades, tais como o controlo da hierarquia estrutural e a atividade enzimática a longo termo, têm apresentado inúmeros desafios.

Recentes desenvolvimentos na química de polímeros, a respeito da sua modificação, e a compreensão das proteínas levaram ao surgimento de novas oportunidades. Teoriza-se que, em vez de imitar a natureza pode ser mais viável gerar materiais usando proteínas, desde que a sua estrutura e funcionalidade se mantenham sob condições não biológicas [1].

Como tal, os cientistas têm-se dedicado a produzir sistemas fechados, microcápsulas e microesferas, que possibilitam a imobilização de proteínas com inspiração na estrutura e função celular.

## 1.1 Microencapsulação

A microencapsulação é um processo onde minúsculas partículas de uma substância em estado sólido, líquido ou gasoso - designado núcleo - são envolvidas por uma película de revestimento, a casca, Figura 1.



**Figura 1** – Constituição de uma microcápsula sem poros, e com poros superficiais.

Esta tecnologia proporciona a combinação de propriedades de diferentes materiais, permitindo [2]:

<sup>1</sup> Os materiais biomiméticos são desenvolvidos usando a natureza como um exemplo e fonte de inspiração, imitando-a.

- melhorar o aspecto visual e o conceito de marketing;
- misturar compostos incompatíveis;
- evitar a degradação ou alteração do material encapsulado por contacto com agentes ambientais;
- proteger o utilizador durante a manipulação de produtos tóxicos ou inflamáveis;
- controlar a libertação de uma substância ativa ao longo do tempo e/ou quando exposta a um parâmetro externo pré-definido como a temperatura, UV e pH;
- possibilitar a imobilização de enzimas e microrganismos.

Esta tecnologia surgiu primordialmente em 1930, quando Green e Schleicher *et al.* [2] produziram tintas microencapsuladas para o fabrico de papel de impressão sem carbono. Desde então, e devido às suas vantagens inerentes, a microencapsulação difundiu-se rapidamente sendo aperfeiçoada e aplicada a diversas áreas industriais tais como a indústria têxtil, agrícola, indústria alimentar, e principalmente na indústria farmacêutica e cosmética [3].

Os procedimentos existentes para a produção de microcápsulas (MCs) são divididos em métodos físicos, métodos químicos ou métodos físico-químicos. As principais diferenças entre eles recaem nas propriedades do material a encapsular e nos requisitos do produto final.

A escolha adequada do material usado como casca é fulcral na estabilidade e eficiência das microcápsulas. O material ideal deve ser capaz de formar um filme coesivo que mantenha e proteja o material do núcleo, deve ser ainda quimicamente compatível e não reativo com o núcleo. Este pode ser selecionado a partir de uma grande variedade de materiais poliméricos sintéticos e naturais que inclui o quitosano, celulose, proteínas, entre outros.

## 1.2 Microcápsulas de poliamida

A poliamida (PA) é um polímero semi-cristalino composto por grupos funcionais terminais amina ( $-\text{NH}_2$ ) e carboxílicos ( $-\text{COOH}$ ), e grupos amida ( $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ ) presentes na cadeia. Os grupos amida são as unidades principais de muitos polímeros biológicos, como é o caso dos polipeptídeos.

Existe uma grande variedade de poliamidas no mercado, sendo que geralmente estas apresentam na sua designação um número correspondente à quantidade de átomos de carbono, que separam a unidade repetitiva do grupo funcional amida. As PA6 e 6.6 são as mais usadas a nível global, representando uma grande porção dos polímeros de engenharia [4].

A primeira PA foi sintetizada pelo químico Wallace Hume Carothers, em 1935 na *DupoPont* [5] onde eram usadas como fibras sintéticas. No entanto, devido à versatilidade das suas propriedades e ao seu custo competitivo, o uso da PA rapidamente expandiu para várias indústrias tecnológicas.

O uso da PA como material de revestimento de microcápsulas apresenta uma série de vantagens: a sua produção pode ser feita diretamente em pó; possibilidade de obter estruturas porosas; e o custo acessível do monômero base, a caprolactama. Assim, a sua produção e aplicabilidade tem vindo a levantar algum interesse por parte dos investigadores.

Suteu *et al.* [6] produziram e caracterizaram pós de PA para a purificação de águas residuais, e Vasiliu-Oprea *et al.* [7] na produção de vernizes. Também na indústria de materiais foram investigadas MCs de PA como uma potencial aplicação em moldação por compressão por Ricco *et al.* [8], Barhoumi *et al.* [9] em moldação rotacional, e Shahzad *et al.* [10] em técnicas de prototipagem rápida como a sinterização seletiva a laser. Mathiowitz *et al.* [11][12][13][14] estudaram extensivamente o uso de MCs de PA para a libertação controlada do material encapsulado.

Porém, foi o trabalho de Dencheva *et al.* [15] que sobressaiu e inspirou a produção das MCs estudadas na presente dissertação. Os autores, produziram e estudaram microcápsulas sintetizadas por polimerização aniônica ativada da  $\epsilon$ -caprolactama ( $\epsilon$ -CL) em solução, na presença de diversos pós tais como alótropos de carbono<sup>2</sup>, nanoargilas e metais. Trata-se de um método inovador, desenvolvido por Dencheva *et al.* [16] no DEP/IPC e recentemente patenteado. Este permite a obtenção de microcápsulas com porosidade controlada de PA6 aniônica (APA6) com incorporação de pós.

Assim, nesta dissertação foram produzidas e investigadas microcápsulas de PA6 com núcleo magnético, e PA6 vazias que serviram como referência. As microcápsulas foram sintetizadas por polimerização aniônica ativada da  $\epsilon$ -CL em solução, com e sem a presença de pós magnéticos.

<sup>2</sup> Materiais à base de carbono cujas estruturas assumem configurações poliatômicas distintas. O número e a natureza das ligações ao átomo de carbono determinam a geometria e as propriedades dos vários alótropos.

### 1.3 Polimerização aniónica ativada na produção de microcápsulas de PA6

A PA6 pode ser obtida a partir de dois processos, a policondensação hidrolítica da  $\epsilon$ -caprolactama ou pela polimerização aniónica ativada da  $\epsilon$ -CL por abertura de ciclo (AAROP – *Activated Anionic Ring-Opening Polymerization*). Por sua vez, o mecanismo de AAROP pode ser realizado em solução [8] ou em massa [9] originando PA em pó.

A polimerização com solventes promove a obtenção de macromoléculas de cadeia regular, com menos ramificações e uma distribuição de pesos moleculares mais homogênea, com menor formação de subprodutos indesejados [7]. O uso de solvente associado a este método possibilita a agitação do meio reativo, e conseqüentemente a dispersão adequada das partículas magnéticas durante a polimerização.

A AAROP inicia quando o monómero reage com uma base forte, o iniciador, formando como espécies ativas os aniões de  $\epsilon$ -CL. Estes últimos reagem com a  $\epsilon$ -CL formando um dímero imida, que é a espécie necessária para o início da polimerização.

Esta polimerização é caracterizada por um período inicial de indução com taxa de reação baixa, à medida que a concentração do dímero aumenta gradualmente. Para que ocorra a polimerização é necessário o dímero, uma vez que a ligação amida do lactama não é suficientemente reativa [17]. O dímero imida atua como ativador da polimerização.

O processo de iniciação finaliza-se pela reação do ativador com o anião  $\epsilon$ -CL, que provoca uma troca rápida de prótons com o monómero. Esta reação é denominada por polimerização ativada devido ao acréscimo do dímero no início do processo. Assim, como não é necessário aguardar a formação do dímero, a polimerização é mais rápida quando comparada com o processo aniónico comum, Figura 2.

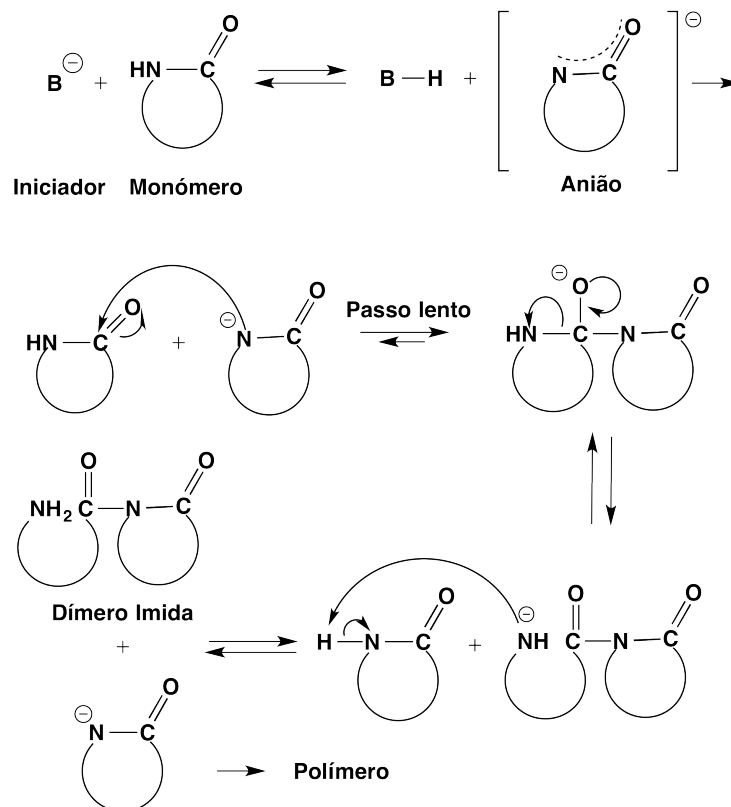


Figura 2 - Mecanismo do período inicial da polimerização aniônica ativada por abertura de ciclo.

O centro de propagação é a ligação C-N no ativador, Figura 3. O anião do monómero, frequentemente referido como monómero ativado, é adicionado à cadeia de propagação. A taxa de propagação depende da concentração do monómero ativado e do ativador, que consequentemente são definidos pela concentração de  $\epsilon$ -CL e do iniciador [7].

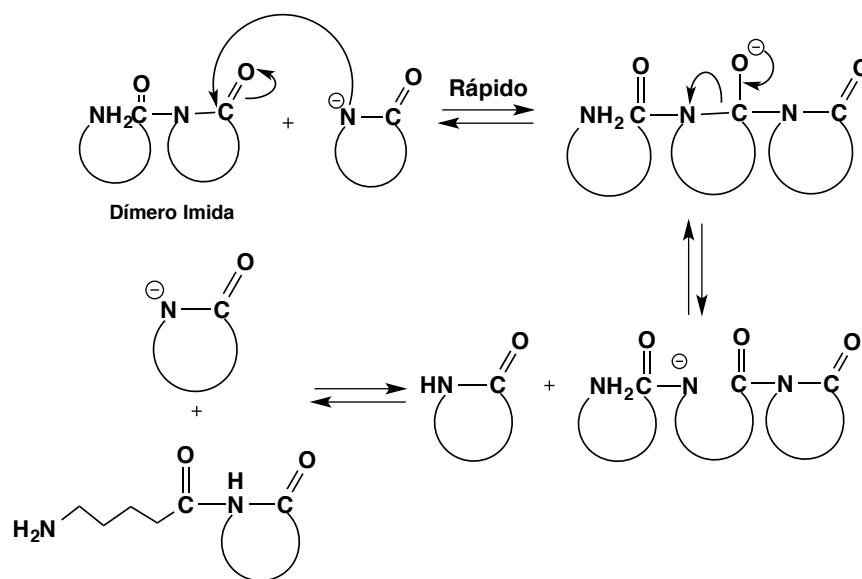


Figura 3 – Período de propagação do mecanismo de polimerização aniônica ativada por abertura de ciclo.

A polimerização termina quando o anião é inativado por alguma reação de terminação.

Segundo os princípios da cinética de polimerização, o grau de polimerização e a massa aumentam com o aumento da concentração do monómero e com a diminuição da porção do ativador. Contrariamente, com o aumento da concentração de ativador o tempo de polimerização diminui [17]. A distribuição de massas é, geralmente mais larga do que a distribuição mais provável uma vez que ocorrem ramificações nos estados mais tardios da reação.

Em suma, neste método de produção das MCs de APA6, o tipo de ativador altera quimicamente as cadeias poliméricas, assim como a forma de crescimento da macromolécula. As concentrações do iniciador e do ativador determinam a taxa de polimerização e, respetivamente, o número de cadeias em crescimento e a massa molecular [17].

## 1.4 Proteínas

A importância das proteínas é incontestável, sendo as moléculas orgânicas mais abundantes em todos os seres vivos, e assumindo enumeras funções fundamentais nos sistemas biológicos.

As proteínas são biopolímeros lineares compostas por monómeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Assim, os aminoácidos podem ser considerados os blocos de construção das proteínas. Cada aminoácido é composto por um grupo carboxílico (COOH), um grupo amina (NH<sub>2</sub>) ligado a um átomo de carbono α, e um grupo funcional (R), Figura 4.

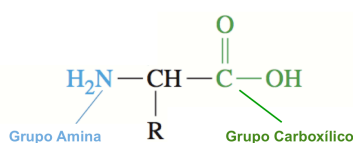


Figura 4 – Estrutura geral dos aminoácidos.

Os aminoácidos são diferenciados entre si pelo grupo R, existindo 20 na totalidade cuja combinação possibilita um grupo diverso de macromoléculas. Este rearranjo dita a dobragem da proteína e a sua forma única final. Uma vez que a proteína é capaz de reconhecer e se ligar a moléculas específicas, a sua forma correta é crítica para as funções finais (mecanismo chave-fechadura).

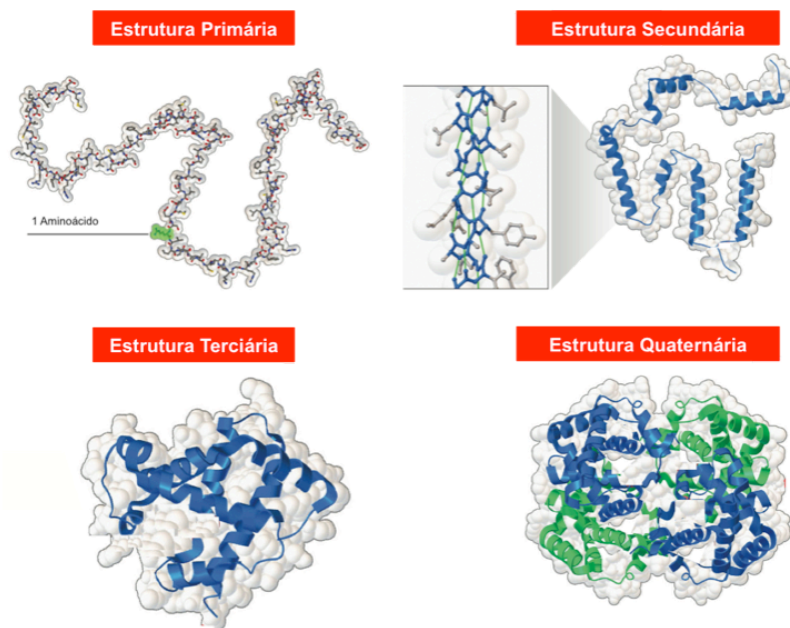


A estrutura das proteínas é bastante complexa requerendo o conhecimento dos vários níveis de organização. São quatro os níveis estruturais que podem ocorrer nas proteínas: estruturas primária, secundária, terciária e quaternária, Figura 5.

O número de aminoácidos, a espécie e a sequência linear presentes numa proteína é designada de estrutura primária, onde a cadeia de átomos é mantida por ligações covalentes.

Por sua vez, as cadeias de proteínas rearranjam-se entre si de forma a maximizar as ligações intra e intermoleculares, que são criadas por ligações tipo pontes de hidrogénio, formando uma estrutura secundária. Tais ligações entre os aminoácidos originam estruturas elementares nas proteínas, hélices alfa e folhas beta.

Uma estrutura terciária surge quando as cadeias de proteínas dobram, dando origem a uma forma globular compacta. Por fim, algumas proteínas podem ainda apresentar uma estrutura quaternária que associa duas ou mais cadeias de polipeptídeos que formam um complexo tridimensional, como é o exemplo da hemoglobina [9].



**Figura 5** - Os quatro níveis estruturais das proteínas. (adaptado de [18])

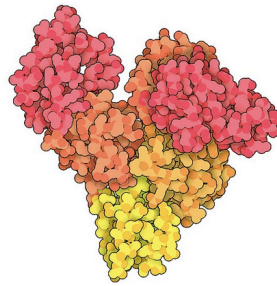
As funções das proteínas dependem diretamente da sua estrutura tridimensional. Como resultado dos diversos rearranjos dos aminoácidos, as proteínas possuem assim um grande espectro de propriedades estruturais e catalíticas. Esta versatilidade faz com que estes elementos sejam imprescindíveis nas estruturas e funções celulares, funções enzimáticas, na regulação metabólica, armazenamento, transporte e defesa.

### Proteína Albumina do Soro Bovino

As albuminas do soro são os principais constituintes de proteínas solúveis do sistema circulatório possuindo diversas funções fisiológicas [19]. Este grupo de proteínas é solúvel no plasma presente no sistema circulatório, sendo responsável pela manutenção do pH no sangue [20][21], transporte e depósito de substâncias endógenas<sup>3</sup> e exógenas<sup>4</sup> nos seres vivos [22][23].

Devido à sua estrutura homóloga com a albumina do soro humano (HSA), a albumina de soro bovino (BSA) é uma das proteínas mais amplamente estudadas. Conseqüentemente, a BSA é usada extensivamente como um modelo modular da proteína albumina possuindo alta purificação e estabilidade em reações bioquímicas [24].

BSA é composta por 604 aminoácidos com o peso molecular de 66462 g/mol [20], apresentando uma estrutura em forma de coração, Figura 6.



**Figura 6** - Vista frontal da estrutura de BSA [25].

Porém, com a variação do pH no meio envolvente ocorrem mudanças reversíveis na sua conformação secundária podendo exibir as formas: expandida até um pH 2.7, *fast* até ao pH 4.3, normal até ao pH 8, básica até ao pH 10 e a partir daqui envelhecida [26].

A BSA foi selecionada como o modelo de proteína para o presente estudo devido à sua biocompatibilidade e extensa utilização.

### **1.5 Imobilização proteica**

A imobilização de proteínas em geral, e enzimas em particular, têm vindo a ser amplamente estudada [27][28].

<sup>3</sup>Elementos químicos, reguladores de baixo peso molecular, biopolímeros de alto peso molecular que participam no sistema metabólico e tem função nitidamente fisiológica.

<sup>4</sup> Proteínas, gorduras, hidratos de carbono, vitaminas, entre outros que penetram no organismo pela ingestão de alimentos ou medicamentos.

O termo 'imobilização de enzimas' foi adotado em 1971 [29] na primeira conferência de engenharia enzimática. Desde então, a ligação de enzimas a sólidos tem rapidamente progredido de uma curiosidade laboratorial para uma área em expansão.

Este é um fenômeno onde as enzimas estão fisicamente confinadas num local ou localizadas em determinada região, porém retêm a sua atividade catalítica e possibilitam o seu uso repetidamente e de forma contínua [30].

Frequentemente a ligação de uma enzima a um sólido resulta num aumento da estabilidade da mesma. A imobilização enzimática pode ser vista como a disposição das enzimas num estado mais natural e estável, uma vez que na natureza grande parte das enzimas não funcionam em solução mas sim na interface ou dentro de um substrato sólido [31]. Quando a enzima é isolada e purificada, esta é removida do substrato onde está ligada podendo-a destabilizar. Assim, a ligação das enzimas realizada corretamente a uma superfície sólida pode imitar parte do ambiente onde estas são supostas atuarem [31].

A imobilização de enzimas ou proteínas a um substrato sólido, produz um conjugado com diversas características de interesse.

A escolha do substrato adequado à imobilização proteica afeta a viabilidade das aplicações industriais, sendo que este deve satisfazer alguns requisitos cruciais: não toxicidade, resistência física e térmica, biocompatibilidade, resistência a ataques microbianos, disponibilidade e baixo custo [32][33].

Os substratos para imobilização de proteínas podem ser divididos em duas classes principais, inorgânicos e orgânicos [34]. Os últimos podem ainda ser subdivididos em polímeros naturais e sintéticos [35]. Ambas as classes têm sido descritas como suportes eficazes para a imobilização proteica [34][36].

Na classe inorgânica estão abrangidos principalmente a sílica e materiais à base de óxido-metal. Já nos substratos orgânicos são incluídos sobretudo materiais polissacarídeos, polímeros acrílicos e vinílicos, e as poliamidas.

Relativamente aos substratos poliméricos, os conjugados de proteína-polímero são materiais híbridos que envolvem polipeptídeos biorgânicos naturais com segmentos poliméricos. Esta combinação sinérgica beneficia das vantagens de ambos os componentes e evita as desvantagens de cada um separadamente, tal como Klok *et al.* [37] apresentaram, Tabela 1, abrindo uma nova variedade de aplicações biológicas e não-biológicas.

**Tabela 1** - Características dos peptídeos/proteínas e os polímeros sintéticos <sup>a</sup>. (Adaptado de [37])

Peptídeos/Proteínas		Polímeros Sintéticos	
+	Formação de estruturas hierárquicas	-	Controlo limitado sobre a nanoestrutura
+	Reconhecimento e ligação	-	'Inatividade' biológica
-	Toxicidade	+	Biocompatibilidade
-	Imunogenicidade	+	Transporte passivo (efeito de permeabilidade e retenção - EPR)
-	Degradação Enzimática	+	Resistência à degradação enzimática

<sup>a</sup>As características são classificadas como um ponto forte (+), ou um ponto fraco (-). A atribuição específica de cada característica, depende da aplicação particular do material.

Complementarmente, os polímeros sintéticos exibem alta estabilidade térmica e química podendo ser sintetizados com massa molecular controlada e baixa dispersividade (distribuição estreita da massa molecular). Possibilitam ainda a incorporação de grupos funcionais, e podem ser idealizados para responderem a um dado estímulo biológico e não-biológico [38].

A PA é um suporte atrativo para a imobilização proteica, pois aliado à sua biocompatibilidade, esta possui similaridade química com as proteínas, não fosse a proteína uma poliamida natural. Ambas têm na sua composição os mesmos grupos funcionais, -NH<sub>2</sub> e -COOH, e amida (-NHCO-).

O uso da PA como substrato para a imobilização proteica tem sido estudado ao longo dos anos. Silva *et al.* [39] investigaram e desenvolveram fibras de PA 6.6 onde foi imobilizada lacase com retenção da proteína a 30% e rendimento da imobilização de 2%. Também Fatarella *et al.* [40] imobilizaram lacase em filmes e nanofibras de nylon 6. Os autores concluíram que a quantidade de enzima imobilizada foi de 59.4% e 71.0%, respetivamente. Nan *et al.* [41] utilizaram glicose oxidase imobilizada em rede de nylon para produzir um biossensor de glicose. Já Cai *et al.* [42] prepararam microesferas de PA6 com núcleo magnético para a imobilização proteica de BSA.

Também os suportes de polímeros magnéticos têm sido amplamente investigados para a imobilização de proteínas [43][44][45][46], salientando-se as microesferas de PA6 com incorporação de óxido de ferro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) que Cai *et al.* [42] desenvolveram. O ferro magnético só é adequado como suporte, quando envolvido com um material inerte. Além das características associadas aos materiais sintéticos, estes híbridos acrescentam ainda características supermagnéticas. Estes, perante um campo magnético, facilitam a sua recolha e permitem que

os conjugados sejam direcionados para um local específico. Quando o campo magnético é retirado os polímeros magnéticos não tem qualquer magnetismo residual [47].

A par com as propriedades da PA6, materiais nanoestruturados com capacidade para controlar o tamanho e a forma, como é o caso das microcápsulas, permitem uma melhor interação com a enzima, aumentam a eficácia da imobilização, assim como melhoram o armazenamento a longo termo e a estabilidade da enzima [48].

Contudo, até à data não foi possível encontrar literatura que suporte uma possível imobilização de proteínas em MCs de PA, com e sem núcleo magnético, sintetizadas por polimerização aniônica ativada.

No âmbito do presente estudo, o uso de MCs de APA6 com propriedades magnéticas como substrato da imobilização proteica, exhibe uma série de vantagens desejadas: elevada área superficial específica, fácil modificação das características superficiais, o potencial de trazer grupos funcionais específicos e suscetibilidade magnética.

## 1.6 Métodos de conjugação de proteína-polímero

Os conjugados de proteína-polímero podem ser produzidos por vários métodos, sendo que cada um tem as suas vantagens e desvantagens, Anexo 1, podendo ser divididos em dois tipos de abordagem, via ligação não-covalente e via ligação covalente.

Em conjugações usando ligações não covalentes, são aplicadas estratégias de *layer-by-layer* baseadas em interações electrostáticas, atrações hidrofóbicas ou bioafinidade altamente seletiva. No entanto, com esta abordagem não é possível controlar a orientação espacial das proteínas na superfície do substrato, o que pode resultar no decréscimo da atividade biológica aparente do conjugado proteína-polímero.

A segunda abordagem é baseada na ligação das proteínas ao substrato através de ligações covalentes. Estas ligações são normalmente formadas entre os grupos funcionais presentes na superfície do substrato e na proteína. A ligação covalente é uma forma eficaz de afixar irreversivelmente as proteínas ao suporte, uma vez que a ligação estabelecida é mais estável e reproduzível, sendo mais vantajosa quando comparada com os métodos usando ligação não-covalentes. Assim, este foi o método escolhido para produzir os conjugados proteína-polímero nesta presente dissertação.

A eficácia da conjugação depende de vários parâmetros tais como o número de biomoléculas ligadas ao substrato, o local e o tipo de grupos funcionais existentes quer nas biomoléculas quer no substrato, o tipo de ligante e o comprimento do ligante.

Têm sido descritas diversas abordagens no uso de ligações covalentes para formar a conjugação proteína-polímero [49][50], tais como: reações de adição-eliminação com amina-aldeído [51] e reações químicas entre carbodiimida e os grupos ácido carboxílico-amina [52], em que ambas geram conjugações não específicas do local. Sendo selecionada a última estratégia para a produção dos conjugados proteína-polímero.

Na revisão bibliográfica, a imobilização com base em ligações covalentes requer duas fases, a funcionalização e a ativação do substrato, que devem ser adequadamente concebidas de forma a obter uma maior estabilidade e atividade biológica da proteína.

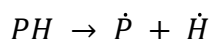
#### 1ª Fase: Funcionalização do substrato

A literatura mostra que para a imobilização de proteínas em substratos de PA6, é necessário introduzir grupos carboxílicos através da modificação química da superfície do substrato [39][42].

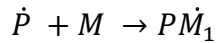
A modificação de polímeros tem vindo a receber uma enorme atenção. De todos os métodos utilizados, a copolimerização de enxerto apresenta-se como um dos mais promissores, conferindo uma grande variedade de grupos funcionais a um dado polímero. Esta pode ser conseguida usando técnicas que incluem o enxerto enzimático, plasma induzido, radiação, tratamento químico, foto irradiação, entre outros.

No presente estudo, foram enxertados ramos de ácido acrílico (AA) na superfície das microcápsulas poliméricas. O enxerto de AA trata-se de uma reação de polimerização radicalar, onde ocorre a transferência de radicais livres.

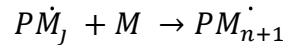
A reação é iniciada formando um radical livre à superfície do polímero (P), através da extração (libertação) do átomo de hidrogénio (H), Equação 1.



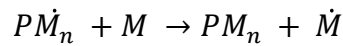
Na ausência de oxigénio, o radical livre é altamente reativo com as unidades do monómero (M) de AA, Equação 2 (Logo a reação tem de ocorrer em ambiente ausente de oxigénio).



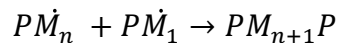
A reação é continuada através da polimerização de transferência da cadeia, onde o radical livre é propagado ao longo das unidades do monómero. Por sua vez, estas unidades aderem ao terminal da cadeia, Equação 3, onde  $n$  é o número de unidades de monómero.



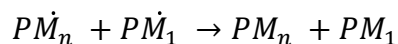
Este processo continua até que a cadeia é terminada por uma das quatro estratégias existentes. A primeira ocorre por transferência de cadeia, onde os radicais livres são transferidos para uma unidade livre de monómero deixando assim uma cadeia ‘morta’ de polímero. O termo ‘morta’ significa o cessar do crescimento da cadeia por propagação radicalar [17], Equação 4.



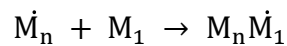
Um outro método passa por combinar duas cadeias de polímeros, que reagem entre si por acoplamento, Equação 5.



A cadeia pode ainda terminar por desproporção radicalar. Neste caso, um próton de uma cadeia é retirado e adicionado a uma outra cadeia, produzindo assim um polímero com um grupo terminal insaturado e um polímero com o grupo terminal saturado, Equação 6.



A par destas reações primárias, pode ainda ocorrer homopolimerização do monómero, Equação 7.



Adicionalmente, são descritas reações de terminação menos dominantes como a interação da cadeia com impuridades ou inibidores.

## 2ª Fase: Ativação do substrato e imobilização da proteína

São poucos os grupos químicos que permitem uma conjugação específica aos ácidos carboxílicos (-COOH), tal como ocorrem em proteínas e muitas outras biomoléculas. Os mais

comumente utilizados são os compostos de carbodiimida (CDI), que funcionam como ativador [53]. Este é o método mais prático e versátil de reticulação com o ácido carboxílico (*crosslinking*). A CDI pode ser utilizada em condições aquosas e não aquosas, permitindo ativar os ácidos carboxílicos para conjugação direta com aminas primárias ( $R-NH_2$ ) através da formação de ligações amida.

A ativação do substrato foi feita em condições aquosas, sendo que se usou N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), que é um composto de CDI, como o ativador da reação.

A EDC reage com os grupos carboxílicos formando um intermediário O-acilisoureia, que fica com um grupo ativado. Este intermediário pode ser facilmente deslocado por ataque nucleófilo dos grupos amino presentes na mistura reativa, Figura 7.

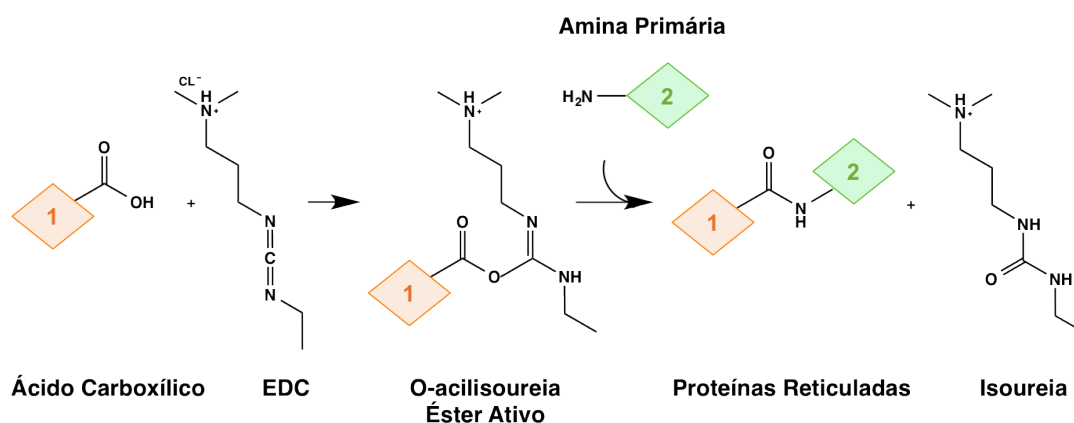


Figura 7 - Esquema da reação de reticulação com EDC.

Uma amina primária forma uma ligação amida com o grupo carboxílico original, sendo que o subproduto da EDC é libertado como derivado de ureia solúvel. O intermediário O-acilisoureia é instável em soluções aquosas, assim, quando este não reage com uma amina resulta na sua hidrólise, dando-se a regeneração dos carboxilos e a libertação de ureia [54][55].

A técnica de *crosslinking* usando EDC é mais eficaz em condições ácidas, nomeadamente com pH 4.5, devendo ser realizada em soluções tampão desprovidas de grupos carboxílicos e aminas. Uma solução tampão adequada para a reação com a EDC é o ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) [56].



## 1.7 Aplicações da conjugação proteína-polímero

A conjugação de polímeros sintéticos com proteínas permite características e funcionalidades adicionais, como por exemplo, comportamento de separação de fases e automontagem.

As características superiores dos conjugados permitem uma vasta gama de aplicações na biomedicina, biotecnologia e nanotecnologia.

### 1.7.1 Suscetibilidade a Estímulos Externos

A capacidade de alguns polímeros submeterem-se a mudanças reversíveis como resposta a um estímulo externo (*stimuli responsive polymers*), conferiu-lhes a designação de polímeros inteligentes. Têm sido utilizados vários estímulos tais como a temperatura [57][58][59], luz [60], pH [61][62][63][64], iões [65], campo magnético externo [15], entre outros.

Os conjugados suscetíveis podem ser usados para controlar o acesso do local ativo da enzima, ou do local de reconhecimento do receptor [66][67][68]. A estratégia para controlar a atividade da proteína é baseada no mecanismo reversível que bloqueia o local ativo. Perante um dado estímulo externo, o polímero anexado irá esconder esse local ativo [69].

A combinação dos estímulos externos com os diversos conjugados possíveis, abre o caminho para inúmeras aplicações. Um exemplo é mediar a bioatividade e acesso ao substrato, usando conjugados suscetíveis ao pH e/ou à temperatura [70][71].

### 1.7.2 Transporte de Fármacos

Novas estratégias para o transporte de fármacos têm sido uma grande prioridade para a indústria farmacêutica. As proteínas e polipeptídeos sempre atraíram especial atenção, porém os conjugados proteínas-polímeros apresentam também um grande potencial nesta área.

As aplicações biomédicas de enzimas imobilizadas podem ser divididas em dois grupos principais [72]. No primeiro grupo estão incluídas as enzimas destinadas à circulação prolongada, e as que estão presentes em diferentes órgãos e tecidos. Já no segundo grupo, a enzima imobilizada é destinada à deposição local durante o tratamento de lesões, como tumores, ou de órgãos individuais [72].

Os conjugados têm o potencial de transportar e entregar fármacos a regiões específicas do corpo usando o bio-reconhecimento existente à superfície da proteína [73][74][75].

Em alguns casos, uma proteína específica presente na superfície do substrato, pode auxiliar a passagem através de barreiras biológicas impermeáveis [76][77].

### 1.7.3 Outras aplicações

A par com as aplicações biomédicas, que são tipicamente associadas aos conjugados proteína-polímero, existem aplicações não-biológicas destes híbridos.

Os conjugados peptídeo-polímero têm sido estudados e usados em técnicas de separação. Estes podem ser usados para gerar filmes finos que contêm canais sub-nanométricos que têm orientação normal com a superfície. Assim, exibem propriedades de transporte e separação únicos, que podem servir como membranas seletivas para a separação e revestimentos protetores [78].

Também a imobilização de proteínas em polímeros com incorporação magnética, como óxido de ferro, facilita a separação das proteínas em soluções complexas quando aplicado um campo magnético ou por centrifugação. O processo de separação magnética facilitado por estes conjugados, permite diversas aplicações como no tratamento de água, diagnósticos clínicos, processamento mineral e biologia molecular [79][80].

Os híbridos proteína-polímero podem ser igualmente aplicados em nanoreatores uma vez que permitem uma maior tolerância a diversas condições experimentais, sem que ocorra a perda de bioatividade, podendo assim aumentar significativamente a eficácia das reações enzimáticas [81][82].

A conjugação proteína-polímero apresenta aplicações optoelectrónicas promissoras. Os híbridos oligopeptídeo-oligotiofeno que formam agregados fibrilares nanoestruturados, combinam a sua suscetibilidade ao estímulo e automontagem fornecido pelos péptidos, com as propriedades semicondutoras do tiofeno [83][84]. Um outro exemplo, é o uso de conjugados de polietilenoglicol (PEG) com oligopeptídeos, como modelos para a nucleação e crescimento de nanopartículas de prata. As propriedades óticas e elétricas das nanopartículas permitem a intercepção da luz em células solares [85].

É ainda possível desenvolver biossensores baseados nas nanopartículas de proteína-polímero [86][87][88], uma vez que as proteínas têm uma elevada especificidade para determinadas substâncias. Este tipo de biossensores tem sido utilizados na deteção de vários

compostos orgânicos de forma rápida e altamente seletiva, como por exemplo, a imobilização de glicose oxidase permite a medição dos níveis de glicose no sangue [89].

## 1.8 Conjugados suscetíveis ao pH

Polímeros com suscetibilidade ao pH podem ser definidos como polieletrólitos. Um polieletrólito é uma macromolécula que pode dissociar-se, quando dissolvido em água ou outros solventes ionizantes, fornecendo iões [90].

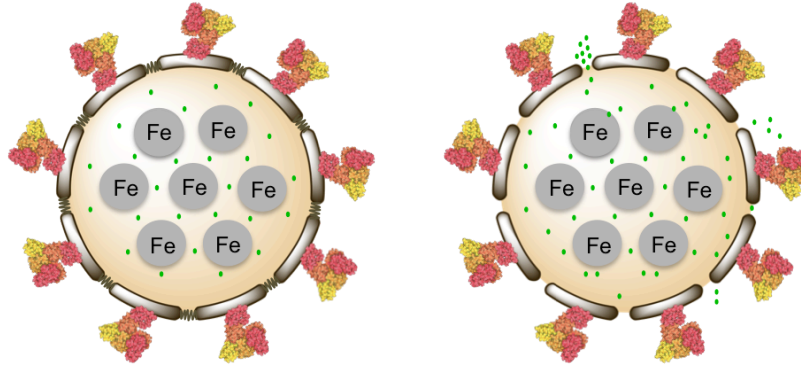
Estes polímeros incluem na sua estrutura grupos ácidos ou básicos fracos que fornecem ou recebem prótons, respetivamente, em resposta ao pH do meio envolvente. Perante um determinado pH, os grupos funcionais presentes no polímero sofrem ionização levando a uma mudança conformacional do mesmo, o que resulta na sua expansão ou compactação.

