UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ADRIANO MARIM DE OLIVEIRA

Obtenção de nanopartículas sensíveis a temperatura e pH a partir de copolímeros em bloco constituídos de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) sintetizado via RAFT visando aplicação em encapsulação e liberação controlada de ativos

São Paulo
2008

ADRIANO MARIM DE OLIVEIRA

Obtenção de nanopartículas sensíveis a temperatura e pH a partir de copolímeros em bloco constituídos de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) sintetizado via RAFT visando aplicação em encapsulação e liberação controlada de ativos

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Materiais e Meio Ambiente
Orientador: Prof. Dr. Amilton Martins dos Santos

**São Paulo
2008**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Biblioteca Universitária

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Oliveira, Adriano Marim de

Obtenção de nanopartículas sensíveis a temperatura e pH a partir de copolímeros em bloco constituídos de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) sintetizado via RAFT visando aplicação em encapsulação e liberação controlada de ativos. / Adriano Marim de Oliveira ; orientador Amilton Martins dos Santos. -- Lorena : 2008.

268 f: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais. Área de Concentração: Materiais e Meio Ambiente) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. N-isopropilacrilamida 2. RAFT 3. PHBHV 4. Copolímeros em bloco 5. Liberação controlada de ativos. I. Título.

DEDICATÓRIA

*Dedico este meu trabalho as pessoas que
sempre me apoiaram neste sonho, meu pai
S. Dito, a minha mãe D. Geny, o meu irmão
Airton e a minha esposa Adriana.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida.

Ao Prof. Dr. Amilton Martins dos Santos pelo apoio, atenção e coragem em aceitar o desafio deste trabalho.

À Dr^a Maria Inês Ré pelo auxílio com os ensaios de liberação *in-vitro*.

Ao Prof. Dr. Pedro Carlos de Oliveira pela amizade e os momentos de ajuda nas correções de relatórios, trabalhos para congressos e artigos.

À Gizelda que sempre me ajudou com muita boa vontade e amizade.

Aos amigos que trabalharam como bolsistas nesta tese, Patrícia, Jaime, Flávia e Isabelle.

Aos Amigos Sérgio e Patrícia que me agüentaram nos vários finais de semanas que estive em Lorena para execução deste trabalho.

Aos amigos Maurício e Lilia que acompanharam de perto este trabalho e também pelas caronas de finais de semana.

Aos colegas que tive a oportunidade de conviver no Laboratório de Polímeros da EEL-USP.

Ao Dr. Frank D`Agosto pela ajuda nas sínteses dos CTAs

À Prof^a. Dr^a. Jayne pelas análises de RMN e FTIR.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Biaggio pela ajuda nas sínteses dos CTAs.

Ao Dr. Marcelo pelas análises de TEM.

Aos amigos da Hexion pelo estímulo e risadas, principalmente meu amigo Garotinho (Ademir).

Aos amigos do Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia de Partículas do IPT pela agradável convivência.

Ao responsável pelo Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia de Partículas do IPT, Dr. Silas Derenzo pelo incentivo e compreensão.

Aos funcionários da EEL-USP.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que eventualmente não foram citados

" Observe, eu lhe peço, esses locais respeitáveis que são designados
pelo expressivo termo: Laboratórios.
Exija que eles sejam multiplicados e adornados.
São os templos do futuro, templos do bem-estar e da felicidade.
É neles que a humanidade torna-se maior, mais forte, melhor".

Louis Pasteur

“A Ciência e a Religião são as duas alavancas da inteligência humana.
Uma revela as leis do mundo material, e a outra as leis do mundo
moral. Mas *aquelas e estas leis, tendo o mesmo princípio, que é Deus,*
não podem contradizer-se.”

Allan Kardec

RESUMO

OLIVEIRA, A. M. Obtenção de nanopartículas sensíveis a temperatura e pH a partir de copolímeros em bloco constituídos de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) sintetizado via RAFT visando aplicação em encapsulação e liberação controlada de ativos. 2008. 268p. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2008.

Recentemente, utilizando a técnica de auto-agregação (“self-assembly”) foi possível visualizar a possibilidade de se obterem estruturas de tamanhos nanométricos de maneira rápida, em poucas etapas sintéticas e por meio de simples atrações físicas entre as macromoléculas, simulando as interações dos peptídeos nas proteínas. A principal característica desta técnica baseia-se na estrutura química dos polímeros sintéticos que permite o processo de autoagregação somente com interações físicas entre as macromoléculas (sem ligações covalentes). Por meio desta técnica é possível obter, com eficiência e rapidez, estruturas nanométricas que seriam de difícil obtenção por técnicas convencionais. O objetivo principal desta tese foi estudar uma rota química para a síntese de copolímeros em bloco anfifílicos e a preparação de nanopartículas sensíveis à variação de temperatura e pH, pelo método de auto-agregação. Para isso, copolímeros em bloco anfifílicos foram sintetizados utilizando como segmento hidrofóbico o Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBHV) e como segmento hidrofílico foram utilizados a Poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) e Poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) (PNIPAAmAA). Estes polímeros chamados “inteligentes” foram sintetizados pelo novo mecanismo de polimerização radicalar controlada, por transferência de cadeia, via fragmentação e adição reversíveis (RAFT). Essas nanopartículas termo-pH-sensíveis foram empregadas nos estudos de liberação controlada de um ativo modelo, o acetato de dexametasona, sob condições controladas de temperatura e pH. Com os resultados obtidos nesta tese foi possível identificar uma rota química de síntese de copolímeros em bloco anfifílicos sensíveis a temperatura e pH, utilizando-se de reações de acoplamento entre um polímero biodegradável, obtido de fontes renováveis, e polímeros “inteligentes”. Foi possível demonstrar também, a viabilidade de utilização destes copolímeros anfifílicos na preparação de nanopartículas pela técnica de auto-agregação, o emprego deste sistema na encapsulação e a liberação controlada de um ativo modelo em função de variações de temperatura e pH.

Palavras Chaves: N-isopropilacrilamida. RAFT. PHBHV. Copolímeros em bloco. Liberação controlada de ativos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A. M. Preparation of thermo and pH responsive nanoparticles composed of block copolymers of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBHV) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) (PNIPAAmAA) synthesized via RAFT and its application in encapsulation and drug delivery. 2008. 268p. Thesis (Doctoral in Materials Engineering) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2008.

Recently, the self-assembly technique provided an efficient and rapid pathway for obtaining nanometers structures in a nanometer scale using few steps of reactions and by means of simple physical attractions among macro chains, simulating the folding of peptide segments in proteins. The main characteristic of this technique is based on the chemical structure of the synthetic polymers which allow the self degradation process only with physical interactions between the macro chains (without covalent bonds). By the utilization of this technique is possible to obtain, easily and efficiently, nanometers structures, which would be difficult to be obtained by conventional techniques. The aim of this work was to study a chemical route for designing amphiphilic block copolymers and nanoparticles that exhibit thermo and pH responsive by means of self-assembly method. For this purpose, amphiphilic block copolymers were synthesized using as hydrophobic segment Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBHV) and as hydrophilic segments, Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) and Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) (PNIPAAmAA). The hydrophilic polymers, called “smart” polymers were synthesized by a new mechanism of controlled radical polymerization, the reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT). These nanoparticles sensitive to temperature and pH were utilized in a drug delivery system of a model drug, the Dexametasone acetate (DexAc) under controlled environment of temperature and pH. The results allowed identifying a chemical route for the synthesis of stimuli-responsive amphiphilic block copolymers by means of coupling reactions of a biodegradable polymer obtained from renewable resources with smart polymers. It was also possible to demonstrate the possibility of utilization of these amphiphilic copolymers in the preparation of nanoparticles by self-assembly technique as well as the utilization of this system in the encapsulation and in the drug delivery of a model drug with variation of temperature and pH.

Key words: N-isopropylacrylamide. RAFT. PHBHV. block copolymer e drug delivery

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1: Diferentes áreas de aplicação da nanotecnologia. (Adaptada de INOVABRASIL, 2007).....	42
Figura 1.2: Tipos de nanopartículas empregadas em sistemas de liberação controlada. (Adaptada de LETCHFORD e BURT, 2007).....	45
Figura 1.3. Estrutura dos polihidroxialcanoatos.....	54
Figura 1.4. Estrutura do poli-3-hidroxibutirato (PHB). (Adaptada de LEMOIGNE, et al., 1926).....	55
Figura 1.5. Estrutura do poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBHV). (Adaptada de WALLEN, <i>et al.</i> , 1974).....	56
Figura 1.6. Mecanismo de polimerização radical livre “viva” via RAFT.....	67
Figura 1.7. Arquiteturas macromoleculares possíveis de serem obtidas via RAFT. (Adaptada de MOAD, <i>et al.</i> , 2005).....	77
Figura 1.8. Equilíbrio de reação de adição-fragmentação entre radical propagante e cadeia dormente.....	80
Figura 1.9. Estrutura química do iniciador bifuncional empregado por HAWKER e colaboradores empregado na copolimerização em bloco do estireno, via NMP com a caprolactona. (Adaptada de HAWKER, et al., 1998).....	87
Figura 1.10: Mecanismo de reação de acoplamento via “ <i>click chemistry</i> ”.....	88
Figura 1.11: Polímeros sintetizados por SHI; TANG; PAN (2008) para preparação de copolímeros em bloco anfífilos pela técnica de “ <i>click chemistry</i> ”.....	89
Figura 1.12. Processos de auto-agregação de copolímeros em bloco.....	95
Figura 1.13. Controle das interações entre micelas poliméricas formadas por PBMA-b-PNIPAAm e células mediante variação de temperatura. (Adaptada de CHUNG, et. al. 1999).....	100

Figura 1.14. Liberação controlada da adriamicina pelas nanopartículas termosensíveis, formadas por PBMA-b-PNIPAAm, nas temperaturas de 4 e 40 °C. (CHUNG, et al., 1998).....	101
Figura 1.15. Síntese do copolímero em bloco constituído por PLA-b-PNIPAAm. (Adaptada de KIM, et al., 2000).....	103
Figura 1.16. Polímeros a base de PNIPAAm utilizados por CHUNG, et al., (1998) na preparação de nanopartículas termosensíveis.....	104
Figura 1.17. Mecanismo empregado por Lo, et al., (2005) para síntese do PLA-g-Poli(NIPAAm-co-MAA).....	110
Figura 1.18. Liberação controlada da 5-F pela nanopartícula termo-pH sensível, na temperatura de 37°C. (LO, <i>et.al.</i> , 2005).....	110
Figura 2.1. Estrutura química dos principais reagentes e dos produtos intermediários utilizados nas sínteses dos copolímeros em bloco.....	114
Figura 2.2. Espectro de RMN ¹ H da NIPAAm purificada.....	115
Figura 2.3. Espectro de RMN ¹ H do Ácido acrílico.....	115
Figura 2.4. Espectro de Infra-Vermelho (FT-IR) do monômero NIPAAm.....	116
Figura 2.5. Espectro de Infra-Vermelho (FT-IR) do monômero AA.....	116
Figura 2.6. Espectro de RMN ¹ H do PHBHV utilizado nas sínteses de copolímeros em bloco.....	118
Figura 2.7. Sistema de polimerização utilizado nesta etapa do projeto.....	127
Figura 2.8. Modelo de integração dos sinais do trioxano e da NIPAAm para o cálculo de conversão de reação.....	129
Figura 3.1. Mecanismo da síntese do ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico (PTETPA).....	139

Figura 3.2. Espectro de RMN ^1H do ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico (PTETPA).....	140
Figura 3.3. Mecanismo empregado na síntese do ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico (PTTPA).....	141
Figura 3.4. Espectro de R MN ^1H do ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico (PTTPA).....	142
Figura 4.1. Influência da estrutura química do CTA na polimerização da NIPAAm via RAFT (reações H14 e H15 da Tabela 4.4).....	152
Figura 4.2. Mecanismo de formação de moléculas ou macromoléculas tipo “estrelas”, conforme proposto por MONTEIRO e BROUWER, 2001.....	152
Figura 4.3. Efeito do PTETPA na cinética de polimerização da NIPAAm (condições experimentais nas Tabelas 4.3 e 4.4).....	153
Figura 4.4. Consumo de monômero em função do tempo da polimerização da NIPAAm utilizando o PTEPTA como CTA (reação H14 da Tabela 4.4).....	155
Figura 4.5. Variação da massa molecular da PNIPAAm e do índice de polidispersidade das macrocadeias vs conversão de polimerização (reação H14 da Tabela 4.4).....	156
Figura 4.6. Sobreposição dos cromatogramas de GPC das amostras retiradas em diferentes tempos da reação de polimerização da NIPAAm via RAFT empregando o PTETPA como CTA (reação H14 da Tabela 4.4).....	156
Figura 4.7. Espectro de RMN ^1H da PNIPAAm sintetizada via RAFT, empregando PTETPA como CTA, obtida nas condições da reação H14 (Tabela 4.4).....	157
Figura 4.8. Sobreposição dos cromatogramas de GPC dos produtos obtidos nas duas etapas da reação H20: (reações H20 e H20c da Tabela 4.5).....	159

Figura 4.9. Influência da estrutura química do CTA na polimerização do AA via RAFT.....	161
Figura 5.1. Consumo de monômeros em função do tempo para a reação C2.....	166
Figura 5.2. Massa molecular da PNIPAAmAA e índice de polidispersidade em função da conversão de polimerização obtido nas condições da C2.....	167
Figura 5.3. Sobreposição dos cromatogramas de GPC obtidos na caracterização de amostras coletadas em diferentes tempos da reação C2.....	167
Figura 5.4. Espectro de Infra-Vermelho (FT-IR) da PNIPAAm obtida nas condições experimentais da reação C 1, empregando PTETPA como CTA.....	169
Figura 5.5. Espectro de Infra-Vermelho (FT-IR) do PNIPAAmAA obtido nas condições experimentais da reação C2, empregando PTETPA como CTA.....	169
Figura 5.6. Espectro de Infra-Vermelho (FT-IR) do PNIPAAmAA obtido nas condições experimentais da reação C3, empregando PTETPA como CTA.....	170
Figura 5.7. Influência da razão molar [PTETPA]/[AIBN] na conversão da copolimerização da NIPAAm.....	172
Figura 5.8 Influência da temperatura na conversão individual da NIPAAm, para as reações de copolimerização com o AA, mediada pelo PTETPA.....	175
Figura 5.9. Perfil das curvas de LCST determinadas por transmitância a 542 nm, [polímeros] = 5 g/L.....	179
Figura 5.10. Mecanismo ilustrativo de formação de agregados em função da temperatura e pH do PNIPAAmAA com diferentes razões molares de NIPAAm e AA.....	183
Figura 6.1. Esquema de reação empregado na síntese de um copolímero em bloco termo-sensível constituído de PHBHV e PNIPAAm, utilizando DCC e DMAP como agentes de acoplamento.....	186

Figura 6.2. Cromatogramas de GPC do PHBHV-1 (Tabela 2.1 do Capítulo2) e do produto da reação CB8, obtidos empregando CHCl_3 como eluente	190
Figura 6.3. Cromatogramas de GPC do PHBHV-1 (Tabela 2.1, Capítulo 2), PNIPAAm e o produto da reação CB8 obtidos empregando DMF como eluente.....	191
Figura 6.4. Fluxograma ilustrativo da técnica de precipitação seletiva utilizada na separação do produto de reação dos polímeros residuais de uma reação de acoplamento entre o PHBHV e PNIPAAm.....	193
Figura 6.5. Espectro de RMN ^1H do material recuperado após evaporação do filtrado da precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB3.....	195
Figura 6.6. Espectro de RMN ^1H do precipitado obtido com técnica de precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB3.....	195
Figura 6.7. Espectro de RMN ^1H do material recuperado após evaporação do filtrado da precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB4.....	197
Figura 6.8. Espectro de RMN ^1H do precipitado obtido com técnica de precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB4.....	197
Figura 6.9. Espectro de RMN ^1H do precipitado obtido na precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB5.....	198
Figura 6.10. Espectro de RMN ^1H do material recuperado após evaporação do filtrado da precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB6.....	200

Figura 6.11. Espectro de RMN ^1H do precipitado obtido com técnica de precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB6.....	200
Figura 6.12. Efeito do pH na LCST de dois copolímeros em bloco, um contendo PNIPAAm (CB7) e outro contendo PNIPAAmAA (CBAA3), como segmentos hidrofílicos.....	202
Figura 7.1. Esquema de formação das nanopartículas pelo método de diálise, empregando copolímeros em bloco anfifílicos.....	205
Figura 7.2. Influência da concentração do copolímero em bloco no DP e IP das nanopartículas obtidas pela técnica de autoagregação empregando PHBHV-b-PNIPAAmAA obtido nas condições da reação CBAA4.....	208
Figura 7.3. Micrografias de TEM das nanopartículas Np01 (PHBHV-b-PNIPAAmAA – reação CB1).....	209
Figura 7.4. Efeito da temperatura no DP e IP das nanopartículas Np02 (PHBHV-b-PNIPAAm – reação CB7).....	211
Figura 7.5. Esquema representativo do efeito da temperatura no DP e IP das nanopartículas Np02 (PHBHV-b-PNIPAAm – reação CB7).....	211
Figura 7.6. Histogramas de diâmetro médio de partícula (DP) da nanopartícula Np03 (PHBHV-b-PNIPAAmAA – reação CBAA3) nos pHs de 7,4 (imagem A) e 3,0 (imagem B).....	213
Figura 7.7. Micrografias de TEM da Np03 (PHBHV-b-PNIPAAmAA – reação CBAA3) condicionada em pH igual a 7,4 (imagem A) e pH igual a 3,0 (imagem B). ..	213
Figura 7.8. Efeito do aquecimento na transmitância da suspensão das nanopartículas termosensíveis (Np02) obtidas com copolímeros em bloco de PHBHV-PNIPAAm. (25 a 60°C).....	215

Figura 7.9. Efeito do resfriamento na transmitância da suspensão das nanopartículas termosensíveis (Np02) obtidas com copolímeros em bloco de PHBHV-PNIPAAm. (60 a 25°C).....	215
Figura 8.1. Liberação controlada do AcDex das nanopartículas constituídas por PHBHV-b-PNIPAAm em função da temperatura.....	219
Figura 8.2. Efeito da temperatura na taxa de liberação do AcDex das nanopartículas NpAcDex01.....	220
Figure 8.3. Mecanismo de liberação do AcDex do interior das nanopartículas termosensíveis.....	221
Figura 8.4. Efeito do pH na liberação do AcDex de nanopartículas constituídas de PHBHV-b-PNIPAAmAA (NpAcDex02) (T = 40°C).....	223
Figure 8.5. Mecanismo de liberação do AcDex das nanopartículas termo-pH-sensíveis em função do pH na temperatura de 40°C.....	224
Figura 8.6. Efeito do pH na liberação do AcDex de nanopartículas constituídas de PHBHV-b-PNIPAAmAA (NpAcDex02) (T = 35°C).....	225

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Principais eventos históricos em nanotecnologia. (Adaptada de DURÁN, MATTOSO e MORAIS, 2006).....	40
Tabela 1.2 – Forças que atuam nas diferentes escalas dos materiais. (Adaptada de DURÁN, MATTOSO e MORAIS, 2006).....	41
Tabela 1.3: Métodos de obtenção de microencapsulados. (Adaptada de BENITA, 1996).....	47
Tabela 1.4 - Métodos de preparação de nanopartículas, polímeros mais utilizados e ativos encapsulados.....	51
Tabela 1.5 - Razão de reatividade da NIPAAm (M1) com outros comonômeros (M2). (Adaptado de RZAEV, et al., 2007).....	61
Tabela 1.6 - Tipos de agentes RAFTs (composto 1 da figura 6) e suas aplicações.(MOAD, et al., 2005).....	69
Tabela 1.7 - Aplicação de copolímeros em bloco anfifílicos na encapsulação de ativos. (Adaptada de TORCHILIN, 2007).....	90
Tabela 2.1 – Massa molecular, índice e porcentagem de hidroxilas de amostras de PHBHV hidrolisado.....	117
Tabela 4.1 - Formulações e condições experimentais utilizadas nas polimerizações da NIPAAm via RAFT, utilizando PTETPA como CTA.....	145
Tabela 4.2 - Resultados de Mn_t e Mn_{exp} no estudo da homopolimerização da NIPAAm via RAFT.....	145
Tabela 4.3 - Dados experimentais das polimerizações da NIPAAm via radical livre convencional.....	150

Tabela 4.4 - Dados experimentais das polimerizações da NIPAAm via RAFT para o estudo da influencia do tipo de CTA e de solvente.....	150
Tabela 4.5 - Confirmação da característica de polimerização viva, via RAFT, da NIPAAm, mediada pelo PTETPA.....	159
Tabela 4.6 - Formulações das polimerizações do AA via RAFT.....	161
Tabela 5.1 - Formulações empregadas no estudo de variação da razão molar de [NIPAAm]/[AA].....	164
Tabela 5.2 - Resultados de conversão, massa molecular e Índice de Polidispersidade obtidos no estudo de variação da razão molar de [NIPAAm]/[AA].....	165
Tabela 5.3 - Condições experimentais para o estudo da influência da razão molar [PTETPA]/[AIBN] na copolimerização da NIPAAm com o AA.....	171
Tabela 5.4 - Resultados de conversão, massa molecular e Índice de Polidispersidade do estudo da influência da razão molar [PTETPA]/[AIBN] na copolimerização da NIPAAm com o AA.....	171
Tabela 5.5 - Dados experimentais das polimerizações realizadas variando-se a temperatura da reação.....	173
Tabela 5.6 - Resultados de conversão, massa molecular e Índice de Polidispersidade.....	173
Tabela 5.7 - Dados experimentais para as sínteses de PNIPAAm-b-AA, via RAFT, utilizando PTETPA como agente de controle.....	177
Tabela 5.8 - Resultados de conversão final, massa molecular e Índice de Polidispersidade para as sínteses de PNIPAAm-b-AA, via RAFT, utilizando PTETPA como agente de controle.....	178
Tabela 5.9 - Resultados das análises de Espalhamento de Luz em função da temperatura e do pH para duas amostras de PNIPAAmAA com razões molares diferentes.....	183

Tabela 6.1 - Formulações utilizadas nas reações de acoplamento do PHBHV com os polímeros termo-sensíveis.....	186
Tabela 6.2 - Formulações utilizadas nas reações de acoplamento do PHBHV com os polímeros termo-pH-sensíveis.....	187
Tabela 6.3 - Valores de massa molecular ($M_{n_{exp}}$) e Índice de Polidispersidade das reações de preparação dos copolímeros em bloco termo-pH-sensíveis obtidos nas reações CB7, CB8 e CBAA3.....	189

LISTA DE SIGLAS

CVP.....	2-vinilpiridina
3HV.....	3-hidroxivalerato
5-F.....	5-Fluorouracil
AA.....	ácido acrílico
AcDex.....	acetato de dexametasona
AEMHC.....	cloreto de aminoetilmetacrilato
AFM.....	microscópio de força atômica
AIBN.....	2,2'-azo-bis-isobutironitrila
AlClPc.....	Cloreto de ftalocianina alumínio
AM.....	acrilamida
AMBS.....	3-acrilo-amida-3-metilbutanoato de sódio
AMPS.....	2-acriloamida-2-metilpropano-1-sulfonato de sódio
AN.....	acrilonitrila
ATRP.....	polimerização por transferência reversível de átomo
BA.....	acrilato de butila
BMA.....	metacrilato de butila
BMDO.....	5,6-benzo-2-metileno-1,3-dioxipán
BzMA.....	metacrilato de benzila
CAC.....	concentração de associação crítica

CB.....	copolímeros em bloco
CDI.....	1,1' carbonildiimidazol
CMC.....	concentração micelar crítica
CMT.....	temperatura micelar crítica
CNPq.....	conselho nacional de pesquisa e desenvolvimento
CPADB.....	ácido ditiobenzoato de 4-cianopentanóico
CPM.....	2,4,4,6-tetraquis(etoxicarbonil)hepta-1,6-dieno
CRP.....	polimerização radicalar controlada
CTA.....	agente de transferência de cadeia
DCC.....	diciclohexilcarbodiimida
DCC.....	N,N' diciclohexila carbodiimida
DLS.....	espalhamento de luz dinâmico
DMA.....	N-dimetilacrilamida
DMAAm.....	dimetilacrilamida
DMAEMA.....	dimetilaminoetilmetacrilato
DMAP.....	dimetiaminopiridina
DMF.....	dimetilformamida
DNA.....	ácido desoxirribonucléico
DP.....	diâmetro médio de partícula
DSC.....	calorimetria diferencial exploratória
EA.....	acrilato de etila

EEL-USP.....	Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo
EHA.....	acrilato de 2-etilhexila
EHMA.....	2-etilhexilmetacrilato
EPR.....	efeito de permeação e retenção
ESI.....	espectrometria de Massa do tipo “ <i>eletrospray ionization</i> ”
FT-NIR.....	espectroscopia de infravermelho próximo
GMA.....	Metacrilado de glicidila
GPC.....	cromatografia de permeação em gel
HA.....	hidroxi-ácidos
HEMA.....	benzoato de vinila e hidroxietilmetacrilato
hGRF.....	Hormônio de Crescimento Humano
HPLC.....	cromatografia líquida de alto desempenho
HPLC.....	cromatografia líquida de alto desempenho
IP.....	índice de polidispersidade
IPT.....	Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo
LCST.....	temperatura mínima crítica de solução
LS.....	espalhamento de luz
MA.....	acrilato de metila
MAA.....	ácido metacrílico
MAA.....	ácido metacrílico

MAH.....	anidrido maleico
MALDI-TOF.....	“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight”
MCPDB.....	ditiobenzoato de S-metoxicarbonilfenilmetila
MIT.....	instituto de tecnologia de massachusetts
MMA.....	metacrilato de metila
NHS.....	N-hidroxisuccinimida
NIPAAm.....	N-Isopropilacrilamida
NMP.....	polimerização na presença de nitróxidos
PAA.....	poli(ácido acrílico)
PBMA.....	Poli(metacrilato de butila)
PEG.....	poli(etileno glicol)
PEO.....	poli(óxido de etileno)
PEO-b-PPO-b-PEO.....	poli(óxido de etileno)-b-poli(óxido de propileno)-b-poli(óxido de etileno)
PGA.....	poli(ácido glicólico)
PHA.....	polihidroxialcanoato
PHAs.....	polihidroxialcanoatos
PHB.....	poli-3-hidroxibutirato
PHBHV.....	poli(hidroxibutirato-co- hidroxivalerato)
PHBHV-b-PNIPAAmAA...	poli(hidroxibutirato-co- hidroxivalerato)-b- poli(N-isopropilacrilamida-co-Ácido Acrílico)

PICM.....	micelas de poli íons complexos
PLA.....	poli(ácido láctico)
PLGA.....	poli(ácido glicólico-co-ácido láctico)
PMAA.....	poli(ácido metacrílico)
PNAM.....	poli(n-acriloilmorfolina)
PNIPAA-b-AA.....	poli(N-isopropilacrilamida-b-ácido acrílico)
PNIPAAmAA.....	poli(N-Isopropilacrilamida-co-Ácido Acrílico)
Pt-BMA.....	poli(metacrilato de t-butila)
PTETPA.....	ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico
p-THPP.....	mesotetra(hidroxifenil)porfirina
PTTPA.....	ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico
RAFT.....	polimerização por transferência fragmentação e adição reversíveis
RMN.....	Ressonância Magnética Nuclear
S.....	estireno
SAc.....	4-acetoxiestireno
SMe.....	4-metilestireno
SRP.....	polimerização por radical estável
SSO ₃ Na.....	estireno-4-sulfonato de sódio
STM.....	microscópio de varredura por tunelamento
StySO ₃ Na.....	estirenato sulfonato de sódio

tBA.....	terc-acrilato de butila
TEM.....	microscopia eletrônica de transmissão
Tg.....	temperatura de transição vítrea
THF.....	tetrahidrofurano
UFRGS.....	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VAc.....	acetato d vinila
VBz.....	benzoato de vinila
XMA.....	metacrilato funcional

LISTA DE SÍMBOLOS

$[CTA]$	concentração do CTA (mol/L);
$[CTA]_0$	concentração inicial de monômero
$[M]$	concentração do monômero (mol/L);
$[M]_0$	concentração inicial de monômero
$[M]_t$	concentração de monômero em determinado tempo de reação
$\overline{Mn}$	massa molecular numérica média
A_0	área do sinal referente ao deslocamento correspondente ao próton da dupla ligação no tempo zero (0);
Ac_I	massa de ativo adicionada no início da encapsulação
Ac_N	massa de ativo nas nanopartículas após a liofilização
A_t	área do sinal referente ao deslocamento correspondente ao próton da dupla ligação num tempo conhecido (t).
f	fator de correção da solução de NaOH 1 M;
H_{PI}	número de prótons do padrão interno (6 para o trioxano)
IOH	índice de grupos hidroxila (mg KOH / g de polímero)
m	massa da amostra (g);
MM_{CTA}	massa molecular do CTA (g/mol).
MM_M	massa molecular do monômero (g/mol);
Mn_{exp}	Massa molecular numérica experimental

Mn_t	massa molecular numérica teórica;
N_M	número de moles do monômero;
N_{PI}	número de moles do padrão interno;
p/v	unidade de concentração massa/volume
Pm^*	radical polimérico livre
Pn^*	radical polimérico livre
R^*	radical livre
V_A	volume gasto de NaOH 1 M na amostra contendo polímero (ml);
V_B	volume gasto de NaOH 1 M na prova branca (ml);
X	conversão da reação de polimerização;
$X[\%]$	conversão da reação de polimerização;

SUMÁRIO

Introdução	30
<i>Objetivos</i>	35
<i>Apresentação da Tese</i>	36
Capítulo I: Revisão Bibliográfica	38
1.1. Nanotecnologia	39
1.2. Micro/Nanoencapsulação	43
<i>1.2.1. Métodos de encapsulação</i>	47
<i>1.2.2. Mecanismos de liberação controlada de ativos</i>	48
1.3. Polihidroxicanoatos – PHAs	54
1.4. Polímeros Termossensíveis	58
1.5. Polimerização RAFT	62
1.6. Síntese de copolímeros em bloco	82
1.7. Obtenção de Nanopartículas Inteligentes Empregando Copolímeros em Bloco	92
CAPÍTULO II: MATERIAIS E MÉTODOS	111
2.1. Materiais	112
2.2. Métodos	120
<i>2.2.1. Purificação da n-isopropilacrilamida (NIPAAm)</i>	120
<i>2.2.2. Purificação do Ácido Acrílico (AA)</i>	121
<i>2.2.3. Purificação do 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN)</i>	121
<i>2.2.4. Secagem do THF</i>	121
<i>2.5. Secagem do 1,4-dioxano</i>	122
<i>2.2.6. Obtenção do reagente de Grignard</i>	122
<i>2.2.7. Síntese do ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico (PTETPA)</i>	123
<i>2.2.8. Síntese do ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico (PTTPA)</i>	124
<i>2.2.9. Polimerização via radical livre “viva” (Mecanismo RAFT)</i>	126
<i>2.2.10. Estudo da cinética de polimerização por RMN ¹H</i>	128
<i>2.2.11. Purificação dos polímeros</i>	130
<i>2.2.12. Síntese dos copolímeros em bloco</i>	130
<i>2.2.13. Purificação dos copolímeros em bloco</i>	131
<i>2.2.14. Caracterização dos polímeros</i>	132
<i>2.2.15. Preparação das nanopartículas</i>	134

2.2.16. Caracterização das nanopartículas	134
2.2.17. Encapsulação do Acetato de Dexametasona (AcDex)	135
2.2.18. Ensaios de Liberação controlada “in-vitro”	136
Capítulo III: Síntese dos agentes de transferência de cadeia (CTA) para as polimerizações via RAFT	137
3.1. Introdução	138
3.2. Síntese dos CTAs	138
Capítulo IV: Homopolimerização da NIPAAm e do AA via RAFT	143
4.1. Introdução	144
4.2. Homopolimerização da NIPAAm	144
4.3. Homopolimerização do AA via RAFT	160
Capítulo V: Copolimerização da NIPAAm com o AA via RAFT	162
5.1. Introdução	163
5.2. Influência da razão molar dos monômeros na copolimerização da NIPAAm com ácido acrílico via RAFT	163
5.3. Influência da razão molar [PTETPA]/[AIBN] na copolimerização da NIPAAm com AA	170
5.4. Influência da temperatura da reação na copolimerização da NIPAAm com o AA	173
5.5. Estudo da viabilidade de obtenção de copolímeros em bloco constituídos de NIPAAm e AA via RAFT	175
5.6. Determinação da LCST	178
5.7. Avaliação da influência da temperatura e do pH nas propriedades de soluções aquosas de PNIPAAmAA	180
Capítulo VI: Síntese dos Copolímeros em Bloco constituídos de PHBHV-b-PNIPAAm e PHBHV-b-PNIPAAmAA	184
6.1. Introdução	185
6.2. Síntese dos copolímeros em bloco anfifílicos	185
6.3. Determinação da LCST dos copolímeros em bloco	201
Capítulo VII: Preparação das nanopartículas “inteligentes”	203
7.1. Introdução	204
7.2. Preparação das nanopartículas “inteligentes”	204
Capítulo VIII: Liberação controlada <i>in-vitro</i> do Acetato de Dexametasona	216

8.1. Introdução	217
8.2. Encapsulação e ensaios de liberação	217
CONCLUSÃO GERAL	226
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	230
REFERÊNCIAS	233
Anexo 1:: Determinação da concentração crítica de agregação (CAC)	
Anexo 2: Curvas de DSC	
Anexo 3: Produção Bibliográfica	

Introdução

A ciência e tecnologia da micro/nanoencapsulação constitui um dos exemplos de como a aplicação de uma técnica, em determinado campo pode ser estendida para outros, incluindo o das ciências farmacêuticas. Nos últimos 20 anos, a nanoencapsulação tem se destacado como uma tecnologia por excelência para a compartimentização de substâncias. Esses sistemas possibilitam o isolamento e a manutenção de espécies ativas no interior de partículas, com diâmetro variando de nanômetros até milímetros, dependendo da metodologia utilizada, funcionando como verdadeiros reservatórios de princípios ativos. (FILHO; OLIVEIRA, 1999; KOPEEK; et al., 1992)

Na área farmacêutica, as micro/nanoencapsulações assumem, atualmente, uma das alternativas viáveis para o desenvolvimento de novas formulações, uma vez que possibilitam, de maneira racional e efetiva, o aumento da eficiência terapêutica de substâncias já utilizadas no tratamento de uma grande variedade de doenças. Sistemas micro/nanoparticulados têm sido produzidos para direcionar sistemas coloidais para sítios específicos de ação farmacológica, proporcionando alta concentração do fármaco no órgão ou tecido pretendido. Esta tecnologia tem sido utilizada para a obtenção de formas sólidas de óleos, no mascaramento do sabor e de odores desagradáveis de substâncias ativas (alcalóides e sulfas), na diminuição da volatilização de fármacos líquidos (vitaminas, ácido acetil salicílico, enzimas e hormônios) e na prevenção da incompatibilidade entre as substâncias ativas contidas na mesma formulação. Também tem sido utilizada para tornar materiais tóxicos manipuláveis de maneira segura, para aumentar características de fluxo de materiais sólidos em processos de compressão, para a liberação controlada de fármacos (antibacterianos, antineoplásticos, analgésicos e imunossupressores), no isolamento de tecidos (encapsulação de hemácias e ilhotas de Langerhans), na conservação de sólidos em líquidos (óleos, aromatizantes e vitamina A) e em biotecnologia (diagnósticos, terapia gênica e biossíntese). (FILHO; OLIVEIRA, 1999)

Quando uma dose de um princípio ativo é administrada em um organismo vivo por vias parenteral ou enteral, a concentração do princípio ativo no órgão alvo aumenta até um valor máximo e depois decresce devido ao processo de excreção ou pela conversão metabólica. Para conseguir um nível de concentração de princípio ativo terapeuticamente efetivo e por um tempo maior, são necessárias altas doses do mesmo o que leva a concentração do princípio ativo para um nível próximo da toxicidade. (THROMBRE, 1990)

Na última década, a nanomedicina surgiu como sendo uma nova área dentro da medicina, a qual se utiliza de materiais nanoestruturados para veiculação de drogas, genes e agentes de imagem. Uma das aplicações mais nobres para estes sistemas nanoestruturados é a veiculação de agentes quimioterápicos para o tratamento de câncer. Nesta aplicação, o uso das nanopartículas para veiculação do agente quimioterápico, contorna uma das principais desvantagens deste tipo de tratamento, a falta de toxicidade específica da droga, ou seja, a morte apenas de células doentes localizadas no tumor e não de células de tecidos saudáveis. A idéia de conceber uma droga seletiva que não danifique tecidos saudáveis foi mencionada pela primeira vez por Paul Ehrlich em 1906. Atualmente esta idéia já está sendo colocada em prática clinicamente devido à utilização de materiais nanoestruturados, tais como: lipossomos, nanoconjugados polímero/droga e micelas poliméricas. Entre estes três sistemas, as nanopartículas obtidas a partir de copolímeros em bloco ou micelas poliméricas ganharam grande destaque nos últimos anos. Este sistema foi criado por Helmut Ringsdorf no início da década de 80 e apresenta vantagens muito particulares como tamanho inferior a 200nm, estrutura do tipo núcleo-casca “core-shell”, capacidade de se acumular no interior do tumores, alta estabilidade em meio aquoso em baixas concentrações e possibilidade de utilização de materiais biodegradáveis para sua síntese. (RAPOPORT ; 2007; WEI; et al., 2006; KOHORI; et al., 2002; CHUNG; et al., 1999)

Apesar do sucesso do emprego das micelas poliméricas em sistemas de liberação controlada *in vitro*, *in vivo* e em testes clínicos, existe um número relevante de problemas como, por exemplo, a liberação prematura do ativo da nanopartícula durante a circulação ou uma taxa de liberação do ativo no tumor inadequada para o tratamento da doença. No primeiro caso, a solução está no estudo da estabilidade da nanopartícula no meio aquoso ou utilização de segmentos hidrofóbicos no copolímero de bloco que compõe a nanopartícula. No segundo problema a utilização de materiais estímulo-resposta pode contribuir de maneira decisiva para solucionar esta dificuldade. Neste caso, materiais sensíveis a estímulos externos (físicos ou químicos) permitirão modular a taxa de liberação do ativo do interior das nanopartículas em concentrações terapêuticas e no local mais adequado ao tratamento. (NA; et al., 2006) Existem diferentes tipos de estímulos, tais como: temperatura (CAMMAS; et al., 1992; YOSHIDA; et al., 1990; SERRES; et al., 1996), pH (OKATATA; et al., 1982), pressão (TANAKA; et al., 1998) e campo elétrico (EISENBERG; GRODZINSKY, 1984). Para as nanopartículas se tornarem sensíveis, reações de modificação e enxertia em sua superfície podem ser realizadas, visando a obtenção de partículas com polaridades diferentes (aniônica e catiônica) e até mesmo partículas com morfologia núcleo-casca (core-shell) do tipo cabeleira (hairy-layer), obtidas por meio da autoagregação de copolímeros em bloco ou copolímeros enxertados anfifílicos, conferindo propriedades específicas tais como sensibilidade ao pH e à variação de temperatura (partículas termo-pH-sensíveis). (TANIGUCHI, et al., 2003; GIL, e HUDSON, 2004; RODRÍGUES-HERNÁNDES, et al., 2005; KATAOKA, et al., 2001) Várias metodologias estão sendo utilizadas para a síntese de nanopartículas estímulo-resposta empregando copolímeros em bloco. Dentre estas metodologias pode-se citar o processo de diálise, no qual um copolímero de bloco anfifílico é solubilizado em um solvente para ambos os segmentos do bloco e dialisado em água para formação da nanopartícula. (ALLEN; MAYSINGER;

EISENBERG; 1999) Os copolímeros em bloco mais utilizados são formados por segmentos hidrofóbicos biodegradáveis e biocompatíveis ligados quimicamente a segmentos hidrofílicos biocompatíveis, geralmente poli (etileno glicol) (PEG). (RAPOPORT; 2007) Outros materiais hidrofílicos já foram empregados na síntese de copolímeros em bloco anfifílicos como, poli(N-vinil-2-pirrolidona), (LELE; LEROUX, 2002) poli(2-etil-2-oxazolina), (KIM; et al., 2000) poli(ácido acrílico), (ZHANG; EISENBERG; 1995) poli (N-isopropilacrilamida) (RAPOPORT, 2007; ALARCON; et al. 2005)

Um problema na utilização de nanopartículas poliméricas para a veiculação e a liberação de princípios ativos é a sua biodegradabilidade, uma vez que elas são ingeridas ou aplicadas em seres vivos, precisando ser “digeridas” e excretadas pelo organismo. Na prática, copolímeros de ácido glicólico com ácido láctico, ou seja, poli(ácido glicólico-co-ácido láctico) (PLGA) são os mais utilizados devido a sua aprovação para uso em humanos, fácil processabilidade e a possibilidade de controle da taxa de degradação. No entanto, a busca por alternativas de materiais biodegradáveis levou ao desenvolvimento ou descoberta de novos materiais biodegradáveis, tais como: polidioxanona, policaprolactona, poliésteres “bacterianos” (polihidroxialcanoatos), poliuretanos, polianidridos, polímeros degradáveis enzimaticamente como, poli(amino ácidos) (ex. colágeno, albumina, elastina) e polissacarídeos como a quitosana. (NAIR; LAURENCIN, 2007)

Objetivos

O objetivo principal desta tese foi estudar uma rota química para a síntese de copolímeros em bloco anfifílicos e a preparação de nanopartículas sensíveis a variação de temperatura e pH, pelo método de auto-agregação. Para isso, foi utilizado como segmento

hidrofóbico o Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBHV), copolímero da família dos polihidroxialcanoatos, biodegradável e biocompatível, obtido pela fermentação de insumos de fontes renováveis empregando tecnologia brasileira. PHBHV, com diferentes massas moleculares e funcionalizados com grupos terminais hidroxila, foram utilizados nas sínteses dos copolímeros em bloco. Como segmento hidrofílico foram utilizados a Poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) e Poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) (PNIPAAmAA) com diferentes massas moleculares, obtidas por um novo mecanismo de polimerização via radical livre “viva”, o mecanismo por transferência de cadeia, via fragmentação e adição reversíveis (RAFT). Essas nanopartículas termo-pH-sensíveis foram empregadas nos estudos de liberação controlada de um ativo modelo, o acetato de dexametasona, sob condições controladas de temperatura e pH.

