LILIAN LACERDA DE ALMEIDA

**SÍNTESE E PROPRIEDADES DO COPOLÍMERO ANFIFÍLICO POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO)-*BLOCO*-POLI(ÓXIDO DE ETILENO) E
PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS**

**SÃO PAULO
2012**

LILIAN LACERDA DE ALMEIDA

**SÍNTESE E PROPRIEDADES DO COPOLÍMERO ANFIFÍLICO POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO)-*BLOCO*-POLI(ÓXIDO DE ETILENO) E
PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS**

Área de Concentração:

Engenharia Metalúrgica e de Matérias

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Wang Shu Hui

**SÃO PAULO
2012**

LILIAN LACERDA DE ALMEIDA

**SÍNTESE E PROPRIEDADES DO COPOLÍMERO ANFIFÍLICO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)-*BLOCO*-POLI(ÓXIDO DE ETILENO) E
PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS**

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Engenharia.

Área de Concentração:
Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Wang Shu Hui

**SÃO PAULO
2012**

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 28 de fevereiro de 2012.

Assinatura do autor _____

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Lilian Lacerda de

**Síntese e propriedade do copolímero anfifílico poli (3-hidro-
xibutirato)-*bloco*-poli (óxido de etileno) e preparação de nano-
partículas / L.L. de Almeida. – ed.rev. -- São Paulo, 2012.
82 p.**

**Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade
de São Paulo. Departamento de Engenharia Metalúrgica e de
Materiais.**

**1. Polímeros (Materiais) 2. Nanopartículas (Preparo) I. Univer-
sidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de En-
genharia Metalúrgica e de Materiais II. t.**

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais
Geraldo e Dauricea, ao meu irmão Michel,
minhas irmãs, cunhados e aos meus
sobrinhos Rafael e Mariana.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, principalmente:

Aos meus pais pelo apoio incondicional, e por terem me dado a oportunidade de me dedicar exclusivamente a esse trabalho.

À professora Dra. Wang Shu Hui, pela confiança, paciência e por todo tempo em que se dedicou a me ensinar.

Ao MSc. Fábio Conte Correia, pela amizade e auxílio durante toda a pesquisa.

Ao Dr. Walker Soares Drummond e a Dra Telma Moura, pela amizade, ajuda e pelos conselhos.

Ao Dr Douglas Moraes pela ajuda nas análises espectroscópicas.

Ao Técnico Vinícius responsável pela microscopia no Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

A CAPES pela bolsa de mestrado.

RESUMO

Visando o crescente interesse em pesquisa de novos materiais que utilizam polímeros biodegradáveis, este presente trabalho teve como objetivo a síntese de novos copolímeros através da reação de transesterificação no estado fundido entre poli(3-hidroxibutirato) (PHB), um polímero biodegradável, com poli(etileno glicol) (PEG).

Sabe-se que um dos grandes problemas no uso do PHB é a sua elevada cristalinidade e instabilidade térmica, pois possui temperatura de fusão entre 170 e 180°C e apresenta degradação térmica a 190°C. A reação de transesterificação é uma alternativa para fazer a modificação química deste polímero, o que também viabiliza a formação de copolímeros anfifílicos triblocos.

O objetivo final foi utilizar este novo material para o preparo de nanopartículas poliméricas a partir do método de difusão do solvente. Tais partículas são utilizadas para microencapsulamento de fármacos.

Os copolímeros foram sintetizados e caracterizados por ensaio de solubilidade, espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN), calorimetria diferencial exploratória (DSC), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), cromatografia de permeação em gel (GPC), análise por difração de Raios-X (WAXS), microscopia ótica de luz polarizada (MOLP) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A indicação de formação de copolímero anfifílico pode ser observada nos ensaios de solubilidade, pois o copolímero mostrou-se parcialmente solúvel em uma série de solventes em que o PHB original é insolúvel.

A modificação química pode ser observada com as técnicas de RMN e FTIR, cujos espectros apresentaram absorções referentes ao grupo carbonila da ligação éster. As técnicas de DSC, WAXS e MOLP mostraram uma ligeira redução na cristalinidade do material, além da temperatura de fusão reduzir-se de 171 °C para 154°C. Com o GPC observou-se uma redução da massa molar, o que facilita a formação das nanopartículas poliméricas. As nanopartículas apresentaram tamanhos com diâmetros ao redor de 250nm, quando observadas por MEV.

ABSTRACT

Aimed at the growing interest in research on new materials using biodegradable polymers, the present work was aimed at the synthesis of new copolymers through transesterification reaction in the molten state of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB), a biodegradable polymer, poly (ethylene glycol) (PEG).

It is well known that a major problem in the use of PHB is its high crystallinity and thermal instability, as it has melting temperature between 170 and 180 ° C and shows thermal degradation at 190°C. The transesterification reaction is an alternative to the chemical modification of this polymer, which also enables the formation of amphiphilic triblock copolymers.

The mainly goal of this studies was to use this new material for the preparation of polymeric nanoparticles from the solvent diffusion method. Such particles are used for microencapsulation of drugs.

The copolymers were synthesized and characterized by solubility test, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Hydrogen (NMR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Infrared Spectroscopy with Fourier transform (FTIR), Gel permeation chromatography (GPC) analysis by X-ray diffraction (WAXS), polarized light optical microscopy (MOLP) and scanning electron microscopy (SEM).

The signs of the formation of amphiphilic copolymer can be observed in the trials of solubility, since the copolymer was found to be partially soluble in a variety of solvents in the original PHB is insoluble.

The chemical modification can be observed with the techniques of NMR and FTIR spectra which showed absorptions for the carbonyl group of the ester linkage. The techniques of DSC, WAXS and MOLP showed a decrease in crystallinity of the material in 15%, and reduce the melting temperature is 171 °C to 154 °C. With the GPC showed a reduction in molar mass, which facilitates the formation of polymeric nanoparticles. The nanoparticles showed sizes with diameters around 250nm observed by SEM.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- FÓRMULA QUÍMICA GERAL DOS PHAS.	3
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO PHB.	4
FIGURA 3 - MICROGRAFIA ÓPTICA E MODELO DE UM ESFERULITO [18].	10
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO NÚCLEO DE CRISTALIZAÇÃO CILÍNDRICO [98].	111
FIGURA 5- VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE DE FORMAÇÃO DE NÚCLEOS CRISTALINOS ESFÉRICOS COM RAIO “R” A DIFERENTES TEMPERATURAS [98].	13
FIGURA 6- INTERAÇÃO DE HIDROGÊNIO ENTRE BLENDAS DE PHB/PVPH [28].	17
FIGURA 7 - ESTRUTURA QUÍMICA DO PEG.	25
FIGURA 8 - REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENTRE PHB E MPEG [57].	26
FIGURA 9 - SÍNTESE DO COPOLÍMERO GRAFTIZADO DE PHB/PEG UTILIZANDO RADIAÇÃO UV [59].	27
FIGURA 10 - SÍNTESE DO PRECURSOR DE PHB-DIOL E DO COPOLÍMERO TRIBLOCO PEG-PHB-PEG [60].	27
FIGURA 11 - SISTEMAS NANOESTRUTURADOS, MICELARES E VESICULARES: A) CONJUGADOS FÁRMACO- POLÍMERO; B) CONJUGADOS PROTEÍNA-POLÍMERO; C) DENDRÍMEROS; D) MICELAS; E) LIPOSSOMAS [66].	33
FIGURA 12 - ILUSTRAÇÃO DA FORMAÇÃO DA CORONA E NÚCLEO NA AUTOASSOCIAÇÃO DOS COPOLÍMEROS TRIBLOCOS.	33
FIGURA 13 - ESTRATÉGIA DE ENCAPSULAÇÃO: LIBERAÇÃO DO FÁRMACO NA CÉLULA-ALVO.	35
FIGURA 14 - TÉCNICA DE “SPRAY DRY BASED” PARA PREPARO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS [87].	38
FIGURA 15 – GLOVEBOX ONDE FOI REALIZADA SÍNTESE.	38
FIGURA 16 - MECANISMO DE TRANSESTERIFICAÇÃO PROPOSTO E PRODUTOS	39
FIGURA 17 - ASPECTO DO COPOLÍMERO PURIFICADO (ESQUERDA) E NÃO PURIFICADO (DIREITA)	47
FIGURA 18 - ASPECTO DO COPOLÍMERO INSOLÚVEL (A), EMULSIFICADO (B) E SOLÚVEL (C)	47
FIGURA 19 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DO PHB (A), PEG (B) E COPOLÍMERO (C)	50
FIGURA 20 - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ¹ H DO PHB (A), PEG (B) E COPOLÍMERO TRIBLOCO (C) EM CDCl ₃	55
FIGURA 21 - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE ¹³ C DO PHB (A) E COPOLÍMERO TRIBLOCO (B) EM CDCl ₃	57
FIGURA 22 – DISTRIBUIÇÃO ESTATÍSTICA DE MASSA MOLAR EM UM POLÍMERO [94]	57
FIGURA 23– DISTRIBUIÇÃO DE MASSA MOLAR DO PHB.	58
FIGURA 24 – DISTRIBUIÇÃO DE MASSA MOLAR DO COPOLÍMERO.	58
FIGURA 25 – CURVA DE DSC DO POLI(ETILENO GLICOL) PEG 4000	59
FIGURA 26– CURVA DE DSC DO POLI(3-HIDRÓXIBUTIRATO) (PHB).	61
FIGURA 27– AMPLIAÇÃO DA CURVA DE DSC DO POLI(HIDRÓXIBUTIRATO) PHB.	62
FIGURA 28 – CURVA DE DSC DO COPOLÍMERO TRIBLOCO PHB-PEG-PHB	64
FIGURA 29 - DIFRATOGRAMAS DE RAIO-X DOS HOMOPOLÍMEROS E COPOLÍMERO	64

FIGURA 30 - MICROGRAFIAS DO PHB E DO COPOLÍMERO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DA CRISTALIZAÇÃO ISOTÉRMICA.	67
FIGURA 31 – MICROSCOPIAS DAS ESTRUTURAS MICELARES.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - NOMENCLATURA DOS PHAS.....	3
TABELA 2 - VALOR DO QUILO DOS POLÍMEROS DE DIFERENTES ORIGENS [10].	6
TABELA 3 - PARÂMETROS DA CÉLULA UNITÁRIA DE PHB E ENERGIA DE EMPACOTAMENTO [17].	9
TABELA 4 - RESULTADOS DE BLENDS DE PHB/PEG [40].	20
TABELA 5 - PROPRIEDADES DO COPOLÍMERO P(3HB-co-3HV). [G].....	22
TABELA 6 - INFLUÊNCIA DA PORCENTAGEM DE GRAFTIZAÇÃO DE AM EM PHB NA TEMPERATURA DE CRISTALIZAÇÃO [51].	23
TABELA 7 - POLIDISPERSÃO DOS COPOLÍMEROS TRIBLOCOS SINTETIZADOS A PARTIR DO PHB-DIOL.	28
TABELA 8 - REAGENTES UTILIZADOS E FORNECEDORES.	36
TABELA 9 - GRAU DE PUREZA DOS SOLVENTES UTILIZADOS.....	36
TABELA 10 - PARÂMETROS DE SOLUBILIDADE (Δ) DE DIVERSOS SOLVENTES.	46
TABELA 11 - COMPORTAMENTO DOS POLÍMEROS FRENTE À SOLUBILIDADE.	47
TABELA 12 - POSIÇÃO DE BANDAS CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS FUNCIONAIS NA TÉCNICA IR [89].	48
TABELA 13 - MASSAS MOLARES DOS POLÍMEROS DETERMINADAS POR GPC.....	58
TABELA 14 - COMPOSIÇÃO PERCENTUAL, ENTALPIA DE FUSÃO E CRISTALINIDADE DO PHB E COPOLÍMERO TRIBLOCO.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{13}C -NMR	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
^1H -NMR	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
3HB	3hidroxibutirato
CHCl_3	Clorofórmio
DCE	Dicloroetano
DRX	Análise por Difração de Raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EtOH	Etanol
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HV	Hidroxivalerato
IPOH	Isopropanol
MA	Anidrido Maléico
MEK	Metil-etilcetona
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
M_n	Massa molar numérica média
MOLP	Microscopia Ótica de Luz Polarizada
M_w	Microscopia Ótica de Luz Polarizada
NMP	N-metil-2-pirrolidona
P(HB-co-HV)	(hidroxibutirato)-co-(hidroxivalerato)
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PEG	Poli(óxido de etileno) ou Poli(etileno glicol)
PHAs	Polihidróxialcanoatos
PHB	Poli(3-hidroxibutirato)
PHV	Poli(3-hidroxivalerato)
PHVB	Poli(hidroxibutirato-co-valerato)
PLA	Poli (ácido láctico)
PMMA	Poli(metacrilato de metila)

PVAc	Poli(acetato de vinila)
PVPh	Poli(estireno-co-vinil fenol)
T_g	Temperatura de transição vítrea
THF	Tetrahidrofurano
T_m	Temperatura de fusão cristalina

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	3
1.1 Objetivos.....	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1 Propriedades do Poli(3-hidroxibutirato)	8
2.2 Modificações do Poli(3-hidroxibutirato).....	14
2.2.1 Blendas de hidroxibutirato.....	15
2.2.2 Copolímeros de hidroxibutirato.....	21
2.3 Polímeros na área farmacêutica	29
2.3.1 Nanopartículas poliméricas	30
2.3.2 Microencapsulamento	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Reagentes e solventes	36
3.2 Equipamentos	37
3.3 Métodos	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
4.1 Síntese do copolímero.....	44
4.2 Ensaio de Solubilidade.....	46
4.3 Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) ..	47
4.4 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H.....	51
4.5 Composição do copolímero determinada por Ressonância Magnética Nuclear ¹ H.....	53
4.6 Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C.....	54
4.7 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	56
4.8 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	58
4.9 Análise por Difração de Raio X (DRX)	63
5 Caracterização das micelas 67	
5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	67
6 CONCLUSÕES.....	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1.INTRODUÇÃO

Os polímeros sintéticos apresentaram-se como uma inovação tecnológica e foram denominados popularmente como plásticos. Devido às propriedades como leveza, resistência química e mecânica e custo relativamente baixo, o uso de plásticos se expandiu em múltiplas aplicações como, por exemplo, em embalagens, tubos de encanamento, próteses, utensílios domésticos, pneus, peças automotivas, tintas entre outros.

Os polihidróxialcanoatos (PHAs) são poliésteres alifáticos também conhecidos como biopolímeros ou bioplásticos e são biodegradáveis. Os PHAs mais conhecidos são poli(3-hidroxibutirato) (PHB), poli(3-hidroxivalerato) (PHV) e poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHVB) .

Tais polímeros podem apresentar características de material duro e quebradiço, bem como amorfo e/ou elastomérico, dependendo do grupo substituinte R presente na unidade repetitiva (Figura 1, Tabela 1).

Figura 1- Fórmula química geral dos PHAs.

Tabela 1- Nomenclatura dos PHAs.

<i>POLÍMERO</i>	
n=1 ; R= hidrogênio	Poli(3-hidroxipropionato)
R = metil	Poli(3-hidroxibutirato)
R = etil	Poli(3-hidroxivalerato)
R = propil	Poli(3-hidroxihexanoato)
R = pentil	Poli(3-hidroxi octanoato)
R = nonil	Poli(3-hidroxidodecanoato)
n=2 ; R= hidrogênio	Poli(4-hidroxibutirato)
n=3 ; R= hidrogênio	Poli(5-hidroxibutirato)

Uma ampla variedade de microorganismos é capaz de produzir os poliésteres naturais com o objetivo de garantir uma reserva intracelular de energia e de carbono. Este acúmulo ocorre no citoplasma da célula bacteriana na forma de grânulos de 0,2 a 0,5 µm de diâmetro rodeados por uma membrana. Este processo é semelhante ao glicogênio sintetizado e estocado pelos mamíferos [1]. Em condições apropriadas, os grânulos intracelulares podem ser separados e removidos após lise celular, gerando assim uma resina com propriedades semelhantes às dos plásticos de origem petroquímica, com a vantagem de poder ser biodegradada no ambiente por microrganismos em curto espaço de tempo após o descarte.

O interesse em polímeros biodegradáveis tem crescido muito nos últimos anos em nível mundial. Apesar disso, o alto custo de produção dos biodegradáveis em comparação aos plásticos convencionais ainda tem se constituído num problema para ser resolvido [2].

O PHB pode ser encontrado em bactérias do solo, de algas e de esgotos microbiologicamente tratados. Entre as espécies de bactérias, pode-se citar *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus megaterium*, *Ralstonia eutropha* e *Pseudomonas oleovorans*. Sua produção em grande escala acontece por um processo de fermentação bacteriana, sendo ainda um processo relativamente caro [3].