Anteriormente, foi referida a necessidade da modificação da superfície do substrato com ácido acrílico para a imobilização proteica. Porém, o enxerto de AA tem dupla funcionalidade, a incorporação de grupos carboxílicos no substrato e tornar o conjugado proteína-polímero suscetível ao pH do meio envolvente [91][92].

Os poliácidos são polímeros cuja estrutura tem um grande número de grupos funcionais ácidos ionizáveis, tais como ácidos carboxílicos. O pH que permite a ionização do ácido depende da constante de dissociação ( $pK_a$ ) de cada polímero [93]. No caso particular do poli(ácido acrílico) (PAA) o  $pK_a$  é de 4.28 [94].

Perante um pH acima do  $pK_a$ , os grupos carboxílicos das cadeias de PAA dissociam-se aumentando o número de aniões  $COO^-$ . A repulsão electrostática entre estes grupos, aumenta o comprimento da molécula e a distância entre as cadeias adjacentes. Assim, o polímero enxertado nos poros das microcápsulas dilata permitindo que os poros fechem, ou seja, o material contido no seu interior fica preso, Figura 8.

Por outro lado, quando o pH fica abaixo do  $pK_a$ , as cadeias poliméricas diminuem de tamanho ficando compactadas. Desta forma, os poros das microcápsulas ficam abertos permitindo a libertação do material contido no seu interior, Figura 8.



**Figura 8** - Da esquerda para a direita, comportamento das microcápsulas porosas com núcleo magnético perante o pH do meio, quando:  $\text{pH} > \text{pKa}$ ;  $\text{pH} < \text{pKa}$ .

O cariz inovador na produção das MCs de APA6 restringe o número de artigos relacionados com a sua técnica produtiva, porém vários autores estudaram a suscetibilidade ao pH de microesferas e microcápsulas obtidas por outros métodos.

Uma vez mais o trabalho de Cai *et al.* [42] salienta-se nesta área uma vez que usaram o grupo carboxílico, incorporado por AA nas microesferas magnéticas de PA6, como ligante para a adsorção de BSA. Esta investigação provou a dupla suscetibilidade das microesferas: a suscetibilidade magnética e ao pH, permitindo este último, otimizar a quantidade de BSA adsorvida através da alteração do pH e da concentração inicial de BSA.

Também Liu *et al.* [95] produziram, via polimerização em emulsão, e estudaram microesferas de poli(estireno-co-(ácido acrílico)) com núcleo magnético de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Neste estudo, os autores usaram a suscetibilidade ao pH das microesferas para investigar a sua capacidade de adsorção de BSA, concluindo que esta aumentava com o incremento da quantidade de AA presente.

Yun *et al.* [96] prepararam microcápsulas e microesferas de poliálcool vinílico com poli(ácido acrílico), através da polimerização em emulsão, contendo no seu interior vitamina  $\text{B}_{12}$ . Os autores estudaram a suscetibilidade ao pH de ambas, sendo que os dois tipos de micropartículas são sensíveis ao pH do meio envolvente, protegendo ou libertando a vitamina  $\text{B}_{12}$ . Porém concluíram que, as microcápsulas apresentaram uma libertação mais rápida do seu conteúdo quando comparadas com as microesferas.

## 1.9 Objetivos

O objetivo geral da presente dissertação consiste em desenvolver microcápsulas, vazias e com incorporação de várias percentagens de diferentes partículas magnéticas, para a imobilização de proteínas. Para esse efeito a poliamida 6 é usada como substrato para a imobilização, em forma de microcápsulas porosas, uma vez que é biocompatível e possui os mesmos grupos funcionais,  $-COOH$  e  $-NH_2$ , que as proteínas. Pretende-se aplicar um método rápido, ecológico e que permite a produção de microcápsulas porosas, em quantidades razoáveis e com possibilidade de *scale-up*.

Aliado a este objetivo primordial, as microcápsulas com imobilização proteica apresentam ainda um comportamento inteligente perante dois estímulos externos. A incorporação das cargas magnéticas torna as microcápsulas suscetíveis a um dado campo magnético, assim como o enxerto de poli(ácido acrílico) (PAA), tipicamente necessário para a imobilização de proteínas, faz com que as microcápsulas sejam suscetíveis ao pH do meio que as envolve.

Assim, com base na revisão bibliográfica apresentada, o trabalho deverá passar pelas seguintes etapas:

- Sintetizar microcápsulas porosas de PA6, vazias e com cargas magnéticas incorporadas, através da polimerização aniônica ativada de  $\epsilon$ -CL em solvente. No caso das microcápsulas magnéticas a polimerização é realizada na presença de pós de ferro (Fe) e óxido de ferro ( $Fe_3O_4$ ), ambos em quantidades de 1%, 3% e 5%;
- Modificar quimicamente as microcápsulas produzidas com o enxerto de ramos de PAA. Esta técnica de polimerização radicalar permite introduzir grupos COOH na superfície das microcápsulas, aumentando desta forma o teor destes grupos nas microcápsulas de APA6, sendo estes necessários para a imobilização proteica;
- Produzir os conjugados proteína-polímero. Consistindo o processo em imobilizar a proteína BSA nas microcápsulas, que têm o enxerto de PAA e nas que não sofreram qualquer modificação química. A imobilização é realizada de duas formas: sem interferência de um ativador; e na presença de um ativador, um composto de carbodiimida;
- Caracterizar todas as microcápsulas produzidas (MCs referência, MCs com PAA e MCs com imobilização de BSA) de modo a relacionar a imobilização com: o tipo e

percentagem de incorporação magnética, a funcionalização, o tempo de imobilização e a influência do uso de ativador na imobilização;

- Estudar o efeito da incorporação magnética, em termos de percentagem e do tipo de partículas, na imobilização proteica. Pretende-se ainda investigar a influência da funcionalização e o uso de ativador na percentagem de BSA imobilizada nas microcápsulas de APA6.
- Por fim, estudar a suscetibilidade das MCs perante o pH do meio envolvente usando a vitamina B<sub>12</sub> como modelo.

A Figura 9, resume sequencialmente as atividades desenvolvidas ao longo da dissertação num fluxograma cronológico.

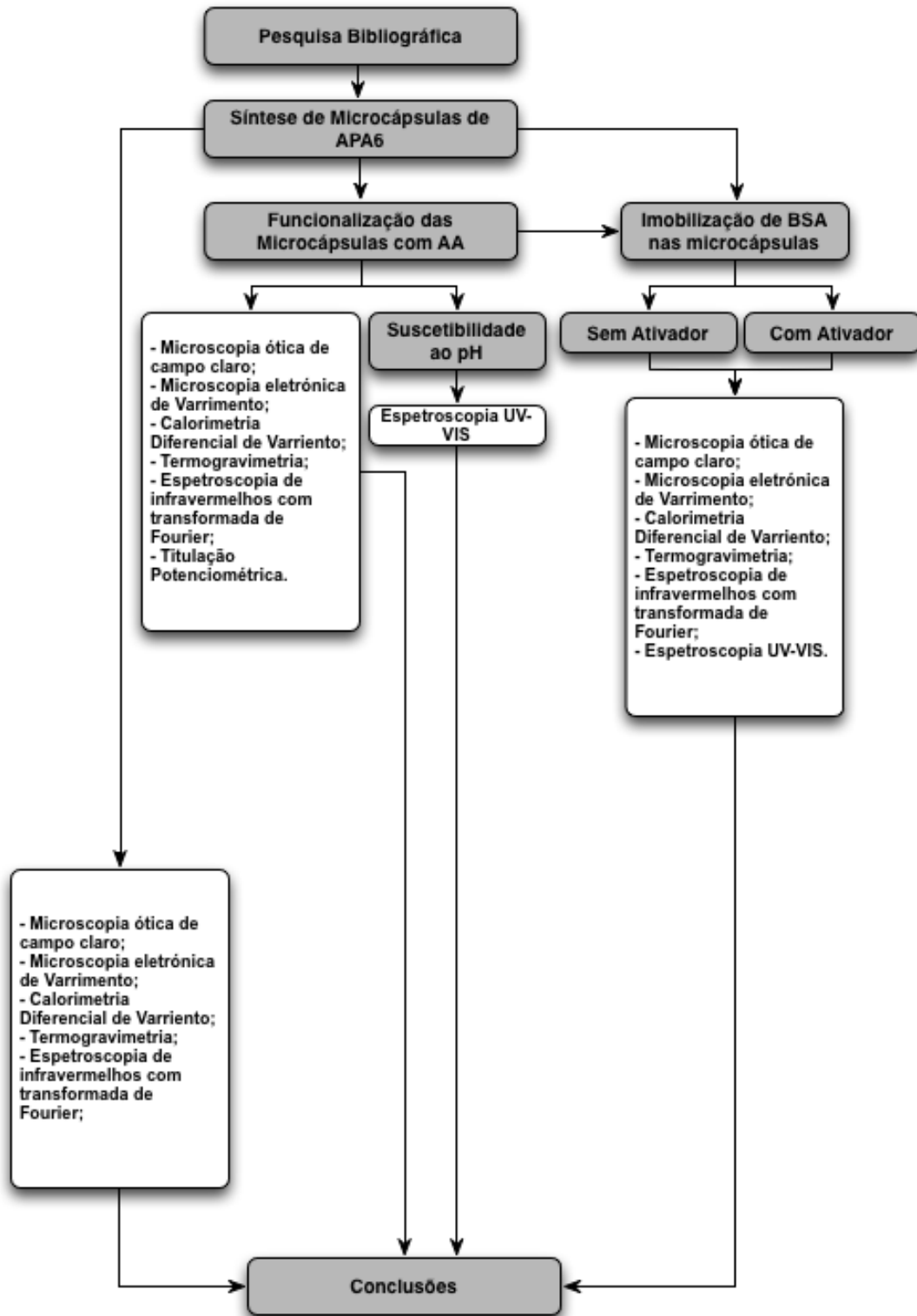


Figura 9 - Fluxograma cronológico das etapas desenvolvidas ao longo da dissertação.





## Capítulo II

### Materiais e Procedimentos Experimentais



## 2 Materiais e procedimentos experimentais

Neste capítulo são apresentados os procedimentos experimentais, os materiais, e equipamentos utilizados na obtenção e caracterização de todas as microcápsulas obtidas neste projeto.

Este inicia-se com a descrição das metodologias para a obtenção das microcápsulas a partir de uma reação de síntese, seguindo-se a sua funcionalização e imobilização. Também foi estudada a suscetibilidade das microcápsulas funcionalizadas quando sujeitas a um dado estímulo externo, o pH. Com estes produtos foram realizados ensaios de caracterização morfológica e estrutural, análises térmicas, análise eletroanalítica, e ensaios espectroscópicos.

### 2.1 Síntese das microcápsulas de APA6 e APA6/magnética

A síntese das microcápsulas de poliamida 6 aniônica vazias (APA6) e com incorporação magnética (APA6/magnética), realizou-se a partir da polimerização aniônica ativada por abertura de ciclo da  $\epsilon$ -caprolactama ( $\epsilon$ -CL). A reação de síntese das microcápsulas de poliamida está apresentada na Figura 10.

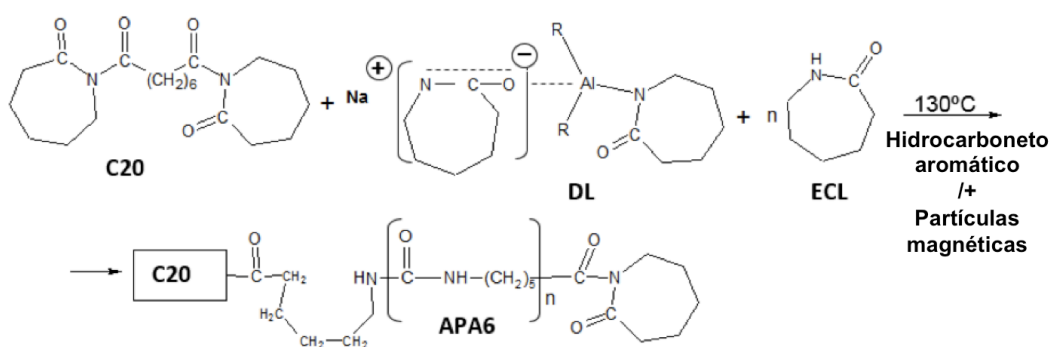


Figura 10 - Reação de síntese das microcápsulas de APA6 e APA6/magnética [15].

#### 2.1.1 Materiais

Na síntese das MCs de APA6 foram utilizados os materiais e reagentes seguintes, nas proporções apresentadas na Tabela 2:

- 180 mL solvente tolueno, Sigma-Aldrich com pureza  $\geq 99.5\%$ ;

- 55.6 g de  $\epsilon$ -caprolactama fornecido pela Brüggemann Chemical;
- O sistema catalítico foi constituído por um 7.97 g de iniciador, dilactamato (DL) fornecido pelo Katchem, e 3.67 g de ativador da polimerização, C20P, fornecido pela Brüggemann Chemical;
- 1.67 g de cargas magnéticas incorporadas: ferro (Fe) da BASF e óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) da Sigma-Aldrich.

### 2.1.2 Procedimento experimental

A reação de polimerização foi realizada num balão de vidro de 500 mL com um agitador, no qual se acoplou um termómetro, um condensador de refluxo (*Dean-Stark*) e uma entrada de azoto de forma a garantir uma atmosfera inerte. O balão foi colocado numa manta de aquecimento com agitação magnética, possibilitando assim o controlo da temperatura e de rotação do agitador na Figura 11.

A  $\epsilon$ -CL foi introduzida no balão juntamente com o solvente e, se for o caso, a carga magnética que foi calculada em relação à quantidade de monómero usado na reação. O balão foi aquecido até à ebulição ( $\approx 115$  °C) garantindo a completa dissolução do monómero. A água libertada pela  $\epsilon$ -CL por ser mais densa que o solvente ficou no fundo da purga do condensador, permitindo assim a sua separação.

Após estabilizada a temperatura, foi adicionado o sistema catalítico em duas etapas. Em cada fase foi acrescentada metade da quantidade estipulada de iniciador e ativador, tendo-se feito a segunda adição uma hora após a primeira adição.

Duas horas após a primeira adição do sistema catalítico as microcápsulas foram filtradas, uma vez que não se dissolvem no solvente, e lavadas com metanol.

Por fim, as microcápsulas filtradas foram secas na estufa a 120 °C por 4 horas, findo esse tempo foram pesadas e o rendimento (ou taxa de conversão) da reação de polimerização foi avaliado.

As microcápsulas com núcleo magnético apresentaram suscetibilidade perante a ação de um íman, movendo-se em consonância com ele, Figura 11.

Todas as microestruturas obtidas foram posteriormente utilizadas na funcionalização e imobilização, por isso foram consideradas as microcápsulas referência.



**Figura 11** - Da esquerda para a direita: Montagem usada na síntese e funcionalização das microcápsulas; MCs vazias (cor branca), com incorporação de Fe (cor cinza) e com incorporação de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; Reação das MCs com partículas magnéticas sob ação de um íman.

### 2.1.3 Designação das amostras referência

As amostras foram designadas tendo em conta o tipo e a percentagem de carga magnética incorporada. De notar que, apesar de todas as microcápsulas serem de APA6 para facilitar a leitura deste estudo somente as vazias têm a designação PAMC, microcápsulas de PA, ficando assim subentendida esta designação nas restantes microcápsulas com partículas magnéticas incorporadas.

Na Tabela 2, é apresentada a designação de cada uma das amostras sintetizadas (referência).

**Tabela 2** - Designação das amostras referência.

Designação	Descrição
PAMC	MCs vazias
Fe_1%	MCs com 1% de Fe incorporado
Fe_3%	MCs com 3% de Fe incorporado
Fe_5%	MCs com 5% de Fe incorporado
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ _1%	MCs com 1% de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ incorporado
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ _3%	MCs com 3% de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ incorporado
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ _5%	MCs com 5% de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ incorporado

## 2.2 Funcionalização das microcápsulas de APA6 e APA6/magnética

Seguiu-se o enxerto de ramificações de poli(ácido acrílico) (PAA-G) sobre as microcápsulas previamente sintetizadas por meio de polimerização radicalar, apresentada na Figura 12.

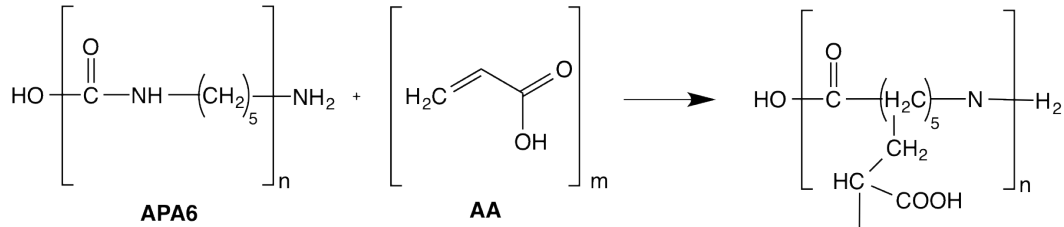


Figura 12 - Reação de polimerização radicalar nas microcápsulas de APA6 e APA6/magnética.

### 2.2.1 Materiais

A funcionalização foi realizada com os seguintes materiais:

- Foram usados como solventes 40 mL de tolueno da Sigma-Aldrich com pureza  $\geq 99.5\%$ , e 50 mL de água destilada;
- 1 g de MCs referência;
- 0.36 + 0.18 g em solução de Luperox® A75 peróxido de benzoíla (BPO) da Sigma-Aldrich;
- 2 mL de ácido acrílico (AA) com pureza de 99 %, fornecido pela Sigma-Aldrich.

### 2.2.2 Procedimento experimental

À semelhança da síntese das microcápsulas, a polimerização radicalar foi realizada num balão de vidro de 500 mL com agitador. Neste foi acoplado um termómetro, um condensador de refluxo e uma entrada de azoto de forma a garantir uma atmosfera inerte. O balão foi instalado numa manta de aquecimento com agitação magnética, possibilitando assim o controlo da temperatura e a velocidade de rotação do agitador, Figura 10.

No balão foram introduzidas as microcápsulas referência juntamente com os solventes. Este foi aquecido até se atingir  $85\text{ }^\circ\text{C}$  e conseqüente início da condensação dos solventes.

O iniciador, BPO, foi acrescentado em dois momentos da polimerização, tendo sido previamente dissolvido em água destilada. Ao estabilizar a temperatura foi adicionada a primeira porção de BPO. Findos 30 minutos foi acrescentado o AA gota a gota, seguindo-se o acréscimo da segunda parte de BPO.

Ao fim de duas horas depois da primeira adição de BPO, as microcápsulas foram filtradas. Num gobelé com agitador, foram adicionadas as microcápsulas filtradas e água destilada. O gobelé foi posto sob agitação e temperatura controladas durante 30 minutos, seguindo-se uma segunda filtração. O procedimento é repetido uma vez mais, ou seja, a solução de água com as microcápsulas filtradas é posta sob agitação e temperatura durante 30 minutos seguindo-se a filtração das mesmas. Estes passos são realizados de forma a extrair um possível homopolímero de ácido poliacrílico formado aquando o processo, que iria interferir nos resultados dos ensaios de espectroscopia.

### 2.2.3 Designação das amostras funcionalizadas

As amostras com enxerto PAA foram designadas tendo em conta esse processo de funcionalização, sendo adicionado à designação inicial (Secção 2.1.3) um F. Na Tabela 3, é apresentada a designação de todas as amostras funcionalizadas.

**Tabela 3** - Designação das amostras obtidas por funcionalização.

Designação	Descrição
PAMC_F	MCs vazias funcionalizadas
Fe_1%_F	MCs com 1% de Fe incorporado, funcionalizadas
Fe_3%_F	MCs com 3% de Fe incorporado, funcionalizadas
Fe_5%_F	MCs com 5% de Fe incorporado, funcionalizadas
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_F	MCs com 1% de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> incorporado, funcionalizadas
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_F	MCs com 3% de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> incorporado, funcionalizadas
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_F	MCs com 5% de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> incorporado, funcionalizadas

### 2.3 Imobilização de BSA nas microcápsulas

A imobilização da proteína albumina de soro bovino (BSA) sobre as microcápsulas, foi realizada na presença e na ausência do ativador N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

(EDC). Como substrato de imobilização, foram utilizadas não só microcápsulas funcionalizadas mas também referência, uma vez que as últimas já possuem grupos funcionais  $\text{NH}_2$  e  $\text{COOH}$  necessários para o processo de imobilização covalente de BSA.

A reação de imobilização foi descrita anteriormente no estado da arte, secção 1.5.1 - Figura 7.

### 2.3.1 Materiais

Assim, para a imobilização foi necessário:

- 0.1 g de MCs referência e de MCs funcionalizadas;
- 1 mL de solução de 0.1 M de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico (MES) monohidratado da Sigma-Aldrich;
- 2.5 mL de solução de BSA com 1wt.%, fornecido pela Sigma-Aldrich;
- 0.2 mL de ativador carbodiimida (EDC) com 0.4 mol/L, da Sigma-Aldrich.

### 2.3.2 Procedimento experimental

A imobilização da proteína BSA nas microcápsulas, referência ou funcionalizadas anteriormente, foi realizada em tubos de ensaio com tampa de 14 mL.

Este estudo foi dividido em duas séries, a primeira sem EDC na solução e a segunda com EDC na solução, de modo a determinar a influência do ativador na percentagem de imobilização proteica. Na imobilização sem ativador foram adicionadas microcápsulas em cada tubo de ensaio, correspondendo cada tubo a microcápsulas distintas, seguido da adição de MES e BSA com o auxílio de uma micropipeta. Por outro lado, na imobilização com ativador, à solução anterior foi também acrescentado EDC a cada tubo.

Após a agitação dos tubos, procedeu-se à medição do pH de cada solução. O pH foi posteriormente acertado de modo a que as soluções tivessem um pH próximo do ponto isoelétrico<sup>5</sup> do BSA, pH 4.7 quando usado em conjugação com MES [97].

Em seguida, os tubos foram dispostos num agitador com ângulo ajustável, e sob agitação foram transferidos para uma estufa a 37 °C durante um período de tempo estipulado.

<sup>5</sup> O ponto isoelétrico de uma molécula é o pH em que esta é eletricamente neutra.



### 2.3.3 Designação das amostras com imobilização proteina

As amostras com imobilização de BSA foram designadas com base no tipo de imobilização, ou seja, se ocorreu na presença de ativador (IC) ou na ausência de ativador (IS), sendo estes adicionados à designação inicial (Secção 2.1.3). Na Tabela 4, é apresentada a designação dada a cada uma das amostras com BSA.

**Tabela 4** - Designação das amostras obtidas por imobilização com ou sem ativador presente.

Imobilização nas MCs de APA6 com ativador	Imobilização nas MCs de APA6 sem ativador
PAMC_IC	PAMC_IS
Fe_1%_IC	Fe_1%_IS
Fe_3%_IC	Fe_3%_IS
Fe_5%_IC	Fe_5%_IS
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_IC	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_IS
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_IC	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_IS
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_IC	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_IS
PAMC_F_IC	PAMC_F_IS
Fe_1%_F_IC	Fe_1%_F_IS
Fe_3%_F_IC	Fe_3%_F_IS
Fe_5%_F_IC	Fe_5%_F_IS
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_F_IC	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_F_IS
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_F_IC	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_F_IS
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_F_IC	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_F_IS

### 2.4 Suscetibilidade ao pH

As microcápsulas com enxerto de AA permitem a sua suscetibilidade ao pH do meio dielétrico que as rodeia. De forma a estudar este efeito, as MCs funcionalizadas foram carregadas com vitamina B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>), e estudadas num meio com pH 2 e com pH 7, a escolha destes pH foi explicada anteriormente na secção 1.8.

### 2.4.1 Materiais

Foram utilizados:

- 0.1 g de MCs previamente funcionalizadas;
- Solução tampão fosfórico com 0.1 mM;
- 4 mL de solução tampão de VB<sub>12</sub>, com 0.2 mM. A VB<sub>12</sub> foi fornecida pela Sigma-Aldrich.

### 2.4.2 Procedimento experimental

Em tubos de ensaio de 14 mL foram adicionadas as MCs funcionalizadas e a vitamina B<sub>12</sub>, previamente diluída na solução tampão fosfórico com pH 2. Perfazendo na totalidade 14 tubos/amostras, metade para o estudo do meio com pH 2 e metade para o estudo do meio com pH 7.

Os tubos foram bem agitados e dispostos num agitador com ângulo ajustável, sendo posteriormente colocados sob agitação na estufa a 37 °C durante 5 horas.

Passadas 48 horas de carregamento das MCs com VB<sub>12</sub>, todo o solvente foi retirado deixando somente as microcápsulas nos tubos. Foi adicionada a metade dos tubos, uma nova solução tampão com pH 2, e nos restantes uma solução tampão ajustada para um pH 7. Os tubos foram bem agitados seguindo-se a medição do pH de cada tubo.

Posteriormente, os tubos foram deixados a repousar por tempo definido.

## 2.5 Caracterização das amostras

### 2.5.1 Microscopia ótica de campo claro

A microscopia ótica é uma técnica de caracterização morfológica que permite obter uma imagem ampliada de uma amostra, possibilitando a aquisição de informação estrutural e molecular.

Esta técnica permite o recurso a diferentes formas de transmissão de acordo com a natureza das amostras. Para amostras poliméricas, as técnicas mais indicadas são a microscopia de reflexão, microscopia de luz polarizada e a microscopia de campo claro.

Para a caracterização das microcápsulas foi usada a microscopia de campo claro, sendo que o contraste é gerado por alterações na absorção e difusão da luz pelos constituintes da

amostra. Isto permite a observação da forma e distribuição destes constituintes (absorção), ou ainda das fronteiras de separação destes com o contorno mais escuro (difusão).

A análise foi iniciada com a recolha de imagens das amostras usando o microscópio de transmissão *Olympus BH-2*, com o acoplamento da câmara digital *Leica DFC 280*. Todas as imagens recolhidas foram posteriormente tratadas usando o *software Leica Application Suite V4.4*, sendo este um processo moroso por ser semi-manual. O tratamento da imagem, permite identificar partículas individuais e separar partículas que se apresentam juntas através do desenho de uma reta de separação. O *software* fornece assim dados da área, esfericidade e diâmetro circular equivalente das partículas.

Todas as amostras foram observadas no microscópio equipado com uma objetiva de 4x, e uma ocular de 1.67x.

### 2.5.2 Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM - *Scanning Electron Microscope*) permite a observação e caracterização morfológica de materiais heterogéneos, orgânicos e inorgânicos numa elevada resolução, nanométrica (nm) ou micrométrica ( $\mu\text{m}$ ). O princípio de funcionamento desta técnica consiste em incidir sobre a amostra um feixe localizado de electrões com elevada energia, que são acelerados por aplicação de uma diferença de potencial. A interação dos electrões com os átomos, que constituem a amostra, gera sinais que revelam informações sobre a topografia da mesma, incluindo a sua microestrutura, composição, estrutura cristalina e a orientação dos materiais que a compõem [98].

Esta análise morfológica foi efetuada às microcápsulas de APA6 vazias e as que têm incorporação de 3% Fe e 3%  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , as mesmas amostras foram também analisadas depois de funcionalizadas e com a proteína imobilizada. A área a analisar foi revestida por *sputtering* com uma fina camada de uma liga de ouro e paládio, com o propósito de tornar condutora a sua superfície. Neste estudo foi utilizado o equipamento *Nano SEM-FEI Nova 200*, que integra o sistema *EDAX-Pegasus X4M* de microanálise por raio-X (EDS - *Energy Dispersive Spectrometer*) e o sistema de deteção e análise de padrões de difração de electrões retrofundidos (EBSD – *Electron Backscatter Diffraction*).

### 2.5.3 Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*) é uma técnica de análise térmica que regista o fluxo de energia calorífica associado a transições nos materiais em função da temperatura ou tempo.

Neste método, a substância em estudo e a referência são submetidas a um mesmo programa de aquecimento ou arrefecimento, rigorosamente controlado. Assim, a diferença no fornecimento de energia calorífica entre a substância em estudo e a referência é medida em função da temperatura.

A medição de parâmetros por compensação fornece dados qualitativos e quantitativos em processos endotérmicos (absorção de energia calorífica) e exotérmicos (libertação de energia calorífica). Desta forma permite obter informações referentes a alterações de propriedades físicas e/ou químicas tais como a temperatura de fusão, temperatura de cristalização, temperatura de transição vítrea, grau de cristalinidade, entalpia de fusão e cristalização.

O DSC foi utilizado em dois estudos que permitiram analisar todas as MCs.

No primeiro estudo as amostras foram sujeitas a dois períodos de aquecimento, sendo que o primeiro elimina a história térmica do material tornando o segundo aquecimento mais preciso quanto à sua caracterização, e um de arrefecimento. Os ensaios foram realizados num intervalo de temperaturas de 0 °C a 250 °C para o primeiro e segundo aquecimento, com uma velocidade de 10 °C/min. No caso do arrefecimento, este foi efetuado num intervalo de temperaturas de 250 °C a 0 °C, com uma velocidade de 20 °C/min. Neste estudo, o azoto foi utilizado como gás de purga e de proteção.

Num segundo estudo as amostras necessitaram de preparação prévia, sendo que estas foram submersas em água durante 24h. No entanto, imediatamente antes do ensaio, as mesmas foram escorridas e o excesso de água foi absorvido. Cada amostra foi sujeita somente a um aquecimento num intervalo de temperaturas de -20 °C a 30 °C com uma velocidade de 10 °C/min.

Todos os ensaios foram conduzidos no equipamento *Netzsch DSC 200 F3* e os dados foram tratados no *software Netzsch Proteus Thermal Analysis* versão 6.0.0.

O grau de cristalinidade ( $\chi_c$  %) da APA6 foi calculado a partir da seguinte equação, Equação 8.

$$\chi_c(\%) = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0} \times 100$$

Onde  $\Delta H_f$  refere-se à entalpia de fusão da amostra e  $\Delta H_f^0$  ao valor extrapolado da entalpia que corresponde à fusão de uma amostra 100% cristalina de APA6. Na APA6 existem duas estruturas cristalinas predominantes, a forma  $\alpha$  e a forma  $\gamma$ , foi assim considerado o valor intermédio de 190J/g para  $\Delta H_f^0$  [99].

#### 2.5.4 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA - *Thermogravimetric Analysis*) é uma técnica de análise térmica que possibilita o estudo da variação da massa de uma amostra em função da temperatura, quando esta é submetida a um programa controlado e sob uma atmosfera adequada (inerte ou reativa) [100].

A análise de TGA foi realizada na caracterização das microcápsulas de APA6 vazias e com incorporação magnética, e em todas as amostras funcionalizada. Foram também analisadas algumas microcápsulas com a proteína imobilizada com e sem funcionalização. O intervalo de temperaturas estabelecido para os ensaios foi de 40 °C a 600 °C com uma velocidade de aquecimento estabelecida de 20 °C/min, sob atmosfera inerte de azoto.

Os ensaios foram conduzidos num equipamento de TGA, modelo Q500 fabricado por *TA Instruments*, e os dados foram tratados através do software Q séries [Q500-0796] versão 6.7.

Este método permite obter informações sobre a estabilidade térmica das amostras tais como a velocidade de degradação máxima, a temperatura de degradação à velocidade máxima e o resíduo no final da degradação.

#### 2.5.5 Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) deteta as transições entre estados vibracionais das moléculas. A amostra é irradiada com um feixe de luz infravermelha, sendo que quando a frequência do feixe é a mesma que a frequência de vibração de uma ligação ocorre absorção nesse respetivo comprimento de onda [101].

Assim, esta técnica permite identificar grupos funcionais específicos ou determinados tipos de ligações presentes na estrutura química do material, através de picos de intensidade em determinados comprimentos de onda.

Através deste método foram analisadas todas as MCs referência, funcionalizadas e com a proteína imobilizada com e sem incorporação magnética.

O ensaio foi iniciado com um teste em branco de forma a obter-se a linha de base. Seguiu-se o ensaio com as amostras em estudo, obtendo-se espectros da percentagem de transmitância em função do comprimento de onda. Todos os ensaios foram sujeitos às mesmas condições de medição (quantidade da amostra, condições atmosféricas, acoplamento de ATR, e o mesmo aperto de ATR) de forma a tornar os resultados comparáveis.

Para o presente estudo foi utilizado o equipamento *Jasco FT/IR 4100* com o dispositivo ATR acoplado, com 64 acumulações.

### 2.5.6 Titulação Potenciométrica

A potenciometria é um método eletroquímico que tem como base a diferença de potencial entre duas células, o eletrodo indicador e um eletrodo de referência. Esta técnica pode ser dividida em duas, a potenciometria direta onde se utiliza uma única medida de potencial para determinar a concentração de uma espécie iónica em solução, e a titulação potenciométrica.

Para o presente estudo realizou-se uma titulação potenciométrica, na qual é medida a força eletromotriz das células após a adição de um certo volume de titulante, neste caso hidróxido de sódio (NaOH).

Foi usado um eletrodo combinado de vidro, que incorpora no mesmo corpo cilíndrico o eletrodo de vidro e o de referência, cuja superfície é sensível à concentração hidrogeniônica. Este permite a penetração de iões  $H^+$  e, conseqüentemente, o aparecimento de uma tensão elétrica que é função linear do pH. Assim, durante o ensaio o potencial registado é aquele que se observa pela transferência de carga através da interface solução/camada hidratada (superfície externa do eletrodo), sendo o potencial total do eletrodo dado pela concentração hidrogeniônica presente em solução.

Os parâmetros deste ensaio foram otimizados, sendo que todas as amostras foram analisadas com as mesmas condições de temperatura e tempo.

Para o presente estudo as MCs, previamente pesadas, foram acrescentadas a um goblé com água destilada seguindo-se a medição do pH das mesmas. Posteriormente, as amostras foram postas sob agitação magnética a 23 °C durante 30 minutos. Findo esse tempo, foi acrescentado aos poucos uma dada quantidade de titulante, NaOH, até à neutralização (pH=7) da solução.

Através deste método foram analisadas todas as amostras funcionalizadas, de forma a quantificar o teor dos grupos carboxílicos presentes nas MCs calculada pela seguinte equação, Equação 9.

$$COOH (mmol/g) = \frac{M \times V}{m}$$

Onde *M* refere-se à molaridade do titulante, *V* o volume do titulante e *m* a massa das microcápsulas em estudo. Foi utilizado o medidor *Oakton Acorn* pH6 com o respetivo elétrodo e sonda ATC (*Automatic Temperature Compensation*).

### 2.5.7 Espetroscopia de UV-visível

A espectroscopia UV-visível (UV-VIS) possibilita o estudo da absorção de luz UV-visível das soluções coloidais em função do comprimento de onda. A absorção molar na faixa de energias ultravioleta (300-400 nm) e na região da luz visível (400-800 nm) depende da estrutura eletrónica da molécula.

Esta técnica espectroscópica foi realizada em dois momentos da tese, o estudo da imobilização proteica e a suscetibilidade ao pH.

#### 2.5.7.1 Percentagem de Imobilização de BSA

Primeiramente foram analisadas todas as microcápsulas com BSA, de forma a verificar a percentagem de imobilização conseguida em função de cinco fatores: a carga magnética incorporada e respetiva percentagem, a funcionalização, o tempo de imobilização e o uso de ativador.

O estudo iniciou com a construção da curva de calibração (linha de base), relação entre a concentração do BSA e absorbância, usando várias diluições da solução inicial de BSA e fazendo a sua medição no espectrofotómetro.

A análise das MCs em estudo requereu a preparação prévia das amostras. De cada solução com microcápsulas (seção 2.3.2), foram extraídos 20  $\mu\text{L}$  do solvente que as rodeia, sendo essa porção transferida para *cuvettes* de plástico. A cada *cuvette* foi adicionado 180  $\mu\text{L}$  de MES, diluindo assim 10 vezes o solvente das microcápsulas. Desta nova solução foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  para provetas de vidro. A estas foi acrescentado 2 mL de ácido bicinconínico (BCA), que permite desenvolver um complexo colorido, Figura 13, seguindo-se a sua transferência para novas *cuvettes* e início do ensaio.

A concentração de proteína imobilizada, foi medida no início e no fim de cada ensaio, sendo que a leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda de 562 nm [42].

Este estudo foi feito de 30 em 30 minutos durante as primeiras 3 horas, após o acréscimo de BSA à solução com microcápsulas, sendo posteriormente repetido findo 24 e 48 horas após a adição da proteína.

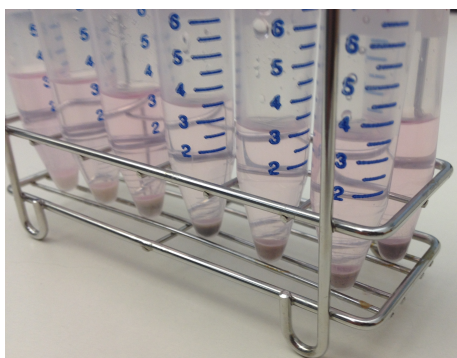


**Figura 13** - Amostras imediatamente antes do ensaio de UV-VIS para a verificação da percentagem de imobilização de BSA nas microcápsulas em estudo.

### 2.5.7.2 Suscetibilidade ao pH

Uma segunda análise foi realizada com as MCs funcionalizadas que foram carregadas com a vitamina B<sub>12</sub>, Figura 14. O UV-VIS permitiu assim averiguar a libertação da VB<sub>12</sub> em função do pH do meio dielétrico, quando o meio é ácido ou básico.





**Figura 14** - Tubos de ensaio com os distintos tipos de microcápsulas mergulhadas na solução de VB<sub>12</sub>.

Antes do ensaio da suscetibilidade ao pH, foram construídas duas linhas de base, uma para cada pH.

De cada tubo foi retirado 2 mL do solvente, solução tampão fosfórico, sendo este transferido para as *cuvettes* de ensaio. Iniciou-se o ensaio e fez-se a leitura da absorbância no comprimento de onda de 361 nm [96].