Apresentação da Tese

Os resultados obtidos neste trabalho de tese estão apresentados na forma de 6 (seis) capítulos, compreendendo um capítulo com o estado da arte para os principais temas deste trabalho, como nanotecnologia, polímeros termosensíveis e os polialcanatos, polimerização radicalar controlada do tipo RAFT e a tecnologia de preparação de nanopartículas “inteligentes” obtidas a partir da micelização de copolímeros de bloco anfifílicos.

O segundo capítulo apresenta a metodologia adotada para realização das diferentes etapas deste trabalho: preparação de agentes de transferência de cadeia (CTA) para a polimerização via RAFT, polimerização via RAFT da NIPAAm e do AA, síntese de copolímeros em bloco pela reação de acoplamento entre o PHBHV e a PNIPAAm ou

PNIPAAmAA, a preparação das nanopartículas termo-pH-sensíveis e finalmente a encapsulação de um ativo modelo pelos copolímeros de bloco.

No terceiro capítulo estão demonstrados os resultados obtidos na síntese dos agentes de transferência de cadeia (CTA), que foram utilizados como agentes de controle de polimerização via RAFT na síntese dos polímeros sensíveis a temperatura e pH. Os agentes de transferência de cadeia sintetizados neste trabalho foram, o ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico (PTETPA) e o ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico (PTTPA).

O quarto e o quinto capítulo foram elaborados com os resultados do estudo da homopolimerização da NIPAAm e do AA via RAFT e da copolimerização da NIPAAm com o AA pelo mesmo mecanismo. Nestes estudos foram avaliados diferentes parâmetros de reação, tais como: estrutura química do CTA, tipo de solvente, razão monômero/CTA, razão CTA/iniciador, razão NIPAAm/AA e temperatura de reação.

Os resultados de síntese dos copolímeros em bloco anfifílicos constituídos de PHBHV e PNIPAAm ou PNIPAAmAA estão apresentados no sexto capítulo desta tese.

Finalmente, a preparação das nanopartículas obtidas com os copolímeros em bloco de PHBHV-b-PNIPAAm ou PHBHV-b-PNIPAAmAA esta apresentada no sétimo capítulo, bem como a utilização destes copolímeros em bloco para encapsulação, pela técnica de autoagregação, de um ativo modelo, o acetato de dexametasona, e sua liberação controlada por estímulos externos, como temperatura e pH, são apresentados no último capítulo desta tese.

O manuscrito é finalizado com a apresentação das conclusões gerais e a apresentação de sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo I

Revisão Bibliográfica

1.1. Nanotecnologia

A nanociência é o estudo e manipulação dos materiais quando reduzidos a partículas cujos tamanhos encontram-se na casa do nanômetro ou milionésimo do milímetro – número cem mil vezes menor do que o diâmetro de um fio de cabelo. Em média, um átomo mede de 0,2 a 0,4 nanômetro, logo uma outra definição pode ser dada para a ciência, por tratar-se da capacidade de manipular átomos e moléculas de forma a dar aos materiais propriedades diferentes das que eles apresentam em seu estado natural.(Sant’Anna, 2005) Para que a nanociência seja melhor compreendida, Henrique Toma exemplifica de que forma diferentes estruturas moleculares podem alterar as características de uma substância. Ele cita o caso da concha do mar e do giz. “Os dois são feitos de carbonato de cálcio, no entanto, a concha tem uma estrutura molecular diferente e é 30 mil vezes mais dura do que o giz. (SANT’ANNA, 2005)

Apesar da ciência estudar os elementos da matéria por várias décadas e a partir deste estudo acumulado entender e controlar o comportamento macroscópico dos materiais, a manipulação de átomos/moléculas em escala nanométrica só foi idealizada recentemente e ganhou destaque após uma palestra proferida na *American Physical Society*, em 29 de dezembro de 1959, por Richard Feynman, ganhador de dois prêmios Nobel.(DREXLER, 1990; DREXLER, 1991; DREXLER,1992) A Tabela 1.1 apresenta os principais eventos históricos em nanotecnologia.

Tabela 1.1 - Principais eventos históricos em nanotecnologia.
(Adaptada de DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006)

Ano	Fato importante na nanotecnologia
1959	Richard Feynman proferiu a palestra <i>There's a plenty of room at the bottom</i> para a <i>American Physical Society</i> , no Instituto de Tecnologia da Califórnia (EUA).
1974	O pesquisador da Universidade de Tóquio, Norio Taniguchi, atribui o nome nanotecnologia ao campo da engenharia em escala submicrométrica.
1981	O microscópio de varredura por tunelamento (STM) foi inventado pelos pesquisadores da IBM, Gerd Binnig e Henrich Röhrer.
1981	Primeiro artigo científico publicado sobre nanotecnologia por K. Eric Drexler, pesquisador do Instituto de Tecnologia de Massachusetts - MIT O Instituto <i>Foresight</i> é criado para auxiliar no desenvolvimento e promoção da nanotecnologia, promovendo muitas conferências sobre nanotecnologia
1986	Publicação do livro <i>The engines of creation</i> por K. Eric Drexler, com teorias que ainda continuam revolucionando a nanotecnologia.
	Invensão do microscópio de força atômica (AFM), também pelos pesquisadores da IBM, Gerd Binnig e Henrich Röhrer
1996	Richard Smalley desenvolve um método de produção de nanotubos de diâmetros uniformes
1997	A primeira empresa em nanotecnologia é criada – a Zyvex
1997	Primeiro dispositivo nanomecânico baseado na estrutura da molécula de DNA é criado por Ned Seeman
1999	Os cientistas Mark Reed e James M. Tour criam um interruptor (chave) do “computador molecular” usando uma única molécula
2000	Pesquisadores da Universidade de Rice desenvolveram métodos de transformação de nanotubos de carbono em estruturas rígidas multicomponentes
2001	Pesquisadores da IBM desenvolveram métodos para o crescimento de nanotubos de carbono

Na escala nanométrica surgem novos fenômenos que não aparecem em escala macroscópica. As mudanças mais importantes de comportamento são causadas não apenas pela ordem de magnitude da redução de tamanho, mas por novos fenômenos intrínsecos,

observados ou que se tornam predominantes em nanoescala. (NICOLAU; et. al., 2000; RIETH, 2003; GALEMBECK, 2003)

À medida que os corpos diminuem de tamanho, a força gravitacional, o atrito e a combustão diminuem sua influência, enquanto novas forças, como a força eletrostática ganham destaque. Na escala nanométrica a força de atração eletrostática entre dois prótons é cerca de 10^{36} vezes maior que a força gravitacional. (FISHBINE, 2002; ROCCO, 1995; ROCO; BAINBRIDGE, 2001; ROCO; et al., 1999; SEEMAN, 2003) A Tabela 1.2 apresenta as forças dominantes em diferentes escalas.(FISHBINE, 2002; ROCO; et al., 1999)

**Tabela 1.2 – Forças que atuam nas diferentes escalas dos materiais.
(Adaptada de DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006)**

Unidade de Medida	Do tamanho de	Efeitos predominantes
Metro	Criança pequena, bicicleta	Gravidade, atrito, combustão
Centímetro	Polegar Humano, Moedas	Gravidade, atrito, combustão
Milímetro	Grão de açúcar	Gravidade, atrito, combustão, força eletrostática
Micrômetro	1/40 do diâmetro do fio de cabelo	Força eletrostática, van der Waals, movimento browniano
Nanômetro	Comprimento de uma fila de 5 a 10 átomos	Força eletrostática, van der Waals, movimento browniano, mecânica quântica
Angstrom	1 átomo, 10 vezes o comprimento de onda de um elétron	mecânica quântica

A Figura 1.1 apresenta algumas possibilidades de aplicação dos nanomateriais em diferentes áreas da ciência.

Figura 1.1: Diferentes áreas de aplicação da nanotecnologia. (Adaptado de INOVABRASIL, 2007)

Levando-se em conta apenas os recursos oriundos das esferas estatais, as verbas cresceram mundialmente de US\$ 400 milhões em 1997 para US\$ 4 bilhões em 2004.(SANT'ANNA, 2005) No ano de 2005, foram vendidos, em todo o mundo, US\$ 30 bilhões em produtos que incorporam nanotecnologia, segundo a empresa de pesquisas Lux Research. Em 2014, o montante deve alcançar US\$ 2,6 trilhões, o equivalente a 15% de todos os produtos manufaturados que serão comercializados no mundo. A nanotecnologia apresenta

uma oportunidade para países em desenvolvimento darem um salto, afirmou o presidente da Lux Research, Peter Hebert. A Turquia já elegeu a nanotecnologia como uma prioridade para seu desenvolvimento, no lugar de tentar mercados mais maduros, como a informática e a biotecnologia. (CRUZ, 2006) No Brasil os investimentos na área de nanotecnologia foram de aproximadamente R\$ 150 milhões até o ano de 2007.(PLANTÃO INFO, 2007)

1.2. Micro/Nanoencapsulação

O conceito de microcápsula surgiu da idealização do modelo celular. Neste conceito, a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce ao mesmo tempo outras funções, como controlar a entrada e saída de material da célula. De modo semelhante, a microcápsula consiste, em geral, em uma camada de polímero que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa e evitando os efeitos de sua exposição inadequada. Essa membrana desfaz-se sob estímulos específicos, liberando a substância em locais específicos ou na taxa mais adequada ao tratamento. Uma outra possibilidade de encapsulação, além das cápsulas, é a formação de microesferas. Neste segundo caso, o material ativo encontra-se disperso em uma matriz sólida de polímero. (RÉ, 2000)

Os primeiros registros de tentativas de aplicação da microencapsulação datam dos anos 30, mas o primeiro produto com material microencapsulado surgiu em 1954. A empresa norte-americana *National Cash Register* foi a pioneira, ao comercializar um produto contendo material microencapsulado, um papel de cópia sem carbono, que revolucionaria a indústria de formulários. Esse papel recebia uma fina camada de microcápsulas (ou melhor, partículas menores que 20 micra, ou 20 milésimos de mm) contendo um revestimento incolor. Tal camada era recoberta com um reagente também incolor. A pressão da ponta do lápis na

superfície do papel rompia as microcápsulas, liberando a tinta incolor que, ao entrar em contato com o reagente, tornava-se colorida, produzindo em outra folha uma cópia idêntica ao que estava sendo escrito no primeiro papel. (RÉ, 2000)

As primeiras pesquisas na área farmacêutica, realizadas pela Universidade de Wisconsin (Estados Unidos), também datam dos anos 50. As microcápsulas são usadas principalmente para aumentar a estabilidade de uma droga, para modificar ou retardar sua liberação em locais específicos de ação. Substâncias antiinflamatórias, por exemplo, podem ter seu tempo de atuação no plasma sanguíneo aumentado pela microencapsulação, prolongando seu efeito no organismo. (RÉ, 2000)

O sucesso do processo de micro/nanoencapsulação levou muitos cientistas a aplicar esta tecnologia nas áreas gráfica, farmacêutica, agricultura, indústria de alimentos, produtos domésticos, entre outras. Na área farmacêutica, a micro/nanoencapsulação assume, na atualidade, uma das alternativas viáveis para o desenvolvimento de novas formulações, uma vez que possibilita, de maneira racional e efetiva, aumentar a eficiência terapêutica de substâncias já utilizadas no tratamento de diversas doenças. (FILHO; OLIVEIRA, 1999)

Inicialmente, micropartículas eram produzidas com tamanhos variando de 5 μm até 2 mm. Entretanto, desde de 1980, uma segunda geração de sistemas microparticulados de dimensões menores vem sendo desenvolvidos. Esses sistemas incluem nanopartículas (10 - 1000 nm de diâmetro) e micropartículas (1 - 10 μm de diâmetro). Outros sistemas capazes de encapsular substâncias ativas são os lipossomas e as microemulsões. (FILHO; OLIVEIRA, 1999)

A microencapsulação foi utilizada como modelo para o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas, agora em escala nanométrica, permitindo a fabricação de sistemas nanoparticulados. A descoberta dos lipossomas nos anos 60 veio aumentar a variedade de

ferramentas para o desenvolvimento da nanotecnologia farmacêutica com sistemas lipídicos para vetorização de fármacos. Nos anos 90 surgiram os nano-sistemas mais sofisticados revestidos por polímeros hidrofílicos, denominados sistemas furtivos, que permitem um tempo de circulação maior no organismo. Além dos sistemas furtivos, sistemas contendo moléculas sinalizadoras nas superfícies das nanopartículas, denominados sítio-específicos, foram desenvolvidos com a finalidade do direcionamento específico de fármacos para células alvo (PIMENTEL; et al., 2007).

A Figura 1.2 apresenta uma classificação genérica dos tipos de nanopartículas empregadas em liberação controlada de fármacos. (LETCHFORD; BURT, 2007)

Figura 1.2: Tipos de nanopartículas empregadas em sistemas de liberação controlada. (Adaptada de LETCHFORD; BURT, 2007)

Fármacos, quando encapsulados no interior de matrizes poliméricas, não estão prontamente disponíveis para o sistema biológico como quando em solução. Assim, o polímero tem que dissolver ou desintegrar para que o fármaco possa ser liberado, ou então o fármaco tem que dissolver e/ou difundir do interior da matriz. De qualquer modo, a liberação do fármaco para o meio fisiológico é estendida a um tempo muito maior comparado ao fármaco na sua forma livre, sendo esta característica um dos principais fatores para a pesquisa e desenvolvimento de sistemas microparticulados. (FILHO; OLIVEIRA, 1999)

Uma aplicação conhecida em farmácia é a redução da irritação gastrointestinal conseguida pela encapsulação de ativos, como o ácido acetilsalicílico (aspirina). Nesse caso, uma liberação constante é conseguida pelo revestimento deste ativo com etilcelulose. Também para atenuar os efeitos nocivos de medicamentos que contenham componente agressivo à mucosa estomacal, costuma-se encapsulá-lo usando como membrana material resistente ao meio ácido e que só se decompõe em pH alcalino. Dessa forma, a cápsula passa pelo estômago sem se romper, permitindo a absorção do ativo apenas no intestino. Mascara odor e/ou sabor desagradáveis de princípios ativos e proteção de ativos higroscópicos também são outras aplicações do processo de encapsulação na indústria farmacêutica. (SOUZA, 2000)

1.2.1. Métodos de encapsulação

Os métodos mais comuns de obtenção de microencapsulados são listados na Tabela 1.3:

Tabela 1.3: Métodos de obtenção de microencapsulados. (Adaptada de BENITA, 1996)

Métodos Físicos (empregando polímero pré- formado)	Métodos Físico-Químicos (empregando polímero pré- formado)	Métodos Químicos
<i>"Spray-drying"</i>	Coacervação Simples	Polimerização interfacial
<i>"Spray-chilling"</i>	Coacervação Complexa	Polimerização <i>"in-situ"</i>
Leito fluidizado	Emulsificação e evaporação de solvente	
Deposição eletrostática	Gelificação iônica/térmica	
Extrusão centrífuga	Incompatibilidade polímero- polímero	
Separação rotacional de suspensões		
Centrifugação multiorifício		
Revestimento em turbinas		
Dessolvatação em meio líquido		

Vários dos métodos apresentados na Tabela 1.3, já são aplicados em escala industrial, como *"spray-drying"*, coacervação simples e complexa, polimerização interfacial, entre outros. No entanto, vários desses métodos não são eficientes na preparação de nanoencapsulados, podendo citar como exemplo os métodos de *"spray-drying"*, processos de coacervação ou leito fluidizado. Desta forma, é importante mencionar quais são os métodos mais empregados em nanoencapsulação. Estes métodos também podem ser divididos em duas classes, sendo a primeira aquela em que, durante o processo de formação das nanopartículas ocorre uma reação de polimerização; na segunda classe, a nanopartícula é formada por um processo físico-químico, empregando um polímero pré-formado. Os métodos que envolvem

reações de polimerização são divididos em polimerização em emulsão (inversa ou aquosa), polimerização radicalar interfacial e policondensação interfacial. Os métodos físicos são: emulsão/evaporação de solvente, deslocamento de solvente, deposição interfacial, “salting-out”, emulsão/difusão de solvente, dessolvatação de macromoléculas e técnicas de nebulização. (REIS; et al., 2006)

1.2.2. Mecanismos de liberação controlada de ativos

Os sistemas de liberação controlada podem ser classificados em diferentes classes, destacando-se: sistemas controlados por difusão, sistemas ativados por solvente, sistemas controlados quimicamente. Nos sistemas difusivos, o ativo pode estar armazenado de duas formas diferentes: em reservatórios (micro/nanocápsulas) ou em uma matriz (micro/nanoesferas). Neste tipo de sistema de liberação controlada o ativo irá difundir do interior da partícula e as características físico-químicas do ativo e do polímero é que irão governar o perfil da liberação controlada. O controle difusivo pode ser otimizado com a utilização de materiais estímulo-respostas, que por meio de estímulos de temperatura, pH, força iônica, força elétrica, compostos químicos, enzimas e ultrassom aumentam ou diminuem a difusão do ativo pela matriz polimérica. (BENITA, 1996)

Nos sistemas controlados pelo solvente o mecanismo de liberação pode ocorrer por dois tipos: pressão osmótica ou intumescimento da matriz e liberação do ativo. No processo controlado por pressão osmótica o solvente penetra a camada semipermeável que recobre o ativo e por gradiente de concentração o ativo é liberado. Nos processos de intumescimento a matriz absorve grande quantidade de solvente, sem se solubilizar, e facilita a liberação do

ativo. Nestes sistemas também podem ser associados os materiais estímulo-respostas. (BENITA, 1996)

A liberação controlada por mecanismos químicos, envolvem basicamente a quebra de ligações químicas da matriz polimérica, a erosão/degradação, ou a quebra de ligação entre o ativo e o polímero que serve como veículo. Na erosão/degradação o ativo é exposto pela matriz polimérica por meio de erosões ou processos de biodegradação, criando canais no interior da matriz polimérica que permitem a entrada do solvente, disponibilizando o ativo para meio externo. (BENITA, 1996)

É importante lembrar que em algumas situações os mecanismos que controlam a liberação do ativo podem ser uma associação de diferentes mecanismos, como por exemplo, a erosão e a difusão. (BENITA, 1996)

No desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, o polímero utilizado tem uma função muito importante na disponibilização ou liberação da droga. (PORTE, et al., 1994).

A diferença entre erosão e biodegradação é estabelecida com base no mecanismo de degradação da macromolécula. A erosão da matriz polimérica resulta em perda de massa em nível macroscópico, sem alteração das unidades macromoleculares, que pode ocorrer de dois modos diferentes: por quebra de ligações intermoleculares em sistemas reticulados, onde a matriz é gradualmente erodida a partir da superfície externa ou pela hidrólise de grupos laterais à cadeia principal, resultando em dissolução do polímero sem redução de seu peso molecular (PORTE; et al., 1994).

Polímeros biodegradáveis são aqueles em que a quebra das cadeias resulta em unidades monoméricas que podem ser eliminadas pelas vias metabólicas normais e essa quebra das cadeias pode ocorrer por ação de hidrólise (degradação hidrolítica) ou de enzimas (degradação enzimática). Sistemas erosivos ou degradáveis e, mais particularmente, aqueles que se

degradam em meio biológico (biodegradáveis) têm encontrado grande utilidade no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada. (LIMA; et al., 1999).

A eliminação natural de um polímero após liberação total do ativo tem a vantagem de dispensar o inconveniente de acúmulo de polímero no organismo. Sendo assim, sistemas micro e nano-estruturados biodegradáveis e biocompatíveis (microesferas, microcápsulas, nanocápsulas e nanoesferas) têm sido desenvolvidos para liberação controlada de drogas (SOPPIMATH; et al., 2001; BENOIT; et al., 1996). O papel do polímero na formulação (modulação) desses sistemas de liberação controlada é muito diferente do papel de um excipiente inerte em formulações farmacêuticas. O polímero influencia não apenas na cinética de liberação do agente ativo como esperado, mas também na estabilidade da droga, na toxicidade e na compatibilidade com o organismo vivo (ANDERSON; et al., 1997).

Várias famílias de biopolímeros estão sendo utilizadas nos sistemas de liberação controlada de ativos, sendo elas: poliésteres, como poli(ácido lático), poli(ácido glicólico), poli(ácido lático-co- ácido glicólico) e PHBHV; poliamidas, polissacarídeos, como amido e hidroxipropilmetilcelulose; poli(alquilcianoacrilato), polianidridos, poli(ortoesters), poli(amino ácidos) e polifosfazenos.(SHUKLA; 2001)

A Tabela 1.4 apresenta os métodos de preparação de nanopartículas, os polímeros mais utilizados e os ativos encapsulados.

Tabela 1.4 - Métodos de preparação de nanopartículas, polímeros mais utilizados e ativos encapsulados.
(Adaptado de REIS; et al., 2006) Continua

Polímero	Material encapsulado	Diâmetro de nanopartícula [nm]
Polimerização em emulsão aquosa		
Poli(metacrilato de metila)	Antígeno Influenza	130
Poli(metacrilato de metila) e seus copolímeros	Doxorubicina	300
Poli(metilcianoacrilato)	Vinblastina	200-300
Poli(etilcianoacrilato)	Insulina	<500
Poli(butilcianoacrilato)	Progesterona	250
Poli(isobutilcianoacrilato)	Ampilicilina	40-80
	Anticorpos	120
	hGRF	140-170
Poli(hexilcianoacrilato)	Vincamina	200
Poli(isohexilcianoacrilato)	Ampilicilina	30-80
	Doxorubicina	
Poli(malonato de dialquilmetilideno)	Primaquina	<1000
Polimerização em emulsão inversa ou orgânica		
Poliacrilamida	Enzimas	<1000
Poli(metilcianoacrilato)	Triamcinolona	500
	Fluoresceína	800-1000
	Pilocarpina	300-600
Outros polímeros: Poli(etilcianoacrilato), poliestireno, polivinilpiridina e poliactoleína		
Polimerização Interfacial		
Poli(etilcianoacrilato)	Insulina	~151

Tabela 1.4 - Métodos de preparação de nanopartículas, polímeros mais utilizados e ativos encapsulados. (Adaptado de REIS; et al., 2006) Continuação

Poli(isobutilcianoacrilato)	Indometacina	220-240
	Darodipina	150
	Insulina	150-300
	Calcitonina	<1000
	Octreotide	260
Poli(isohexilcianoacrilato)	Ftalocianinas	180
Outros Polímeros: Poliamidas, Polifenilésteres e Poliuretanos		
Policondensação Interfacial		
Poliuretano e Poliéteruretano	α Tocoferol	<500
Evaporação de Solvente		
Poli(ácido láctico)	Testosterona	<1000
	Albubina	100 ou 120
	Loperamida	~300
Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)	DNA	~100
	Cicloporina A	~300
Outros Polímeros: Poli(ϵ -caprolactona) e Poli(β -hidroxibutirato)		
Deslocamento de Solvente		
Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)	Indometacina	~168
	Doxorubicina	274
	Cicloporina A	~170
	Ácido Valpoico	~166
	Cetoprofeno	~167
	Vancomicina	~187
	Insulina	~105-170

Tabela 1.4 - Métodos de preparação de nanopartículas, polímeros mais utilizados e ativos encapsulados. (Adaptado de REIS; et al., 2006) Continuação

Poli(ácido lático)	Doxorubicina	270
	Taxol	~260
	Dexametasona	~300
	Vitamina K	~270
	Cicloporina A	~100-200
Outros Polímeros: β -ciclodextrina		
Deposição Interfacial		
Poli(ácido lático)	Indometacina	230
“Salting-Out”		
Poli(ácido lático)	Saxoxepina	<1000
Outros Polímeros: Poli(alquilmetacrilato) e etilcelulose		
Emulsão/Difusão de Solvente		
Poli(ácido lático-co-ácido	p-THPP	117-118
glicólico)	Doxorubicina	<1000
Poli(ácido lático)	p-THPP	125
	DNA	<300
Outros Polímeros: Poli(ϵ -caprolactona)		
Desolvatação de Macromoléculas*		
Gelatina	DNA	<1000
	Citostáticos	
Outros Polímeros: Caseína, Albumina e etilcelulose		

Tabela 1.4 - Métodos de preparação de nanopartículas, polímeros mais utilizados e ativos encapsulados. (Adaptado de REIS; et al., 2006) Conclusão

Técnicas de Nebulização		
Poli(ácido láctico)	Insulina	400-600

hGRF: Hormônio de Crescimento Humano; p-THPP: mesotetra(hidroxifenil)porfírina.

*Induzida por aquecimento, mudança de pH, sais, solventes orgânicos, complexos com macromoléculas, sonificação ou reticulação química

1.3. Polihidroxialcanoatos – PHAs

Os polímeros bacterianos, denominados polihidroxialcanoatos (PHAs), constituem uma categoria de poliésteres de ácidos hidroxi-alcanóicos, biodegradáveis, que podem ser obtidos a partir de fontes de carbono renováveis, sendo produzidos por diversas bactérias, como material de reserva, na forma de grânulos intracelulares (KREUTER, 2001). O seu acúmulo se dá no citoplasma da célula sob a forma de grânulos de 0,2-0,5 µm de diâmetro e sua função se assemelha ao glicogênio sintetizado e estocado pelos mamíferos (CHANDRA; et al., 1998). As diferentes propriedades dos PHAs derivam do seu grupo constituinte R, podendo variar de um material duro e quebradiço até amorfo ou elastomérico, como é apresentado na Figura 1.3.

$$R = -(CH_2)_x - CH_3 \rightarrow X = 0 \text{ a } 8 \text{ ou mais}$$

Figura 1.3. Estrutura dos polihidroxialcanoatos.

A primeira observação de polihidroxicanoatos da qual se tem conhecimento foi no início do século XX (MEYER, 1903), acumulados em bactérias *Azotobacter chroococcum*, na forma de inclusões lipídicas, solúveis em clorofórmio (MEYER, 1903). Só mais tarde, a composição química dessas inclusões foi determinada por LEMOIGNE e seus colaboradores (LEMOIGNE; et al., 1926) e identificada como poli-3-hidroxi-3-butenato (PHB). A estrutura do PHB é mostrada na Figura 1.4.

Figura 1.4. Estrutura do poli-3-hidroxi-3-butenato (PHB) (LEMOIGNE; et al., 1926).

Até o final dos anos 50, alguns estudos com bactérias produtoras dessas inclusões mostraram que o PHB era estocado como fonte de reserva de carbono e energia (WILLIAMSON; et al., 1958; MACRAE; et al., 1958). Na sequência dos estudos que se intensificaram para o entendimento das funções do PHB no metabolismo das células produtoras, foi publicada a primeira revisão científica sobre esse biopolímero, comparando a sua função à da gordura nos seres humanos (DAWES; et al., 1973). Até aquele momento, PHB era o único polihidroxicanoato conhecido Wallen; et al., (1974) reportaram a identificação de outras unidades do tipo hidroxí-ácido (HA), dentre elas, a unidade 3-hidroxi-3-pentenoato (3HP). Desta forma, foi identificado o copolímero poli-3-hidroxi-3-butenato-co-3-hidroxi-3-pentenoato (PHBHV). A estrutura do PHBHV é mostrada na Figura 1.5.

Figura 1.5. Estrutura do poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBHV). (WALLEN; *et al.*, 1974).

Desde a descoberta do PHB, foram encontrados mais de 90 gêneros de *archae* e *eubactérias* capazes de produzir PHAs em diferentes meios de cultivo (STEINBUCHER, 1991; FINDLAY; WHITE, 1983). Atualmente os PHAs são divididos em três classes: PHAs formados por monômeros com 3-5 átomos de carbono, PHAs formados por monômeros com 6-14 átomos de carbono e PHAs formados por monômeros com mais de 14 átomos de carbono (LEE, 1996).

O PHB e seus copolímeros podem ser usados como matérias-primas em um amplo campo de aplicações, principalmente naqueles setores em que características como pureza e biodegradabilidade são necessárias. Eles podem ser usados na fabricação de embalagens para produtos de limpeza e higiene, cosméticos e produtos farmacêuticos. Também servem para produzir vasilhames para fertilizantes e defensivos agrícolas, vasos para mudas e produtos injetados, como brinquedos e material escolar. Além disso, por serem biocompatíveis e facilmente absorvidos pelo organismo humano, podem ser empregados na área médico-farmacêutica, prestando-se à fabricação de cápsulas que liberam gradualmente medicamentos na corrente sanguínea (VASCONCELOS, 2002).

Alguns pesquisadores já demonstraram a viabilidade de utilização dos PHAs em sistemas de liberação controlada. Sendil; *et al.*, (1999) utilizaram PHBHV para encapsular e veicular tetraciclina na forma ácida e na forma neutra. Lionzo; *et al.*, (2007), utilizaram

PHBHV para formação de blendas com policaprolactona e encapsular acetato de dexametasona. As micropartículas foram preparadas pelo método de emulsão e evaporação de solvente.

A síntese de copolímeros em bloco a partir de PHAs e sua utilização em sistemas de nanoencapsulação de fármacos ainda foi muito pouco explorada. Alguns trabalhos encontrados na literatura relatam a síntese de copolímeros em bloco tendo como base os PHAs (LI; et al., 2006; CHEN; et al., 2006; ARSLAN; MENTES; HAZER, 2004; ARSLAN; HAZER; KOWALCZUK, 2002). No entanto, nenhum destes trabalhos exploraram a idéia de associar as propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade com os polímero estímulo-resposta, na forma de blocos, e, além disso, empregar este novo material na encapsulação de fármacos ou outras substâncias ativas.

1.4. Polímeros Termosensíveis

As proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos são biopolímeros que fazem parte fundamental dos organismos vivos e apresentam propriedades muito particulares de responderem a estímulos físicos ou químicos provocados no meio onde se encontram. Esta propriedade dos biopolímeros baseia-se em interações cooperativas, as quais podem provocar forças significativas em resposta a uma pequena mudança do meio. No entanto, a obtenção e industrialização destes biopolímeros são difíceis e com isso, o desenvolvimento de polímeros sintéticos que imitem as funcionalidades destes biopolímeros ganharam grande destaque nos últimos anos. Este novo campo de pesquisa objetiva a preparação de polímeros sintéticos que “imitem” as propriedades dos biopolímeros, isto é, resposta física ou química a um estímulo externo intencionalmente provocado. A idéia de criar polímeros sintéticos que respondam de maneira controlada a um estímulo externo, deu origem a uma nova classe de polímeros, “polímeros estímulo-resposta”, “polímeros inteligentes” ou “polímeros ativos” (OKANO, 1998; OSADA; KHOKHLOV, 2002; GUPTA; et al., 2002; JEONG; GUTOWSKA, 2002; GIL; HUDSON, 2004).

Os polímeros estímulo-resposta são definidos como aqueles que sofrem uma mudança, lenta ou rápida, química ou física em resposta a um estímulo externo. Os estímulos podem ser classificados em químicos e físicos. Como estímulos químicos, podemos citar o pH, a concentração iônica e aqueles provocados por agentes químicos. Os estímulos físicos são temperatura, campo elétrico ou magnético e força mecânica (GIL; HUDSON, 2004). A resposta desses polímeros inteligentes pode ser utilizada em diversas aplicações, tais como: sistemas de liberação de ativos (GUPTA; et al., 2002; JEONG; GUTOWSKA, 2002; QUI; PARK, 2001; SERSHEN; WEST, 2002; YOKOYAMA, 2002; CHILKOTI; et al., 2002),

biotecnologia (JEONG; GUTOWSKA, 2002; GALAEV; MATTIASSON, 2000; SHARMA; et al., 2003) e cromatografia (KIKUCHI; OKANO, 2002; KOBAYASHI; et al., 2002; ANASTASE-RAVION; et al., 2001). Alguns sistemas poliméricos inteligentes podem ser desenvolvidos para que respondam a mais de um estímulo simultaneamente, como temperatura e pH e recentemente, uma nova categoria de estímulo foi descoberta, a resposta bioquímica a antígenos, enzimas, ligantes e agentes bioquímicos (PINKRAH; et al., 2003; PENG; CHENG, 2001; BIGNOTTI; et al., 2000; GAN; et al., 2000; HOFFMAN; et al., 2000).

A temperatura é o estímulo mais utilizado nos sistemas de polímeros inteligentes. A mudança de temperatura não é simples de ser controlada, porém pode ser aplicada tanto *in vitro* como *in vivo* (GIL; HUDSON, 2004). Por exemplo, os polímeros termosensíveis, como a PNIPAAm e seus copolímeros têm sido utilizados para a distribuição e liberação seletiva de drogas (OKANO; et al., 1990). PNIPAAm é um polímero solúvel em água, porém, coalesce neste solvente quando a solução é aquecida acima de 32°C, temperatura que neste caso é denominada de temperatura inferior crítica de solução (LCST) (HESKINS; GUILLET, 1968). Esta separação de fase reversível ou precipitação do polímero ocorre devido a um balanço hidrofílico/lipofílico dos grupos funcionais do polímero. Abaixo da LCST, a água é um bom solvente para a PNIPAAm, as interações polímero-solvente são maiores que as interações polímero-polímero, as moléculas de água estão solvatando os grupos acrilamidas e o polímero está completamente solúvel neste meio. Acima desta temperatura, as interações de pontes de hidrogênio se rompem, ocorre a dessolvatação e a água é expelida do “coil” polimérico. Nesta nova situação a água torna-se um não-solvente para a PNIPAAm e acontece a formação dos glóbulos compactos de PNIPAAm precipitada. A PNIPAAm não é o único exemplo de material que apresenta este comportamento, visto que outros polímeros não-iônicos e solúveis em água também apresentam esta perda de solubilidade com o aumento da temperatura.

Entretanto, estes polímeros não-iônicos, como o poli(óxido de etileno), apresentam LCST próxima ou acima do ponto de ebulição da água, enquanto que a LCST do PNIPAAm é próxima da temperatura fisiológica, o que faz desse polímero um material atrativo para ser empregado em liberação controlada de princípios ativos (ATAMAN; BOUCHER, 1982). A LCST do PNIPAAm pode ser modificada pela incorporação em sua cadeia de um comonômero hidrofílico com aumento da LCST ou hidrofóbico com diminuição da LCST, ou pela adição de sal ou emulsificante na solução aquosa do polímero (SCHILD; TIRREL, 1990; SCHILD; TIRREL, 1991). O poli(ácido acrílico) (PAA) é um polímero solúvel em água e sensível a variações de pH. Assim, a utilização da NIPAAm e do AA numa reação de copolimerização levaria à formação de copolímeros sensíveis a temperatura e ao pH. Para utilizar estes copolímeros em sistemas de liberação controlada de princípios ativos, a resposta (solubilidade) do material às variações de pH e de temperatura deverá ocorrer mediante pequenas mudanças desses parâmetros nas condições fisiológicas do organismo (YOO; et al., 2000).

A NIPAAm e seus copolímeros podem ser sintetizadas por diferentes mecanismos, como polimerização via radical livre (KUCLING; et al., 2000; TÜDÖS; et al., 1976; BAE; et al.), radicalar livre controlada (AROTÇARENA; et al., 2002; GANACHAUD; et al., 2000; SCHILLI; et al., 2002), fotopolimerização (KANAZAWA; et al., 1997; AKERMAN; et al., 1998; OKANO; et al., 1993), polimerização por plasma (LEE, e SHIM, 1997) e irradiação de elétrons (OKANO; et al., 1995; YAMATO; et al., 1999). A Tabela 1.5 apresenta as razões de reatividade da NIPAAm com diferentes comonômeros.

Tabela 1.5 - Razão de reatividade da NIPAAm (M1) com outros comonômeros (M2). (Adaptado de RZAEV; et al., 2007)

Comonomêro (M2)	Meio	T(°C)	Método	r ₁	r ₂	Referência
Ácido Acrílico	H ₂ O/Metanol	50	KT	14,0	0,07	KAHRAMAN, et al., 2005
Ácido Metacrílico	H ₂ O/Metanol	50	KT	10,2	0,01	KAHRAMAN, et al., 2005
4-Ácido Pentenóico	Metanol	50	FR	10,58	0,035	WAHLUND, et al., 2002
Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propenesulfônico	H ₂ O/Metanol	50	KT	2,4	0,03	KAHRAMAN, et al., 2005
	H ₂ O	50	FR	1,12	0,24	
	H ₂ O	50	KT	1,13	0,25	MATSUKATA, et al., 1998
2-Dimetilmaleimido-N-Etilacrilamida	1,4-Dioxano	70	KT	1,46	1,33	MATHIOWITZ, 1999
N-vinil-2-Pirrolidona	1,4-Dioxano	65	FR	0,37	0,40	DINÇER, et al., 2006
			KT	0,44	0,50	
			NLR	0,38	0,40	
			KT	0,47	0,50	
Anidrido Malêico	1,4-Dioxano	65	KT	0,46	0,106	DINÇER, et al., 2002
			NLR	0,45	0,11	
Anidrido Cítacônico	1,4-Dioxano	65	KT	0,44	0,024	DINÇER, et al., 2006
			NLR	0,45	0,03	
Ácido 4-Vinilfenilborônico	1,4-Dioxano	65	KT	0,15	1,28	KÖSELI, et al., 2003
			NRL	0,16	1,38	

KT (Kelen-Tüdös); FR (Fineman-Ross); NLR (Non-Linear-Regression)

1.5. Polimerização RAFT

A polimerização via radical livre é um dos processos mais empregados na obtenção de polímeros de alta massa molecular em escalas industriais. (MOAD; SOLOMON, 1995) Dentre os fatores responsáveis por tornar este processo tão utilizado, destacam-se: (a) aplicação na polimerização de uma série de monômeros diferentes, tais como: (meta) acrilatos, estireno e seus derivados, (meta)acrilamidas, butadieno, acetato de vinila e seus derivados; (b) muito bem conduzido na presença de substâncias (monômeros, solventes, etc) que apresentam em suas estruturas químicas grupos funcionais (OH, NR₂, COOH, CONR₂); (c) aplicável em todas as técnicas de polimerização (polimerização em massa, solução, suspensão, emulsão e miniemulsão); (d) facilidade de operação e baixo custo em relação a outras tecnologias competitivas. No entanto, o processo convencional de polimerização via radical livre apresenta algumas limitações, principalmente, no controle da estrutura macromolecular, ou seja, distribuição da massa molecular, composição e arquitetura das macrocadeias.(MOAD; et al., 2005)

Na tentativa de minimizar estas limitações da polimerização via radical livre, foram desenvolvidos vários mecanismos alternativos de polimerização via radical livre “viva”/controlada e hoje, já é possível afirmar que esta nova tecnologia proporcionou novas perspectivas para a química dos polímeros, pois uma série de trabalhos encontrados na literatura demonstraram que estes mecanismos ou processos de polimerização “viva”/controlada conferem ao processo de polimerização via radical livre convencional um controle preciso do processo de polimerização (estrutura macromolecular), mantendo a versatilidade deste tipo de polimerização radicalar.(HAWKER; et al., 2001; MATYJASZEWSKI; XIA, 2001; KAMIGAITO; et al., 2001; RIZZARDO; et al., 1999;

RIZZARDO; et al., 2000; CHIEFARI; RIZZARDO, 2002; MAYADUNNE; RIZZARDO, 2005) Essa versatilidade não é encontrada nos mecanismos convencionais de polimerização “viva”, como a polimerização aniônica e catiônica. Os maiores desafios para esta nova tecnologia é a preparação de copolímeros em bloco, polímeros com arquitetura tipo “estrela”, ou outros polímeros com macroestruturas complexas, novos materiais que venham revolucionar a indústria dos polímeros, com a síntese de novos tipos de surfatantes, dispersantes, revestimentos especiais, adesivos e materiais para microeletrônica. (MOAD; et al., 2005)

A polimerização via radical livre viva foi descoberta por Szwarc (SZWARC, 1956; SZWARC; et al., 1993). Segundo o autor, uma polimerização para ser considerada viva deve obedecer aos seguintes requisitos:

- ✚ O processo de polimerização deverá ter 100% de conversão. A adição de uma nova carga de monômero deverá dar continuidade à polimerização, ou seja, não existe a terminação das cadeias poliméricas;
- ✚ A massa molecular média é linearmente dependente da conversão;
- ✚ O número de cadeias poliméricas é constante durante a polimerização;
- ✚ A massa molecular pode ser controlada pela relação entre as concentrações do agente de controle da polimerização e de monômero;
- ✚ A polidispersidade (distribuição de massas moleculares) do polímero é baixa;
- ✚ A funcionalidade das extremidades das cadeias poliméricas pode ser obtida quantitativamente;

Portanto, por definição, pela técnica de polimerização via radical livre viva é possível preparar macromoléculas complexas de maneira controlada. O grau de polimerização pode ser

previamente definido pela razão entre a concentração de monômero e do agente de controle da polimerização.