Sudesh et al do Instituto Pasteur (1925) [5] foi o primeiro a descrever o isolamento de um poliéster alifático – poli(3-hidroxibutirato) (PHB) (Figura 2), do citoplasma de bactérias *Alcaligenes eutrophus*.

Figura 2 - Estrutura química do PHB.

A produção industrial do PHB ocorre da seguinte maneira: bactérias são estocadas em bioreatores juntamente com uma fonte de carbono (na forma de carboidratos, ácidos graxos, óleos vegetais e alcanos [4]), nitrogênio e fósforo. A porcentagem de material acumulado é de 1 a 30% em massa, em relação a massa seca, podendo chegar até a 90% dependendo do aumento da proporção de carbono e ainda da redução de nitrogênio, magnésio, sulfato e oxigênio. Sendo assim, o microorganismo produz o polímero em situações onde há limitação de nutrientes que

não o carbono . Para que ocorra a síntese do biopolímero é importante ressaltar que os carboidratos são provenientes de fontes renováveis de carbono como por exemplo, açúcar da cana [4], de beterraba e óleos vegetais[5].

O PHB é um termoplástico dotado de algumas boas propriedades, o que o torna um excelente candidato nas aplicações de uso comum.

Em 1982 a Imperial Chemical Industries (ICI) desenvolveu um processo para produção de PHB e passou a comercializá-lo com o nome de Biopol [3]. No Brasil, os estudos sobre o PHB tiveram início no final da década de 80. Foi em 1994, que um grupo de pesquisadores do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT/SP), em parceria com a Copersucar (Cooperativa de Produtores de cana, álcool e açúcar do estado de São Paulo) e o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo desenvolveu o PHB de origem totalmente nacional [6]. Para a produção em larga escala, foi necessário desenvolver o processo de “pelletização” [4]. Atualmente, a PHB Industrial S.A. produz o PHB, com o nome comercial Biocycle, a partir da sacarose proveniente da cana de açúcar [7].

No segundo semestre de 2009, a empresa americana Metabolix, Inc. iniciou a operação de uma de suas unidades visando uma produção inicial de 50000 t/ano de PHAs, com o nome comercial de Mirel [8].

Como muito desses polímeros biodegradáveis são também biocompatíveis, estes estudos incluem aplicações médicas, farmacológicas e cirúrgicas, como os sistemas de liberação de drogas no corpo humano, suturas, implantes ósseos, e todo tipo de aplicação na qual é interessante a reabsorção do material [9].

O PHB não é o único plástico biodegradável disponível no mercado, mas no quesito biodegradabilidade/sustentabilidade sua qualidade é inquestionável.

Enquanto embalagens de PHB variam de seis a doze meses para se decompor, os polímeros derivados do petróleo como, por exemplo, o polipropileno, necessita de aproximadamente 200 anos para se decompor. Outra vantagem do PHB é o preço do produto comparado aos outros polímeros provenientes de outras fontes que não seja a cana-de-açúcar (Tabela 2) [10].

Tabela 2 - Valor do quilo dos polímeros de diferentes origens [10].

<i>Origem do polímero</i>	<i>valor (US\$) */ quilo</i>
cana-de-açúcar	US\$ 5
beterraba ou milho	US\$ 14
fontes não renováveis	US\$ 8

* em média

O que justifica tal disparidade de preço é a auto-suficiência das instalações das fábricas. A cana-de-açúcar fornece a matéria-prima, o açúcar e um álcool especial, chamado superior, usado na etapa final da fabricação. O bagaço de cana é usado para gerar energia elétrica e vapor necessários ao processo industrial. Sendo assim, o processo não necessita de energia externa, o que definitivamente possibilita a produção a custos mais baixos.

Apesar da vantagem ambiental, o PHB apresenta uma estreita janela de processabilidade, sendo considerado um material rígido com alta cristalinidade (entre 55-80%) e possui alto custo em relação aos polímeros convencionais.

O PHB possui características que melhoradas podem torná-lo um polímero com ampla aplicação tecnológica. Entre as características que dificultam sua maior utilização estão: sua fragilidade nas aplicações em embalagens e filmes (quebradiço e duro), o aumento de cristalinidade quando estocado à temperatura ambiente e sua baixa estabilidade térmica, o que dificulta seu processamento. Ensaio utilizando a técnica de difração de raios X demonstram que o PHB está organizado em uma célula ortorrômbica [6]. Apresenta densidade média de $1,26 \text{ g/cm}^3$, temperatura de transição vítrea (T_g) em 5°C e temperatura de fusão cristalina (T_m) em 170°C , propriedades similares as do polipropileno [2]. O PHB possui também boas propriedades de barreira, sendo comparado ao poli(tereftalato de etileno) (PET) e ao poli(cloreto de vinila) (PVC) [7]

1.1 **Objetivos**

Nessa pesquisa, a modificação do PHB com poli(etileno glicol) PEG tem como objetivo tornar o material altamente cristalino em um material mais hidrofílico e mais flexível pela inibição de seu processo de cristalização pela incorporação de segmento polimérico flexível e solúvel em água. Em condições de altas temperaturas, a cisão das ligações éster do PHB favorecem a transesterificação em presença de composto hidroxilado.

Com este novo copolímero tribloco poli(3-hidroxibutirato)-*bloco*-poli(óxido de etileno) formado, podemos formar sistemas poliméricos micelares que são dispersões coloidais formadas a partir de macromoléculas compostas por blocos com afinidades opostas em relação a um solvente (geralmente água) – macromoléculas anfifílicas. Em determinada concentração, formam-se agregados, conhecidos como micelas, compostas por dezenas de macromoléculas, podendo exibir formas variadas (esferas, bastão, tubos, lamelas, etc). Dentre as grandes vantagens da incorporação de drogas por micelas poliméricas, sem dúvida, a mais importante é o acréscimo no tempo de permanência no sistema sanguíneo [8].

Resumidamente, o enfoque principal deste trabalho é:

- sintetizar o copolímero anfifílico poli(3-hidroxibutirato)-*bloco*-poli(óxido de etileno) por reação de transesterificação;
- caracterizar o novo material sintetizado;
- preparar agregados micelares, produto especial de pesquisas de copolímeros anfifílicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os polihidroxicanoatos (PHAs), em especial o poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e seus copolímeros são extremamente atrativos na preparação de sistemas biomédicos devido às propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e termoprocessabilidade [11,12]. No entanto, a elevada cristalinidade e a instabilidade térmica do PHB restringem as aplicações biomédicas e também interferem nas propriedades mecânicas deste polímero.

Esta revisão bibliográfica abordará as técnicas utilizadas para modificação do PHB, tornando-o um polímero de maior aplicabilidade. Entre estas técnicas podemos citar: a biosíntese de copoliésteres contendo unidades de outros hidroxicanoatos além do 3-hidroxibutirato (3HB), a formação de blendas e a copolimerização. Também será revisada a técnica de microencapsulamento que é de fundamental importância para o preparo de nanopartículas portadores de drogas.

2.1 *Propriedades do Poli(3-hidroxibutirato)*

O poli(3-hidroxibutirato), PHB é um material termoplástico semicristalino que se torna viscoso e moldável acima de sua temperatura de fusão. Em condições de resfriamento, cristaliza rapidamente tornando-se material plástico com elevada cristalinidade 60 % a 80 % [13,14] e com propriedades que podem ser comparadas às do polipropileno.

O estado cristalino é conhecido por apresentar uma estrutura definida que difrata raios X e exibe uma transição de primeira ordem denominada fusão. Polímeros semicristalinos são aqueles que apresentam a característica de cristalização, devido ao fato de serem constituídos por longas cadeias que possuem segmentos uniformes com elevada simetria. Os polímeros nunca cristalizam completamente, sendo assim, não existe polímero 100 % cristalino. A formação de uma fase cristalina depende da regularidade da estrutura do polímero.

O PHB normalmente encontrado (biosintetizado) possui configuração R, com estrutura perfeitamente isotática, o que justifica a sua elevada cristalinidade. Pazur *et al* [15] pesquisaram as características do PHB sindiotático obtido a partir de uma

rota sintética partindo de monômeros de configurações R e S. O PHB sindiotático possui melhores características físicas se comparado ao PHB 100 % isotático, entre elas : menor cristalinidade, transparência, resistência mecânica além da melhora na processabilidade e degradação química.

As cadeias poliméricas são arranjadas de maneira organizada e repetitiva na estrutura cristalina, e a menor unidade que representa este arranjo espacial é denominada célula unitária.

A célula unitária do PHB é ortorrômbica e composta por 4 unidades de monômero. A conformação da cadeia é em hélice em L (giro para o lado esquerdo) e cada volta completa é feita por duas unidades monoméricas [16].

Ao longo das décadas de 70 e 80 do século passado, os parâmetros da célula unitária e a energia de empacotamento do PHB foram elucidados (Tabela 3) [17].

Tabela 3 - Parâmetros da célula unitária de PHB e Energia de empacotamento [17].

Dimensão da célula (nm)			Energia de empacotamento (kcal / mol)		
a	b	c	van der Waals	Energia de potencial químico	Total
5,76	13,2	5,96	-28,7	-13,5	-42,2
5,76	13,2	5,96	-28,5	-14,7	-43,2
5,73	13,14	5,93	-29,1	-47,4	-76,5

Tais células unitárias são organizadas em lamelas com nanômetros de espessura. Estas lamelas formam fibrilas que reunidas irradiam em todas as direções de um ponto central originando assim esferulitos (Figura 3), que podem ter dimensões de micrômetros a centímetros.

As lamelas inicialmente são paralelas uma em relação às outras, mas com o crescimento divergem, torcem e ramificam, formando as estruturas esferulíticas simétricas. Assim, os esferulitos são considerados como agregados esféricos de milhares de monocristais lamelares, que se orientam na direção radial a partir de um núcleo, e são interligados por materiais amorfos.

Figura 3 - Micrografia óptica e modelo de um esferulito [18].

A formação de cristais e crescimento dos mesmos nos polímeros está relacionada com o processo de nucleação, no qual uma nova fase cristalina se inicia na fase fundida a partir de flutuações estatísticas, e na sequência ocorre o crescimento desta nova fase. A taxa com que ocorre a nucleação depende da temperatura, sendo muito baixa em temperaturas logo abaixo da fusão, e à medida que se resfria, atinge um valor máximo e decresce com a evolução do resfriamento.

Durante a solidificação de um polímero fundido, pode ocorrer o processo de nucleação, o qual é conhecido pelo rearranjo de cadeias. Neste caso as cadeias se organizam tangencialmente e as regiões solidificadas crescem em direção radiais formando estruturas organizadas denominadas esferulitos. a forma cruz de malta é observada no MOLP. Na medida em que os esferulitos aumentam de tamanho, suas fronteiras tornam-se poligonais.

Para dar início a nucleação, é necessário que o sistema esteja em equilíbrio termodinâmico. A equação 1 descreve as componentes que determinam a variação de energia livre para a nucleação [98] para um dado volume V do núcleo.

$$\Delta G = V \times \Delta G_u + \sum S_i \times \sigma_i \quad (1)$$

Onde:

ΔG = energia livre para a formação do núcleo

ΔG_u = energia livre associada à cristalização por unidade de volume

V = volume do núcleo

S_i = área da interface i do núcleo

σ_i = energia livre da interface i do núcleo

Considerando que em temperaturas abaixo da temperatura de fusão, o ΔG_u é negativo, sendo assim favorável à formação dos núcleos, é possível notar que o aumento na energia livre de formação do núcleo, ΔG , é uma função da contribuição positiva da energia interfacial livre, que se opõe à ΔG_u . Assim, a formação ou não de núcleos é o resultado de um balanço entre estas duas grandezas.

Considerando um núcleo lamelar cilíndrico, representado na Figura 4, com comprimento l , e área transversal ρ , a somatória da equação 3 deve ser desdobrada em dois termos: o termo referente ao plano lateral do núcleo com área com energia livre interfacial σ_u ; e o termo referente aos planos transversais com área $S_e=2\rho$ (referentes aos planos superior e inferior do cilindro) e respectiva energia livre interfacial σ_e .

Figura 4 - Representação esquemática do núcleo de cristalização cilíndrico [98].

A equação (1) se transforma na equação (2) :

$$\Delta G = l \rho \Delta G_u + 2 l \rho^{\frac{1}{2}} \pi^{\frac{1}{2}} \sigma_u + 2 \rho \sigma_e \quad (2)$$

As derivadas de ambas as equações em função das dimensões l e ρ igualadas a zero representam a barreira crítica de energia livre (ΔG^*) para que se forme o núcleo estável com tamanho crítico l^* e ρ^* . As equações 1, 2 e 3 representam essas igualdades. Assim, para que os núcleos lamelares comecem a etapa de crescimento, estes devem atingir um tamanho crítico, que é uma função da

energia livre interfacial lateral e transversal, e da energia livre associada à cristalização [98].

$$\Delta G^* = \frac{8 \pi \sigma_e \sigma_u^2}{(\Delta G_u)^2} \quad (3) \quad l^* = \frac{-4\sigma_e}{\Delta G_u} \quad (4) \quad \rho^* = \frac{4\pi(\sigma_u)^2}{\Delta G_u} \quad (5)$$

O rearranjo da equação 3 e substituindo ΔG_u por sua relação com entalpia e temperatura, chegamos na seguinte equação 6:

$$\Delta G^* = \frac{8\pi\sigma_u^2 \sigma_e \times (T_m^0)^2}{(\Delta H_u)^2 \times (\Delta T)^2} \quad (6)$$

Onde:

T_m^0 = temperatura de fusão de equilíbrio

ΔH_u = entalpia de formação do núcleo pelo volume

$\Delta T = T_m^0 - T_c$ (temperatura de fusão de equilíbrio – temperatura de cristalização)

A partir da equação 4 é possível fazer a relação entre a energia livre crítica de formação do núcleo e a temperatura, representada na Figura 5. À medida que a temperatura se eleva, se aproximando da temperatura de fusão, o valor da energia livre de formação dos núcleos aumenta, deslocando o tamanho crítico dos núcleos estáveis para valores maiores e dificultando a formação dos mesmos. Consequentemente podemos esperar que em temperaturas menores a densidade de formação de núcleos é maior, uma vez que esta condição é termodinamicamente mais favorecida, pois a probabilidade de se formar núcleos com tamanho acima do crítico aumenta.

Figura 5 - Variação de energia livre de formação de núcleos cristalinos esféricos com raio “ r ” a diferentes temperaturas [98].

A etapa de crescimento é também uma função da difusão das cadeias poliméricas em direção ao núcleo em crescimento, sendo assim governado pela viscosidade do polímero, determinada pela sua massa molar e pela temperatura de cristalização.

A massa molar influi de forma significativa na taxa de cristalização. Com o aumento da massa molar, a taxa de nucleação chega a um máximo, resultado da redução da energia livre para a transição de líquido para sólido, sofrendo, em seguida, uma redução devido ao aumento da viscosidade, que dificulta a difusão dos trechos de cadeia para a formação dos núcleos. Para baixas massas molares, a difusão das terminações de cadeias tolhe a formação de núcleos estáveis.

O PHB é opticamente ativo devido à presença do centro quiral na configuração D- ou R- do seu monômero. Sendo assim, filmes e soluções deste polímero induzem a rotação do plano de luz polarizada que o atravessa. A transparência de filmes é uma excelente característica para aplicações em embalagens. Tal fato justifica o interesse na obtenção de filmes amorfos de PHB. Choi *et al* [19] obtiveram filmes finos amorfos de PHB (espessura de dezenas de nanômetros), que se formaram devido às interações dos grupos polares do PHB com o substrato de vidro, que dificultam a capacidade de cristalização de segmentos de cadeia.

Além da elevada cristalinidade, o PHB apresenta instabilidade térmica. O ponto de fusão está entre 170 a 180 °C e sua degradação ocorre a aproximadamente 190 °C [17], sendo assim, sua janela de processamento é muito limitada, o que é uma grande desvantagem para seu uso.

Kunioka et al [20] fizeram estudos sobre degradação térmica do polímero PHB e de copolímeros de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato). Em ambos os casos, em temperaturas acima de faixa de fusão, ocorre a degradação térmica do PHB que apresenta rápida redução da massa molar. Em temperaturas próximas da temperatura de fusão (177 °C) ocorre o início da degradação térmica e com apenas 1 minuto na mesma isoterma, a degradação térmica do PHB já é significativa sendo ainda mais pronunciada em temperaturas maiores.

Esta redução da massa molar devido à degradação térmica prejudica as propriedades mecânicas do PHB. Segundo Hoffmann [21], a 180 °C a tensão de ruptura pode ser reduzida em até 30 % do seu valor original após apenas 10 minutos.