O estudo da suscetibilidade ao pH foi feito ao fim de 10 minutos, após a adição das soluções tampão com pH ácido ou neutro (seção 2.4.2). O ensaio foi repetido diversas vezes, sendo o tempo entre cada ensaio previamente estipulado.

Ambos os ensaios UV-VIS foram realizados usando como equipamento o espectrofotômetro *Shimadzu* UV-2401 PC de feixe duplo, permitindo fazer a diferença entre a solução e a solução de controlo. Para a primeira análise foi usado MES como solução de controlo, e para a segunda análise foram usadas duas soluções tampão fosfórico com pH 2 e 7.

O ensaio foi operando a uma resolução de 1 nm na gama de comprimentos de onda 400-650 nm, para o estudo de BSA, e 220-400 nm, para o estudo de VB<sub>12</sub>. Para ambas as leituras foram utilizadas *cuvettes* de plástico de 2 mL.



## Capítulo III

### Apresentação e Discussão de Resultados



## 3 Apresentação e discussão de resultados

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos, segundo os procedimentos e técnicas de caracterização enunciadas no capítulo anterior, estando divididos em quatro secções.

Primeiramente, são apresentados os resultados da caracterização efetuada às microcápsulas (MCs) referência de APA6, vazias e com incorporação magnética. É estudada a influência da incorporação magnética, tipo de partículas magnéticas e as suas percentagens, nas características morfológicas e térmicas das MCs. Estes resultados, servem como base comparativa para as restantes secções.

Na segunda secção, são expostos os resultados relativos ao estudo da influência da funcionalização nas propriedades das MCs referência. As MCs funcionalizadas são analisadas quanto à sua morfologia e propriedades térmicas, sendo ainda investigada a quantidade de grupos carboxílicos (COOH) incorporados nas MCs pelo enxerto de ácido acrílico (AA).

Uma terceira secção é reservada ao estudo das MCs com a proteína albumina de soro bovino (BSA) imobilizada, sem interferência de um ativador e com a influência do ativador N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC). Assim, é avaliada a percentagem de BSA imobilizada segundo o efeito: das partículas magnéticas e suas percentagens, da funcionalização, do ativador e do tempo de imobilização.

Por fim, é estudada a suscetibilidade das MCs funcionalizadas quando sujeitas a mudanças do pH do meio que as envolve.

### 3.1 Microcápsulas Referência

#### 3.1.1 Resultados da síntese de microcápsulas de APA6 e APA6/magnética

As reacções de síntese das microcápsulas de APA6, vazias e com incorporação de cargas magnéticas, realizadas a partir da polimerização aniónica ativada por abertura de ciclo da  $\epsilon$ -caprolactama, decorreram com sucesso e de forma controlada.

Na Tabela 5 são apresentados os rendimentos obtidos e as percentagens teóricas das partículas magnéticas encapsuladas em cada uma das sínteses.

**Tabela 5** - Rendimento das reações de síntese das microcápsulas de APA6 e percentagem esperada de incorporação magnética.

Tipo de Microcápsulas	Carga em relação a $\epsilon$ -CL (%)	Rendimento de AAROP (%)	Carga Esperada (%)
PAMC	-	37.70	-
Fe_1%	1	49.80	2.01
Fe_3%	3	41.00	7.25
Fe_5%	5	60.00	8.29
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%	1	43.87	2,28
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%	3	72.00	7,03
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%	5	59.70	8.34

A reação de polimerização das microcápsulas vazias de APA6 (PAMC) resultou num rendimento de 37.7%, já nas sínteses das microestruturas com cargas no núcleo obtiveram-se rendimentos entre os 41 e 72%. Os rendimentos das sínteses com Fe e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> análogos ao das PAMC demonstram que as partículas magnéticas não impedem o processo de polimerização aniônica.

Relativamente à percentagem esperada de incorporação das partículas magnéticas, esta foi calculada através da Equação 10.

$$\% \text{ Carga Esperada Incorporada} = \frac{M_{\text{Magnética}}}{M_{\text{APA6/Magnética}}} \times 100$$

Onde,

$M_{\text{Magnética}}$  - massa da carga inicial da síntese

$M_{\text{APA6/Magnética}}$  - massa das microcápsulas de APA6 com cargas, obtidas na síntese

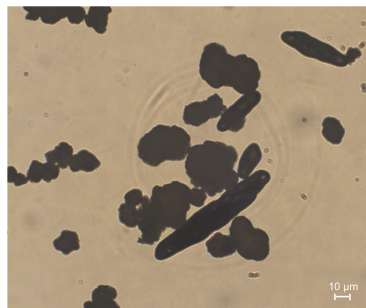
### 3.1.2 Microscopia ótica de campo claro

O recurso à microscopia ótica de campo claro permitiu fazer uma análise granulométrica, pela distribuição de tamanhos das MCs, particularmente quanto ao seu diâmetro do círculo equivalente e à sua esfericidade.

Para uma partícula não esférica a sua dimensão pode ser determinada a partir do diâmetro do círculo equivalente (DCE), que define o diâmetro de uma partícula hipoteticamente esférica.

A esfericidade ( $\phi$ ), resume a relação entre a área da superfície de uma esfera (com o mesmo volume que a partícula em estudo) e a superfície real da partícula em estudo, medindo o quão esférica é a partícula. Para uma esfera,  $\phi = 1$  [102].

A análise por microscopia ótica de campo claro permitiu observar que as dimensões das MCs com cargas magnéticas incorporadas, altera em função do tipo de carga integrada, e das dimensões e formas dessas partículas magnéticas. O Fe e o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  por serem partículas esféricas de pequenas dimensões, respetivamente na ordem dos micro e nano, são envolvidas pela APA6 gerando microestruturas esferoides isoladas ou agregados de diversos tamanhos, Figura 15. Evidencia-se ainda que no caso das MCs com incorporação de Fe surgem microestruturas cuja forma se assemelha a bastões, Figura 15, sendo estas uma consequência da agitação magnética utilizada no processo de polimerização, em que ocorre o encapsulamento de partículas de Fe magnetizadas que se uniram de forma orientada.



**Figura 15** - Imagem obtida por microscopia ótica de campo claro das microcápsulas referência de APA6 contendo partículas de ferro no seu interior.

Após a captura das imagens panorâmicas de cada amostra, o software *Leica Application Suite* quantifica o número de microestruturas presentes numa dada amostra e calcula para cada uma delas o seu diâmetro do círculo equivalente e a esfericidade. Estes parâmetros permitiram a construção de histogramas, em que as suas classes são apresentadas em função da frequência do número de partículas.

As Figura 16 e 17 mostram os histogramas construídos com os resultados obtidos do DCE e esfericidade, respectivamente, das microcápsulas de APA6 vazias e com incorporação magnética.

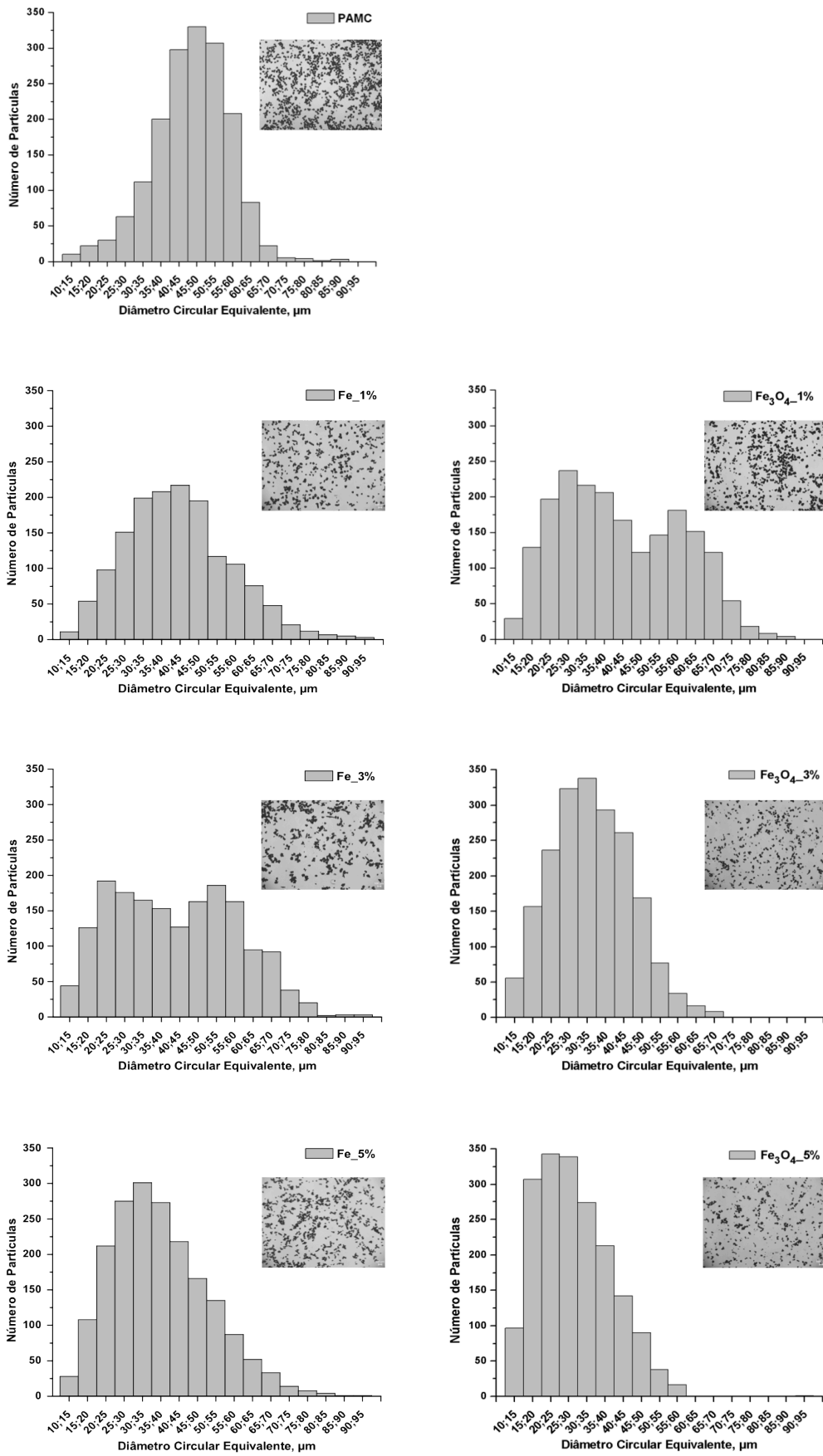


Figura 16 - Histogramas de frequência do diâmetro do círculo equivalente das microcápsulas referência de APA6.



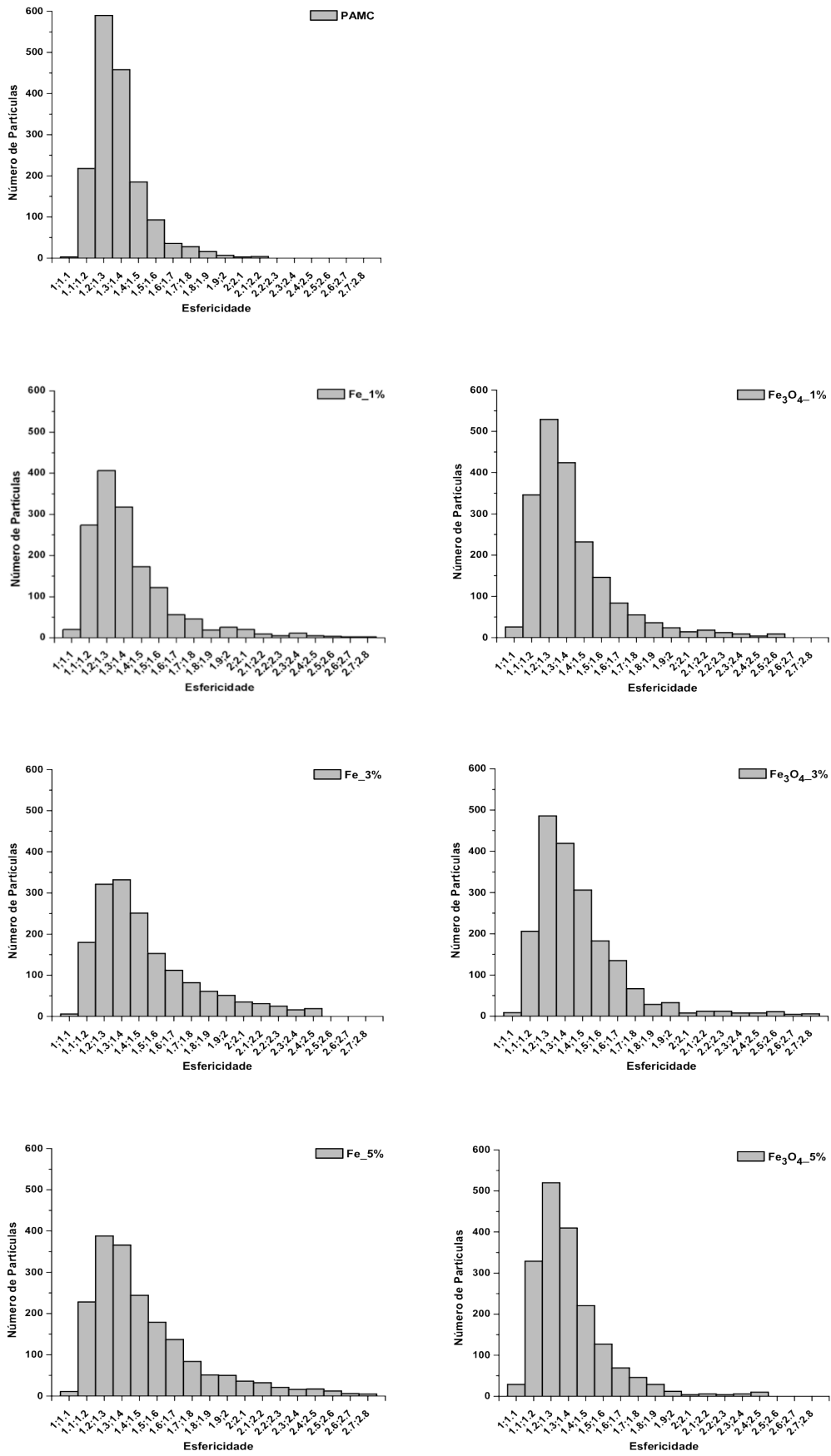


Figura 17 - histogramas de frequência da esfericidade das microcápsulas referência de APA6.

De acordo com os dados obtidos, o método de polimerização *in-situ* utilizado possibilitou a obtenção de MCs de APA6, vazias e carregadas com Fe e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, com uma granulometria aproximada, Tabela 6.

Pode-se assumir que todas as amostras exibem um diâmetro do círculo equivalente entre 10-95 µm. Os histogramas de valores do DCE das MCs apresentam uma distribuição normal, excetuando as MCs com 3% de incorporação de Fe e com 1% de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> incorporado, que mostram uma distribuição bimodal. É ainda possível verificar que, o aumento da dimensão das MCs é proporcional ao aumento da percentagem de incorporação de partículas de Fe e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

No que se refere à esfericidade, todas as MCs referência apresentam uma distribuição normal salientando-se as MCs vazias cuja distribuição é a mais estreita. Nas MCs com núcleo de Fe, o aumento da percentagem incorporada desta carga é proporcional com o aumento da dispersão da esfericidade, devido ao aparecimento de microestruturas em forma de bastões. Por outro lado, os histogramas das MCs com incorporação de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> em diferentes percentagens apresentam uma dispersão da esfericidade idêntica.

**Tabela 6** - Valores médios do diâmetro do círculo equivalente e esfericidade das microcápsulas referência de APA6.

	Diâmetro do círculo equivalente médio (µm)	Esfericidade média
PAMC	40-55	1.2-1.4
Fe_1%	30-50	1.2-1.4
Fe_3%	20-30 ; 45-60	1.2-1.4
Fe_5%	20-45	1.2-1.4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%	20-35 ; 50-65	1.2-1.4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%	25-40	1.2-1.4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%	15-35	1.2-1.4

### 3.1.3 Microscopia Eletrónica de Varrimento

A interação entre o feixe de electrões com a superfície da amostra resulta na emissão de electrões secundários, electrões retrofundidos e os raios-X característicos. Os primeiros, electrões secundários, são pouco energéticos tendo origem nas camadas mais superficiais das amostras fornecendo informações sobre a topografia da superfície. Por outro lado, os segundos são mais energéticos e facultam a informação do contraste que se relaciona qualitativamente

com a composição química da amostra [103][104]. Já os raios-X emitidos pela amostra permitem identificar e quantificar os elementos presentes na amostra [104].

A análise de microscopia eletrônica de varrimento, além de complementar o estudo granulométrico, permite ainda avaliar a porosidade das microestruturas e a eventual presença de agregados formados. Assim, foram selecionadas algumas amostras para este ensaio nomeadamente as MCs vazias, MCs com 3% de Fe integrado e MCs com 3% de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  incorporado.

As partículas magnéticas de Fe e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresentaram morfologias distintas, Figura 18. As partículas de Fe são redondas e bem definidas, já as de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apesar de serem mais pequenas por vezes agregam-se formando uma estrutura compacta porém é possível verificar pequenas partículas soltas deste material.

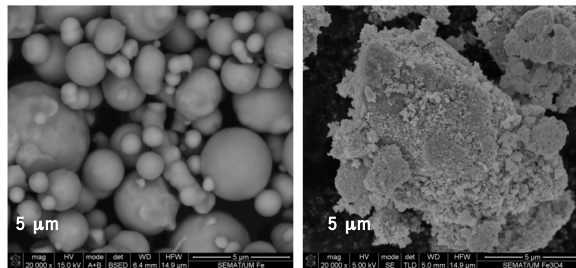


Figura 18 - Imagens SEM das partículas magnéticas, da esquerda para a direita, Fe e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

A Figura 19 apresenta a morfologia das microcápsulas vazias a várias ampliações.

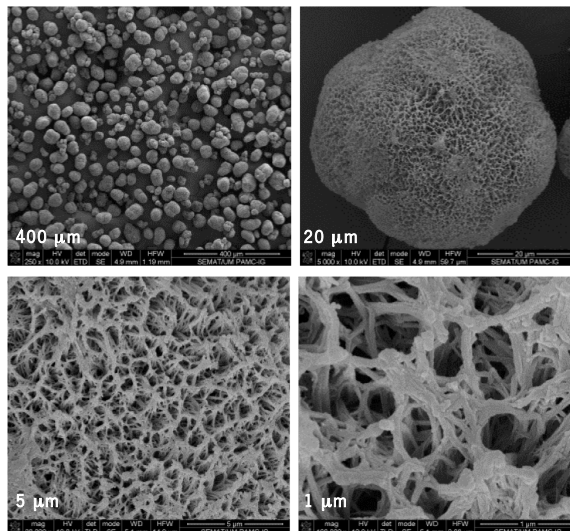


Figura 19 - Imagens SEM das microcápsulas referência vazias de APA6 a várias ampliações.

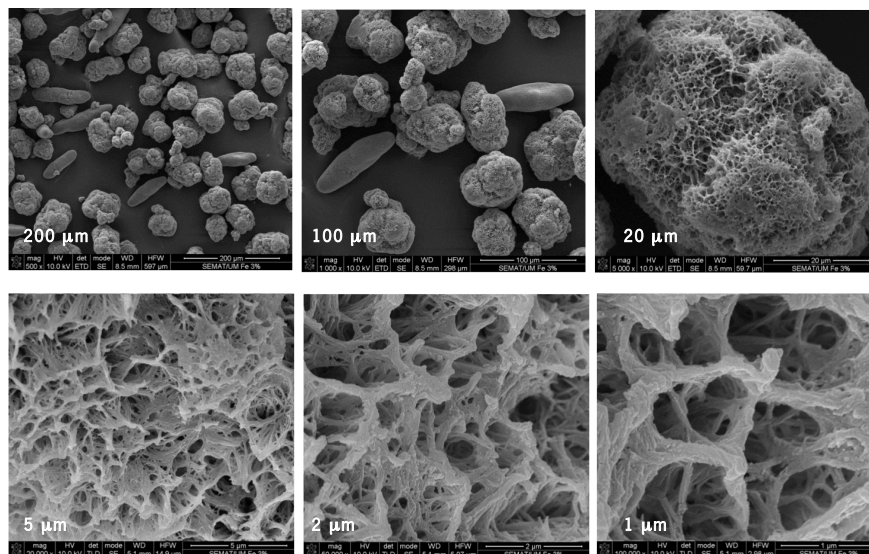
Observa-se que as MCs vazias de APA6, PAMC, são estruturas altamente porosas, do tipo *scaffold*, conseqüentes da síntese conduzida na presença do solvente, que ao ebulir liberta

bolhas de gás que rebentam e voltam a formar-se, impossibilitando que o polímero ocupe esses espaços. Os poros das MCs vazias apresentam diversos tamanhos, que segundo a amostra ampliada apresentam dimensões médias de 825 nm.

Tal como comprovam os resultados obtidos na microscopia ótica de campo claro, as MCs vazias possuem uma estrutura globular que se aproxima de uma forma esférica. Esta configuração nas PAMC é resultante do seu método de síntese, uma vez que a adição do sistema catalítico se dá em duas partes, levando a que ocorram duas polimerizações. A primeira polimerização acontece aquando a adição da primeira parte do sistema catalítico e, o acréscimo da segunda parte despoleta uma segunda polimerização que se consuma à volta das microestruturas já formadas. Em suma, os agregados surgem através da junção de várias MCs com diferentes tamanhos.

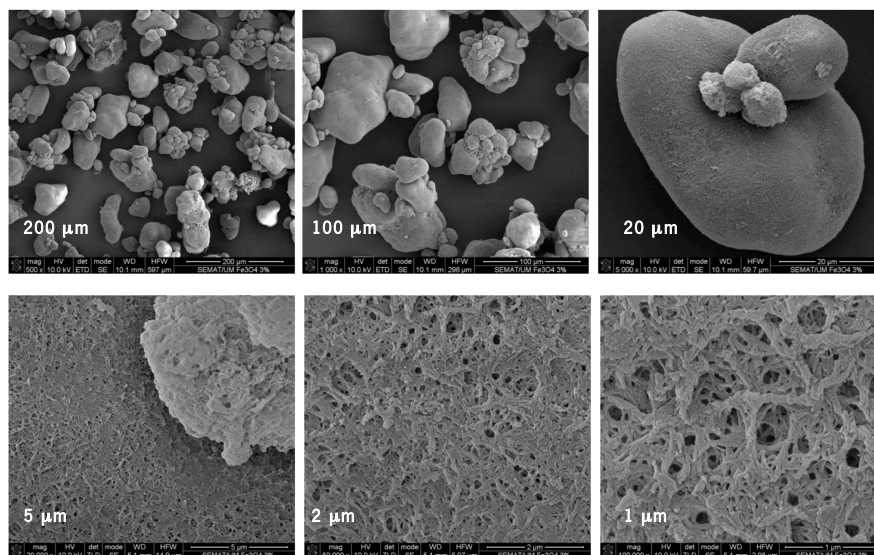
O mesmo processo de polimerização é usado no fabrico das MCs com incorporação de partículas magnéticas, Fe e  $Fe_3O_4$ , observando-se configurações similares.

Devido à agitação do sistema catalítico, as microestruturas poliméricas que vão crescendo durante a polimerização chocam não só umas com as outras, mas também com as partículas magnéticas presentes na suspensão. Logo, a partir dos glóbulos de polímero, são originados centros de crescimento pela adesão das cargas magnéticas à sua superfície. À medida que estes glóbulos se formam, podem colidir entre si, formando agregados de glóbulos com partículas magnéticas no seu interior.



**Figura 20** - Imagens SEM das microcápsulas referência de APA6 com incorporação de 3% de Fe a várias ampliações.

A Figura 20, apresentam a morfologia da superfície das MCs com incorporação de 3% de Fe. Quando comparadas com as MCs vazias, ambas apresentam configurações agregacionais idênticas, porém, as partículas de Fe magnetizadas pelo sistema de agitação magnético aquando a síntese, unem-se de forma orientada assemelhando-se a bastões. Os seus poros apresentam dimensões médias de 600 nm.



**Figura 21** - Imagens SEM microcápsulas referência de APA6 com incorporação de 3% de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a várias ampliações.

Também as microestruturas com 3% de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  incorporado apresentam formas igualmente semelhantes às MCs vazias, Figura 21, todavia, são notórias as diferenças superficiais. Os poros das MCs com  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  são mais pequenos quando comparados com as restantes MCs em estudo, tendo uma média de 175 nm, revelando um elevado grau de cristalinidade.

É de salientar que as imagens apresentadas referem-se a uma única microcápsula, vazia ou com incorporação de partículas magnéticas, que por sua vez foi ampliada numa só zona. Assim, ao ampliar outra zona da mesma microcápsula a média de tamanho dos poros pode alterar.

A análise EDAX efetuada sobre as MCs de APA6 com cargas magnéticas incorporadas, permitiu afirmar que as cargas se encontram efetivamente no interior das microestruturas. Por exemplo, na Figura 22 é apresentado o gráfico da análise EDAX sobre as partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , e na Figura 23 a análise realizada diretamente sobre a superfície de uma microcápsula com  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  incorporado em dois pontos distintos: ponto Z1 à superfície da microcápsula; e no ponto Z2 no interior da microcápsula. Como se pode verificar em ambos os pontos não é detectável a presença da carga.

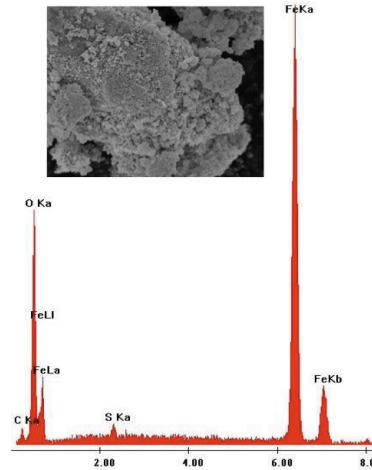


Figura 22 - Gráfico EDAX sobre as partículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

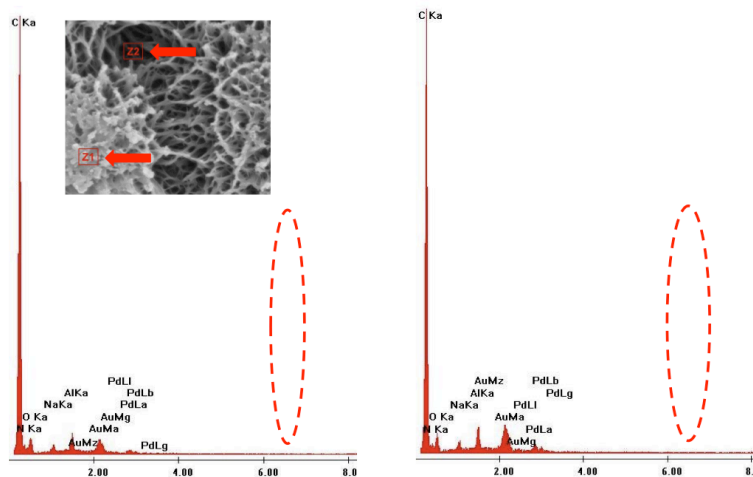


Figura 23 - Gráficos EDAX sobre dois pontos de uma microcápsula de APA6 com  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  incorporado. Da esquerda para a direita: gráfico do ponto Z1 na superfície da microcápsula, gráfico do ponto Z2 no interior do poro.

Em suma, as características morfológicas destas microestruturas alargam o espectro de aplicações das MCs de APA6 vazias e com cargas magnéticas, uma vez que toda a sua superfície contém grupos funcionais que podem ser modificados de forma a possuir uma dada propriedade ou desempenhar uma determinada função.

### 3.1.4 Calorimetria diferencial de varrimento

A Tabela 7 apresentada os resultados da análise de calorimetria diferencial de varrimento realizada a todas as MCs referência.

Em ambos os aquecimentos, a inclusão de partículas magnéticas nas MCs de APA6 altera ligeiramente a temperatura de fusão ( $T_f$ ), registando-se um aumento de 3 a 5°C, quando estão incorporadas partículas de Fe, e de 2 a 9°C quando usadas partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

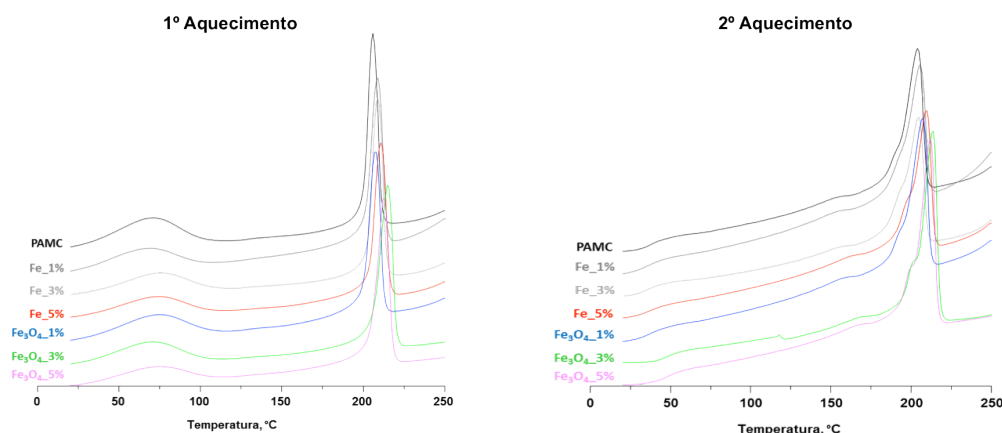
Tabela 7 - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas referência de APA6 - 1<sup>ª</sup> e 2<sup>ª</sup> Aquecimento.

Tipo de Microcápsulas	1 <sup>ª</sup> Aquecimento				2 <sup>ª</sup> Aquecimento			
	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>f</sub> (°C)	ΔH <sub>f</sub> (J/g)	χ <sub>c</sub> (%)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>f</sub> (°C)	ΔH <sub>f</sub> (J/g)	χ <sub>c</sub> (%)
PAMC	-	205.9	79.24	41.71	35.8	204.2	34.89	18.36
Fe_1%	-	208.7	82.45	43.39	33.3	205.5	35.76	18.82
Fe_3%	-	208.8	78.63	41.38	32.7	204.8	33.29	17.52
Fe_5%	-	211.1	74.35	39.13	40.9	209.6	35.25	18.55
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%	-	207.5	78.29	41.21	43.6	207.4	38.28	20.15
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%	-	215.1	87.67	46.14	44.4	213.6	43.96	23.14
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%	-	212.5	83.80	44.11	47.4	212.1	43.40	22.84

No primeiro aquecimento, não é possível registar valores associados à temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>). Já no segundo aquecimento a T<sub>g</sub> aumenta na presença das partículas magnéticas, principalmente nas MCs com Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> incorporado apresentando um acréscimo até 9.2 °C. Este fenómeno pode ser justificado pela presença de oxigénio no Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> possibilitando assim mais ligações do tipo pontes de hidrogénio entre a carga e as macromoléculas de APA6, consequentemente, a carga restringe os movimentos das macromoléculas sendo necessária mais energia para libertar essas ligações formadas.

Os valores do grau de cristalinidade (χ<sub>c</sub>), calculados a partir dos valores da variação da entalpia de fusão, são muito próximos em todas as MCs em estudo. As condições do processo de síntese possibilitam a obtenção de MCs com um grau de cristalinidade superior ao encontrado na PA6 comercial, e, também devido a essas condições a presença das partículas magnéticas não interferem no processo de cristalização. Destaca-se o caso particular das microestruturas com 3% de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> incorporado, em que estas partículas promovem uma maior cristalização que as MCs de APA6 vazias aumentando o χ<sub>c</sub> em 4.4%. Este aumento pode estar associado às características morfológicas das partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, uma vez que a sua dimensão reduzida pode fazer com que atuem como agentes de nucleação, acelerando o processo de cristalização e resultando numa fração mássica cristalina mais elevada. Observa-se ainda, que o χ<sub>c</sub> de todas as MCs em estudo diminuiu significativamente no segundo aquecimento. Tal acontece, pois a velocidade de arrefecimento estabelecida para os ensaios (20 °C/min), entre o primeiro e o segundo aquecimento, foi mais rápida quando comparada com as condições de

síntese, onde as MCs de APA6 estiveram várias horas a temperaturas elevadas, possibilitando uma cristalização maior.



**Figura 24** - Curvas de DSC das microcápsulas referência de APA6 durante o primeiro e segundo aquecimento.

Na Figura 24 estão apresentados os termogramas referentes ao primeiro e segundo aquecimento, resultantes das análises de DSC realizadas às MCs de APA6 vazias e com incorporação magnética, verificando-se entre os dois aquecimentos uma alteração na forma dos gráficos.

O termograma do primeiro aquecimento apresenta um patamar inicial entre os 30 e 100 °C, aproximadamente, que impede o cálculo da  $T_g$ . Trata-se de um processo físico que engloba a  $T_g$ , desaparecendo após o primeiro aquecimento, assim permite concluir que se trata da eliminação de uma substância absorvida pelas MCs ou uma relaxação. Averigua-se ainda que no primeiro aquecimento surge apenas um pico de fusão, enquanto que no segundo aquecimento os termogramas apresentam dois picos de fusão, estando o primeiro entre os 195 e 202 °C. Estes picos devem-se à presença das duas formas cristalinas características da poliamida 6, o primeiro pico, de menor temperatura, é correspondente à sua forma  $\gamma$ , e o segundo, mais energético, referente à sua forma  $\alpha$ . A forma  $\gamma$  é composta por pontes de hidrogénio existentes entre as cadeias paralelas e surge devido ao arrefecimento mais brusco ou a uma menor temperatura e cristalização, já a forma  $\alpha$  é formada por pontes de hidrogénio existentes entre as cadeias antiparalelas apresentando uma estrutura cristalina mais organizada, resultante de um arrefecimento lento ou de temperaturas de cristalização mais elevadas. Normalmente estas duas formas cristalinas coexistem, sendo uma predominante em relação à outra conforme as condições de obtenção das amostras.

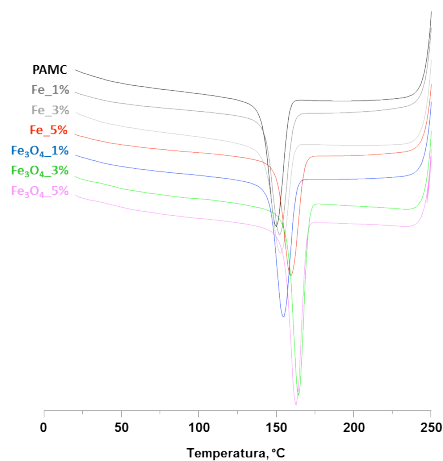


Como no primeiro aquecimento só existe um pico de fusão, entre 205.9 e 215.1°C, torna-se evidente que a forma cristalina predominante resultante do processo de síntese é a forma  $\alpha$ , porém depois da primeira fusão seguida de arrefecimento, verifica-se um polimorfismo, passando a estar presentes as formas  $\gamma$  e  $\alpha$ . Salienta-se ainda, que no segundo aquecimento o pico da forma  $\gamma$  é mais evidente nas MCs com incorporação de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nas percentagens de 3% e 5%, indicando que esta carga magnética favorece a formação da forma  $\gamma$  de APA6 poliamorfo.

Também é possível ver, nos dois aquecimentos, que ocorre uma deslocação horizontal dos picos de fusão. Este fenómeno acontece em ambas as cargas magnéticas, apesar de se verificar uma maior deslocação nas MCs com núcleo de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . O acréscimo da percentagem incorporada de carga leva assim a uma deslocação dos picos no sentido crescente, ou seja, a um aumento da temperatura de fusão.

**Tabela 8** - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas referência de APA6 - arrefecimento.

Arrefecimento		
Tipo de Microcápsulas	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)
PAMC	149.9	-47.18
Fe_1%	152.3	-47.06
Fe_3%	152.8	-45.29
Fe_5%	159.5	-46.31
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ _1%	154.6	-49.49
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ _3%	164.5	-57.41
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ _5%	162.7	-56.95



**Figura 25** - Curvas de DSC das microcápsulas referência de APA6 durante o arrefecimento.

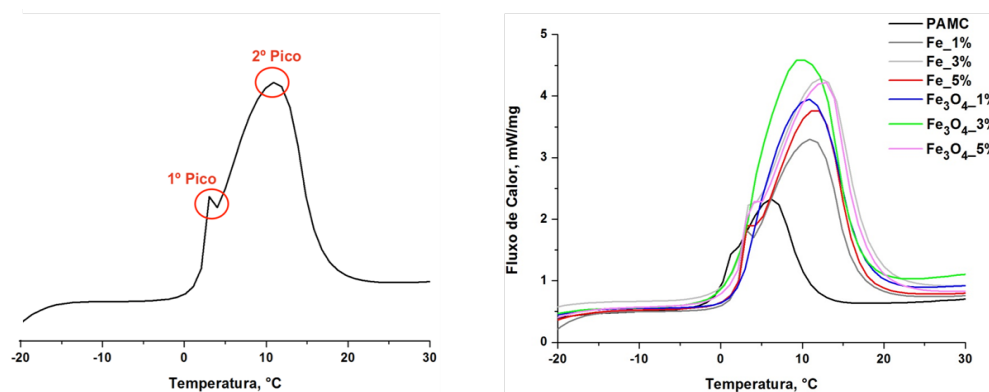
A temperatura de cristalização ( $T_c$ ) das MCs magnéticas é superior à das MCs vazias, indicando que as partículas magnéticas usadas antecipam a recristalização, fazendo com que esta ocorra a temperaturas mais elevadas, Tabela 8 e Figura 25. Assim, as partículas magnéticas facilitam a cristalização após fusão, favorecendo a formação da gama poliamorfa da PA6.