A polimerização via radical livre viva pode ser controlada por vários mecanismos: polimerização na presença de nitroxídeos (NMP), polimerização por radical estável (SRP) (GEORGES, 1993), polimerização por transferência reversível de átomo (ATRP) (WANG; MATYJASZEWSKI, 1995; BRAUNECKER; MATYJASZEWSKI, 2007), polimerização por transferência de cadeia, via fragmentação e adição reversíveis (RAFT) (CHONG; et al., 1999).

A polimerização conduzida por NMP descoberta na década de 80 (SOLOMON; *et.al.*, 1986) é estudada até os dias atuais devido a possibilidade de obtenção homopolímeros ou copolímeros em bloco de estireno com monômeros acrílicos com baixa polidispersidade.(HAWKER; et al., 2001; CHONG; et al., 1999; MOAD; RIZZARDO, 1995) O processo por ATRP é muito mais versátil que o NMP (MATYJASZEWSKI; XIA, 2001; KAMIGAITO; et al., 2001), no entanto, o mecanismo ATRP requer um sistema de iniciação não muito convencional, o que torna o mecanismo incompatível com alguns meios de polimerização. Agora, dentre os mecanismos de polimerização via radical livre viva aquele que mais tem apresentado versatilidade é o mecanismo RAFT.(CHIEFARI; et al., 1998; LE; et al., 1998)

O mecanismo de RAFT é utilizado na polimerização de vários tipos de monômeros, podendo esta reação ser conduzida em meio a diferentes solventes e sob várias condições reacionais.(CHIEFARI; et al., 1998).

A polimerização via RAFT pode ser resumida nos seguintes termos: (MOAD; et al., 2005)

✚ É conduzida pela simples adição de uma quantidade apropriada do agente RAFT em uma polimerização radicalar convencional. As mesmas condições experimentais podem ser utilizadas (monômeros, iniciadores, solventes e temperaturas);

✚ Ocorre com as mesmas características de uma polimerização via radical livre “viva”, já citada anteriormente;

✚ A Massa Molecular Numérica Média ($\overline{Mn}$) pode ser estimada pela seguinte equação:

$$\overline{Mn} = \frac{[M]_0 - [M]_t}{[CTA]_0} Mm + M_{CTA} \quad (1.1)$$

Onde: ($[M]_0 - [M]_t$) é a quantidade de monômero consumida, $[CTA]_0$ é quantidade de agente RAFT inicial, Mm é a massa molar do monômero e M_{CTA} é a massa molecular do CTA;

✚ A polidispersidade das macrocadeias é baixa;

✚ Permite a síntese de copolímeros em bloco, estrelas e macroestruturas complexas.

O mecanismo RAFT foi descrito pela primeira vez em 1998 por meio de uma patente depositada por LE T. P. e co-autores (LE; et al., 1998). O primeiro artigo publicado sobre o assunto foi, também, apresentado à comunidade científica em 1998 pelo mesmo grupo de pesquisa (CHIEFARI; et al., 1998). Outras patentes já foram depositadas e este mecanismo juntamente com NMP e ATRP dominam as publicações que envolvem a polimerização via radical livre “viva” (CORPART; et al., 1999; MOAD; et al., 1999; CHIEFRARI; et. al. 1999; MATYJASZEWSKI, 2003; MATYJASZEWSKI, 2002).

A característica básica do mecanismo RAFT é uma sequência de adição-fragmentação em equilíbrio como demonstrado na Figura 1.6. As etapas de iniciação e de terminação ocorrem da mesma forma que num mecanismo de polimerização radicalar convencional. No primeiro estágio da polimerização, a decomposição do iniciador e o ataque do radical formado às moléculas de monômero originam um radical propagante Pm^* . Este radical reagindo com a molécula do ditioéster (1) que dará origem a um radical intermediário (2), que por sua vez sofre uma fragmentação levando a formação de uma nova macromolécula ($PmSC(Z)=S$, 3) e

um radical de saída R^* . Esta primeira reação de transferência de cadeia reversível é chamada de pré-equilíbrio. A reação deste novo radical (R^*) com novas moléculas de monômero dará origem a um novo radical propagante (Pn^*). Um rápido equilíbrio, chamado de etapa de equilíbrio principal, entre a propagação destes dois radicais Pm^* e Pn^* e o estado de dormência dos radicais poliméricos contendo a estrutura tiocarboniltio (4 e 6) promove a mesma probabilidade de crescimento para ambos os radicais em propagação, conferindo também uma baixa polidispersidade para ambos os polímeros. Terminada a polimerização pelo consumo de monômero ou pela inibição proposital a maioria das macrocadeias formadas apresentarão em suas extremidades os compostos de ditioéster e poderão ser isoladas na forma de material estável. (RIZZARDO; et al., 1999; CHIEFARI; et al., 1998)

Uma grande variedade de tiocarboniltio compostos (composto 1 na Figura 1.6), que polimerizam via RAFT, já foram apresentados por diversos autores. O primeiro trabalho publicado em RAFT apresentou apenas compostos a base de ditioésteres.(CHIEFARI; et al., 1998) Entretanto, nas patentes e em outros trabalhos publicados posteriormente são apresentadas várias outras possibilidades de moléculas que podem ser utilizadas em polimerização por mecanismo RAFT, tais como: tritiocarbonatos, xantatos, ditiocarbamatos e outros.(LE, *et al.*, 1998; CHIEFRARI, et al. 1999; RIZZARDO, et al., 1999)

A eficiência de um agente RAFT pode ser influenciada por diversos fatores, destacando o tipo de monômero que está sendo polimerizado e principalmente, as propriedades de saída do grupo R (capacidade de geração de um radical livre) e as propriedades de ativação ou desativação da dupla ligação entre S e C (agentes RAFT 1, 3, 4 e 6 na Figura 1.6) que dependem do grupo Z do ditioésteres. (CHONG; et al., 2003; CHIEFARI; et al., 2003)

*** Iniciação** *** Transferência de Cadeia Reversível (Pré-equilíbrio)** *** Reiniciação e Propagação** *** Equilíbrio Principal** *** Terminação**

Figura 1.6. Mecanismo de polimerização radical livre “viva” via RAFT

Para uma eficiente polimerização com agente RAFT algumas condições são importantes: (CHONG; et al., 2003; CHIEFARI; et al., 2003)

- As espécies 1, 3, 4 e 6 devem apresentar a ligação C=S reativa (alto K_{add});
- O radical intermediário 2 deve ter a tendência de deslocar o equilíbrio para os produtos;

- ✚ O radical R^* deve ser eficiente na re-iniciação da polimerização.
- ✚ Os radicais intermediários 2 e 5 devem sofrer fragmentação rapidamente;

No equilíbrio principal do mecanismo de reação via RAFT existe uma competição entre as reações de propagação das cadeias ativas (P_n^* e P_m^*) e as reações de terminação. Isto significa que, para garantir o bom controle da polimerização, a concentração de radicais propagantes deverá ser muito menor do que a concentração de espécies dormentes (cadeias dormentes, (4) e (6)). Por isso utiliza-se uma pequena quantidade de iniciador. Na teoria, apenas um radical seria necessário para iniciar estas polimerizações. Os outros radicais resultariam das próprias moléculas de CTA (radicais de saída R^*). Por este motivo são utilizadas elevadas razões de $[CTA]/[Iniciador]$. Por outro lado, razões muito altas deixam a reação muito lenta, o que ocasiona um desvio no controle da polimerização. Existe, portanto, uma condição ótima entre cinética e controle, ou seja, a escolha da razão $[CTA]/[Iniciador]$ é feita com base neste compromisso entre cinética (ex.: reação não muito longa) e controle. É importante lembrar que não existe uma razão ideal que seja universal. O resultado dependerá do trio CTA-Monômero-Iniciador.

A Tabela 1.6 apresenta os agentes RAFT já sintetizados e as aplicações na síntese de diversos homopolímeros e copolímeros. (MOAD; et al., 2005) Na Figura 1.7 estão apresentadas os tipos de macro-cadeias que podem ser sintetizadas via RAFT.

Tabela 1.6 - Tipos de agentes RAFTs (composto 1 da figura 6) e suas aplicações.(MOAD; et al, 2005)
Continua

Agentes RAFT		Homopolímeros	Copolímeros
R	Z		
Ditioésteres aromáticos
MMA, AA	-
S, MMA	-
S, AA, MA, XMA, VBz, MMA, EHMA	NIPAAm-XMA, S-MAH, EHMA-b-S, EHMA-b-MMA-MA
AN	-
SSO ₃ Na, AMPS	AMPS-AMBS, AMPS-b-AMBS -b- AMPS
MMA	-
S, DMAEMA, AM	-
AM	-
MMA	-
S, SAc, MA, BA, MMA	-

Tabela 1.6 - Tipos de agentes RAFTs (composto 1 da figura 6) e suas aplicações.(MOAD; et al., 2005)
Continuação

$C_2H_5OC(O)-\bullet$	S,BA,MMA	-
$C_2H_5OC(O)-\text{┐} \bullet$	S,BA,MMA	-
$C_2H_5OC(O)-\text{┘} \bullet$	S,MMA	-
$C_2H_5OC(O)-\text{┐} \text{└} \bullet$	BMDO	-
S, MA, BA, MMA, DMA,NIPAAm,S, MMA	S-b-DMA, S-b-SMe, MMA-b-S, S-co-MAH, AMS-co-MAH
S,AA, MA,BA, MMA	BA-b-AA, MA-b-EA
S,MA, BA, MMA, BzMA,DMAEMA, XMA, AM, DMA, NIPAAm, 2VP, CPM, S, MMA, BMA	S-co-AN, S-co-MMA, MMA-co-HEMA, MMA-co-BA, HEMA-co-iBMA-MMA-S, MMA-b-MMA, MMA-b-MAA, MMA-b-S, BzMA-b-DMAEMA, BzMA-b-MAA, 2VP-b-4VP, 4VP-b-2VP, MMA-b-S, BMA-b-S
MMA	-
MA	-

Tabela 1.6 - Tipos de agentes RAFTs (composto 1 da figura 6) e suas aplicações.(MOAD; et al, 2005)
Continuação

MMA	-
S, MMA, GMA	MMA-b-S
MMA	MMA-b-S
MMA	MMA-b-S
MMA, BA	-
Ditioéteres Alifáticos			
H ₃ C--		S, BA	-
H ₃ C--		S, BA	S-b-MMA
H ₃ C--		S	-
H ₃ C--		MMA	-
S, MA, NIPAAm	NIPAAm-b-S

Tabela 1.6 - Tipos de agentes RAFTs (composto 1 da figura 6) e suas aplicações.(MOAD; et al., 2005)
Continuação

S, MMA, MA, AM, NIPAAm	NIPAAm-b-S
MA	-
Ditiocarbamatos
S, MA, MMA	-
MMA	-
S, MA, NIPAAm	-
NIPAAm	-
S, MA	-
EA	-
S, MMA, VAc	-
AN, MA	AA-b-NIPAAm
S, MA	-

Tabela 1.6 - Tipos de agentes RAFTs (composto 1 da figura 6) e suas aplicações.(MOAD; et al., 2005)
Continuação

S, MA	-
EA	-
S, EA, VAc	-
EA, VAc	-
VAc	-
VAc	-
EA, VAc	-
S	-
Tritiocarbonatos
S, AA, MA	S-co-MAH
S	-
S	-

Tabela 1.6 - Tipos de agentes RAFTs (composto 1 da figura 6) e suas aplicações.(MOAD; et al., 2005)
Continuação

$\text{HO}_2\text{C}-\text{S}---$	$\text{---}\cdot\text{CO}_2\text{H}$	S, AA, HEA, EA, BA, MMA, AM	AA-b-EA, S-b-AA, EHA-b-EA
$\text{H}_3\text{C}-\text{S}---$	$\text{NC}-\text{---}\cdot$	S, MA, MMA	-
$\text{H}_3\text{C}-\text{S}---$	$\text{Ph}-\text{---}\cdot\text{CO}_2\text{H}$	S	-
$\text{C}_4\text{H}_9-\text{S}---$		S, BA	-
$\text{C}_4\text{H}_9-\text{S}---$	$\text{---}\cdot\text{CO}_2\text{H}$	AA	AA-b-S, AA-b-BA
$\text{---}\text{S}---$ CO_2CH_3	$\text{---}\cdot\text{CO}_2\text{CH}_3$	MA	-
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}-\text{S}---$	$\text{---}\cdot\text{CO}_2\text{H}$	AA, EA, BA, BAM, NIPAAm	AA-b-EA, AA-b-S
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}-\text{S}---$	$\text{NC}-\text{---}\cdot\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	MMA	-
Xantatos			
$\text{C}_2\text{H}_5-\text{O}--$	$\text{NC}-\cdot$	VAc	MA-co-VAc
$\text{C}_2\text{H}_5-\text{O}--$		S	-
$\text{C}_2\text{H}_5-\text{O}--$		S, AA, MA, EA AM, VAc, S, BA	-
$\text{C}_2\text{H}_5-\text{O}--$	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}(\text{O})-\text{---}\cdot$	S, BA, S	AA-co-AM, AA-b-AM, AA- AM-b-AM
$\text{C}_2\text{H}_5-\text{O}--$		S	-

Tabela 1.6 - Tipos de agentes RAFTs (composto 1 da figura 6) e suas aplicações.(MOAD; et al., 2005) Conclusão

C_2H_5-O-		S	-
C_2H_5-O-		S, EA	-
C_2H_5-O-		S	-
C_2H_5-O-		S, tBA, MMA	-
$CH_3OC(O)-$	VAc,	-
S, AA	-
AA	-
S, tBA	tBA-co-VAc
CF_3CH_2-O-		S, EA	-
S, EA	-
Outros Agentes RAFTs
S	-

A influência dos grupos R e Z na eficiência e no coeficiente de transferência do agente RAFT já foi amplamente explorada. Estes trabalhos demonstram que a velocidade de adição de

um radical à dupla ligação C=S do agente RAFT é drasticamente influenciada pelo substituinte Z. Esta velocidade é maior para os substituintes do tipo aril, alquil (ditioésteres), S-alquil (tritiocarbonatos) e baixa quando os grupos são O-alquil (xantatos) ou N,N-dialquil (ditiocarbamatos). Genericamente, o coeficiente de transferência de cadeia do agente RAFT decresce na seguinte ordem: ditiobenzoatos > tritiocarbonatos $\cong$ ditioalcanoatos > ditiocarbonatos (xantatos) > ditiocarbamatos. Por outro lado, para que ocorra uma fragmentação eficiente do agente RAFT o grupo R deve ter alto coeficiente de cisão homolítica quando atacado pelo radical Pm^* . Por exemplo, um agente RAFT do tipo ditiobenzoato de benzila é facilmente atacado por radicais propagantes do tipo estíril ou acríl, no entanto apresenta baixa reatividade quando atacado por radicais metacrílicos. Esta diferença deve-se ao fato do ditiobenzoato de benzila permanecer inerte na presença de radicais propagantes do tipo metacrílico (por exemplo metacrilatos) devido o baixo coeficiente de cisão homolítica do radical R quando reagindo com metacrilatos. (MOAD; et al., 2005)

Figura 1.7. Arquiteturas macromoleculares possíveis de serem obtidas via RAFT. (MOAD; et al., 2005)

Entre as características de uma polimerização via RAFT já citadas anteriormente nesse trabalho, a mais significativa é a retenção do agente RAFT no final das macrocadeias. A presença destes compostos nas extremidades das cadeias poliméricas pode ser demonstrada utilizando várias técnicas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN), “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight” (MALDI-TOF) ou Espectrometria de Massa do tipo “Eletronspray Ionization” (ESI). (MOAD; et al., 2005)

O mecanismo RAFT é utilizado, como já citado, na polimerização de vários tipos de monômeros, podendo esta reação ser conduzida em diferentes solventes e sob várias condições de reação, como mostra o primeiro artigo publicado no assunto por Chiefari; et al., (1998). Nesse trabalho os autores utilizaram monômeros com diferentes funcionalidades: metacrilato de metila (MMA), metacrilato de butila (BMA), dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEMA), acrilato de butila (BA), ácido acrílico (AA), estireno (S), estireno sulfonato de sódio (SSO_3Na), benzoato de vinila e hidroxietilmetacrilato (HEMA), variando-se a temperatura de reação e a concentração dos monômeros. Para cada monômero polimerizado foi empregado um tipo de solvente. Além destes parâmetros, os pesquisadores trabalharam com nove tipos diferentes de agente de transferência de cadeia (CTA). Como era o primeiro trabalho a ser publicado no assunto de RAFT, os autores utilizaram várias espécies químicas (monômeros, agentes RAFT e solventes) com o objetivo de comprovar a versatilidade do novo mecanismo de polimerização radicalar controlada e comparar com os métodos de polimerização já desenvolvidos. Além de apresentar a viabilidade e a versatilidade do mecanismo RAFT, os autores demonstraram que o sucesso de uma polimerização via RAFT depende da escolha dos radicais R e Z que constituem o agente RAFT. Neste trabalho os autores mostraram que os agentes RAFT apresentavam maior coeficiente de transferência quando o grupo Z era formado por aril ou alquil e no caso do

grupo Z ser formado de dialquilamino (ditiocarbamatos) ou alcóxi (xantatos) o coeficiente de transferência era menor, tornando estes agentes ineficientes.

Vários trabalhos encontrados na literatura apresentam a síntese da PNIPAAm ou de seus copolímeros via RAFT (KIRKLAND; et al., 2008; BOUCHEKIF; NARAIN, 2007; YOU; et al., 2007; LOWE; TORRES; WANG, 2007; NUOPPONEN; et al., 2007; QIU; WINNIK, 2007; SCHILLI; et al., 2004; RAY; et al., 2004; RAY; et al., 2003; SCHILLI; LANZENDORFER; MULLER, 2002; GANACHAUD; et.al., 2000).

Dentre estes trabalhos citados destacam-se os estudos realizados por Ganachaud; et.al., (2000) e Schilli, et al., (2002). Ganachaud e seus colaboradores (GANACHAUD; et.al., 2000) foram os primeiros pesquisadores a utilizar o mecanismo RAFT para síntese da PNIPAAm. Os autores empregaram dois tipos de agentes RAFT, o ditiobenzoato de benzila e ditiobenzoato de cumila. Foram utilizados dois solventes diferentes, benzeno e dioxano e como iniciador foi utilizado o 2,2-azobisisobutironitrila (AIBN). Segundo os autores, estes dois solventes utilizados apresentavam baixo coeficiente de transferência de cadeia e o AIBN foi escolhido por apresentar uma taxa de decomposição lenta, o que evitaria a terminação de cadeias, e alta eficiência nestes solventes. Com este estudo os autores demonstraram a viabilidade da síntese de PNIPAAm via RAFT e evidenciaram que a presença do agente RAFT no meio reacional diminuiu a velocidade de polimerização da NIPAAm. Na caracterização da massa molecular foram utilizadas três técnicas, GPC, MALDI-TOF e viscosimetria. Com o emprego destas técnicas, os autores perceberam que a correlação linear entre massa molecular teórica e real ocorreu até valores inferiores a 10^5 .

Schilli e co-autores (SCHILLI; et al., 2002) empregaram a técnica de espectroscopia de infravermelho (FT-NIR), para investigar a cinética da polimerização via mecanismo RAFT da n-isopropilacrilamida (NIPAAm), na presença de ditiocarbamatos (1-pirrolecarboditioato de

benzila e 1-pirrolecarboditioato de cumila), em 1,4-dioxano a 60°C. Através da técnica de FT-NIR, foi verificado um longo período de indução para reações conduzidas em maiores concentrações relativas de CTA. Outro resultado obtido pelos autores foi a influência do tipo de CTA no perfil cinético das reações, pois comparando-se reações com as mesmas concentrações de CTA, o CTA com radical cumila apresentou um tempo de indução três vezes maior que o CTA com radical benzila. Os autores sugerem que esta diferença no tempo de indução entre os dois radicais está ligada a maior estabilidade do radical cumila, ou seja, o radical cumila adiciona unidades de NIPAAm numa velocidade menor que o radical benzila.

Chiefari, et al., (1998) foram os primeiros a descrever a polimerização controlada do AA utilizando RAFT, empregando um agente de transferência de cadeia constituído pelos grupos Z=fenil e R=CH(CH₃)fenil. O índice de polidispersidade foi baixo (1,23) entretanto, a polimerização foi extremamente lenta (18% de conversão em 4 horas de reação a 60°C). De acordo com os autores, essa baixa velocidade de reação originou-se da estabilidade intrínseca do radical intermediário na etapa de fragmentação (Figura 1.8), da baixa re-iniciação do radical fragmentado ou ainda, de uma interação específica entre o radical propagante e o agente de transferência de cadeia.

Figura 1.8. Equilíbrio de reação de adição-fragmentação entre radical propagante e cadeia dormente.

Ladaviere (LADAVIERE; DORR; CLAVERIE, 2001) e Loiseau (LOISEAU; et al., 2003) empregaram o mecanismo RAFT para polimerizar o ácido acrílico em meios próticos (etanol, metanol, 2-propanol e dioxano). Ladaviere e seus colaboradores polimerizaram o ácido acrílico com 17 tipos de agentes RAFT, em meio etanol e usando ácido 4,4'-azobis-4-cianoaléico como iniciador. As reações foram conduzidas à 90°C. Neste trabalho os autores demonstraram que quanto mais lenta a reação menor era o controle da massa molecular do PAA e que os grupos R e Z dos agentes RAFT influenciam significativamente nesta velocidade de polimerização. Logo, na polimerização do ácido acrílico os grupos R formados por carbono secundário e os grupos Z do tipo aril e tiol são os mais indicados para estas sínteses. Loiseau explorou a influência do uso de diferentes solventes na polimerização do AA via RAFT, empregando dois agentes de transferência de cadeia, o ácido dibenziléster tritioarbônico e o ácido bis(1-feniletil)éster tritioarbônico. Os autores demonstraram que dentre os solventes utilizados (etanol, metanol, 2-propanol e dioxano) aquele que apresentou o maior coeficiente de transferência de cadeia é o 2-propanol e os melhores resultados de controle de massa molecular foram obtidos com o emprego do metanol e etanol.

Em função dos resultados encontrados por estes diferentes autores é possível afirmar que a polimerização do AA via RAFT terá maior sucesso, isto é, melhor controle da polimerização de acordo com um mecanismo radicalar controlado se conduzida na presença de agente RAFT formado por tritioéster ou xantato devido à estabilidade do radical intermediário formado.

D'agosto; et al., (2003), demonstraram a possibilidade de se empregar agentes de transferência de cadeia que polimerizam via RAFT e apresentam em sua estrutura química o grupo funcional COOH, o qual funcionaliza a extremidade da cadeia do polímero sintetizado, permitindo a reação desse polímero funcionalizado com outros polímeros que apresentem OH

ou NH₂ livres. Neste trabalho os pesquisadores utilizaram o mecanismo RAFT para sintetizar a Poli(n-acriloilmorfolina) (PNAM) funcionalizada com grupos carboxílicos terminais. Os agentes de transferência de cadeia, o ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico (PTETPA), e o ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico (PTTPA), foram sintetizados no referido trabalho. Nesse trabalho os autores realizaram um estudo cinético da reação de polimerização da n-acriloilmorfolina (NAM) avaliando quatro parâmetros: a temperatura de reação (65°C e 85°C), a estrutura química do CTA (PTETPA e PTTPA), as concentrações dos agentes de transferência de cadeia e do monômero NAM. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, as conversões das reações foram maiores para a temperatura de 85°C e observaram também que, para a polimerização com o PTETPA, a velocidade de reação foi maior e o polímero formado apresentou uma menor polidispersidade. Este resultado, segundo os autores, poderia ser atribuído ao radical Z destes dois CTAs, pois no caso do PTTPA, o radical fenil (grupo Z) retarda a reversibilidade da reação RAFT e consequentemente aumento da probabilidade de reações de terminação.

1.6. Síntese de copolímeros em bloco

Copolímeros em blocos são definidos como sendo a junção de duas seqüências (blocos) de um ou mais monômeros de maneira linear ou radial. No caso mais simples, um copolímero di-bloco AB será formado pela ligação de dois homopolímeros constituídos dos monômeros A e B. O caso mais simples de copolímeros em bloco obtidos via junção radial são os copolímeros do tipo “estrelas”, ocorrendo quando n homopolímeros são ligados em um único sítio de reação multifuncional.(RIESS, 2003)

A síntese de copolímeros em bloco vem sendo estudada extensivamente durante décadas e uma revisão geral sobre este assunto pode ser encontrada facilmente na literatura.(RIESS, et al., 1985; RIESS, et al., 2002; QUIRK, et al., 1989) Alguns tópicos mais específicos merecem destaque, como a síntese via polimerização por etapas(FRADET, 1989), polimerização com utilização de macro-iniciadores(MISHRA; YAGCI, 1989) ou polimerização radical livre viva(MALMSTROM; HAWKER; 1998; BRAUNECKER; MATYJASZEWSKI, 2007). A síntese de copolímeros em bloco anfífilicos(COLFEN, 2001) ou a base de poli(óxido de etileno) (NACE, 1996, XIE; XIE, 1999) também são assuntos importantes nesta área da ciência.

Os métodos de síntese dos copolímeros em blocos podem ser divididos em duas classes de reações. A primeira classe é caracterizada pela formação de um radical de polimerização num polímero A, o qual é capaz de iniciar a polimerização de um segundo monômero B. Nesta classe de reação estão incluídas as polimerizações aniônicas, catiônicas e via radical livre convencional e “viva”/controlada. O segundo método de polimerização, também chamado de policondensação, consiste na reação de acoplamento de dois grupos funcionais presentes nos polímeros A e B (RIESS, 2003).

A seleção do tipo de mecanismo empregado na síntese de um copolímero em bloco depende de alguns fatores, tais como: o mecanismo de polimerização dos monômeros A e B deverá ser compatível com os monômeros, ou seja, os monômeros deverão polimerizar pelo mesmo mecanismo de reação; o tipo de estrutura que se deseja di-bloco, tri-bloco, multi-bloco ou tipo “estrela”; a massa molecular do copolímero final (para copolímeros de baixa massa molecular é conveniente optar pela reação de acoplamento); a polidispersidade de cada bloco e finalmente a pureza do copolímero em bloco (RIESS, 2003).

O primeiro copolímero em bloco foi obtido por Melville (MELVILLE, 1941) com a reação de macrorradicais de poli(metacrilato de metila) com estireno. Desde este evento o mecanismo de polimerização radicalar, por meio dos macroiniciadores, vem sendo utilizado para a produção de copolímeros em bloco. Os compostos a base de peróxido e os azo-compostos, como por exemplo, macroiniciadores do tipo poliazoésteres, são os mais empregados (MISHRA; YAGCI, 1989). Esta técnica é empregada na síntese de polieletrólitos em bloco. No entanto, este tipo de mecanismo apresenta algumas limitações como, alta polidispersidade, falta de controle da arquitetura e da massa molecular dos copolímeros (RIESS, 2003).

Para contornar estas limitações e viabilizar o emprego do mecanismo via radical livre na síntese de copolímeros em bloco foram desenvolvidos os mecanismos de polimerização radicalar controlada (CRP), os quais trouxeram novas e boas perspectivas para os cientistas. Apesar de existir outros mecanismos de produção dos copolímeros em bloco, como a polimerização aniônica e a catiônica em condições muito específicas, as CRPs são mais versáteis, uma vez que permitem a utilização de monômeros funcionalizados, diferentes solventes (inclusive água) e temperatura. Dentre os mecanismos de polimerização via radical livre “viva” que se destacam na produção de copolímeros em bloco, podemos citar a NMP,

ATRP e RAFT (LADAVIÈRE; et al., 2001; SAVE; ARMES, 2001; MONTEIRO; DE BARBEYRAC, 2002; CASSEBRAS; et al., 1999; GRAVANO; et al., 2001).

A síntese de copolímeros em bloco, à base de NIPAAm, pode ser realizada com o emprego dos mecanismos de CRPs (DIMITROV; et al., 2007). Schilli e colaboradores (SCHILLI; et al., 2004) sintetizaram copolímero em bloco de Poli(N-isopropilacrilamida-b-ácido acrílico), PNIPAAm-b-AA, com baixa polidispersidade, por meio da polimerização via RAFT. Nesse trabalho os copolímeros em bloco foram sintetizados, preparando-se primeiro o PAA utilizando como CTA o ditiobenzoato de cumila. O PAA foi purificado por precipitação em acetato de etila, com o intuito de remover o monômero residual e evitar um decréscimo na velocidade de polimerização na subsequente copolimerização com a NIPAAm. Empregando esta metodologia, os autores obtiveram PAA com $M_n = 7900$ g/mol e polidispersidade de 1,19 e copolímeros em blocos com M_n variando de 15100 à 23400 com polidispersidades de 1,03 à 1,15.

Uma série de copolímeros anfífilos em bloco com PNIPAAm constituindo o bloco hidrofílico e Poliestireno (PS) ou Poli(metacrilato de t-butila) (Pt-BMA) constituindo o bloco hidrofóbico, foram sintetizados por Nuopponen; *et al.*, (2004) empregando polimerizações RAFT. Neste trabalho os pesquisadores empregaram o ácido ditiobenzoato 4-cianopentanóico (CPADB) como agente RAFT e dioxano como solvente de reação. Os copolímeros em blocos foram preparados em duas etapas, primeiro sintetizando o PS ou o Pt-BMA, dando origem a um macro agente RAFT, e em seguida polimerizando-se a NIPAAm. Neste trabalho os autores demonstraram a viabilidade do emprego de agente RAFT funcionalizado com grupo carboxílico na polimerização da NIPAAm, obtendo copolímeros em bloco com polidispersidades em torno de 1,15. Os autores mencionaram que as $M_{n_{exp}}$ dos copolímeros em bloco obtidas via GPC eram imprecisas e esta dificuldade foi contornada com o emprego da

técnica de ressonância magnética nuclear. Segundo os pesquisadores, esta dificuldade encontrada poderia ser atribuída a presença da PNIPAAm nos copolímeros em bloco.

Liu e Perrier, (2005) publicaram um estudo sobre a polimerização via RAFT da NIPAAm e da N-dimetilacrilamida (DMA) empregando o ditiobenzoato de S-metoxycarbonilfenilmetila (MCPDB) como agente RAFT. Neste trabalho os autores confirmaram a viabilidade de síntese destes homopolímeros e seus copolímeros em bloco, utilizando este CTA específico. Na síntese do copolímero em bloco, os autores utilizaram duas metodologias. Na primeira os autores prepararam primeiramente homopolímeros de NIPAAm e posteriormente, utilizaram este homopolímero como macro agente RAFT para a síntese do segundo segmento do copolímero em bloco, constituído por DMA. Na segunda metodologia foi obtida um homopolímero de DMA e posteriormente copolimerizado a NIPAAm. Os autores determinaram a concentração micelar crítica - CMC do copolímero em bloco à 40°C e perceberam que quanto maior o segmento de PNIPAAm menor era a CMC do copolímero em bloco.

O trabalho mais recente e que merece destaque no emprego do mecanismo RAFT na polimerização da NIPAAm e do ácido metacrílico (MAA) foi apresentado por YANG e CHENG, 2006. Neste trabalho os autores utilizaram o ditioéster, ditiobenzoato de carboximetila, como agente RAFT e realizaram homopolimerizações da NIPAAm, do MAA e copolimerização em bloco da NIPAAm com o MAA. Os autores avaliaram a cinética de reação e o efeito da razão [monômero]/[agente RAFT] na polimerização via RAFT. Para realizar a síntese dos copolímeros em bloco os autores primeiro sintetizaram a PNIPAAm e posteriormente reagiram este macro agente RAFT com o MAA. Nas sínteses dos homopolímeros de PNIPAAm e PMAA os autores demonstraram que a polimerização via RAFT é mais lenta que uma homopolimerização convencional. Por exemplo, na síntese da

PNIPAAm via RAFT a conversão foi de 69% em 10 horas de reação, enquanto que a síntese da PNIPAAm via convencional a conversão foi maior que 95% em 12 horas. Os fatores que poderiam explicar esta diferença, segundo os pesquisadores, estariam associados à lenta fragmentação do radical de saída R do agente de controle. Na comparação das Mn_t com as Mn_{exp} , os autores perceberam que as Mn_{exp} eram sempre maiores que as Mn_t , tanto para a síntese da PNIPAAm quanto para a síntese do PMAA. Esta diferença entre as massas moleculares foi atribuída a alta taxa de polimerização inicial, via mecanismo convencional, (geração dos macrorradicais) resultando numa alta massa molecular inicial, podendo até ocorrer a terminação via mecanismo convencional de polimerização. Após a geração dos macrorradicais e a transferência de cadeia ao agente RAFT ocorreu o controle da polimerização via RAFT. A partir da transferência de cadeia agente RAFT o aumento da massa molecular em função da conversão da reação passou a ser linear em função do controle do mecanismo RAFT. Na síntese dos copolímeros em bloco constituídos de NIPAAm e MAA os resultados encontrados pelos autores foram interessantes, pois obtiveram copolímeros em bloco com polidispersidades de 1,3.

Como mencionado anteriormente, os copolímeros em bloco podem ser obtidos por reações de polimerização radicalar ou por condensação. Nos trabalhos que foram apresentados até este momento foram mencionadas algumas possibilidades de obtenção dos copolímeros em bloco via polimerização radicalar, com destaque para o mecanismo de polimerização radicalar controlada do tipo RAFT. Este foi o mecanismo escolhido para a síntese dos polímeros sensíveis a temperatura e o pH que foram empregados na síntese dos copolímeros de bloco estudados nesta tese.

Na síntese de copolímeros em bloco via condensação destacamos três mecanismos. O primeiro seria a utilização de iniciador bifuncional que poderia ser empregado na reação de

dois monômeros que polimerizam por mecanismos diferentes, sendo um via condensação e outro via radicalar. Um exemplo desta nova estratégia de polimerização foi apresentada por Hawker e colaboradores (HAWKER; et al., 1998) com a polimerização da caprolactona, via abertura de anel, e do estireno via polimerização radicalar controlada por NMP, empregando um único iniciador (Figura 1.9).

Figura 1.9. Estrutura química do iniciador bifuncional empregado por Hawker e colaboradores empregado na copolimerização em bloco do estireno, via NMP com a caprolactona (Hawker; et al., 1998)

O segundo mecanismo trata-se da utilização das reações de acoplamento entre grupos funcionais de homo(co)polímeros diferentes. Neste tipo de síntese, um grupo funcional presente num polímero reage com um outro grupo funcional de outro polímero, dando origem ao copolímero em bloco. Estes grupos funcionais geralmente são hidroxilas, aminas, grupos carboxílicos, ésteres e anidridos. Um exemplo típico desta reação é a síntese de copolímeros em bloco à base de Poli(óxido de etileno). Neste tipo de copolímero a síntese é realizada através da reação das hidroxilas terminais do poli(óxido de etileno) com um outro polímero que contenha grupos carboxílicos, por meio de uma esterificação ou transesterificação (ESSELBORN; et al., 1996).

Recentemente, uma nova técnica de acoplamento foi desenvolvida por Kolb e colaboradores (KOLB; et al. 2001), denominada de “*click chemistry*”. Esta técnica também é uma reação de acoplamento entre dois grupos funcionais presentes nas extremidades das

cadeias poliméricas, contudo a reação de acoplamento ocorre instantaneamente quando colocados em contato sem necessidade de temperatura. Estes grupos funcionais são específicos, azida (N_3^+) na extremidade de um segmento polimérico e um grupo acetileno ($\text{C}\equiv\text{C}$) na extremidade do outro segmento. Quando estes dois grupos funcionais são colocados no mesmo meio reacional, a ligação dos blocos ocorre rapidamente, com alto rendimento de reação e especificidade reacional. A Figura 1.10 ilustra o mecanismo de reação de acoplamento via “*click chemistry*”.

Figura 1.10: Mecanismo de reação de acoplamento via “*click chemistry*”. (Adaptada de BINDER; SACHSENHOFER, 2007)

O uso desta técnica para preparação de copolímeros anfífilicos contendo PNIPAAm foi apresentado por Shi; Tang e Pan (2008). Neste trabalho os autores sintetizaram copolímeros em bloco de Poliestireno-b-PNIPAAm, polimerizando primeiramente o estireno via RAFT utilizando ditiobenzoato isobutirato de propargila como agente RAFT (agente RAFT

responsável pela funcionalização da extremidade da cadeia pelo grupo acetileno) (polímero (1) na Figura 1.11). Na sequência polimerizaram anidrido maleico (copolímero (2) na Figura 1.11) e a NIPAAm (copolímero (3) na Figura 1.11), também via RAFT. Entre os segmentos de PS e PNIPAAm ficou enxertado o anidrido maleico, o qual foi utilizado como sítio de reação para funcionalização com grupos azidas (N_3^+) (copolímero (4) na Figura 1.11). Finalmente, a ciclização do copolímero em bloco foi realizada por meio da reação do grupo azida com o grupo acetileno, empregando brometo de cobre e uma amina como catalisadores, dando origem a um copolímero anfifílico cíclico.

Figura 1.11: Polímeros sintetizados por Shi; Tang e Pan (2008) para preparação de copolímeros em bloco anfifílicos pela técnica de “click chemistry”.

Os copolímeros em bloco anfifílicos compreendem uma família especial dos copolímeros em bloco, pois consistem na ligação química de um segmento polimérico hidrofóbico com um segmento hidrofílico e esta arquitetura macromolecular permite que este tipo de material tenha uma larga aplicação na indústria farmacêutica, destacando-se liberação controlada de ativos e a terapia gênica (LETCHEFORD; BURT, 2007; ADAMS; et al., 2003).

A Tabela 1.7 ilustra as aplicações de alguns copolímeros em bloco anfifílicos na encapsulação de diferentes agentes ativos utilizados na indústria farmacêutica.

Tabela 1.7 - Aplicação de copolímeros em bloco anfifílicos na encapsulação de ativos. (Adaptada de TORCHILIN, 2007) Continua

Copolímero de Bloco Anfifílico	Ativo encapsulado
Poli(óxido de etileno)-b-Poli(óxido de propileno) (Pluronic®)	Doxorubicina
	Cisplatina
	Carboplatina
	Epirubicina
	Haloperidol
	ATP
	Polinucleotídeos
Pluronic®/Polietilenoimina	Antisense oligos
Policaprolactona-b-PEG	FK506
	L-685.818
	125-I
	Ciclosporina A
	17 beta-estradiol
Poli(delta-valerolactona)-b-PEG	Paclitaxel
Policaprolactona-b-PEG	Indometacina
	Cisplatina
	Paclitaxel
Poli(caprolactona/trimetileno carbonato)-PEG	Risperidona
	Elipticina
	Doxorubicina
Poli(ácido aspártico)-b-PEG	Cisplatina
	Lisozina
	Adriamicina
	Campotecina
Poli(ácido glutâmico)-b-PEG	Cisplatina
Poli(benzil-L-glutamato)-b-PEG	Clonazepan
Poli(D,L-ácido láctico)-b-metoxi-PEG	Paclitaxel
Poli(benzil-L-aspartato)-b-poli(hidroxi-óxido de etileno)	Testosterona
	Griseofulvina
	Indometacina
	Doxorubicina
	Adriamicina

Tabela 1.7 - Aplicação de copolímeros em bloco anfifílicos na encapsulação de ativos. (Adaptada de TORCHILIN, 2007) Conclusão

Poli(benzil-L-aspartato)-b-PEG	Doxorubicina
	Indometacina
	Anfotericina B
	Camptotecina
Poli(L-lisina)-b-PEG	DNA 125T
Poli(2-etil-2-oxazolina)-b-poli(ϵ -caprolactona)	Paclitaxel
Poli(2-etil-2-oxazolina)-b-poli(L-ácido láctico)	Doxorubicina
Poli(N-vinil-2-pirrolidona)-b-poli(D,L-ácido láctico)	Indometacina
PEG-lípido	Dequalinio
	Paclitaxel
	Camptotecina
	Tamoxifena
	Porfirina
	Vitamina K3
	Anfotericina B
	Clorina e6 trimetil éster
	Ftalocianina
PEG-PE/fosfatidocolina de ovo (micelas)	Paclitaxel
	Camptotecina
Poli(N-isopropilacrilamida)-b-poli(D,L-ácido láctico)	Miscelâneas
	Ftalocianina
	Paclitaxel
Poli(N-isopropilacrilamida)-poli(vinilpirrolidona)-poli(ácido acrílico)	Ketorolac
Poli(N-isopropilacrilamida)-b-poli(alquilmetacrilato)	Ftalocianina
	Doxorubicina
Poli(L-histidina)-b-PEG	Doxorubicina
Poli(L-ácido láctico)-b-PEG	Doxorubicina

1.7. Obtenção de Nanopartículas Inteligentes Empregando Copolímeros em Bloco

A natureza constrói estruturas químicas de alta complexidade e diversidade empregando poucas unidades químicas, como, amino ácidos, lipídeos e outros. Proteínas, por exemplo, são formadas por poucas unidades diferentes de aminoácidos (cerca de 20). Proteínas com estruturas terciárias e quaternárias bem definidas são formadas por segmentos de peptídeos. Aumentando em escala de complexidade, as células são produzidas em um número enorme de variedades e com funções específicas nos organismos. As funções celulares são executadas pela ação de poucas proteínas, mas com funções bem definidas (RODRÍGUES-HERNÁNDES; et al., 2005).