2.2 Modificações do Poli(3-hidroxibutirato)

Para tornar o poli(hidroxibutirato) um material polimérico competitivo, é fundamental otimizar seu processamento, para isso é necessário reduzir a sua temperatura de plastificação.

Para alcançar as propriedades adequadas ao uso do PHB, é necessário alterar as propriedades características deste polímero, tais como: elevada cristalinidade, instabilidade térmica e o caráter quebradiço. Para esta alteração podemos fazer a biosíntese de outros copoliésteres contendo hidroxibutirato, blendas poliméricas e copolímeros a partir do próprio PHB.

Com a modificação do meio que ocorre a biossíntese e da fonte de carbono é possível obter copolímeros com diferentes composições. Um meio contendo ácido pentanóico e butírico, ou ácido propiônico e glicose, na ausência de nitrogênio, é propício para a síntese de poli(hidroxibutirato) e do copolímero poli(hidroxibutirato)-co-(hidroxivalerato), P(HB-co-HV), com distribuição aleatória, podendo variar o teor de hidroxivalerato de 0 a 95%. Com esta alteração não ocorre modificação na cristalinidade do material comparado a do PHB puro. No entanto, ocorre um

aumento na tensão de ruptura além de uma menor temperatura de fusão, fato que melhora as condições de processabilidade, pois diminui a degradação térmica [22,23].

Também com a ausência de nitrogênio no meio de cultura e com a presença dos ácidos 4-hidroxibutírico e butírico, é possível sintetizar copolímeros com distribuição aleatória, P(3HB-co-4HB). Copolímero contendo 49 % em massa de unidades de 4HB apresentou cristalinidade de apenas 14 %, e temperatura de fusão (T_m) de 54 °C [24].

Taguchi *et al* [25] sintetizaram o copolímero de hidroxibutirato com hidroxialconoatos de tamanho médio de cadeia, modificando o caminho metabólico da bactéria *Pseudomonas*. Esse copolímero apresentou propriedades mecânicas semelhantes ao polietileno de baixa densidade.

Ashby *et al* [26] utilizaram PEG de massa molar igual a 200g/mol e adicionaram ao meio fermentativo a *Alcaligenes eutrophus* em diversos estágios do crescimento. O PHB foi sintetizado com distribuição de massa molar bimodal.

2.2.1 Blendas de hidroxibutirato

Um dos métodos utilizados para melhorar a processabilidade do PHB é o preparo de blendas poliméricas com outros polímeros miscíveis.

Quando misturamos dois polímeros miscíveis entre si, podemos formar um novo material com características intermediárias a de seus componentes, dependendo da quantidade relativa de cada polímero. As misturas poliméricas são classificadas conforme sua miscibilidade e compatibilidade.

Quando ocorre uma mistura física dos constituintes estruturalmente diferentes, denominamos esta mistura de blenda. Se em equilíbrio existir nas blendas uma única fase amorfa, formada por segmentos misturados dos dois polímeros, classifica-se a blenda de homogênea e miscível. Caso a parte amorfa da mistura se separe em duas fases distintas, formadas pelos polímeros separadamente, denominamos a blenda de heterogênea e imiscível. Há também uma situação intermediária onde classificamos a blenda de parcialmente miscível.

As interações químicas entre as moléculas determinam a miscibilidade da blenda. Os polímeros são considerados miscíveis se as interações entre os segmentos das macromoléculas são favorecidas e não ocorre a separação de fases.

O critério mais aceito para a avaliação da miscibilidade de uma blenda é a detecção de uma única transição vítrea situada entre as transições vítreas dos componentes constituintes da blenda polimérica. A temperatura em que ocorre a transição vítrea (T_g) é uma característica fundamental dos polímeros, pois representa um limite de temperatura abaixo do qual a energia térmica não é suficiente para superar as barreiras rotacionais em torno das ligações químicas, portanto, as mudanças conformacionais do polímero são inibidas. [27].

A produção de blends poliméricas é uma técnica muito atrativa do ponto de vista econômico, pois não é necessário investir no desenvolvimento de um novo polímero para obter as características do novo material polimérico que conseguimos atingir com esta mistura física.

As duas formas mais conhecidas para se obter blends poliméricas são:

- Técnica de evaporação de solvente. Os polímeros são dissolvidos em um solvente comum que posteriormente será evaporado;
- Uso de um misturador. Os componentes poliméricos são colocados em um misturador o qual opera a uma temperatura suficiente para que ocorra a fusão ou amolecimento dos polímeros sem que ocorra a degradação dos mesmos.

Polímeros imiscíveis são dificilmente processados, pois a falta de adesão entre os polímeros torna a mistura muito quebradiça. Para melhorar esta adesão recomenda-se a adição de compatibilizantes a esta mistura.

Os compatibilizantes podem ser copolímeros enxertados ou em blocos, estes ficam localizados na interface dos polímeros imiscíveis, agregando um ao outro e facilitando assim o processamento.

Para garantir a formação de blends poliméricas miscíveis, é necessário assegurar a existência de interações intermoleculares entre os componentes da blenda polimérica.

Shiao *et al* [28] estudaram o aumento da miscibilidade de blends de poli(hidroxibutirato) com copolímeros de poli(estireno-co-vinil fenol) (PVPh) devido às interações de hidrogênio. O poli(vinil fenol) possui uma característica interessante por formar blends miscíveis com polímeros que contém grupos aceptores de

próton, tais como, acrilato, éster, éter, piridina e grupos hidroxilas. Os autores concluíram que o PHB forma blendas miscíveis com o copolímero em composições de PVPh acima de 22% em mol. A Figura 6 mostra a interação de hidrogênio entre a carbonila do poli(hidroxibutirato) com a hidroxila do grupo fenol.

Figura 6 - Interação de hidrogênio entre blenda de PHB/PVPh [28].

Ao estudar blendas de PHB com borracha de poli(etileno-co-propileno) EPR funcionalizadas com anidrido maleico (EPR-g-MA), Martuscelli et al [29] avaliaram uma significativa melhora nas propriedades mecânicas da blenda, em relação ao PHB puro. Os autores apontam a reação entre o grupo anidrido com o grupo éster do PHB, formando assim um copolímero entre o PHB e EPR. Tal copolímero agiria como um compatibilizante entre as duas fases, melhorando assim a adesão entre eles.

Um outro copolímero, no caso um copoliéster sintetizado a partir de uma transesterificação entre poli(3-hidroxibutirato) e poli(ϵ -caprolactona) também foi utilizado como compatibilizante. Assim, Kim e Woo [30] estudaram o aumento da miscibilidade da blenda de poli(3-hidroxibutirato) com poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e concluíram que a temperatura de fusão da blenda diminui quando é utilizado o compatibilizante, e com o aumento da quantidade do mesmo, a cristalização do PHB diminuiu enquanto a do PCL aumentou.

Tanto o PHB quanto o PCL possuem o mesmo grupo funcional, caracterizado pela ligação éster, sendo assim, a compatibilização é induzida por reações de transesterificação. No entanto, devido ao fato do poli(3-hidroxibutirato) possuir extrema sensibilidade térmica e das reações de transesterificação necessitarem de altas temperaturas para ocorrer, esta rota de compatibilização é pouco utilizada.

A mesma blenda de poli(3-hidroxibutirato) com poli (ϵ -caprolactona) também foi preparadas em solução na presença de peróxidos. Os radicais formados pelos peróxidos possibilitaram o aumento da compatibilização, melhorando a dispersão entre os componentes. Verificou-se que o aumento na quantidade desta blenda melhorou a plasticidade do material [31].

O PHB forma blendas miscíveis com outros polímeros não biodegradáveis, tais como: poli(acetato de vinila), poliamida 6, além do poli(metacrilato de metila), que é incompatível com PHB a temperatura ambiente, mas miscível no estado fundido.

Quanto aos polímeros biodegradáveis, podemos citar blendas de PHB com poli(óxido de etileno) , poli (ácido láctico), ésteres de celulose e amido.

- **Blendas com polímeros não biodegradáveis**

Blendas de PHB e poli(acetato de vinila) (PVAc) apresentaram miscibilidade quando utilizada técnica de solvente comum, no caso clorofórmio , e também quando utilizada a mistura mecânica [32,33]. Os dados de cristalização indicam que blendas contendo quantidades de PVAc superior a 50 % não apresentam evidências de cristalização no resfriamento devido a presença de uma fase homogênea amorfa situada na região interlamelar dos cristais de PHB. Mesmo com a presença desta fase amorfa, o PVAc não influencia a estrutura cristalina do PHB, mas reduza taxa de crescimento dos esferulitos[32].

Chui *et al* [34] estudaram a morfologia de blendas de PHB/PVAc e também de blendas de poli(hidroxibutirato) copolimerizado com 10 % de hidroxivalerato, P(HB-co-10HV), com poli(acetato de vinila). Ambas as blendas foram preparadas com dimetilformamida como solvente. A partir do estado fundido, as amostras foram mantidas a 70 °C durante 4 dias para estimular a cristalização. Durante esta cristalização, em ambos os casos, o PVAc foi segregado pela fase cristalina, e alojou-se nos espaços interfibrilares dos esferulitos de PHB.

Siciliano *et al* [35] prepararam blendas de PHB com poli(metacrilato de metila) (PMMA), utilizando o clorofórmio como solvente. Para blendas contendo entre 30 a 90 % de PHB, ocorreu uma separação de fases na mistura a 185 °C. Para blendas contendo entre 10 a 20 % de PHB, a separação de fases ocorreu entre 155 a 170°C.

A partir desta evidência de separação de fases de blendas de PHB/PMMA, Cimmino *et al* [36] produziram blendas através de mistura mecânica no estado fundido, a 190 °C. Após um rápido resfriamento, a mistura apresentou-se totalmente amorfa, não apresentando assim nenhum comportamento de cristalização.

Rawajfeh *et al* [37] avaliaram a miscibilidade de blendas poliméricas de Poliamida-6 e poli(hidroxibutirato). A miscibilidade entre blendas poliméricas deve-se também às interações intermoleculares entre os dois tipos de cadeia polimérica, por exemplo: ligação de hidrogênio, ligações iônicas e interações dipolo-dipolo [38]. A análise do espectro no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) mostrou a diminuição da banda referente ao estiramento da ligação N-H da poliamida. Concluíram que houve a formação da ligação de hidrogênio entre o grupo amida e a carbonila do PHB, indicando assim a miscibilidade entre esses dois polímeros.

O estudo da cinética de cristalização de blendas miscíveis de poli(3-hidroxibutirato) com poli(óxido de etileno) de baixa massa molecular, mostrou que no resfriamento do fundido até a temperatura ambiente ocorre uma cristalização competitiva entre esses dois polímeros, e após cristalização e segregação, uma complexa morfologia de esferulitos é gerada [39].

- **Blendas com polímeros biodegradáveis**

Parra *et al* [40] fizeram estudo sobre a influência do poli(etileno glicol) (PEG) nas propriedades térmicas e mecânicas em blendas com PHB. O processo de mistura escolhido foi a solubilização em clorofórmio, solvente no qual ambos os polímeros são miscíveis. Mesmo que a temperatura de fusão cristalina (T_m) não tenha mudado significativamente, o aumento da proporção de PEG inserido na blenda reduziu a resistência à tração e aumentou o alongamento na ruptura (Tabela 4), provavelmente devido à redução das forças de ligações secundárias intermoleculares entre as cadeias de PHB.

Em ensaios de biodegradação, as blendas que contém maior quantidade de PEG apresentaram uma degradação enzimática maior, devido à natureza hidrofílica do PEG que aumenta ainda mais a biodegradação do PHB.

Tabela 4 - Resultados de blendas de PHB/PEG [40].

Blenda		T_m (°C)	Tensão de ruptura (MPa)	Alongamento à ruptura (%)
PHB/PEG	100/0	178,7	28	9
PHB/PEG	98/2	175,5	26	25
PHB/PEG	95/5	174,3	11	25
PHB/PEG	90/10	167,0	12	25
PHB/PEG	80/20	166,2	13	32
PHB/PEG	60/40	173,4	13	31

Além do poli(3-hidroxibutirato), outros polímeros de fontes renováveis ganham maior atenção em pesquisas científicas recentes. Entre esses polímeros estão o amido, derivados de celulose e poli(ácido láctico) (PLA) [41].

O PLA é polímero biodegradável originado de produtos agrícolas. Lactídeo é um dímero cíclico sintetizado a partir da despolimerização do ácido láctico, o qual pode ser obtido do milho e da cana de açúcar [42].

Ohkoshi *et al* [43] relataram sobre a miscibilidade e a cristalinidade de blendas de PLA com PHB atático de diferentes massas moleculares. Blendas de PLA com 50 % de PHB atático de baixa massa molecular ($M_w = 9400$), apresentaram uma única transição vítrea após a fusão a 200 °C. O valor reduziu de 59 para 10 °C com o aumento da porcentagem do PHB atático, comprovando assim, a miscibilidade do PLA com PHB atático de baixa massa molecular no estado fundido.

A cristalinidade do PLA também aumentou com o acréscimo de PHB atático. A espessura das lamelas dos cristais de PLA diminuiu com a presença do outro polímero, o que indica a incorporação na estrutura interlamelar do mesmo. Derivados de celulose também geraram interesse no preparo de blendas devido à compatibilidade com o poli(3-hidroxibutirato).

Zhang *et al* [44] investigaram a miscibilidade, cristalização e o comportamento no estado fundido de blendas de poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e etilcelulose (EC). A miscibilidade da blenda polimérica foi comprovada com o aparecimento de uma única T_g a 9 °C. A quantidade de etil celulose atrasou o crescimento dos esferulitos de PHB que começaram a surgir apenas a 80 °C, 30 °C a menos do que o usual.

Maekawa *et al* [45] obtiveram blendas miscíveis de PHB com propionato de celulose (CP). A miscibilidade também foi comprovada pelo aparecimento de uma única transição vítrea. O propionato de celulose diminuiu o crescimento dos

esferulitos de PHB, diminuindo assim a cristalinidade. Quanto às propriedades mecânicas, verificou-se que houve um aumento da ductibilidade da blenda de PHB com propionato de celulose quando comparada com a do poli(hidroxibutirato) puro.

Conforme estudos de El-Shafee *et al* [46], butirato de celulose também forma blendas miscíveis com poli(3-hidroxibutirato). A estreita janela de processamento do PHB é melhorada, pois sua elevada cristalinidade é reduzida com o acréscimo do butirato de celulose na blenda polimérica. Propriedades mecânicas do PHB como ductibilidade e resistência a tração são melhoradas, o alongamento a ruptura aumenta de 2,2% para 7,3%.

Estudos sobre blendas de PHB com o amido através de mistura mecânica mostraram imiscibilidade entre esses dois polímeros [47,48]. Godbole *et al* [47] avaliaram o comportamento mecânico de blendas de PHB com amido termoplástico e amido solúvel de batata, utilizando clorofórmio como solvente. Foram verificados maiores valores de resistência em blendas com 30 % (m/m) de amido termoplástico quando comparado com blendas de PHB com amido solúvel de batata.

2.2.2 Copolímeros de hidroxibutirato

A técnica de copolimerização é utilizada para modificar não somente as propriedades físicas, mas também químicas de um polímero para aplicações específicas.

Copolímero é um polímero que apresenta mais de um mero diferente na cadeia polimérica, são chamados de comonômeros cada um dos monômeros utilizados na copolimerização. Os copolímeros podem ser divididos em quatro tipos diferentes, em função do modo da distribuição dos diferentes meros dentro da cadeia polimérica. Os quatro tipos de copolímeros são:

- Aleatório ou estatístico: não há uma sequência definida de disposição dos diferentes meros.
- Alternado: os diferentes meros se dispõem de maneira alternada.
- Em bloco: há formação de sequências (blocos) de um dado mero se alternando com outras grandes sequências do outro mero.

- Graftizado ou enxertado: sobre a cadeia de um homopolímero, liga-se covalentemente à outra cadeia polimérica.

Foi na década de 1980 que a empresa americana ICI (International Chemical Industry) sintetizou os primeiros copoliésteres de HB com HV, poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), P(3HB-co-3HV), a fim de que propriedades como flexibilidade, temperatura de fusão e resistência ao impacto fossem modificadas para obter uma melhor aplicabilidade comercial [17]. A Tabela 5 mostra como a inserção de HV interfere nas temperaturas de fusão (T_m) e de transição vítrea (T_g) e também nas propriedades mecânicas do copoliéster.