#### 3.1.4.1 Calorimetria diferencial de varrimento a baixas temperaturas

As microcápsulas foram analisadas por DSC a temperaturas baixas de forma a quantificar os seus poros e avaliar os respetivos tamanhos. Contrariamente ao SEM, que permite avaliar a porosidade superficial das microestruturas numa dada zona de ampliação, esta técnica possibilita o estudo da porosidade global das MCs, ou seja, esta é avaliada desde a superfície ao núcleo.

Conforme referido no capítulo 2, cada amostra foi submersa em água durante 24h sendo escurridas imediatamente antes do ensaio. Posteriormente, as microcápsulas foram sujeitas somente a um aquecimento num intervalo de temperaturas de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com uma velocidade de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Apesar de absorvido o excesso de água nas MCs, alguma parte penetrou nos poros das microestruturas congelando aquando o início do ensaio, a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Atingidos os  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a água retida nos poros das microcápsulas funde, saindo lentamente.

Os gráficos obtidos neste intervalo de temperaturas apresentam uma forma diferente, revelando-se tipicamente dois picos, Figura 26. Teorizou-se que o primeiro pico corresponderia à fusão da água contida nos poros superficiais ou de pouca profundidade das MCs, enquanto que o segundo pico iria corresponder ao mesmo processo nos poros mais profundos das microestruturas. Assim, quanto mais confinada estiver a água mais alta será a temperatura de fusão registada.



**Figura 26** - Curvas DSC a temperaturas baixas realizado às microcápsulas referência de APA6. Da esquerda para a direita: curva ilustrativa dos picos em estudo e curvas obtidas nas microcápsulas.

Na Tabela 9 estão apresentadas as temperaturas correspondentes a cada pico e a soma da variação de entalpia de fusão dos dois picos.

**Tabela 9** - Resultados numéricos do DSC a temperaturas baixas realizado às microcápsulas referência de APA6.

Tipo de Microcápsulas	T <sub>1</sub> (°C)	T <sub>2</sub> (°C)	ΔH <sub>1+2</sub> (J/g)
PAMC	1.2	6.9	71.7
Fe_1%	3.2	11.1	161.8
Fe_3%	3.5	12.1	202.2
Fe_5%	3.6	11.6	163.2
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%	4.5	10.7	170.5
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%	-	9.7	204.6
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%	3.6	12.6	202.0

Interpretação da Tabela 9:

T<sub>1</sub> - Temperatura de fusão associada ao primeiro pico;

T<sub>2</sub> - Temperatura de fusão associada ao segundo pico;

ΔH<sub>1+2</sub> - Variação de entalpia dos dois picos das temperaturas de fusão.

Analisando as microcápsulas vazias, verifica-se que a fusão da água contida nos poros mais superficiais das mesmas ocorre a 1.2 °C, e, o mesmo fenómeno para os poros mais profundos acontece a 6.9 °C. Os dados obtidos mostram que a estrutura das MCs de APA6 é bastante complexa, apresentado vários níveis de porosidade, sendo que estes representam um constrangimento na deslocação da água e conseqüente fusão.

A incorporação magnética leva ao aumento das temperaturas de ambos os picos, assumindo-se que as partículas magnéticas formam ligações do tipo pontes de hidrogénio com a

água, requerendo temperaturas mais elevadas para a sua fusão. Denota-se que o incremento da temperatura correspondente ao primeiro pico, aumenta com o incremento da percentagem de incorporação, mas o mesmo não se pode afirmar para o segundo pico, não existindo um padrão delimitado.

Comparando ambas as cargas magnéticas, com a incorporação de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  é necessária mais energia para a fusão da água confinada, quer nos poros superficiais quer nos mais profundos. Esta carga tem mais possibilidades de fazer ligações do tipo pontes de hidrogénio com a água, devido ao oxigénio nela presente, denotando-se diferenças na posição e forma dos picos de ambas as temperaturas. Também a sua morfologia pode afetar a energia de fusão, isto porque as partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  são mais pequenas que as de Fe podendo-se dispersar melhor nos poros das MCs.

Os resultados obtidos confirmam a porosidade das MCs referência, provando que o seu interior é igualmente constituído por poros que aparentam ter diversas formas e tamanhos. O formato dos picos revela diferenças na granulometria das MCs, assim, quanto mais estreita a forma do pico mais estreita é a distribuição dos tamanhos e formas dos poros, e vice-versa. As MCs vazias apresentam curvas diferentes das MCs magnéticas, aparentando uma capacidade menor na retenção de água e conseqüente entalpia de fusão menor.

### 3.1.5 Análise termogravimétrica

No presente estudo, a análise termogravimétrica foi realizada de forma a controlar a degradação térmica das microcápsulas. Pretende-se ainda conhecer as quantidades reais de cargas magnéticas constituintes dos produtos em pó, avaliando assim a eficácia do método de síntese das MCs de APA6 contendo no seu núcleo partículas magnéticas em diferentes percentagens, e se estas influenciam a degradação térmica.

Os resultados numéricos foram obtidos através do tratamento gráfico das curvas de retenção da massa das amostras recolhidas no TGA, Figura 27, e são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados numéricos do TGA realizado às microcápsulas referência de APA6.

Tipo de Microcápsulas	T <sub>10%</sub> (°C)	T <sub>V máx</sub> (°C)	V <sub>máx</sub> (%/°C)	R <sub>FD</sub> (%)	Carga Efetiva (%)
PAMC	306	354.47	2.18	1.31	-
Fe_1%	309	343.44	1.78	2.31	1.00
Fe_3%	308	354.97	2.26	5.62	4.31
Fe_5%	316	352.2	2.24	7.47	6.16
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%	314	344.83	2.39	2.14	0.83
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%	344	429.54	1.01	2.89	1.58
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%	340	368.81	1.49	4.25	2.94

Interpretação da Tabela 10:

T<sub>10%</sub> - Temperatura onde se registou 10% de perda de massa;

T<sub>V máx</sub> - Temperatura em que a velocidade de degradação foi máxima;

V<sub>máx</sub> - Velocidade de degradação máxima;

R<sub>FD</sub> - Resíduo no final da degradação;

Carga Efetiva - Carga magnética real incorporado nas MCs, calculado pela diferença entre o resíduo no final da degradação das MCs vazias e o resíduo no final de cada amostra de MCs incorporadas com carga.

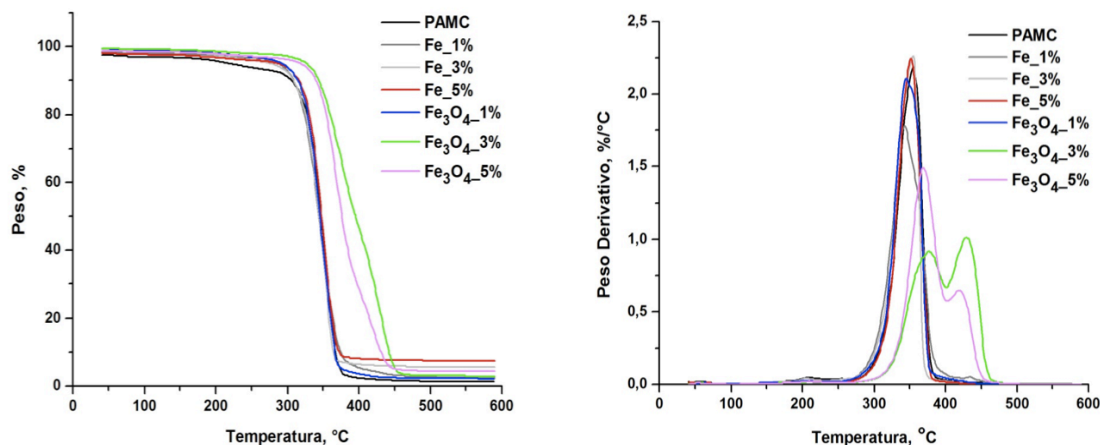


Figura 27 - Curvas do TGA realizado às microcápsulas referência de APA6. Da esquerda para a direita: curvas integrais da degradação térmica e velocidade de degradação térmica correspondente.

A Figura 27 ilustra as curvas integrais de degradação térmica e de velocidade de degradação térmica das MCs vazias e das MCs com incorporação magnética.

Os resultados apresentados e as curvas termogravimétricas obtidas, mostram que a incorporação de cargas magnéticas aumenta a estabilidade térmica das microcápsulas alterando a forma como o polímero se degrada termicamente.

A incorporação de Fe nas MCs não influencia significativamente a degradação da APA6, porém o aumento da percentagem incorporada de Fe faz com que aumente em 10 °C a temperatura onde se registou 10% de perda de massa.

Já as MCs com incorporação de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nas percentagens de 3 e 5% apresentaram um aumento relevante na estabilidade térmica, apresentando uma  $T_{v \text{ máx.}}$  de 75 °C e 14 °C, respetivamente. Assume-se assim que a presença de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  muda o mecanismo de termodegradação das MCs, daí a existência de múltiplos picos nas curvas da velocidade de degradação.

A carga de incorporação magnética nas MCs referência, determinado a partir do peso da  $\epsilon$ -caprolactama, difere dos valores obtidos para a carga efetiva, por sua vez calculado pela diferença entre o resíduo no final de degradação das MCs magnéticas e o resíduo obtido nas MCs vazias. Este fenómeno é explicado pela aderência das partículas de Fe e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ao agitador magnético, impedindo a sua inclusão nas MCs. Desta forma, nos textos seguintes quando referido as microcápsulas com 1% de Fe sabe-se que na realidade a percentagem incorporada é de 1%, nas MCs com designação de 3% de Fe a percentagem real incorporada é de 4.31%, procedendo-se de igual forma para as restantes percentagens e carga magnética.

Estes resultados demonstram que, a inclusão de partículas magnéticas nas microcápsulas não impede o processo de polimerização aniónica, ocorrendo melhorias das suas estabilidades térmicas e conseqüente desaceleração da taxa de degradação.

### 3.3 Microcápsulas Funcionalizadas

#### 3.3.1 Microscopia ótica de campo claro

As MCs funcionalizadas com ácido acrílico foram analisadas por microscopia ótica de campo claro, de forma a estudar a influência da funcionalização (F) na granulometria das MCs referência.

Na Figura 28 e 29 são apresentados os histogramas construídos para o diâmetro do círculo equivalente e a esfericidade, respectivamente, das MCs funcionalizadas.

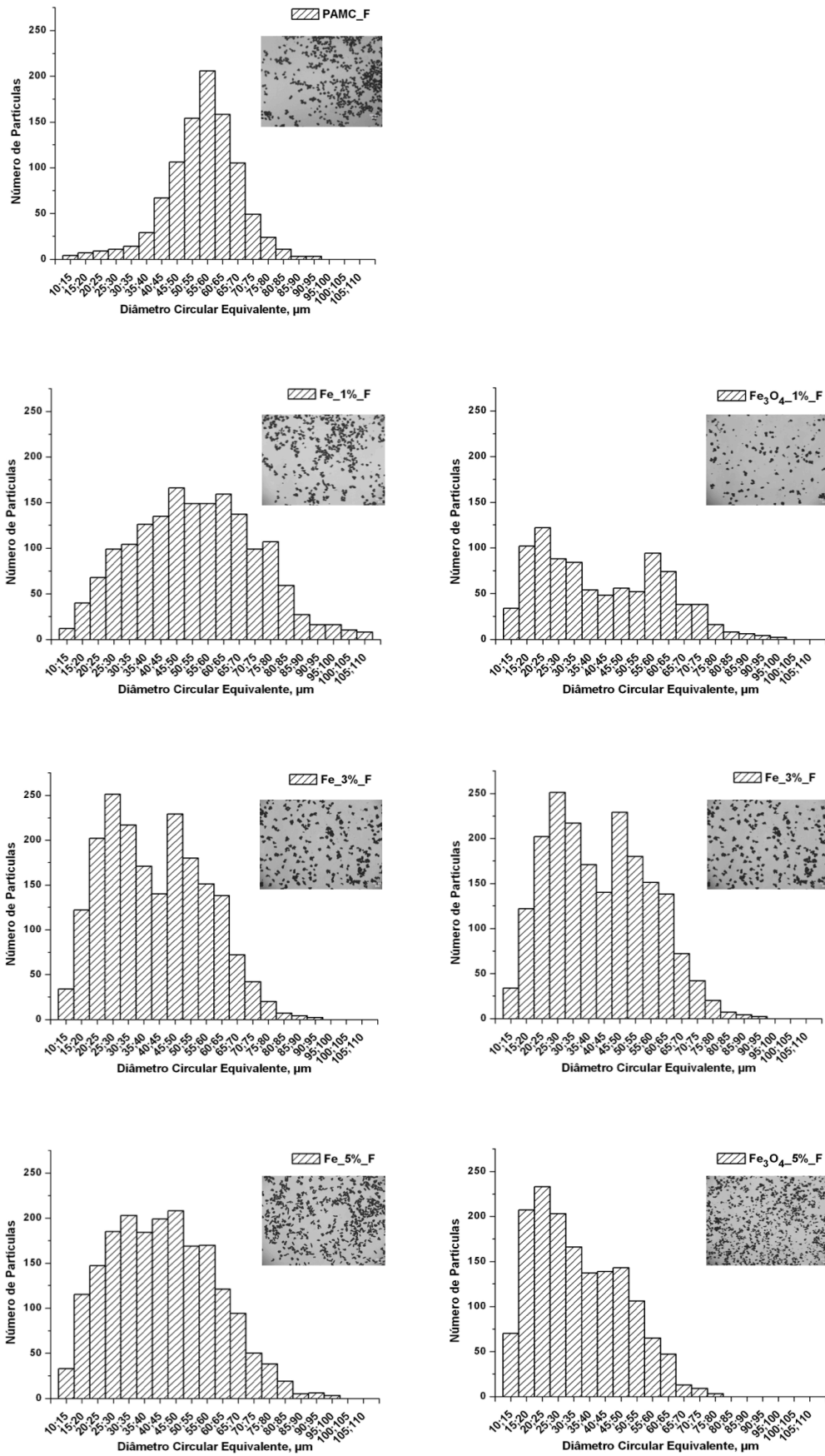


Figura 28 - Histogramas de frequência do diâmetro do círculo equivalente das microcápsulas de APA6 funcionalizadas.

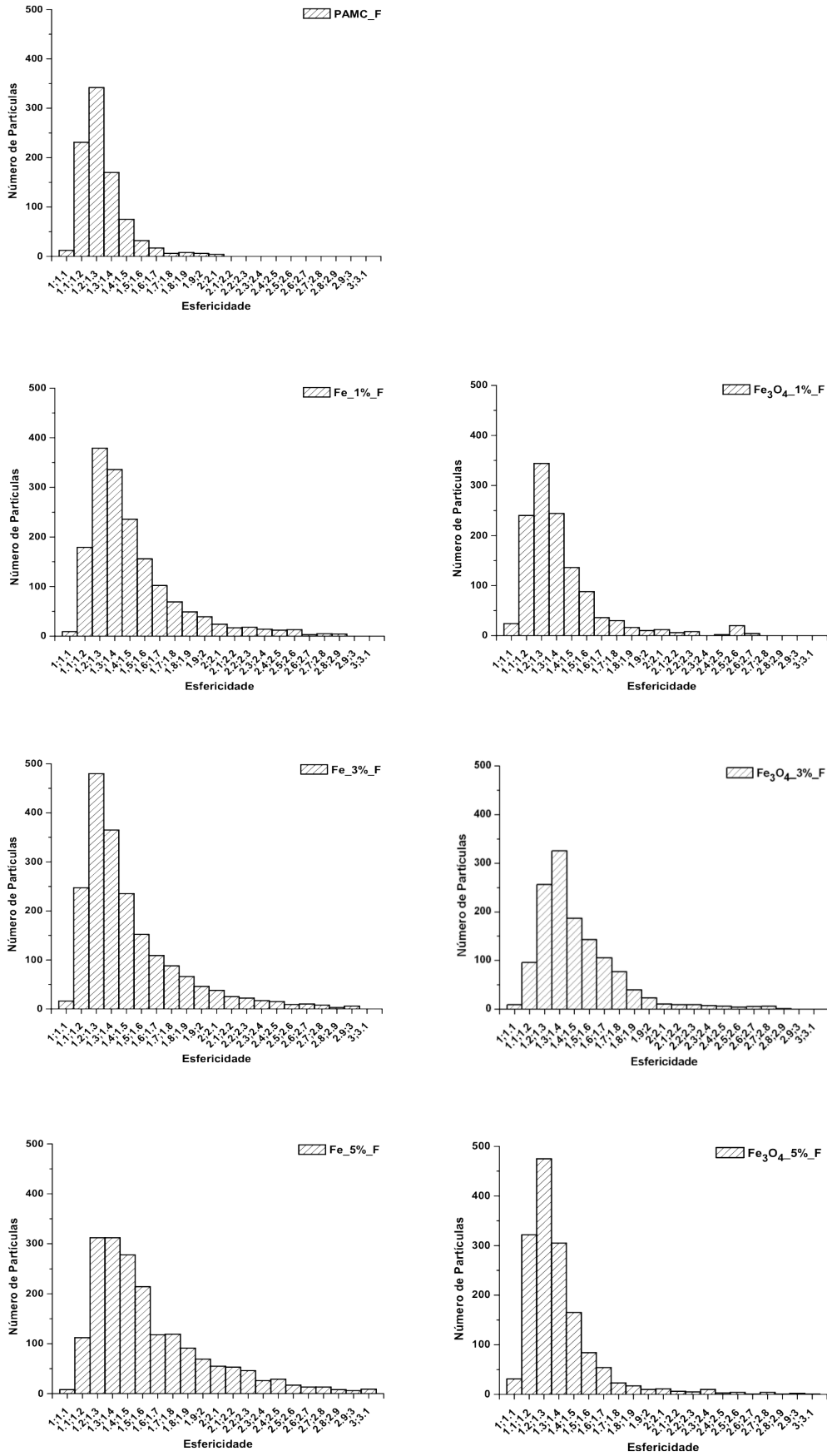


Figura 29 - Histogramas de frequência da esfericidade das microcápsulas de APA6 funcionalizadas.



É visível uma diferença na distribuição dos valores de DCE e da esfericidade, quando comparados com os obtidos nas MCs referência (Figura 16 e 17), sugerindo que com a funcionalização há o aparecimento de mais tamanhos e formas de MCs.

Os histogramas de DCE denotam uma distribuição mais alargada dos seus valores. Uma justificação possível para o acréscimo das microestruturas com menor DCE, passa pelo processo de funcionalização utilizado. Aquando a funcionalização, é usado um sistema de agitação magnética, podendo este ser responsável pela desagregação de aglomerados em microestruturas de menor tamanho, ainda antes de nestas serem enxertadas as ramificações de poli(ácido acrílico) (PAA-G). Por outro lado, o PAA-G à superfície das MCs referência faz com que estas aumentem o seu tamanho e conseqüente DCE, apresentando um acréscimo máximo de 10  $\mu\text{m}$ .

A estrutura não esférica das MCs referência tem também um papel preponderante na esfericidade das microestruturas funcionalizadas, pois as primeiras assumem várias formas e tamanhos, podendo esta distorção levar a uma não uniformidade do enxerto de ramificações de PAA na superfície das MCs. Assim, a esfericidade média aumentou o seu limite superior de 1.4 para 1.5 nas MCs com incorporação de 5% de Fe e 3% de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Os resultados dos valores médios obtidos no diâmetro do círculo equivalente e na esfericidade são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11** - Valores médios do diâmetro do círculo equivalente e esfericidade das microcápsulas de APA6 funcionalizadas.

	<b>Diâmetro do círculo equivalente médio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Esfericidade média</b>
PAMC_F	50-65	1.1-1.4
Fe_1%_F	45-65	1.2-1.3
Fe_3%_F	20-35 ; 45-55	1.1-1.4
Fe_5%_F	30-50	1.2-1.5
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ _1%_F	20-35 ; 50-65	1.1-1.4
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ _3%_F	30-45	1.2-1.5
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ _5%_F	15-30	1.1-1.4

### 3.3.2 Microscopia eletrônica de varrimento

Foram selecionadas algumas microestruturas funcionalizadas para o ensaio de SEM, iguais às amostras referência analisadas pelo mesmo método, onde se pretende avaliar o efeito do PAA-G na configuração e porosidade das MCs.

A morfologia das MCs funcionalizadas assemelha-se à deparada nas microestruturas referência, ou seja, também estas são porosas e apresentam uma forma globular que se aproxima de uma configuração esférica. Porém, é visível a variação do tamanho dos agregados e dos seus poros.

O PAA-G levou ao aumento do DCE das MCs, provado anteriormente pela microscopia, conseqüentemente a configuração agregacional das MCs funcionalizadas é alterada. O tamanho dos agregados é notoriamente superior, aparentando a sobreposição de uma camada sob as MCs referência (Figura 19).

Similarmente, a porosidade das microestruturas funcionalizadas é modificada, sendo que o tamanho dos poros é significativamente reduzido, podendo ser justificado pelo seu enchimento com o PAA enxertado. As MCs vazias funcionalizadas apresentam um espectro de dimensões médias de 344 nm, Figura 30, que quando comparadas com as MCs vazias referência apresentam uma diminuição do tamanho dos poros em 481 nm.

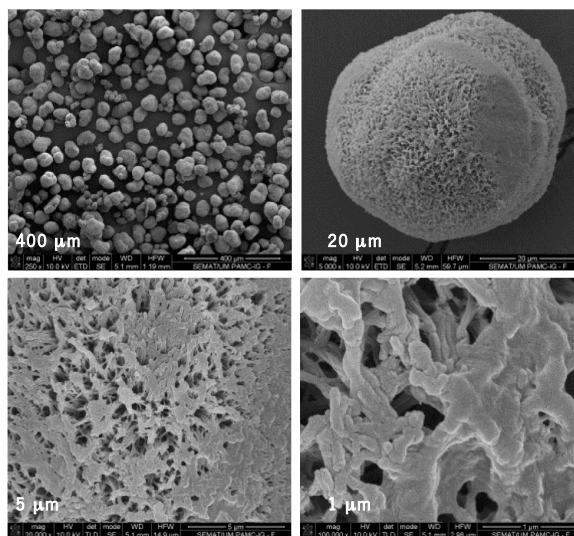


Figura 30 - Imagens SEM das microcápsulas vazias funcionalizadas a várias ampliações.

Já as MCs funcionalizadas com incorporação magnética, Figura 31 e 32, apresentam uma diferença maior no tamanho dos poros, em relação às mesmas microestruturas referência

(respetivamente Figura 20 e 21), exibindo dimensões médias de 274 nm com a inclusão de 3% de Fe e 167 nm quando é incorporado 3% de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

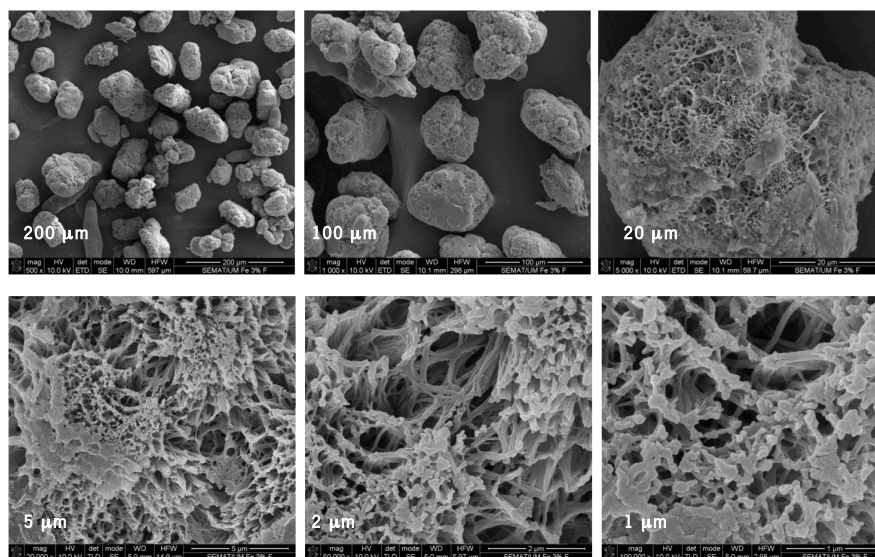


Figura 31 - Imagens SEM das microcápsulas funcionalizadas com incorporação de 3% de Fe a várias ampliações.

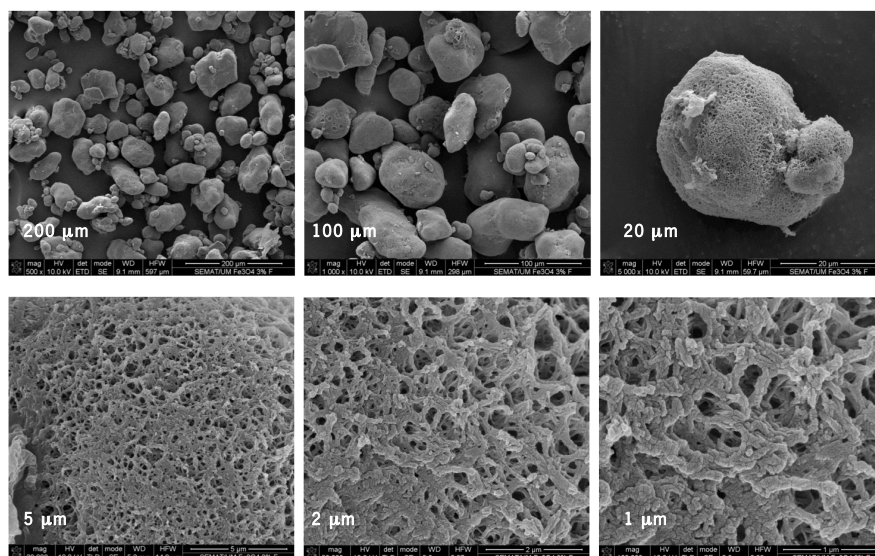


Figura 32 - Imagem SEM das microcápsulas funcionalizadas com incorporação de 3% de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a várias ampliações.

### 3.3.3 Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier

Para comprovar a modificação química, com o PAA-G, realizou-se uma análise comparativa de FTIR-ATR a todas as MCs referência e funcionalizadas. Esta análise permitiu assim avaliar qualitativamente os grupos carboxílicos ( $\text{COOH}$ ) acrescentados.

Na Figura 33, estão representados os espectros obtidos para as MCs vazias referência e funcionalizadas, sendo possível verificar que ambas as microestruturas têm bandas de absorção de luz infravermelha similares.

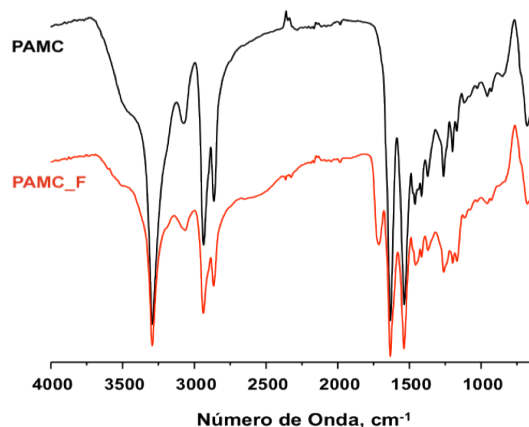
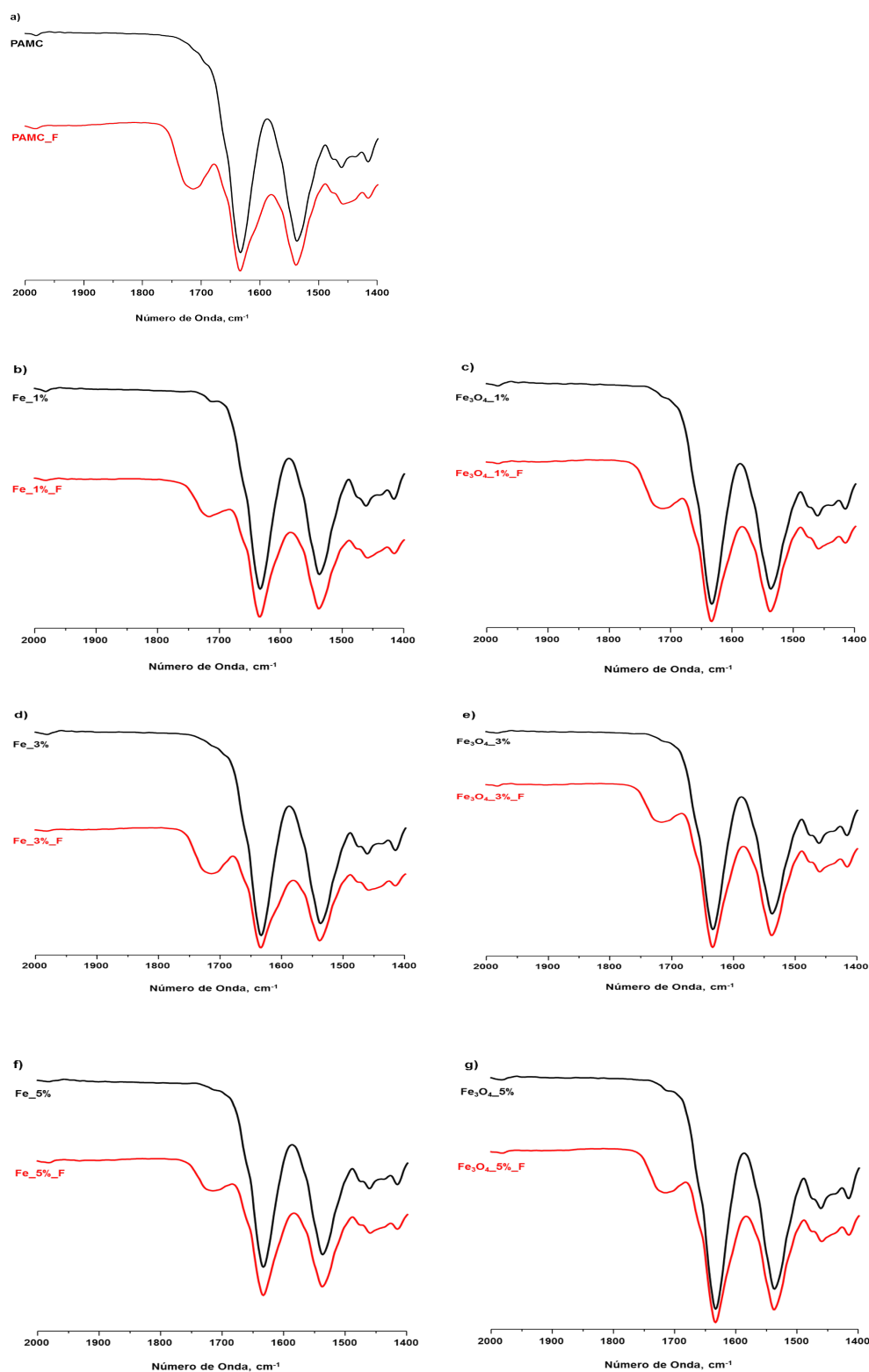


Figura 33 - Espectros FTIR-ATR das microcápsulas vazias referência e funcionalizadas.

Os dois espectros exibem bandas de absorção características das cadeias de APA6 tais como o comprimento de onda a  $1634\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao grupo amida 1, em  $1528\text{ cm}^{-1}$  está representado o grupo amida 2 e em  $1451\text{ cm}^{-1}$  o grupo amida 3. Contudo, as bandas de absorção das MCs funcionalizadas possuem uma intensidade mais fraca, sugerindo que algumas cadeias de APA6 tenham sofrido uma degradação termo-oxidativa tal como Cai *et al* [42] concluíram.

Tal como suporta a revisão bibliográfica [39][42], com o enxerto de ramificações de PAA nas MCs o espectro exibe um deslocamento na região de  $1700$  a  $2900\text{ cm}^{-1}$ , contudo o pico de absorção mais intenso surge no comprimento de onda de  $1720\text{ cm}^{-1}$ . Este pico corresponde às ligações do grupo carboxílico, pelo estiramento da ligação  $\text{C}=\text{O}$ , comprovando assim o acréscimo destes grupos nas MCs por via da polimerização radicalar.

Os restantes espectros das MCs referência e funcionalizadas, apresentaram uma configuração idêntica, salientando-se sempre o deslocamento registado anteriormente. Assim, nos espectros seguintes foi destacada essa região, de grande interesse para o presente estudo.



**Figura 34** - Espectros FTIR-ATR de comparação entre as microcápsulas referência e as respectivas microcápsulas funcionalizadas.

É possível verificar através dos espectros representados na Figura 34, que todas as MCs funcionalizadas apresentam o pico característico de COOH, no comprimento de onda de 1720

$\text{cm}^{-1}$ , alterando somente a intensidade do mesmo. As MCs vazias funcionalizadas e as MCs com incorporação de 3% de Fe funcionalizadas destacam-se pela intensidade do pico, apontando que nestas microestruturas há mais grupos COOH, ou seja, há mais PAA enxertado, respetivamente Figura 34 A e D.

Em suma, confirma-se o sucesso da modificação quimicamente das MCs pelo acréscimo dos grupos COOH, que são posteriormente necessários para a imobilização da proteína nas microestruturas.

### 3.3.4 Titulação potenciométrica

As MCs funcionalizadas foram ainda estudadas por titulação potenciométrica, que contrariamente ao FTIR-ATR permite quantificar os grupos carboxílicos introduzidos por PAA-G.

Na Tabela 12 estão apresentados os valores do teor de COOH nas MCs, calculados a partir do peso de cada amostra, da quantidade de hidróxido de sódio necessária para neutralizar a solução e da sua molaridade (0.0152 mmol).

**Tabela 12** - Teor dos grupos COOH nas microcápsulas funcionalizadas de APA6.

Tipo de Microcápsulas	[COOH] (mmol/g)
PAMC_F	0.171
Fe_1%_F	0.069
Fe_3%_F	0.171
Fe_5%_F	0.072
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_F	0.054
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_F	0.087
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_F	0.149

Os resultados obtidos reafirmam a funcionalização, porém mostram que o teor de COOH nas MCs varia de acordo com a presença de partículas magnéticas no núcleo das microestruturas, assim como o seu tipo e percentagem incorporada.

No caso da incorporação de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nas MCs, o teor de COOH aumenta com o aumento da percentagem integrada, porém com na incorporação de Fe não é visível a mesma norma. Assim,

nas MCs com  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  o maior teor de grupos carboxílicos ocorre com a incorporação de 5%, já nas MCs com Fe esse fenómeno acontece quando se incorpora uma percentagem de 3%.

Este método só avalia os grupos carboxílicos que se dissociam em água e que estão presentes na superfície das microcápsulas, logo, assume-se que devido à morfologia altamente porosa das MCs os grupos COOH que se encontram nos poros mais profundos podem ter alguma dificuldade em se dissociarem.

Tal como constatado no FTIR-ATR o teor de COOH é maior nas MCs vazias e com 3% de Fe incorporado, apontando uma vez mais que nestas microestruturas há mais ramificações de PAA enxertados, ou, que a funcionalização nestas microestruturas se deu de forma distinta das restantes MCs.

### 3.3.5 Calorimetria Diferencial de Varrimento

A Tabela 13, expõe os resultados obtidos da análise de DSC às MCs funcionalizadas, vazias e com incorporação magnética.

Os resultados em ambos os aquecimentos e arrefecimento, quando comparados com os adquiridos nas MCs referência (Tabela 7), demonstram que o PAA-G altera os valores dos parâmetros em estudo.

**Tabela 13** - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas funcionalizadas de APA6 - 1<sup>ª</sup> e 2<sup>ª</sup> aquecimento.

Tipo de Microcápsulas	1 <sup>ª</sup> Aquecimento				2 <sup>ª</sup> Aquecimento					
	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>f</sub> (°C)	ΔH <sub>f</sub> (J/g)	χ <sub>c</sub> (%)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>f</sub> (°C)	ΔH <sub>f</sub> (J/g)	χ <sub>c</sub> (%)	T <sub>cd</sub> (°C)	ΔH <sub>cd</sub> (J/g)
PAMC_F	-	201.9	59.53	31.33	51.3	177.7	14.41	7.58	104.7	-10.47
Fe_1%_F	-	204.2	79.32	41.75	47.6	199.0	35.39	18.63	-	-
Fe_3%_F	-	204.2	56.96	29.98	56.1	179.4	29.13	15.33	107.3	-6.59
Fe_5%_F	-	207.9	76.01	40.00	47.2	197.4	29.13	15.33	-	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_F	-	206.1	74.17	39.04	58.3	189.5	30.52	16.06	-	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_F	-	214.3	86.86	45.52	59.8	200.7	33.62	17.69	-	-
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_F	-	210.7	79.46	41.82	54.8	195.9	27.36	14.40	-	-

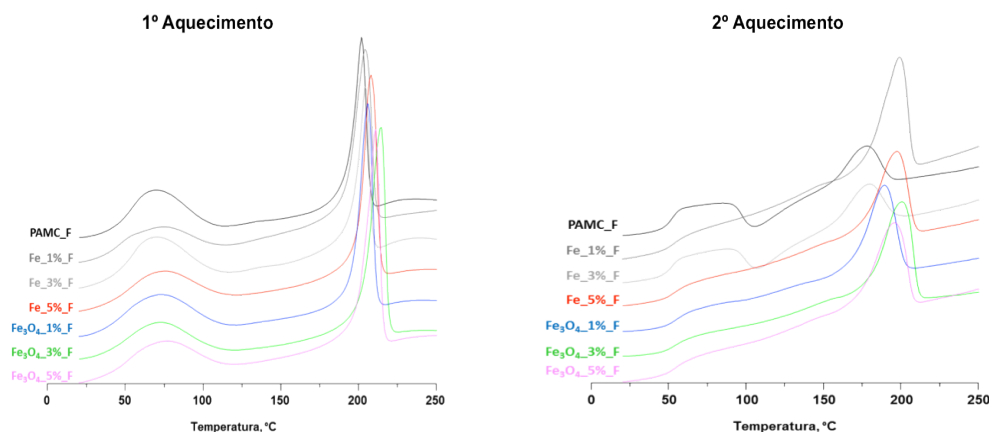
Os dados da tabela mostram que a funcionalização leva à diminuição dos valores de T<sub>f</sub> nos dois aquecimentos, revelando-se que esta mudança depende do tipo de carga incorporada e

do teor das ramificações de PAA presente nas MCs, salientando-se as MCs com incorporação de Fe onde ocorreu o maior decréscimo da temperatura, aproximadamente 5 °C.