Os polímeros sintéticos podem ser preparados utilizando uma quantidade muito maior de monômeros quando comparada com a quantidade que a natureza utiliza na obtenção das macromoléculas naturais. A polimerização desses monômeros sintéticos permite a obtenção de homopolímeros e copolímeros com complexidades variadas e a engenharia macromolecular proporciona novas arquiteturas e formas moleculares diferentes. Entretanto, nenhuma dessas estruturas sintéticas exibem sofisticação e complexidade obtidas pela natureza com a simples combinação de 20 aminoácidos diferentes. O desenvolvimento de novos mecanismos de polimerização nesta última década, refinou as metodologias de preparação dos polímeros sintéticos, melhorando o controle da composição monomérica, massa molecular e arquitetura macromolecular, todavia sem se comparar com a complexidade das proteínas (HSIEH; QUIRK, 1996; MATYJASZEWSKI; DAVIS, 2002; PENCZEK, 1990; IVIN; SAEGUSA, 1984).

Recentemente, utilizando a técnica de auto-agregação (“self-assembly”) foi possível visualizar a possibilidade de se obterem estruturas de tamanhos nanométricos de maneira

rápida, em poucas etapas sintéticas e por meio de simples atrações físicas entre as macrocadeias, simulando as interações dos peptídeos nas proteínas. A principal característica desta técnica baseia-se na estrutura química dos polímeros sintéticos que permite o processo de auto-agregação somente com interações físicas entre as macrocadeias (sem ligações covalentes). Por meio desta técnica é possível obter, com eficiência e rapidez, estruturas nanométricas que seriam de difícil obtenção por técnicas convencionais. Dependendo da morfologia, tamanho e periodicidade, as estruturas obtidas por auto-agregação podem ou demonstram grande viabilidade de serem utilizadas em nanotecnologia (HAMLEY, 2003; LAZZARI; LÓPEZ-QUINTELA, 2003), materiais elastoméricos (HOLDEN; et al., 1996), eletrônicos (EDRINGTON; et al., 2001), tintas (BARADIE; SCHOICHET, 2002), cosméticos, lubrificantes, detergentes (LELE; LEROUX, 2002) e liberação controlada de ativos (DISHER; EISENBERG, 2002).

Dos vários processos de agregação, o mais estudado é o processo de auto-agregação de copolímeros em bloco ou copolímeros enxertados. A auto-agregação dos copolímeros em bloco no estado sólido leva a formação de “super látices” com escalas nanométricas e periodicidade nanométrica. O processo de auto-agregação é dirigido por duas forças coexistentes e paralelas. A primeira força consiste nas interações repulsivas os domínios incompatíveis de um copolímero em bloco. Por exemplo, Poli(estireno-b-isopreno) formam nanopartículas ou micelas nanométricas quando dispersos em tolueno. O núcleo das nanopartículas é formado por segmentos de poliisopreno e a casca por segmentos de poliestireno. Neste caso, o polímero anfifílico apresenta um domínio solúvel (poliestireno) e outro insolúvel (poliisopreno) e esta diferença de solubilidade em tolueno provoca as forças de repulsão. (RODRÍGUES-HERNÁNDES; et al., 2005; CANHAM; et al., 1980)

Os copolímeros anfífilicos estão sendo estudados pelo fato de poderem ser utilizados em uma importante gama de aplicações devido à suas propriedades de formação de agregados e micelas quando dispersos em solventes adequados, como mencionado anteriormente. Polímeros anfífilicos solúveis em água podem sofrer uma mudança conformacional em resposta a um estímulo externo, sendo que o tipo mais simples de agregação é exibida por copolímeros do tipo di-bloco que podem se auto reunir quando o núcleo (core) hidrofóbico é envolto pela casca (shell) hidrofílica solvatada. No entanto, em solução aquosa, copolímeros em bloco com diferentes hidrofilicidades podem formar agregados ao acaso, micelas ou até estruturas mais organizadas, como por exemplo lipossomos. (ALLEN; et al., 1999; GAUCHER; et al., 2005)

O processo de miscelização de um copolímero em bloco depende principalmente de dois fatores: a temperatura micelar crítica (CMT) e a concentração micelar crítica (CMC). (RODRIGUES-HERNANDES; et al., 2005)

Existem dois processos de preparação de nanopartículas pelo método de auto-agregação, o método de solubilização direta do copolímero em bloco e o método de diálise. A escolha do método depende da solubilidade do copolímero em bloco em água. Se o polímero é parcialmente solúvel em água o método mais indicado é a solubilização direta e se o polímero é muito pouco solúvel em água, o método que deve ser utilizado é o método de diálise, o qual é mais lento. (ALLEN, et al., 1999)

O método de solubilização direta consiste na solubilização do copolímero em bloco na água ou em uma solução de fosfato. Um exemplo de aplicação deste método é a micelização de copolímeros em bloco constituídos de poli(óxido de etileno)-b-poli(óxido de propileno)-b-poli(óxido de etileno) (PEO-b-PPO-b-PEO), o qual pode ser diretamente solubilizado em água formando micelas poliméricas. (KABANOV; et al., 1995) Já no método de diálise o

copolímero em bloco é solubilizado em um solvente orgânico, o qual é miscível em água. Após agitação, a solução polimérica é submetida à diálise, utilizando-se saco de diálise. Durante o processo de micelização o solvente é substituído pela água lentamente, induzindo à formação das nanopartículas. O tamanho e a distribuição de tamanhos das partículas obtidas via diálise, são influenciados pelo solvente orgânico utilizado. (ALLEN; et al., 1999) A Figura 1.12 demonstra os esquemas dos dois processos de micelização mencionados anteriormente.

Figura 1.12. Processos de auto-agregação de copolímeros em bloco.

A estrutura do tipo núcleo-casca (“core-shell”), obtida no processo de auto-agregação de copolímeros em bloco, apresenta um enorme potencial de aplicação nas áreas farmacêutica, cosmética e veterinária. Com esse tipo de estrutura formada pelo copolímero em bloco facilitou-se a utilização de princípios ativos hidrofóbicos ou lipofílicos em formulação que usa

como veículo a água. O núcleo hidrofóbico, formado na estrutura do tipo núcleo-casca, torna-se uma região que facilita a incorporação, dispersão e estabilização do princípio ativo hidrofóbico no meio aquoso em escala nanométrica, facilitando a biodisponibilização do ativo para o organismo. Enquanto isso, a camada hidrofílica estabiliza o núcleo hidrofóbico, evitando o processo de agregação do fármaco, além de proteger o princípio ativo do contato com outros componentes hidrofóbicos presentes nos organismos vivos, como por exemplo, proteínas ou parede celular. (WEI; *et.al.*, 2006; KATAOKA; *et.al.*, 2001) Vários estudos já foram desenvolvidos utilizando copolímeros em bloco anfífilicos do tipo poli(estireno-*b*-óxido de etileno) (ZHAO; *et al.*, 1990; WILHELM; *et al.*, 1991; XU; *et al.*, 1991), poli(estireno-*b*-ácido acrílico) (ZANG; EISENBERG, 1995; ZANG; YU; EISENBERG, 1996) e poli(estireno-*b*-ácido metacrílico) (MOFFITT; KHOUGAZ; EISENBERG, 1996) para a obtenção de nanopartículas com morfologias definidas pelas características físico-química dos copolímeros. Zang (ZANG; EINSERBERG, 1998) e Yu (YU; EISENBERG, 1998) obtiveram, em seus trabalhos, morfologias do tipo esférica, vesículas, tubular, dentre outras, empregando poli(estireno-*b*-ácido acrílico) e poli(estireno-*b*-óxido de etileno), respectivamente.

Geralmente, as nanopartículas do tipo núcleo-casca são obtidas a partir de copolímeros em bloco que não apresentam nenhum sistema de estímulo-resposta em função do meio externo. Com a descoberta dos polímeros estímulo-resposta surgiu a possibilidade de associação destes novos materiais com a tecnologia de geração de nanopartículas a partir de copolímeros em bloco, dando origem a sistemas capazes de responder a um estímulo externo. Esta resposta geralmente ocorre por meio de uma modificação de estrutura morfológica da nanopartícula. Desta forma, as nanopartículas podem exibir diferentes tipos de estímulos, no entanto, os mais estudados são temperatura e pH.(WEI; *et.al.*, 2006; LO; *et.al.*, 2005; GAUCHER; *et al.*, 2005; CHUNG; *et.al.*, 2000; CHUNG; *et al.*, 1999; HAY; *et al.*, 2004)

As nanopartículas obtidas por meio de auto-agregação de um copolímeros em bloco à base de PNIPAAm podem exibir diferentes a seguinte estrutura (CHAW; et al., 2004; CHUNG; et al., 1998). Em temperaturas a baixo da temperatura de transição (LCST) da PNIPAAm em água, as nanopartículas são normalmente constituídas de um núcleo e uma casca muito bem definidos. O núcleo pode ser formado por segmentos hidrofóbicos do copolímero de bloco, tais como: poli(metacrilato de butila) (CHUNG; *et al.*, 1999;), poliestireno (CHUNG; YOKOYAMA; OKANO, 2000), poli(γ -benzil-L-glutamato) (CHO; CHEON; JEONG, 1997) e poli(ácido láctico) (KIM; et al., 2000). Já a casca hidrofílica é formada pelos segmentos hidrofílicos, isto é, pelas cadeias de PNIPAAm solvatadas em água. O núcleo pode ser utilizado para a compartimentalização de um princípio ativo lipofílico. No entanto, quando a temperatura da água é superior à LCST, a camada de PNIPAAm perde a solubilidade, provocando a aglomeração das nanopartículas em água. Durante o processo de precipitação das cadeias de PNIPAAm sobre o núcleo da nanopartícula, ocorre a expulsão do princípio ativo do seu interior, porém de maneira controlada e pré-estabelecida. Esta mudança da estrutura núcleo-casca em resposta a uma variação da temperatura permite um controle exato do lugar ou posição em que as nanopartículas deverão se depositar por meio das interações entre a superfície das nanopartículas, agora hidrofóbica devido a precipitação da PNIPAAm, com a parede celular de um determinado tecido orgânico. Esta propriedade de resposta a estímulos característicos de nanopartículas derivadas de PNIPAAm pode ser utilizada com grande expectativa no tratamento de tumores malignos. (KUHORI; et al., 2002; CHUNG; *et al.*, 1999;)

No tratamento de tumores malignos são administradas altas doses de drogas para o rápido controle do crescimento exagerado das células doentes. Por outro lado, estas altas doses podem causar a morte de células sadias devido à falta de especificidade terapêutica do

princípio ativo, que não apresenta nenhum mecanismo físico-químico para diferenciar uma célula doente de uma célula sadia. Com isso, a possibilidade de compartimentalizar o princípio ativo no interior de uma nanopartícula, evitando o contato do ativo com as células sadias e por um mecanismo de estímulo-resposta (por exemplo temperatura) realizar a deposição da nanopartícula no tumor maligno, liberando de maneira controlada o princípio ativo no local desejado, diminuiria significativamente os efeitos colaterais de um tratamento quimioterápico como este. Esse processo é realmente um grande estímulo para toda comunidade científica, pois o aumento da eficiência do tratamento e a diminuição dos efeitos colaterais provocados pelas altas concentrações das drogas anti-câncer são evidentes. (WEI; *et.al.*, 2006)

O processo de liberação controlada de um princípio ativo em um tumor maligno ocorre por dois mecanismos distintos (ALLEN; MAYSINGER; EISENBERG, 1999; CHAW; *et al.*, 2004): o primeiro é chamado de mecanismo passivo de liberação e o segundo é o mecanismo de liberação estímulo-resposta. O mecanismo passivo de liberação já é definido pelo próprio nome, ou seja, as nanopartículas vão se acumulando no interior do tumor, pelas características físico-químicas das nanopartículas, e a droga é liberada por difusão de acordo com a porosidade da nanopartícula, conforme as características fármaco-cinéticas da droga ou ainda, no caso de nanopartículas biodegradáveis, de acordo com a velocidade de degradação das nanopartículas. Este tipo de mecanismo é favorecido no tratamento de tumores malignos devido ao efeito de aumento de permeação e retenção (EPR) característico de tecidos doentes. Este efeito consiste no aumento do espaçamento das células do tecido doente e de acordo com o tipo de tumor, o poro endotelial pode variar de 10 a 1000 nm. O aumento dos espaços entre as células é um recurso que o tecido doente utiliza para que ocorra um aumento da circulação sanguínea e conseqüentemente um maior fluxo de oxigênio é utilizado pelas células em multiplicação exagerada e sem controle (câncer). No entanto, com a utilização de

nanopartículas, o EPR atua como um coadjuvante na eficiência da liberação do princípio ativo no local desejado, pois as nanopartículas vão se acumulando no interior do tecido doente devido ao espaçamento entre as células doentes e posteriormente o ativo é liberado por difusão. (CHUNG; et al., 1999; WEI; et al., 2006; MAEDA; SEYMOUR; MIYAMOTO, 1992 ; MATSUMURA; MAEDA, 1986)

No segundo mecanismo de liberação controlada de drogas característico de nanopartículas que sejam formadas por polímeros termosensíveis a liberação é provocada pela resposta da nanopartícula à um aquecimento da região doente ou do próprio tumor (mecanismo estímulo-resposta). Os sistemas termosensíveis mais estudados são aqueles que empregam como polímero sensível a temperatura a PNIPAAm. No caso em que se aplica a PNIPAAm como material termosensível o tumor é aquecido por hipertermia (radio frequência) à uma temperatura superior à LCST da PNIPAAm, fazendo com que as nanopartículas que estavam circulando pela corrente sanguínea de maneira estável precipitem na região aquecida, devido a perda de solubilidade da camada hidrofílica (PNIPAAm) da estrutura núcleo-casca. Além da possibilidade de direcionar externamente a região na qual as nanopartículas devem ser depositadas, o processo de precipitação da PNIPAAm sobre o núcleo aumenta a afinidade da superfície da nanopartícula com as paredes celulares e ainda com a mudança da estrutura núcleo-casca ocorre um aumento na taxa de liberação do princípio ativo do interior das nanopartículas. (CHUNG; et al., 1997; CHUNG; et al., 1998; CHUNG; et al., 1999; CAMMAS; et al., 1997; KOHORI; et al., 1999; WEI; et al., 2006; LO; et al., 2005; CHUNG; et al., 2000) Este aumento da taxa de liberação do princípio ativo foi demonstrado por Chung e colaboradores (CHUNG; et. al. 1999) em um trabalho realizado com nanopartículas constituídas por copolímero em bloco de poli (metacrilato de butila-b-N-isopropilacrilamida). Neste trabalho os autores encapsularam adriamicina, um agente anti-câncer, e realizaram os

testes de liberação da droga em duas temperaturas diferentes, ou seja, uma abaixo da LCST (4°C) e outro acima da LCST (40°C). A Figura 1.13 foi proposta pelos autores para demonstrar o princípio de encapsulação do ativo pelas micelas poliméricas e o mecanismo de agregação das nanopartículas em função da perda de solubilidade e precipitação da PNIPAAm e a liberação do ativo. Na Figura 1.14, é apresentada a taxa de liberação da droga do interior das nanopartículas. Como é possível observar nesta figura, a taxa de liberação da droga aumentou significativamente quando a temperatura passou de 4 para 40°C e diminuiu novamente com o decréscimo da temperatura. Esta variação na taxa de liberação em função da variação da temperatura para estas nanopartículas termosensíveis foi chamado pelos autores de estado ativado/desativado (*on-off*) de liberação.

Figura 1.13. Controle das interações entre micelas poliméricas formadas por PBMA-*b*-PNIPAAm e células mediante variação de temperatura. (Adaptado de CHUNG; et. al. 1999)

Figura 1.14. Liberação controlada da adriamicina pelas nanopartículas termossensíveis, formadas por PBMA-b-PNIPAAm, nas temperaturas de 4 e 40 °C. (CHUNG; et al., 1998)

Cho; *et al.*, (1997) mostraram que copolímeros em bloco formados de poli(γ -benzil L-glutamato-b-N-isopropilacrilamida) formavam estruturas do tipo núcleo-casca em meio aquoso. O copolímero em bloco foi obtido pela reação de acoplamento da PNIPAAm funcionalizada com grupo terminal amina com o poli(γ -benzil L-glutamato) funcionalizado com um anidrido. Os copolímeros em bloco sintetizados tinham massas moleculares entre 31500 e 50000 g/mol. As nanopartículas foram obtidas por meio de diálise e apresentaram diâmetro médio de 70, 350 e 360 nm na temperatura de 28°C.

Kim; et al., (2000) prepararam nanopartículas constituídas respectivamente de poli(l-ácido láctico) e poli(N-isopropilacrilamida), para utilização em liberação controlada de indometacina. Inicialmente os autores sintetizaram PNIPAAm com grupos amínicos terminais

em meio de hidrocloreto de 2-aminoetanotiol. Em seguida, sintetizaram o copolímero em bloco, em meio orgânico, através da reação entre os grupos amínicos terminais do PNIPAAm com os grupos carboxílicos do poli(1-ácido láctico) utilizando como agente ativador a N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (Figura 1.15). Finalmente, as nanopartículas foram preparadas pelo método de diafiltração, utilizando um saco de diálise para troca do solvente orgânico (dimetilformamida) pela água. O diâmetro médio de partícula foi de 30 a 50 nm empregando microscopia eletrônica de transmissão. Os autores utilizaram este sistema polimérico para encapsular indometacina e avaliar as propriedades termosensíveis das nanopartículas na liberação controlada do ativo. A eficiência de encapsulação obtida pelos autores foi de 26% e o perfil de liberação da indometacina foi influenciado pela temperatura, obtendo-se os maiores valores de liberação nas temperaturas acima da LCST da PNIPAAm.

Para preparar nanopartículas do tipo núcleo-casca, CHUNG; et al., (1998) sintetizaram três polímeros a base de N-isopropilacrilamida, como demonstra a Figura 1.16. Segundo os autores as reações de acoplamentos (reações A e C) tiveram 100% de rendimento. As massas moleculares dos polímeros obtidos nas condições da reação A, B e C foram de 7600, 8600-12600 e 46700. As nanopartículas foram obtidas por micelização direta, nos casos dos polímeros em bloco obtidos nas condições das reações A e B e diálise no caso do copolímero em bloco a base de PS. Os melhores copolímeros para a preparação de nanopartículas foram aqueles obtidos na forma de blocos (reações A e C), pois os segmentos de PNIPAAm apresentam maior mobilidade para estabilização da morfologia núcleo-casca, quando comparados com o copolímero randômico obtido nas condições da reação B.

Figura 1.15. Síntese do copolímero em bloco constituído por PLA-b-PNIPAAm. (Adaptado de Kim; et al, 2000)

ou PS como segmentos hidrofóbicos. Estes polímeros foram obtidos por polimerização convencional na presença de mercaptanas. A PNIPAAm foi polimerizada na presença de uma mercaptana que continha uma hidroxila como grupo e o PBMA e o OS foi polimerizado na presença de uma mercaptana que continha um grupo carboxílico. Os copolímeros em bloco foram obtidos por esterificação entre grupos hidroxilas terminais da PNIPAAm com grupos carboxílicos do PBMA ou PS. Após a obtenção dos copolímeros em bloco as nanopartículas foram preparadas por diálise a 20°C por 24 horas. Neste trabalho os autores encapsularam e realizam testes de liberação controlada de um agente anti-câncer (adriamicina) e o resultado mais importante encontrado pelos autores, além da possibilidade de liberar controladamente o ativo, foi a influencia da Tg do segmento hidrofóbico na taxa de liberação da droga. Segundo os autores quanto maior a Tg do polímero hidrofóbico menor era a taxa de liberação do ativo. Neste caso as nanopartículas obtidas pela miscelização do PBMA-b-NIPAAm apresentaram maior taxa de liberação do ativo do que as nanopartículas obtidas com PS-b-NIPAAm. Sendo assim, quando se desejam taxas de liberação maiores é necessário a utilização de um copolímero em bloco que contenha um segmento hidrofóbico com baixa Tg, caso contrário, utiliza-se um segmento com Tg alta, como por exemplo PS (Tg próxima de 100°C).

Kohori; et al., (2002) também estudaram a encapsulação de adriamicina por nanopartículas termosensíveis. Neste trabalho os autores sintetizaram copolímeros em bloco contendo copolímeros de NIPAAm e dimetilacrilamida (DMAAm) como segmento hidrofílico e Poli(D,L ácido láctico) como segmento hidrofóbico. Os autores concentraram seus estudos na determinação da eficiência de encapsulação da adriamicina neste tipo de nanopartículas e obtiveram informações do tipo: a relação ideal de água/solvente na diálise para a melhor eficiência de encapsulação é de 40% de água inicialmente colocada na solução de copolímero

em bloco; a melhor temperatura para a diálise é de 20°C e quanto maior a quantidade de adriamicina inicial maior é a eficiência de encapsulação.

Dufresne; et al., (2004) sintetizaram diferentes copolímeros tendo como base monomérica a NIPAAm. Dentre os copolímeros preparados por estes autores, merece destaque aquele preparado com NIPAAm, ácido metacrílico e vinil-2-pirrolidona, utilizando um iniciador do tipo azo, o 4,4'-azobis(4-ciano-N-N'-dioctadecila) pentanamida (DODA). Este iniciador permitiu a formação de copolímero anfifílico do tipo P(NIPAAm-co-MAA-VP)-b-DODA, pois na extremidade de cada cadeia encontrava-se pendente um grupo octadecila proveniente do iniciador. Este copolímero foi empregado na encapsulação de cloreto de ftalocianina alumínio (AlClPc) e sua citotoxicidade foi avaliada em modelos tumorais. Em particular, estas micelas poliméricas foram desenvolvidas como uma alternativa para os "clássicos" surfatantes de baixo peso molecular (por exemplo: polissorbatos ou óleo de rícino modificado com poli(óxido de etileno) (Cremophor[®] EL)) devido sua baixa toxicidade e alta capacidade de armazenamento de drogas. Além disso, o sistema núcleo-casca obtido pela associação hidrofóbica do polímero anfifílico, geralmente apresenta uma baixa concentração de associação crítica (CAC), o que resulta em uma extraordinária estabilidade em solução. A formação micelar pode de fato ser induzida com sucesso por interações eletrostáticas entre polímeros com cargas opostas e drogas macromoleculares, como por exemplos, oligonucleotídeos e plasmídeo de DNA e não somente por interações hidrofóbicas para formar as chamadas micelas de poli-íons complexos (PICM), sendo que este novo tipo de micela polimérica deve acabar com diversos problemas encontrados na terapia gênica. Segundo Dufresne; et al., (2004) os derivados da PNIPAAm podem ser uma alternativa segura e potencial em relação ao Cremophor[®] EL para a solubilização de drogas hidrofóbicas.

Realizando testes *in-vivo*, os pesquisadores demonstraram que as micelas à base de PNIPAAm contendo o AICIPc foram mais eficientes do que seu equivalente Cremophor[®] EL no tratamento de um modelo de tumor mamário em ratos.

Wei; et al., (2007) prepararam nanopartículas do tipo núcleo-casca empregando a técnica de micelização de Poli(NIPAAm-b-metacrilato de metila). Neste estudo os autores encapsularam um agente anti-inflamatório (acetato de prednisona) e realizaram testes de liberação controlada deste princípio ativo. Os autores avaliaram se este sistema nanométrico apresentava o mecanismo de estímulo-resposta provocado pela coalescência da PNIPAAm com o aquecimento (estado ativado/desativado - “on-off”). Os autores determinaram a CAC do copolímero em bloco, encontrado um valor de 50 mg/L e apresentaram imagens de TEM das nanopartículas. O diâmetro médio de partículas foi 190 nm. Demonstraram que quando a temperatura foi variada de 24 para 40°C cerca de 45% da droga foi liberada em 3 horas, enquanto, que a 24°C, apenas 15% da droga encapsulada foi liberada em 2 horas.

Outros trabalhos publicados recentemente apresentam a viabilidade de formação de nanopartículas termosensíveis empregando copolímeros em bloco contendo a PNIPAAm, como por exemplo os trabalhos de Lo; et al., (2005), Wei; et al., (2006), Choi; et al., (2006), (Lo); et al., 2007, Wei; et al., (2007), Liu, et al., (2007), Wei; et al., (2008), Wang; et al., (2008), Kelarakis; et al., (2008).

O trabalho que será apresentado neste parágrafo é aquele que melhor valida a idéia dessa tese, pois os autores prepararam nanopartículas via auto-agregação de copolímeros de Poli(ácido láctico) (PLA) e P(NIPAAm-co-ácido metacrílico). (LO; et al., 2005) O copolímero sintetizado neste trabalho é diferentes daqueles apresentados até este momento, pois neste caso os blocos do copolímero foram obtidos por enxertia do PLA no P(NIPAAm-co-ácido

metacrílico). Neste trabalho os autores chamaram o sistema de nanopartículas inteligentes do tipo núcleo-casca, ou seja, as nanopartículas apresentavam sensibilidade a estímulos de temperatura e pH simultaneamente, além de apresentarem um segmento biodegradável pela presença do PLA. Os copolímeros em bloco foram preparados em uma seqüência reacional, como mostrado na Figura 1.17, iniciando-se pela polimerização do D,L lactato, para formação do PLA. Em uma segunda etapa, os autores reagiram na extremidade da cadeia do PLA uma molécula insaturada (cloreto de acila) e em seguida polimerizaram a NIPAAm e ácido metacrílico (MAA) formando o copolímero em bloco. Os autores prepararam 7 copolímeros em bloco com razões monoméricas diferentes. As massas moleculares (M_n) dos copolímeros sintetizados variaram de 8300 a 16500 g/mol. As nanopartículas foram preparadas utilizando-se o processo de diálise. Os autores encapsularam um princípio ativo, o 5-Fluorouracil (5-F), com uma eficiência de encapsulação de aproximadamente 20%. Foi avaliada temperatura de transição vítrea - T_g em função da composição monomérica e os resultados para os sete copolímeros foram muito parecidos, em torno de 46 a 47 °C. Os autores avaliaram a influencia do MAA na LCST de quatro copolímeros com quantidades diferentes deste monômero. Neste estudo os autores demonstraram que quanto maior a quantidade de MAA incorporada no copolímero maior era a LCST. Este resultado foi explicado com o grau de solvatação das cadeias em função do aumento da incorporação de monômero hidrofílico (MAA) no copolímero. O diâmetro médio de partícula (DP) e eficiência de encapsulação da droga foram avaliados em função da quantidade de água inicial no processo de diálise e os autores perceberam que quanto maior a quantidade de água adicionada como cosolvente na diálise menor era o diâmetro das partículas, chegando a obter nanopartículas com 30nm de diâmetro médio. A eficiência de encapsulação apresentou o maior valor (21%) com a utilização de 30% de água utilizada como cosolvente no processo de diálise. No entanto, a maior contribuição

deste trabalho foram os resultados de liberação controlada do 5-F em água. Com os resultados, os autores demonstraram o duplo mecanismo estímulo-resposta das nanopartícula, pois mesmo em temperaturas acima da LCST da PNIPAAm, a variação do pH controlou a taxa de liberação do ativo (Figura 1.18). Neste caso, as nanopartículas responderam ao outro estímulo, o pH, pois como demonstrado pelos autores, em $\text{pH} = 7,4$, a casca, formado por NIPAAm e MAA, estava solúvel e estabilizou as nanopartículas devido à ionização dos grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) do MAA e a liberação só ocorreu quando o pH foi diminuído para 5,4. Nesta situação, os grupos COOH não estavam ionizados, a camada hidrofílica (casca) perdeu a solubilidade em água, precipitou sobre o núcleo da nanopartícula e provocou um aumento da velocidade de liberação da droga. Sendo assim, os autores demonstraram que nanopartículas núcleo-casca, onde a casca é formada por copolímeros sensíveis à variações de temperatura e pH, apresentam dois mecanismos de estímulo-resposta, conferindo maior versatilidade ao processo de liberação do princípio ativo. A Figura 1.18 apresenta o perfil de liberação controlada, em pHs diferentes, da 5-F pelas nanopartículas “inteligentes”, na temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (acima da LCST da PNIPAAm).

Figura 1.17. Mecanismo empregado por Lo; et al., (2005) para síntese do PLA-g-Poli(NIPAAm-co-MAA)

Figura 1.18. Liberação controlada da 5-F pela nanopartícula termo-pH sensível, na temperatura de 37°C . (LO; et.al., 2005)

CAPÍTULO II

Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Reagentes

Foram sintetizados dois agentes de transferência de cadeia, o ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico (PTETPA) e o ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico (PTTPA). Nas sínteses destes CTAs foram utilizados os seguintes reagentes: tetrahidrofurano (THF) (99%, Carlo Erba), destilado na presença de fios de sódio e benzofenona, dissulfeto de carbono (99%, Aldrich), bromobenzeno (99%, Aldrich), clorobenzeno (99,8%, Aldrich), bromo fenil benzeno (99,5%, Aldrich), éter etílico (99,5%, Vetec), todos previamente destilados em pressão atmosférica. Foram utilizados também, ácido 2-bromopropanóico (99%, Aldrich), acetato de etila (99,5%, Vetec), cloreto de sódio, sulfato de magnésio (99%, Merck), carbonato de sódio, ácido clorídrico (37%, Merck) e magnésio (99,5% Vetec), lavado com THF anidro e posteriormente seco em estufa com circulação de ar a 60°C. 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN) (grau industrial, Dupont), n-isopropilacrilamida (97%, Aldrich) foi utilizado como iniciador de polimerização, tolueno (99,99%, Carlo Erba), hexano (99,9%, Vetec), ácido acrílico (grau industrial, cedido gentilmente pela Rhodia Brasil), 1,4-dioxano (99,5, Anidrol), trioxano (99%, Aldrich), clorofórmio deuterado (99,8%, Aldrich), água deuterada (99,9%, Aldrich) e brometo de tetrabutilamônio (99%, Aldrich).

Na síntese dos copolímeros em bloco foi utilizado PHBHV fornecido pela PHB Industrial S.A.. O PHBHV foi submetido a um processo de redução de massa molecular. Este processo de redução de massa molecular foi realizado por Montoro, (2005) em seu trabalho de dissertação de mestrado. Clorofórmio (Anidrol) foi utilizado como solvente de reação e como

ativadores de reação foram utilizados 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) (grau analítico, Aldrich), diciclohexilcarbodiimida (99%, DCC) (Aldrich), N-hidroxisuccinimida (NHS) (99%, Aldrich) e dimetiaminopiridina (99%, DMAP) (Aldrich). Nos ensaios de encapsulação e liberação controlada foi utilizado o acetato de dexametasona (99%, Henrifarma) como ativo modelo.

A Figura 2.1 apresenta a estrutura química dos principais reagentes utilizados e dos produtos intermediários obtidos neste trabalho.

Figura 2.1. Estrutura química dos principais reagentes e dos produtos intermediários utilizados nas sínteses dos copolímeros em bloco. Continua

Figura 2.1. Estrutura química dos principais reagentes e dos produtos intermediários utilizados nas sínteses dos copolímeros em bloco. (Conclusão)

As Figuras 2.2 e 2.3 ilustram os espectros de RMN ^1H da NIPAAm e do AA, respectivamente. Com esta caracterização foi possível identificar todos os sinais referentes a cada próton das moléculas da NIPAAm e do AA. Para a NIPAAm os sinais foram os seguintes: sendo eles: δ 1,1 ppm, duplete referente aos grupos CH_3 do grupo isopropila; δ 4,2 ppm, multiplete referente ao CH do grupo isopropila; δ 5,6 ppm, duplete referente ao próton do carbono alfa; δ 6,1 e 6,3 ppm, sinais referentes aos prótons do carbono beta. No caso do AA, os sinais dos prótons na caracterização por RMN ^1H foram: δ 5,9 e 6,1 ppm, dupletos e quadruplete referentes aos prótons do carbono beta; δ 6,5 ppm, duplete referentes ao próton do carbono alfa e em δ 11,7 ppm, singlete referente ao próton da hidroxila do grupo carboxílico.

Figura 2.2. Espectro de RMN ^1H da NIPAAm purificada.

Figura 2.3. Espectro de RMN ^1H do Ácido acrílico.

Os monômeros também foram caracterizados via FTIR. As Figuras 2.4 e 2.5 ilustram os espectros de FTIR da NIPAAm e do AA, respectivamente.

Figura 2.4. Espectro de Infra-Vermelho (FT-IR) do monômero NIPAAm.

Figura 2.5. Espectro de Infra-Vermelho (FT-IR) do monômero AA.

Neste trabalho foram empregadas três diferentes amostras de PHBHV hidrolisados. Estas amostras foram caracterizadas por RMN ^1H , GPC e índice de hidroxilas. A concentração dos grupos hidroxila presentes na extremidade da cadeia polimérica do PHBHV, foi obtida pela técnica de titulação em meio orgânico, nas presenças de uma solução acilante e de um indicador de coloração. Este trabalho foi desenvolvido em uma dissertação de mestrado realizada no Laboratório de Polímeros da Escola de Engenharia de Lorena – USP pelo aluno Sérgio Roberto Montoro. (MONTORO, 2005)

Abaixo, na Tabela 2.1, estão os resultados de massa molecular numérica e os resultados da titulação das amostras de PHBHV hidrolisado.

O PHBHV também foi caracterizado por RMN ^1H . O espectro do PHBHV obtido é mostrado na Figura 2.6. Por meio deste espectro o PHBHV foi identificado pelos seus deslocamentos característicos, sendo: δ 0,9 ppm, quadrupeto referente aos grupos CH_3 do grupo valerato; δ 1,2 ppm, dupeto referente ao CH_3 do grupo butirato; δ 1,70 ppm, singleto referente ao CH_2 do grupo valerato; δ 2,3-2,8 ppm, multipeto referente ao CH_2 ; δ 5,2 ppm, multipeto referente ao CH.

Tabela 2.1 – Massa molecular, índice e porcentagem de hidroxilas de amostras de PHBHV hidrolisado.

Amostra	M_n [g/mol]	IOH – índice de hidroxilas [mg KOH/g de polímero]	% OH
PHBHV-1	7973	83.48	2.53
PHBHV-2	9447	53.49	1.7
PHBHV-3	15747	47,11	1,42

Figura 2.6. Espectro de RMN ^1H do PHBV utilizado nas sínteses de copolímeros em bloco.

Equipamentos

- Ressonância magnética nuclear (RMN)

O equipamento utilizado nas caracterizações químicas por RMN foi da marca Varian, modelo Oxford 300, locado no Laboratório de Química Fina da EEL-USP.

- Espectrofotometria de Ultra-Violeta

O equipamento utilizado nesta caracterização foi da marca Varian modelo Cary 50 CONC, locado no Laboratório de Biocatálise da EEL-USP.

- Espectroscopia por Infravermelho (FTIR)

Na caracterização via espectroscopia de Infra-vermelho (FTIR) foi utilizado um equipamento da marca Perkin Elmer modelo Spectrum One, locado no Laboratório de Química Fina da EEL-USP.

- Espalhamento de Luz

Neste tipo de caracterização foi utilizado um equipamento da marca Malvern modelo Zetasizer 1000.

- Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Nesta técnica de caracterização foram utilizados dois equipamentos, um da marca Viscotek, modelo TDA 302 com detector de UV da marca Viscotek modelo 2501 e injetor manual da marca Waters modelo 510, outro da Waters, modelo Breeze com detector RI modelo 2414 e injetor automático 717, ambos equipados com um jogo de colunas da marca Phenomenex com porosidades de 120 Å, 250 Å e 500 Å.

- Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Na caracterização das nanopartículas por TEM foi utilizado um equipamento da marca Philips modelo CM120 com uma voltagem de 80kV.

- Turbidimetria

Na determinação de transmitância das amostras de suspensões de nanopartículas foi utilizado um equipamento de medidas de turbidez da marca Turbiscan, modelo Lab.

Foram utilizados ainda os seguintes equipamentos: evaporador rotativo da marca Fisatom, modelo 802; liofilizador da marca Liobras, modelo L101; bomba de alto vácuo da marca Edwards, modelo E2M18; balança analítica da marca Ohaus, modelo E12140; placa de agitação e aquecimento da marca Fisatom, modelo 752A; banho termostático da marca Haake; modelo DC 10; e o pHmetro digital da marca Gehaka, modelo PG2000.

2.2. Métodos

2.2.1. Purificação da n-isopropilacrilamida (NIPAAm)

A NIPAAm foi purificada por recristalização em uma mistura de tolueno/hexano, na proporção 60/40 (v/v), de acordo com a seguinte metodologia: 10 g de NIPAAm foram dissolvidos em 100 mL da mistura de solventes. A solução foi colocada no congelador para a

recristalização do monômero. Os cristais foram filtrados em filtro de vidro sinterizado (Porosidade 0), e secos sob altovácuo durante 11 horas a temperatura ambiente.

2.2.2. Purificação do Ácido Acrílico (AA)

O AA foi purificado por destilação a pressão reduzida, utilizando a bomba de alto vácuo a uma temperatura de 30°C.

2.2.3. Purificação do 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN)

O AIBN foi purificado por recristalização em etanol absoluto, de acordo com a seguinte metodologia: 7 g de AIBN foram dissolvidos em 70 mL de etanol absoluto e colocados sob agitação e refluxo por 30 minutos a uma temperatura de 45°C. Em seguida a solução foi resfriada e após 1 hora de resfriamento os cristais foram filtrados em filtro de vidro sinterizado (Porosidade 0) e secos a vácuo (bomba de alto vácuo) durante 11 horas a temperatura ambiente.

2.2.4. Secagem do THF

O THF foi submetido a um processo de secagem utilizando sódio metálico e benzofenona (indicador). A secagem do THF foi realizada de acordo com a seguinte metodologia: em um balão de 1000 mL foram colocados 500 mL de THF, sódio metálico e benzofenona. O sistema foi mantido sob agitação magnética e aquecimento na temperatura de

ebulição do THF (refluxo) até apresentar coloração azul. Em seguida, o THF foi destilado sob pressão atmosférica e transferido para o meio reacional utilizando seringa de vidro.

2.2.5. Secagem do 1,4-dioxano

O 1,4-dioxano foi primeiramente deixado sob refluxo na presença de hidreto de lítio e alumínio (AlLiH_4) por 30 minutos e posteriormente destilado, ainda na presença deste hidreto, para remoção da água.

2.2.6. Obtenção do reagente de Grignard

Para a obtenção dos CTA's foram preparados três reagentes de Grignard, bromo fenil magnésio, bromo benzil magnésio e o cloro benzil magnésio. Foi montado um sistema com balão de fundo redondo de 50mL e funil de adição de 125mL, em atmosfera de nitrogênio. No balão foi colocado 0,0195 mol de raspas de magnésio, previamente secas em estufa (60°C). Para eliminar possíveis impurezas bem como a presença de água, o magnésio foi lavado com THF anidro. Após a lavagem foram adicionados ao balão 3mL de THF anidro e um cristal de iodo, com agitação constante. Adicionaram-se, lentamente, 0,0189mol do composto orgânico halogenado, previamente destilado. Agitando-se a mistura reacional por aproximadamente 5 horas à temperatura ambiente.

2.2.7. Síntese do ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico (PTETPA)

Todas as reações de síntese do agente de transferência de cadeia PTETPA foram realizadas em meio a THF anidro e atmosfera de nitrogênio. Em um balão de fundo redondo e em banho de gelo, foi adicionado dissulfeto de carbono (1,5 mL; 0,026 moles), THF anidro (10mL), com agitação constante. Ao balão de fundo redondo foi adaptado um funil de adição, onde foi colocado lentamente o composto de Grignard (cloreto de fenil magnésio, 0,0189 mol). Após a adição do composto de Grignard, o sistema foi deixado para reagir durante 45 minutos, e logo após foi então adicionado o ácido 2-bromopropanóico (1,53 mL; 0,017 moles), e a reação foi mantida por 48 horas. Após as 48 horas de reação o produto obtido foi purificado de acordo com a seguinte metodologia: em um funil de decantação, o produto foi lavado, primeiramente, com 50mL de acetato de etila e posteriormente com três frações de 50mL de água destilada. Em seguida, o produto foi lavado com 70mL de uma solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio (grau de pureza 99%), que foi adicionado em excesso até o aparecimento de uma dispersão fina deste reagente no meio reacional (pré-secagem). Filtrou-se o resíduo sólido (MgSO_4), que foi lavado com acetato de etila. O filtrado foi evaporado em rotaevaporador sob vácuo, até obtenção de uma solução viscosa do produto. Após esta etapa, foi feita a secagem utilizando-se a bomba de alto vácuo, durante três horas na temperatura ambiente.