Tabela 5 - Propriedades do copolímero P(3HB-co-3HV). [G]

P(3HB-co-3HV) mol% HV	T_m (°C)	T_g (°C)	Módulo Elasticidade (Gpa)	Tensão Ruptura (Mpa)
0	179	10	3,5	40
3	170	8	2,9	38
9	162	6	1,9	37
14	150	4	1,5	35
20	145	-1	1,2	32
25	137	-6	0,7	30

Nota-se que há uma redução da T_m e da T_g , conforme o percentual de HV inserido. Esta inserção interfere diretamente no percentual de fase cristalina, o PHB com cristalinidade elevada torna-se cada vez mais amorfo. Esta mudança provoca um decaimento muito mais elevado no módulo de elasticidade do que na tensão de ruptura.

A técnica de copolimerização tem sido investigada para se obter um polímero a base de HB mais maleável e menos quebradiço. Um dos copolímeros muito conhecido é o poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) P(HB-coHV) produzido a partir do substrato de ácido propiônico e glicose [49].

Liu *et al* [50] sintetizaram copolímeros multiblocos de [poli(3-hidroxibutirato)-co-(3-hidroxivalerato)], segmento rígido e hidrofóbico, com poli(etileno glicol), segmento flexível e hidrofílico, utilizando o 1,6-hexametileno diisocianato (HDI) como agente de acoplamento. Primeiramente o PHB de elevada massa molar foi convertido a uma baixa massa molecular após transesterificação com poli(etileno

glicol), utilizando o catalisador dilaureato de dibutil-estanho. A ligação uretana detectada por FTIR comprovou a formação do copolímero bloco de PHB/PEG. Uma redução de 12% na cristalinidade foi verificada neste novo material, comparada ao PHBV puro. Além deste fenômeno, o alongamento na ruptura com o valor inicial de 2,8% passou a ser 20,9% para fibras de PHBV contendo 30 % de poli(etileno glicol).

Copolímeros graftizados de PHB com anidrido maléico (MA) utilizando peróxido de benzoíla como iniciador foram sintetizados com o intuito de estudar o comportamento cristalino deste novo material [51].

A inserção de anidrido maléico (49) dificultou a cristalização do PHB, pois a graftização perturba a regularidade da estrutura cristalina deste polímero, dificultando assim a cristalização do PHB. Tal fato pode ser observado ao analisar a temperatura de cristalização a partir do estado fundido (T_c) diminuiu em aproximadamente 15 °C , o que mostra a Tabela 6 abaixo.

Tabela 6 - Influência da porcentagem de graftização de MA em PHB na Temperatura de cristalização [51].

	Graftização(%)	T_c (°C)
PHB	0	100,1
PHB- <i>g</i> -MA21	0,21	89,6
PHB- <i>g</i> -MA44	0,44	86,5
PHB- <i>g</i> -MA56	0,56	85,3
PHB- <i>g</i> -MA73	0,73	85,8
PHB- <i>g</i> -MA118	1,18	85,2

Este novo material graftizado gera cristais imperfeitos durante o processo de resfriamento e a quantidade destes cristais aumenta com a porcentagem de graftização. Outro fato interessante é que o grupo MA não foi introduzido na região cristalina do PHB, pois as difrações de Raios X mostram que não ocorreu mudança na célula unitária do PHB. No entanto, ao analisar os esferulitos cristalizados isotermicamente a 100 °C após a modificação com MA, conclui-se que os esferulitos apareciam de forma mais ordenada

Yuan *et al* [52] avaliou a melhora das propriedades de PHB com a copolimerização utilizando outros monômeros além do ácido láctico, também foi utilizado ϵ -caprolactona. Com a modificação da estrutura da cadeia polimérica, bem

como sua morfologia, a resistência mecânica foi alterada e também o custo final deste polímero.

Copolímeros de PHB com (ϵ -caprolactona) PCL foi amplamente estudado devido às propriedades do PCL. Por ser semicristalino e com estrutura similar ao polietileno, o PCL é mais flexível que o PHB, possui baixa T_g , de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e T_m de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Além disso, possui alta resistência a tração, boa estabilidade eletrolítica, boa solubilidade em diversos solventes além de ser biodegradável. A ligação éster do PCL é lábil e pode ser hidrolisada facilmente produzindo o ácido 6-hidroxihexanóico que é um produto metabólico não tóxico [53].

Copolímeros de poli(3-hidroxibutirato-co- ϵ -caprolactona) foram sintetizados a partir dos polímeros em solução na presença de ácido 4-toluenosulfônico [54]. Foram obtidos copolímeros randômicos e microblocos. Com o aumento da porcentagem de CL de 0 para 72 % molar, a T_g do copolímero reduziu de 2 para $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a temperatura de fusão do PHB mudou de $177\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $163\text{ }^{\circ}\text{C}$. O aumento da quantidade de hidroxibutirato, de 0 a 44 % mol, possibilitou a redução da T_m de 70 para $46\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Chen *et al* [55] sintetizaram copolímeros de poli(3-hidroxibutirato) e poli (ϵ -caprolactona) (PCL) através de transesterificação com o uso de octanoato de estanho como catalisador. Análises térmicas mostram a redução das temperaturas de transição vítrea, temperatura de fusão e cristalização. Após a transesterificação, a regularidade das cadeias de PHB foi alterada com os segmentos flexíveis de PCL. A temperatura de fusão do PHB reduziu de 173 para $165\text{ }^{\circ}\text{C}$, quando copolimerizado com 3,46% de PCL. Quanto à cristalização, verificou-se a formação de esferulitos com a estrutura mais ordenada e com maior espaçamento entre as lamelas.

O polietileno glicol PEG (Figura 7) também tem sido utilizado em reações de transesterificação com PHB.

Nas reações de transesterificação ocorre a troca direta de ésteres na porção interna das cadeias poliméricas. Os polímeros que inicialmente são imiscíveis como, por exemplo, poliésteres e poliamidas podem tornar-se miscíveis ou parcialmente miscíveis dependendo das condições utilizadas no processo.

Síntese de copolímeros de PHB com PEG têm despertado muito interesse em pesquisas científicas. O PHB, material altamente cristalino, torna-se um material mais hidrofílico e mais flexível pela inibição de seu processo de cristalização devido

à incorporação de segmento polimérico solúvel em água. A ligação entre o carbono e oxigênio presentes no polímero de PEG, justifica a flexibilidade deste material.

Figura 7 - Estrutura química do PEG.

O poli(etileno glicol) é um poliéter que além de hidrofílico é também biocompatível e largamente utilizado em pesquisas biomédicas [56].

Os copolímeros que apresentam esta característica de serem parte hidrofóbico e parte hidrofílico são classificados como materiais anfifílicos.

Ravenelle e Marchessault [57] estudaram a formação de polímeros de copolímeros dibloco anfifílicos utilizando PHB 100 % isotático com elevada cristalinidade e altamente hidrofóbico. Para esta síntese foi utilizada a transesterificação com polietileno monohidroxilado (mPEG) no estado fundido como mostrado na Figura 8. Na síntese do copoliéster PHB-mPEG, a hidroxila do PEG atua como nucleófilo e ataca a carbonila do PHB deficiente em elétrons.

Figura 8 - Reação de transesterificação entre PHB e mPEG [57].

A escolha deste método foi justificada pelo fato da transesterificação catalisada no estado fundido ser um processo químico que gera poucos resíduos, também conhecido como um processo “verde”. Com esta síntese é possível despolimerizar o PHB de elevada massa molar (neste caso $M_n = 300.000$ g/mol com polidispersão de 2,0), atuando como nucleófilo o grupo terminal hidroxila do polietileno glicol monohidroxilado.

Li *et al* [60] pesquisaram a formação de copolímeros anfifílicos triblocos de poli(óxido de etileno) – bloco- poli(3-hidroxibutirato)–*bloco*-poli(óxido de etileno) PEO-PHB-PEO.

Para este novo material, foi sugerido primeiramente converter o PHB de elevada massa molar em um PHB-diol

O PHB-diol trata-se do poli (3-hidroxibutirato) funcionalizado através da transesterificação com etilenoglicol, resultando em um oligômero com terminações em hidroxilas primárias e massa molar controlada, o que possibilita a construção de copolímeros e a obtenção de materiais com propriedades mais adequadas, ampliando assim as aplicações. Este novo PHB adicionado ao ácido monopropiônico de metóxi poli(óxido de etileno) (M-PEO-A) sintetizou o novo copolímero tribloco como mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Síntese do precursor de PHB-diol e do copolímero tribloco PEG-PHB-PEG [60].

Com esta rota, copolímeros triblocos com bloco de PHB inserido entre blocos de PEO foram sintetizados com uma estreita distribuição de massa molecular mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Polidispersão dos copolímeros triblocos sintetizados a partir do PHB-diol.

<i>Copolímeros *</i>	<i>M_n</i>	<i>M_w</i>	<i>M_w/M_n</i>
PEG-PHB-PEG (20-05-20)	4500	4730	1,05
PEG-PHB-PEG (20-39-20)	7290	8000	1,1
PEG-PHB-PEG (20-52-20)	8120	9260	1,14
PEG-PHB-PEG (50-08-50)	10390	112000	1,08
PEG-PHB-PEG (50-38-50)	12720	13770	1,08
PEG-PHB-PEG (50-55-50)	13390	16250	1,21

* números entre parênteses mostram peso molecular de cada bloco em centenas de g/mol.

Zhao *et al* [61,62] propuseram a síntese de copolímeros multiblocos de PHB-PEG a partir do PHB-diol e hexametileno diisocianato (HDI) como agente de acoplamento. Ao fazer análises sobre a cristalinidade deste novo material, verificou-se que a cristalinidade do PHB diminuiu à medida que aumentava os blocos de PEG no copolímero. No resfriamento, ambos os polímeros formam fase cristalina, mas quando o PHB está presente em mais de 60 %, apenas a fase de PHB cristaliza.

Naguib *et al* [63] sintetizaram copolímeros segmentados poli(éster-éter-uretana) baseados no poli(hidroxibutirato) (PHB-diol) e triblocos poli(ε-caprolactone)-*bloco*-poli(etileno glicol)-*bloco*-poly(ε-caprolactona), (PCL-PEG-PCL) utilizando 1,6-hexametileno diisocianato (HDI) como agente de acoplamento não tóxico. A temperatura de fusão deste novo material diminuiu para 141°C, aproximadamente 40 °C a menos que o PHB puro. Quanto às propriedades mecânicas, copolímeros com menores quantidades de PHB apresentaram maior alongamento na ruptura, 448 ± 15 % para amostras de copolímero contendo 30 % de PHB, e 280 ± 6 % para copolímeros contendo 70 % de PHB.

Chen *et al* [64] prepararam copolímeros triblocos de poli(3-hidroxibutirato)-*bloco*-poli(etilenoglicol)-*bloco*-poli(3-hidroxibutirato) (PHB-PEG-PHB) a partir de copolimerização com abertura de anel utilizando o monômero β-butirolactona e o PEG como macroiniciador. A miscibilidade entre os blocos de PEG e PHB foi comprovada pelo aparecimento de uma única transição vítrea. Análises de raios X mostraram que blocos de PHB do copolímero dificultam a cristalização dos blocos de PEG.

Com o mesmo processo de copolimerização, Liu *et al* [65] prepararam copolímeros triblocos de PHB-PEG-PHB com síntese controlada, variando a quantidade de PEG e de β -butirolactona. Os copolímeros apresentaram dois estágios de degradação. A temperatura de degradação do PHB passou de 210 °C para 300 °C, enquanto a temperatura de degradação do PEG passou de 350 °C para 450 °C.

2.3 Polímeros na área farmacêutica

Os polímeros representam uma classe de materiais mais versáteis disponíveis para aplicações em diversas áreas, inclusive a farmacêutica.

O Sistema de Liberação de Fármacos ou *Drug Delivery System* são definidos como um sistema de administração desenvolvido para prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, sustentar sua concentração plasmática e controlar a localização temporal e espacial das moléculas *in vivo*, por meio da aplicação de princípios biológicos e químicos. Desta forma, elimina-se as alterações nas concentrações e a disponibilidade biológica do fármaco é aumentada [66].

A biodegradabilidade e a bioadesão são propriedades que definem a escolha do polímero para o uso farmacêutico.

A biodegradabilidade dos polímeros é uma característica fundamental na modulação da liberação de fármacos, uma vez que o material introduzido no microorganismo deve desaparecer depois de cumprida sua função, sem que seja necessário intervir para sua retirada.

Há duas possibilidades para os produtos degradados, que podem ser excretados na urina ou metabolizados a dióxido de carbono e água, via ciclo de Krebs. [67,68].

Os ésteres, *orto*-ésteres, carbonatos, amidas e uretanas são os principais grupos funcionais suscetíveis à hidrólise. Podem sofrer biodegradação via hidrólise química ou enzimática.

Poliésteres alifáticos tais como: poli(ácido láctico) PLA, poli(ácido glicólico) PGA e poli(ϵ -caprolactona) (PCL), sofrem biodegradação em meio biológico.

Polímeros de origem natural, como os poli (hidroxialcanoatos) PHAs entre eles o poli(3-hidroxibutirato) PHB e copolímero de poli(3-hidroxibutirato-co-3-

hidroxivalerato) são passíveis de degradação in vivo por hidrólise ou ataque enzimático.

A bioadesão está relacionada com os seguintes eventos: adsorção, espalhamento do material bioadesivo sobre a mucosa e interpenetração entre cadeias do polímero e da mucosa [69,70]. O poli(etileno glicol) PEG, poli(vinil pirrolidona) PVP e poli(lisina) são exemplos de polímeros mucoadesivos.

As principais características que favorecem a bioadesividade são: 1. Elevada massa molar; 2. Capacidade de dispersão em água; 3. Presença de grande número de grupos carboxila e/ou hidroxila; 4. Habilidade de formar ligações de hidrogênio; 5. Flexibilidade da cadeia polimérica e 6. Presença de superfície negativamente carregada. Todas estas propriedades facilitam a interpenetração das cadeias poliméricas com o estabelecimento de interações físicas e mecânicas com a mucina, principal proteína do muco [71-72].

A presença de grande número de grupo carboxila promove um intumescimento e possibilita a formação de ligações de hidrogênio. Um pH que fornece baixa ionização do polímero é o ideal para formar ligações de hidrogênio. O ângulo de contato entre polímero/muco também é um importante parâmetro para a bioadesão [73].

2.3.1 Nanopartículas poliméricas

Aproximadamente 50% das moléculas farmacologicamente ativas descobertas possuem reduzida solubilidade e biodisponibilidade, sendo assim rejeitadas para o uso. Carregadores nanométricos ou micrométricos foram pesquisados para contornar este problema. Tais carregadores são capazes de liberarem o fármaco com alto grau de reprodutibilidade [74].

As nanopartículas poliméricas são sistemas aplicados na vetorização de vacinas tumorais, material para terapia gênica, administração de antibióticos via oral e anticancerígenos [75-77].

Os principais polímeros sintéticos empregados na preparação de nanopartículas são: poli(álcool vinílico) PVA, poli(acrilamida), poli(metacrilato de 2-hidroxietila) PHEMA e poli(etileno glicol) PEG. Entre os polímeros biodegradáveis podemos citar o PLA, PGA e PCL.

A Figura 11 representa os principais vetores nanoestruturados baseados em polímeros.

Figura 11 - Sistemas nanoestruturados, micelares e vesiculares: a) conjugados fármaco-polímero; b) conjugados proteína-polímero; c) dendrímeros; d) micelas; e) lipossomas [66].

Os conjugados fármaco-polímero e as micelas são os sistemas nanoestruturados mais estudados.

O primeiro sistema nanoestruturado apresentado, o fármaco-polímero (Figura 9a), é obtido pela polimerização direta entre o polímero e o fármaco, que é liberado após quebra hidrolítica ou enzimática do agregado. Ocorre a ligação covalente entre o ativo e a matriz polimérica, formando assim o conjugado [78].

As micelas são partículas coloidais de geometria esférica, formadas por compostos anfifílicos que se formam em solução, são conhecidas como *self-assemblies*. Possuem um núcleo hidrofóbico (*core*), e exterior hidrofílico.

2.3.2 Microencapsulamento

Um dos objetivos principais deste trabalho é o preparo de nanopartículas de copolímero tribloco de poli(hidroxibutirato)-*bloco*-poli(etileno glicol) para o uso como *Drug Delivery*. Nesta revisão bibliográfica a formação de micelas poliméricas, bem como as técnicas de microencapsulamento serão abordadas de forma mais cautelosa.

Atualmente, a técnica de microencapsulamento mostra-se bastante avançada, com aplicações no setor agropecuário, encapsulação de pesticidas (o que os torna menos tóxico durante o manuseio e aplicação); na prevenção da oxidação na área de alimentos e também na perda de aromas voláteis, o que permite a fortificação de alimentos com minerais de zinco, ferro e cálcio sem interferência em suas características organolépticas; no setor de tintas como a encapsulação de pigmentos; na área de diagnósticos por imagens como a encapsulação de contrastes; e na área farmacêutica como na liberação controlada de fármacos.