Contrariamente os valores da  $T_g$  aumentaram com o PAA-G, em particular nas MCs com 3% Fe incorporado onde ocorreu um acréscimo de 24 °C. O PAA, quando enxertado nas MCs porosas, não se limita a criar ligações superficiais mas também dentro dos poros existentes desde a superfície até ao núcleo das microestruturas. Assim, este pode atuar com as partículas magnéticas incorporadas, criando uma área de interface maior com o polímero e consequente contenção dos movimentos da macromolécula, gerando desta forma valores superiores da  $T_g$ . Este fenómeno é mais notório nas MCs com  $Fe_3O_4$ , podendo ser comparável com os resultados obtidos por Yamaguchi *et al.* [105] que produziram compostos amorfos através da reação de óxido de estanho e PAA.

Também os valores da  $\chi_c$  diminuíram até 11.4 °C pois a presença de PAA-G impede a cristalização de APA6, atestando que com a funcionalização ocorreu a formação de um copolímero.

Evidenciam-se as MCs vazias e com 3% de Fe, amostras que apresentaram maior teor de COOH (Tabela 12), que apresentam cristalização dinâmica aquando o segundo aquecimento. PAA-G impede de alguma forma a cristalização nestas amostras, não conseguindo cristalizar durante o arrefecimento.



**Figura 35** - Curvas de DSC das microcápsulas funcionalizadas de APA6 durante o primeiro e segundo aquecimento.

Os termogramas, Figura 35, referentes ao primeiro e segundo aquecimento das MCs funcionalizadas com PAA apresentam alterações na sua configuração.



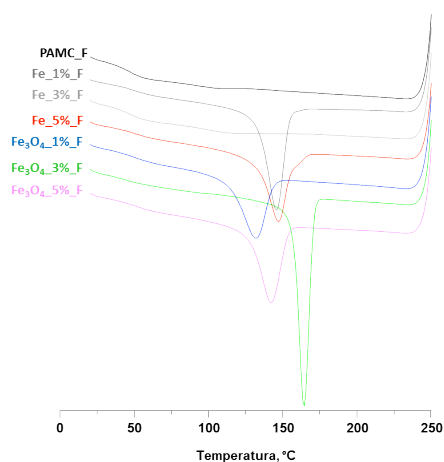
No primeiro aquecimento o patamar inicial, que surge entre os 50 °C e 100 °C, comprova a funcionalização das MCs, uma vez que a qualidade higroscópica do PAA leva ao aumento da intensidade do pico.

Os termogramas do segundo aquecimento, são aqueles que apresentam mais diferenças quando comparados com as MCs referência (Figura 24). Aquando o segundo aquecimento, o patamar inicial é atenuado, à exceção as MCs vazias e com incorporação de 3% de Fe indicando uma vez mais que nestas microestruturas há uma grande quantidade de PAA-G. É ainda possível ver, que estas microestruturas exibem perto dos 100 °C um pico exotérmico indicando uma cristalização dinâmica a temperaturas altas, sendo que as cristalites formadas são de pequenas dimensões e/ou imperfeitas, daí fundirem a  $T_f$  muito inferiores. As mesmas MCs exibem também um pico de fusão menos energético e a sua deslocação horizontal no sentido decrescente.

Contrariamente às MCs referência, não é possível distinguir em nenhuma microestrutura o pico de temperatura de fusão referente à forma cristalina  $\gamma$  de PA6. Assim, a PAA-G não modifica a forma cristalina predominante deste polímero, a forma  $\alpha$ , detetável em ambos os aquecimentos.

**Tabela 14** - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas de APA6 - arrefecimento.

Tipo de Microcápsulas	Arrefecimento	
	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)
PAMC_F	-	-
Fe_1%_F	145.9	-44.63
Fe_3%_F	-	-
Fe_5%_F	147.3	-37.74
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_F	132.1	-34.90
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_F	148.9	-44.19
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_F	142.3	-39.78



**Figura 36** - Curvas do DSC realizado às microcápsulas funcionalizadas de APA6 durante o arrefecimento.

A Tabela 14 e Figura 36, expõem que a presença de PAA-G dificultam ou impedem a cristalização do polímero quando esta ocorre em fase de arrefecimento.

As MCs vazias e com incorporação de 3% de Fe não conseguiram cristalizar durante o arrefecimento, podendo ser justificado pela maior quantidade de PAA a elas associada.

As restantes microestruturas cristalizaram com alguma dificuldade podendo-se associar este facto à presença dos domínios cristalinos pequenos ou imperfeitos, e em pouca concentração, denotando-se que o  $\Delta H_c$  é muito próxima de  $\Delta H_f$  do segundo aquecimento. Excetua-se as MCs com 1% de Fe que mostram valores mais similares às MCs referência com a mesma incorporação, aproximadamente 45 °C.

Ao relacionar os valores obtidos neste ensaio com os da titulação potenciométrica, pensa-se que a penetração de PAA nas MCs varia com o tipo de partículas magnéticas incorporadas. A análise de DSC mostra também a possibilidade de existirem mais PAA-G nas MCs vazias e com 3% de Fe incorporado do que revelou a titulação.

### 3.3.5.1 Calorimetria diferencial de varrimento a baixas temperaturas

Na Tabela 15 encontram-se os dados referentes ao segundo ensaio de DSC realizado às MCs funcionalizadas, sujeitas apenas a um aquecimento num intervalo de temperaturas de -20 °C a 30 °C com uma velocidade de 10 °C/min.

**Tabela 15** - Resultados numéricos do DSC a baixas temperaturas realizado às microcápsulas funcionalizadas de APA6.

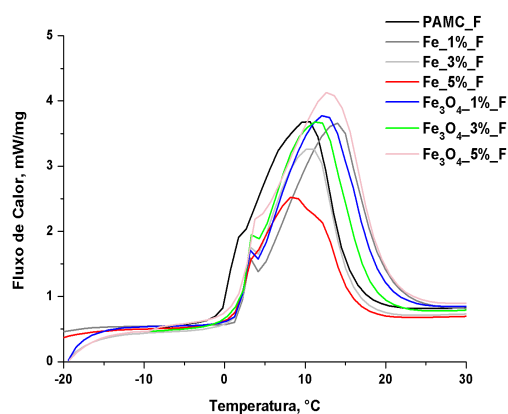
Tipo de Microcápsulas	T <sub>1</sub> (°C)	T <sub>2</sub> (°C)	ΔH <sub>1+2</sub> (J/g)
PAMC_F	4.7	10.2	161.2
Fe_1%_F	3.0	13.9	180.2
Fe_3%_F	3.2	10.7	154.5
Fe_5%_F	2.9	8.5	97.3
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_F	3.1	12.4	205.4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_F	3.5	11.7	200.5
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_F	3.8	12.8	210.7

Interpretação da Tabela 15:

T<sub>1</sub> - Temperatura de fusão associada ao primeiro pico;

T<sub>2</sub> - Temperatura de fusão associada ao segundo pico;

ΔH<sub>1+2</sub> - Variação de entalpia dos dois picos das temperaturas de fusão.



**Figura 37** - Curvas do DSC a temperaturas baixas realizado às microcápsulas de APA6 funcionalizadas.

A Figura 37 representa os gráficos obtidos no ensaio de DSC às MCs funcionalizadas, sendo possível verificar a mesma conformação encontrada nas MCs referência (Figura 26).

Apesar do PAA ser higroscópico, aparentemente a funcionalização não gera alterações na temperatura correspondente ao primeiro pico nas MCs magnéticas. Contrastando, temos as MCs vazias cuja temperatura aumentou 3.5 °C com a funcionalização. Já a temperatura do segundo pico mostrou aumentar com a modificação química das MCs, aumentando principalmente nas microestruturas vazias em 3.3 °C. Assim, supõem-se que o PAA impeça a passagem da água ou até de pequenos cristais de água semicongelados contidos no interior das microcápsulas, implicando temperaturas mais elevadas para a sua fusão.

A presença de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  requer mais energia para a fusão da água presente nas MCs funcionalizadas, aumentando a variação de entalpia com o aumento da percentagem incorporada. O oposto ocorre nas MCs funcionalizadas com inclusão de Fe, ou seja, o acréscimo das percentagens de incorporação de Fe conduz à diminuição da energia necessária para a fusão total da água confinada. Esta diferença pode ser justificada uma vez mais pela possibilidade do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  fazer mais ligações do tipo pontes de hidrogénio com a água e pela sua morfologia.

Fazendo uma comparação direta entre as entalpias de fusão das amostras funcionalizadas e das referência (Tabela 9), o enxerto de ramificações de PAA gera uma unificação na distribuição dos poros, quer relativamente aos seus tamanhos quer na sua disposição ao longo da estrutura das MCs. Denota-se ainda, que a funcionalização afetou as microcápsulas vazias de forma diferente aumentando a sua entalpia de fusão em 89.5 J/g enquanto que nas MCs com partículas magnéticas incorporadas as entalpia são muito próximas.

### 3.3.6 Análise Termogravimétrica

A análise de TGA a todas as MCs funcionalizadas possibilita comprovar a funcionalização e estudar a sua influência na estabilidade térmica das MCs, vazias e com incorporação de partículas magnéticas. A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos na análise.

**Tabela 16** - Resultados numéricos do TGA realizado às microcápsulas funcionalizadas de APA6.

Tipo de Microcápsulas	T <sub>10%</sub> (°C)	T <sub>V máx</sub> (°C)	V <sub>máx</sub> (%/°C)	R <sub>FD</sub> (%)	R <sub>s</sub> (%)	ΔR <sub>f</sub> (%)
PAMC_F	334	454.01	0.97	3.73	1.31	2.42
Fe_1%_F	371	462.6	1.72	3.15	2.31	0.84
Fe_3%_F	333	445.1	0.96	6.02	5.62	0.40
Fe_5%_F	366	460.3	1.24	6.81	7.47	-0.66
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_F	368	462.6	1.72	3.99	2.14	1.85
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_F	379	459.53	1.66	3.92	2.89	1.03
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_F	363	455.68	1.41	5.05	4.25	0.80

Interpretação da Tabela 16:

T<sub>10%</sub> - Temperatura onde se registou 10% de perda de massa;

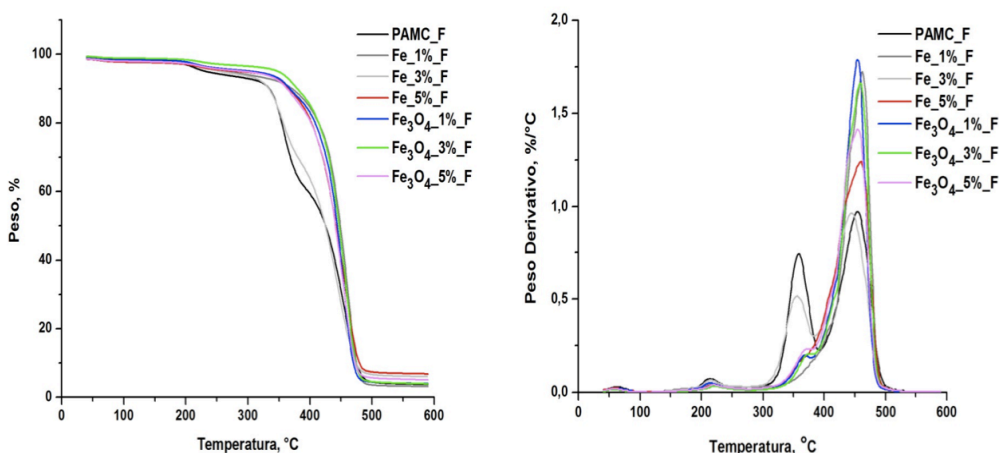
T<sub>V máx</sub> - Temperatura em que a velocidade de degradação foi máxima;

V<sub>máx</sub> - Velocidade de degradação máxima;

$R_{FD}$  - Resíduo no final da degradação das MCs funcionalizadas;

$R_{r/t}$  - Resíduo no final da degradação das MCs referência;

$\Delta R_t$  - Cálculo da diferença entre o resíduo obtido na funcionalização e o resíduo obtido na síntese para as mesmas MCs.



**Figura 38** - Curvas do TGA realizado às microcápsulas funcionalizadas de APA6. Da esquerda para a direita: curvas integrais da degradação térmica e curva de velocidade de degradação térmica correspondentes.

Os resultados obtidos e as curvas termogravimétricas, Figura 38, não só comprovam a funcionalização das MCs, assim como mostram que este processo aumenta a estabilidade térmica das microestruturas.

As perdas de 10% massa das microestruturas funcionalizadas iniciam a temperaturas superiores às encontradas nas MCs referência (Tabela 10), salientando-se as microestruturas com 1% de Fe incorporado, onde há um aumento de 62 °C.

O enxerto de ramificações de PAA nas MCs gera vários processos de degradação, identificados pelos vários picos nas curvas da velocidade de degradação térmica. Evidencia-se ainda que, as MCs vazias e com incorporação de 3% de Fe apresentam a menor velocidade de degradação máxima das amostras em estudo, sendo também inferior à obtida para as mesmas MCs referência diminuindo entre 1.21 e 1.3 %/°C, respectivamente (Tabela 10).

A partir da diferença entre o resíduo inorgânico, no final da degradação, das MCs funcionalizadas e das MCs referência é possível validar o PAA-G nas microestruturas. Como se comparam resíduos obtidos em amostras diferentes, os valores calculados são somente indicativos, daí o valor calculado para as MCs com 5% de Fe ser negativo, contudo, o que se poderia aproximar mais do resíduo real da funcionalização seria o referente às MCs vazias.

### 3.4 Microcápsulas com BSA Imobilizada

De acordo com a literatura analisada [39][42], a imobilização da proteína albumina de soro bovino (BSA) deve ocorrer nas MCs de APA6 previamente funcionalizadas com o enxerto de ramificações de PAA, e na presença de um ativador dos grupos COOH, neste caso N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC).

A similaridade química com as proteínas e a composição química do substrato de imobilização, as MCs de APA6, gerou interesse numa possível imobilização proteica sem a adição do ativador EDC. Decidiu-se ainda fazer ensaios de imobilização proteica nas MCs que não sofreram funcionalização, ou seja, as MCs referência.

Assim, os resultados apresentados nesta secção fazem uma comparação direta entre os quatro estudos realizados:

- Imobilização de BSA com ativador (IC) nas MCs funcionalizadas;
- Imobilização de BSA sem ativador (IS) nas MCs funcionalizadas;
- Imobilização de BSA com ativador nas MCs não funcionalizadas;
- Imobilização de BSA sem ativador nas MCs não funcionalizadas.

#### 3.4.1 Microscopia ótica de campo claro

Os novos conjugados proteína-polímero foram primeiramente analisados por microscopia ótica de campo claro permitindo observar as alterações dimensionais ocorridas. Nos Anexos 2, 3, 4 e 5 estão representados os histogramas de frequência construídos com os dados obtidos.

A imobilização de BSA nas MCs funcionalizadas, com ativador e sem ativador, tem os valores médios do DCE e da esfericidade apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17** - Valores médios do diâmetro do círculo equivalente e esfericidade das microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada, com e sem ativador.

	Imobilização com Ativador (IC)		Imobilização sem Ativador (IS)	
	DCE médio ( $\mu\text{m}$ )	Esfericidade média	DCE médio ( $\mu\text{m}$ )	Esfericidade média
PAMC_F	55-75	1.1-1.3	40-55	1.1-1.4
Fe_1%_F	60-70	1.1-1.4	50-65	1.1-1.4
Fe_3%_F	15-30 ; 45-65	1.1-1.4	15-30 ; 40-55	1.1-1.4
Fe_5%_F	20-35	1.1-1.4	20-35	1.1-1.4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_F	25-40 ; 60-70	1.1-1.3	20-30 ; 55-65	1.1-1.4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_F	10-25	1.1-1.4	15-30	1.1-1.4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_F	10-20	1.1-1.4	10-20 ; 40-50	1.1-1.4

Os valores associados ao DCE médio das microestruturas funcionalizadas variam quando a imobilização se faz com e sem a presença de ativador. A imobilização proteica realizada sem a presença de ativador, comparando com a imobilização com ativador, nas MCs funcionalizadas expõem uma diminuição do DCE somente nas microestruturas vazias e valores semelhantes para as restantes. Salientam-se as microestruturas com 5% de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> incorporado, que apresentam uma distribuição bimodal quando a imobilização ocorre sem ativador, fenômeno não detetável para as mesmas MCs funcionalizadas e após a imobilização com ativador. Relativamente à esfericidade média, os dois tipos de imobilização nas MCs funcionalizadas apresentam valores muito similares.

Comparando estes valores com os obtidos nas MCs funcionalizadas (Tabela 11) a imobilização na presença de ativador apresenta um ligeiro aumento de DCE em todas as microestruturas, excetuando as MCs com 3% e 5% de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> integrado que diminuem até 20  $\mu\text{m}$ . Por outro lado a esfericidade média não apresentou diferenças significativas.

A Tabela 18 apresenta os valores médios obtidos na imobilização, com e sem ativador, nas MCs não funcionalizadas.

**Tabela 18** - Valores médios do diâmetro do círculo equivalente e esfericidade das microcápsulas referência e com BSA imobilizada, com e sem ativador.

	Imobilização com Ativador (IC)		Imobilização sem Ativador (IS)	
	DCE médio ( $\mu\text{m}$ )	Esfericidade média	DCE médio ( $\mu\text{m}$ )	Esfericidade média
PAMC	15-20	1.1-1.3	40-50	1.1-1.4
Fe_1%	30-45	1.1-1.4	55-70	1.2-1.4
Fe_3%	20-35 ; 45-60	1.1-1.4	5-20 ; 30-40	1.1-1.4
Fe_5%	15-30	1.2-1.5	20-40	1.1-1.4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%	20-35 ; 50-65	1.1-1.4	20-35	1.1-1.4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%	15-30	1.1-1.4	10-25	1.1-1.4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%	15-30	1.1-1.4	10-30	1.1-1.4

Em geral, a imobilização sem ativador realizada nas MCs referência leva à diminuição dos valores do DCE médio, só nas MCs vazias e com 1% de Fe incorporado é que a tendência difere, apresentando um aumento.

Fazendo uma comparação direta com os resultados obtidos nas MCs referência (Tabela 6), as dimensões das microestruturas são similares. Porém, com a imobilização na presença de ativador, as MCs vazias e com 1% de Fe apresentam uma diminuição significativa nos valores médios de DCE, respectivamente, até 45  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{m}$ . A esfericidade média das MCs referência e com BSA imobilizada apresentam uma diminuição no seu primeiro valor, quando comparada com os resultados obtidos nas MCs referência, implicando o aumento de microestruturas cuja configuração se aproxima mais a uma esfera, esfericidade igual a 1.

### 3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varrimento

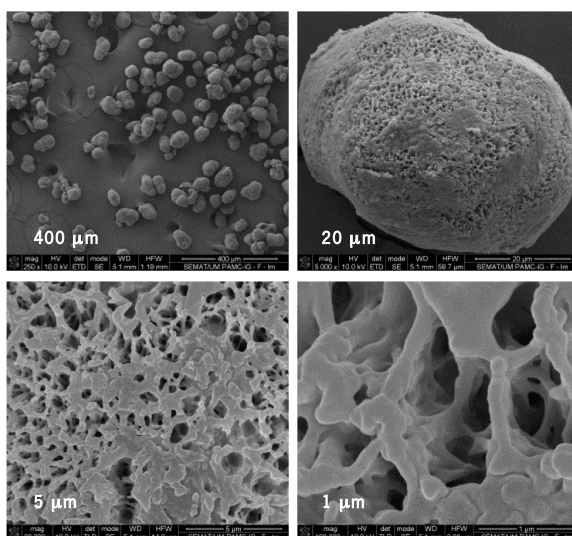
A imobilização de BSA com auxílio de ativador sob as microestruturas previamente estudadas, exibiu variações morfológicas detectáveis no SEM. Assim, foi analisada a imobilização com ativador nas MCs referência e funcionalizadas, vazias e com incorporação magnética de 3% de Fe e 3% de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

Na Figura 39 são apresentadas as imagens SEM das MCs vazias, na Figura 40 as MCs com 3% de Fe e por fim na Figura 41 as MCs com incorporação de 3% de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, todas elas funcionalizadas e com BSA imobilizada com ativador.

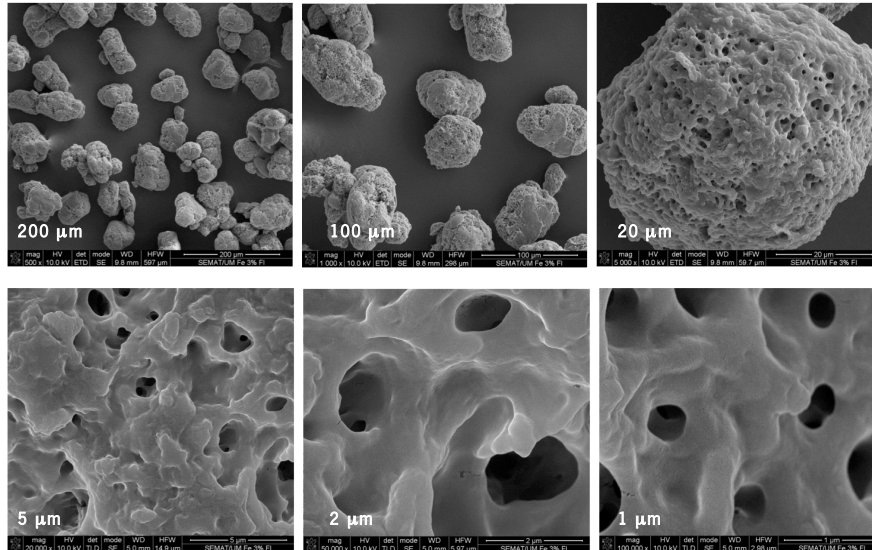


O processo de imobilização proteica nas MCs funcionalizadas leva ao aparecimento de uma terceira camada, a camada superior visível, depositada sobre o revestimento/camada da funcionalização. Estas, apresentam uma morfologia muito particular, em que as camadas superiores das microestruturas aparentam estar fundidas, sendo este fenómeno mais perceptível nas MCs funcionalizadas com cargas magnéticas incorporadas.

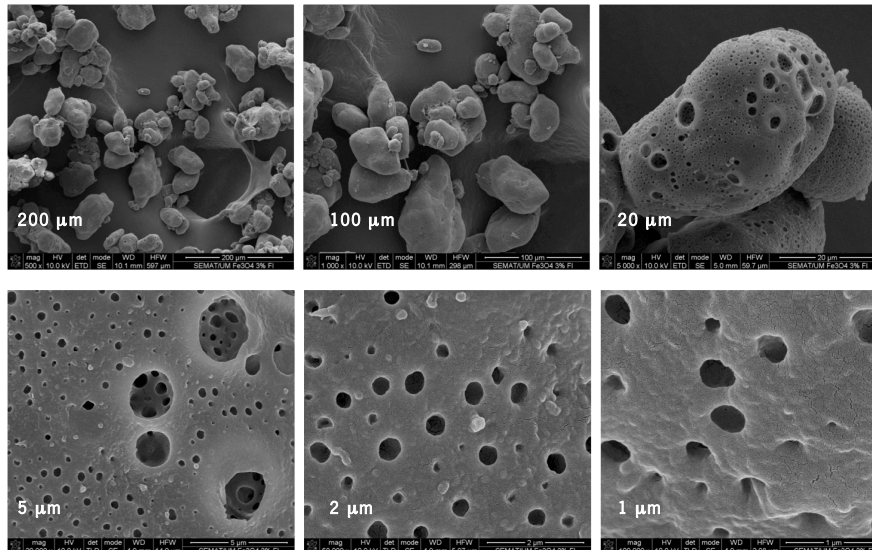
Relativamente à porosidade das microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada com ativador, e avaliando somente a zona ampliada, é observável que a dimensão dos poros visíveis aumentou. Apesar de existir a possibilidade da diminuição do tamanho dos poros nas camadas adjacentes, pelo preenchimento dos mesmos com BSA, os poros visíveis pertencem exclusivamente ao revestimento proteico externo. A dimensão média dos poros das MCs funcionalizadas e com BSA imobilizada varia uma vez mais com a incorporação magnética, as MCs vazias apresentam uma média de 272 nm, as MCs com 3% de Fe incorporado de 1  $\mu\text{m}$  e a incorporação de 3% de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  gerou poros com tamanhos médios de 325 nm, respectivamente Figuras 39, 40 e 41.



**Figura 39** - Imagens SEM das microcápsulas vazias funcionalizadas, e com BSA imobilizada na presença de ativador, várias ampliações.



**Figura 40** - Imagens SEM das microcápsulas com incorporação de 3% de Fe funcionalizadas e com BSA imobilizada com ativador, várias ampliações.



**Figura 41** - Imagens SEM das microcápsulas com incorporação de 3% de  $Fe_3O_4$ , funcionalizadas e com BSA imobilizada com ativador, várias ampliações.

Observa-se que a imobilização afecta as microestruturas referência de forma diferente, Figura 42 e 43. Estas apresentam uma configuração aparente muito similar à encontrada nas MCs referência, todavia, denotam-se diferenças na porosidade das mesmas de acordo com a incorporação de partículas magnéticas. A dimensão média dos poros das MCs é de 531 nm com a incorporação de 3% de Fe e 170 nm quando é incorporado 3% de  $Fe_3O_4$ , Figura 42 e 43 respetivamente.

Quando comparadas com as MCs referência (Figura 20 e 21), a imobilização nas MCs referência com núcleo magnético gerou poros com tamanhos muito similares.

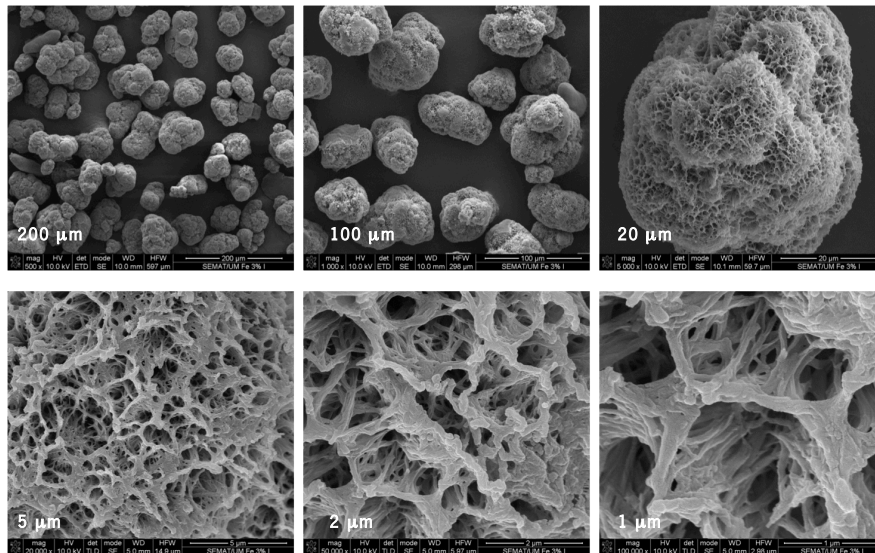


Figura 42 - Imagens SEM das microcápsulas com incorporação de 3% de Fe, referência e com BSA imobilizada com ativador, várias ampliações.

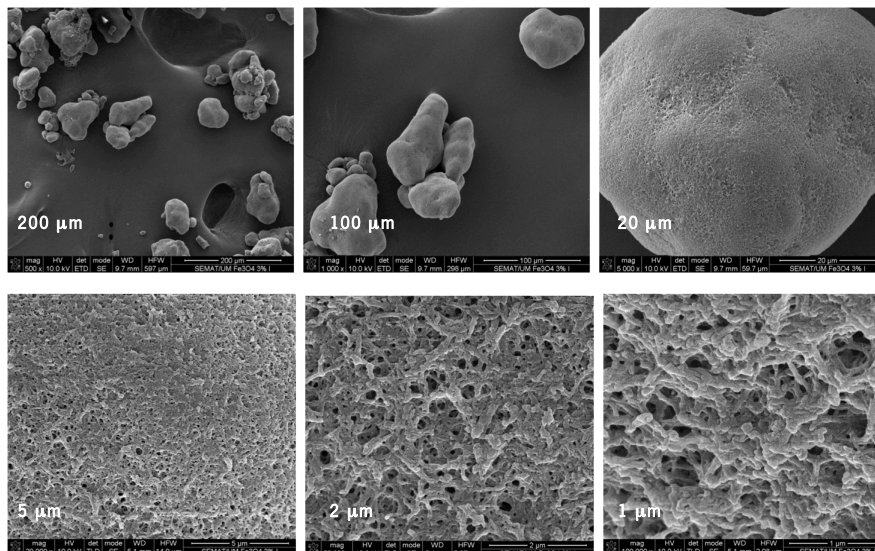


Figura 43 - Imagens SEM das microcápsulas com incorporação de 3% de  $Fe_3O_4$  referência e com BSA imobilizada com ativador, várias ampliações.

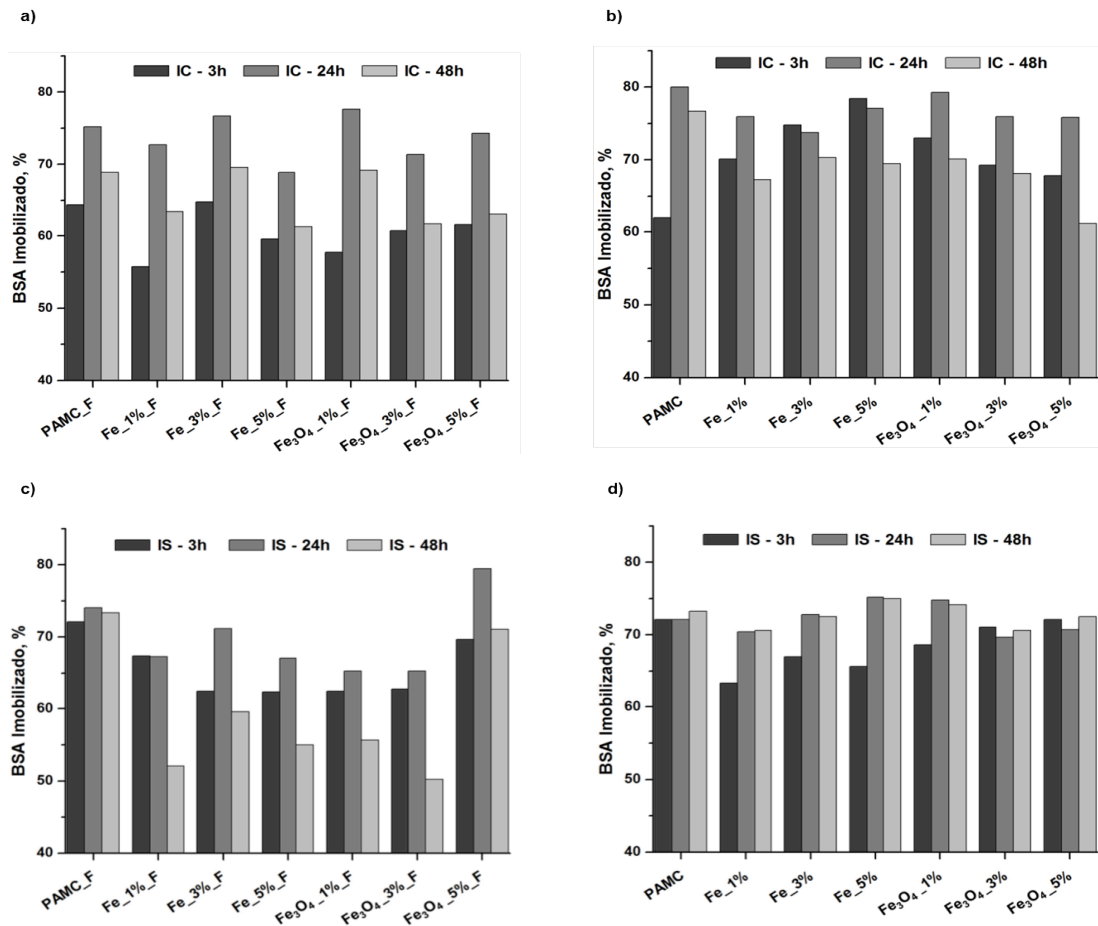
As imagens obtidas pelo SEM, mostram de forma clara a diferença da natureza do processo de imobilização de BSA quando este se realiza sob as MCs enxertadas com ramificações de PAA e nas MCs referência.

### 3.4.3 Percentagem de imobilização de BSA

A imobilização da BSA sobre as MCs referência e funcionalizadas foi avaliada usando o método colorimétrico com ácido bicinconínico (BCA), baseando-se na capacidade da proteína reduzir  $Cu^{2+}$  em  $Cu^{+1}$ . Este último, em conjunção com o BCA forma um complexo de cor roxa

cuja intensidade da tonalidade é diretamente proporcional à concentração da proteína, sendo detetável a absorvância no UV-VIS no comprimento de onda de 562 nm.

Os gráficos representam a percentagem de imobilização de BSA nas MCs funcionalizadas com ativador e sem ativador, Figura 44 A e C, e nas MCs referência com e sem ativador, Figura 44 B e D.



**Figura 44** - Percentagem de imobilização de BSA entre 3h e 48h. A - Imobilização com ativador nas microcápsulas funcionalizadas; B - Imobilização com ativador nas microcápsulas referência; C - Imobilização sem ativador nas microcápsulas funcionalizadas; D - Imobilização sem ativador nas microcápsulas referência.

Comparando os quatro estudos realizados conclui-se que nas condições dos ensaios o tempo de imobilização ideal é de 24h, ocorrendo um processo reversível após esse período.

Com este tempo de imobilização a percentagem em ambos os tipos de microcápsulas, referência e funcionalizadas, apresenta valores acima de 65%. Os dados obtidos são muito semelhantes quando a imobilização se faz com e sem a presença de ativador, porém os resultados são ligeiramente superiores quando usado EDC alcançando percentagens entre 75 e 80%. Já no estudo de imobilização sem ativador são apresentadas percentagens entre 65 e 77%.

Analisando o efeito do enxerto de ramificações de PAA, os resultados obtidos na percentagem de BSA imobilizada são muito semelhantes entre as MCs funcionalizadas e as MCS referência, apresentado ao fim de 24h valores compreendidos entre 65 e 80%.

Quanto à influência da presença de partículas magnéticas na imobilização com ativador, nas MCs funcionalizadas salientam-se a incorporação de 3% de Fe e 1% de  $Fe_3O_4$ , já nas MCs não funcionalizadas as microestruturas vazias e com 1% de  $Fe_3O_4$  incorporado são as que apresentam uma maior percentagem de imobilização proteica. Na imobilização sem ativador, destaca-se claramente a incorporação de 5% de  $Fe_3O_4$  nas MCs funcionalizadas, enquanto que nas MCs não funcionalizadas todas as microestruturas apresentam percentagens similares de imobilização de BSA.

Resumindo, assume-se que a APA6 é um bom substrato para a imobilização proteica uma vez que findas 3h de imobilização se obtêm percentagens altas de imobilização de BSA. Esta conclusão levou ao estudo do rastreamento do processo de imobilização até às 3h, sendo selecionadas apenas algumas amostras, Figura 45.

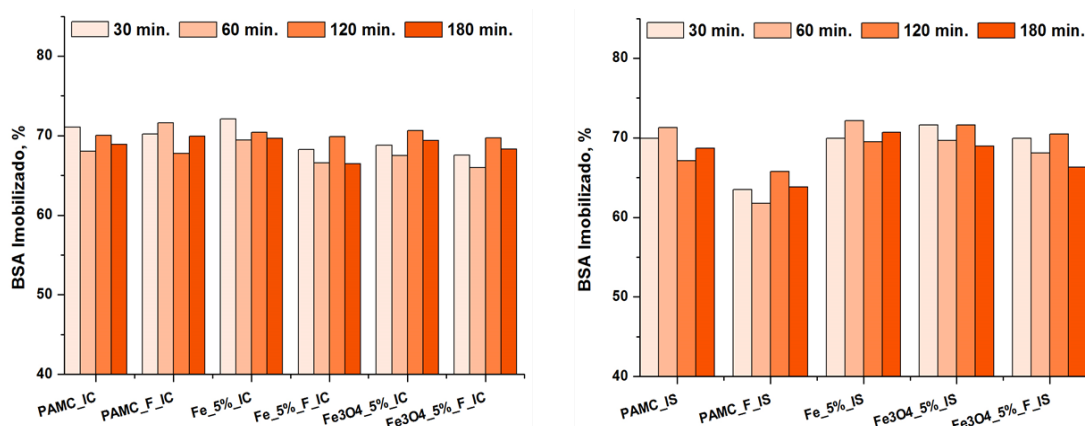


Figura 45 - Percentagem de imobilização da BSA, com (IC) e sem (IS) ativador, durante as três primeiras horas do processo.

É possível comprovar que a percentagem de imobilização de BSA nas MCs selecionadas apresenta valores superiores a 60% após 30 minutos, aparentando que a presença de ativador no processo de imobilização produz resultados mais estáveis. O PAA-G não têm grande influência na percentagem de BSA imobilizada nas MCs.