Devido a presença de ácido residual e outras impurezas, foi continuado o processo de purificação: foram adicionados 75mL de éter etílico, pois o produto é solúvel neste solvente. O produto foi lavado adicionando-se oito frações de 50mL de uma mistura 1:1 de água e solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), onde o produto na forma de sal passa para a fase

aquosa (límpida). A fase aquosa foi lavada com 200mL de éter e foi deixado separar as duas fases, para retirada de qualquer resíduo orgânico que fosse insolúvel em água. Acidificou-se a fase aquosa com ácido clorídrico concentrado até aproximadamente pH 1,0 (a adição do ácido foi feita lentamente para evitar transbordamento do meio reacional). Em pH 3,0 observou-se o meio reacional com uma coloração amarela/esbranquiçada, indicando a formação de cloreto de sódio. Em pH 1,0 foi verificado o aparecimento de um óleo avermelhado. O meio reacional foi transferido para um funil de decantação onde foi adicionado 200mL de solução de ácido acético, pois o CTA, na forma ácida, é insolúvel em água, passando para a fase orgânica. Finalmente, o produto foi colocado para secar, primeiramente em evaporador rotativo e posteriormente em um balão, utilizando bomba de alto vácuo. Após todo o procedimento de purificação descrito acima o produto foi caracterizado por RMN ^1H .

2.2.8. Síntese do ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico (PTTPA)

Em um balão de fundo redondo de capacidade de 50mL e em banho de gelo, foram adicionados 2,16g de dissulfeto de carbono (0,028 mol), e 10mL de THF anidro, com agitação constante. Ao balão de fundo redondo foi adaptado um funil de adição no qual foi colocado o composto de Grignard obtido anteriormente (brometo de benzil magnésio, 0,0189 mol). Esse composto foi adicionado lentamente sobre o dissulfeto de carbono sob agitação, em banho de gelo e atmosfera de nitrogênio. Deixou-se reagir por 45 minutos e após este tempo, foram adicionados 2,89g do ácido 2-bromopropanóico (0,0189 mol). A reação ficou sob agitação por aproximadamente 48 horas, à temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio. Após este tempo, o produto bruto obtido foi caracterizado por RMN ^1H . O produto bruto foi purificado

de acordo com a seguinte metodologia: utilizando um funil de decantação, o produto bruto foi lavado com 50mL de acetato de etila, e três frações de 50mL de água destilada, levando à formação de uma fase orgânica. Esta fase orgânica foi lavada com 70mL de uma solução saturada de cloreto de sódio. Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio (grau de pureza 99%), o qual foi adicionado em excesso até o aparecimento de uma dispersão fina deste sal no meio reacional. O MgSO_4 foi separado por filtração e lavado com acetato de etila. O filtrado foi concentrado, pela evaporação dos solventes (Acetato de etila e THF), em rota-evaporador (evaporação sob vácuo) e na temperatura ambiente, até obtenção de uma solução viscosa. Após a evaporação, o produto foi seco utilizando-se uma bomba de alto vácuo na temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 75mL de éter etílico a este produto seco, transferindo-se esta solução para um funil de separação. Lavou-se esta fase etérea com oito frações de 50mL de uma mistura 1:1 de água e solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), onde o PTTPA, na forma de sal passou para a fase aquosa (límpida). A fase aquosa foi lavada com 200mL de éter etílico, para a retirada de qualquer resíduo orgânico que seja insolúvel em água. Transferiu-se a fase aquosa para um erlenmeyer e acidificou-se com ácido clorídrico concentrado até aproximadamente pH 1,0 (a adição do ácido foi feita lentamente para evitar transbordamento do meio reacional). Transferiu-se esta mistura para um funil de decantação onde foi adicionado 200mL de acetato de etila, pois o PTTPA, agora na forma ácida é insolúvel em água, e passa para a fase orgânica. Secou-se esta fase orgânica com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente sob alto vácuo e em temperatura ambiente, obtendo-se o PTTPA.

2.2.9. Polimerização via radical livre viva (*Mecanismo RAFT*)

Polimerizações: Sínteses da PNIPAAm e dos copolímeros PNIPAAmAA

As polimerizações foram realizadas em um reator encamisado, de capacidade igual a 100 mL (Figura 2.7). As reações foram conduzidas sob atmosfera de nitrogênio ou hélio e agitação magnética em temperaturas previamente definidas entre 60 e 80°C. Primeiramente o reator foi carregado com o monômero (ou os monômeros no caso das copolimerizações), o CTA e o padrão interno (trioxano), quando empregado, e em seguida foi adicionado aproximadamente 75% do volume total de solvente (por exemplo o dioxano) e purgou-se o sistema com o nitrogênio durante 20 minutos. Enquanto isso, o iniciador (AIBN) foi pesado separadamente e solubilizado nos 25% restantes do volume total de solvente e purgado com o gás durante 20 minutos. Atingida a temperatura desejada, a reação foi então iniciada pela adição da solução de iniciador ao meio reacional. A quantidade de iniciador utilizada nas reações foi calculada em função da quantidade de CTA. As formulações e condições experimentais empregadas nas sínteses dos polímeros via RAFT estão apresentadas juntamente com os resultados. Para o estudo cinético foi utilizado trioxano como padrão interno. A massa de trioxano foi determinada empregando a equação 2.1.

Figura 2.7. Sistema de polimerização utilizado nesta etapa do projeto.

Cálculo da Massa Molecular teórica

As formulações de cada reação foram definidas a partir da massa molecular teórica desejada, empregando-se a seguinte equação: (D'AGOSTO, *et.al.*, 2003)

$$Mn = \frac{[M].MM_M.X}{[CTA]} + MM_{CTA} \quad (2.1)$$

Onde:

Mn = Massa Molecular numérica média teórica;

[M] = concentração do monômero (mol/L);

[CTA] = concentração do CTA (mol/L);

MM_M = massa molecular do monômero (g/mol);

X = conversão da reação de polimerização;

MM_{CTA} = massa molecular do CTA (g/mol).

Determinação da massa de padrão interno (Trioxano)

A massa de padrão interno utilizada nas reações foi determinada em função do número de moles do monômero e do número de prótons do padrão interno, para uma equivalência de área de picos nos espectros de ^1H RMN:

$$N_{\text{PI}} = \frac{N_{\text{M}}}{H_{\text{PI}}} \quad (2.2)$$

Onde:

N_{PI} = Número de moles do padrão interno;

N_{M} = Número de moles do monômero;

H_{PI} = Número de prótons do padrão interno (6 para o trioxano)

2.2.10. Estudo da cinética de polimerização por RMN ^1H

A cinética das reações de polimerização foi estudada empregando-se a técnica de RMN ^1H , através de amostras coletadas em diferentes tempos de reação. Ao serem retiradas do meio reacional, as amostras eram introduzidas em banho de gelo e pequenas alíquotas destas amostras eram solubilizadas em um solvente adequado (clorofórmio deuterado ou deutério), e submetidas às análises.

O cálculo das conversões foi realizado por dois métodos diferentes. No primeiro método, o sinal referente ao deslocamento correspondente aos prótons do trioxano (5,1 ppm) foi integrado e à sua área foi atribuído o valor 1,00. Com este valor de área como referência, foi integrado o sinal correspondente ao deslocamento do próton da dupla ligação dos monômeros (5,6 ppm) (Figura 2.8). Os valores das áreas obtidas por integração dos prótons da dupla ligação diminuem ao longo da reação, indicando assim o consumo dos monômeros e

formação dos polímeros. No segundo método, o sinal referente ao deslocamento correspondente aos grupos CH₃ da NIPAAm (1,2 ppm) foi integrado e à sua área foi atribuído o valor 6,00. Com este valor de área como referência, foi integrado o sinal correspondente ao deslocamento do próton da dupla ligação dos monômeros (5,6 ppm). Dessa forma foi possível calcular a conversão da reação, utilizando a seguinte equação:

$$X[\%] = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (2.3)$$

Onde:

X (%) = conversão da reação de polimerização;

A₀ = Área do sinal referente ao deslocamento correspondente ao próton da dupla ligação no tempo zero (0);

A_t = Área do sinal referente ao deslocamento correspondente ao próton da dupla ligação num tempo conhecido (t).

Figura 2.8. Modelo de integração dos sinais do trioxano e da NIPAAm para o cálculo de conversão de reação.

2.2.11. Purificação dos polímeros

Os polímeros foram purificados precipitando-se algumas gotas das soluções poliméricas em um béquer contendo 10 mL de água destilada sob agitação magnética, aquecida a 45°C. Após a sedimentação do polímero, a água foi retirada utilizando-se uma pipeta. Em seguida os polímeros foram dissolvidos em 2 mL de água destilada gelada, sendo essa solução novamente gotejada em água destilada aquecida a 45°C. Este procedimento foi repetido duas vezes.

2.2.12. Síntese dos copolímeros em bloco

Nesse estudo foram realizadas doze (12) reações de acoplamento dos blocos de PHBHV e PNIPAAm ou PNIPAAmAA. A reação de acoplamento ocorreu por meio de uma esterificação entre hidroxilas terminais do PHBHV e grupos carboxílicos terminais da PNIPAAm ou PNIPAAmAA. Esta reação foi conduzida na presença de ativadores dos grupos funcionais OH e COOH, para que a reação ocorra em temperaturas mais baixas, evitando a degradação do biopolímero (PHBHV). Os ativadores utilizados neste trabalho foram : CDI e DCC para o grupo COOH e DMAP e NHS para os grupos OH. O solvente utilizado em todas as reações foi o clorofórmio, grau HPLC, previamente destilado.

Os polímeros utilizados foram, o PHBHV purificado com duas massas moleculares diferentes, PNIPAAm e PNIPAAmAA com diferentes massas moleculares.

As reações de acoplamento foram conduzidas empregando-se duas metodologias diferentes. Na primeira, no reator de vidro encamisado com capacidade de 100ml e sob

agitação magnética, foram adicionados clorofórmio (CHCl_3), PNIPAAm ou PNIPAAmAA purificado e CDI ou DCC. Após a adição, o meio reacional ficou agitando por 3 horas a temperatura ambiente e sob fluxo de nitrogênio. Decorrido o tempo de ativação, a temperatura foi elevada para 55°C e foi adicionado no meio reacional uma solução de PHBHV e DMAP ou NHS em meio CHCl_3 . O tempo de reação após a adição da solução de PHBHV foi um dos parâmetros avaliados. Na segunda via de síntese dos copolímeros em bloco, uma solução de PHBHV em clorofórmio, juntamente com um dos ativadores de OH foi adicionado ao reator e deixado reagir por 4 horas. Decorrido esse tempo, uma solução de PNIPAAm e um ativador de COOH (CDI ou DCC) foi adicionada ao meio reacional, sob agitação. Após a adição da solução de PNIPAAm e ativador, o sistema reacional foi mantido sob agitação por diferentes tempos.

2.2.13. Purificação dos copolímeros em bloco

Os copolímeros em bloco foram purificados por duas metodologias diferentes. A primeira ocorreu por meio do gotejamento do produto de reação em éter etílico gelado. Após a precipitação o produto foi filtrado e seco em estufa com circulação de ar a 60°C . Na segunda metodologia adotada o produto de reação foi precipitado em metanol gelado duas vezes consecutivas. Após as duas precipitações, o não-solvente foi removido por filtração e o polímero obtido foi seco em estufa com circulação de ar a 60°C .

2.2.14. Caracterização dos polímeros

- Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H)

A estrutura química dos polímeros sintetizados neste trabalho foi confirmada pela técnica de RMN ^1H . Utilizou-se como solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3). As análises foram realizadas conforme o seguinte procedimento: 10 – 15 mg de cada amostra foram adicionadas a um tubo específico para RMN ^1H e diluídas em 0,40 mL de solvente deuterado.

- Espectroscopia de Ultra-Violeta

Depois de purificados e diluídos em água a uma concentração de 5 g/L, as soluções poliméricas foram caracterizadas por espectrofotometria de Ultra-Violeta. As análises foram realizadas num comprimento de onda constante de 542 nm, numa faixa de 25 a 45°C, com incrementos de temperatura de 2 °C. Com os resultados obtidos nesta caracterização foi possível determinar as LCST da PNIPAAm e dos copolímeros aleatórios PNIPAAmAA e dos copolímeros em bloco.

- Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Na caracterização dos polímeros PNIPAAm e PNIPAAmAA foram empregadas soluções poliméricas com tetrahidrofurano (THF) a uma concentração de 10 mg/mL e previamente filtradas em filtros para solventes orgânicos (0,45µm) antes de serem injetadas no

aparelho. O volume de solução polimérica injetado foi de 100 μL . Como eluente foi utilizada uma solução 0,25% (m/v) de brometo de tetrabutilamônio em THF, num fluxo de 1 mL/min, com o compartimento das colunas operando a uma temperatura de 35°C. O PHBHV foi caracterizado empregando clorofórmio HPLC como eluente, num fluxo de 1 mL/min, com o compartimento das colunas operando a 35°C. Os copolímeros em bloco foram caracterizados via GPC, empregando-se duas metodologias diferentes para preparação e análise das amostras. Na primeira metodologia foi utilizado clorofórmio HPLC como eluente, num fluxo de 1 mL/min, com o compartimento das colunas operando a 35°C (análise feita no Laboratório de Polímeros –EEL-USP). Na segunda metodologia o eluente utilizado foi uma solução 0,02 M LiBr em dimetilformamida (DMF), num fluxo de 1 mL/min, com o forno operando a 60°C (análise realizada pela Viscotek-USA).

- Espectroscopia de Infra-Vermelho (FTIR)

Para a realização das análises de infra-vermelho, os polímeros foram solubilizados em THF e as soluções obtidas foram depositadas sobre pastilha de NaCl. Após a formação do filme as análises foram realizadas em modo de transmitância, numa de 400 a 4000 cm^{-1} .

- Titulometria

A quantidade de AA incorporada nos copolímeros PNIPAAmAA foi determinada por titulação ácido-base em meio aquoso empregando uma solução aquosa de NaOH 0,01M e fenolftaleína como indicador.

2.2.15. Preparação das nanopartículas

As nanopartículas foram preparadas pelo processo de autoagregação empregando a técnica de diálise. Os copolímeros em bloco foram solubilizados em dois solventes diferentes, DMF ou clorofórmio. A solução feita com DMF foi dialisada em água na temperatura ambiente, empregando um saco de diálise com corte de 6.000-8.000 Da, por 24 horas. No caso da solução com clorofórmio, a diálise foi realizada em uma mistura de água/etanol (1:1, em volume) na temperatura ambiente. As nanopartículas foram caracterizadas por turbidimetria, LS e TEM.

2.2.16. Caracterização das nanopartículas

-Turbidimetria

A dispersão de nanopartículas foi caracterizada pela técnica de turbidimetria em duas temperaturas diferentes (25 e 60 °C) por 72 horas num comprimento de onda de 850nm. As análises foram realizadas em dois ciclos, aquecendo-se a amostra de 25 a 60°C e depois resfriando as mesmas de 60 a 25°C. O objetivo desta caracterização foi avaliar o processo de precipitação da camada hidrofílica (PNIPAAm e PNIPAAmAA) das nanopartículas por meio da mudança de transmitância das dispersões de nanopartículas em função da temperatura.

- Espalhamento de Luz (LS)

Para realizar esta caracterização uma amostra de cada sistema de nanopartículas foi colocada em cubetas de poliestireno e analisadas em diferentes temperaturas, variando-se entre 25 a 45 °C, com incrementos de temperatura de 2°C. Para as nanopartículas temo-pH-sensíveis também foi variado o pH das amostras.

-Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Nos ensaios de caracterização das nanopartículas por TEM, as amostras de nanopartículas dispersas em água foram gotejadas sobre grades de cobre, secas na temperatura ambiente, recobertas com carbono e em seguida levadas à análise, numa voltagem de 80Kv com ampliações de até 80.000 vezes.

2.2.17. Encapsulação do Acetato de Dexametasona (AcDex)

A encapsulação do AcDex foi realizada solubilizando-se 10 mg de copolímero em bloco e 10 mg deste ativo em 1 mL de DMF. Esta solução foi gotejada lentamente em 40 mL de água, na temperatura ambiente e pH 7,0. Após o gotejamento, a dispersão de nanopartículas carregadas com o ativo foi dializada utilizando saco de diálise com corte de 6.000-8.000 Da. Após a dialise a dispersão do encapsulado foi congelada e liofilizada. Neste estudo foram feitas duas encapsulações, uma utilizando o copolímero em bloco constituídos de PHBHV-b-PNIPAAm (NpAcDex01) e a outra empregando o copolímero constituídos de PHBHV-b-

PNIPAAmAA (NpAcDex02). A Eficiência de encapsulação foi estimada empregando a seguinte equação:

$$\%E = \frac{Ac_N}{Ac_I} \times 100 \quad (2.4)$$

onde, Ac_N é a massa de ativo nas nanopartículas após a liofilização obtida por UV/vis num comprimento de onda de 260nm Ac_I é a massa de ativo adicionada no início da encapsulação.

2.2.18. Ensaios de Liberação controlada “in-vitro”

Os ensaios de liberação controlada do acetato de dexametasona do interior das nanopartículas foram realizados em meio de tampão de fosfato nas temperaturas de 4 e 40°C e em pHs de 7,4, 5,0 e 1,2. Cerca de 2mg de nanopartículas contendo o ativo foi colocada em um saco de diálise que foi imerso em 200 mL do tampão e condicionada na temperatura escolhida para o ensaio de liberação. Amostras deste meio de liberação (tampão fosfato) eram coletadas e analisadas em UV/vis, num comprimento de onda de 242nm, para a determinação da massa de ativo liberada. A quantificação do ativo foi realizada utilizando uma curva de calibração. O ensaio de dissolução do AcDex não encapsulado foi conduzido utilizando um saco de diálise.

Capítulo III

**Síntese dos agentes de transferência de
cadeia (CTA) para as polimerizações via
RAFT**

3.1. Introdução

Como mencionado anteriormente, o mecanismo RAFT é conduzido na presença de um agente de transferência de cadeia (CTA) que atua como sendo um iniciador de reação, conferindo ao processo de polimerização um controle da massa e da arquitetura molecular, bem como facilitando a funcionalização das extremidades das cadeias para posteriores reações de enxertia ou acoplamento. Estas moléculas podem ser do tipo ditioéster, xantatos, ditiocarbamatos, ditiocarbonatos, dentre outros. Para execução deste trabalho foram sintetizados dois agentes RAFT (CTAs) do tipo ditioéster. Os CTAs sintetizados foram o ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico (PTETPA) e o ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico (PTTPA).

3.2. Síntese dos CTAs

Os CTAs foram sintetizados por um mecanismo de reação que envolve três etapas (Figuras 3.1 e 3.3). Na primeira etapa, foi preparado do reagente de Grignard, sendo a etapa mais crítica destas sínteses. As demais etapas da síntese dos CTAs dependem muito do rendimento da síntese do reagente de Grignard. Na síntese do reagente de Grignard foram testados quatro compostos halogenados, cloreto de benzila ou brometo de benzila para a síntese do PTETPA e cloreto de fenila ou brometo de fenila para a síntese do PTTPA. As sínteses dos reagentes de Grignard conduzidas com os compostos clorados foram as que apresentaram os melhores resultados. Na síntese do Grignard com o cloreto de benzila foi obtido um rendimento de reação de 86%, enquanto que a utilização do brometo de benzila resultou num rendimento de apenas 76%

A Figura 3.1 apresenta a rota química utilizada na síntese do PTETPA. A Figura 3.2 apresenta o espectro de RMN ^1H do PTETPA, onde é possível observar os seguintes deslocamentos: δ 1,54 ppm, duplete referente aos prótons do radical CH_3 , δ 4,28 ppm, singlete referente aos prótons do grupo CH_2 , δ 4,54 ppm, quadruplete referente ao próton do grupo CH e δ 7,22-7,34 ppm, multiplete, referente aos 5 prótons do anel aromático. O sinal referente ao próton do grupo carboxílico não foi identificado no espectro por ser de baixa intensidade quando comparado aos demais sinais da molécula. Foi possível observar também a ocorrência de sinais de baixa intensidade que não foram atribuídos ao PTETPA, podendo ser atribuídos a prótons de solventes residuais, tais como acetato de etila ou éter etílico, utilizados nas etapas de purificação do produto ou ainda de algum resíduo de ácido bromopropanóico ou composto halogenado, pois como menciona D'Agosto em seu trabalho (D'AGOSTO et al. 2003) a remoção das impurezas residuais é de difícil execução, mesmo adotando processos de destilação e recristalização.

Figura 3.1. Mecanismo da síntese do ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico (PTETPA)

Figura 3.2. Espectro de RMN ^1H do ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico (PTETPA)

Como pode ser observado na Figura 3.3, o mecanismo de síntese do PTTPA é muito parecido com aquele adotado para a preparação do PTETPA, mudando apenas o composto halogenado. Neste caso, o uso de um composto halogenado do tipo fenil conduz à formação de um CTA com um diferente grupo “Z”, permitindo desta maneira, avaliar a influência de duas estruturas químicas diferentes de CTA nas sínteses dos polímeros termo-pH-sensíveis.

A Figura 3.4 apresenta o espectro de RMN ^1H do PTTPA obtido neste trabalho. Com este resultados foi possível identificar todos os sinais referentes a estrutura química do CTA que desejava-se obter. Neste espectro foi possível identificar o sinal em δ 1,72 ppm, um duplete referente aos prótons do radical CH_3 , outro em δ 4,90 ppm, quadruplete referente ao próton do grupo CH e os sinais no intervalo de δ 7,39-8,0 ppm, referentes aos 5 sinais do anel aromático. Assim como na caracterização do PTETPA, neste caso também na foi possível

identificar o próton do grupo carboxílico. Pequenos sinais, quando comparados com os sinais do PTPA, foram identificados no espectro e não foram atribuídos ao agente RAFT. Estes sinais poderiam ser atribuídos aos prótons dos solventes utilizados na purificação ou ainda de algum reagente residual. Como a secagem do CTA é realizada sem aquecimento, apesar do uso de alto-vácuo, a retirada de todo o solvente residual e obtenção de um produto completamente puro seria muito demorado e desnecessário, pois a presença de impurezas residuais nestes materiais pouco influenciou na etapa de polimerização, como foi demonstrado por D'AGOSTO e seus colaboradores (D'AGOSTO et al., 2003).

Figura 3.3. Mecanismo empregado na síntese do ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico (PTPA)

Figura 3.4. Espectro de R MN ^1H do ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanoico (PTTPA).

Capítulo IV

Homopolimerização da NIPAAm e do AA via RAFT

4.1. Introdução

Um dos objetivos principais desta tese era obter copolímeros termo-pH-sensíveis para uma posterior reação de acoplamento com o polímero biodegradável PHBHV e com este copolímero anfifílico produzir nanopartículas term-pH-sensíveis pela técnica de autoagregação. Os copolímeros termo-pH-sensíveis foram obtidos pela polimerização da NIPAAm e do AA via RAFT, empregando os agentes RAFT sintetizados neste trabalho (Capítulo III). No entanto, antes de se iniciar o estudo da copolimerização da NIPAAm com o AA foi necessário realizar um estudo preliminar de homopolimerização da NIPAAm e do AA, para a partir destes ensaios, desenvolver os métodos e as formulações mais adequados para conduzir as reações de copolimerização via RAFT destes monômeros com sucesso, ou seja, com controle da massa molecular e da polidispersidade das cadeias.

4.2. Homopolimerização da NIPAAm

No estudo preliminar da homopolimerização da NIPAAm foram avaliados diversos parâmetros de reação, destacando-se: razão monômero/CTA, razão CTA/iniciador, tipo de solvente e a influencia do grupo Z do CTA na polimerização da NIPAAm. Como nesta tese um dos objetivos da utilização do mecanismo RAFT era controlar a massa molecular e a polidispersidade dos polímeros sintetizados, o primeiro estudo conduzido nesta etapa do trabalho foi avaliar a capacidade do CTA sintetizado conduzir uma reação de homopolimerização da NIPAAm via RAFT, ou seja, controlando a massa molecular e a polidispersidade das cadeias. O segundo estudo realizado nesta etapa foi a avaliação da cinética de reação da NIPAAm via RAFT.

- Massa Molecular e Polidispersidade

A Tabela 4.1 apresenta as formulações empregadas no estudo da homopolimerização da NIPAAm via RAFT para avaliação do controle de massa molecular e polidispersidade promovido pelo PTETPA. A Tabela 4.2 apresenta os resultados de massas moleculares experimentais e polidispersidades para os polímeros sintetizados nesta etapa do projeto.

Tabela 4.1 - Formulações e condições experimentais utilizadas nas polymerizações da NIPAAm via RAFT, utilizando PTETPA como CTA.

Reação	Mn _t	Razão molar [PTETPA]/[AIBN]	NIPAAm [g]	PTETPA [g]	AIBN [g]
H1*	11.000	10/1	1,1229	0,0251	0,0016
H2*	5.000	10/1	0,4478	0,0200	0,0019
H3	5.000	10/1	0,4457	0,0201	0,0028
H4	10.000	10/1	0,9053	0,0239	0,0029
H5	15.000	10/1	1,3494	0,0224	0,0022
H6	20.000	10/1	1,7929	0,0217	0,0021
H7	9.000	10/1	2,5110	0,0647	0,0069
H8	15.000	10/1	1,3788	0,0280	0,0024

* NIPAAm e AIBN não purificados por recristalização; Volume de THF anidro: 5 mL;
Temperatura de reação: 70 °C

Tabela 4.2 - Resultados de Mn_t e Mn_{exp} no estudo da homopolimerização da NIPAAm via RAFT.

Reação	Mn _t	Mn _{exp.}	IP**
H1*	5.000	451.159	4,34
H2*	5.000	661.647	3,23
H3	5.000	3.402	1,17
H4	10.000	13.456	1,23
H5	15.000	16.456	1,17
H6	20.000	17.662	1,13
H7	9.000	4.269	1,26
H8	15.000	17.544	1,23

* NIPAAm e AIBN não purificados; **IP= Índice de Polidispersidade

Para as reações realizadas com a NIPAAm e o AIBN não purificados (reações H1 e H2) os valores Mn_{exp} foram muito superiores aos valores calculados e as polidispersidades apresentaram valores muito superiores ao esperado e uma polimerização radicalar controlada. No caso de reações conduzidas por mecanismos “vivos” de polimerização a polidispersidade não deve ser superior a 1,5 e no caso das reações H1 e H2 os valores foram 4,34 e 3,23, respectivamente. Estas duas informações, grande diferença entre Mn_{exp}/Mn_t e altos valores de polidispersidade da massa molecular média, indicam uma falta de controle da polimerização por parte do CTA utilizado. Nestas reações é possível afirmar que os polímeros foram formados via mecanismo de polimerização clássico, isto é, via radical livre e não pelo mecanismo RAFT. É importante observar que estes polímeros apresentaram valores de massas moleculares e de polidispersidades muito semelhantes, reforçando a idéia de que a polimerização não ocorreu pelo mecanismo RAFT.

Para as reações conduzidas com NIPAAm e AIBN purificados (reações H3 - H8), os resultados de GPC, apresentados na Tabela 4.2, indicam a formação de polímeros com massas moleculares próximas das massas moleculares teóricas e polidispersidades menores que 1,5, características que demonstram que a polimerização foi conduzida por um mecanismo “vivo” de reação, neste caso, o mecanismo RAFT. Mediante estes resultados, uma hipótese poderia ser indicada para explicar o resultado obtido com as duas primeiras reações desta etapa. A hipótese seria que contaminantes presentes na NIPAAm ou no AIBN tenham influenciado no mecanismo de reação, levando a uma polimerização pelo mecanismo clássico e não via RAFT. Por exemplo, a NIPAAm utilizada neste estudo foi adquirida com pureza de 97% e contendo inibidor de polimerização. O inibidor de polimerização presente na NIPAAm pode ter reagido com o CTA, comprometendo o controle da polimerização via RAFT.

Apesar da baixa polidispersidade verificada para os polímeros preparados com os reagentes após o processo de purificação, foram observados desvios entre os valores de massa molecular teórica e experimental. Estes desvios podem resultar de vários fatores ligados à síntese ou à caracterização do material, tais como: conversão da reação, pureza dos reagentes e a determinação das massas moleculares via GPC. Dentre estes fatores, aquele que mais pode ter influenciado nos resultados foi a determinação das $M_{n_{exp}}$ pela técnica de GPC, utilizando poliestireno (PS) como padrão de calibração. O PS apresenta solubilidade bem diferente da PNIPAAm no THF, solvente empregado como eluente nas análises de GPC. Esta diferença de solubilidade dos padrões de PS e da PNIPAAm gera um erro na determinação das massas moleculares da PNIPAAm, originando as diferenças entre os valores de M_{n_t} e $M_{n_{exp}}$. Por exemplo, a PNIPAAm obtida na reação H5 deveria apresentar uma $M_{n_{exp}}$ de no máximo 15.000 g/mol (para 100% de conversão), no entanto, o valor encontrado foi de 16.500 g/mol. Este resultado, em hipótese está incoerente, porém quando se leva em consideração as diferenças de solubilidades o resultado pode ser justificado. A PNIPAAm é um polímero hidrofílico que solubiliza facilmente em solventes polares, por outro lado, o poliestireno é um polímero de característica hidrofóbica e considerando-se ainda que o eluente utilizado foi o THF (solvente de características polares), a interação polímero solvente foi muito maior no caso da PNIPAAm-THF do que no caso do poliestireno-THF e com isso o volume hidrodinâmico da PNIPAAm é maior que do poliestireno. Se o volume hidrodinâmico da PNIPAAm é maior em THF do que o volume hidrodinâmico de um padrão de PS, de mesmo comprimento cinético de cadeia, a possibilidade de se encontrar $M_{n_{exp}}$ maiores que M_{n_t} é significativa. Estes desvios nas massas moleculares de amostras de PNIPAAm analisadas pela técnica de GPC, empregando PS como padrão de calibração, foram estudados e bem discutidos por Ganachaud, et al., (2000). Neste trabalho os autores sintetizaram PNIPAAm via RAFT

utilizando como CTA, o ditiobenzoato de benzila e o ditiobenzoato de cumila. Neste trabalho os autores determinaram os valores de Mn_{exp} por GPC e MALDI ToF. Na caracterização dos polímeros via GPC foi empregado PS como padrão de calibração e no caso da técnica de uma técnica MALDI ToF não é necessário a utilização de padrões de massas moleculares. Comparando-se os resultados obtidos pelas duas técnicas com os valores teóricos das massas moleculares teóricas, os autores puderam verificar que a diferença nos valores de Mn_{exp} e Mn_t esta mais associada com a técnica utilizada na determinação das massas moleculares do que com a baixa eficiência do mecanismo RAFT em conduzir uma polimerização radicalar controlada. Por exemplo, em uma das reações feita pelos autores a Mn_t foi calculada para 3.970 g/mol, a Mn_{exp} determinada pela técnica de GPC foi de 3140 g/mol, uma diferença de 830 unidades de massa molecular, porém empregando-se a técnica de MALDI TOF, o valor encontrado foi de 3650 g/mol, ou seja, bem mais próximo do valor de Mn_t , confirmando que os desvios de Mn_t e Mn_{exp} estavam associados à técnica de determinação dessas massas.

Com os resultados apresentados na Tabela 4.2 foi possível observar que o maior valor de polidispersidade foi obtido na reação conduzida com a maior concentração de agente de controle RAFT. Este aumento da polidispersidade com o aumento do agente RAFT poderia ser explicado por duas hipóteses. A primeira explicação seria atribuída ao aumento da concentração do agente RAFT no meio reacional. Este aumento poderia ter retardado o início da reação de polimerização via RAFT e com isso ocorreu um aumento no número de cadeias geradas pelo mecanismo convencional de polimerização, gerando um maior índice de polidispersidade. E a segunda hipótese seria que com o aumento da concentração do agente RAFT, aumentou-se proporcionalmente a concentração de AIBN, o que pode ter gerado um maior fluxo de radicais livres no meio reacional e terminação de cadeias via mecanismo convencional (desproporcionamento e acoplamento).

- Estudo Cinético

Para avaliar o comportamento cinético da homopolimerização da NIPAAm via RFAT foram realizadas 13 (treze) reações. Dessa série de experimentos, 2 foram conduzidas na ausência de CTA, logo, pelo mecanismo de polimerização via radical livre convencional e 11 reações empregando os dois CTAs sintetizados neste trabalho. Nestas reações foram avaliados parâmetros como: tipo de solvente, tipo de CTA e razão CTA/iniciador.

A Tabela 4.3 apresenta as formulações, as condições experimentais e as conversões obtidas nas reações de polimerização da NIPAAm via radical livre convencional (reações H12 e H13). Nestas reações, foi utilizado como padrão interno o trioxano e como solventes o THF e o 1,4-dioxano. Estas duas reações foram realizadas na ausência do agente de transferência de cadeia com os objetivos de conhecer o perfil cinético da homopolimerização da NIPAAm via polimerização convencional e verificar a viabilidade da metodologia para a determinação da conversão das reações pela técnica de RMN ^1H .

A Tabela 4.3 mostra os resultados obtidos nestas duas reações. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.3, a velocidade de polimerização da reação H13 foi maior que a reação H12. Na reação H13, realizada em 1,4-dioxano, obteve-se uma conversão de 92% em 100 minutos de reação, enquanto que na reação H12, realizada em THF, foram necessários 360 minutos para se atingir uma conversão de 96%. Esta diferença de velocidade de reação pode ser atribuída à polaridade dos solventes empregados nas polimerizações da NIPAAm, pois de acordo com a literatura,(LADAVIERE, *et al.*, 2001) quanto maior a polaridade do solvente maior será o coeficiente de propagação dos macrorradicais. Neste caso o 1,4-dioxano apresenta polaridade maior do que o THF. Estes resultados também foram observados para os

outros tipos de solventes, como será visto mais adiante. Segundo Ganachaud et al., (2000) uma outra vantagem em utilizar-se o dioxano na polimerização da NIPAAm é o baixo coeficiente de transferência de cadeia deste solvente a este monômero.

Tabela 4.3 - Dados experimentais das polimerizações da NIPAAm via radical livre convencional.

<i>Reação</i>	<i>Formulação [g]</i>			<i>Solvente [mL]</i>		<i>Tempo [min]</i>	<i>Conv [%]</i>
	<i>NIPAAm</i>	<i>AIBN</i>	<i>Trioxano</i>	<i>THF</i>	<i>1,4Dioxano</i>		
H12	2,0090	0,0205	0,2625	10,0	-	300	96
H13	1,4900	0,0046	0,2070	-	7,5	100	92

Temperatura = 70 °C

A Tabela 4.4 apresenta os dados experimentais das reações H14 e H15, nas quais a NIPAAm foi polimerizada, via RAFT, na presença de dois agentes de transferência de cadeia, utilizando-se THF ou 1,4-dioxano como solvente. Nestas reações, além de se estudar o efeito do tipo agente de agente de transferência de cadeia (PTETPA e PTPA), o efeito do tipo de solvente, foi também estudado.

Tabela 4.4 - Dados experimentais das polimerizações da NIPAAm via RAFT para o estudo da influencia do tipo de CTA e de solvente.

<i>Reação</i>	<i>Formulação (g)</i>				<i>Solvente([mL])</i>		<i>Tempo (min)</i>	<i>Conv (%)</i>
	<i>NIPAAm</i>	<i>CTA</i>	<i>AIBN</i>	<i>Trioxano</i>	<i>THF</i>	<i>1,4Dioxano</i>		
H14	1,7205	0,0095 ¹	0,0009	0,2200	-	7,5	1020	92
H15	1,7000	0,0095 ²	0,0008	0,2272	-	7,5	1320	77

Temperatura = 70 °C; ¹PTETPA; ²PTPA

Os resultados obtidos com as reações H14 e H15 permitiram avaliar a influência da estrutura química do CTA na velocidade de polimerização da NIPAAm em meio de 1,4-dioxano. A Figura 4.1 apresenta as curvas de conversão em função do tempo para as reações H14 e H15. Como pode ser observado na Figura 4.1, a reação H14 apresentou uma taxa de

polimerização muito superior à reação H15. Comparando-se a conversão em um mesmo tempo de reação, por exemplo, 300 minutos, fica evidente esta diferença. Enquanto a reação com PTETPA consumiu 92% da NIPAAm em 300 minutos, a reação H15 estava ainda no período de indução, ou seja, sem consumo de monômero. Estes resultados estão de acordo com os estudos de avaliação da influência dos grupos Z na velocidade de polimerização via RAFT, já discutidos anteriormente. (D'AGOSTO; et al., 2003) Segundo estes estudos, a diferença de reatividade dos CTAs poderia ser explicada pela diferença do grupo “Z” do CTA. O PTETPA apresenta um grupo benzil em sua estrutura química e o PTPA apresentava um grupo fenil e segundo a literatura (D'AGOSTO; et al., 2003) o grupo fenil tende a estabilizar o radical intermediário (2) (ver Figura 1.6 no Capítulo I) gerado durante a etapa de transferência de cadeia reversível entre os macrorradicais propagantes eo agente de controle RAFT (P_m^* ou P_n^* , ver Figura 1.6 no Capítulo I), impedindo a rápida fragmentação dos radicais R^* , P_m^* ou P_n^* , para a continuação da polimerização. Os CTAs que apresentam radicais benzil também tendem a retardar a polimerização devido a reações irreversíveis de terminação, promovidas pelos radicais intermediários (2), dando origem a moléculas ou macromoléculas chamadas de “estrelas” (Figura 4.2). (MONTEIRO; BROUWER, 2001)

Através desta figura, foi possível verificar que a reação H13, realizada sem CTA, apresentou uma velocidade de polimerização maior que a reação H14, realizada com PTETPA, comprovando o efeito de indução e retardação causado pelo agente de transferência de cadeia. Este decréscimo da velocidade de polimerização, provocado pelo agente de transferência de cadeia, também foi verificado nos estudos de polimerização da NIPAAm realizados por Schilli, et al., (2003), utilizando 1-pirrolecarboditioato de benzila como agente RAFT. Segundo os autores, todas as reações de polimerização da NIPAAm via RAFT apresentaram um período de indução, o qual variou em função da concentração e da estrutura química do CTA (grupo R). De acordo com os autores, a reação conduzida na presença do CTA contendo o radical benzil apresentou maior velocidade de polimerização quando comparado com o CTA que apresentava o radical cumila e o tempo de indução foi diretamente proporcional à concentração do CTA, ou seja, quanto maior a concentração de CTA maior foi o tempo de indução.

Figura 4.3. Efeito do PTETPA na cinética de polimerização da NIPAAm (condições experimentais nas Tabelas 4.3 e 4.4).

As Figuras 4.4 e 4.5 apresentam a conversão logarítmica da polimerização da NIPAAm em função do tempo e a variação da massa molecular da PNIPAAm e do índice de polidispersidade em função da conversão monomérica para reação H14, respectivamente. Mediante os resultados apresentados na Figura 4.4 foi possível verificar a dependência linear do consumo de monômero com o tempo de reação. Esta linearidade no consumo de monômero *versus* o tempo é uma característica experimental do controle da polimerização pelo mecanismo de polimerização “viva” via RAFT empregando o PTETPA como CTA. Outra informação importante para a comprovação do controle da polimerização via RAFT está apresentada na Figura 4.5. Como pode ser observado nesta figura, o aumento da massa molecular da PNIPAAm ocorreu de maneira linear. Os valores de M_n experimental foram sempre maiores que os valores teóricos, no entanto, esta diferença pode estar relacionada à análise de GPC, como já discutido anteriormente.

Uma outra possível explicação para esta diferença entre os valores de M_n teórico e experimental foi sugerida por Yang e o seu colaborador (YANG; CHENG, 2006). Os autores propõem que a rápida polimerização da NIPAAm no início da polimerização gera macrocadeias pelo mecanismo convencional e até que o CTA fragmente e controle o processo de polimerização, já ocorreu a formação de polímero, o qual apresenta um M_n experimental superior àquele calculado teoricamente. A partir da fragmentação do CTA o mecanismo de polimerização passa a ser controlado via RAFT, no entanto, o desvio entre M_{n_t} e $M_{n_{exp}}$ já existe. No presente trabalho, o importante é ressaltar a linearidade do crescimento da massa molecular e também os baixos valores de índice de polidispersidade. Os valores diminuíram durante a reação e não ultrapassaram 1,26 (Figura 4.5) durante todo o tempo de reação. Estes valores indicam um bom controle da massa molecular pelo mecanismo RAFT, uma vez que os polímeros sintetizados pelo mecanismo convencional de polimerização (reações H12 e H13) de

polimerização apresentaram índices de polidispersidade muito superiores (3,00 – 4,00). Na Figura 4.6 apresenta a sobreposição de alguns cromatogramas de amostras retiradas em diferentes tempos da reação H14. Como pode ser observado nesta figura ocorreu um aumento linear da massa molecular ao longo do tempo de reação e um decréscimo na polidispersidade, resultados característicos do controle da polimerização via RAFT.