A técnica de microencapsulamento teve sua origem no modelo celular. A membrana celular externa atua como um microreservatório, envolve e protege o citoplasma e demais componentes celulares de agressividades do meio. Uma outra função para esta membrana celular externa é de fazer a seleção dos nutrientes para o interior das células, além de controlar a condução nervosa, fazer o transporte de energia entre outras funções de sobrevivência da célula. [79,80].

A auto-associação de estruturas primárias anfifílicas a partir de lipídeos é capaz de formar estruturas biológicas, como micelas, vesículas e bicamadas. Esta auto-associação (*Self-Assembly*) é a organização dos componentes do sistema sem qualquer intervenção humana, sendo um processo reversível e espontâneo [81].

As moléculas se autoassociam de forma espontânea devido à atração promovida por forças intermoleculares, a minimização da energia interfacial, as características anfifílicas da estrutura molecular e efeito hidrofóbico [81].

Moléculas anfifílicas como as micelas, vesículas e bicamadas se agregam em estruturas que resultam de fatores relacionados à geometria da molécula surfatante (balanço entre grupos hidrofílicos e lipofílicos), ao meio em que se encontram as moléculas, pH, temperatura, concentração da solução biológica e concentração de eletrólitos em solução. Todas estas variações podem levar a transformações interestruturais [81,83].

Copolímeros anfifílicos triblocos com bloco central hidrofílico e duplamente ligado a cadeias hidrocarbônicas, em meio aquoso biológico, se autoassociam em estruturas de bicamadas, formando uma corona e núcleo exibidos na Figura 12. A liberação do fármaco ocorre somente na célula-alvo como ilustrado na Figura 13.

Figura 12 - Ilustração da formação da corona e núcleo na autoassociação dos copolímeros triblocos.

Figura 13 - Estratégia de encapsulação: liberação do fármaco na célula-alvo.

A técnica mais aplicada de microencapsulamento nas indústrias farmacêuticas é a técnica de evaporação de solvente. As microesferas poliméricas com a droga encapsulada podem degradar e liberar o fármaco lentamente. A liberação controlada promove benefícios clínicos como: diminuir a frequência da dose, maior aceitação para pacientes e também droga mais direcionada às posições específicas que permite uma eficiência mais elevada. A hidrofiliicidade ou a

hidrofobicidade da droga determinam a escolha do método que causará uma eficiente encapsulagem da droga [84].

O método óleo-em-água (o/w, *oil-in-water*) é utilizado para drogas insolúveis ou pouco solúveis. As etapas deste método são: dissolver a droga hidrofóbica em solvente orgânico junto ao polímero; emulsificar esta fase orgânica, em uma fase aquosa; fazer extração do solvente orgânico e por ultimo, recuperar e fazer secagem das microesferas para eliminar solvente residual [85].

No caso de drogas hidrofílicas, o método o/w não é recomendado, pois este tipo de droga não se dissolve em solvente orgânico, além de ocorrer perdas durante a emulsão. Neste caso, utiliza-se o método da dupla emulsão (w/o/w): a solução aquosa da droga hidrofílica é emulsificada em uma fase orgânica, e em seguida dispersa em uma segunda solução aquosa (solução de um surfatante) que da forma a uma segunda emulsão (dupla emulsão, w/o/w).

A escolha de um solvente apropriado é fundamental para o sucesso da técnica de microencapsulamento. O solvente deve: dissolver o polímero escolhido, ser insolúvel na fase continua, ter baixo ponto de ebulição e volatilidade elevada e ter baixa toxicidade [84]. Um dos solventes mais utilizados é o diclorometano devido sua elevada volatilidade e alta insolubilidade em água.

Jing et al [86] sintetizaram nanopartículas a partir do copolímero de poli(hidroxibutirato) PHB e poli(etil etileno fosfato) PEEP utilizando polimerização por abertura de anel. O PEEP que é mais amorfo reduziu a cristalinidade do PHB, o que possibilitou a formação das nanopartículas.

As micelas foram preparadas pelo método de diálise e utilizaram dimetilformamida (DMF) como solvente durante 2 horas, após atingir a temperatura ambiente, o solvente foi removido por diálise por 24 horas. Obtiveram micelas esféricas com diâmetro entre 50 a 70 nm.

Drumond et al [9] prepararam nanopartículas de poli(L,L – lactídeo)-bloco-poli(etileno glicol)-bloco- poli(L,L – lactídeo). Para a síntese do copolímero foi utilizado o poli(etileno glicol) dihidroxilado e octanoato de estanho como iniciador. As nanopartículas foram preparadas a partir do método de difusão de solvente, neste caso o tetrahidrofurano (THF) que é miscível com a água. Os copolímeros anfifílicos se auto associaram na emulsão, e após a evaporação do solvente orgânico obtiveram partículas esféricas com o núcleo hidrofóbico de PLA e revestimento hidrofílico de PEG, com diâmetros entre 50 a 250 nm.

Takami et al [87] desenvolveram novo método de preparo de micropartículas de copolímeros de poli(etilenoglicol)-poli(lactídeo) com poli (lactideo-co-glicol) PGLA chamado “*spray dry based*”. A técnica se baseia em três passos: (1) preparar uma emulsão o/w com solvente orgânico, contendo o polímero hidrofóbico e copolímero anfifílico; (2) a emulsão o/w deve ser misturada em um nebulizador e (3) secar a emulsão com o auxílio de um aquecimento para a evaporação do solvente. A Figura 14 ilustra os 3 passos desta técnica.

Figura 14 - Técnica de “*spray dry based*” para preparo de micropartículas poliméricas [87].

Foram obtidas partículas com diâmetro aproximado de 2 μm com uma grande área superficial. Esta característica permite que estas micropartículas possam ser utilizadas como *drug delivery* para drogas de atuação pulmonar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e solventes

Os seguintes reagentes e solventes foram utilizados como recebidos, exceto quando indicada purificação adicional prévia:

Tabela 8 - Reagentes utilizados e fornecedores.

<i>Reagentes</i>	<i>Fornecedores</i>
PHB de alta massa molar (M_w 300.000 g/mol)	Biocycle
PEG (ATPEG 4000F USP) índice de hidroxila de 28 mg KOH/g de massa molar (M_w 4.000 g/mol)	Oxiteno

Tabela 9 - Grau de pureza dos solventes utilizados.

<i>Solventes</i>	<i>Fornecedores / Grau de Pureza</i>
Dicloroetano	Synth (99%)
Dimetilformamida	Synth (99%)
Etanol	Synth (95%)
Metil-etilcetona	Synth (98%)
N-metil-2-pirrolidona	Synth (98%)
Octanoato de Estanho	Aldrich (98%)
Tetrahidrofurano	Synth (99%)
Acetona	Casa Americana P.A
Clorofórmio	Casa Americana P.A
Isopropanol	Casa Americana P.A
Metanol	Casa Americana P.A

3.2 Equipamentos

Para a caracterização do copolímero foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Banho Ultrassom Unique Modelo USC-1800A. Laboratório de Engenharia de Macromoléculas.
- DSC Q10 TA Instruments. Central Analítica IQ USP.
- Cromatógrafo de Permeação em Gel BOM-002, INJ-002, CRL-004, PCM-002 e software Empower 2. Laboratório de Biotecnologia Industrial/CTPP IPT.
- Difratorômetro de raios X Panalytical, modelo X-Pert Pro com detector X'Celerator. Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT) Departamento de Engenharia de Minas e Petróleo.
- Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) Modelo IS10 (Thermo Corporation – Nicolet).
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Inova da Varian, com frequência de Ressonância de 300 MHz para ^1H -NMR e 75 MHz para ^{13}C .
- Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Philips Modelo XL-30.
- Microscópio Eletrônico FEI Modelo 600F. Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT) Departamento de Engenharia de Minas e Petróleo.
- Microscópio Óptico com luz polarizada Olympus – BX50. Acoplado a placa de aquecimento termostatizado Mettler Toledo.

3.3 Métodos

3.3.1 Síntese do copolímero anfifílico

O experimento foi conduzido em uma glovebox. Em um balão de vidro de 50 mL, com agitador magnético, foram colocados aproximadamente 20 g de PHB e 20 g de PEG e aquecido a 190 °C (banho de óleo). Durante um período de 15 minutos, a mistura foi homogeneizada, e todo o processo foi mantido em ambiente controlado com fluxo de nitrogênio, para garantir a retirada de toda a água residual do sistema. Em seguida, foram adicionados aproximadamente 2,9 g do catalisador octanoato de estanho e, após 15 min de reação, o balão foi retirado do aquecimento e resfriado até a temperatura ambiente. O método utilizado foi similar ao usado por Ravenelle et. al [57]. A Figura 15 mostra o sistema onde foi realizada a transesterificação.

Figura 15 - Glovebox onde foi realizada síntese.

A Figura 16 mostra o mecanismo de reação, bem como os produtos formados.

Figura 16 – Mecanismo de transesterificação proposto e produtos.

O produto foi resfriado a temperatura ambiente e solidificou-se como um sólido amarelado. Para purificar o copolímero tribloco poli(3-hidroxibutirato)-bloco-poli(óxido de etileno), foi aplicada um procedimento de purificação conforme o Esquema 1. O produto foi dissolvido em 190 mL de clorofórmio em banho de ultrassom a 45°C por 3 horas, e em seguida filtrado a vácuo. Adicionou-se 200 mL de isopropanol (IPOH) a solução com o intuito de dissolver PEG não reagido. O copolímero tribloco precipitado foi lavado com 100 mL de hexano para extrair o isopropanol, e em seguida, manteve-se o produto obtido a temperatura ambiente por dois dias para a evaporação do resíduo de solventes. O copolímero tribloco foi dissolvido em 100 mL de THF para eliminar PHB não reagido, insolúvel em THF. A solução em THF foi precipitada em hexano, o sólido com rendimento de 97% foi seco em estufa a vácuo até peso constante.

Esquema 1- Procedimento de purificação do copolímero.

3.3.2. Caracterização do copolímero

3.3.2.1 Análise de solubilidade

Foram realizados diversos testes de solubilidade do PHB e dos copolímeros sintetizados, em uma série de diferentes solventes a temperatura ambiente. Em cada tubo de ensaio foram colocados 1 a 3 mg de polímero com 0,5 a 1 mL de solvente, todos os tubos foram aquecidos a 50°C em banho ultrassom, onde permaneceram por 1 hora.

3.3.2.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As análises foram realizadas com o auxílio do aluno de doutorado Douglas Moraes no laboratório de Materiais Cerâmicos do departamento de Engenharia Metalúrgica e de Matérias da Escola Politécnica da USP. Foram preparados filmes finos de polímero sobre placas de NaCl para os ensaios.

3.3.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Utilizou-se para a análise o equipamento Inova da Varian, com frequência de Ressonância de 300 MHz para ^1H -NMR e 75 MHz para ^{13}C . Todas as amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado.

3.3.2.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Foram utilizadas três colunas Phenomenex Phenogel 5 μL Linear em série a 30 °C, fluxo a 1,0mL.min⁻¹ da fase móvel de clorofórmio grau HPLC, detector de índice de refração Waters 2414 a 40 °C e sensibilidade 16. Os padrões utilizados foram de poliestireno monodisperso com as seguintes massas molares: 2630; 6690; 39200; 184000; 475000; 860000; 1250000; 3530000 e 5480000 g.mol⁻¹. O volume de amostra injetado foi de 200 μL e 150 μL para o padrão com concentrações de g/mL e g/mL, respectivamente. O tratamento de dados foi realizado com a utilização do software Waters Empower 2.

3.3.2.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para a análise DSC foi utilizado o equipamento DSC modelo DSC Q10, TA Instruments. As análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio mantida com um fluxo de 10 ml/min, na faixa de temperatura de – 80 °C até 200 °C, a uma taxa de aquecimento de 20 °C/min. Amostras de aproximadamente 10 mg foram pesadas em cadinhos de alumínio e foram submetidas a dois ciclos consecutivos de aquecimento.

3.3.2.6 Análise por Difração de Raios-X (WAXS)

As amostras foram moídas em um cadinho e compactadas com uma prensa hidráulica por 10 segundos e corpos de prova em forma de pastilhas com as dimensões aproximadas de 12 mm de diâmetro por 8 mm de altura foram preparadas para os ensaios de difratometria de raios X.

O estudo foi efetuado mediante o emprego de difratômetro de raios X pertencente ao Departamento de Engenharia de Minas e Petróleo da Escola Politécnica, marca PANalytical, modelo X-Pert PRO com detector X'Celerator. As condições de análise foram: Fonte geradora de raios X de Cu, energia 45kV 40mA, intervalo angular 40° - 45°, passo 0,02° e tempo/passo de 20 segundos.

3.3.2.7 Microscopia Ótica de Luz Polarizada (MOLP)

As lâminas utilizadas na análise foram preparadas da seguinte maneira: o material foi fundido na lâmina a 195 °C, e permaneceu nessa temperatura por 2 min, em seguida as laminas contendo as amostras foram resfriadas imediatamente a temperatura de 50 °C e em seguida observadas.

Estas análises foram feitas com o auxílio do aluno de mestrado Rafael Kurusu, utilizando o Microscópio Óptico com luz polarizada (Olympus-BX50), com um estágio a quente (Mettler Toledo-FPHT) acoplado e as imagens foram capturadas com auxílio de uma câmera de vídeo (Hitacr-KP-M2J).

3.4 Preparação dos agregados micelares pelo método de difusão de solvente

Soluções micelares foram preparadas pelo método de difusão de solvente. Em um béquer de 50 mL, foram colocados 0,05 g do copolímero e 2,5 mL de tetrahidrofurano (THF). Em seguida, à solução formada (2 % m/v) foram adicionados 12,5 mL de água destilada. A mistura (copolímero, THF e água destilada) foi mantida sob agitação em ultrassom durante 5 horas, até completa evaporação do THF. Após este período, verificou-se a formação da solução micelar 0,5 % m/v.

3.5 Caracterização das micelas

Uma das mais importantes características dos copolímeros anfifílicos é a formação de soluções micelares, agregados de macromoléculas em água. Esta característica tornou possível inúmeras aplicações em diversas áreas tecnológicas (agrícola, cosméticos, farmacêutica e médica). As soluções micelares do copolímero foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a fim de podermos estimar os tamanhos dos agregados micelares.

3.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias foram obtidas a partir de micropartículas secas, obtidas de solução aquosa do copolímero. Para tal, a suspensão aquosa do copolímero foi colocada sobre o porta amostra, deixada em repouso por 15 min, em seguida, a amostra foi adsorvida com papel de filtro. Após a completa secagem, a amostra foi metalizada e analisada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esta seção está dividida em três partes, a primeira relaciona a síntese do copolímero, a segunda parte trata das caracterizações estruturais e a terceira a caracterizações das micelas.

4.1 *Síntese do copolímero*

Ao final do procedimento foram produzidos 41,56 g de copolímero tribloco. Após a reação de transesterificação foi obtido um sólido amarelado com rendimento de 97%, o que foi bastante satisfatório.

A transesterificação ocorre através do mecanismo de substituição nucleofílica, envolvendo a interação entre a carbonila do PHB e a hidroxila terminal do PEG que atua como nucleófilo.

Um nucleófilo é um reagente que procura um centro positivo. A palavra nucleófilo vem de núcleo, a parte positiva de um átomo, mais filo do grego *philos*, significando amar [1]. A hidroxila terminal do PEG procura o centro positivo, que neste caso é a carbonila do PHB. Este átomo de carbono contém uma carga parcial positiva porque os átomos de oxigênio vizinhos eletronegativos atraem os elétrons da ligação C-O na sua direção. A Figura 16 mostra o mecanismo de reação e os produtos formados.

Figura 16 – Mecanismo de transesterificação proposto e produtos.

Após a purificação o produto tornou-se um sólido branco. A Figura 17 mostra os produtos antes e depois da purificação.

Figura 17 - Aspecto do copolímero purificado (esquerda) e não purificado (direita).

4.2 Ensaio de Solubilidade

Através dos testes de solubilidade podemos confirmar a modificação do polímero biodegradável PHB, pois este se apresenta insolúvel em praticamente todos os solventes (exceto em CHCl_3 que se mostra eficaz em todos os polímeros), enquanto os copolímeros mostram-se solúveis ou emulsificados em solventes em que o PHB é insolúvel. O copolímero emulsificado apresentou uma pequena quantidade de resíduos, tal fato, provavelmente, se deve às condições em que os testes foram feitos. O solvente NMP não se mostrou eficaz na solubilização de todos os polímeros testados, enquanto o THF e o DCE se mostraram os melhores solventes, formando soluções homogêneas.