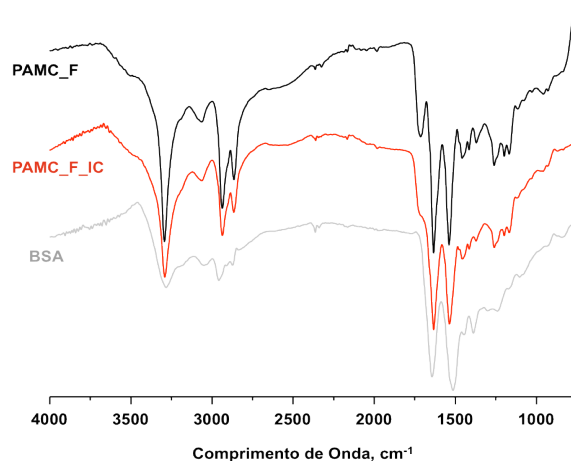
É de salientar que os resultados obtidos nestes estudos, diferem dos espectáveis tendo por base a literatura recolhida. Assim, para que ocorra a imobilização proteica nos substratos de

APA6, é dispensável a sua funcionalização prévia e a presença de ativador dos grupos COOH aquando o processo de imobilização proteica.

### 3.4.4 Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier

O ensaio de FTIR-ATR foi realizado a todas as MCs com BSA imobilizada, com e sem a influência do ativador EDC, complementando a autenticação da imobilização proteica nas mesmas.

Na Figura 46 estão representados os espectros das MCs vazias funcionalizadas, das MCs vazias funcionalizadas cuja imobilização foi realizada com ativador e da proteína BSA.



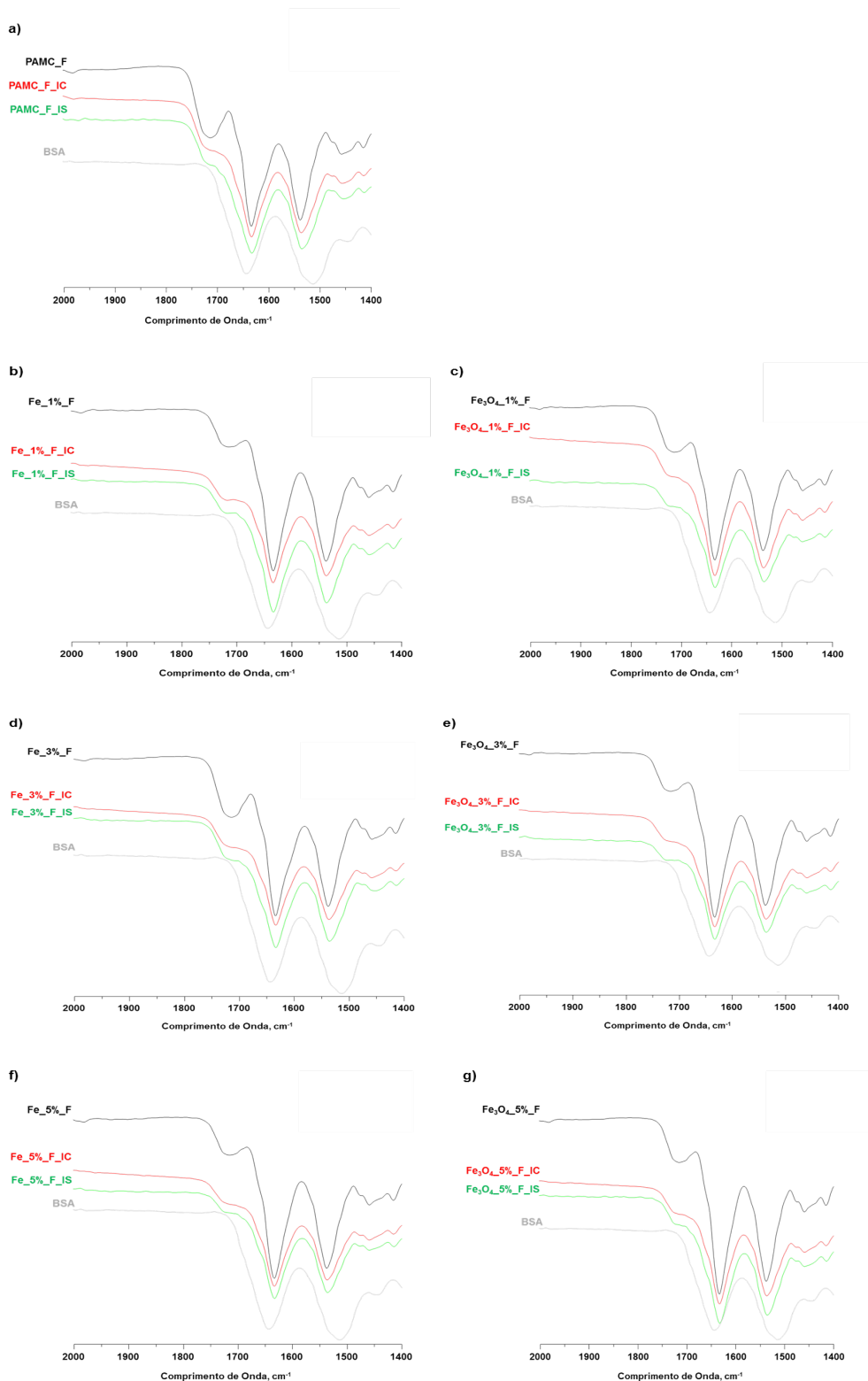
**Figura 46** - Espectros FTIR-ATR comparando as microcápsulas funcionalizadas, microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada com ativador, e a proteína BSA.

É possível verificar que as microestruturas e a proteína têm bandas de absorção idênticas, uma vez que a proteína é uma poliamida natural, variando a intensidade dos seus picos.

O espectro de BSA exhibe bandas de absorção de luz infravermelha no comprimento de onda 3300 cm<sup>-1</sup>, que corresponde à vibração de estiramento da ligação N-H. É ainda possível verificar um pico próximo de 1650 cm<sup>-1</sup> que representa a banda de amida 1, consequente do estiramento da ligação C=O. Surgem picos similares correspondentes a amida 2 nos comprimentos de onda a 1540 cm<sup>-1</sup>, devido à deformação da ligação N-H, e amida 3 no comprimento de onda a 1240 cm<sup>-1</sup>, resultante do estiramento de C-N.

A grande diferença entres os três espectros analisados surge no comprimento de onda a 1720 cm<sup>-1</sup>, pico registado nas microestruturas após o acréscimo dos grupos COOH pela

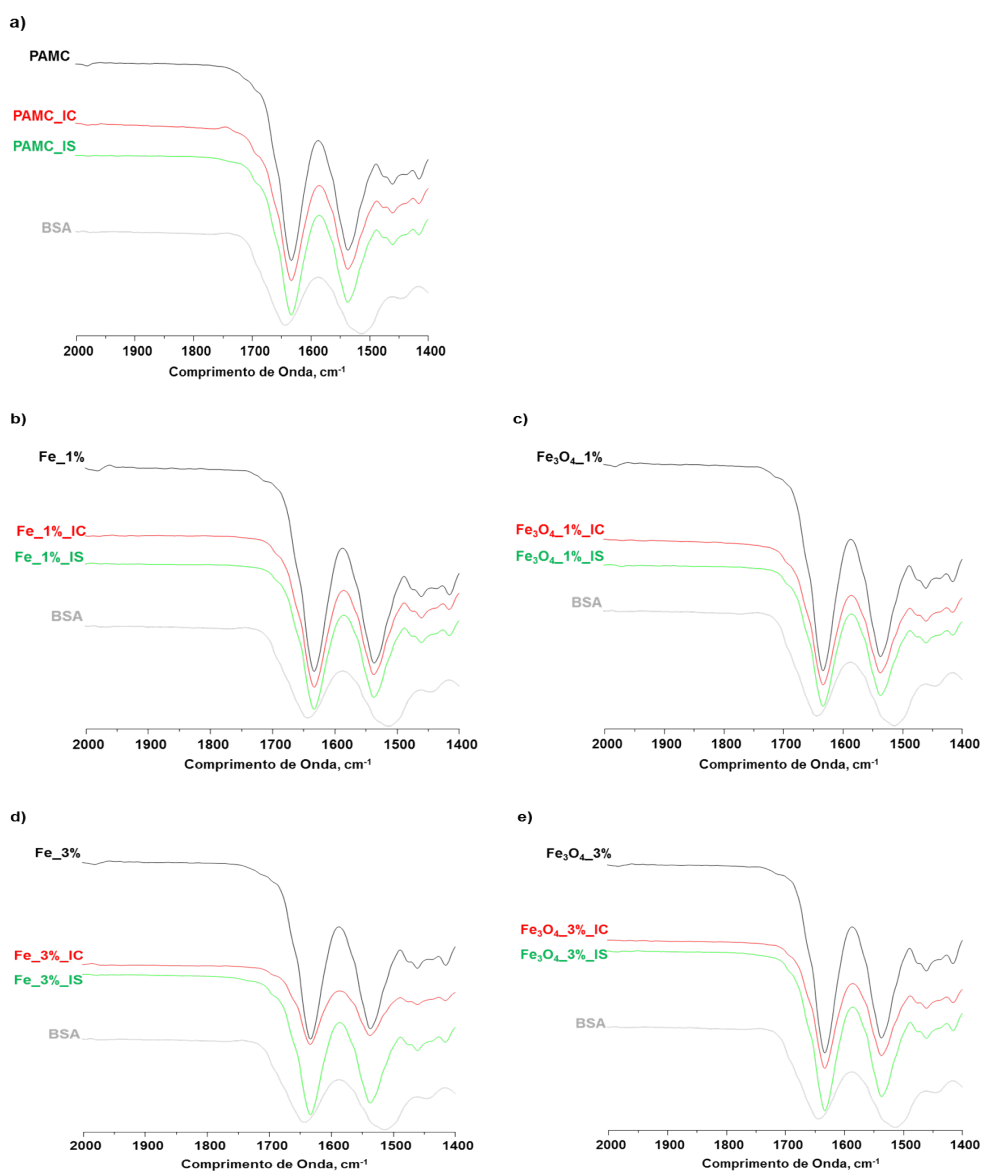
funcionalização, não sendo detectado na BSA. Logo, devido à similaridade detectada, nos espectros seguintes foi destacada a região envolvente a esse pico.



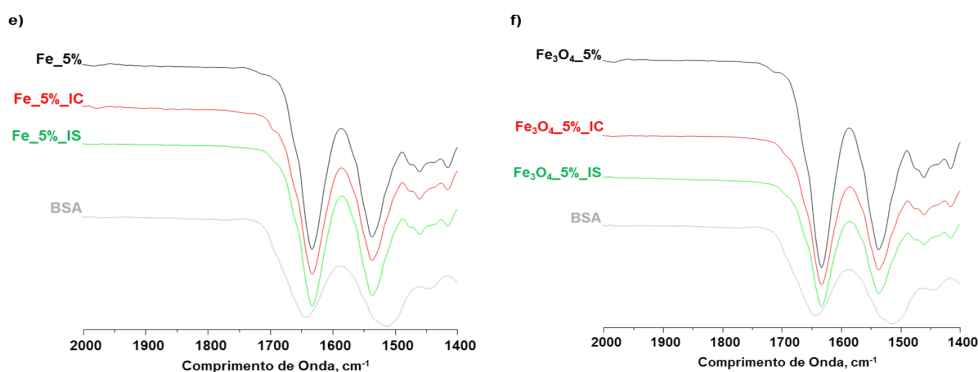
**Figura 47** - Espectros FTIR-ATR comparando: microcápsulas funcionalizadas, microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada com (IC) e sem (IS) ativador, e a proteína BSA

Nas MCs funcionalizadas, Figura 47, verifica-se que a imobilização de BSA altera a configuração do pico no comprimento de onda a  $1720\text{ cm}^{-1}$ . O pico apresenta uma banda mais larga e uma redução considerável de intensidade, indicando que a proteína participou na redução dos grupos COOH, corroborando assim a imobilização da BSA nas MCs.

Como espectável, os espectros obtidos nas MCs não funcionalizadas, Figura 48, não exibem o pico no comprimento de onda a  $1720\text{ cm}^{-1}$ , representativo do PAA-G nas microcápsulas, logo, com a imobilização de BSA não surgem variações nessa região. Contudo, salienta-se a diminuição da intensidade dos picos da amida 1 e 2 nos comprimentos de onda a  $1634\text{ e }1537\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, nas MCs com 3% de Fe incorporado e cuja imobilização foi realizada com ativador, Figura 47 D.







**Figura 48** - Espectros FTIR-ATR comparando: microcápsulas referência, microcápsulas referência e com BSA imobilizada com (IC) e sem (IS) ativador, e a proteína BSA.

Por comparação dos diferentes espectros obtidos, nas MCs referência e nas MCs funcionalizadas, relativamente aos dois tipos de imobilização realizados, com ativador e sem ativador, não é possível verificar diferenças no pico em estudo quanto à sua intensidade e forma. Porém, nestes espectros surge uma pequena alteração na região entre 1660 e 1668  $\text{cm}^{-1}$ , pertencente ao estiramento da ligação C=C. Esta modificação é mais evidente nas MCs funcionalizadas e quando a imobilização é realizada na presença do ativador.

Apesar da BSA possuir os mesmos grupos amida que a APA6, e conseqüentemente as MCs de APA6, os seus picos são significativamente mais amplos. Assim, é possível atribuir o alargamento das bandas de amida 1 e 2 nas MCs com BSA imobilizada, com e sem ativador, à contribuição desta proteína nas microestruturas. Este fenómeno consolida a imobilização em todas as microcápsulas, principalmente nas referência onde não é detectável o pico COOH a 1720  $\text{cm}^{-1}$ , Figura 48.

### 3.4.5 Calorimetria Diferencial de Varrimento

No Anexo 6, é apresentado o gráfico referente ao ensaio de DSC realizado à albumina de soro bovino, sujeita aos mesmos intervalos de aquecimento e arrefecimento que as microcápsulas em estudo. Este tem apenas interesse didático, uma vez que a partir dos 40 °C ocorre a desnaturação da proteína e conseqüente perda estrutural, não se podendo comparar com a APA6.

Também todos os híbridos proteína-polímero foram analisados por DSC. Na Tabela 19 e 20 são apresentados os resultados obtidos na imobilização proteica sob as microcápsulas funcionalizadas.

**Tabela 19** - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada, com e sem ativador - 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> aquecimento.

Tipo de Microcápsulas	Imobilização com ativador (IC)				Imobilização sem ativador (IS)			
	1 <sup>o</sup> Aque.			2 <sup>o</sup> Aque.	1 <sup>o</sup> Aque.			2 <sup>o</sup> Aque.
	T <sub>f</sub> (°C)	ΔH <sub>f</sub> (J/g)	X <sub>C</sub> (%)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>f</sub> (°C)	ΔH <sub>f</sub> (J/g)	X <sub>C</sub> (%)	T <sub>g</sub> (°C)
PAMC_F	205	30.93	16.28	56.1	204.9	74.10	39.00	54.8
Fe_1%_F	204.8	39.28	20.68	54.4	205.9	43.46	22.87	54.2
Fe_3%_F	206.8	26.07	13.72	51.1	207.3	23.95	12.60	52.5
Fe_5%_F	208.9	41.74	21.97	55.1	209.1	59.28	31.20	56.9
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_F	207.3	38.82	20.43	56.1	205.3	30.66	16.14	54.8
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_F	213.9	32.74	17.23	52.6	213.1	28.77	15.14	52.5
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_F	211.9	35.75	18.81	54.9	211.9	32.75	17.24	54.0

**Tabela 20** - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada, com e sem ativador - arrefecimento.

Tipo de Microcápsulas	Imobilização com ativador (IC)		Imobilização sem ativador (IS)	
	Arrefecimento			
	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH <sub>c</sub> (J/g)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH <sub>c</sub> (J/g)
PAMC_F	130.6	-8.37	133.8	-24.81
Fe_1%_F	144.0	-20.19	150.9	-22.06
Fe_3%_F	135.0	-11.60	149.8	-11.06
Fe_5%_F	147.1	-19.84	147.3	-27.17
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_F	137.8	-18.03	140.6	-15.04
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_F	152.4	-16.29	154.5	-14.77
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_F	144.2	-17.44	153.4	-23.20

Em ambos os estudos de imobilização proteica a presença das cargas magnéticas nas microestruturas funcionalizadas, Tabela 19, gera alterações na temperatura de fusão. Com a incorporação de partículas magnéticas nas MCs a T<sub>f</sub> aumenta proporcionalmente, ou seja, quanto maior a percentagem de incorporação maior é a temperatura registada. Também os

valores calculados para o grau de cristalinidade sofrem algumas oscilações. Comparando ambas as imobilizações, denota-se que a presença de ativador gera a diminuição do  $\chi_c$  até 23% nas MCs vazias e com incorporação de Fe.

Nos ensaios realizados não foi possível assinalar a temperatura de transição vítrea aquando o primeiro aquecimento, contudo o segundo aquecimento mostrou que a  $T_g$  apresenta valores muito similares em todas as MCs. Evidenciam-se os valores mais elevados para esta temperatura nas MCs vazias e com incorporação de 1% de  $Fe_3O_4$ , quando a imobilização ocorre com ativador, e nas MCs com 5% de Fe incorporado na imobilização sem ativador.

A  $T_c$  em ambas as imobilizações apresenta valores próximos, Tabela 20, sendo ligeiramente superior quando a imobilização ocorre sem ativador, entre 2 e 14.8 °C.

Fazendo uma comparação direta entre os resultados obtidos nas MCs funcionalizadas (Tabela 13 e 14) com os encontrados nas MCs funcionalizadas e com BSA imobilizada, com e sem ativador, denotam-se algumas mudanças nos parâmetros em estudo. A  $T_f$  e a  $T_g$  expõem valores muito aproximados, todavia, os valores de  $\chi_c$  nas MCs com proteína diminuem drasticamente, como é o caso das microestruturas com 3% de Fe incluído cuja imobilização ocorreu com ativador, em que é observável uma diminuição de 16%. A imobilização aparenta não alterar os valores de  $T_c$ , excetuando as MCs com 5% de  $Fe_3O_4$  com BSA imobilizada sem ativador onde ocorreu um aumento de 11 °C.

**Tabela 21** - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas referência e com BSA imobilizada, com e sem imobilizador - 1ª e 2ª aquecimento.

Tipo de Microcápsulas	Imobilização com ativador (IC)				Imobilização sem ativador (IS)			
	1ª Aque.			2ª Aque.	1ª Aque.			2ª Aque.
	$T_f$ (°C)	$\Delta H_f$ (J/g)	$\chi_c$ (%)	$T_g$ (°C)	$T_f$ (°C)	$\Delta H_f$ (J/g)	$\chi_c$ (%)	$T_g$ (°C)
PAMC	205.5	48.89	25.73	51.3	206.1	40.37	21.25	52.6
Fe_1%	208.5	41.16	21.66	52.6	208.2	46.18	24.30	52.4
Fe_3%	209.5	33.89	17.84	52.3	209.7	34.74	18.28	51.4
Fe_5%	209.8	59.81	31.48	51.6	210.4	37.13	19.54	52.9
$Fe_3O_4$ _1%	207.1	41.20	21.68	53.1	207.7	40.12	21.11	54.8
$Fe_3O_4$ _3%	213.4	38.63	20.33	51.6	214.9	32.48	17.09	51.6
$Fe_3O_4$ _5%	212.0	38.37	20.19	51.3	212.1	44.43	23.38	51.9

**Tabela 22** - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas referência e com BSA imobilizada, com e sem ativador - arrefecimento.

Tipo de Microcápsulas	Imobilização com ativador (IC)		Imobilização sem ativador (IS)	
	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH <sub>c</sub> (J/g)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH <sub>c</sub> (J/g)
PAMC	152.7	-29.05	153.1	-24.78
Fe_1%	153.7	-22.88	156.1	-25.33
Fe_3%	155.8	-21.29	156.3	-21.56
Fe_5%	158.8	-37.20	159.3	-23.42
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%	150.2	-21.93	149.9	-21.18
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%	159.8	-21.38	159.1	-19.09
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%	158.3	-24.35	158.2	-24.80

O uso de ativador aquando a imobilização de BSA nas microestruturas referência, Tabela 21 e 22, não tem influência significativa na T<sub>f</sub>, T<sub>g</sub> e T<sub>c</sub> apresentando valores similares em ambas as imobilizações.

Também o  $\chi_C$  não demonstra alterações significativas nos seus valores quando a imobilização se dá com e sem ativador, excetuando as MCs com 5% de Fe onde este parâmetro diminui aproximadamente 12% sem ativador.

Comparando a influência da imobilização nas MCs referência (Tabela 7 e 8), é observável que os valores da T<sub>f</sub> são muito próximos existindo oscilações mínimas. Os valores de  $\chi_C$  nas MCs referência e com BSA imobilizada apresentam uma diminuição até 28%, quando comparadas com as MCs referência, mas ocorre o contrário na T<sub>g</sub>, em que é visível um aumento dos seus valores em 20 °C, particular nas MCs vazias e com inclusão de Fe. Aquando o arrefecimento, a T<sub>c</sub> nas MCs com proteína exhibe valores semelhantes nas MCs vazias e com incorporação de Fe, porém apresenta uma ligeira diminuição de até 5 °C quando incorporadas partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

### 3.4.5.1 Calorimetria diferencial de varrimento a temperaturas baixas

O ensaio de calorimetria diferencial de varrimento a temperaturas baixas realizado aos conjugados proteína-polímero, não só possibilitou completar a análise granulométrica dos

mesmos assim como permitiu compreender melhor como ocorre a imobilização, com base nos dados obtidos da fusão da água contida nas MCs, exteriormente e interiormente.

As tabelas seguintes apresentam os resultados obtidos no DSC a temperaturas baixas, a Tabela 23 corresponde à imobilização de BSA nas MCs funcionalizadas e a Tabela 24 diz respeito à imobilização nas MCs não funcionalizadas.

Nas MCs funcionalizadas, comparando os dois tipos de imobilização, a presença de ativador não afecta significativamente as temperaturas dos picos em estudo. Já a energia necessária para a fusão total da água contida nas MCs, em geral sofreu um aumento até 34 °C na imobilização com ativador.

Avaliando os resultados obtidos da imobilização realizada nas MCs funcionalizadas, as microestruturas vazias não apresentaram qualquer pico. Nas restantes MCs, quando comparados os valores obtidos nas mesmas microestruturas funcionalizadas (Tabela 16), o primeiro pico, correspondente à temperatura necessária para a fusão da água contida nos poros superficiais das MCs, exhibe um aumento até 1.4 °C. Assim, supõe-se que a proteína imobilizada ocupou uma área maior dos poros superficiais, limitando a fusão da água contida nos poros subsequentes. Já o segundo pico, referente à temperatura de fusão da água nos poros profundos das MCs, em geral exibiu uma diminuição até 5.6 °C na imobilização com ativador e 4.2 °C sem ativador.

**Tabela 23** - Resultados numéricos do DSC a temperaturas baixas realizado às microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada, com e sem ativador.

Tipo de Microcápsulas	Imobilização com ativador (IC)			Imobilização sem ativador (IS)		
	T <sub>1</sub> (°C)	T <sub>2</sub> (°C)	ΔH <sub>1+2</sub> (J/g)	T <sub>1</sub> (°C)	T <sub>2</sub> (°C)	ΔH <sub>1+2</sub> (J/g)
PAMC_F	-	-	-	-	-	-
Fe_1%_F	4.4	8.3	157.0	3.3	11.0	147.70
Fe_3%_F	-	8.2	190.6	-	9.4	156.20
Fe_5%_F	3.6	8.2	104.9	-	5.4	72.28
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _1%_F	3.6	11.0	150.2	3.8	10.1	138.70
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3%_F	4.3	9.6	194.5	-	7.9	198.30
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_F	-	-	-	3.5	8.6	150.10

Interpretação da Tabela 23:

T<sub>1</sub> - Temperatura de fusão associada ao primeiro pico;

$T_2$  - Temperatura de fusão associada ao segundo pico;

$\Delta H_{1+2}$  - Variação de entalpia dos dois picos das temperaturas de fusão.

Também nas MCs referência, a presença de ativador aquando a imobilização não afecta significativamente as temperaturas em análise. Porém, contrastando com a imobilização nas MCs funcionalizadas, a energia necessária para a fusão total da água contida nas MCs referência sofreu um aumento na imobilização sem ativador até 53 °C, excetuando as microestruturas com 3% de  $Fe_3O_4$  incorporado. Também a imobilização ocorrida nas microestruturas vazias referência não gerou qualquer pico.

Relacionando com os resultados adquiridos nas MCs referência (Tabela 9), com a imobilização de BSA o primeiro pico sofre um ligeiro aumento de temperatura nas microestruturas, excetuando as MCs com incorporação de 5% de Fe e 1% de  $Fe_3O_4$  incorporado. Em geral, também o segundo pico exibiu um acréscimo da sua temperatura nas MCs até 2 °C.

**Tabela 24** - Resultados numéricos do DSC realizado às microcápsulas referência e com BSA imobilizada, com e sem ativador.

Tipo de Microcápsulas	Imobilização com ativador (IC)			Imobilização sem ativador (IS)		
	$T_1$ (°C)	$T_2$ (°C)	$\Delta H_{1+2}$ (J/g)	$T_1$ (°C)	$T_2$ (°C)	$\Delta H_{1+2}$ (J/g)
PAMC	-	-	-	-	-	-
Fe_1%	3.8	11.1	190.00	3.5	11.3	168.2
Fe_3%	3.9	13.1	183.90	3.8	12.9	186.5
Fe_5%	2.8	-	39.44	3.9	10.4	143.3
$Fe_3O_4$ _1%	3.6	10.6	169.20	3.3	11.2	186.6
$Fe_3O_4$ _3%	-	7.0	176.10	4.5	10.9	145.3
$Fe_3O_4$ _5%	3.7	9.0	146.70	4.2	9.5	152.6

Interpretação da Tabela 24:

$T_1$  - Temperatura de fusão associada ao primeiro pico;

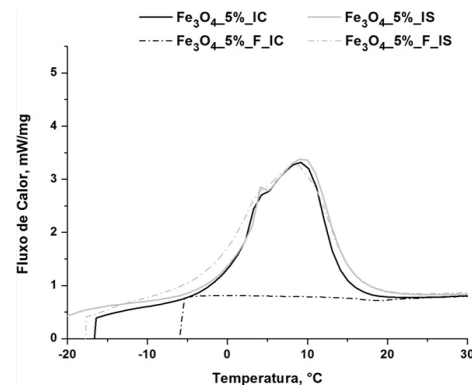
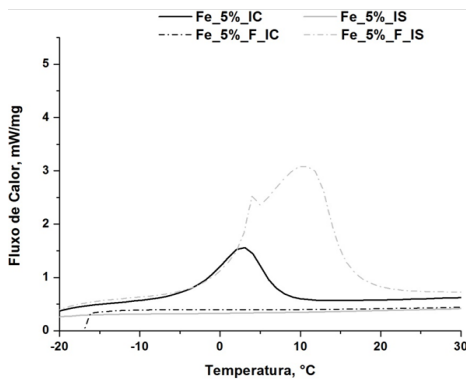
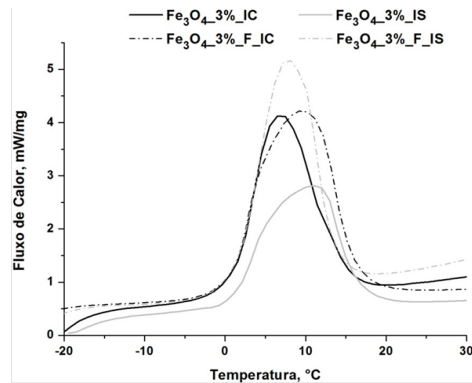
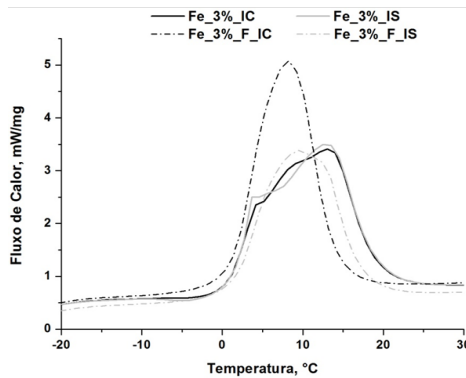
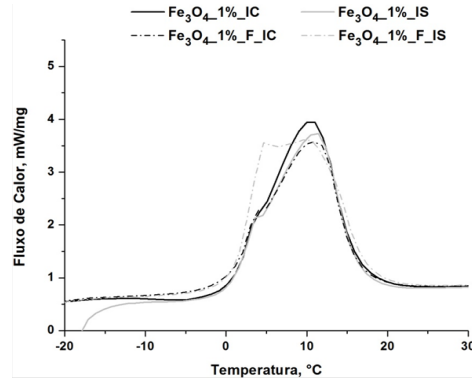
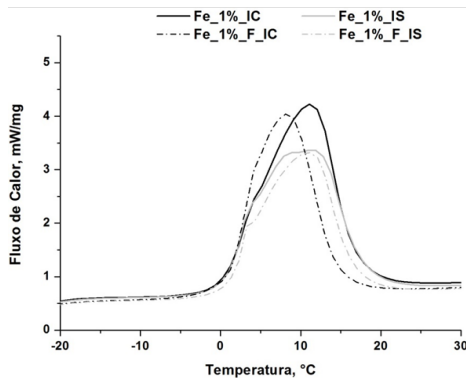
$T_2$  - Temperatura de fusão associada ao segundo pico;

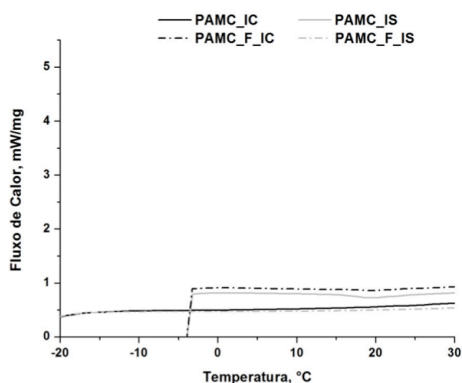
$\Delta H_{1+2}$  - Variação de entalpia dos dois picos das temperaturas de fusão.

A Figura 49 apresenta os gráficos obtidos neste ensaio, fazendo uma comparação entre os quatro estudos realizados.

As amostras referência apresentam picos relativamente coincidentes, como é o caso das MCs com incorporação de 1% de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , 1% e 3% de Fe. Excepcionalmente, as microestruturas com incorporação de 3% de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sofrem uma clara deslocação dos seus picos.

Por outro lado, a funcionalização conduz à deslocação dos picos no sentido decrescente da temperatura nas amostras com  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  incorporado, o mesmo ocorre nas MCs magnéticas de 1% e 3% de Fe.





**Figura 49** - Curvas do DSC a temperaturas baixas realizado às microcápsulas referência e funcionalizadas, cuja imobilização ocorreu com (IC) e sem (IS) ativador.

### 3.4.6 Análise termogravimétrica

A influência da imobilização, com e sem ativador, na estabilidade térmica das MCs foi também avaliada, assim, foram escolhidos três conjugados proteína-polímero para a análise termogravimétrica. Na Tabela 25 são apresentados os resultados obtidos na imobilização sob as MCs funcionalizadas, e na Tabela 26, a imobilização ocorrida nas MCs referência.

**Tabela 25** - Resultados numéricos do TGA realizado às microcápsulas funcionalizadas e com BSA imobilizada, com (IC) e sem (IS) ativador.

Tipo de Microcápsulas	Tipo de Imobilização	T <sub>10%</sub> (°C)	T <sub>v máx</sub> (°C)	V <sub>máx</sub> (%/°C)	R <sub>FD</sub> (%)	R <sub>I</sub> (%)	ΔR (%)
PAMC_F	IC	333	444.17	1.36	8.15	3.73	4.42
	IS	372	444.17	1.47	6.55	3.73	2.82
Fe_5%_F	IC	376	447.95	1.38	8.83	6.81	2.02
	IS	380	448.71	1.40	9.61	6.81	2.80
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%_F	IC	366	446.44	1.81	8.13	5.05	3.08
	IS	387	443.38	1.54	9.42	5.05	4.37
PAMC_F	Sem Imobilização	334	454.01	0.97	-	3.73	-



**Tabela 26** - Resultados numéricos do TGA realizado às microcápsulas referência e com BSA imobilizada, com (IC) e sem (IS) ativador.

Tipo de Microcápsulas	Tipo de Imobilização	T <sub>10%</sub> (°C)	T <sub>V máx</sub> (°C)	V <sub>máx</sub> (%/°C)	R <sub>FD</sub> (%)	R <sub>i</sub> (%)	ΔR (%)
PAMC	IC	369	441.90	1.26	4.52	1.31	3.21
	IS	374	447.90	1.26	3.24	1.31	1.93
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%	IC	382	464.40	1.23	14.10	7.47	6.63
	IS	382	445.68	1.23	12.85	7.47	5.38
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _5%	IC	390	457.79	1.52	6.84	4.25	2.59
	IS	394	454.74	1.54	7.47	4.25	3.22
PAMC	Sem Imobilização	306	354.47	2.18	-	1.31	-

Interpretação das Tabela 25 e 26:

T<sub>10%</sub> - Temperatura onde se registou 10% de perda de massa;

T<sub>V máx</sub> - Temperatura em que a velocidade de degradação foi máxima;

V<sub>máx</sub> - Velocidade de degradação máxima;

R<sub>FD</sub> - Resíduo no final da degradação;

R<sub>w/f</sub> - Resíduo no final da degradação das MCs referência ou funcionalizadas;

ΔR - Cálculo da diferença entre o resíduo obtido nas MCs com BSA imobilizada e o resíduo obtido nas MCs referência ou funcionalizadas para as mesmas MCs, R<sub>FD</sub>- R<sub>i</sub>.

A última linha apresenta os resultados obtidos no TGA das MCs vazias referência ou funcionalizadas, sendo estas as microestruturas que apresentaram uma maior diferença nos parâmetros em estudo.

Por comparação com as MCs referência e funcionalizadas (Tabela 10 e 16, respetivamente), os dados obtidos mostram que o processo de imobilização proteica as torna mais estáveis termicamente, aumentando não só a velocidade máxima de degradação, assim como a temperatura encontrada para essa mesma velocidade. As amostras que apresentaram maiores diferenças nos parâmetros do TGA foram as MCs vazias, referência e funcionalizadas, apresentadas nas Tabelas 25 e 26 a cinza.

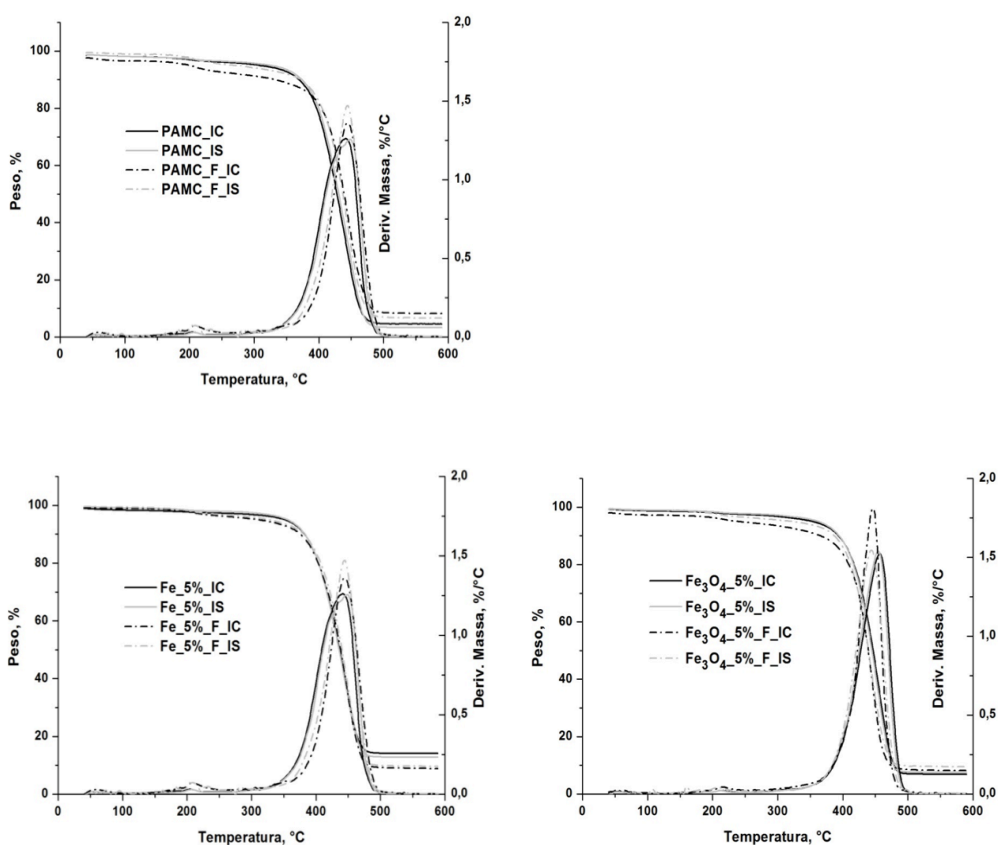
A forma como é realizada a imobilização, com e sem a presença de ativador, gera algumas diferenças nos critérios em análise. O resíduo final, calculado pela diferença entre o resíduo obtido nas MCs com BSA imobilizada e o resíduo obtido na síntese ou funcionalização, conforme o estudo em causa, é o parâmetro que sofre mais alterações relevantes. No caso das MCs referência a imobilização com ativador revela o acréscimo de até 1.28% nas percentagens do resíduo final, à exceção das MCs com incorporação de 5% de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. O contrário ocorre nas

MCs funcionalizadas, onde a presença de ativador gera a diminuição de até 1.29% nas percentagens residuais, excetuado as microestruturas vazias onde ocorre o oposto.

A funcionalização aparenta diminuir a primeira temperatura assinalada, ou seja, ocorre 10% de perda de massa a temperaturas inferiores às registadas nas MCs com proteína que não foram funcionalizadas. Já a velocidade máxima e a temperatura onde se registou a velocidade máxima, não apresentam variações significativas.

As amostras com maior percentagem de BSA imobilizada, exibem também um valor residual superior, como é o caso da imobilização nas MCs referência com Fe incorporado, confirmando assim as percentagens de imobilização obtidas por UV-VIS (Figura 44) para essas microestruturas.