Figura 4.4. Consumo de monômero em função do tempo da polimerização da NIPAAm utilizando o PTEPTA como CTA (reação H14 da Tabela 4.4).

Figura 4.5. Variação da massa molecular da PNIPAAm e do índice de polidispersidade das macrocadeias vs conversão de polimerização (reação H14 da Tabela 4.4).

Figura 4.6. Sobreposição dos cromatogramas de GPC das amostras retiradas em diferentes tempos da reação de polimerização da NIPAAm via RAFT empregando o PTETPA como CTA (reação H14 da Tabela 4.4).

A Figura 4.7 ilustra o espectro de RMN ^1H da PNIPAAm obtidas nas condições da reação H14, utilizando o PTETPA como CTA. Com este espectro foi possível identificar os sinais referentes à PNIPAAm, sendo eles: δ 1,1 ppm, singlete referente aos grupos CH_3 do grupo isopropila; 1,57 ppm e δ 1,9 ppm, singletos referentes aos grupos CH_2 e CH ; δ 4,1 ppm, singlete referente ao CH do grupo isopropila e δ 6,50 ppm singlete referente ao NH do grupo acrilamida. Os sinais em δ 7,2-7,3 ppm foram atribuídos ao anel aromático presente na composição química do PTETPA.

Figura 4.7. Espectro de RMN ^1H da PNIPAAm sintetizada via RAFT, empregando PTETPA como CTA, obtida nas condições da reação H14 (Tabela 4.4).

Uma maneira de avaliar o caráter “vivo” de uma polimerização seria a adição de massa de monômero após um intervalo de tempo de reação e acompanhar o aumento da massa

molecular. Esta não é a metodologia mais adequada, pois no ato da adição da segunda carga de monômero ainda existirá monômero residual da primeira etapa de reação, no entanto, mesmo com esta limitação, se ocorrer um aumento proporcional na massa molecular das cadeias com a adição da segunda carga de monômero e a polidispersidade for mantida próxima dos valores característicos de uma polimerização radicalar controlada, ou seja, menor que 1,5, a metodologia será válida para avaliar a eficiência do agente RAFT em conduzir uma polimerização “viva”. A Tabela 4.5 apresenta os dados experimentais de uma reação de polimerização da NIPAAm em que após 120 minutos de reação foi adicionada uma nova carga de monômero e a reação foi conduzida por mais 120 minutos. A Figura 4.8 apresenta a sobreposição dos cromatogramas das amostras antes da adição da segunda carga de monômero (120 minutos de reação) e após 120 minutos da adição da segunda carga de monômero (tempo total de reação de 240 minutos).

Como pode ser observado na Tabela 4.5, a primeira etapa da reação apresentou uma conversão de 63% em 120 minutos de reação, resultado semelhante aqueles obtidos nas demais reações conduzidas via RAFT. A PNIPAAm obtida nesta primeira etapa apresentou uma $M_{n_{exp}}$ de 15500 g/mol com polidispersidade de 1,18. Após a adição da segunda carga de NIPAAm a conversão na segunda etapa foi de 80%, para um tempo suplementar de reação de 120 minutos, perfazendo assim um tempo total de reação de 240 minutos. Para esta segunda etapa, a $M_{n_{exp}}$ da PNIPAAm foi de 26400 g/mol com polidispersidade de 1,26. Com estes resultados de $M_{n_{exp}}$ e de índice de polidispersidade foi possível confirmar o controle da polimerização pelo mecanismo RAFT, pois o aumento da $M_{n_{exp}}$ foi proporcional à adição da segunda carga de NIPAAm, mantendo-se praticamente constante o índice de polidispersidade. Caso o mecanismo não fosse controlado via RAFT, a segunda carga de monômero iria apenas gerar novas macrocadeias pelo mecanismo convencional de polimerização, aumentando

significativamente a Mn_{exp} e a polidispersidade, no entanto, os resultados de Mn_{exp} demonstraram que as macrocadeias já formadas via RAFT na primeira etapa continuaram polimerizando com a segunda carga de monômero de maneira controlada.

Tabela 4.5 - Confirmação da característica de polimerização viva, via RAFT, da NIPAAm, mediada pelo PTETPA

<i>Reação</i>	<i>Formulação [g]</i>				<i>Solvente (mL)</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Conv (%)</i>
	NIPAAm	PTETPA	AIBN	Trioxano	1,4Dioxano		
H20	0,5916	0,0090	0,0018	0,0690	7,5	120	63
H20c	0,5797	-	-	-	3	240	80

Temperatura = 70°C, c = continuação da reação 20

Figura 4.8. Sobreposição dos cromatogramas de GPC dos produtos obtidos nas duas etapas da reação H20: (reações H20 e H20c da Tabela 4.5)

4.3. Homopolimerização do AA via RAFT

A Tabela 4.6 apresenta os dados experimentais das reações de polimerização via radical livre viva do ácido acrílico. Nessas reações estudou-se a influência da estrutura química do agente de transferência de cadeia na polimerização da AA. A Figura 4.9 apresenta os perfis das curvas de conversão de AA *versus* o tempo de reação. De acordo com os resultados obtidos foi possível verificar que a reação H21, conduzida na presença do PTTPA, apresentou velocidade de polimerização menor que a reação H22 realizada na presença do PTETPA até 60 minutos de reação. A partir deste tempo, a taxa de polimerização entre as duas reações não apresentaram diferenças significativas na taxa de polimerização. Esta diferença de velocidade de polimerização nos primeiros 60 minutos de reação poderia ser atribuída ao fenômeno de indução provocado pelo PTTPA. No entanto, a reação de polimerização do AA com estes dois CTAs é significativamente mais lenta quando comparada com as reações conduzidas na presença de tritioésteres. (LADAVIERE; DORR; CLAVERIE, 2001; LOISEAU; et al., 2003) Esta influência da estrutura química do CTA na polimerização do AA foi demonstrada por LADAVIERE e colaboradores (LADAVIERE; DORR; CLAVERIE, 2001). Segundo os autores os melhores resultados foram obtidos com os CTAs do tipo tritioésteres, pois a polimerização conduzida com diferentes ditioésteres apresentaram conversões de 10 a 30% em 120 minutos de reação, enquanto que com os tritioésteres a conversão atingiu 99% em 90 minutos, com polidispersidades entre 1,3-1,4.

Tabela 4.6 - Formulações das polimerizações do AA via RAFT.

Reação	Formulação [g]			Solvente [mL]
	AA	CTA	AIBN	Metanol/H ₂ O
H21	2,2616	0,0465 ¹	0,0032	16,0/4,0
H22	2,0135	0,0482 ²	0,0040	16,0/4,0

Temperatura = 80°C, ¹PTETPA, ²PTTPA

Figura 4.9. Influência da estrutura química do CTA na polimerização do AA via RAFT.

Capítulo V

Copolimerização da NIPAAm com o AA via RAFT

5.1. Introdução

Como já apresentado anteriormente, visando a preparação de copolímeros em bloco anfifílicos constituído por um segmento hidrofílico termo-pH-sensível realizou-se um estudo de copolimerização da NIPAAm com o AA com o objetivo de definir as condições experimentais de síntese destes copolímeros via RAFT, bem como, avaliar a incorporação do AA na composição química final, conferindo um aumento na LCST do copolímero termo-pH-sensível. Neste estudo foram realizadas 10 (dez) reações de polimerização, dentre as quais somente uma foi conduzida na ausência de AA (homopolimerização da NIPAAm). Em função dos resultados obtidos nos estudos de homopolimerização da NIPAAm via RAFT, o CTA empregado nestas reações foi o PTEPTA. Nas copolimerizações foram avaliados os seguintes parâmetros: razão molar dos comonômeros, razão molar [PTETPA]/[AIBN] e temperatura da reação.

5.2. Influência da razão molar dos monômeros na copolimerização da NIPAAm com ácido acrílico via RAFT

Como já mencionado anteriormente, um fator importante na utilização da PNIPAAm é a capacidade de alterar sua LCST através da incorporação de comonômeros. Neste trabalho optou-se por incorporar o ácido acrílico (AA) na cadeia da PNIPAAm, uma vez que este comonômero hidrofílico além de aumentar a LCST, como será abordado mais adiante, confere sensibilidade ao pH. Neste estudo foi realizada uma homopolimerização da NIPAAm e três copolimerizações de NIPAAm e AA, nas quais variou-se a proporção de AA (5%, 10% e 15%

molar). A Tabela 5.1 apresenta os dados experimentais destas 4 (quatro) reações e a Tabela 5.2 apresenta os resultados das conversões individuais, massa molecular e Índice de Polidispersidade (IP).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.2, foi possível verificar que a maior conversão da NIPAAm, para um mesmo tempo de reação (600 minutos), foi obtida na copolimerização C1 (94,4%) e o menor valor de conversão foi obtido na copolimerização C4 (33,3%). Mediante estes resultados foi possível observar que quando se aumenta a proporção de AA nas reações de copolimerização, a conversão da NIPAAm e do AA diminuem significativamente. Este resultado pode ser explicado pela razão de reatividade entre estes comonômeros, pois de acordo com a tabela apresentada na revisão bibliográfica (Tabela 1.5) a reatividade do AA é 200 vezes menor que a reatividade da NIPAAm. Logo, quando a NIPAAm foi copolimerizada com o AA ocorreu uma possível retardação do consumo da NIPAAm com o aumento da concentração de AA no meio reacional.

Uma observação importante a ser destacada é que com o decréscimo da velocidade de polimerização, em função do aumento da quantidade de AA, ocorreu também um decréscimo no Índice de Polidispersidade (IP), como pode ser observado nas reações C3 (10% em mol de AA) e C4 (15% em mol de AA), onde C3 apresentou um IP de 1,35 e C4 um IP de 1,19.

Tabela 5.1 - Formulações empregadas no estudo de variação da razão molar de [NIPAAm]/[AA].

Reação	[NIPAAm]/[AA] (Molar)	Formulação (g)			
		NIPAAm	AA	PTETPA	AIBN
C1	100/0	2,27	-	0,0150	0,0025
C2	95/5	2,15	0,0749	0,0146	0,0027
C3	90/10	2,04	0,1423	0,0148	0,0025
C4	85/15	1,94	0,2237	0,0147	0,0024

Temperatura = 70°C, solvente: 1,4-dioxano = 10,0 mL, tempo de reação = 600 minutos

Tabela 5.2 - Resultados de conversão, massa molecular e Índice de Polidispersidade obtidos no estudo de variação da razão molar de [NIPAAm]/[AA].

Reação	Conversão individual (%)		Mn _t (g/mol)	Mn _{exp} (g/mol)	IP*
	(t = 600 minutos)				
	NIPAAm	AA			
C1	94,4	-	34526	32106	1,27
C2	67,9	62,5	25007	25929	1,21
C3	83,2	65,0	29263	12259	1,35
C4	33,3	37,5	12157	9102	1,19

* Índice de Polidispersidade

As Figuras 5.1 e 5.2 apresentam o consumo de monômero em função do tempo de reação e a variação da massa molar da PNIPAAmAA e índice de polidispersidade em função da conversão monomérica para a reação C2, respectivamente. De acordo com o resultado apresentado na Figura 5.1 foi possível verificar a dependência linear do consumo de monômero com o tempo de reação. Da mesma forma que na homopolimerização, esta linearidade do consumo de monômero *versus* o tempo é uma outra característica experimental atribuída ao mecanismo de polimerização “viva” via RAFT. Como pode ser observado na Figura 5.2 o crescimento da massa molecular da PNIPAAmAA ocorreu de maneira linear. Os valores de Mn experimental foram sempre maiores que os valores teóricos, no entanto, esta diferença pode estar relacionada à análise de GPC, como mencionado anteriormente. Foi possível identificar também, que acima de uma conversão de 60% ocorreu um desvio na linearidade do crescimento da massa molecular da PNIPAAmAA, resultado que poderia ser atribuído ao aumento da viscosidade do meio reacional, levando a um aumento de terminações de macrocadeias via reações de acoplamento e consequentemente uma maior inclinação na curva de massa molecular *versus* conversão. Acima desta conversão, a Mn_{exp} não apresentou aumento significativo, permanecendo praticamente constante. Este resultado também está

associado às terminações de macrocadeias, pois com o início da inclinação da curva de Mn_{exp} ocorreu também um aumento significativo na polidispersidade. Apesar deste desvio é importante ressaltar que a polidispersidade não ultrapassou 1,35 durante todo o tempo de reação.

Figura 5.1. Consumo de monômeros em função do tempo para a reação C2.

Figura 5.2. Massa molecular da PNIPAAmAA e índice de polidispersidade em função da conversão de polimerização obtido nas condições da C2.

A Figura 5.3 mostra a sobreposição de alguns cromatogramas obtidos nas análises de GPC das amostras coletadas em diferentes tempos da reação C2. Com estes resultados foi possível visualizar a evolução da Mn_{exp} , mantendo uma dispersão monomodal e com baixa polidispersidade.

Figura 5.3. Sobreposição dos cromatogramas de GPC obtidos na caracterização de amostras coletadas em diferentes tempos da reação C2.

Com o objetivo de avaliar qualitativamente a incorporação do AA nos copolímeros sintetizados, os produtos das reações C1, C2 e C3 foram caracterizados por Infra-Vermelho (FT-IR). Estas análises tiveram como objetivo confirmar a presença do grupo funcional –COOH no homopolímero de PNIPAAm (proveniente do CTA), e nos copolímeros de NIPAAm e AA, os grupos –COOH (provenientes do monômero) ao longo da cadeia. As Figuras 5.4, 5.5 e 5.6 apresentam os espectros de Infra-Vermelho (FT-IR) da PNIPAAm (reação C1) e dos copolímeros PNIPAAmAA (reação C2 e reação C3). De acordo com as Figuras 5.4, 5.5 e 5.6 foi possível verificar que com o aumento da quantidade em mol de AA, a intensidade das bandas características do AA (C=O em aproximadamente 1700cm^{-1}) também aumentaram, confirmando desta maneira que o AA foi incorporado à cadeia polimérica em quantidades proporcionais. No entanto, não foi possível verificar a presença do grupo funcional COOH proveniente do CTA, na extremidade da cadeia polimérica da PNIPAAm (reação C1), isto porque a quantidade de CTA (uma molécula na extremidade de cada cadeia polimérica) é muito pequena, quando comparada com a macrocadeia com massa molecular de aproximadamente 32100 g/mol , logo a intensidade da banda C=O do CTA é muito baixa em relação as demais bandas. Para avaliar quantitativamente a incorporação do AA nos copolímeros obtidos nas condições das reações C2 e C3, ou seja, com razão molar de $[\text{NIPAAm}]/[\text{AA}]$ igual a 95/5 e 90/10, foi realizada a titulação destes dois materiais empregando como base uma solução aquosa de NaOH 0,1M. Confirmando o aumento da intensidade da banda referente à carbonila do AA caracterizados via FTIR, os resultados encontrados nas titulações foram de 57% de incorporação em mol do AA para o copolímero sintetizado nas condições experimentais da reação C2 e 62% de incorporação em mol de AA para o copolímero com razão molar 90/10.

Figura 5.4. Espectro de Infra-Vermelho (FT-IR) da PNIPAAm obtida nas condições experimentais da reação C 1, empregando PTETPA como CTA.

Figura 5.5. Espectro de Infra-Vermelho (FT-IR) do PNIPAAmAA obtido nas condições experimentais da reação C2, empregando PTETPA como CTA.

Figura 5.6. Espectro de Infra-Vermelho (FT-IR) do PNIPAAmAA obtido nas condições experimentais da reação C3, empregando PTETPA como CTA.

5.3. Influência da razão molar [PTETPA]/[AIBN] na copolimerização da NIPAAm com AA

A polimerização via RAFT é geralmente conduzida com iniciadores convencionais do tipo, azo, peróxido e persulfatos. Numa polimerização via RAFT o tipo do iniciador, a concentração do iniciador e a temperatura de reação são escolhidos de maneira a fornecer um balanço entre a taxa de polimerização e o nível de cadeias “mortas” (terminação de cadeias e aumento da polidispersidade). (MOAD; RIZZARDO; THANG, 2005) A Tabela 5.3 apresenta as condições experimentais para a copolimerização da NIPAAm com o AA empregando-se duas concentrações diferentes de iniciador (AIBN) e a Tabela 5.4 apresenta os resultados de

conversão, massa molecular e Índice de Polidispersidade. A Figura 5.7 apresenta os perfis de conversão da NIPAAm em função do tempo para este estudo.

Tabela 5.3 - Condições experimentais para o estudo da influência da razão molar [PTETPA]/[AIBN] na copolimerização da NIPAAm com o AA.

Reação	[NIPAAm]/[AA] (Molar)	Formulação (g)			
		NIPAAm	AA	PTETPA	AIBN
C3	90/10	2,04	0,1423	0,0148	0,0025
C5	90/10	2,04	0,1428	0,0143	0,0013

Temperatura = 70°; solvente: 1,4-dioxano = 10,0 mL; tempo de reação = 600 minutos;

Tabela 5.4 - Resultados de conversão, massa molecular e Índice de Polidispersidade do estudo da influência da razão molar [PTETPA]/[AIBN] na copolimerização da NIPAAm com o AA.

Reação	Conversão individual [%]		Mn _t (g/mol)	Mn _{exp} (g/mol)	IP*
	(t = 600 minutos)				
	NIPAAm	AA			
C3	83,2	65,0	29263	12259	1,35
C5	59,1	44,4	21539	12204	1,26

**Índice de Polidispersidade*

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 5.4 e na Figura 5.7 foi possível verificar que a reação C3, conduzida com uma razão molar [PTETPA]/[AIBN] igual a 4/1, apresentou velocidade de polimerização inicial muito próxima ao da reação C5, porém a reação C3 apresentou um aumento na conversão até atingir a conversão limite, para um tempo de 600 minutos, maior que da reação C5, reação esta realizada com uma razão molar [PTETPA]/[AIBN] de 8/1. Este resultado demonstrou a influência da concentração do iniciador na copolimerização da NIPAAm com AA via RAFT, como já discutido na literatura (MOAD; RIZZARDO; THANG, 2005), pois sendo o iniciador o composto responsável pela geração dos radicais que inicializarão a polimerização, quanto maior a concentração deste composto no meio reacional maior será o fluxo de macroradicaís (compostos Pm* e Pn*, do

esquema representado na Figura 1.6 do Capítulo 1) que reagirão com as moléculas de CTA, liberando novos radicais propagantes e assim conduzindo a polimerização via RAFT.

Zhu; et al., (2004), avaliaram a influência da razão molar [agente RAFT]/[AIBN] na polimerização via RAFT do metacrilato de metila (MMA). De acordo com os autores, o aumento da concentração de AIBN no meio reacional provocou um aumento na polidispersidade do polímero formado. Este aumento na polidispersidade também foi observado no presente estudo para os copolímeros de NIPAAm e AA. Foi obtido para a reação realizada com a menor razão molar [PTETPA]/[AIBN] (reação C3) um Índice de Polidispersidade (IP) de 1,352 e para a reação C5, realizada com uma razão molar [PTETPA]/[AIBN] maior, IP de 1,263 (Tabela 5.4). Esta diferença no IP pode ser atribuída à maior concentração de AIBN, ou seja, ao maior fluxo de radicais que resultou no aumento da quantidade de macrocadeias formadas e conseqüentemente uma maior probabilidade destas macrocadeias sofrerem terminação por acoplamento, levando à formação de copolímeros pelo mecanismo de polimerização radicalar convencional.

Figura 5.7. Influência da razão molar [PTETPA]/[AIBN] na conversão da copolimerização da NIPAAm.

5.4. Influência da temperatura da reação na copolimerização da NIPAAm com o AA

Segundo MOAD e seus colaboradores (MOAD; RIZZARDO; THANG, 2005) uma polimerização via RAFT pode ser conduzida em temperaturas que variam de 25 a 140°C. Também já foi demonstrado que em reações via RAFT, que empregaram ditiobenzoatos como agentes RAFT, a polidispersidade diminuiu com o aumento da temperatura. (CHIEFRARI; RIZZARDO, 2002)

Para avaliar o efeito da temperatura na síntese do PNIPAAmAA via RAFT, empregando o PTETPA como CTA, foram realizadas três reações de copolimerização nas temperaturas de 60, 70 e 80°C.

A Tabela 5.5 apresenta as condições experimentais realizadas para avaliar a influência da temperatura na copolimerização da NIPAAm com o AA. A Tabela 5.6 apresenta os resultados de conversão, massa molecular e índice de polidispersidade deste estudo.

Tabela 5.5 - Dados experimentais das polimerizações realizadas variando-se a temperatura da reação.

Reação	Temp. [°C]	[NIPAAm]/[AA] (Molar)	Formulação [g]			
			NIPAAm	AA	PTETPA	AIBN
C6	60	90/10	2,04	0,1457	0,0146	0,0024
C3	70	90/10	2,04	0,1423	0,0148	0,0025
C7	80	90/10	2,04	0,1478	0,0144	0,0026

Solvente: 1,4-dioxano = 10,0 mL, tempo de reação = 600 minutos; Razão [PTETPA]/[AIBN] = 4/1

Tabela 5.6 - Resultados de conversão, massa molecular e Índice de Polidispersidade.

Reação	Conversão individual [%]		Mn _t (g/mol)	Mn _{exp} (g/mol)	IP*
	(t=600 minutos)				
	NIPAAm	AA			
C6	72,9	55,6	26018	10554	1,424
C3	83,2	65,0	29263	12259	1,352
C7	85,5	75,5	31170	15879	1,116

*Índice de Polidispersidade

A Figura 5.8 apresenta os perfis de conversão da NIPAAm em função do tempo para as três temperaturas estudadas. Como pode ser observado, a maior taxa de polimerização foi obtida na reação conduzida com a maior temperatura (80°C), principalmente no início da reação. As reações conduzidas nas temperaturas de 60 e 70°C não apresentaram diferenças significativas na velocidade inicial de polimerização, no entanto, o valor de conversão limite da reação conduzida na temperatura de 70°C foi cerca de 10% maior que a reação conduzida à 60°C. Este aumento da velocidade inicial da polimerização C7 e a diferença nas conversões limites das três reações foram atribuídos ao maior fluxo de radicais livres gerados pela decomposição do iniciador (AIBN) com o aumento da temperatura. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por Zhu; et al., (2004), onde foi observado que a temperatura interferiu diretamente na velocidade de reação. É importante lembrar que a conversão limite neste estudo foi influenciada pela presença do AA, como demonstrado anteriormente. O aumento da temperatura também influenciou a polidispersidade dos copolímeros sintetizados. Por exemplo, para a reação realizada à temperatura de 60°C (C6) foi de 1,424, enquanto que na reação 3, realizada a 70°C, foi obtido um IP igual a 1,352 e na reação realizada a 80°C (C7) foi obtido um IP menor e igual a 1,116 (Tabela 5.6). Este mesmo comportamento, diminuição do IP com o aumento da temperatura, foi observado no estudo realizado por D'agosto; et al., (2003), empregando-se como monômero a NAM e como agente de transferência de cadeia o mesmo CTA utilizado neste trabalho. Este resultado poderia ser uma indicação que quanto maior a temperatura maior a eficiência na ativação das moléculas de CTA e logo, melhor o controle da polimerização.

Figura 5.8 Influência da temperatura na conversão individual da NIPAAm, para as reações de copolimerização com o AA, mediada pelo PTETPA.

5.5. Estudo da viabilidade de obtenção de copolímeros em bloco constituídos de NIPAAm e AA via RAFT

Uma das principais vantagens do mecanismo RAFT é a possibilidade de sintetizar copolímeros em bloco empregando monômeros práticos (monômeros ácidos ou básicos) numa única etapa, ou seja, sem a necessidade de proteger o grupo funcional antes da polimerização. Para avaliar a eficiência do PTETPA na preparação de copolímeros em bloco constituídos de NIPAAm e AA foram realizadas três reações. A primeira reação foi realizada em duas etapas, denominadas aqui de C8a e C8b, conforme metodologia descrita a seguir: Na primeira etapa (C8a) a reação foi inicializada com o monômero NIPAAm e decorridos 300 minutos de reação, adicionou-se o AA e a reação foi conduzida por mais 300 minutos (segunda etapa C8b). É sabido que esta primeira metodologia não é adequada para a síntese de copolímeros em blocos via RAFT, servindo apenas como avaliação/confirmação das características vivas da

polimerização. Contudo, como na primeira etapa (C8a) foi atingida alta conversão, e considerando-se o valor de Mn_{exp} e o baixo valor de IP obtidos, podemos afirmar que nesta reação conduzida em duas etapas, ocorreu a formação de um copolímero em bloco. É evidente que este copolímero em bloco apresentara um segmento com distribuição aleatória de unidades de NIPAAm e de AA, no período de transição dos macro-radicaís terminados em NIPAAm para macro-radicaís terminados em AA.

Uma vez evidenciada a possibilidade de formação de copolímeros com características de copolímero em bloco na reação C8, as reações C9 e C10 foram conduzidas empregando a metodologia adequada para avaliar a eficiência do PTETPA em controlar uma polimerização via RAFT, sintetizando copolímeros em bloco constituídos de NIPAAm e de um monômero prótico, no caso o AA. Estas duas reações foram conduzidas de acordo com a seguinte metodologia: na reação C9, a NIPAAm foi polimerizada num tempo de reação igual a 300 minutos. O polímero obtido nesta reação foi purificado e seco. Este polímero, agora denominado de macro-agente RAFT foi novamente solubilizado em 1,4-dioxano, seguido da adição de uma carga de iniciador AIBN e de AA. Esta nova reação (C10) foi conduzida por um período de 300 minuto. A Tabela 5.7 apresenta as condições experimentais destas 3 reações e a Tabela 5.8 apresenta os resultados de conversão, massa molecular e polidispersidade obtidos neste estudo.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.8 foi possível verificar que na primeira etapa da reação C8 (C8a) a conversão da NIPAAm foi alta, cerca de 94% de conversão. Como mencionado anteriormente, apesar desta metodologia não ser a mais adequada para a síntese de copolímeros em bloco, este alto valor de conversão na primeira etapa garantiu a formação de uma seqüência de AA na extremidade dos copolímeros. Como foi

possível evidenciar, na segunda etapa desta reação, a conversão do AA foi de 70%, enquanto que a conversão da NIPAAm residual foi de aproximadamente 3%. Este resultado indica que o copolímero final obtido nesta metodologia apresentava em suas extremidades longas seqüências de AA com algumas unidades de NIPAAm copolimerizada. Outro resultado que confirmou a eficiência do PTETPA no controle da polimerização via RAFT foi a polidispersidade dos copolímeros obtidos, pois após esta seqüência reacional, o copolímero obtido apresentou polidispersidade de 1,17.

Os resultados das reações C9 e C10 confirmaram a eficiência do PTETPA na síntese de copolímeros em bloco de NIPAAm e AA. A Tabela 5.8 mostra um resultado de conversão para o AA na reação C10, de 30% após 300 minutos de reação. Considerando que o AA tem baixa razão de reatividade quando polimerizado com a NIPAAm, e que se trata de um monômero prótico, geralmente de difícil polimerização via mecanismos “vivos”, este resultado de conversão foi satisfatório. O baixo valor de polidispersidade do copolímero em bloco obtido (IP=1,14) confirmou a eficiência do PTETPA no controle da polimerização.

Tabela 5.7 - Dados experimentais para as sínteses de PNIPAAm-b-AA, via RAFT, utilizando PTETPA como agente de controle.

Reação		[NIPAAm]/[AA] (Molar)	Formulação [g]			
			NIPAAm	AA	CTA	AIBN
C8	a	100/0	2,04	-	0,0145	0,0026
	b	90/10	-	0,1508	-	-
C9		100/0	2,05	-	0,0148	0,0026
C10		90/10	-	0,1416	-	0,0012

Temperatura= 70°C, solvente: 1,4-dioxano = 10,0 mL, tempo de reação (a+b) = 600 minutos

a= reação inicializada somente com a NIPAAm; b= adição de AA decorridos 300 minutos de reação (tempo total de reação (a+b) = 600 minutos).

Tabela 5.8 - Resultados de conversão final, massa molecular e Índice de Polidispersidade para as sínteses de PNIPAAm-b-AA, via RAFT, utilizando PTETPA como agente de controle.

Reação		Conversão individual [%]		Mn _t (g/mol)	Mn _{exp} (g/mol)	IP*
		NIPAAm	AA			
C8	a	93,6	-	-	-	-
	b	96,8	70,0	34672	65407	1,175
C9		91,8	-	-	-	-
C10		-	30,3	31453	64270	1,142

* *Índice de Polidispersidade**a= homopolimerização da NIPAAm**b= adição de AA decorridos 300 minutos da homopolimerização da NIPAAm*

5.6. Determinação da LCST

Conforme mencionado anteriormente, a temperatura crítica inferior de solubilização (LCST) da PNIPAAm pode ser alterada pela incorporação em suas cadeias de grupos hidrofílicos ou hidrofóbicos. Copolímeros de NIPAAm contendo grupos hidrofílicos apresentam maiores valores de LCST. (CHUNG; et al., 1999)

Neste trabalho foi determinada a LCST de 1 amostra de PNIPAAm e de 2 amostras de PNIPAAmAA em dois pHs diferentes (4,0 e 7,0). A LCST das soluções poliméricas (5 g/L) foi estabelecida como sendo o valor correspondente ao decréscimo de 50% da transmitância óptica inicial. (CHUNG; et al., 1999) A Figura 5.9 apresenta a variação da transmitância [%] a 542 nm *versus* a temperatura [°C], da PNIPAAm (H14), do PNIPAAmAA obtido nas condições experimentais da reação C2 (5% de AA, mol) e do PNIPAAmAA obtido nas condições experimentais da reação C3 (10% de AA, mol). Para estes dois últimos produtos foi avaliado também a influência do pH na LCST destes copolímeros.

A primeira informação que pode ser retirada da Figura 5.9 é o aumento da LCST do polímero com a incorporação do AA. Observa-se que a PNIPAAm tem LCST em torno de 32 °C e com a adição do AA a LCST aumentou para valores superiores a 34 °C. É possível observar ainda uma ligeira diferença, mesmo que pouco significativa, entre os valores de LCST dos copolímeros PNIPAAmAA sintetizados com diferentes composições monoméricas. O PNIPAAmAA preparado com uma composição monomérica inicial ([NIPAAm]/[AA]) de 90/10, apresentou maior valor de LCST. O pH do meio apresentou significativa influência na LCST dos copolímeros. Conforme os resultados da Figura 5.9, no pH 7,0, não foi possível identificar a LCST dos copolímeros, ou seja, os valores de LCST estariam acima de 45 °C. Este aumento na LCST dos copolímeros em função do aumento do pH foi provocado pela ionização dos grupos carboxílicos do AA, tornando os copolímeros ainda mais hidrofílicos, isto é, mais solúveis na fase aquosa.

Figura 5.9. Perfil das curvas de LCST determinadas por transmitância a 542 nm, [polímeros] = 5 g/L.

5.7. Avaliação da influência da temperatura e do pH nas propriedades de soluções aquosas de PNIPAAmAA

Apesar das limitações do equipamento de Espalhamento de Luz que foi utilizado nestas análises (apenas um ângulo de difração de 90° e sem controle preciso de temperatura), foi possível verificar a formação em água de aglomerados e de partículas com os copolímeros de NIPAAm e AA. O objetivo deste estudo era investigar a influência da temperatura e do pH no fenômeno de aglomeração das macrocadeias de PNIPAAmAA. Para realizar este estudo foram utilizados o PNIPAAmAA obtido nas condições experimentais da reação C2 (razão molar de [NIPAAm]/[AA] igual a 95/5) e o PNIPAAmAA obtido na copolimerização C3 (razão molar de [NIPAAm]/[AA] igual a 90/10%). É importante ressaltar que os diâmetros medidos pelo equipamento de espalhamento de luz são na verdade os diâmetros de aglomerados de PNIPAAmAA. Mesmo assim, considerando o método de análise nesta técnica e a resposta fornecida pelo equipamento, estaremos chamando aqui estes aglomerados, de partículas. A Tabela 5.9 apresenta os resultados de diâmetro de partícula (DP) e/ou de aglomerados e de índice de polidispersidade (IP), assim como informações sobre a coloração das soluções poliméricas, em diferentes valores de temperatura e pH.

Na Figura 5.10, é proposto um esquema que ilustra o efeito da temperatura e do pH na formação e estabilização de agregados de copolímeros de PNIPAAmAA, com diferentes composições monoméricas. A discussão a seguir será feita com base neste esquema e para os dois copolímeros de composição química diferentes.

Primeiramente, os resultados apresentados na Tabela 5.9 foram analisados comparando-se os valores de DP numa mesma temperatura, avaliando-se desta forma, a influência do pH no

grau de aglomeração dos copolímeros estudados. Como pode ser observado neste estudo, para temperatura de 25°C, o aumento do pH de 3 para 7, resultou no aumento no diâmetro médio das partículas. O diâmetro dos aglomerados de PNIPAAmAA sintetizado com razão molar de [NIPAAm]/[AA] igual a 95/5 variou de 284 nm para 891 nm e, no caso do PNIPAAmAA com razão molar de [NIPAAm]/[AA] igual a 90/10 o DP variou de 144 nm para 878 nm. Esta variação no DP pode ser atribuída à ionização dos grupos COOH do AA incorporados no copolímero. Em pH 7,0 a ionização do AA aumenta a solubilidade do polímero em água e além disso, provoca a expansão das cadeias poliméricas pelo efeito de repulsão eletrostática, resultando num aumento significativo do volume hidrodinâmico dos agregados de PNIPAAmAA. Também foi possível observar que a quantidade de AA nos copolímeros influenciou o diâmetro dos aglomerados. Em pH 3,0 o diâmetro dos aglomerados obtidos com o copolímero com razão molar de [NIPAAm]/[AA] igual a 90/10 foi praticamente a metade daqueles obtidos com o copolímero com razão molar de [NIPAAm]/[AA] igual a 95/5. Por outro lado, em pH 7,0 os diâmetros foram quase equivalentes. Estes resultados poderiam ser explicados pela contribuição feita pelo AA na estabilidade dos aglomerados, mesmo num pH igual a 3,0. No pH igual a 3,0, mesmo o AA não estando ionizado, o aumento de sua concentração poderia ter contribuído para a estabilidade dos aglomerados, estabilidade estérica, diminuindo a aglomeração para o copolímero com razão molar de [NIPAAm]/[AA] igual a 90/10. Já em pH 7,0, os diâmetros dos aglomerados foram equivalentes por que neste pH o que prevaleceu na estabilização dos aglomerados foi a contribuição de repulsão eletrostática do AA. Nesta condição a quantidade de AA presente no copolímero não influenciou no diâmetro dos aglomerados

Nas análises realizadas numa temperatura superior a LCST, isto é a 50°C, a influência da ionização do AA no diâmetro médio dos agregados também foi evidenciada. O efeito do pH nas propriedades das soluções poliméricas é muito diferente daquele observado na temperatura de 25°C. Nesta temperatura observa-se a formação de aglomerados com diâmetros muito maiores, em pH ácido, contrariamente ao que foi observado nos ensaios conduzidos a 25°C. Em pH 3,0 ocorreu a formação de grandes aglomerados, como resultado da coalescência de cadeias poliméricas e/ou menores agregados. Assim como foi observado para o sistema a 25°C, nesta temperatura de 50°C, o AA em maior quantidade, mesmo não estando ionizado, parece ter um efeito determinante na formação e estabilização destes maiores aglomerados. O diâmetro médio dos aglomerados diminui de 2457 para 1077 nm, quando a quantidade de AA passa de 5 para 10 % (molar). O aumento da temperatura de 25 para 50°C num pH de 7,0 resultou num diâmetro de aglomerados completamente diferente daquele obtido com o aumento da temperatura no pH 3,0, pois aquecendo-se as soluções de copolímeros os aglomerados apenas coalesceram, diminuindo o diâmetro, porém sem posteriores aglomerações acarretando um aumento do diâmetro dos aglomerados. Outra informação importante obtida nesta condição foi o índice de polidispersidade dos aglomerados. Este resultado poderia ser atribuído à estabilidade eletrostática provocada pelo AA ionizado.

No pH 7,0 e na temperatura de 50°C os valores de índice de polidispersidade foram os menores valores obtidos no estudo. Estes valores de índice de polidispersidade diminuíram de 1 para 0,066, no caso do copolímero com razão molar de [NIPAAm]/[AA] igual a 95/5, indicando a formação de uma dispersão polimérica muito homogênea, graças ao efeito de estabilização do AA ionizado e ao fato de ter uma parte (maior parte) do polímero que é

insolúvel em água, nesta temperatura. No pH 7,0, assim como no pH 3,0, a quantidade de AA no copolímero não influenciou no diâmetro dos aglomerados.

Tabela 5.9 - Resultados das análises de Espalhamento de Luz em função da temperatura e do pH para duas amostras de PNIPAAmAA com razões molares diferentes.

Reação	pH	T [°C]	coloração	IP*	DP [nm]
C2 [NIPAAm]/[AA] 95/5	3,0	25	translúcida	1,000	284,3
	3,0	50	turva	1,000	2457,4
	7,0	25	translúcida	1,000	891,1
	7,0	50	turva	0,066	247,4
C3 [NIPAAm]/[AA] 90/10	3,0	25	translúcida	0,961	143,5
	3,0	50	turva	1,000	1076,7
	7,0	25	translúcida	1,000	878,0
	7,0	50	turva	0,463	243,9

* Índice de Polidispersidade

Figura 5.10. Mecanismo ilustrativo de formação de agregados em função da temperatura e pH do PNIPAAmAA com diferentes razões molares de NIPAAm e AA.

Capítulo VI

**Síntese dos Copolímeros em Bloco
constituídos de PHBHV-b-PNIPAAm e
PHBHV-b-PNIPAAmAA**

6.1. Introdução

A síntese dos copolímeros em bloco foi conduzida pelo método de acoplamento entre grupos funcionais presentes no PHBHV e na PNIPAAm ou PNIPAAmAA. Os copolímeros em bloco anfifílicos via reação de esterificação entre as carboxilas presentes na PNIPAAm e PNIPAAmAA e os grupos hidroxilas presentes no PHBHV. Para estas reações foram utilizados os seguintes agentes ativadores: CDI e DCC para ativação da função carboxila do PNIPAAm ou do PNIPAAmAA e DMAP e NHS para ativar o grupo funcional hidroxila do PHBHV. Neste estudo foram realizadas doze (12) reações de acoplamento variando-se as massas moleculares dos polímeros e os agentes ativadores.

6.2. Síntese dos copolímeros em bloco anfifílicos

A Figura 6.1 representa o esquema da reação de acoplamento empregado neste trabalho, utilizando como ativadores de reação o DCC e a DMAP. As Tabelas 6.1 e 6.2 apresentam as formulações e condições experimentais empregadas nas sínteses dos copolímeros em bloco.

Figura 6.1. Esquema de reação empregado na síntese de um copolímero em bloco termo-sensível constituído de PHBV e PNIPAAm, utilizando DCC e DMAP como agentes de acoplamento.

Tabela 6.1 - Formulações utilizadas nas reações de acoplamento do PHBV com os polímeros termo-sensíveis.

Reação	PNIPAAm (g)	Mn _{exp} PNIPAAm (g/mol)	PHBV (g)	Mn _{exp} PHBV (g/mol)	DCI (g)	DMAP (g)	DCC (g)	NHS (g)
CB1* [#]	0,1011	32106	0,0500	15747	0,0121	0,01	---	---
CB2** [#]	0,1534	42900	0,1531	15747	---	---	0,0067	0,0037
CB3* [@]	0,1276	5230	0,1276	7973	---	0,0033	0,0055	---
CB4** [@]	0,0573	---	0,0559	7973	---	0,0073	0,0088	---
CB5** [@]	0,1333	32106	0,1351	7973	---	0,0192	0,0198	---
CB6** ^{\$}	0,2384	42269	0,2462	7973	---	0,0740	0,0600	---
CB7** ^{\$}	1,8400	30830	1,8000	7973	---	0,1800	0,1909	---
CB8** ^{\$}	1,0380	40375	1,1462	9447	---	0,2192	0,2010	---

Temperatura de reação: *50°C; **Ambiente; Tempo de reação: [#]24 horas; [@]48 horas e ^{\$}7 dias.

Tabela 6.2 - Formulações utilizadas nas reações de acoplamento do PHBHV com os polímeros termo-pH-sensíveis.

Reação	PNIPAAmAA (g)	Mn _{exp} PNIPAAmAA (g/mol)	PHBHV (g)	Mn _{exp} PHBHV (g/mol)	CDI (g)	DMAP (g)	DCC (g)	NHS (g)
CBAA1*[#]	0,0807	15879	0,0422	15747	0,01	0,0125	---	---
CBAA2**[#]	0,1040	15879	0,1150	15747	---	---	0,00433	0,00242
CBAA3**^{,\$}	0.2800	12534	0.5600	9447	---	0,0500	0,0500	---
CBAA4***^{,@}	1,0300	49551	1,0400	9447	---	0,1000	0,0130	---

Temperatura de reação: *50°C; **Ambiente ***80°C; Tempo de reação: [#]24 horas; [@]48 horas e ^{\$}7 dias.