A Tabela 10 apresenta os parâmetros de solubilidade dos solventes utilizados e a Tabela 11 o comportamento dos polímeros frente aos solventes utilizados. A Figura 18 ilustra o copolímero tribloco quando insolúvel (a), emulsificado (b) e solúvel (c).

Os parâmetros de solubilidade dos solventes utilizados não explicam os resultados dos testes de solubilidade, uma vez que em solventes com valores de 19 a 20,1 $\text{MPa}^{1/2}$, os copolímeros apresentaram solubilização e emulsificação, assim como em solventes com valores de até 29,7 $\text{MPa}^{1/2}$ (metanol), enquanto que em N-metilpirrolidona (23,1 $\text{MPa}^{1/2}$) os copolímeros são insolúveis. Frente a estes resultados, conclui-se que o ideal seria testar um maior número de solventes, a fim de que se possa fazer um mapeamento das três componentes do parâmetro de solubilidade (parâmetros de dispersão (δ_d), dipolar (δ_p) e de ligação de hidrogênio (δ_h), e com isso prever o comportamento de solubilização dos copolímeros.

Tabela 10 - Parâmetros de solubilidade (δ) de diversos solventes.

Parâmetro de Solubilidade	Solventes									
	CHCl_3	DCE	NMP	THF	DMF	MeOH	EtOH	Álcool*	MEK	Acetona
δ ($\text{MPa}^{1/2}$)	19,0	20,1	23,1	19,4	24,9	29,7	26	23,5	19,0	20,3

Tabela 11 - Comportamento dos polímeros frente à solubilidade.

Parâmetro de Solubilidade	Solventes									
	CHCl ₃	DCE	NMP	THF	DMF	MeOH	EtOH	IPOH	MEK	Acetona
δ (MPa ^{1/2})	19,0	20,1	23,1	19,4	24,9	29,7	26	23,5	19,0	20,3

Polímero/ Solubilidade	Solventes									
	CHCl ₃	DCE	NMP	THF	DMF	MeOH	EtOH	IPOH	MEK	Acetona
PHB	S	I	I	I	I	I	I	I	I	I
COPOLÍMERO 1	S	S	I	E	E	E	E	I	E	E

Siglas : de solventes : DCE (dicloroetano); NMP (N-metil - 2- pirrolidona); THF (tetrahidrofurano);

MeOH (metanol); EtOH (etanol 95%) ; IPOH (isopropanol); MEK (metil-etilcetona).

Resultados: I (insolúvel); S (solúvel); E (emulsificado).

Figura 18 - Aspecto do copolímero insolúvel (a), emulsificado (b) e solúvel (c).

4.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia é o estudo das interações da radiação eletromagnética com a matéria. A radiação eletromagnética pode ser dividida em diferentes regiões que correspondem a diferentes técnicas espectroscópicas. A região entre 4000 e 400 cm⁻¹ corresponde à região considerada infravermelho próximo, onde as bandas

vibracionais absorvidas pelos compostos têm sido amplamente usadas em química orgânica e analítica por muitos anos para sua identificação e/ou caracterização [88].

A partir da detecção de feixes de ondas eletromagnéticas incidentes sobre a amostra, que absorve determinados comprimentos de onda, são gerados espectros de absorção ou de reflexão. Nas moléculas, os átomos ou grupos atômicos estão em contínuo movimento, uns em relação aos outros. “Quando elas são sujeitas a radiação com energia semelhante à correspondente, as moléculas podem alterar os seus estados de vibração, absorvendo a radiação correspondente à diferença de energia entre o estado inicial e o estado excitado detectado pelo espectrômetro. Assim, através de comparação dos valores de energia é possível identificar as moléculas ou tipos de moléculas presentes nas amostras” [88].

O método da transformada de Fourier é um tratamento matemático rápido e sensível e quando acoplado com acessórios como refletância total atenuada é possível estudar as camadas superficiais da amostra, permitindo uma análise não destrutiva da superfície, sendo possíveis análises de FTIR de pastas, géis, semi-sólidos, pós e filmes [90].

A Tabela 12 apresenta diversos grupos funcionais que podem ser observados em função da frequência, utilizando a técnica de espectroscopia no infravermelho.

Tabela 12 - Posição de bandas características dos grupos funcionais na técnica IR [89].

Absorção da Ligação	Frequência (cm ⁻¹)
Estiramento C-C	980,3
Estiramento C=O	1720
Estiramento CH ₃	2873, 2979*
Estiramento CH ₂	2853, 2926*
Estiramento C-O	1280, 1132
Angular CH ₃	1380, 1458
Angular CH ₂	1230, 1465
C-H Oriundo da degradação	1453,2

* Estiramento simétrico e assimétrico, respectivamente.

A Figura 19 mostra espectros FTIR do PHB, do PEG e do copolímero tribloco. No espectro FTIR do PHB bandas intensas referentes aos estiramentos C-C, C-O, C=O foram observadas, além de bandas fracas referentes às deformações angulares dos grupos metila e metileno.

Já no espectro referente ao PEG, uma banda intensa em 2900 cm^{-1} é observada, a qual é atribuída à vibração de estiramento do grupo CH_2 , além das bandas intensas referentes ao estiramento C-C, e C-O em 980 cm^{-1} e 1280 cm^{-1} respectivamente. Estes valores de bandas estão de acordo com outros estudos [11-13].

No espectro de FTIR do copolímero tribloco, as bandas do bloco PEG em 1280 cm^{-1} (C-O) e 947 cm^{-1} (C-C) diminuíram à medida que os blocos de PHB tornaram-se visíveis. Uma intensa banda em 1739 cm^{-1} referente ao estiramento da carbonila é observada, o que comprova a formação da ligação éster através da transesterificação.

Figura 19 - Espectros de Infravermelho do PHB (a), PEG (b) e Copolímero (c).

4.4 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H

A interação entre átomos e a radiação eletromagnética é caracterizada pela absorção e/ou emissão de fótons pelos átomos, de tal forma que os quanta dos fótons sejam iguais a diferença de energia dos níveis energéticos atômicos.

Sabendo-se que a energia de um fóton é proporcional a frequência, as diferentes formas de espectrometria são distinguidas com base nas frequências envolvidas. A espectroscopia de RMN usa radiofrequências que estão na faixa de 4 a 900 MHz. Em RMN a absorção e emissão da radiação eletromagnética podem ser observadas quando um núcleo é submetido a um intenso campo magnético uniforme. [88]

A base desta técnica foi proposta por W. Pauli em 1924, sugerindo que certos núcleos atômicos deveriam ter as propriedades de spin e momento magnético e que, conseqüentemente, a exposição a um campo magnético deveria levar a um deslocamento de seus níveis de energia. Foi em 1946 que Bloch e Purcell demonstraram que os núcleos absorvem radiação eletromagnética em um campo intenso, como consequência do desdobramento de níveis de energia induzido pelo campo magnético [91]

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H do PHB, do PEG e do copolímero são apresentados na Figura 18. Os prótons correspondentes aos diferentes grupos funcionais estão assinalados nos espectros. Os deslocamentos químicos em 1,26; 2,43 – 2,63; 5,23 ppm, do bloco do PHB, representam respectivamente os grupos metil, metileno e metino. O pico acentuado em 3,64 ppm indica os prótons metileno do bloco PEG. Estes valores estão de acordo com outros estudos [11-13]. O grupo hidroxila final do PEG, o qual normalmente aparece em 3,72 ppm foi consumido durante a reação, formando a nova ligação éster com o bloco de PHB. Este resultado indica a reação entre um bloco central de PEG e dois blocos laterais de PHB, com uma ligação éster entre estes.

As estruturas dos polímeros e do copolímero também estão representadas na Figura 20.

Figura 20 - Espectros de Ressonância Magnética de ^1H do PHB (a), PEG (b) e Copolímero tribloco (c) em CDCl_3 .

4.5 Composição do copolímero determinada por Ressonância Magnética Nuclear ^1H

Uma importante característica da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H é que as áreas dos picos são proporcionais ao número de prótons de cada espécie. Sendo assim, podemos quantificar as composições das substâncias. Após a passagem de uma série de pulsos curtos (radiofrequência) (com excitação dos núcleos seguida do retorno ao estado fundamental, através do processo de relaxação) é produzido um sinal de decaimento livre que, por Transformada de Fourier, é convertido no espectro convencional. Normalmente utiliza-se o intervalo de 1 segundo entre a aplicação dos pulsos.

A razão molar (PHB:PEG) no copolímero, foi determinada a partir do espectro RMN - ^1H , usando a equação 1[92]:

$$\frac{PHB}{PEG} = \frac{\frac{a}{4}}{\frac{b}{4}} = 1,333 \times \frac{a}{b} \quad (1)$$

Onde:

a = Integração da área correspondente ao grupo metila do PHB (1,2-1,4 δ)

b = Integração da área correspondente ao grupo metileno PEG (3,6-3,7 δ)

Para o copolímero obtivemos m = 140 e n = 91.

4.6 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

A espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C , diferente da espectroscopia no infravermelho, confirmam a formação do copolímero. Espectros comparativos entre o produto final da reação, o copolímero, e o homopolímero PHB são mostrados na Figura 21.

Pelo espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C , confirmamos novamente a formação do copolímero tribloco, pois houve o aparecimento do deslocamento químico na região de 70 ppm referente ao metileno do PEG unido (Figura 19), via ligação éster, ao bloco de PHB; este deslocamento químico não é observado no homopolímero PHB (poliéster).

Figura 21 - Espectros de Ressonância Magnética de ^{13}C do PHB (a) e Copolímero tribloco (b) em CDCl_3

4.7 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Durante a polimerização, o crescimento das cadeias poliméricas ocorrem estatisticamente. A distribuição dos comprimentos de cadeias variam desde oligômeros até cadeias muito longas com valores de número de meros variando em torno de um valor médio com uma dispersão em torno desta média. A polimerização conseqüentemente tem como resultado final uma massa molar (média) e uma polidispersão. Ocorre o crescimento independente das cadeias poliméricas, o que faz com que sejam produzidas cadeias poliméricas com comprimentos diferentes variando em torno de uma média. Este fenômeno gera a distribuição da massa molar do polímero.

A massa molar numérica média (M_n) é definida como sendo a massa molar de todas as cadeias, dividido pelo número total de cadeias. Esta massa molar leva em conta mais fortemente o número de cadeias. [93]

A massa molar ponderal média (M_w) é definida como sendo a massa molar das cadeias poliméricas presentes em cada fração. De outra forma, pode-se dizer que a massa molar de cada fração contribui de maneira ponderada para o cálculo da média total. Quando o interesse é de se considerar mais fortemente a massa molar de cada fração, utiliza-se a massa molar média Z (M_z).

As medidas de viscosidades de soluções poliméricas permitem o cálculo da massa molar média viscosimétrica (M_v), que depende do espaço ocupado pelas macromoléculas, causando oposição ao escoamento, e são fatores importantes, não apenas o número e o peso das moléculas, mas também a sua forma na solução [94].

Figura 22 - Distribuição estatística de massa molar em um polímero [94].

Os resultados apresentados nas Figuras 23 , 24 e Tabela 13 mostram que houve a formação de um copolímero, e este possui uma massa molar média ponderal muito inferior ao do polímero PHB (14.953 g/mol comparado a 266.665 g/mol) uma vez após a reação de transesterificação ocorre em condições extremas, formando o copolímero tribloco de PHB-PEG-PHB, uma cadeia polimérica muito menor comparado ao polímero original.

Figura 23 – Distribuição de massa molar do PHB.

Figura 24 – Distribuição de massa molar do Copolímero.

Tabela 13 - Massas Molares dos polímeros determinadas por GPC.

Amostra	Mn(g/mol)	Mw(g/mol)	Mw/Mn
PHB	75400	266700	3,53
Copolímero	10150	14950	1,47

4.8 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A análise térmica é definida como um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto esta substância é submetida a uma programação controlada de temperatura e sob uma atmosfera especificada. Na Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) a propriedade física em questão é o fluxo de calor em função do tempo e/ou temperatura.

Curvas DSC permitem verificar temperaturas de fusão cristalina. A fusão é uma transição de primeira ordem, característica dos polímeros semicristalinos. Esta

transição ocorre sempre em uma faixa de temperatura, devido à distribuição de tamanho dos domínios cristalinos presentes no material.

A Figura 25 representa a curva DSC do PEG 4000, que apresenta temperatura de fusão cristalina (T_m) de 64,81°C, correspondente ao máximo do pico de fusão na curva DSC. O calor de fusão pode ser determinado pela área contida sob o pico endotérmico, que dada em função da massa de amostra utilizada, fornece, neste caso, o calor de fusão de 191,4 J/g.

Figura 25 – Curva de DSC do poli(etileno glicol) PEG 4000.

A Figura 24 apresenta a curva DSC do poli(3-hidroxibutirato) utilizado na síntese, que possui temperatura de fusão de 170,53°C com calor de fusão de 90,35 J/g.

Neste polímero também foi verificado o fenômeno de cristalização, cuja temperatura de transição T_c aparece com o máximo em 60,76 °C. O processo de cristalização altera a morfologia do polímero, além disso, o entendimento deste processo é de grande importância em operações práticas na fabricação de plásticos, tais como extrusão e fiação de polímeros fundidos, pois afeta a densidade e a cristalinidade do polímero e, conseqüentemente, as suas propriedades mecânicas, térmicas e ópticas. A cristalização de um polímero é acompanhada da liberação de

calor latente, que gera um pico exotérmico bem definido na curva DSC. Na Figura 26, observamos um pico de cristalização a 60,76°C com calor latente de 32,33 J/g.

Figura 26 – Curva de DSC do poli(hidróxibutirato) (PHB).

A Temperatura de transição vítrea (T_g) é aquela em que se inicia o movimento de rotação de segmentos da cadeia polimérica. A passagem do estado vítreo (mais ordenado) para o estado mais flexível e menos ordenado é uma transição de segunda ordem, portanto um processo acompanhado de variação de capacidade calorífica da amostra, que se manifesta como variação da linha base da curva DSC.

As normas ASTM E 1356 e ASTM D 3418 descrevem o procedimento para a determinação da T_g por DSC. A Figura 27 representa uma ampliação da Figura 24 na faixa de -70 a 30°C, que tem como objetivo facilitar a visualização da determinação da T_g do PHB.

Para a determinação da T_g , primeiramente deve-se fazer duas linhas tangentes que marcam o início e fim do evento da variação de calor específico da amostra. A faixa de temperatura que caracteriza a transição vítrea está contida entre os pontos “onset” (início extrapolado 3,81°C) e “endset” (final extrapolado 5,14°C). A temperatura de transição vítrea é o ponto intermediário entre o “onset” e o “endset”, no caso do PHB, foi verificada uma T_g de 4,47°C.

Figura 27– Ampliação da curva de DSC do Poli(hidróxibutirato) PHB .

A Figura 28 mostra o comportamento térmico do copolímero tribloco através da curva DSC. A temperatura de fusão do PHB foi reduzida de 170,53°C para 154,45°C. Esta mudança é muito vantajosa para o uso do PHB, pois sabendo que sua temperatura de decomposição é de 190 °C, com a temperatura de fusão mais baixa, sua janela de processamento é aumentada em aproximadamente 82 %.

Não foi possível detectar a T_g deste novo material. No entanto, um interessante fato pode ser observado. Uma dupla fusão ocorre em temperaturas de 29,76 e 46,37°C o que demonstra que um copolímero em bloco foi de fato sintetizado, pois a dupla fusão é característica destes materiais em que temos dois diferentes polímeros, sendo que ocorre a fusão dos cristalitos do segmento que possui menor temperatura de fusão cristalina.

Figura 28 – Curva de DSC do Copolímero Tribloco PHB-PEG-PHB.

Com curvas DSC é possível calcular a cristalinidade com base nas variações de entalpia de fusão dos copolímeros, comparando-se com valores teóricos de polímeros 100 % cristalinos. Para o PHB 100 % cristalino, o ΔH_f° é 146 J.g^{-1} [95]. A Equação 2 [96] mostra a porcentagem de cristalinidade dos segmentos PHB, usando-se a entalpia de fusão para o PHB 100 % cristalino (ΔH_f°), a entalpia de fusão dos segmentos PHB obtido por DSC (ΔH_f), e a composição de PHB em porcentagem no sistema, W_{PHB} .

$$X = \frac{1}{\Delta H_f^\circ} \frac{\Delta H_f}{W_{\text{PHB}}} (100) \quad (2)$$

A Tabela 14 mostra a porcentagem de cristalinidade e a entalpia de fusão cristalina, tanto do PHB quanto do copolímero tribloco, além da composição do copolímero. A composição foi determinada a partir do espectro de Ressonância Magnética Nuclear, onde se observa uma razão molar entre os segmentos (PHB:PEG) de 140:91, que corresponde à composição percentual em massa de 60 % de segmentos PHB no copolímero tribloco.