Na Figura 50 apresenta-se a comparação do perfil das curvas de degradação térmica e de velocidade de degradação térmica relativos aos ensaios apresentados.



**Figura 50** - Curvas do TGA realizado às microcápsulas referência e funcionalizadas, cuja imobilização ocorreu com (IC) e sem (IS) ativador. Comparação entre as curvas de degradação térmica e curvas de velocidade de degradação térmica correspondentes.

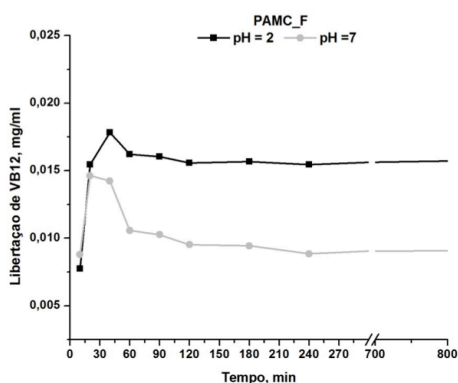
### 3.5 Suscetibilidade ao pH

Anteriormente, no capítulo 1, foi mencionado que o enxerto de ramificações de PAA nas MCs tem dupla funcionalidade, o acréscimo de grupos COOH no substrato e tornar as microcápsulas suscetível ao pH do meio envolvente. Desta forma, após a funcionalização realizou-se mais um ensaio que permita avaliar essa suscetibilidade nas MCs vazias e magnéticas.

Todas as amostras com PAA-G foram carregadas com vitamina B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>) durante 48h, sendo posteriormente submersas em dois meios líquidos, um com pH ácido (pH 2) e outro com pH neutro (pH 7), durante um tempo estipulado. A VB<sub>12</sub> possui na sua composição cobalto, sendo detetável a sua absorbância no UV-VIS no comprimento de onda de 361 nm.

De acordo com a bibliografia mencionada [92] o PAA tem a possibilidade de alterar a conformação das suas macromoléculas perante o pH do meio que o envolve. A submersão das amostras funcionalizadas num meio com pH 7, faz com que as macromoléculas do PAA se expandam formando um novelo que tapa os poros das MCs, impedindo a libertação da VB<sub>12</sub> contida no seu interior. Por outro lado, quando o pH do meio é 2 as macromoléculas de PAA retraem-se ficando compactadas, assim os poros das microestruturas ficam abertos permitindo a libertação da VB<sub>12</sub> confinada no seu interior.

O comportamento das MCs perante o pH dos meios em estudo, permitindo a construção dos gráficos da Figura 51.



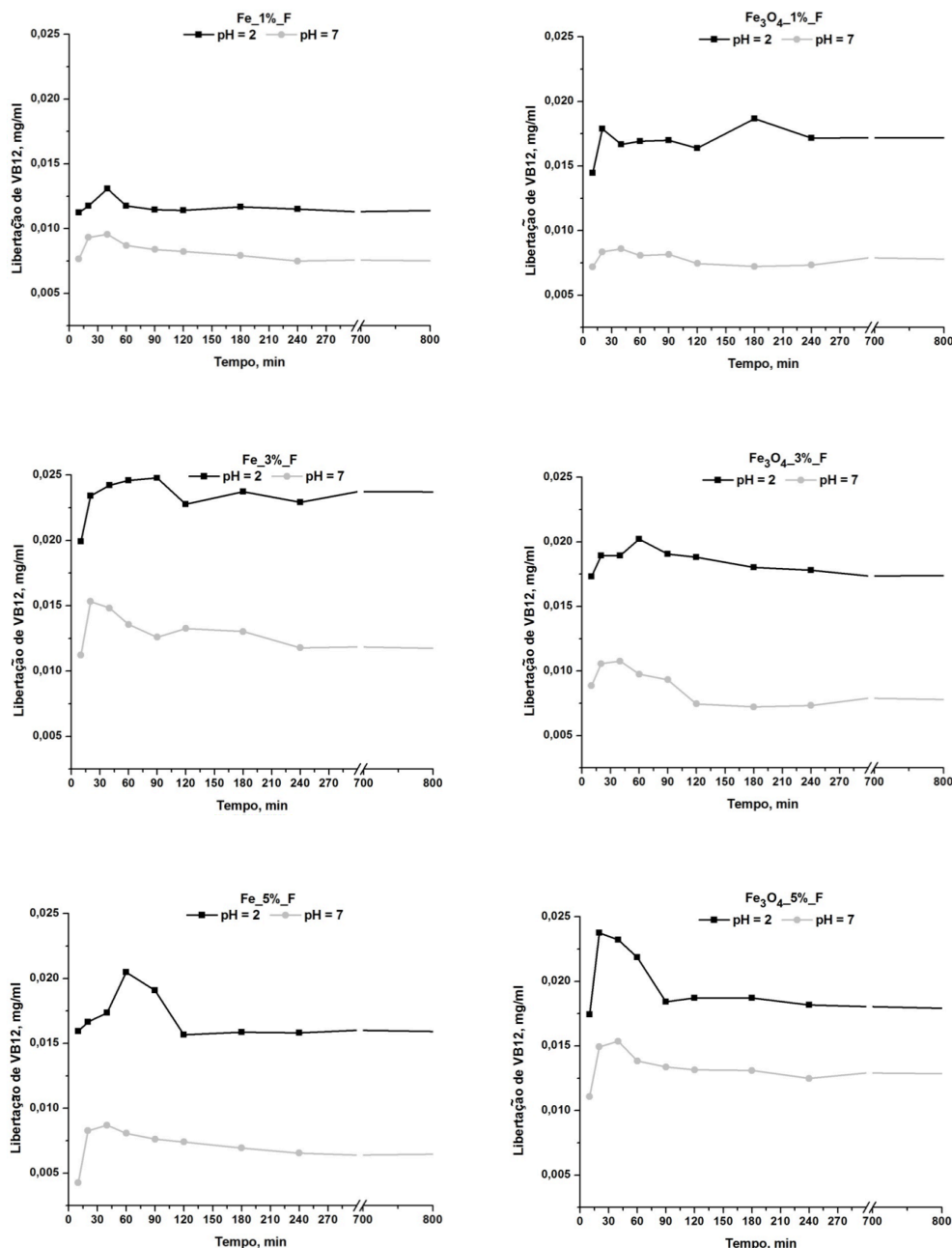


Figura 51 - Libertação da vitamina B<sub>12</sub> perante o meio com pH 2 e pH 7.

Os resultados obtidos mostram que a VB<sub>12</sub> é inicialmente libertada em ambos os meios, apresentando no entanto diferenças na sua concentração.

Em geral, após 15 minutos do processo é notória a diferença da concentração da VB<sub>12</sub> libertada, apresentando-se até duas vezes mais elevada quando o meio é ácido, ou seja, quando os poros das MCs estão abertos. Excetuam-se as MCs vazias onde esta diferença é menor, podendo ser explicada pelo tempo insuficiente que as ramificações de PAA enxertadas nos poros têm para mudar a sua conformação. Teoriza-se ainda que talvez a presença de partículas magnéticas nas MCs facilitem as mudanças conformacionais, ocorrendo mais rapidamente do

que nas microestruturas vazias. Segue-se, em todas as amostras, um pico entre 30 e 45 minutos indicando que até lá ocorreu uma liberação rápida da VB<sub>12</sub>, e findos aproximadamente 120 minutos atinge-se um patamar de equilíbrio na liberação.

No meio com pH 2, a liberação da VB<sub>12</sub> é mais acentuada nas MCs com partículas magnéticas incorporadas, salientando-se a incorporação de 3% de Fe e 5% de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> onde a liberação máxima da vitamina ronda os 0.025 mg/ml. Quando o pH do meio é 7, a liberação da vitamina destaca-se nas MCs vazias, com incorporação de 3% de Fe e 5% de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, assumindo uma liberação máxima de aproximadamente 0.015 mg/ml.

É de salientar que o processo de funcionalização não foi otimizado para esta finalidade, suscetibilidade ao pH, porém este estudo releva que as microcápsulas com PAA-G têm potencial para responderem a este estímulo eficazmente.



## Capítulo IV

### Conclusões





## 4 Conclusões

O presente estudo centrou-se primordialmente no desenvolvimento e caracterização de microcápsulas de APA6, vazias e com partículas magnéticas integradas, tendo sido utilizadas como suporte de imobilização de proteínas e em dispositivos de libertação controlada apresentando uma suscetibilidade a estímulos magnéticos e ao pH do meio que as envolve.

Foi avaliada a influência das cargas magnéticas incorporadas, o tipo e percentagens de incorporação, a modificação química das microcápsulas por enxerto de ramificações de poli(ácido acrílico) (PAA-G) e o uso de ativador aquando a imobilização.

As conclusões deste trabalho podem ser sistematizadas da seguinte forma.

- **Microcápsulas Referência**

1. Foram sintetizadas com êxito microcápsulas de APA6, vazias e com partículas magnéticas incorporadas, por polimerização aniônica ativada da  $\epsilon$ -CL em solvente. O processo decorreu na presença de partículas de ferro (Fe) e óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) com percentagens, relativamente ao peso da  $\epsilon$ -CL, de 1%, 3% e 5%;

2. A caracterização morfológica realizada por microscopia ótica de campo claro e por SEM, provaram que as condições otimizadas do processo de polimerização permitiram uma granulometria controlada das microcápsulas. O Fe e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  por serem partículas esféricas de pequenas dimensões são envolvidas pela APA6, formando microestruturas esferoides isoladas ou agregados de dimensões na gama de 15-60  $\mu\text{m}$ . A inclusão de Fe gera ainda microestruturas cuja forma se assemelham a bastões, sendo estas uma consequência da auto-organização (*auto assembly*) das partículas devido à presença de campos magnéticos. Todas as microcápsulas referência apresentam uma estrutura altamente porosa estimada por SEM variando o tamanho dos poros com a incorporação magnética, entre 175 e 825 nm;

3. O DSC revelou que a incorporação das partículas magnéticas leva ao aumento da temperatura de fusão e da temperatura de cristalização das microcápsulas. O único pico de fusão presente no primeiro aquecimento pode ser atribuído à forma cristalina  $\alpha$  de PA6, já no segundo aquecimento revela a existência das duas fases cristalinas  $\gamma$  e  $\alpha$  deste polímero. O DSC a temperaturas baixas possibilitou o estudo da porosidade das microcápsulas provando a

existência de poros na sua superfície e no interior, estando esta característica dependente da presença, tipo e percentagem das partículas magnéticas;

4. Os ensaios de TGA evidenciaram que as partículas magnéticas não desativam nem impedem a reação de polimerização, tornando a taxa de degradação térmica mais lenta e, conseqüentemente torna as microcápsulas mais termicamente estáveis. A carga magnética efetiva presente no núcleo das MCs varia entre 0.83 e 6.16%;

- **Microcápsulas funcionalizadas**

5. Foram eficazmente funcionalizadas com ácido acrílico as microcápsulas previamente sintetizadas, vazias e com incorporação de partículas magnéticas, através de polimerização radicalar.

6. O enxerto de ramificações de PAA (PAA-G) nas microcápsulas gerou uma distribuição mais alargada dos valores correspondentes ao diâmetro do círculo equivalente e à esfericidade, ambos determinados por microscopia ótica de campo claro. O tamanho dos poros nas microcápsulas funcionalizadas determinado por SEM é significativamente reduzido, entre 167 e 344 nm, sendo justificado pelo seu preenchimento com as ramificações de PAA enxertadas.

7. A análise FTIR-ATR realizada às microcápsulas funcionalizadas, revela o aparecimento do pico de absorção característico dos grupos COOH, no comprimento de onda de  $1720\text{ cm}^{-1}$ , comprovando assim a introdução adicional destes grupos por via do enxerto de ramificações de PAA. Esta, a par com a análise potenciométrica, corroboram o sucesso da funcionalização nas microcápsulas, salientando-se as amostras vazias e com 3% de Fe incorporado que revelam maior teor de COOH na sua estrutura, apresentando um intervalo entre 0.05 e 0.17 mmol/g.

8. No que concerne à influência da funcionalização nos parâmetros do DSC, todas as amostras revelam um aumento da temperatura de transição vítrea até  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e uma diminuição da temperatura de fusão e de cristalização, até  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $11.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respetivamente. O estudo de DSC a temperaturas baixas conclui que o PAA-G ocorreu a diferentes níveis das microcápsulas, gerando uma unificação nos tamanhos dos poros e na sua distribuição ao longo da estrutura das microestruturas, tendo sido confirmado através da semelhança entre as entalpias de fusão da água confinada nos poros. Assim, as ramificações de PAA ocuparam grande parte dos seus poros superficiais e pouco profundos.

9. A análise de TGA reafirma o sucesso da funcionalização, através do acréscimo do resíduo no final da degradação das microcápsulas com PAA. Comparando com as

microcápsulas referência, todas as amostras funcionalizadas revelaram uma termo-estabilidade maior sendo que a temperatura onde se registou 10% de perda de massa apresentou um aumento entre 24 °C e 62 °C.

- **Microcápsulas com imobilização de BSA**

10. O processo de imobilização da proteína albumina de soro bovino (BSA) nas microcápsulas, foi realizado com e sem a presença de um ativador dos grupos COOH, N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC). Assim, a imobilização proteica foi dividida em quatro estudos: imobilização de BSA nas microcápsulas funcionalizadas e com ativador; imobilização de BSA nas microcápsulas funcionalizadas sem o auxílio do ativador; imobilização de BSA nas microcápsulas referência e com a presença do ativador; imobilização de BSA nas microcápsulas referência e sem o ativador.

11. A análise morfológica dos conjugados proteína-polímero através do SEM, apresenta uma nova camada superior visível com uma aparência particular. Apesar do diâmetro do círculo equivalente e a esfericidade apresentarem variações mínimas com a imobilização, até 20 µm, o mesmo não se pode afirmar em relação ao tamanho dos poros. Os poros visíveis, que são pertencentes à camada proteica, nas microestruturas funcionalizadas aumentam de dimensão, até 400 µm mas nas referência até 69 µm.

12. Os ensaios de UV-VIS revelaram que as microcápsulas de APA6 são um bom substrato para a imobilização proteica uma vez que, findos 30 minutos do processo se obtêm aproximadamente 60% de BSA imobilizada, sendo o processo mais estável na presença do ativador.

13. Os híbridos produzidos foram analisados por FTIR-ATR, que autenticaram uma vez mais a imobilização proteica através da diminuição da intensidade do pico associado aos grupos COOH. A largura da sua banda aumentou, indicando assim que a proteína participou na redução desses grupos.

14. Estudos de DSC revelaram que a imobilização proteica não alterou a forma preferível  $\alpha$  do substrato, microcápsulas de APA6. As temperaturas de fusão, comparadas com as obtidas nas microestruturas referência e funcionalizadas, não se alteraram permanecendo entre 204.8 e 214.9 °C, porém a temperatura de transição vítrea aumentou até 20 °C nas microcápsulas referência. O grau de cristalinidade apresentou uma diminuição até 16% nas microcápsulas funcionalizadas. O estudo do DSC a temperaturas baixas também revelou uma mudança na

forma e distribuição dos poros após a imobilização proteica. Em geral com a imobilização de BSA as entalpias de fusão diminuem até aproximadamente 124 °C, inclusive as microcápsulas vazias não apresentaram picos de fusão podendo este efeito indicar o preenchimento quase total dos seus poros.

15. Os ensaios de TGA indiretamente confirmaram a imobilização de BSA nas microcápsulas uma vez que os resíduos no final da degradação aumentaram entre 1.93 e 6.63 %, quando comparados com as referência e funcionalizadas. A imobilização proteica levou a uma estabilidade térmica adicional nas microcápsulas, aumentando entre 38 °C e 68 °C as temperaturas de degradação quando há perdas de massa de 10%. As amostras vazias apresentaram a melhor estabilidade térmica.

- Suscetibilidade ao pH

16. Num meio com pH neutro, pH 7, a libertação da vitamina B<sub>12</sub> (VB<sub>12</sub>) é impedida devido à expansão das ramificações de PAA. Este fenómeno é mais acentuado nas microestruturas com incorporação magnética, onde a libertação máxima da vitamina confinada ronda os 0.015 mg/mL. Quando o meio circundante é ácido, pH 2, ocorre a contração das macromoléculas do PAA ficando os poros das microcápsulas abertos, possibilitando a libertação da vitamina confinada no seu interior. Para este caso, a libertação máxima é de aproximadamente 0.025 mg/mL. Como espectável, as microcápsulas com PAA-G apresentaram uma suscetibilidade ao pH do meio que as envolve.

Em suma, a granulometria das microestruturas referência, a sua porosidade e entrelaçamento das macromoléculas, permitem que ao longo da sua estrutura se encontrem grupos funcionais, não só na superfície como nos seus poros.

Assim, devido à semelhança química com as proteínas a APA6 mostrou ser um bom substrato para o processo de imobilização proteica, uma vez que os grupos COOH e NH<sub>2</sub> nela presentes aparentam ser suficientes para que ocorra a imobilização de BSA. Com este substrato, não é necessária a sua funcionalização nem o uso de ativador para que ocorra a imobilização eficazmente, abrindo portas a imobilizações proteicas mais simples. A introdução das cargas magnéticas não impedem os processos de síntese, funcionalização e imobilização proteica nem a suscetibilidade ao pH, significando que as microcápsulas de APA6 com cargas magnéticas podem ser usados em dispositivos e aplicações biotecnológicas.

## Capítulo V

### Propostas de Trabalhos Futuros



## 5 Propostas de trabalhos futuros

A estrutura química e morfológica das microcápsulas de APA6 referência, vazias e com incorporação de partículas magnéticas, permitem aplicabilidades em diversas áreas de estudo. Todavia, quer o comportamento inteligente associado ao enxerto de ramificações de poli(ácido acrílico), quer a imobilização de proteínas nas microcápsulas, amplificam grandemente as suas aplicações. Um exemplo aplicacional, passa pelo controlo do teor alcoólico dos vinhos através da utilização de microcápsulas com núcleo magnético e com glicose oxidase imobilizada, sendo que, findo o tratamento estas podem ser recolhidas/separadas por ação de um campo magnético.

Atendendo aos resultados obtidos e conclusões levantadas nesta dissertação, sugerem-se algumas propostas de trabalhos futuros de modo a complementar o presente trabalho:

- Estudar o efeito de diferentes concentrações de ácido acrílico, quer nas propriedades gerais das microcápsulas quer na sua suscetibilidade ao pH, e otimizar o processo;
- Estudar a natureza da ligação (covalente, iónica, adsorção, etc) entre a proteína e o substrato polimérico quando o processo de imobilização proteica decorre na presença e ausência de um ativador;
- Estudar o processo de imobilização de enzimas.





## 6 Referências bibliográficas

- [1] J. Y. Shu, B. Panganiban, and T. Xu, *Peptide-polymer conjugates: from fundamental science to application.*, vol. 64, no. January. 2013.
- [2] R. Dubey, T. C. Shami, and K. U. Bhasker Rao, "Microencapsulation technology and applications," *Def. Sci. J.*, vol. 59, no. 1, pp. 82–95, 2009.
- [3] J. Suave, E. C Dall'agnol, a P. T Pezzin, D. a K Silva, M. M Meier, and V. Soldi, "Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas," *Rev. Saúde e Ambient.*, vol. 7, no. 2, pp. 12–20, 2006.
- [4] G. Lehnert, "Polyamides," *Kunststoffe Plast Eur.*, vol. 88, no. 10, pp. 25–26, 1998.
- [5] I. B. Page, *Polyamides as Engineering Thermoplastic Materials*. Rapra Technology Ltd, 2000.
- [6] D. Suteu, D. Bilba, and F. Dan, "Synthesis and characterization of polyamide powders for sorption of reactive dyes from aqueous solutions," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 105, no. 4, pp. 1833–1843, Aug. 2007.
- [7] C. Vasiliu-oprea and F. Dan, "On the Relation Between Synthesis Parameters and Morphology of Anionic Polycaproamide Obtained in Organic Media . I. Influence of the Na[O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>AlH<sub>2</sub>/Isophorone Diisocyanate Catalytic System," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 62, pp. 1517–1527, 1996.
- [8] L. Ricco, O. Monticelli, S. Russo, A. Paglianti, and A. Mariani, "Fast-activated anionic polymerization of -caprolactam in suspension, 1," *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 203, no. 10–11, pp. 1436–1444, Jul. 2002.
- [9] N. Barhoumi, "Polyamide from lactams by reactive rotational molding via anionic ring-opening polymerization: Optimization of processing parameters," *Express Polym. Lett.*, vol. 7, no. 1, pp. 76–87, 2012.

- [10] K. Shahzad, J. Deckers, S. Boury, B. Neirinck, J.-P. Kruth, and J. Vleugels, "Preparation and indirect selective laser sintering of alumina/PA microspheres," *Ceram. Int.*, vol. 38, no. 2, pp. 1241–1247, Mar. 2012.
- [11] E. Mathiowitz and M. D. Cohen, "Polyamide microcapsules for controlled release. I. Characterization of the membranes," *J. Memb. Sci.*, vol. 40, no. 1, pp. 1–26, Jan. 1989.
- [12] E. Mathiowitz and M. D. Cohen, "Polyamide microcapsules for controlled release. II. Release characteristics of the microcapsules," *J. Memb. Sci.*, vol. 40, no. 1, pp. 27–41, Jan. 1989.
- [13] E. Mathiowitz and M. D. Cohen, "Polyamide microcapsules for controlled release. III. Spontaneous release of azobenzene," *J. Memb. Sci.*, vol. 40, no. 1, pp. 43–54, Jan. 1989.
- [14] E. Mathiowitz and M. D. Cohen, "Polyamide microcapsules for controlled release. IV. Effects of swelling," *J. Memb. Sci.*, vol. 40, no. 1, pp. 55–65, Jan. 1989.
- [15] N. Dencheva, Z. Denchev, S. Lanceros-Méndez, and T. Ezquerro Sanz, "One-Step In Situ Synthesis of Polyamide Microcapsules With Inorganic Payload and Their Transformation into Responsive Thermoplastic Composite Materials," *Macromol. Mater. Eng.*, pp. 119–124, 2015.
- [16] Z. Denchev and N. Dencheva, "Polyamide Microcapsules and Method to Produce the Same," PT 107879, 2014.
- [17] G. Odian, *Principles of Polymerization*, 4th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2004.
- [18] J. May and D. S. Goodsell, "What is a Protein?," *Pdb 101*, vol. 18, no. 8, p. 432, 2002.
- [19] J. Flarakos, K. L. Morand, and P. Vouros, "High-throughput solution-based medicinal library screening against human serum albumin.," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 5, pp. 1345–53, Mar. 2005.

- [20] D. C. Carter and J. X. Ho, "Structure of serum albumin.," *Adv. Protein Chem.*, vol. 45, pp. 153–203, Jan. 1994.
- [21] D. C. Carter, X. M. He, S. H. Munson, P. D. Twigg, K. M. Gernert, M. B. Broom, and T. Y. Miller, "Three-dimensional structure of human serum albumin.," *Science*, vol. 244, no. 4909, pp. 1195–8, Jun. 1989.
- [22] S. Sasnouski, V. Zorin, I. Khludeyev, M.-A. D'Hallewin, F. Guillemin, and L. Bezdetsnaya, "Investigation of Foscan interactions with plasma proteins.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1725, no. 3, pp. 394–402, Oct. 2005.
- [23] K. Yamasaki, T. Maruyama, U. Kragh-Hansen, and M. Otagiri, "Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1295, no. 2, pp. 147–57, Jul. 1996.
- [24] A. A. Saboury, "Application of a new method for data analysis of isothermal titration calorimetry in the interaction between human serum albumin and Ni<sup>2+</sup>," *J. Chem. Thermodyn.*, vol. 35, no. 12, pp. 1975–1981, Dec. 2003.
- [25] D. D. Goodsell, "Bovine Serum Albumin." [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a4503?lang=pt&region=PT>. [Accessed: 22-Sep-2015].
- [26] J. F. FOSTER, "Some Aspects of the structure and Conformational Properties of Serum Albumin," in *Albumin: Structure, Function and Uses*, V. Rosenoer, M. Oratz, and M. Rothschild, Eds. New York: Pergamon Press, 1977, pp. 53–84.
- [27] R. Taylor, *Protein Immobilization: Fundamentals and Applications*. New York: Marcel Dekker, Inc, 1991.
- [28] A. A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, and R. Stevanato, "Enzyme immobilization: an update," *J. Chem. Biol.*, vol. 6, no. 4, pp. 185–205, Aug. 2013.
- [29] W. Hartmeier, *Immobilized Biocatalysts: An Introduction*. Springer Science & Business Media, 1988.

- [30] U. Kragl, "Immobilized enzymes and membrane reactors," in *Industrial Enzymology: The Application of Enzymes in Industry*, T. Godfrey, Ed. London: Macmillan Press LTD, 1996, pp. 275–283.
- [31] R. Falb, "Classification and Chemistries of Immobilized Enzymes," in *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*, T. Chang, Ed. New York: Plenum Press, 1977, pp. 7–14.
- [32] M. D. Trevan, *Immobilized enzymes: an introduction and applications in biotechnology*. Wiley, 1980.
- [33] K. Buchholz and J. Klein, "Characterization of immobilized biocatalysts.," *Methods Enzymol.*, vol. 135, pp. 3–30, Jan. 1987.
- [34] R. A. Sheldon, "Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance," *Adv. Synth. Catal.*, vol. 349, no. 8–9, pp. 1289–1307, Jun. 2007.
- [35] J. M. Cabral and J. F. Kennedy, "Covalent and coordination immobilization of proteins.," *Bioprocess Technol.*, vol. 14, pp. 73–138, Jan. 1991.
- [36] E. Magner, "Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 15, pp. 6213–22, Aug. 2013.
- [37] H.-A. Klok, "Peptide/Protein–Synthetic Polymer Conjugates: *Quo Vadis*," *Macromolecules*, vol. 42, no. 21, pp. 7990–8000, 2009.
- [38] E. M. Pelegri-O'Day, E.-W. Lin, and H. D. Maynard, "Therapeutic protein-polymer conjugates: advancing beyond PEGylation.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 41, pp. 14323–32, Oct. 2014.
- [39] C. Silva, C. J. Silva, A. Zille, G. M. Guebitz, and A. Cavaco-Paulo, "Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibres," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 41, no. 6–7, pp. 867–875, 2007.

- [40] E. Fatarella, D. Spinelli, M. Ruzzante, and R. Pogni, "Nylon 6 film and nanofiber carriers: Preparation and laccase immobilization performance," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 102, pp. 41–47, Apr. 2014.
- [41] C. Nan, Y. Zhang, G. Zhang, C. Dong, S. Shuang, and M. M. F. Choi, "Activation of nylon net and its application to a biosensor for determination of glucose in human serum," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 44, no. 5, pp. 249–253, May 2009.
- [42] X. Cai, Y. Zhang, and G. Wu, "A novel approach to prepare PA6/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> microspheres for protein immobilization," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 122, no. 4, pp. 2271–2277, Nov. 2011.
- [43] L. C. Santa Maria, M. A. S. Costa, F. A. M. Santos, S. H. Wang, and M. R. Silva, "Preparation and characterization of polymer metal composite microspheres," *Mater. Lett.*, vol. 60, no. 2, pp. 270–273, Jan. 2006.
- [44] X. Liu, Y. Guan, R. Shen, and H. Liu, "Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads.," *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 822, no. 1–2, pp. 91–7, Aug. 2005.
- [45] G. Bayramoglu, M. Yilmaz, and M. Yakup Arica, "Preparation and characterization of epoxy-functionalized magnetic chitosan beads: laccase immobilized for degradation of reactive dyes," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 33, no. 4, pp. 439–448, Jun. 2009.
- [46] Y. Liu, S. Jia, Q. Wu, J. Ran, W. Zhang, and S. Wu, "Studies of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles prepared by co-precipitation under the magnetic field for lipase immobilization," *Catal. Commun.*, vol. 12, no. 8, pp. 717–720, Mar. 2011.
- [47] A. K. Gupta and M. Gupta, "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications.," *Biomaterials*, vol. 26, no. 18, pp. 3995–4021, Jun. 2005.
- [48] J. Kim, J. W. Grate, and P. Wang, "Nanobiocatalysis and its potential applications," *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 11, pp. 639–646, 2008.

- [49] L. Nobs, F. Buchegger, R. Gurny, and E. Allémann, "Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles.," *J. Pharm. Sci.*, vol. 93, no. 8, pp. 1980–92, Aug. 2004.
- [50] F. Zeng, H. Lee, and C. Allen, "Epidermal Growth Factor-Conjugated Poly(ethylene glycol)-block - Poly( $\delta$ -valerolactone) Copolymer Micelles for Targeted Delivery of Chemotherapeutics," *Bioconjug. Chem.*, vol. 17, no. 2, pp. 399–409, Mar. 2006.
- [51] L. Tao, G. Mantovani, F. Lecolley, and D. M. Haddleton, "Alpha-aldehyde terminally functional methacrylic polymers from living radical polymerization: application in protein conjugation 'pegylation'.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 41, pp. 13220–1, Oct. 2004.
- [52] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*. Elsevier, 2008.
- [53] G. Tillet, B. Boutevin, and B. Ameduri, "Chemical reactions of polymer crosslinking and post-crosslinking at room and medium temperature," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 2, pp. 191–217, 2011.
- [54] S. S. Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking*. 1991.
- [55] D. Sehgal and I. K. Vijay, "A Method for the High Efficiency of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Amidation," *Anal. Biochem.*, vol. 218, no. 1, pp. 87–91, 1994.
- [56] "Covalent Coupling," 2013.
- [57] Y. Okahata, H. Noguchi, and T. Seki, "Thermoselective permeation from a polymer-grafted capsule membrane," *Macromolecules*, vol. 19, no. 2, pp. 493–494, Mar. 1986.
- [58] T. Kidchob, "Thermoresponsive release from poly(Glu(OMe))-block-poly(Sar) microcapsules with surface-grafting of poly(N-isopropylacrylamide)," *J. Control. Release*, vol. 50, no. 1–3, pp. 205–214, Jan. 1998.
- [59] K. Makino, Y. Fujita, K. Takao, S. Kobayashi, and H. Ohshima, "Preparation and properties of thermosensitive hydrogel microcapsules," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 21, no. 4, pp. 259–263, Aug. 2001.

- [60] S. J. Chang, C. H. Lee, and Y. J. Wang, "Microcapsules prepared from alginate and a photosensitive poly(L-lysine)," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 10, no. 5, pp. 531–542, Jan. 1999.
- [61] Y. Okahata, H. Noguchi, and T. Seki, "Functional capsule membranes. 26. Permeability control of polymer-grafted capsule membranes responding to ambient pH changes," *Macromolecules*, vol. 20, no. 1, pp. 15–21, Jan. 1987.
- [62] N. Vishal Gupta and H. G. Shivakumar, "Investigation of Swelling Behavior and Mechanical Properties of a pH-Sensitive Superporous Hydrogel Composite," *Iran. J. Pharm. Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 481–493, 2012.
- [63] S. G. Roy and P. De, "pH responsive polymers with amino acids in the side chains and their potential applications," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 131, no. 20, p. n/a–n/a, Oct. 2014.
- [64] T. Kidchob, S. Kimura, and Y. Imanishi, "pH-responsive release from polypeptide microcapsules," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 63, no. 4, pp. 453–458, Jan. 1997.
- [65] Y. Okahata and H. J. Lim, "Functional capsule membranes. 8. Signal-receptive permeability control of sodium chloride from a large nylon capsule coated with phospholipid bilayers," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 106, no. 17, pp. 4696–4700, Aug. 1984.
- [66] D. Schmaljohann, "Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 58, no. 15, pp. 1655–70, Dec. 2006.
- [67] Z. Zarafshani, T. Obata, and J.-F. Lutz, "Smart PEGylation of trypsin.," *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 8, pp. 2130–5, Aug. 2010.
- [68] J. Hentschel, K. Bleek, O. Ernst, and H. G. Bo, "Easy Access to Bioactive Peptide - Polymer Conjugates via RAFT," *Macromolecules*, vol. 41, pp. 1073–1075, 2008.
- [69] B. Jung and P. Theato, "Chemical Strategies for the Synthesis of Protein – Polymer Conjugates," *Adv. Polym. Sci.*, no. May 2012, pp. 1–34, 2012.

- [70] T. Shimoboji, E. Larenas, T. Fowler, A. S. Hoffman, and P. S. Stayton, "Temperature-Induced Switching of Enzyme Activity with Smart Polymer–Enzyme Conjugates," *Bioconjug. Chem.*, vol. 14, no. 3, pp. 517–525, May 2003.
- [71] T. Shimoboji, Z. Ding, P. S. Stayton, and A. S. Hoffman, "Mechanistic Investigation of Smart Polymer–Protein Conjugates," *Bioconjug. Chem.*, vol. 12, no. 2, pp. 314–319, Mar. 2001.
- [72] V. P. Torchilin, "Immobilised enzymes as drugs," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 1, no. 1, pp. 41–86, May 1987.
- [73] M. J. Hawkins, P. Soon-Shiong, and N. Desai, "Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 8, pp. 876–85, May 2008.
- [74] J. Panyam and V. Labhasetwar, "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 3, pp. 329–347, Feb. 2003.
- [75] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. G. Chen, and D. M. Shin, "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 5, pp. 1310–6, Mar. 2008.
- [76] J. Kreuter, D. Shamenkov, V. Petrov, P. Ramge, K. Cychutek, C. Koch-Brandt, and R. Alyautdin, "Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier.," *J. Drug Target.*, vol. 10, no. 4, pp. 317–25, Jun. 2002.
- [77] T. M. Göppert and R. H. Müller, "Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: comparison of plasma protein adsorption patterns.," *J. Drug Target.*, vol. 13, no. 3, pp. 179–87, Apr. 2005.
- [78] T. Xu, N. Zhao, F. Ren, R. Hourani, M. T. Lee, J. Y. Shu, S. Mao, and B. A. Helms, "Subnanometer Porous Thin Films by the Co-assembly of Nanotube Subunits and Block Copolymers," *ACS Nano*, vol. 5, no. 2, pp. 1376–1384, Feb. 2011.
- [79] I. Koh, X. Wang, B. Varughese, L. Isaacs, S. H. Ehrman, and D. S. English, "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biorecognition: Evaluation of Surface Coverage and Activity," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, no. 4, pp. 1553–1558, Feb. 2006.



- [80] Y. Li, X. Xu, C. Deng, P. Yang, and X. Zhang, "Immobilization of trypsin on superparamagnetic nanoparticles for rapid and effective proteolysis.," *J. Proteome Res.*, vol. 6, no. 9, pp. 3849–55, Sep. 2007.
- [81] A. Zaks and A. Klibanov, "Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents," *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 7, pp. 3194–3201, Mar. 1988.
- [82] Y. Fang, X.-J. Huang, P.-C. Chen, and Z.-K. Xu, "Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors," *BMB Rep.*, vol. 44, no. 2, pp. 87–95, 2011.
- [83] A. K. Shaytan, E.-K. Schillinger, E. Mena-Osteritz, S. Schmid, P. G. Khalatur, P. Bäuerle, and A. R. Khokhlov, "Self-organizing bioinspired oligothiophene–oligopeptide hybrids," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 2, pp. 525–544, 2011.
- [84] R. J. Kumar, J. M. MacDonald, T. B. Singh, L. J. Waddington, and A. B. Holmes, "Hierarchical Self-Assembly of Semiconductor Functionalized Peptide  $\alpha$ -Helices and Optoelectronic Properties," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 22, pp. 8564–8573, Jun. 2011.
- [85] I. Díez, H. Hahn, O. Ikkala, H. G. Börner, and R. H. A. Ras, "Controlled growth of silver nanoparticle arrays guided by a self-assembled polymer–peptide conjugate," *Soft Matter*, vol. 6, no. 14, p. 3160, Jul. 2010.
- [86] E. N. Savariar, S. Ghosh, D. C. González, and S. Thayumanavan, "Disassembly of noncovalent amphiphilic polymers with proteins and utility in pattern sensing.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 16, pp. 5416–7, Apr. 2008.
- [87] B. S. Sandanaraj, R. Demont, S. V. Aathimanikandan, E. N. Savariar, and S. Thayumanavan, "Selective sensing of metalloproteins from nonselective binding using a fluorogenic amphiphilic polymer.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 33, pp. 10686–7, Aug. 2006.

- [88] D. C. González, E. N. Savariar, and S. Thayumanavan, "Fluorescence patterns from supramolecular polymer assembly and disassembly for sensing metallo- and nonmetalloproteins.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 22, pp. 7708–16, Jun. 2009.
- [89] M. Delvaux and S. Demoustier-Champagne, "Immobilisation of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 18, no. 7, pp. 943–951, Jul. 2003.
- [90] M. Aguilar, C. Elvira, a. Gallardo, B. Vázquez, and J. Román, "Smart polymers and their applications," *Top. Tissue Eng.*, vol. 3, no. 3, pp. 1–27, 2007.
- [91] S. Marek, M. Gran, N. Peppas, and M. Caldorera-Moore, "Intelligent, Responsive and Theranostic Hydrogel Systems for Controlled Delivery of Therapeutics," in *Chemoresponsive Materials: Stimulation by Chemical and Biological Signals*, 14th ed., H. Schneider, Ed. The Royal Society of Chemistry, 2015, pp. 13–14.
- [92] T. Swift, L. Swanson, M. Geoghegan, and S. Rimmer, "The pH-responsive behaviour of poly(acrylic acid) in aqueous solution is dependent on molar mass.," *Soft Matter*, vol. 12, no. 9, pp. 2542–9, Feb. 2016.
- [93] R. Ghizal, "Smart polymers and their applications," *Int. J. Eng. Technol. Manag. Appl. Sci.*, vol. 2, no. 4, pp. 104–115, 2014.
- [94] M. D. Kurkuri, J.-R. Lee, J. H. Han, and I. Lee, "Electroactive Behavior of Poly(Acrylic Acid) Grafted Poly(Vinyl Alcohol) Samples, Their Synthesis Using a Ce(IV) Glucose Redox System and Their Characterization," *Smart Mater. Struct.*, vol. 15, no. 2, pp. 417–423, 2006.
- [95] X. Y. Liu, S. W. Zheng, R. Y. Hong, Y. Q. Wang, and W. G. Feng, "Preparation of magnetic poly(styrene-co-acrylic acid) microspheres with adsorption of protein," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 443, pp. 425–431, 2014.
- [96] J. Yun and H. I. Kim, "Preparation of poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) microcapsules and microspheres and their pH-responsive release behavior," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 15, no. 6, pp. 902–906, 2009.