Como pode ser observado no esquema apresentado na Figura 6.1, a reação de acoplamento entre os polímeros PHBHV e PNIPAAm ocorre entre seus grupos funcionais presentes na extremidade da cadeia polimérica. Com isso, o produto final desta reação poderá ser constituído, pelo copolímero em bloco de PHBHV-b-PNIPAAm, macrocadeias de PHBV e PNIPAAm que não reagiram.

Desta forma, a caracterização dos produtos destas reações de acoplamento apresenta algumas complicações, pois a separação do PHBHV-b-PNIPAAm formado dos polímeros que não reagiram não é trivial. Duas das diferentes possibilidades de caracterização dos produtos obtidos neste tipo de reação seriam a utilização da técnica de GPC e a escolha de solventes e não-solventes que separem os copolímeros em bloco dos polímeros residuais, pela precipitação seletiva destes materiais, utilizando suas características físico-químicas.

A primeira alternativa escolhida para verificar a formação dos copolímeros em bloco foi à utilização da técnica de GPC. A primeira e maior dificuldade encontrada no emprego da técnica de GPC na caracterização destes copolímeros em bloco foi o tipo de solvente usado nas análises. O PHBHV não é solúvel na maioria dos solventes que são normalmente empregados na caracterização por GPC, apresentando baixa solubilidade (4 %p/p) em solventes clorados.

Com isso, nesta técnica foi utilizado, primeiramente, clorofórmio como eluente. Para ilustrar os resultados obtidos na caracterização dos produtos da síntese dos copolímeros em bloco por GPC, na Tabela 6.3 estão apresentados os valores de $M_{n_{exp}}$ e de polidispersidade dos produtos das reações CB7 (PHBHV-b-PNIPAAm), CB8 (PHBHV-b-PNIPAAm) e CBAA3 (PHBHV-b-PNIPAAmAA). Os resultados da Tabela 6.3 mostram que as massas moleculares destes copolímeros em bloco não aumentaram significativamente, se comparadas com as massas moleculares dos blocos de PHBHV empregados nas reações. O aumento da massa molecular após as reações de acoplamento seria uma confirmação da formação dos copolímeros em bloco, porém o aumento que ocorreu, cerca de 1000 unidades de massa molecular, não poderia ser considerado como sendo significativo. No entanto, na caracterização da PNIPAAm por GPC, empregando clorofórmio como eluente, foi verificado que este polímero apresentava uma massa molecular muito diferente daquela obtida na análise em que foi utilizado THF como eluente (Tabela 6.3). Por exemplo, na reação CB8, foi utilizada uma PNIPAAm que em THF apresentou massa molecular de 43169 g/mol, enquanto que em clorofórmio a massa molecular foi de 850 g/mol. Como a caracterização do produto desta reação foi realizada em clorofórmio (Figura 6.2), é evidente que a análise indicará uma influencia da PNIPAAm na massa molecular final muito pouco significativa. Logo, no caso da reação CB8 a variação da $M_{n_{exp}}$ de 9447 g/mol para 10772 g/mol, mesmo sendo pouco significativa, poderia ser atribuída à formação do copolímero em bloco. A Figura 6.2 apresenta a sobreposição dos cromatogramas do produto obtido na reação CB8, do PHBHV e da PNIPAAm utilizados nesta reação. Como pode ser observado nesta figura o produto da reação CB8 apresentou um pico com um tempo de retenção 15,6 minutos, que poderia ser atribuído a formação do copolímero em bloco, pois o pico do PHBHV apresentou um tempo de retenção ligeiramente superior (16 minutos), ou seja, uma $M_{n_{exp}}$ inferior ao produto da reação CB8. O cromatograma do produto da reação CB8

também apresentou um pico num tempo de retenção de 19,5 minutos. Este pico poderia ser atribuído a PNIPAAm residual, pois comparando-se os cromatogramas deste produto de reação com o cromatograma da PNIPAAm os tempos de retenção foram os mesmos. A presença deste pico de PNIPAAm residual no cromatograma dos produtos de reação é uma indicação qualitativa de que a reação de acoplamento não apresentou rendimento máximo.

Tabela 6.3 - Valores de massa molecular ($M_{n,exp}$) e índice de polidispersidade das reações de preparação dos copolímeros em bloco termo-pH-sensíveis obtidos nas reações CB7, CB8 e CBAA3.

Reação	PHBHV (M_n/IP)	PNIPAAm/PNIPAAmAA (M_n/IP)	CB (M_n/IP)
CB7	7973** (2,53)	35282* (1,36)	8028** (1,31)
CB8	9447** (1,70)	43169* (1,16) / 850**	10772** (1,21)
CBAA3	9447** (1,7)	12534* (1,21)	9896** (1,24)

THF; ** clorofórmio;

Figura 6.2. Cromatogramas de GPC do PHBHV-1 (Tabela 2.1 do Capítulo2) e do produto da reação CB8, obtidos empregando $CHCl_3$ como eluente .

Ainda na tentativa de comprovar a formação dos copolímeros em bloco via GPC, optou-se pela busca de solventes alternativos para solubilização do PHBHV da PNIPAAm e de seus copolímeros aleatórios PNIPAAmAA. Dentre alguns solventes testados, a

dimetilformamida (DMF), que é comumente empregada na solubilização destes polímeros, foi testada e tanto o PHBHV, PNIPAAm ou PNIAPAA e assim como o produto das reações entre estes polímeros, isto é, os copolímeros em bloco solubilizaram neste solvente quando aquecidos a uma temperatura de 80°C. A Figura 6.3 apresenta a sobreposição dos cromatogramas de GPC obtidos na caracterização do produto da reação CB8 e dos polímeros de partida. (PHBHV e PNIPAAm), empregando DMF como eluente. Com a sobreposição destes três cromatogramas foi possível observar que nesta nova condição de análise a massa molecular da PNIPAAm é muito superior à massa molecular do PHBHV. Esta diferença entre a massa molecular da PNIPAAm e do PHBHV já havia sido confirmada nas caracterizações destes dois polímeros em seus melhores solventes, THF para PNIPAAm e clorofórmio para o PHBHV (Tabela 6.3). O resultado também demonstrou que o produto desta reação apresenta dois picos, sendo um de maior intensidade, que poderia ser atribuído ao copolímero em bloco e o segundo, de menor intensidade que poderia ser atribuído ao PHBHV residual. O primeiro pico está deslocado para um menor volume de retenção, quando comparado com o pico referente a PNIPAAm. Este deslocamento, apesar de não ser muito significativo, pode ser justificado pela importante diferença entre as massas moleculares do PHBHV (9447 g/mol) e da PNIPAAm (43169 g/mol), utilizados nesta reação.

Figura 6.3. Cromatogramas de GPC do PHBHV-1 (Tabela 2.1, Capítulo 2), PNIPAAm e o produto da reação CB8 obtidos empregando DMF como eluente.

Como mencionado anteriormente, uma outra alternativa para a confirmação da formação dos copolímeros em bloco seria a utilização da técnica de precipitação seletiva. A Figura 6.4 apresenta um fluxograma que ilustra a metodologia utilizada na separação dos copolímeros em bloco dos polímeros residuais (PNIPAAm e PHBHV). Numa primeira etapa, o produto da reação foi solubilizado em clorofórmio e a solução obtida foi gotejada em metanol gelado para a precipitação do PHBHV residual. O metanol foi escolhido por ser um não-solvente do PHBHV e um ótimo solvente para a PNIPAAm e seus copolímeros em baixas temperaturas. Com isso, promovendo esta precipitação seletiva em metanol o PHBHV residual seria separado por precipitação, a PNIPAAm residual ficaria solúvel no metanol e o copolímero em bloco poderia estar no metanol ou precipitado, dependendo das características de solubilidade do copolímero em bloco em metanol. Se no copolímero em bloco o segmento de PNIPAAm conferir solubilidade ao copolímero em metanol, este ficaria solúvel no filtrado. Por outro lado, se o segmento de PHBHV presente no copolímero em bloco torna-lo insolúvel

no metanol, este ficaria na forma de precipitado em meio ao metanol. Para confirmar estas hipóteses, os polímeros recuperados no filtrado e no precipitado foram purificados, secos e submetidos a análises de RMN ^1H para determinação da composição química.

Nesta etapa serão apresentados os resultados de caracterização das frações obtidas na técnica de precipitação seletiva (filtrado e precipitado) dos produtos das reações CB3, CB4, CB5 e CB6, ou seja, reações realizadas na presença de PHBHV e PNIPAAm. Estes copolímeros em bloco foram escolhidos pelo fato de terem sido obtidos com homopolímeros de NIPAAm, que apresentam na cadeia polimérica apenas uma função carboxila (grupo terminal de cadeia, proveniente do agente RAFT/CTA). Para estes sistemas o rendimento das reações de acoplamento deveria ser menor do que o rendimento das reações onde foram utilizados os copolímeros PNIPAAmAA (maior número de grupos $-\text{COOH}$, distribuídos ao longo de toda a cadeia polimérica. Para identificar os polímeros via RMN ^1H foram utilizados alguns deslocamentos característicos de cada material, sendo estes: 2,5 e 5,2 ppm para o PHBHV e 4,0 ppm para a PNIPAAm.

Figura 6.4. Fluxograma ilustrativo da técnica de precipitação seletiva utilizada na separação do produto de reação dos polímeros residuais de uma reação de acoplamento entre o PHBHV e PNIPAAm.

As Figuras 6.5 e 6.6 apresentam os espectros de RMN ^1H dos polímeros recuperados no filtrado e no precipitado do produto da reação de acoplamento da PNIPAAm ($M_{n\text{exp}} = 5230$ g/mol) e o PHBHV-1 ($M_{n\text{exp}} = 7973$ g/mol) (reação CB3), respectivamente. A análise de RMN do produto recuperado na evaporação do filtrado indicou apenas a presença da PNIPAAm,

caracterizado pelo sinal na forma de singlete em 4,0 ppm. Nesta fração não foi identificado nenhum deslocamento que poderia ser atribuído ao PHBHV. Este resultado indica que a reação de acoplamento não foi completa, pois parte da PNIPAAm utilizada na reação foi separada na precipitação seletiva. Analisando-se o espectro de RMN ^1H do precipitado do produto da reação CB3 é possível verificar os deslocamentos característicos ao PHBHV e da PNIPAAm, o que poderia ser uma indicação da formação do copolímero em bloco. Considerando que a PNIPAAm é solúvel em metanol gelado, a identificação deste polímero no precipitado é uma indicação de que o mesmo está quimicamente ligado ao PHBHV. Como foi confirmada a presença de PNIPAAm livre, provavelmente também existe PHBHV livre no meio reacional, conforme observado nas análises de GPC do produto em DMF (Figura 6.3). Contudo, não foi possível separar o PHBHV residual do copolímero em bloco formado, uma vez que este homopolímero precipita junto com o copolímero em bloco, no não-solvente utilizado.

Figura 6.5. Espectro de RMN ^1H do material recuperado após evaporação do filtrado da precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB3.

Figura 6.6. Espectro de RMN ^1H do precipitado obtido com técnica de precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB3.

Assim como para a reação CB3, o produto da reação de acoplamento da reação CB4 foi precipitado em metanol gerando duas frações, filtrado e precipitado, e os polímeros recuperados destas frações também foram caracterizados por RMN ^1H . As Figuras 6.7 e 6.8 apresentam os espectros de RMN ^1H dos polímeros recuperados nestas frações. O polímero obtido após a evaporação do metanol (filtrado) não apresentou nenhum sinal referente à PNIPAAm, todavia, apresentou todos os deslocamentos referentes ao PHBHV, como pode ser observado na Figura 6.7. Este resultado não era esperado, uma vez que, conforme mencionado anteriormente, o PHBHV não é solúvel em metanol. No entanto, o que poderia explicar este resultado seria a presença de resíduo de PHBHV de baixa massa molecular (oligômeros provenientes do processo de hidrólise) no metanol.

A Figura 6.8 apresenta o espectro de RMN ^1H do precipitado obtido na precipitação seletiva do produto e dos resíduos da reação de acoplamento da reação CB4. Neste espectro

foram identificados os sinais provenientes do PHBHV e da PNIPAAm. Assim como na reação CB3, neste caso, a presença da PNIPAAm no precipitado indica a possível formação de copolímeros em bloco.

Figura 6.7. Espectro de RMN ^1H do material recuperado após evaporação do filtrado da precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB4.

Figura 6.8. Espectro de RMN ^1H do precipitado obtido com técnica de precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB4.

As Figuras 6.9 apresenta o espectro de RMN ^1H do precipitado gerado na precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento entre a PNIPAAm e o PHBHV, conduzida nas condições experimentais da reação CB5. Observando-se este espectro foi possível identificar os sinais referentes a PNIPAAm e ao PHBHV. Este resultado também poderia ser uma indicação de que o copolímero em bloco foi formado.

Figura 6.9. Espectro de RMN ^1H do precipitado obtido na precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB5.

Para a reação CB6 os resultados encontrados por RMN ^1H dos polímeros recuperados após a secagem do filtrado e do precipitado foram diferentes dos resultados obtidos para os produtos das reações CB3, CB4 e CB5. A Figura 6.10 apresenta o espectro de RMN ^1H do polímero obtido no filtrado da precipitação seletiva do produto da reação CB6. Neste espectro foi possível observar a presença dos deslocamentos que caracterizariam a PNIPAAm e também os deslocamentos que caracterizam o PHBHV, indicando a possível presença do copolímero de bloco nessa fração. Por outro lado, o espectro de RMN ^1H do precipitado (Figura 6.11) não apresenta nenhum deslocamento referente à PNIPAAm foi identificado, apenas os sinais referentes ao PHBHV. A presença de deslocamentos referentes a PNIPAAm apenas no

material recolhido após a evaporação do filtrado poderia ser uma indicação da formação do copolímero em bloco. É importante ressaltar que nesta síntese (CB6), a massa molecular da PNIPAAm utilizada ($M_{n_{exp}} = 42269$ g/mol) era muito maior do que a massa molecular do PHBHV (7973 g/mol). Esta maior massa molecular do segmento hidrofílico poderia ter conferido ao copolímero em bloco solubilidade no metanol, o que não ocorreu com os produtos das reações CB3, CB4 e CB5 devido a relação entre a massa molecular da PNIPAAm e do PHBHV.

Figura 6.10. Espectro de RMN ^1H do material recuperado após evaporação do filtrado da precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB6.

Figura 6.11. Espectro de RMN ^1H do precipitado obtido com técnica de precipitação seletiva do produto da reação de acoplamento conduzida nas condições da reação CB6.

6.3. Determinação da LCST dos copolímeros em bloco

Neste estudo foram determinados os valores de LCST do copolímeros em bloco PNIPAAm-b-PHBHV obtido nas condições da reação CB7 e PNIPAAmAA-b-PHBHV obtido nas condições experimentais da reação CBAA3. Para avaliar a influência do pH na LCST, as soluções aquosas destes copolímeros em bloco foram analisadas em dois pHs diferentes, 4,0 e 7,4.

A Figura 6.12 ilustra a influência do AA na LCST dos copolímeros em bloco sintetizados neste trabalho. Como é possível constatar, a LCST do copolímero formado por PHBHV-b-PNIPAAm (reação CB7) não sofre nenhuma variação em função da mudança do pH, como já era esperado uma vez que a PNIPAAm não apresenta nenhum grupo passível de ionização. Já no caso do copolímero em bloco que apresenta em sua cadeia o comonômero

ionizável AA (PHBHV-b-PNIPAAmAA/CBAA3), a LCST variou de maneira significativa com a variação do pH. Para o pH 4,0, a LCST do copolímero em bloco foi de aproximadamente 33°C e em pH igual a 7,4 a LCST aumentou para 37°C. Este aumento na LCST em função do pH é atribuído à ionização do AA no pH de 7,4, conferindo maior hidrofilicidade ao copolímero em bloco.

Figura 6.12. Efeito do pH na LCST de dois copolímeros em bloco, um contendo PNIPAAm (CB7) e outro contendo PNIPAAmAA (CBAA3), como segmentos hidrofílicos.

Capítulo VII

Preparação das nanopartículas

“inteligentes”

7.1. Introdução

Nesta etapa do trabalho foi estudada a micelização dos copolímeros em bloco anfifílicos termo-pH-sensíveis em meio aquoso para formação das nanopartículas do tipo núcleo-casca. Para este estudo foram preparadas 4 (quatro) amostras de nanopartículas empregando a técnica de auto-agregação em meio aquoso. Os copolímeros em bloco utilizados na preparação das nanopartículas foram o PHBHV-b-PNIPAAm obtido nas condições da reação CB1, PBHV-b-PNIPAAm obtido na reação CB7 e dois copolímeros em bloco termo-pH-sensíveis obtidos nas reações CBAA03 e CBAA04, sendo todos estes copolímeros em bloco sintetizados nas condições experimentais apresentadas nas Tabelas 5.1 e 5.2 do Capítulo VI. As nanopartículas foram caracterizadas via LS, TEM e turbidimetria. Nestas caracterizações foram avaliados o diâmetro médio de partículas em função da temperatura e do pH, a estrutura das nanopartículas pelas imagens obtidas via TEM e a estabilidade (aglomeração/desaglomeração) das nanopartículas no meio aquoso em função da temperatura também foi avaliada via turbidimetria.

7.2. Preparação das nanopartículas “inteligentes”.

A Figura 7.1 apresenta o esquema de formação das nanopartículas no meio aquoso, empregando a técnica de difusão de solventes. A formação das nanopartículas ocorre por meio da autoagregação dos copolímeros em bloco anfifílicos, formando uma nanoestrutura estável que pode se modificada com a variação da temperatura e do pH. A formação e estabilização das nanopartículas não dependem da adição de agentes estabilizantes, como tensoativos ou colóides protetores, a proteção coloidal é feita pelos segmentos hidrofílicos presentes na

composição química do copolímero em bloco. No entanto, as condições experimentais para autoagregação de um copolímero em bloco anfifílico e formação de uma nanopartícula não são simples de serem definidas, pois depende de diversos fatores, tais como: tipo do solvente utilizado na técnica de difusão, concentração do copolímero em bloco, temperatura e razão entre as massas moleculares dos segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos.

Figura 7.1 Esquema de formação das nanopartículas pelo método de diálise, empregando copolímeros em bloco anfifílicos.

Neste trabalho foi utilizado como segmento hidrofóbico o PHBHV e como segmento hidrofílico a PNIPAAm ou PNIPAAmAA. Neste caso, a definição das melhores condições de autoagregação dos copolímeros em bloco foi obtida após avaliar diferentes condições experimentais, como solventes, temperatura e pH, concentração da suspensão de

nanopartículas após o processo de autoagregação e os tamanhos dos segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos do copolímero em bloco.

Na escolha do solvente para preparação das nanopartículas surgiu o primeiro problema nesta etapa do trabalho, ou seja, à limitação com à solubilização do PHBHV em solventes que fossem miscíveis em água. É importante lembrar que a técnica de difusão de solventes baseia-se no princípio de que o solvente do copolímero em bloco seja miscível na água. A primeira tentativa foi a solubilização do copolímero em bloco em clorofórmio, por ser este um solvente para ambos os segmentos do copolímero em bloco, porém este solvente não era miscível em água. A possibilidade de utilizar o clorofórmio como solvente e conduzir a micelização diretamente em água foi descartada logo no início do estudo por formar grandes agregados após a evaporação do clorofórmio. Porém, uma alternativa foi encontrada para a utilização do clorofórmio como solvente, ou seja, a utilização de um co-solvente na água que promovesse a miscibilidade do clorofórmio na água. Os co-solventes testados foram: acetona, metanol, tetrahidrofurano e etanol. Dentre estes co-solventes utilizados aquele que apresentou o melhor resultado foi o etanol. Utilizando este sistema, isto é, a mistura clorofórmio/etanol, foi possível preparar a primeira amostra de nanopartícula apresentada neste trabalho, denominada de Np01. Esta amostra de nanopartículas que é foi preparada empregando um copolímero de bloco constituído de PHBHV e PNIPAAm, sintetizado nas condições da reação CB1.

Outro solvente utilizado em substituição ao clorofórmio foi a dimetilformamida (DMF), devido a afinidade deste solvente com os copolímeros em bloco à base de PHBHV. Este novo solvente apresentava a vantagem de ser miscível em água, dispensando a utilização de co-solvente. Com este sistema constituído de DMF/água mais três amostras de nanopartículas foram preparadas pela autoagregação dos copolímeros em bloco empregando a técnica de difusão de solvente. As nanopartículas obtidas foram denominadas: Np02, formada

pelo PHBHV-b-PNIPAAm obtido nas condições experimentais da reação CB7, Np03, constituída de PHBHV-b-PNIPAAmAA obtido nas condições experimentais da reação CBAA3 e uma quarta amostra (Np04) constituída de PHBHV-b-PNIPAAmAA obtido nas condições experimentais da reação CBAA4.

Outro fator importante no processo de autoagregação dos copolímeros em bloco, contudo mais simples de ser definido, foi a temperatura. Neste caso a temperatura de micelização deverá ser inferior a LCST da PNIPAAm ou PNIAPAAm empregada na síntese do copolímero de bloco. A influência do pH foi observada apenas para os sistemas constituídos por PNIPAAmAA e em pH superior a 5,0, valor que torna o AA ionizado e este contribui na estabilização das nanopartículas formadas.

A concentração de copolímero em bloco utilizada no processo de auto-agregação influenciou diretamente no diâmetro médio (DP) das nanopartículas e também na polidispersidade (IP). Observou-se que o aumento da concentração de copolímero em bloco provocava um aumento do diâmetro médio das nanopartículas e da polidispersidade. Os melhores sistemas foram obtidos com concentrações de copolímero em bloco inferiores a 1mg/mL. A Figura 7.2 ilustra o aumento do DP e IP das dispersões poliméricas em função da concentração do copolímero em bloco. Neste estudo foi utilizado o copolímero de bloco PHBHV-b-PNIPAAmAA sintetizado nas condições da reação CBAA4. No entanto, este aumento não foi proporcional ao aumento da concentração do CB. Para uma concentração de 1mg/mL o diâmetro médio das partículas foi de 205 nm com polidispersidade de 0,309. Já para uma micelização com concentração do CB de 5 mg/mL (cinco vezes mais concentrada) o diâmetro médio das partículas foi de 357nm com polidispersidade de 0,549. Este resultado é muito importante, uma vez que indica a possibilidade de aumento do teor de nanopartículas na

dispersão (fator econômico) permanecendo o sistema na escala nanométrica (escala de interesse para aplicação nesta tese).

Figura 7.2. Influência da concentração do copolímero em bloco no DP e IP das nanopartículas obtidas pela técnica de autoagregação empregando PHBHV-b-PNIPAAmAA obtido nas condições da reação CBAA4.

A amostra Np01 foi caracterizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) com o objetivo de avaliar o tipo de estrutura formada no processo de autoagregação. A Figura 7.3 apresenta duas imagens obtidas nesta caracterização. Uma evidência da formação de partículas pode ser feita com a imagem A da Figura 7.3, pois é possível identificar uma população de partículas com diâmetro relativamente homogêneo, porém com a formação de alguns agregados. Apesar da formação destes agregados é possível identificar a região que correspondente a cada núcleo de partícula. Estes aglomerados podem ter sido gerados em duas

ocasiões, durante o processo de autoagregação dos copolímeros em bloco em água e/ou durante a preparação da amostra para ser analisada por TEM. Neste caso a primeira hipótese poderia ser descartada pelos resultados obtidos na caracterização via LS, pois para este sistema foi obtido uma polidispersidade em torno de 0,3, resultado este que indica uma grande diferença entre diâmetros de partículas, porém com pouca aglomeração de partículas. Outra informação importante obtida nesta caracterização foi o tipo de estrutura das nanopartículas. Como é possível observar, a imagem B na Figura 7.3 sugere a formação da estrutura do tipo casca-núcleo. Nesta imagem é possível observar partículas com verificar uma região mais escura que poderia ser atribuída ao núcleo da nanopartícula, constituída pelo segmento hidrofóbico (PHBHV), e outra região mais clara que poderia ser atribuída à casca formada pelos segmentos hidrofílicos.

Figura 7.3. Micrografias de TEM das nanopartículas Np01 (PHBHV-b-PNIPAAmAA – reação CB1).

A sensibilidade à temperatura das nanopartículas foi confirmada pela variação do diâmetro de partícula (DP) em função da temperatura e de medidas de transmitância das nanopartículas em suspensão aquosa. A Figura 7.4 mostra o efeito da temperatura no diâmetro médio das partículas para a amostra Np02. Como pode ser observado nestes resultados o DP apresentou uma pequena diminuição com o aumento da temperatura até a temperatura de 32°C (LCST da PNIPAAm) e a partir desta temperatura o DP aumenta rapidamente com o aumento da temperatura. A diminuição do DP poderia ter sido causada pela desolvatação dos segmentos de PNIPAAm com o aquecimento, seguido da precipitação destes segmentos sobre a superfície dos núcleos hidrofóbicos, diminuindo o diâmetro médio das partículas. Já o aumento significativo do DP acima de 32°C poderia ser resultado da aglomeração das nanopartículas com a formação de agregados. Outro resultado muito interessante foi a diminuição do IP com o aumento da temperatura. Este resultado poderia ser explicado pela aglomeração das nanopartículas de menores diâmetros sobre a superfície das partículas maiores, aumentando o DP e diminuindo o IP, ou até a aglomeração das partículas de menores diâmetros, formando aglomerados com tamanhos equivalentes as partículas de diâmetros maiores já formadas e desse modo diminuindo o IP (Figura 7.5). No entanto, estas hipóteses precisariam ser confirmadas por imagens obtidas via TEM.

Figura 7.4. Efeito da temperatura no DP e IP das nanopartículas Np02 (PHBHV-b-PNIPAAm – reação CB7).

Figura 7.5. Esquema representativo do efeito da temperatura no DP e IP das nanopartículas Np02 (PHBHV-b-PNIPAAm – reação CB7).

A Figura 7.6 apresenta os histogramas das análises de diâmetro das partículas formadas pela micelização de PHBHV-b-PNIPAAmAA obtido na reação CBAA3. Primeiramente, as nanopartículas foram preparadas num pH igual 7,4, condição em que todas as unidades de AA

presentes no segmento hidrofílico do copolímero em bloco encontram-se ionizadas e em seguida parte da amostra teve seu pH ajustado para um valor de 3,0, no qual o AA não está ionizado, logo não contribui para estabilidade das nanopartículas. Os valores de DP para estes dois sistemas foram 184 nm (IP = 0,258) no pH de 7,4 e 436 nm (IP = 1,000) para o pH de 3,0. Este aumento no valor do diâmetro das partículas quando o pH foi diminuído de 7,4 para 3,0 poderia ser explicado pela perda de estabilidade das nanopartículas no meio aquoso e aglomeração das mesmas. Como estas partículas foram preparadas com um copolímero em bloco, no qual o segmento hidrofílico é constituído por NIPAAm e AA, a presença do AA conferiu à camada hidrofílica das nanopartículas a capacidade de mudança às variações de pH. No pH de 7,4 o AA estava em seu estado ionizado e com isso ajudou no processo de estabilização coloidal, isto é, evitando a aglomeração das nanopartículas. Por outro lado, no pH de 3,0 o AA não encontrava-se ionizado e não contribuiu para evitar a aglomeração das nanopartículas.

Estas mesmas amostras de nanopartículas submetidas à análise de LS também foram submetidas à caracterização por TEM. A Figura 7.7 apresenta duas imagens obtidas por TEM nos pHs de 7,4 (imagem A) e 3,0 (imagem B). A imagem na Figura 7.7 (A) mostra partículas com diferentes diâmetros, confirmando a polidispersidade de 0,25 encontrada com a análise de LS, porém neste pH não foi observada a presença de aglomerados, confirmando a contribuição do AA na estabilidade das nanopartículas durante o processo de autoagregação pela técnica de difusão por solvente. Por outro lado, analisando a imagem das nanopartículas num pH 3,0, observa-se a formação de um número maior de aglomerados e principalmente a aglomeração de pequenas partículas sobre a superfície de partículas com diâmetro maiores. Este processo de aglomeração poderia ser atribuído ao estado não ionizado do AA presente no segmento hidrofílico do copolímero em bloco, como mencionado anteriormente.

Figura 7.6. Histogramas de diâmetro médio de partícula (DP) da nanopartícula Np03 (PHBHV-b-PNIPAAmAA – reação CBAA3) nos pHs de 7,4 (imagem A) e 3,0 (imagem B).

Figura 7.7. Micrografias de TEM da Np03 (PHBHV-b-PNIPAAmAA – reação CBAA3) condicionada em pH igual a 7,4 (imagem A) e pH igual a 3,0 (imagem B)

A técnica de turbidimetria foi empregada na caracterização de uma amostra de suspensão de nanopartícula com o objetivo de avaliar o perfil de mudança da transmitância da suspensão em função do aquecimento da amostra. A transmitância da suspensão esta associada

ao grau de solubilidade do segmento hidrofílico do copolímero em bloco. Em temperaturas abaixo da LCST do segmento hidrofílico a transmitância é maior pelo fato da camada hidrofílica da nanopartícula estar solúvel em água, permitindo a passagem da luz. Já em temperaturas acima da LCST os segmentos hidrofílicos precipitam sobre os núcleos das nanopartículas, ocasionando a formação dos aglomerados que torna a suspensão de nanopartículas mais opaca a luz e assim diminuindo a transmitância da suspensão.

As Figuras 7.8 e 7.9 apresentam a variação da transmitância em função da temperatura das nanopartículas Np02. As curvas de cor azul correspondem as transmitâncias no início do ciclo de aquecimento-resfriamento e a curva vermelha ao final de cada ciclo. A transmitância da amostra foi medida durante 24 horas para o aquecimento e este mesmo tempo para o resfriamento. A Figura 7.8 apresenta o processo de aquecimento de 25 para 60°C da suspensão das nanopartículas. Como pode ser observada, a transmitância da suspensão apresenta uma diminuição de aproximadamente 37%. Esta diminuição da transmitância pode ser atribuída à precipitação da PNIPAAm das nanopartículas e a formação dos agregados, devido ao aquecimento acima da LCST do copolímero de bloco. Por outro lado, quando o mesmo sistema é resfriado os valores de transmitância aumentam aproximadamente 36% (Figura 7.9), indicando que a PNIPAAm tornou a solubilizar no meio aquoso com a diminuição da temperatura, provocando a desagregação dos aglomerados. Uma informação importante neste teste foi que o DP não mudou após o ciclo de aquecimento/resfriamento. Esta característica das nanopartículas apresentarem uma casca que altera seu grau de hidrofilicidade/hidrofobicidade em função da variação da temperatura confere a este sistema nanoparticulado grande versatilidade de aplicações. Este mecanismo de precipitação e solubilização da camada hidrofílica das nanopartículas pode ser aplicado com muito sucesso em processos de liberação

controlada de ativos, por se tratar de um mecanismo sofisticado de controle da difusão da droga do interior das nanopartículas.

Figura 7.8. Efeito do aquecimento na transmitância da suspensão das nanopartículas termosensíveis (Np02) obtidas com copolímeros em bloco de PHBHV-PNIPAAm. (25 a 60°C).

Figura 7.9. Efeito do resfriamento na transmitância da suspensão das nanopartículas termosensíveis (Np02) obtidas com copolímeros em bloco de PHBHV-PNIPAAm. (60 a 25°C).

Capítulo VIII

Liberação controlada *in-vitro* do Acetato de Dexametasona

8.1. Introdução

As etapas de encapsulação e liberação *in-vitro* de um ativo modelo não estavam previstas no escopo inicial desta tese, no entanto, para avaliar a viabilidade de utilização das nanopartículas termo-pH-sensível nestas aplicações, foram realizados dois ensaios de encapsulação de um ativo modelo, o acetato de dexametasona (AcDex). Para realizar a encapsulação do AcDex foi empregada à mesma técnica utilizada na preparação das nanopartículas, isto é, a técnica de auto-agregação dos copolímeros em bloco por difusão de solvente (diálise).

8.2. Encapsulação e ensaios de liberação

Os ensaios de encapsulação foram realizados empregando o copolímero em bloco PHBHV-b-PNIPAAm, obtido nas condições de reação CB6 (Tabela 6.1 do Capítulo VI), dando origem ao encapsulado denominado de NpAcDex01 e o PHBHV-b-PNIPAAmAA obtido na reação CBAA3 (Tabela 6.2 do Capítulo VI), que originou o encapsulado NpAcDex02.

Os valores de eficiência de encapsulação para estes dois sistemas foram 77% e 78%, respectivamente.

Os ensaios de liberação *in-vitro* do ativo foram realizados em duas temperaturas distintas, 4 e 40 °C, e em três pHs diferentes 1,2, 5,0 e 7,4. A Figura 8.1 apresenta os perfis de liberação do AcDex para o sistema NpAcDex01, em duas temperaturas diferentes e também o perfil de dissolução do AcDex não encapsulado (livre). Como se pode observar nesta figura, o perfil de liberação do ativo é claramente influenciado pela mudança de temperatura, ou seja, na

temperatura na qual o segmento de PNIPAAm está solúvel no meio aquoso a taxa de liberação do ativo é muito menor que a taxa de liberação do ativo na temperatura de 40°C, onde os segmentos de PNIPAAm estão coalescidos sobre a superfície das nanopartículas. Esta mudança na taxa de liberação do ativo se deve ao fato de que na temperatura de 4°C a camada de PNIPAAm, que forma a casca da nanopartícula, apresentava-se solvatada, dificultando a difusão do ativo do interior das nanopartículas. Com o aumento da temperatura ocorreu a coalescência da PNIPAAm e a modificação da estrutura da nanopartícula. Esta modificação da estrutura da nanopartícula poderia ser responsável pela expulsão ou exposição do ativo para o meio de dissolução, aumentando a taxa de liberação do ativo. Chung; et al., (2002) propuseram que o mecanismo que controla a liberação do ativo num sistema de nanopartículas termo-sensíveis, formadas pela auto-agregação de copolímeros em bloco anfifílicos, é a modificação da estrutura do núcleo da nanopartícula com a coalescência da camada de PNIPAAm. Os autores propuseram este mecanismo com base nos resultados obtidos com dois tipos de nanopartículas termo-sensíveis, uma formada com poli(metacrilato de butila) (PBMA) e outra formada por poliestireno (PS), como segmentos hidrofóbicos dos copolímeros em bloco. Neste trabalho os autores demonstraram que o perfil de liberação modificava com a variação da temperatura apenas para o sistema formado com o PBMA. No caso do sistema formado por PS, a taxa de liberação quase não se alterou em função da temperatura. Segundo os autores, as nanopartículas formadas por PS apresentavam um núcleo muito rígido e compacto, devido a alta temperatura de transição vítrea (T_g) deste polímero, e a coalescência da PNIPAAm não alterava a estrutura deste núcleo e consequentemente o ativo hidrofóbico não era liberado. Para os ensaios de liberação de AcDex realizados nesta tese, o mecanismo que melhor explica os resultados obtidos é aquele proposto por Chung; et al., (2002), pois quando comparou-se as T_g s do PBMA ($T_g = 20^\circ\text{C}$) (HIROAKI, B., et al., 2001) com a do PHBHV ($T_g < 0^\circ\text{C}$),

observou que ambas estão abaixo da temperatura na qual foi conduzido o ensaio de liberação (40°C), enquanto que a T_g do PS ($T_g \sim 100^{\circ}\text{C}$) está muito acima da temperatura de liberação, o que torna o núcleo rígido e compacto, dificultando a liberação do ativo com a coalescência da camada de PNIPAAm. Observou-se também que na curva de liberação conduzida na temperatura de 4°C ocorreu um “burst” (taxa de liberação) inicial na liberação provocado, provavelmente, pela presença de ativo disperso na camada hidrofílica de PNIPAAm.

Figura 8.1. Liberação controlada do AcDex das nanopartículas constituídas por PHBHV-b-PNIPAAm em função da temperatura.

A Figura 8.2 mostra a oscilação na taxa de liberação controlada do AcDex em função da temperatura, comprovando a propriedade de sensibilidade à temperatura das nanopartículas NpAcDex01. Este tipo de controle da liberação do ativo só é possível devido à capacidade de coalescência da camada de PNIPAAm e a alteração do núcleo das nanopartículas formadas pela auto-agregação dos copolímeros em bloco anfifílicos termosensíveis. Na Figura 8.3 é

apresentada uma proposta de mecanismo de liberação do ativo das nanopartículas termosensíveis preparadas nesta tese.

Figura 8.2. Efeito da temperatura na taxa de liberação do AcDex das nanopartículas NpAcDex01.

Figure 8.3. Mecanismo de liberação do AcDex do interior das nanopartículas termossensíveis.

O estudo da influência do pH no perfil de liberação do AcDex foi realizado empregando o sistema NpAcDex02, nos pHs de 1,2, 5,0 e 7,4, nas temperaturas de 35 e 40°C. Os perfis de liberação do AcDex em função do pH estão apresentados na Figura 8.4. Analisando a figura 8.4 foi possível identificar que a maior taxa de liberação do AcDex na temperatura de 40°C ocorreu no pH de 7,4 e a menor taxa de liberação foi no pH de 1,2. Conforme sugerido, a liberação do ativo modelo estaria condicionada ao grau de coalescência da camada externa formada pela PNIPAAmAA na superfície da nanopartícula, ou seja, quanto maior a coalescência maior é a velocidade de liberação do ativo. Neste estudo em particular foram utilizadas nanopartículas preparadas com PHBHV-b-PNIPAAmAA que apresentava LCST de aproximadamente 37°C (Figura 6.12 do Capítulo VI). Conforme mencionado anteriormente, este estudo foi conduzido numa temperatura de 40°C e nesta temperatura a camada de PNIPAAmAA deveria estar coalescida, logo, a variável mais importante neste

estudo seria o pH. Mediante estas condições utilizadas no ensaio, a explicação para a diferença encontrada nos perfis de liberação do AcDex em função do pH poderia ser atribuída ao fato de que no pH de 1,2, o AA não estando ionizado leva a formação de aglomerados, como demonstrado no estudo da influência da temperatura e do pH nas propriedades de soluções aquosas de PNIPAAmAA (ítem 5.7 do Capítulo V). Portanto, a formação dos aglomerados dificultou a difusão do ativo diminuindo a taxa de liberação do mesmo. Por outro lado, com o aumento do pH e a ionização do AA não ocorreu a formação dos grandes aglomerados como no pH 1,2, logo, a difusão do AcDex foi favorecida pela coalêncencia da camada de PNIPAAmAA e a não formação dos aglomerados, que dificultariam a difusão do ativo. Sendo assim, para a temperatura de 40 °C quanto maior o pH maior a taxa de liberação do ativo. A Figura 8.5 ilustra uma proposta de mecanismo de liberação do AcDex das nanopartículas termo-pH-sensíveis nos três pHs estudados e para a temperatura de 40°C. Para se obter um taxa de liberação mais lenta no pH 7,4 deveria-se aumentar a quantidade de ácido acrílico no copolímero de PNIPAAmAA o que levaria a um aumento da LCST para valores superiores à 40°C e nesta nova situação a camada hidrofílica de PNIPAAmAA, que protege o núcleo de PHBHV carregado de ativo, não coalesceria e a liberação do AcDex seria menor que em pHs ácidos, pois neste caso os grupos carboxílicos não estariam ionizados em função do baixo pH e não estariam contribuindo para a solvatação da casca das nanopartículas.. Uma outra alternativa, a qual foi adotada nesta tese, para confirmar a influência do pH na liberação do AcDex, foi a realização de um ensaio numa temperatura abaixo de 37°C, isto é, a 35 °C, temperatura esta intermediária à LCST no pH de 4,0 e a LCST no pH de 7,4 (Figura 6.12 do Capítulo VI).

Figura 8.4. Efeito do pH na liberação do AcDex de nanopartículas constituídas de PHBHV-b-PNIPAAmAA (NpAcDex02) ($T = 40^{\circ}\text{C}$).

Figure 8.5. Mecanismo de liberação do AcDex das nanopartículas termo-pH-sensíveis em função do pH na temperatura de 40°C.

A Figura 8.6 apresenta os perfis de liberação controlada do acetato de dexametasona das nanopartículas termo-pH-sensíveis na temperatura de 35°C, temperatura ligeiramente inferior a LCST do PHBHV-b-PNIPAAmAA no pH de 7,4 (Figura 6.12 do Capítulo 6). Mediante estes resultados foi possível observar que os perfis de liberação do ativo foram modificados com a diminuição da temperatura de 40 para 35°C. No ensaio conduzido a 35°C (Figura 8.6) a maior taxa de liberação foi obtida no pH de 5,0, e não no pH de 7,4, como no ensaio realizado a 40°C (Figura 8.4). Esta mudança no perfil de liberação em função do pH

poderia ser atribuída à diminuição da temperatura de liberação para um valor abaixo da LCST do copolímero em bloco no pH de 7,4. Nesta temperatura a camada de PNIPAAmAA formada na estrutura casca-núcleo não está coalescida, devido a presença do ácido acrílico ionizado, e esta estrutura promoveu o controle da liberação do ativo.