Tabela 14 - Composição percentual, entalpia de fusão e cristalinidade do PHB e copolímero tribloco.

<i>Polímero</i>	<i>Composição percentual</i>	<i>Entalpia de fusão (J/g)</i>	<i>Cristalinidade (%)</i>
PHB	100	90,35	61,8
Copolímero	60 (%PHB)	51,51	47,0

Ao analisarmos a Tabela 4, foi verificada uma redução de aproximadamente 15% na cristalinidade dos segmentos de PHB no copolímero tribloco, comparado ao PHB puro, demonstrando que a presença de trechos de PEG, mais flexíveis, não alterou o processo de cristalização do PHB. Mas é difícil determinar a cristalinidade de cada um somente pela interpretação das curvas de DSC, porque trata-se de um sistema tribloco e a escassez de informações sobre estes sistemas poliméricos na literatura, dificultam ainda mais esta finalidade. Todavia, o uso de outros métodos de análise, como a microscopia ótica pode oferecer mais informações sobre a estrutura cristalina presente no copolímero.

4.9 Análise por Difração de Raios-X (Wide Angle X-Ray Scattering WAXS)

Raios X são radiações eletromagnéticas com energias na faixa de 100 eV – 100 keV. Para aplicações em difração, são usados os raios X de comprimento de ondas curto (*hard x-rays*) na faixa de poucos angstroms a 0,1 ângstrom (1 keV – 120 keV) que corresponde à ordem de grandeza dos átomos e moléculas. O motivo de se usar ondas eletromagnéticas na região dos raios X é devido ao espaçamento entre as camadas de átomos em um cristal possuírem a mesma ordem de grandeza do comprimento de onda desta radiação, onde o fenômeno de difração pode ser observado.

Para obter padrões de difração acentuados em cristais, as ondas espalhadas devem interagir entre si de forma construtiva. Este fenômeno é conhecido como interferência e ocorre quando as ondas espalhadas por planos sucessivos de

átomos em um cristal, estão em fase, ou seja, a diferença de caminho, entre os planos do cristal deve ser igual a um múltiplo inteiro do comprimento de onda. [97]

A Figura 29 representa os difratogramas de Raio-X obtidos do PHB, PEG 4000 e do copolímero sintetizado. Os picos em $2\theta = 19^\circ$, 22° são característicos do PEG. Os picos em $2\theta = 12^\circ$, 17° e 22° , são característicos da estrutura cristalina do PHB, cuja célula unitária é classificada como ortorrômbica. No difratograma do copolímero, os picos que representam tanto a estrutura cristalina referente ao PHB quanto aos picos que representam a estrutura cristalina do PEG 4000.

Com esta técnica, não foi possível fazer uma comparação entre os halos amorfos do copolímero, o que inviabiliza o cálculo da cristalinidade do material.

Figura 29 – Difratogramas de Raios-X dos homopolímeros e copolímero.

4.10 Microscopia Ótica de Luz Polarizada (MOLP)

Esta técnica de Microscopia Ótica foi utilizada para estudar a cristalinidade, sendo assim, uma técnica complementar junto às demais técnicas de análise.

As amostras dos copolímeros foram preparadas sobre lâminas de vidro recobertas por lamínulas de vidro. Estas lâminas ficaram por dois minutos a 195°C

e, em seguida, submetidos a um resfriamento lento até 50°C. As imagens da Figura foram obtidas com aumento de 50 vezes.

O PHB resfriado lentamente a partir do estado fundido apresenta inicialmente a formação de grandes esferulitos a temperaturas acima de 60°C, o que pode ser visualizado na Figura 30, o que indica um processo de cristalização no qual a densidade de nucleação é baixa, formando assim poucos núcleos. A densidade de nucleação do PHB varia fortemente com a temperatura, um aumento da mesma ocasiona pronunciada redução no número de esferulitos. Em temperaturas menores que 60°C, é possível observar uma maior quantidade de esferulitos, tal fato pode ser relacionado à redução da energia livre crítica ΔG^* e aumento da estabilidade dos núcleos com dimensões menores. Por outro lado, o aumento da temperatura ocasiona redução da nucleação e um aumento na difusão das cadeias, e, conseqüentemente, um aumento na taxa de crescimento dos cristais. [99,100] Entretanto, neste trabalho não foram feitas medidas cinéticas do processo de cristalização.

A massa molar tem grande influência na morfologia da fase cristalina, de tal modo que podemos observar o aparecimento tardio de esferulitos no copolímero tribloco. A ligação éter, juntamente a menor cristalinidade, baixa temperatura de fusão e reduzida massa molar permite que o material sintetizado forme esferulitos apenas em 50°C com uma morfologia bem diferenciada se compararmos com os esferulitos de PHB. É importante observar que o homopolímero PEG com massa molar superior a 4000 g.mol⁻¹, apresenta temperatura de fusão ao redor de 60 °C [101].

ISOTERMAS	PHB	COPOLÍMERO
110°C

<p>100°C</p>	<p>200 μm</p>
<p>90°C</p>
<p>80°C</p>
<p>70°C</p>

Figura 30 - Micrografias do PHB e do copolímero em função da temperatura da cristalização isotérmica.

5 Caracterização das micelas

5.1 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

O desenvolvimento da microscopia eletrônica teve como principal desafio conseguir ultrapassar a barreira de resolução pela luz visível. O primeiro protótipo de microscópio eletrônico foi construído em 1931. No final dos anos 80 o lançamento no mercado dos microscópios ambientais tornou a técnica versátil. As técnicas de microscopia eletrônica são hoje as principais ferramentas disponíveis para o estudo da estrutura fina e da morfologia de materiais.

Diferentemente da microscopia óptica, que usa luz para formação de imagem, o microscópio eletrônico utiliza elétrons. A principal vantagem de se utilizar um microscópio eletrônico em relação ao uso de um óptico é a resolução. Microscópios

ópticos garantem a visualização de detalhes em escala micrométrica, enquanto que os eletrônicos de varredura em escala nanométrica.

O microscópio eletrônico de varredura é, sem dúvida, o microscópio eletrônico mais versátil. É geralmente utilizado para o estudo de estruturas superficiais ou subsuperficiais de amostras com dimensões relativamente grandes. As imagens têm alta profundidade de foco. São imagens tridimensionais sendo mais fáceis de interpenetrar que as imagens de projeção de microscopia de transmissão. Esta técnica também produz imagens de alta resolução, garantindo alta ampliação de detalhes próximos sem perda de nitidez.

A Microscopia eletrônica de Varredura permite, através da interação elétrons-matéria, a obtenção de imagem tridimensional indireta da superfície com aumento da ordem de 10 a 150.000 vezes e a determinação da forma e o tamanho das partículas no estado sólido (seco), do copolímero.

A Figura 31 mostra as imagens em microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas formadas de PHB-PEG-PHB. As imagens mostram que os copolímeros adquiriram formato esférico irregular em meio aquoso. Estas partículas irregulares, analisadas por MEV apresentam diâmetros de em média 50-250 nm. Os agregados micelares dependem da concentração da fase orgânica em que foram dissolvidos além disso, a preparação da dispersão tem um efeito muito importante na preparação das micelas.

a)

b)

Figura 4– Microscopias das estruturas micelares

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como finalidade o estudo de um novo copolímero anfifílico tribloco de PHB-PEG-PHB com objetivo de melhorar as propriedades do PHB e conseqüentemente a aplicabilidade do produto.

Através de uma transesterificação no estado fundido com catalisador de estanho, foi possível sintetizar o copolímero, com rendimento total de 97% e com menores massas molares ($M_n = 75400$ g/mol para o PHB e 10150 g/mol para o copolímero), comprovada pelos resultados de GPC.

A análise de solubilidade do material permitiu o planejamento da rota de purificação do copolímero com sucesso, além de comprovar que o material tornou-se de fato anfifílico.

No espectro de FTIR do copolímero tribloco, as bandas do bloco PEG em 1280 cm^{-1} (C-O) e 947 cm^{-1} (C-C) diminuíram à medida que os blocos de PHB tornaram-se visíveis. Uma intensa banda em 1739 cm^{-1} referente ao estiramento da carbonila é observada, o que comprova a formação da ligação éster através da transesterificação.

Na Ressonância Magnética Nuclear, os deslocamentos químicos em 1,26; 2,43 – 2,63; 5,23 ppm, do bloco do PHB, representam respectivamente os grupos metil, metileno e metino. O pico acentuado em 3,64 ppm indica os prótons metileno do bloco PEG. O grupo hidroxila final do PEG, o qual normalmente aparece em 3,72 ppm foi consumido durante a reação, formando a nova ligação éster com o bloco de PHB. Este resultado indica a reação entre um bloco central de PEG e dois blocos laterais de PHB, com uma ligação éster entre estes.

Na Calorimetria Diferencial Exploratória, a temperatura de fusão do PHB foi reduzida de $170,53\text{ °C}$ para $154,45\text{ °C}$. A cristalinidade do copolímero reduziu em aproximadamente 15% comparada a cristalinidade do PHB puro.

Nas curvas de difração de raios-X do copolímero, os picos que representam tanto a estrutura cristalina referente ao PHB quanto aos picos que representam a estrutura cristalina do PEG 4000. Não foi possível fazer o cálculo de cristalinidade a partir desta técnica.

A massa molar tem grande influência na morfologia da fase cristalina, de tal modo que podemos observar o aparecimento tardio de esferulitos no copolímero tri

bloco com a técnica de Microscopia Ótica. A ligação éter, juntamente a menor cristalinidade, baixa temperatura de fusão e reduzida massa molar permite que o material sintetizado forme esferulitos apenas em 50°C com uma morfologia bem diferenciada se compararmos com os esferulitos de PHB.

O método de difusão de solvente foi satisfatório para preparo dos agregados micelares. Com a Microscopia Eletrônica de Varredura, foram observadas nanopartículas com tamanho de aproximadamente 250nm.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CHANDRA R. R. Biodegradable Polymers. *Prog Polymer Science*, 1998, v.23, p.1273.
- [2] KONING G. J; LEMSTRA P. J. **Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3- hydroxybutirate]: Embrittlement and rejuvenation**". *Polymer*, 1993, v.34, p. 4089-4095.
- [3] ROSSEL, E.; NONATO R. **Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol**. *Appl Microbiol Biotechnol* ,2001, v.57, p.1-12.
- [4] REDDY C. S. K.; GHAI R.; RASHIMI V.; KALIA V. C. **Polyhydroxyalkanoates: on Overview**. *Bioresource Technology*. 2003, v. 87, n. 2, 137-146.
- [5] SUDESH K.; ABE H.; DOI T. **Synthesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters**, *Progress in Polymer Science*, 2000, v.25, p. 1503-1555.
- [6] REDE DE TECNOLOGIA & INFORMAÇÃO RIO DE JANEIRO. Invenção com depósito de Patente junto ao INPI – PHB – Plástico biodegradável. Celso Lellis Bueno Netto (IPT/Copersugar) PI9806557, PI9302312, PI9103116.
- [7] BIOCYCLE – “PHB Industrial S.A”, São Paulo 2007. Disponível em: <http://www.biocycle.com.br/site.htm>
- [8] METABOLIX “Bioplastics: mirel structure and properties”. Cambridge 2009. Disponível em: <http://www.metabolix.com>
- [9] DRUMOND W. S; MOTHÉ C. G; WANG S. H. **Biodegradable nanosize Particles of Poly(L,L-lactide)-b-Poly(ethylene glycol)-b-Poly(L,L-lactide)**. *Polymer Engineering and Science* ,2008, v. 48 , p.1939- 1946.

[10] site: Inovação Unicamp. Disponível em:
<http://funcapciencia.funcap.ce.gov.br>

[11] SIMIONI,A.R.; VACCARI, C.; Re, M.I. ; TEDESCO, A. C. **PHBHV/PCL microspheres as biodegradable drug delivery systems (DDS) for photodynamic therapy (PDT).** *Journal of Matererials Science* 2008, v.43, p.580-584.

[12] DENG, X.M; HAO, J.Y. *European Polymer Journal*, 2001,v.37, p.211.

[13] MITOMO,H.; BARHAM,P.J.; KELLER,A. **Polymer Journal. Crystallization and Morphology of Poly(β -hydroxybutyrate) and Its Copolymer**, *Polymer*, 1987, v.19, p.1241-1253.

[14] ORTS, W.J.; VANDERHART, D.L.; BLUHM, T.L.; MARCHESSAULT, R.H. *J. Chem* 1995, v.73, p.2094.

[15] PAZUR, R.J.; HOCKING, P.J.; RAYMOND, S.; MARCHESSAULT,R.H. **Crystal Structure of Syndiotactic Poly(3-hydroxybutyrate) from X-ray Fiber and Power Diffraction Analyses and Molecular Modeling.** *Macromolecules*, v.31, p. 6585-6592, 1998.

[16] YOKOUCHI, M.; CHATANI,Y.; TADOKORO,H.; TERANISHI,K. **Structural studies of polyesters. Molecular and Crystal structures of optically active and racemic poly(3-hibroxibutirate).** *Polymer*, v.14, p.267, 1973.

[17] ORTS,W.J.; NOBES, G.A.R.; KAWADA,J.; NGUYEN, S.; YU, G.; RAVENELLE F. **Poly(hidroxyalkanoates): Biorefines polymers with a whole range of application. The work of Robert H. Marchessault.** *Can. J. Chem*, 2008, v.86, p. 628-640.

[18] CANEVAROLO J. S. V. *Ciência dos Polímeros – Um Texto Básico para Tecnólogos e Engenheiros.* Artliber Editora. São Paulo, 2002.

- [19] CHOI, H. J.; KIM, J.; JHON, M.S. **Viscoelastic characterization of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate).** *Polymer*, v.40, p. 4135-4138,1999.
- [20] KUNIOKA, M.; DOI, Y. **Thermal Degradation of Microbial Copolyesters: Poly((3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and Poly ((3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate).** *Macromolecules*, 1990, v.23, p.1933-1937.
- [21]. HOFFMANN, A.; KREUZBERGER,S.; HINRICHSSEN, G. **Influence of thermal degradation on tensile strength and Young's modulus of poly(hydroxybutyrate).** *Polymer Bulletin*, 1994, v.33,p. 355-361.
- [22] BLOEMBERGEN, S.; HOLDEN, D. **Studies of composition and cristallinity of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-hydrovalerate).** *Macromolecules*, 1986, v.19, p.2865-2870.
- [23] KUNIOKA, M.; TAMAKI, A.; DOI, Y. **Cristalline and thermal properties of bacterial copolyesters: poly(3hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate.** *Macromolecules*, 1989, v.22, p.694-699.
- [24] RANJANA,S.; ALOK, R. **Polyhydrybutyrate, its copolymers and blends.** *J.M.S – Rev Macromol Chem Phys*, C 35, 1995, p.327.
- [25] TAGUCHI, S.; MATSUSAKI, H.; MATSUMOTO, K.; TAKASE, K. **Biosynthesis of biodegradable polyesters from renewable carbon sources by recombinant bacteria.** *Polymer International*, 2002, v. 51, p. 899-903.
- [26] ASHBY, R.D., SHI, F.; GROSS, R.A. **A Turnable Switch to regulate the synthesis of low and high molecular weight microbial polyesters.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, v.62, n.1, January 5.

- [27] QUENTAL, A.C.; CARVALHO, F.P.; TADA, E.S.; FELISBERTI, M.I. **Blendas de PHB e seus copolímeros: miscibilidade e compatibilidade.** *Química Nova*, 2010, v.33, p.438-446.
- [28] SHIAO, W.K; LIU,W.C. **Miscibility enhancement through hydrogen bonding interaction of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) blending with poly(styrene-co-vinyl phenol) copolymer.** *J. Appl. Polymer Science*, 2011, v.119, p.300-310.
- [29] GRECO, P.;MARTUSCELLI, E. **Crystallization and thermal behaviour of poly(d(—)-3-hydroxybutyrate)-based blends.** *Polymer*, 1989, v.30, p.1475-1483.
- [30] KIM, B.O.; WOO, S.I. **Compatibilizing Capability of Poly(hydroxybutyrate-co-e-caprolactone).** *Polymer Bulletin*, 1998,v.41, p.707-712.
- [31] IMMIRZI, B.; MALINCONICO, M.; ORSELLO, G.; PORTOFINO, S.; VOLPE, M.G. **Blends of biodegradable polyesters by reactive blending: preparation, characterization and properties.** *Journal of Materials Science*, 1999, v.34, p.1625-1639.
- [32] HAY, J. N.; SHARMA, L. **Crystallisation of poly(3-hydroxybutyrate)/polyvinyl acetate blends.** *Polymer*, 2000, v. 41,p. 5749-5757.
- [33] AN, Y.; DONG, L.; XING, P.; ZHUANG, Y.; ZHISHEN, M.; FENG, Z. **Crystallization kinetics and morphology of poly(β -hydroxybutyrate) and poly(vinyl acetate) blends.** *Eur. Polym. J.* 1997, 33, 1449-1452.
- [34] CHIU, H.J. **Segregation morphology of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(vinyl acetate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-10% 3-hydroxyvalerate)/poly(vinyl acetate) blends as studied via small angle X-ray scattering.** *Polymer*, 2005, v.46, p.3906-3913.
- [35] SICILIANO, A.; SEVES, A.; DE MARCO, T.; CIMMINO, S.; MARTUSCELLI, E.; SILVESTRE, C. **Miscibility and thermal and crystallization behaviors of poly (D-**

(-)-3-hydroxybutyrate)/atactic poly (methyl methacrylate) blends. *Macromolecules*, 1995, 28, 8065-8072.