- [97] B. Jachimska, M. Wasilewska, and Z. Adamczyk, "Characterization of Globular Protein Solutions by Dynamic Light Scattering, Electrophoretic Mobility, and Viscosity Measurements," *Langmuir*, vol. 24, no. 13, pp. 6866–6872, Jul. 2008.
- [98] B. Hafner, "Energy Dispersive Spectroscopy on the SEM: A Primer," *Charact. Facil. Univ. Minnesota*, pp. 7–10, 2006.
- [99] G.-F. Shan, W. Yang, M. Yang, B. Xie, J. Feng, and Q. Fu, "Effect of temperature and strain rate on the tensile deformation of polyamide 6," *Polymer (Guildf.)*, vol. 48, no. 10, pp. 2958–2968, May 2007.
- [100] J. F. MANO and J.-P. CAHON, "A simple method for calibrating the temperature in dynamic mechanical analysers and thermal mechanical analysers," *Polym. Test.*, vol. 23, no. 4, pp. 423–430.
- [101] K. Menard, *Dynamic Mechanical Analysis: A Practical Introduction*, Second. CRC Press, 2008.
- [102] A. D. McNaught and A. Wilkinson, *IUPAC - Compendium of Chemical Terminology - Gold Book*, 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.
- [103] G. Kampf, *Characterization of Plastics by Physical Methods: Experimental Techniques and Practical Applications*. Munich: Hansen, 1986.
- [104] G. Lawes, *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. 1987.
- [105] H. Yamaguchi, S. Nakanishi, H. Iba, and T. Itoh, "Amorphous polymeric anode materials from poly ( acrylic acid ) and tin ( II ) oxide for lithium ion batteries," *J. Power Sources*, vol. 275, pp. 1–5, 2015.
- [106] P. Zucca and E. Sanjust, "Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms," *Molecules*, vol. 19, no. 9, pp. 14139–14194, 2014.



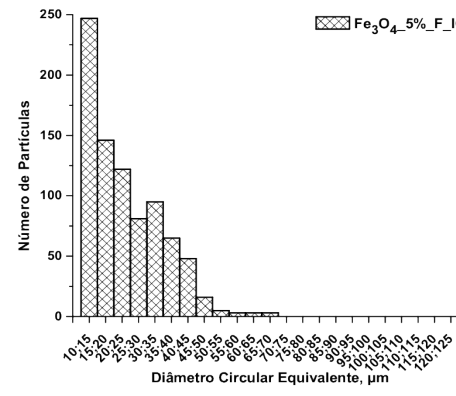
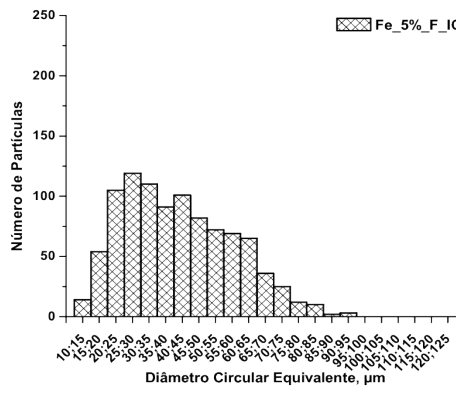
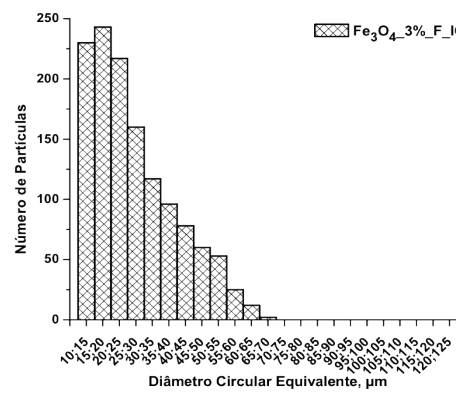
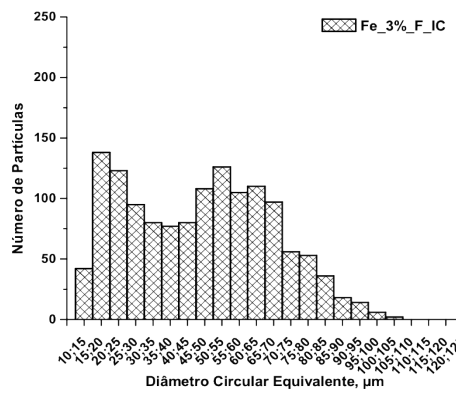
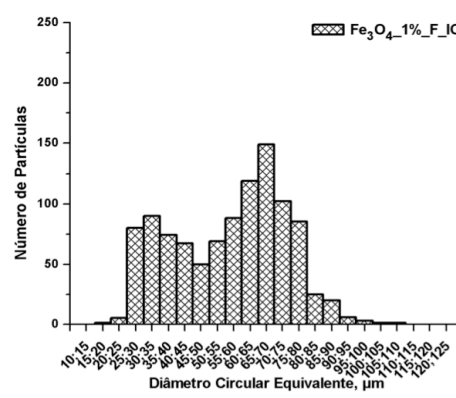
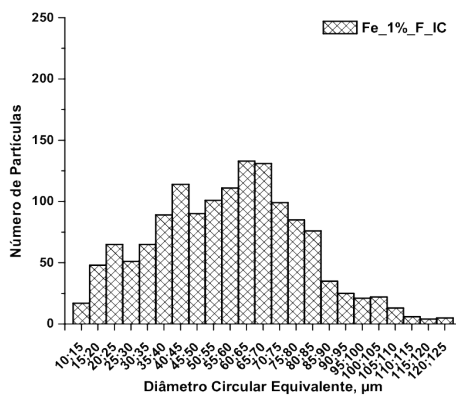
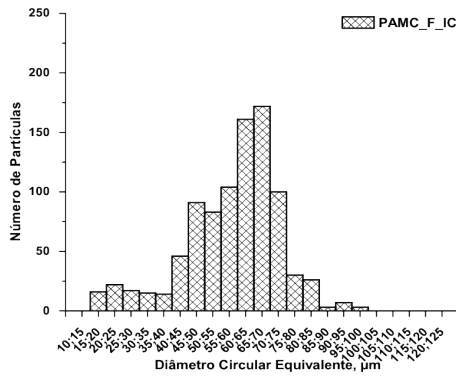
## Anexos

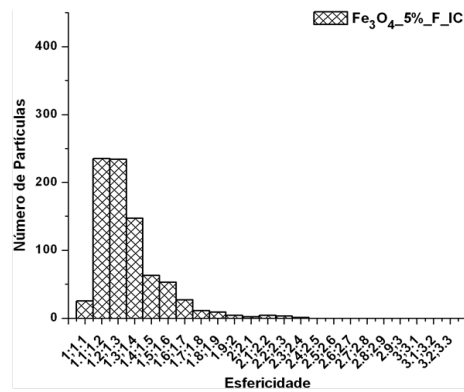
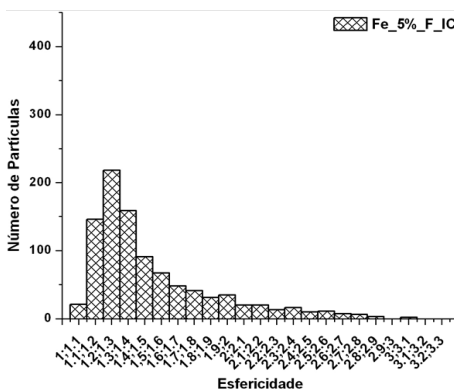
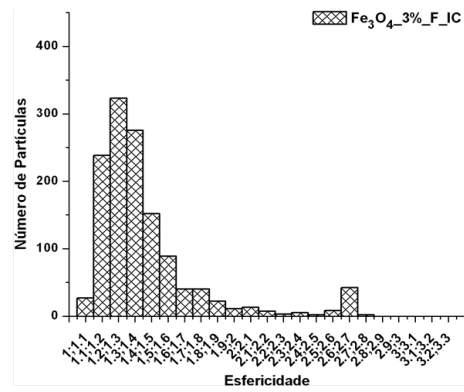
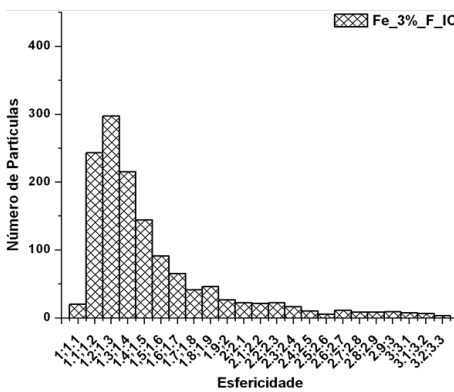
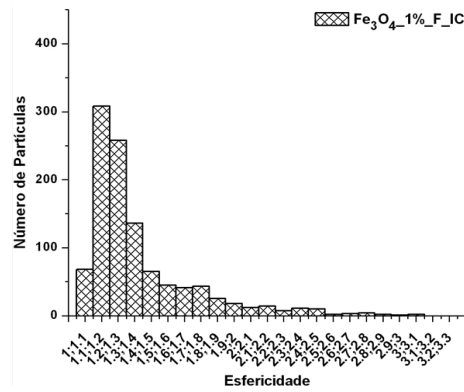
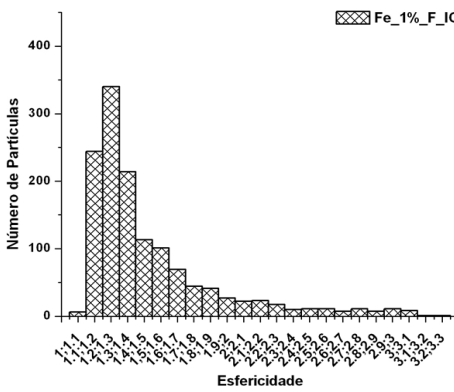
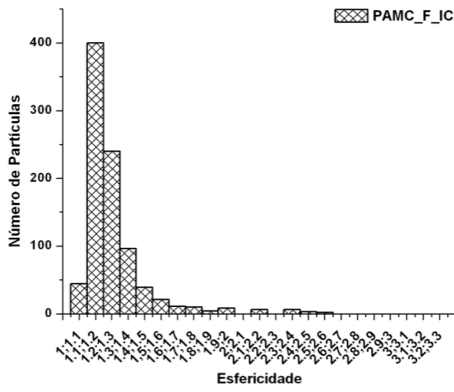
## 7 Anexos

Anexo 1 - Vantagens e desvantagens dos métodos de conjugação proteína-polímero [106].

		Vantagens	Desvantagens
Ligação Não Covalente	<b>Aprisionamento</b>	Não é preciso modificar quimicamente a enzima; A enzima deve reter a atividade catalítica sob condições de polimerização/transição do suporte.	Perda de enzimas; Transferência de massa.
	<b>Interação Electroestática</b>	Não é preciso modificar quimicamente a enzima; Fácil execução;	Perda de enzimas; Baixa especificidade da reação (troca de iões e a adsorção pode se sobrepor).
	<b>Adsorção</b>	Não é preciso modificar quimicamente a enzima; Execução fácil e barata;	Perda de enzimas; Baixa especificidade da reação (troca de iões e a adsorção pode se sobrepor).
	<b>Bioafinidade</b>	Alta especificidade da reação.	É mandatária a presença de grupos específicos na enzima.
Ligação Covalente	<b><i>Crosslinking</i> de Enzimas</b>	Não é necessário um suporte; Estabilização enzimática; Perdas do ativador minimizadas.	Transferência de massa; Processo experimental complexo.
	<b>Ligação Covalente</b>	Força da ligação; Estabilização enzimática; Perdas do ativador minimizadas;	Possível diminuição da atividade enzimática; Necessidade de modificar quimicamente o substrato; Ligação usualmente irreversível, impedindo a reutilização do substrato.

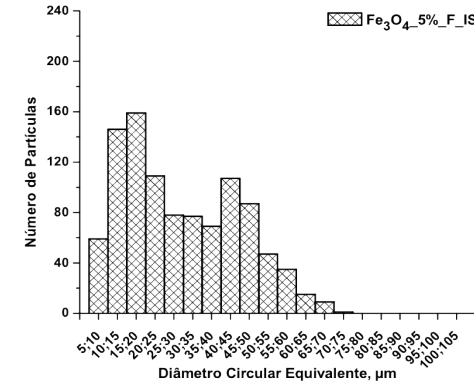
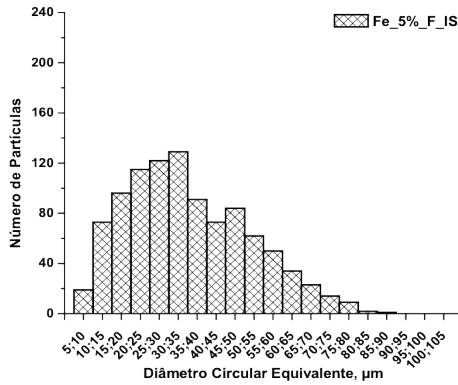
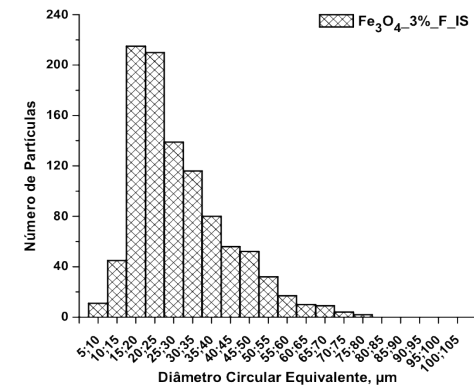
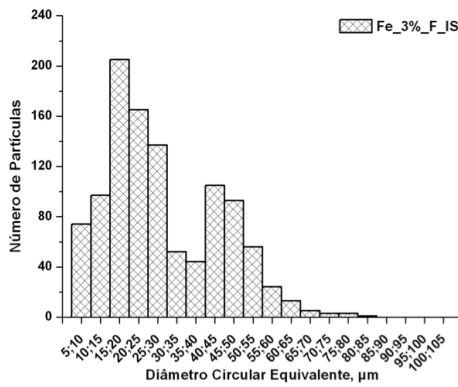
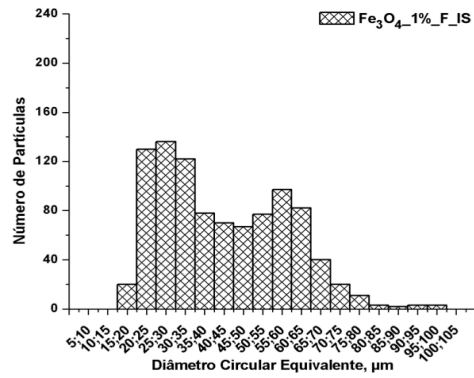
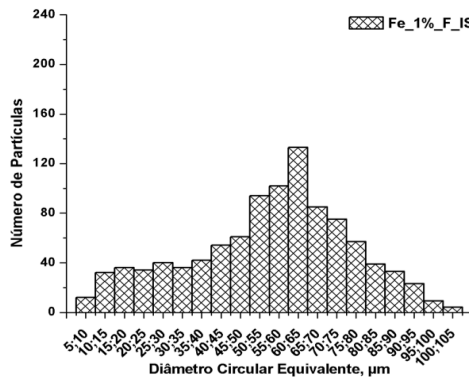
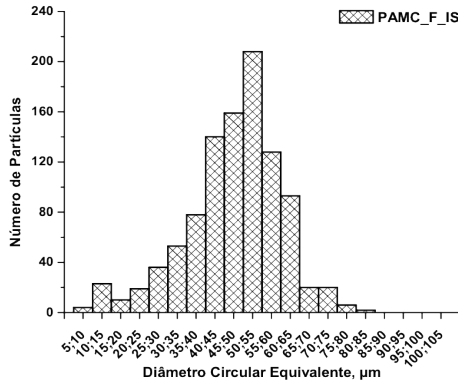
Anexo 2 - Histogramas do diâmetro do círculo equivalente e esfericidade das MCs funcionalizadas e com BSA imobilizada com ativador (IC).

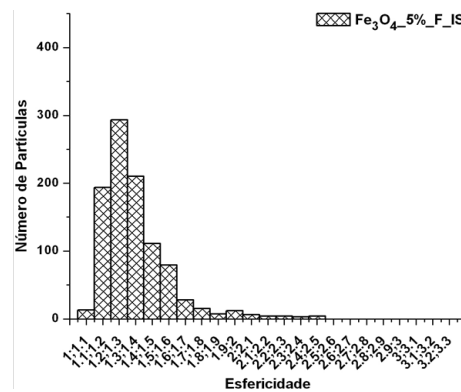
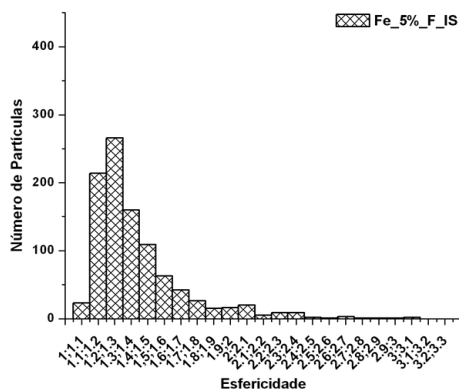
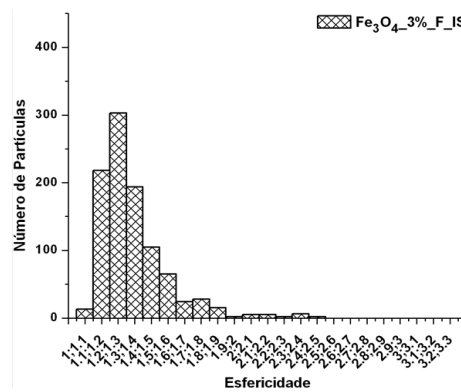
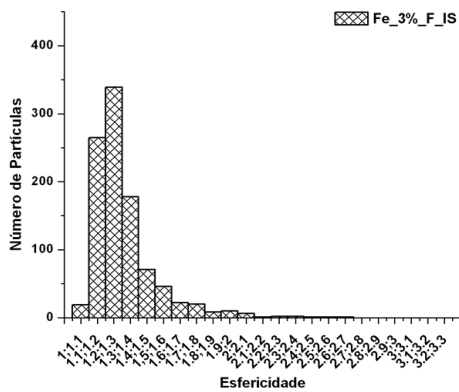
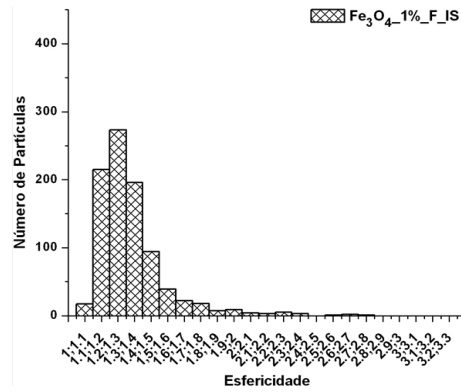
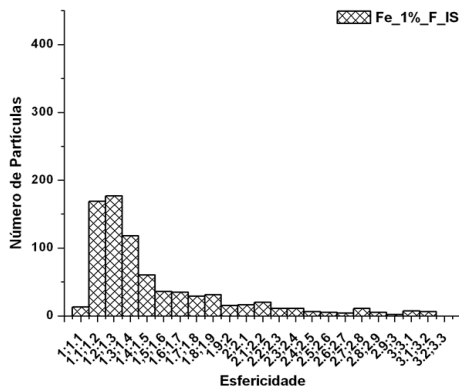
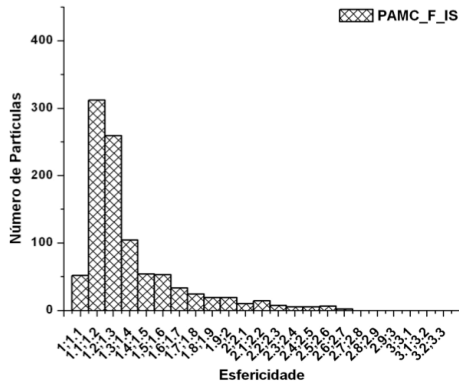




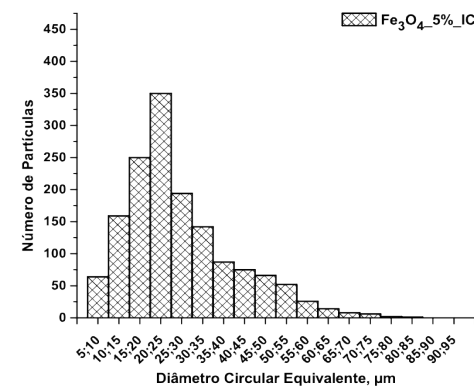
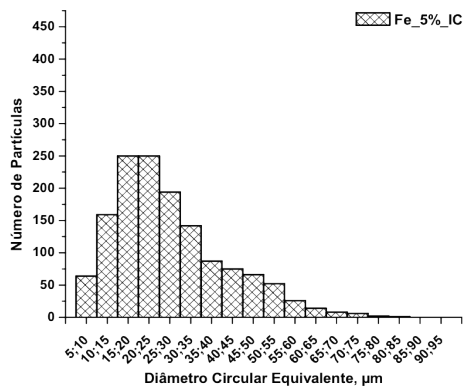
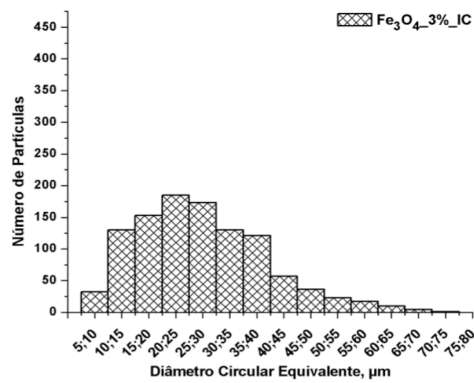
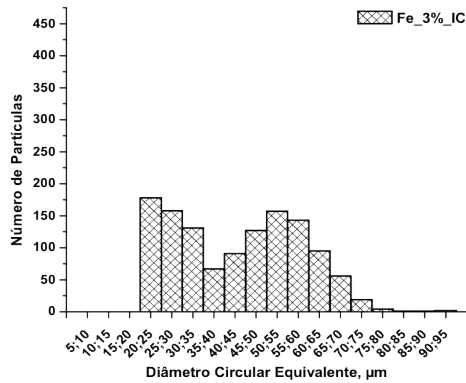
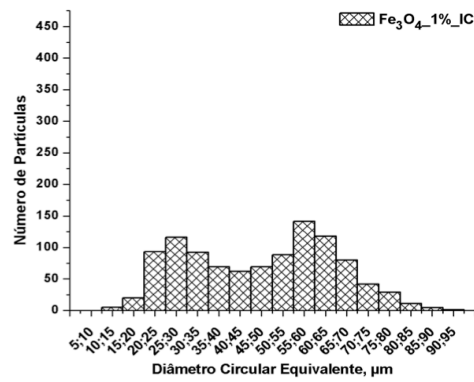
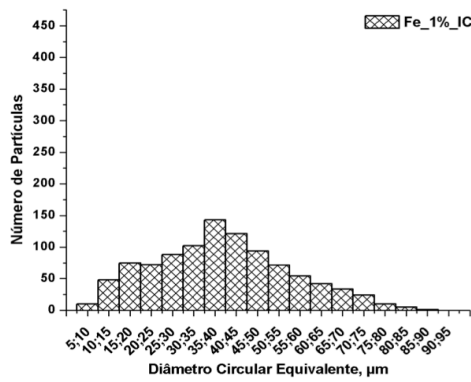
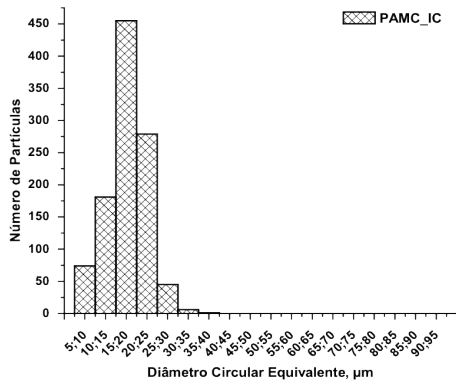


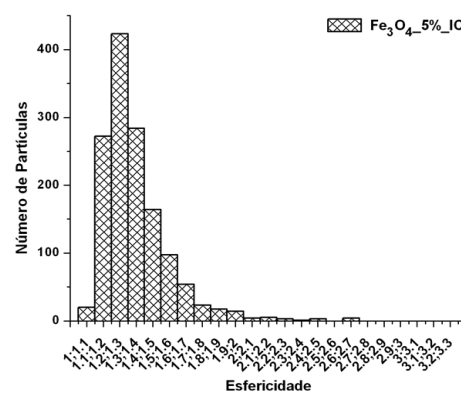
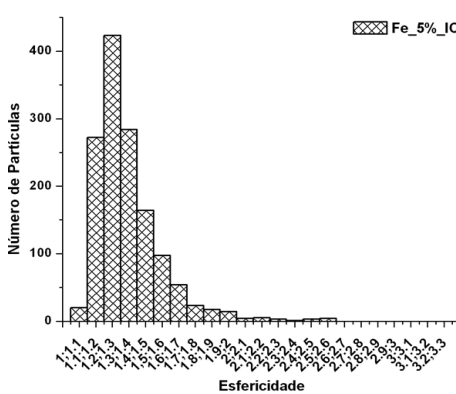
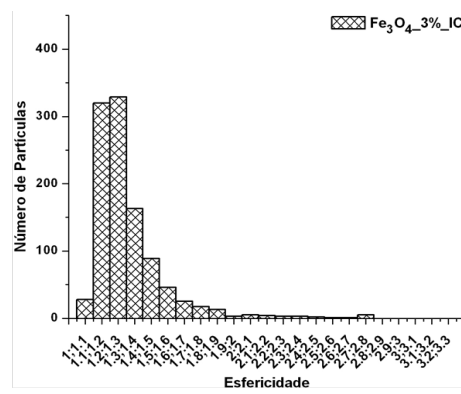
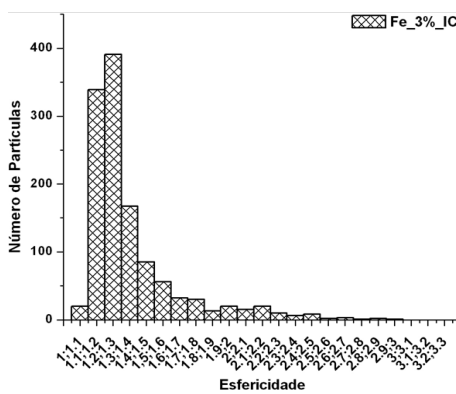
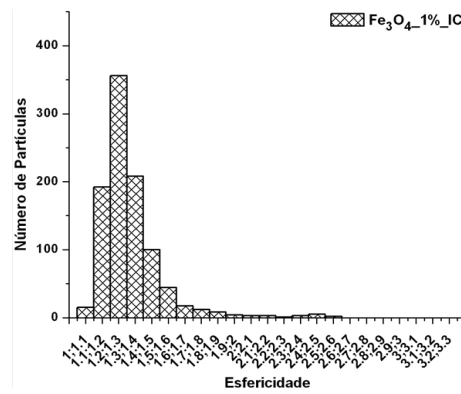
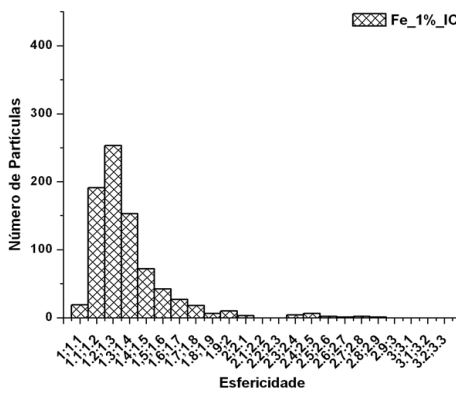
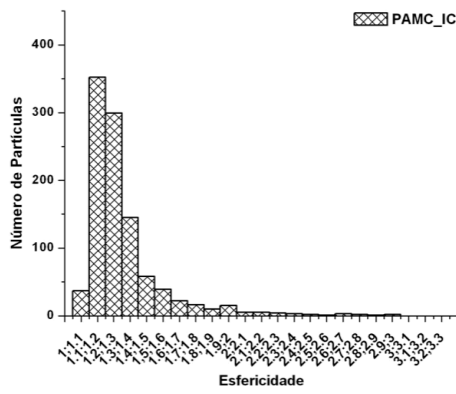
Anexo 3 - Diâmetro do círculo equivalente das MCs funcionalizadas e com BSA imobilizada sem ativador (IS).



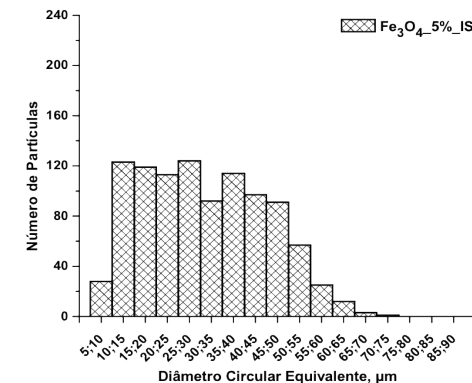
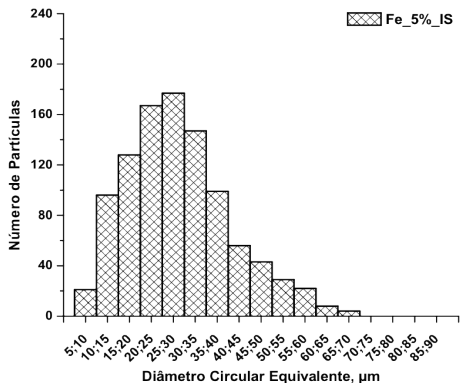
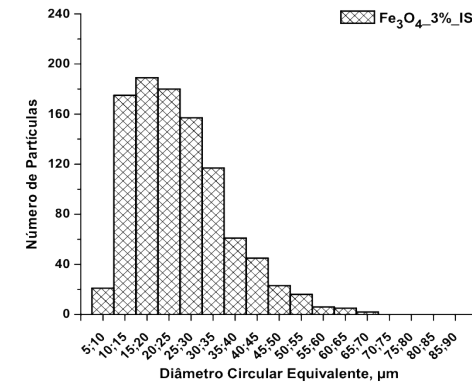
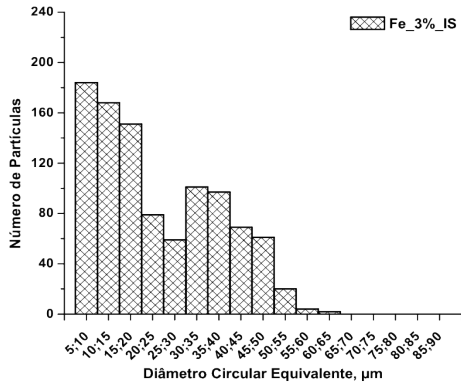
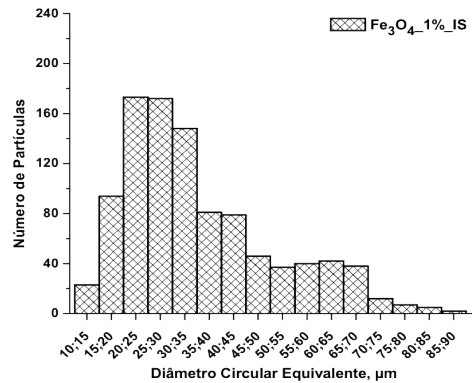
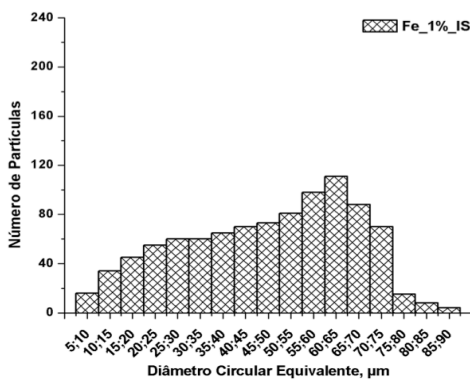
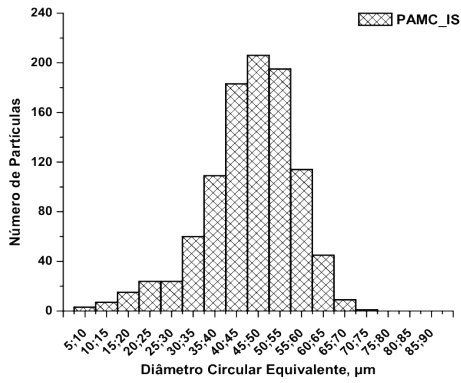


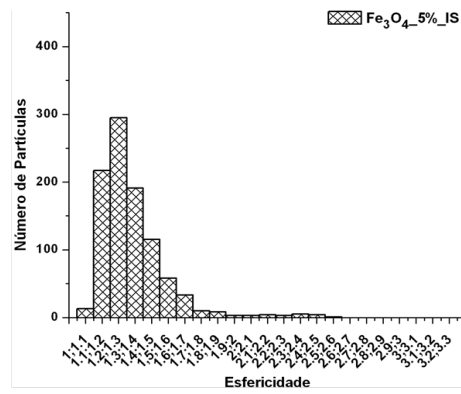
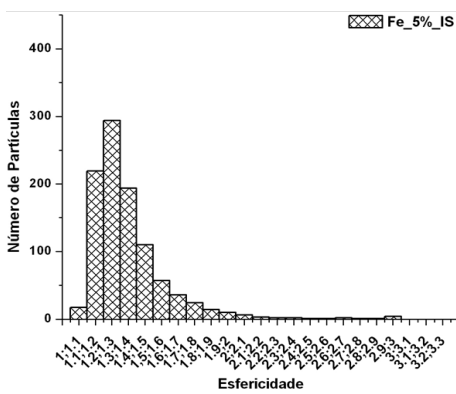
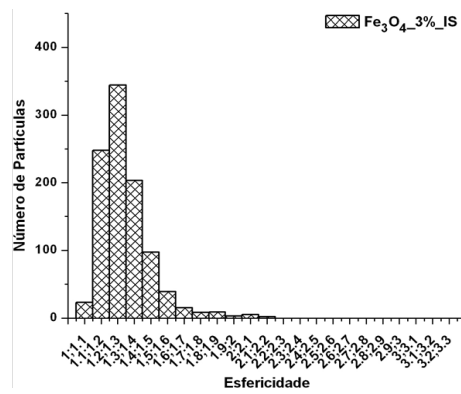
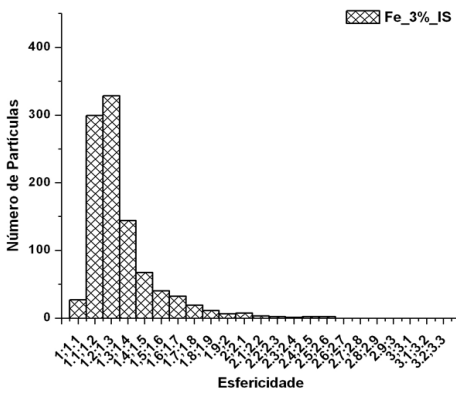
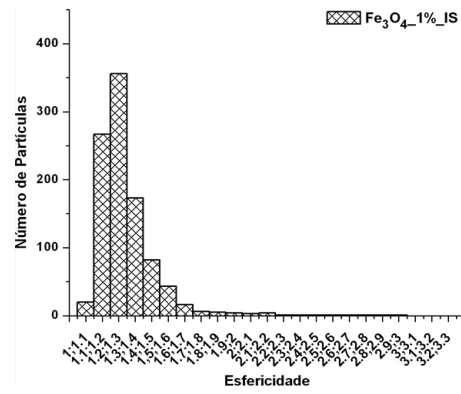
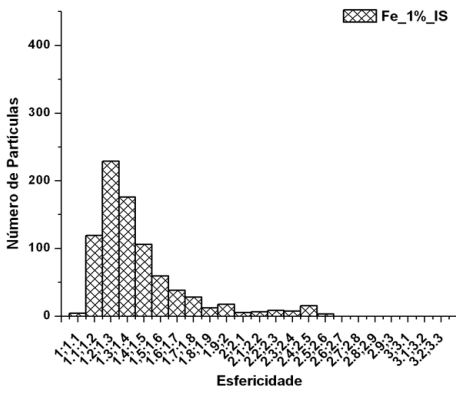
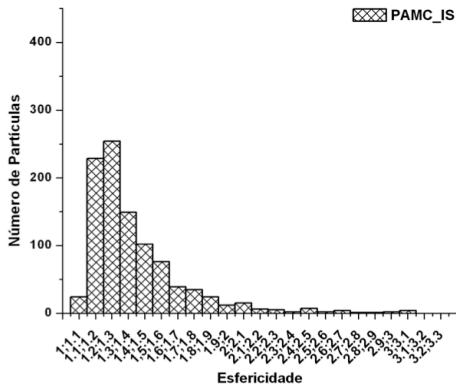
Anexo 4 - Histogramas do diâmetro do círculo equivalente e esfericidade das MCs referência e com BSA imobilizada com ativador.





Anexo 5 - Histogramas do diâmetro do círculo equivalente e esfericidade das MCs referência e com BSA imobilizada sem ativador.





Anexo 6 - Gráfico do DSC da proteína albumina de soro bovino (BSA) estando representado a preto o primeiro aquecimento, a vermelho o segundo e a cinzento o arrefecimento.