[36] CIMMINO, S.; IODICE, P.; SILVESTRE, C.; KARASZ, F. E. **Atactic poly(methyl methacrylate) blended with poly(3-D(-)hydroxybutyrate): Miscibility and mechanical properties.** *J. Appl. Polym. Sci.* 2000, 75, 746-753.

[37] AL-RAWAJFEH, A. E.; AL-SALAH, H. A.; AL-RHAEL. I. **Miscibility, Crystallinity and Morphology of Blends of Polyamide-6/ Poly(β -hydroxybutyrate).** *Jordan Journal of Chemistry* v.1, p. 155-170, 2006.

[38] LANDRY, M.R; MASSA, D.J; LANDRY, C.J.T. ; TEEGARDEN, D.M.; COLBY, R.H.; LONG, T.E.; HENRICHES, P.M. **A survey of polyvinylphenol blend miscibility.** *Journal of applied Polymer Science* v.54, p.991-1011,1994.

[39] YOU, J.W.; CHIU, H.J.; DON, T.M. **Spherulitic Morphology and Crystallization Kinetics of Melt-Miscible Weight Poly (ethylene oxide).** *Polymer*, 2003, v.44, p.4355-4362.

[40] PARRA, D.F.; FUSARO,J.; GABOARDI F.; ROSA, D.S. **Influence of poly (ethylene glycol) on thermal, mechanical, morphological, physical-chemical and biodegradation properties of poly (3-hydroxybutyrate).** *Polymer Degradation and Stability*, 2006, v.91, p.1954-1959.

[41].YU, L.; DEAN, K.; LI, L. **Polymer blends and composites from renewable resources.** *Pogress in Polym. Sci.* , 2006, v.31,p.576-602.

[42].DRUMRIGHT, R.E.; GRUBER, P.R.; HENTON, D.E.; **Polylactic acid technology.** *Adv Materials*, 2000, v.12, p.1841-1846.

[43] OHKOSHI, I.; ABE, H.; DOI, Y. **Miscibility and solid-state structures for blends for blends of poly((S)-lactide) with atactic poly ((R,S) -3-hydroxybutyrate).** *Polymer*, 2000, v.41, p.5985-92.

- [44] ZHANG ,L.; DENG, X.; HUANG, Z. **Miscibility, thermal behavior and morphological structure of poly(3-hidroxybutyrate) and ethyl cellulose binary blends.** *Polymer*, 1997, v.38, p.5379-5387.
- [45] MAEKAWA, M.; PEARCE, R.; MARCHESSAULT, R.H, MANLEY, R.S.J. **Miscibility and tensile properties of poly(3-hidroxybutyrate)-cellulose propionate blend.** *Polymer*, 1999, v.40, p. 1501-1505.
- [46] EL-SHAFEE, E.; SAAD, G.R.; FAHMY, S.M. **Miscibility, crystallization and phase structure of poly(3-hidroxybutyrate)/cellulose acetate butyrate blend.** *Eur Polym J*, 2001,v.37, p.2091-2104.
- [47] GODBOLE, S.; GOTE , S.; LATKAR, M.; CHAKRABARTI, T. **Preparation and characterization of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate-starch blend films.** *Bios. Techn*, 2003, 86, p.33-37.
- [48] ZHANG, L. L.; DENG, X. M.; ZHAO, S. J.; HUANG, Z. T. **Biodegradable polymer blends of Poly(3-hydroxybutyrate) and starch acetate.** *Polym. Intern*, 1997, 44, 104-110.
- [49] SERAFIM, S.L.; LEMOS, P.C.; REIS, M.A.M. **Produção de Bioplásticos por Culturas Microbianas Mistas.** *Boletim de Biotecnologia*, 2003, v.76, p.15-20.
- [50] LIU, Q.; ZHU, M.; CHEN, Y. **Synthesis and characterization of multi-block copolymers containing poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)] and poly(ethylene glycol).** *Polym International*, 2010, v.59, p. 842-850.
- [51] CHEN, C; PENG, S.; FEI, BIN, ZHUANG, Y.; DONG. L.; FENG, Z.; CHEN, S.; XIA,H. **Synthesis and Characterization of Maleated Poly(3-hydroxybutyrate).** *J. Appl. Polymer Science*, v.88, p.659-668, 2003.
- [53] FÉRNANDEZ, A.M.; ABRAHAM, G.A.; VALENTIN, J.L.; RÓMAN, J.S. **Synthesis and characterization of biodegradable non-toxic poly (ester-**

urethane-urea)s based on poly(ϵ -caprolactone) and amino acid derivatives. *Polymer*, 2006, v. 47, p. 785-798.

[54] IMPALLOMENI, G.; GIUFFRIDA, M.; BARBUZZI, T.; MUSUMARRA, G.; BALLISTRERI, A. **Acid Catalyzed Transesterification as a Route to Poly (3-hydroxybutyrate-co- ϵ -caprolactone) copolymers from their homopolymers.** *Biomacromolecules*, 2002, v.3, p.835-840.

[55] CHEN, C.; YU, C.H.; CHEN, Y.C.; YU, P.H.F.; CHEUNG, M.K. **Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on amphiphilic poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol)-poly(3-hydroxybutyrate) triblock copolymer.** *Eur. Polym. J.*, 2006, v.42, p.2211-2220.

[56] HAROLD D.A.; KEIL, K.; BRUNS, D.E. *Biochem. Pharmacol.*, 1989, v.38, p.73-76.

[57] RAVENAVELLE, F. MARCHESSAULT, R.H. **One-step Synthesis of Amphiphilic diblock copolymers from bacterial poly([R]hydroxybutyric acid).** *Biomacromolecules*, 2002, v.3 p.1057-1064.

[58] JEONG, K.H.; KWON, S.H.; KIM, Y.J. **Characterization and Release Behaviour of Poly[(R)-3-hydroxy butyrate] –co- Methoxy Poly(ethylene glycol) with Various Block Ratios.** *Macromolecular Research*, 2008, v.6, p.418-423.

[59] ZHIJIANG, C.; ZHIHONG, W. **Preparation of biodegradable poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) and poly(ethylene glycol) (PEG) graft copolymer.** *J. Mater Sci*, 2007, v.42, p.5886-5890.

[60] LI, J.; LI, X.; NI, X.; LEONG, K.W. **Synthesis and Characterization of New Biodegradable Amphiphilic Poly(ethylene oxide) –b-poly[(R)-3-hydroxy butyrate]-b-poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers.** *Macromolecules*, 2003, v.36, p.2661-2667.

- [61] ZHAO,Q.; CHENG,G.; LI,H; MA,X, ZHANG,L. **Synthesis and characterization of biodegradable poly(3-hidroxybutirate) and poly(ethylene glycol) multiblock copolymers.** *Polymer*, 2005, v.46, p.10561-10567.
- [62] ZHAO,Q.; CHENG,G.; SONG,C.; ZENG,Y.; TAO,J.; ZHANG,L. **Crystallization behavior and biodegradation of poly(3-hidroxybutirate) and poly(ethylene glycol) multiblock copolymers.** *Polym Degradation and Stability*, 2006, v.91,p.1240-1246.
- [63] NAGUIB,H.F.; AZIZ, M.S.A.; SHERIF,S.M.; SAAD, G.R. **Synthesis and thermal characterization of poly(ester-ether-urethane)s based on PHB and PCL-PEG-PCL blocks.** *J. Polym.Res*, 2011, v.18, p.1217-1227.
- [64] CHEN, C.; FEI, B.; PENG, S.; WU, H.; ZHUANG, Y.; CHEN, X.; DONG, L.; FENG, Z. **Synthesis and characterization of Poly(hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone) copolyester by transesterification.** *J. Polymer Science*, 2002, v. 40, p.1893-1903.
- [65] LIU, L.K.; GOH, S.H.; LI, J. **Controlled synthesis and characterizations of amphiphilic poly [(R,S)-3-hydroxybutyrate]-poly(ethylene glycol)-poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate] triblock copolymers.** *Polymer*, 2008, v.49, p.732-741.
- [66] VILLANOVA, J.C.O.; ORÉFICE,R.L. **Aplicações Farmacêuticas de Polímeros.***Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 2010, v.20, p.51-64.
- [67] BARBANTI,S.H.; ZAVAGLIA,C.A.C.; DUEK,E.A.R **Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos.***Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 2005, v.15,p.13-21.
- [68] KOTWAL, V.B.; SAIFEE, M.; INAMDAR, N.; BHISE,K. **Biodegradable polymers: Which, when and why?** *Indian J. Pharmaceutical*, 2007, v.69, p.616-625.

- [69] ASANE, G.S.; NIRMAL, S.A.; RASAL, K.B., NAIK, A.A.; MAHADIK,M.S.; MADHUSUDAN, R. Y. **Polymers for Mucoadhesive Drug Delivery System: A Current Status** *Drug Development Industrial Pharmacy*. 2008, v.34, p.1246-1266.
- [70] ANDREWS, G.P.; LAVERTY, T.P.; JONES, D.S. **Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery.** *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009, v.71, p.505-518.
- [71] BANSIL, R.; TURNER, B.S. **Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications.** *Current Opinion in Colloid Interface Science*, 2006, v.11, p.164-170.
- [72] LINDEN, S.K.; SUTTON, P.; KARLSSON, N.G.; KOROLIK,V.; McGUICKIN, M.A. **Mucins in the mucosal barrier to infection.** *Mucosal Immunology*, 2008, v.1, p.183-197.
- [73] HARDING, S.E. **Mucoadhesive Interactions** Meeting on Intermolecular Associations in 2D and 3D Location: UNIV NOTTINGHAM, NOTTINGHAM, ENGLAND Date: JUN 19-20, 2003 *Biochem. Soc. Trans.*, 2003, v.31, p.1036-1041.
- [74] SMART, J.D. **The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion.** *Adv. Drug Delivery Rev*, 2005, v.57, p.1556-1568.
- [75] QIU, L.Y.; BAE, Y.H. **Polymer Architecture and Drug Delivery.** *Pharm. Res.* 2006, v.23, p.1-30.
- [76] VLERKEN, L.; AMIJI, M.; **Multi-functional polymeric nanoparticles for tumour-targeted drug delivery.** *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2006, v.3, p.205-216.
- [77] BISHT, S.; FELDMANN. KOOSTRA. J.M., , G.; **In vivo characterization of a polymeric nanoparticle platform with potential oral drug delivery capabilities.** *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008, v.7, p.3878-3888.

- [78] LANGER, R.; PEPPAS, N.A. **Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology.** *AIChE Journal* 2003, v.49, p.2990-3006.
- [79] YUAN J.; LI,Y.; LI X.; CHENG S.; JIANG L.; FAN. C. **The “crew-cut” aggregates of polystyrene-b-poly(ethylene oxide)-b-polystyrene triblock copolymers in aqueous media.** *European Polymer Journal*, 2003, v.39, p.767-776.
- [80] ISRAELACHVILI J. N.; **Intermolecular and Surfaces Forces – With applications to colloidal and biological systems.** Academic Press Harcourt Brace Jovanovich Publishers, London, 2000, p.229-273.
- [81] DEAMER D. W. **Membrane compartments in prebiotic evolution. The Molecular Origins of Life.** *Cambridge University Press*, 1998, p.189-205.
- [82] SOLARO R. **Nanostructured Polymeric Systems in Target Release of Proteic Drugs and in Tissue Engineering.** *EU Forum on Nanosized Technology*, 2002, p.225-244.
- [83] NGUYEN C. A.; MARSAUD V.; BOUCLIER C.; TOP, S.; VESSIERES A.; PIGEON, P.; GREF, R.; LEGRAND, P.H.; JAUEN, G.; RENOIR, J.M. **Nanoparticles loaded with ferrocenyl tamoxifen derivatives for breast cancer treatment.** *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, v. 347, p.128-135.
- [84] FREITAS S.; MERKLE H. P.; GANDER, B. **Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology.** *Journal of Controlled Release*, 2005, v.102, p. 313-332.
- [85] LI M.; ROUAUD, O.; PONCELET D. **Microencapsulation by solvent evaporation : State of the art for process engineering approaches.** *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, v. 363, p. 26-39.

- [86] JING C.; JUN W. **Syntheses of amphiphilic biodegradable copolymers of poly(ethyl ethylene phosphate) and poly(3-hydroxybutirate) for drug delivery.** *Science in China Series*, 2009, v.52, p. 961-968.
- [87] TAKAMI T; MURAKAMI Y. **Development of PEG–PLA/PLGA microparticles for pulmonary drug delivery prepared by a novel emulsification technique assisted with amphiphilic block copolymers.** *Colloids and Surfaces*, 2011, v.87 p.433– 438.
- [88] SILVERSTEIN R. M.; BASSLER G. C.; MORRIL T.C. **Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos.** 5ª edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., p.387, 1994.
- [89] GABOARDI F. **Avaliação das Propriedades Mecânicas, Térmicas e de Biodegradação de Blendas de PHB e PEBD com e sem Aditivos Pró-Oxidantes.** 2007. 117p. Dissertação de Mestrado, Universidade São Francisco. Itatiba.
- [90] SOUZA F. B., OLIVEIRA M. F.; LULA I. S. ; SANSIVIERO, M. T. C.; CÓRTEZ, M. E.; SINISTERRA, R. D. **Study of inclusion compound in solution involving tetracycline and b-cyclodextrin by FTIR-ATR.** *Vibrational Spectroscopy*, 2008, v.46, n.1, p.57-62.
- [91] SKOOG D.A.; HOLLER F.J.; NIEMAN T.A. **Princípios de Análise Instrumental** 5ª edição, Porto Alegre, Editora Bookman, p.836 2002.
- [92] DU, Y. J.; LEMSTRA, P.J., NIJENHUS, A. J.; BASTIAANSEN, C.; ABA **Type Copolymers of Lactide with Poly(ethylene glycol). Kinetic, Mechanistic, and Model Studies,** *Macromolecules* 1995; v.28 (7); p.2124-2132.
- [93] CALLISTER, W.D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução.** 5ed. LTC. 2002, Rio de Janeiro, Brasil.

- [94] MANO E. B. **Polímeros como materiais de engenharia**. São Paulo: Editora Edgar Blücher LTDA, 1991,p. 197.
- [95] ROA J. P.; FAUSTINO, V. M. P. B.; SILVA, E. B.; FILHO J. D. S. Síntese e **Caracterização do Copolímero Poli(3-Hidroxibutirato-co- ϵ -Caprolactona) a Partir de Poli(3-Hidroxibutirato) e Poli(ϵ -Caprolactona)**. *Polímeros*, 2010, v.20, p.221-226.
- [96] ANTUNES, M. C. M. “**Transesterificação do poli(3-hidróxibutirato) com etilenoglicol via catálise ácida – Influência nas propriedades finais e morfologia**”, Dissertação de Mestrado, 2003, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- [97] CASTRO C. R. F. **Tomografia por Difração de Raios X em Tecidos Biológicos utilizando Radiação Síncrotron**. Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia Nuclear. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil, 2006.
- [98] GEDDE. **Polymer Physics** , Kluwer Academic Publishers, 251 (1985).
- [99]JENDROSSEK D.; HANDRICK R. **Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates** , *Annu Rev Microbiol*, 2002, v. 56, p. 403-408.
- [100] QUENTAL A.; FELISBERTI M. I. **Comportamento Térmico e Morfológico do Poli(Hidroxibutirato) - PHB**, Anais do 6º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2000.
- [101] BRANDDRUP J.; IMMERGUT E. H.; GRULKE E. A. *Polymer Handbook* 4 th ed, Wiley-Interscience, New Jersey; vol 2.