Figura 8.6. Efeito do pH na liberação do AcDex de nanopartículas constituídas de PHBHV-b-PNIPAAmAA (NpAcDex02) ($T = 35^{\circ}\text{C}$).

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos na síntese dos agentes RAFT indicaram que a rota química utilizada é adequada para este tipo de síntese. Agentes RAFT, do tipo ditioéster, funcionalizados com grupos carboxílicos, foram obtidos com sucesso. Na síntese dos reagentes de Grignard (compostos intermediários para a síntese dos agentes RAFT), as reações conduzidas com compostos clorados apresentaram os maiores rendimentos. A maior dificuldade encontrada nas sínteses dos agentes RAFT foi a purificação dos mesmos.

Neste trabalho foram estudados vários parâmetros das reações de polimerização da NIPAAm e do AA via RAFT, tais como: estrutura química do agente de controle (CTA), razão molar [CTA]/[AIBN], concentração dos monômeros, temperatura de reação, entre outros. Os polímeros obtidos nestes estudos foram caracterizados quanto as suas massas moleculares e as LCST. Foi estudado ainda o comportamento destes polímeros em solução aquosa em função do pH e da temperatura.

Verificou-se que o PTETPA foi mais eficiente nas polimerizações RAFT, proporcionando maior velocidade de polimerização e melhor controle da reação de polimerização, isto é, menor índice de polidispersidade, quando comparado com o PTTPA. Esta maior eficiência do PTETPA foi atribuída ao grupo Z da estrutura química do CTA, que neste caso era um grupo benzil. Outra informação importante obtida nestes estudos foi que a diminuição da razão molar [NIPAAm]/[AA] inibe as reações de copolimerização conduzidas na presença do PTETPA.

Verificou-se que nas reações de copolimerização, a diminuição da razão molar [CTA]/[AIBN] proporcionou um aumento na velocidade de polimerização, por outro lado ocorreu um aumento no índice de polidispersidade (IP) dos polímeros formados. Estes

resultados foram atribuídos ao aumento do fluxo de radicais livres gerados com o aumento da concentração em AIBN.

Com os resultados obtidos nas reações de acoplamento do PHBHV com os segmentos de PNIPAAm ou PNIPAAmAA foi possível confirmar a viabilidade da utilização desta rota química na síntese dos copolímeros em bloco. A maior dificuldade encontrada neste estudo foi a caracterização dos copolímeros em bloco obtidos. Esta dificuldade estava associada à limitação de solventes para o PHBHV, pois este polímero apresentava maior solubilidade apenas em solventes clorados, como o clorofórmio, enquanto que a PNIPAAm e o PNIPAAmAA eram polímeros de características hidrofílicas com maior solubilidade em solventes polares. Com isso, as análises dos copolímeros pela técnica de GPC, que seria a técnica mais indicada para comprovar a formação dos copolímeros em bloco, ficou comprometida com esta limitação de solventes. Como alternativa a esta dificuldade encontrada foi empregada a técnica de precipitação seletiva para caracterizar, de forma qualitativa, via análises de RMN, a formação dos copolímeros em bloco.

Nanopartículas termo-pH-sensíveis foram obtidas com sucesso pelo processo de auto-agregação em meio aquoso, utilizando-se os copolímeros em bloco sintetizados nesta tese. Vários fatores influenciam este processo de auto-agregação, destacando-se o tipo de solvente e não solvente usado no processo de micelização. Quando se utilizou o clorofórmio como solvente para a micelização dos copolímeros em bloco foi necessário adicionar um co-solvente na fase aquosa para aumentar a difusão do clorofórmio na mesma. O melhor cosolvente encontrado para os copolímeros em bloco sintetizados nesta tese foi o etanol. Com a substituição do clorofórmio pela dimetilformamida o uso de cosolente não foi mais necessário, pois sendo a dimetilformamida miscível em água, a difusão desta no meio aquoso ocorreu de

forma rápida, provocando a autoagregação dos copolímeros em bloco anfifílicos formando nanopartículas. Foi possível observar também, que o diâmetro das nanopartículas varia com a mudança de temperatura e pH. Este comportamento das nanopartículas em meio aquoso, foi justificado pela coalescência da camada hidrofílica de PNIPAAm ou PNIPAAmAA sobre a superfície das nanopartículas e pela aglomeração destas após o processo de coalescência da camada hidrofílica.

Apesar de ser um estudo preliminar, os resultados de encapsulação e de liberação controlada do AcDex evidenciaram a viabilidade de aplicação das nanopartículas constituídas de copolímeros em bloco formados de PHBHV e PNIPAAm ou PNIPAAmAA na veiculação e liberação controlada de ativos hidrofóbicos. Os resultados mostraram ainda que a liberação do ativo modelo, do interior das nanopartículas, pode ser controlada de maneira eficiente pelo controle de temperatura e/ou pH.

Desta forma, com os resultados obtidos nesta tese foi possível identificar uma rota química de síntese de copolímeros em bloco anfifílicos sensíveis à temperatura e ao pH, utilizando-se de reações de acoplamento entre um polímero biodegradável, obtido de fontes renováveis, e polímeros “inteligentes”, obtidos por um novo mecanismo de polimerização radicalar, o mecanismo RAFT. Foi possível demonstrar também, a viabilidade de utilização destes copolímeros anfifílicos na preparação de nanopartículas pela técnica de auto-agregação, o emprego deste sistema na encapsulação e a liberação controlada de um ativo modelo em função de variações de temperatura e pH.

Sugestões para trabalhos futuros

As principais sugestões que poderíamos sugerir àqueles que venham desenvolver algum trabalho que tome como referência os resultados obtidos nesta tese seriam:

- ✚ Busquem explorar novas rotas de síntese dos copolímeros em bloco, como por exemplo: a funcionalização da extremidade da cadeia do polímero biodegradável (PHBHV) com o agente de controle RAFT, seguida da reação de polimerização dos monômeros que darão origem aos segmentos hidrofílicos do copolímero em bloco.
- ✚ Substituição do mecanismo de polimerização radicalar controlada do tipo RAFT pelo mecanismo de ATRP. Neste caso, o PHBHV funcionalizado com grupos OH seria modificado para a posterior reação via ATRP de monômeros hidrofílicos.
- ✚ Utilização de um agente RAFT funcionalizado com grupo OH, o qual promoveria a funcionalização dos polímeros hidrofílicos com um grupo hidroxila terminal e este seria empregado na transesterificação do PHBHV para obtenção dos copolímeros de bloco anfifílicos.
- ✚ Síntese dos segmentos hidrofílicos via copololimerização da NIPAAm com o acrilato de t-butila pelo mecanismo RAFT. Após a caracterização do copolímero e confirmação do controle da polimerização pelo mecanismo RAFT (estudo cinético), o acrilato de t-butila incorporado no copolímero é hidrolisado, dando origem ao polímero termo-pH-sensível
- ✚ Explorar melhor a formação de segmentos hidrofílicos do tipo bloco: PNIPAAm-b-AA. Esta nova estrutura de macrocadeia, com certeza, deverá mudar completamente as propriedades dos copolímeros em bloco no processo de auto-agregação e, como

consequência, deverá ter um impacto muito importante na preparação das NP e nas propriedades finais das mesmas.

✚ Avaliar, de maneira mais detalhada, a relação entre o tamanho de cada segmento hidrofílico/hidrofóbico do copolímero em bloco com as propriedades das nanopartículas (tamanho e morfologia) obtidas via autoagregação, correlacionando estes parâmetros com os perfis de liberação controlada em função da temperatura e do pH.

✚ Finalmente sugerimos que novos trabalhos venham a substituir a NIPAAm e o AA por novos monômeros que também originem polímeros “inteligentes”.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. L.; LAVASANIFAR, A.; KWON, G. S. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. **J. Pharm. Sci.**, v. 92, p. 1343-1355, 2003.

AKERMAN, S.; VINIKKA, P.; SFARFVAR, B.; PUTKONEN, K.; JARVINEN, K.; KONTTURI, K. Drug permeation through a temperature-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)grafted poly(vinylidene fluoride) membrane. **Int. J. Pharm.**, v. 164, p. 29-36, 1998.

ALARCÓN, C. H.; SIVANAND, P.; CAMERON, A. Stimuli responsive polymer for biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 34, p. 276-285, 2005.

ALLEN, C.; MAYSINGER, D.; EISENBERG, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 16, p. 3-27, 1999.

ANASTASE-RAVION, S.; DING, Z.; PELLE, A.; HOFFMAN, A. S.; LETOURNEUR D. New antibody purification procedure using a thermally responsive poly(N-isopropylacrylamide)-dextran derivative conjugate. **J. Chromatogr.**, v. 761, p. 247-254, 2001.

ANDERSON, J. M.; SHIVE, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, p. 5-24, 1997.

AROTÇARENA, D. M.; HEISE, B.; ISHAYA, S.; LASCHEWSKY, A. Switching the inside and the outside of aggregates of water-soluble block copolymers with double block copolymers with double thermoresponsivity. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 124, p. 3787-3793, 2002.

ARSLAN, H.; HAZER, B.; KOWALCZUK, M.; Synthesis and characterization of poly[(*R,S*)-3-hydroxybutyrate] Telechelics and their use in the synthesis of poly(methyl methacrylate)-*b*-Poly(3-hydroxybutyrate) block copolymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 85, p. 965-973, 2002.

ARSLAN, H.; MENTES, A.; HAZER, B. Synthesis and characterization of diblock, triblock, and multiblock copolymers containing poly(3-hydroxybutyrate) units. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 94, p. 1789-1796, 2004.

ATAMAN M.; BOUCHER, E. A. Properties of aqueous salt. solutions of poly(ethylene oxide). **J. Polym. Sci.: Polym. Phys.**, v. 20, p. 1585-1592, 1982.

BAE, Y. H.; VERNON, B.; HAN, C. K.; KIM, S. W. Extracellular matrix for a rechargeable cell delivery system. **J. Control Release**, v. 53, p. 249-258, 1998.

BARADIE, B.; SCHOICHET, M. S. Synthesis of fluorocarbon-vinyl acetate copolymers in supercritical carbon dioxide : insight into bulk properties. **Macromolecules**, v. 35, p. 3569-3575, 2002.

BENITA, S. **Microencapsulation – Methods and Industrial Applications**, New York: Marcel Dekker Inc, 1996, v. 73, p 1-640.

BENOIT, M. A. **Advances in Production Technology**, In: BENITA, S. New York: Marcel Dekker Inc, 1996, v. 73, p. 35-72.

BIGNOTTI, F.; PENCO, M.; SARTORI, L.; PERONI, I.; MENDICHI, R.; CASOLARO, M.; D'AMORE, A. Synthesis, characterization and solution behavior of thermo-and-pH-responsive polymers bearing L-leucine residues in the side chains. **Polymer**, v. 41, p. 8247-8256, 2000.

BINDER, W. H.; SACHSENHOFER, R. Click chemistry in polymer and material science: an update. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 29, p.1-30, 2008.

BOUCHÉKIF, H.; NARAIN, R. Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization of *N*-isopropylacrylamide: A comparasion between a conventional and a fast initiator. **J. Phys. Chem.**, v. 111, p. 11120-11126

BRAUNECKER, W. A.; MATYJASZEWSKI, K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. **Prog. Polym. Sci**, v. 32, p. 93-146, 2007.

CAMMAS, S.; SUZUKI, K.; SONE, C.; SAKARAI, Y.; KATAOKA, K.; OKANO, T. Thermo-responsive polymer nanoparticles with a core-shell micelle structure as site-specific drug carriers. **J. Control. Rel.**, v. 48, p.157-164, 1997.

KOPEEK, J.; KOPEKOVÁ, P.; BRØNDSTED, H.; RATHI, R.; ÍHOVÁ, B., YEH, P. - Y.; IKESUE, K. Polymers for colon-specific drug delivery **J. Control. Rel.**, v. 19, p. 121-130, 1992.

CANHAM, P. A.; LOLLY, T. R.; PRICE, C.; STUBBERSFIELD, R. B. Formation of wormlike micelles from a polystyrene-polybutadiene-polystyrene block copolymer in ethyl acetate. **J. Chem. Soc. Faraday T.**, v. 76, p. 1857-1867, 1980.

CASSEBRAS, M.; PASCUAL, S.; POLTON, A.; TARDI, M.; VAIRON, J. Synthesis of di-and triblock copolymers os styrene and butylacrylate by controlled atom transfer radical polymerization. **Macromol Rapid Commun**, v. 20, p. 261-4, 1999.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Prog. Polym. Sci.**, v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHAW, C. S.; CHOOI, K. W.; LIU, X. M.; TAN, C. W.; WANG, L.; YANG, Y. Y. Thermally responsive core-shell nanoparticles self-assembled from cholesteryl and-capped and grafted polyacrylamides: drug incorporation and in vitro release. **Biomaterials**, v. 25, p. 4297-4308, 2004.

CHEN, C. ; CHUNG, H. Y. ; CHENG, C. Y.; YU, P. H. F.; CHEUNG, M. K. Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on amphiphilic poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethyleneglycol)-poly(3-ydroxybutyrate)triblock copolymer. **European Polymer Jounal**, v. 42, p. 2211-2220, 2006.

CHIEFARI, J.; CHONG, Y. K.; ERCOLE, F.; KRSTINA, J.; JEFFERY, J.; LE, T. P. T.; MAYADUNNE, R. T. A.; MEIJS, G. F.; MOAD, C L.; MOAD, G.; RIZZARDO, E.; THANG S. H. Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: The RAFT process. **Macromolecules**, v. 31, p. 5559, 1998.

CHIEFARI, J., MOAD, G., RIZZARDO, E., GRIDNEV, A. A., *WO Patent*. 9847927, 1998.

CHIEFARI, J.; MAYADUNNE, R. T. A.; MOAD, C L.; MOAD, G.; RIZZARDO, E.; THANG S. H.; *Int. Patatent*. 9931144, 1999.

CHIEFARI, J.; MAYADUNNE, R. T. A.; MOAD, C L.; MOAD, G.; RIZZARDO, E.; POSTMA, A.; SKIDMORE, S. H.; THANG S. H. Thiocarbonylthio compounds ($S=C(Z)S-R$) in free radical polymerization with reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT polymerization). Effect of the activating group Z. **Macromolecules**, v. 36, p. 2273, 2003.

CHIEFARI, J.; RIZZARDO, E. In: **Handbook of radical polymerization**. New Jersey.: John Wiley & Sons, 2002, p. 263-300.

CHILCOTI, A.; DREHER, M. R.; MEYER, D.E.; RAUCHER, D. Targeted drug delivery by thermally responsive polymers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 54, p. 613-630, 2002.

CHO, C. S., CHEON, J. J. B., JEONG, Y. I., KIM, I. S., KIM, S. H., AKAIKE, T. Novel core-shell type thermo-sensitive nanoparticles composed of poly(-benzyl L-glutamate) as the core and poly(N-isopropylacrylamide) as the shell. **Macromol. Rapid. Commun.**, v. 18, p. 361-369, 1997.

CHOI, C.; CHAE, S. Y., NAH, J. W. Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for efficient drug delivery system. **Polymer**, v. 47, p. 4571-4580, 2006.

CHONG, Y. K.; KRSTINA, J.; LE, T. P. T.; MOAD, G.; POSTMA, A.; RIZZARDO, E.; THANG S. H. Thiocarbonylthio compounds $[S=C(Ph)S-R]$ in free radical polymerization with reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT polymerization). Role of the free-radical leaving group (R). **Macromolecules**, v. 36, p. 2256, 2003.

CHONG, Y. K.; LE, T. P. T.; MOAD, G.; RIZZARDO, E.; THANG, S. H. A more versatile route to block copolymers and other polymers of complex architecture by living radical polymerization: The RAFT process. **Macromolecules**, v. 32, p. 2071, 1999.

CHUNG, J. E.; YOKOYAMA, M. ; SUZUKI, K.; AOYAGI, T.; SAKURAI, Y.; OKANO, T. Reversible thermo-responsive alkyl-terminated poly(N-isopropylacrylamide) core-shell micellar structures. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 9, p. 37-48, 1997.

CHUNG, J. E.; YOKOYAMA, M.; AOYAGI, T.; SAKURAI, Y.; OKANO, T. Effect of molecular architecture of hydrophobically modified poly(N-isopropylacrylamide) on the formation of thermoresponsive core-shell micellar drug carriers. **J. Controll. Rel.**, v. 53, p. 119-130, 1998.

CHUNG, J. E.; YOKOYAMA, M.; OKANO, T. Inner core segment design for drug delivery control of thermo-responsive polymeric micelles. **J. Controlled Release**, v. 65, p. 93-103, 2000.

CHUNG, J. E.; YOKOYAMA, M.; YAMATO, M.; AOYAGI, T.; SAKURAI, T.; OKANO, T. Thermo-responsive drug delivery from polymeric micelles constructed using block copolymers of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(butylmethacrylate). **J. Controlled Release**, v. 62, p. 115-127, 1999.

CÖLFEN, I. Double-hydrophilic block copolymers: synthesis and application as novel surfactants and crystal growth modifiers. **Macromol Rapid Commun**, v. 22, p. 219-52, 2001.

CORPART, P.; CHARMOT, D.; BIADATTI, T.; ZARD, S. ; MICHELET, D. Int. Pat. 9858974. apud, Chem Abstr. V. 130, p. 820181, 1999.

CRUZ, R.; **Um pequeno mercado de US\$ 30 bilhões.** Disponível em <http://www.estado.com.br/editorias/2006/11/04/eco-1.93.4.20061104.39.1.xml> Acesso em abril de 2008.

D'AGOSTO F.; HUGHES R.; CHARREYRE M. T.; PICHOT, C.; GILBERT, R. G. Molecular weight and functional end group control by RAFT polymerization of a bisubstituted acrylamide derivative. **Macromolecules**, v. 36, p. 621-629, 2003.

DAWES, E. A; SENIOR, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Adv. Microb. Physiol.**, v. 10, p. 135-266, 1973.

DIMITROV, I.; TRZEBICKA, B.; MÜLLER, A. H. E.; DWORAK, A.; TSVETANOV, C. B. Thermosensitive water-soluble copolymers with doubly responsive reversibly interacting entities. **Prog. Poly. Sci.**, v. 32, p. 1275-1343, 2007.

DİNÇER, S. RZAEV, ZMO; PISKIN, E. Stimuli-responsive poly (N-isopropylacrylamide-co-N-vinyl-2-pyrrolidone). **Polym Res**, v. 13, p. 121-31, 2006.

DİNÇER, S.; KÖSELI, V.; KESIM, H.; RZAEV, Z.; PISKIN, E. Radical copolymerization of N-isopro-pylacrylamide with anhydrides of maleic and citraconic acids. **Eur Polym J**, v. 38, p. 43-52, 2002.

DISHER, D. E.; EISENBERG, A. Polymer vesicles. **Science**, v.297, p.967-973, 2002.

DUFRESNE, M. H.; LE GARREC, D.; SANT, V.; LEROUX, J. C.; RANGER, M. Preparation and characterization of water-soluble pH-sensitive nanocarriers for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 277, p. 81-90, 2004.

DÚRAN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. Nanotecnologia – Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. **Artliber**, p 1-201, 2006.

EDRINGTON, A. C.; URBAS, A. M.; DEREGE, P.; CHEN, C.; SWAGER, T. M.; HADJICHRISTIDIS, M.; XENIDOU, M.; FETTERS, L. J.; JOANNOPOULOS, J. D.; FINK, Y.; THOMAS, E. L. Polymer-based photonic crystals. **Adv. Mater.**, v. 13, p. 421-425, 2001.

EISENBERG, S. R.; GRODZINSKY, A. J. Electrically modulated membrane-permeability. **J. Memb. Sci.**, v. 19, p. 173-194, 1984.

ESSELBORN, E.; FOCK, J.; KNEBELKAMP, A. Block copolymers and telechelic oligomers by end group reaction of polymethacrylates. **Makromol Chem. Macromol Symp**, v. 102, p. 91-8, 1996.

FILHO, N. A.; OLIVEIRA, A. G. Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos. **INFARMA**, v. 9, p. 18-21, 1999.

FINDLAY, R. H.; WHITE, D. C. Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.45, p.71-78, 1983.

FISHBINE, G. **The investor's guide to nanotechnology & micromachines**. New York: John Wiley & Sons, 2002.

FRADET, A. **Block copolymers**. New York: Pergamon Press, 1989, p. 797-807.

GALAEV, L.Y.; MATTIASSON, B. Smart polymers and what they could do in biotechnology and medicine. **Trends Biotechnol**, v. 17, p. 335-340, 2000.

GALEMBECK, F. Polímeros e nanotecnologia. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, 2003.

GAN, L. H.; GAN, Y. Y.; DEEN, G. R. Poly(*N*-acryloyl-*N'*-propylpiperazine): a new stimuli-responsive polymer. **Macromolecules**, v. 33, p. 7893-7897, 2000.

GANACHAUD, F.; MONTEIRO, M. J.; GILBERT, R. G.; DOURGES, M. A.; THANG, S. H.; RIZZARDO, E. Molecular weight characterization of poly(*N*-isopropylacrylamide) prepared by living free-radical polymerization. **Macromolecules**, v. 33, p. 6738-6745.

GAUCHER, G.; DUFRESNE, M.; SANT, V. P. ; KANG, N. ; MAYSINGER, D. ; LEROUX, J. Block copolymer micelles : preparation, characterization and application in drug delivery. **J. Controlled release**, v. 109, p. 169-188, 2005.

GEORGES, M. K., VEREGIN, R. P. N., KASMAIER, P. M., HAMER, G. K. Narrow molecular weight resins by a free-radical polymerization process. **Macromolecules**, v. 26, p. 2987, 1993.

GIL, E. S.; HUDSON, S. M. Stimuli-reponsive polymers and their bioconjugates. **Prog. Polym. Sci.**, v. 29, p. 1173-1222, 2004

GRAVANO, S.; BORDEN, M.; CHEN, A.; DOENFFLER, E.; PATTEN, T.; LONGO, M. Synthesis of a well-defined amphiphilic block copolymer via ATRP. **Polym Prepr.**, v. 42, p. 549-50, 2001.

GUIYING, L.; SHI, L.; YINGLI, A.; ZHANG, W.; RUJIANG, M. Double-responsive core-shell-corona micelles from self-assembly of diblock copolymer of poly(t-butyl acrylate-co-acrylic acid)-b-poly(N-isopropylacrylamide). **Polymer**, v. 47, p. 4581-4587, 2006.

GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug Discov. Today**, v. 7, p. 569-579, 2002.

HAMLEY, I. W. Nanotechnology with soft materials. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 42, p. 1692-1712, 2003.

HAWKER, C. J.; BOSMAN, A. W.; HARTH, E. New polymer synthesis by nitroxide mediated living radical polymerizations. **Chem. Rev.**, v. 101, p. 3661, 2001.

HAWKER, C. J.; HEDRICK, J. L.; MALMSTROM, E.; TROHSAS, M.; JÉRÔME, R. Dual living free radical and ring opening polymerization from a double-headed initiator. **Macromolecules**, v. 31, p. 213-219, 1998.

HAWKWE, C.; HEDRICK, J.; MALMSTROM, E.; TROLHAS, M.; MECERREYES, D.; MOINEAU, G.; DUBOIS, P.; JÉRÔME, R. Dual living free radical and ring opening polymerization from a double-headed initiator. **Macromolecules**, v. 31, p. 12-34, 1998.

HAY, D.N.T.; RICKERT, P.G.; SEIFERT, S.; FIRESTONE, M.A. Thermoresponsive nanostructures by self-assembly of a poly(*N*-isopropylacrylamide)-lipid conjugate. **J Am Chem Soc**, v. 126, p. 2290-2291, 2004.

HESKINS, M., GUILLET, J. E. Solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide). **J. Macromol. Sci. Chem.**, v. 8, p. 1441-1455, 1968.

HIROAKI, B.; HIDEO, O.; SHINZABURO, I.; MASAHIDE, Y.; KEITA, T. Intramolecular photoinduced electron transfer in polymer solids having different glass transition temperature. **Kotai Hyomen Kokagaku Toronkai Koen Yoshishu**, v. 20, p. 51-52, 2001.

HOFFMAN, A. S. Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 52, p. 577-586, 2000.

HOLDEN, G.; LEGGE, N. R.; QUIRK, R.; SCHROEDER, H. E. **Thermoplastic elastomers**. Cincinnati: Honser/Gardner Publication, 1996.

HSIEH, H. L.; QUIRK, R. P. **Anionic polymerization: principles and practical applications**. New York: Marcel Dekker, 1996.

HUA, W.; WEN-QIN, C.; CHANG, C.; CHENG, C.; SI-XUE, C.; ZHANG, X., ZHUO, R. Synthesis of star block, thermosensitive Poly(L-lactide)-star block-poly(N-isopropylacrylamide-co-N-hydroxymethylacrylamide) copolymers and their self-assembled micelles for controlled release. **J. Phys. Chem.**, v. 112, p. 2888-2894, 2008.

INOVABRASIL desafios dos nanomateriais 22/08/2007. Disponível em <http://inovabrasil.blogspot.com/2007/08/desafios-dos-nanomateriais.html>. Acesso em julho de 2008.

IVIN, K. J.; SAEGUSA, T. **Ring-opening polymerization**. London: Elsevier, 1984.

JEONG, B.; GUTOWSKA, A. Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. **Trends Biotechnol**, v. 20, p. 305-311, 2002.

JEONG, B.; GUTOWSKA, A. Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. **Trends Biotechnol**, v. 20, p. 305-311, 2002.

KABANOV, A. V.; NAZAROV, V. A.; ASTAFIEVA, I. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y.; YAROSLAVO, A. A.; KATRAKOVA, E. V. **Macromolecules**, v. 28, p.2303, 1995.

KAHRAMAN, G. BESKARDES, O. RZAEV ZMO, PISKIN, E. Biongeneering functional copolymers. VII. Synthesis and characterization of copolymers of p-vinylphenyl boronic acid with maleic and citraconic and their self-assembled macrobranched supramolecular architectures. **Polymer**, v. 45, p. 5813-28, 2005.

KAMIGAITO, M.; ANDO, T.; SAWAMOTO, M. Metal-catalyzed living radical polymerization. **Chem. Rev.**, v. 101, p. 3689, 2001.

KANAZAWA, H.; KASHIWASE, Y.; YAMOAMOTO, K.; MATSUSHIMA, Y.; KIKUCHI, A.; SAKURAI, Y. Temperature-responsive liquid chromatography. 2. Effect of hydrophobic groups in N-isopropylacrylamide copolymers. **Anal. Chem.**, v. 69, p. 823-830.

KATAOKA, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: desing, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 113-131, 2001.

KELARAKIS, A.; TANG, T.; HAVREDAKI, V.; KYRIAKOS, V.; HAMLEY, I. W. Micellar and surface properties of a poly(methyl methacrylate)-block-poly(N-isopropylacrylamide) copolymer in aqueous solution. **J. Colloid and Interface Science**, v. 320, p. 70-73, 2008.

KIKUCHI, A.; OKANO, T. Intelligent thermoresponsive polymeric stationary phases for aqueous chromatography of biological compounds. **Prog. Polym. Sci.**, v. 27, p. 1165-1193, 2002.

KIM, C.; LEE, S. C.; SHIN, J.; YOON, S.; KNON, I. C.; JEONG, Y. S. Amphiphilic diblock copolymers based on Poly(2-ethyl-2-oxazoline) and Poly(1,3-trimethylene

carbonate): Synthesis and Micellar Characteristics. **Macromolecules**, v. 33, p. 7448-7452.

KIM, I. S.; JEONG, Y. I.; CHO, C. S.; KIM, S. H. Core-shell type polymeric nanoparticles composed of poly(L-lactic acid) and poly(N-isopropylacrylamide). **Intern. J. Pharmac.**, v. 211, p. 1-8, 2000.

KIRKLAND, S. E.; HENSARLING, R. M.; McCONAUGHY, S. D.; GUO, Y.; JARRET, W. L.; McCORMICK, L. C. Thermoreversible hydrogels from RAFT-Synthesized BAB triblock copolymers: steps toward biomimetic matrices for tissue regeneration. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 481-486, 2008.

KOBAYASHI, J.; KIKUCHI, A.; SAKAI, K.; OKANO, T. Aqueous chromatography utilizing hydrophobicity-modified anionic temperature-responsive hydrogel for stationary phases. **J. Chromatogr.** v. 958, p. 109-119, 2002.

KOHORI, F.; SAKAI, K.; AOYAGI, M.; YOKOYAMA, M.; YAMATO, M.; SAKURAI, Y.; OKANO, T. Control of adriamycin cytotoxic activity using thermally responsive polymeric micelles composed of poly(*N*-isopropylacrylamide-*co-N,N*-dimethylacrylamide)-*b*-poly(_{D,L}-lactide). **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v. 16, p. 195-205, 1999.

KOHORI, F.; YOKOYAMA, K.; SAKAI, K.; OKANO, T. Process desing for efficient and controlled drug incorporation into polymeric micelle carrier systems. **J. Controlled Release**, v. 78, p. 155-163, 2002.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, p. 2004–2021, 2001.

KÖSELI, V.; RZAEV, Z.; PISKIN, E. Bioengineering functional copolymers. III. Synthesis of biocompatible poly(*N*-iso-propylacrylamide-co-maleic anhydride)-*g*-poly(ethylene oxide)/poly(ethylene imine) macrocomplexes and their thermostabilization effect on the activity of the enzyme penicillin G acylase. **J. Polym Sci A-1 Polym Chem**, v. 41, p. 158-193, 2003.

KREUTER J. **Nanoparticles – Preparation and Applications in Donbrow M., Microcapsules and nanoparticles in Medicine and Pharmacy**. Boca Raton: CRC Press 1992, p. 125-147,.

KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 47, p. 65-81, 2001.

KUCKILNG, D.; ADLER, H. J. P.; LING, L.; HABICHER, W. D. Temperature-sensitive polymers based on 2-(dimethyl maleimido)-*N*-ethylacrylamide: Copolymer with *N*-isopropylacrylamide. **Polym Bull**, v. 44, p. 269-276, 2000.

LADAVIÈRE, C.; DÖR, N.; CLAVERIE, J. Controlled radical polymerization of acrylic acid in protic media. **Macromolecules**, v. 34, p. 5370-2, 2001.

LAZZARI, M.; LÓPEZ-QUINTELA, M. A. Block copolymers as a tool for nanomaterial fabrication. **Adv. Mater.**, v. 15, p. 1583-1594, 2003.

LE, T. P. T.; MOAD, G.; RIZZARDO, E.; THANG S. H.; *Int. Patent*. 9801478, 1998.

LEE, S. Y. **Trends Biotechnol.**, v. 14, p. 431-438, 1996.

LEE, Y. M.; SHIM, J. K. Preparation of pH/temperature responsive polymer membrane by plasma polymerization and its riboflavin permeation. **Polymer**, v. 38, p. 1227-1232, 1997.

LELE, B. S.; LEROUX, J. C. Synthesis and micelar characterization of novel amphiphilic A-B-A triblock copolymers of N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide or N-Vinyl-2-pyrrolidone with Poly(epsilon-caprolactone). **Macromolecules**, v. 35, p. 6714-6723, 2002.

LEMOIGNE, M., WILKINSON, J.R. Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acid β -Oxybutyrique. **Chim. Bio.**, v. 8, p. 770-782, 1926.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymers nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 65, p. 259-269, 2007.

LIMA, K. M., RODRIGUES-JÚNIOR, J. M. Poly-DL-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 2, p. 171-180, 1999.

LIONZO, M. I. Z.; RÉ, M. I.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Microparticles prepared with poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly(ϵ -caprolactone) blends to control the release of a drug model. **J. of Microencapsulation**, v. 24, p. 175-186, 2007.

LIU, B.; PERRIER, S. Thermoresponsive micelles from well-defined block copolymers synthesized via reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization. **J. Polym. Sci. Part A: Polymer Chemistry**, v. 43, p. 3643-3654, 2005.

LIU, S. Q.; WIRADHARMA, N.; GAO, S. J.; TONG, Y. W.; YANG, Y. Y. Bio-functional micelles self-assembled from a folate-conjugated block copolymer for targeted intracellular delivery of anticancer drugs. **Biomaterial**, v. 28, p. 1423-1433, 2007.

LO, C. L.; HUANG, C. K.; LIN, K. M.; HSIUE, G. H. Mixed micelles formed from graft and diblock copolymers for application in intracellular drug delivery. **Biomaterials**, v. 28, p. 1225-1235, 2007.

LO, C.; LIN, K.; HSIUE, G. Preparation and characterization of intelligent core-shell nanoparticles based on poly(D,L-lactide)-g-poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid). **J. Controlled Release**, v. 104, p. 477-488, 2005.

LOISEAU, J.; DOËR, N.; SUAUE, M.; EGRAZ, J. B. ; LIAURO, M. F. ; LADAVIERE, C. Synthesis and characterization of poly(acrylic acid) produced by RAFT polymerization. Application as a very efficient dispersant of CaCO₃, Kaolin, and TiO₂. **Macromolecules**, v. 36, p. 3066-3077, 2003.

LOWE, A. B.; TORRES, M.; WANG, R. Doubly responsive AB diblock copolymer: RAFT synthesis and aqueous solution properties of poly(*N*-isopropylacrylamide-*block*-4-vinylbenzoic acid). **Journal of Polymer Science**, v. 45, p. 5864-5871, 2007.

MACRAE, R. M.; WILKINSON, J. R. Poly-β-hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. **J. Gen. Microbiol**, v. 19, p. 210-222, 1958.

MAEDA, H.; SEYMOUR, L.W.; MIYAMOTO, Y. Conjugates of anticancer agents and polymers: advantages of macromolecular therapeutics in vivo. **Bioconjugate Chem**, v. 3, p. 351-361, 1992.

MALMSTRÖM, E.; ILAWKER, C. Macromolecular engineering via 'living free radical polymerization'. **Macromol Chem Phys**, v. 199, p. 923-25, 1998.

MATHIOWITZ, E. **Encyclopedia of controlled drug delivery**. New York:Wiley, 1999, v. 1-2.

MATSUKATA, M.; HIRATA, M.; GONG, J. P.; OSADA, Y.; SAKURAI, Y.; OKANO, T. Two step surfactant binding of solvated and cross-linked poly[N-isopropylacrylamide-co-2-acrylamido-2-methyl propane sulfonic acid)]. **Colloid Polym Sci**, v. 276, p. 11-8, 1998.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Res**, v. 46, p. 6387-6392, 1986.

MATYJASZEWSKI, K. In: **Handbook of radical polymerization**. New Jersey:John Wiley & Sons, p. 361-406, 2002.

MATYJASZEWSKI, K. Polymers, particles and surfaces with “hairy” coatings: synthesis, structure, dynamics and resulting properties. **ACS Symp. Ser.**, v. 854, p. 366-382, 2003.

MATYJASZEWSKI, K. XIA, J.; **Chem. Rev.**, v. 101, p. 2921, 2001.

MATYJASZEWSKI, K.; DAVIS, T. P. **Handbook radical polymerization**. New Jersey:: John Wiley & Sons, 2002.

MAYADUNNE, R. T. A.; RIZZARDO, E. In: **Living and Controlled polymerization: Synthesis, Characterization and Properties of the Perspective Polymers and Copolymers**. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2005.

MELVILLE, I. Some themes in the chemistry of macromolecules. **J Chem Soc.**, p. 414-26, 1941.

MEYER, A. Praktikum der botanischen bakterienkunde. **Jena**, 1903.

MISHRA, M.; YAGCI, Y. **Block copolymers**. New York: Pergamon Press, 1989, p. 808-14.

MOAD, G.; RIZZARDO, E. Alkoxyamine-initiated living radical polymerization: Factors affecting alkoxyamine homolysis rates. **Macromolecules**, v. 28, p. 8722, 1995.

MOAD, G.; RIZZARDO, E.; THANG, S. H. *Int. Patent*, 9905099, 1999.

MOAD, G.; RIZZARDO, E.; THANG, S. H. Living radical polymerization by the RAFT process. **Aust. J. Chem.**, v. 58, p. 379-410, 2005.

MOAD, G.; SOLOMON, D. H. **The chemistry of radical polymerization**. Oxford: Pergamon, 1995.

MOES, A. J. Research and development of oral controlled release dosage forms. **J. Pharm. Belg.**, v. 44 (1), p. 60-70, 1989.

MOFFIT, M.; KHOUGAZ, K.; EISENBERG, A. Micellization of ionic block copolymers. **Acc Chem Res**, v. 29, p. 95-102, 1996.

MONTEIRO, M.; BARBEYRAC, J. Preparation of reactive composite latexes by living radical polymerization using RAFT process. A new class of polymers materials. **Macromol Rapid Commun**, v. 23, p. 370-4, 2002.

MONTEIRO, M.; BROUWE, H. Intermediate radical termination as the mechanism for retardation in reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization. **Macromolecules**, v. 34, p. 349-352, 2001.

MONTORO, S. R. Redução da massa molar do poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBHV) para sua posterior utilização no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada. 2005. 132 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Departamento de Engenharia de Materiais, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

NA, K.; SETHURAMAN, V. A.; BAE, Y. H. Stimuli-sensitive polymeric micelles as anticancer drug carriers. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 525-535, 2006.

NACE, V. **Nonionic surfactants: polyoxyalkylene block copolymers**. New York: Marcel Dekker Inc., 1996p.1-266.

NAIR, S. L.; LAURENCIN, C. T.; Biodegradable polymers as biomaterial. **Prog Polym. Sci.**, v. 32, p. 762-798, 2007.

NICOLAU, D. E.; PHILLIMORE, J.; CROSS, R.; NICOLAU, D. V.; Nanotechnology at the crossroads: the hard or the soft way. **Microelectronics Journal**, v. 31, p. 611-616, 2000.

NUOPPONEN, M.; KALLIOMÄKI, K.; LAUKKANEN, A.; HIETALA, S.; TENHU, H. A-B-A stereoblock copolymers of *N*-isopropylacrylamide. **Journal of Polymer Science**, v. 46, p. 38-46, 2008.

NUOPPONEN, M.; OJALA, J.; TENHU, H. Aggregation behaviour of well defined amphiphilic diblock copolymers with poly (N-isopropylacrylamide) and hydrophobic blocks. **Polymer**, v. 45, p. 3643-3650, 2004.

OKANO, T. **Biorelated Polymer and Gels**. San Diego: Academic Press, 1998

OKANO, T.; BAE, Y. H.; JACOBS, H.; KIM, S. W. Thermally on off switching polymers for drug permeation and release. **J. Control. Rel.**, v. 11, p. 255-265, 1990.

OKANO, T.; YAMADA, N.; OKUHARA, M.; SAKAI, H.; SAKURAI, Y. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. **Biomaterials**, v. 16, p. 297-303, 1995.

OKANO, T.; YAMADA, N.; SAKAI, H.; SAKURAI, Y. Anovel recovery-system for cultured-cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isoprylacrylamide). **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 27, p. 1243-1251, 1993.

OKATATA, J.; NOGUCHI, H.; SEKI, T. **Macromolecules**, v. 20, p. 15-21, 1982.

OSADA, Y.; KHOKHLOV, A. R. Polymer gels and networks. **Marcel Dekker**, 2002.

OSTRO, M. J. **Liposomes**. New York: Macel Dekker Inc., 1983.

PENCZEK, S. **Models of biopolymers by ring-opening polymerization**. Boca Raton: FL: CRC Press, 1990.

PENG, T.; CHENG, Y. L. PNIPAAm and PMAA co-grafted porous PE membranes: living radical co-grafting mechanism and multi-stimuli responsive permeability. **Polymer**, v. 41, p. 2091-2100, 2001.

PIMENTEL, L. F.; TAVARES, A. J. J.; FURTADO, V. V. M.; SANTOS, N. S. M. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p.1-14, 2007.

PINKRAH V. T.; SNOWDEN, M. J.; MITCHELL J. C.; SEIDEL, J.; CHOWDHRY, B. Z.; FERN, G. R. Physicochemical properties of poly(N-isopropylacrylamide-co-4-vinylpyridine) cationic polyelectrolyte colloidal microgels. **Langmuir**, v. 19, p. 585-590, 2003.

PLANTÃO INFO 05/07, **Brasil investe pouco em nanotecnologia**. Disponível em <http://info.abril.com.br/aberto/infonews/052007/14052007-5.shl>. Acesso em julho de 2008.

PORTE, H.; COUARRAZE, G.; CHULIA, D.; DELAIL, M.; POURCELOT, Y.

Microencapsulation processes for the manufacture of systems providing modified release of the active constituent. London: Elsevier Science, 1994, p. 513-543.

QIU, X. P.; WINNIK, M. Synthesis of α,ω -dimercapto poly(*N*-isopropylacrylamide) by RAFT polymerization with a hydrophilic difuncional chain transfer agent. **Macromolecules**, v. 40, p. 872-878, 2007.

QIU, Y.; PARK, K. Enviroment-sensitive hydrogels for drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 53, p. 321-339, 2001.

QUIRK, R.; KINNING, D.; FEUERS, L. **Block copolymers.** New York: Pergamon Press, 1989, p.1-26.

RAPOPORT, N. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. **Polym. Sci.**, v. 32, p. 962-990, 2007.

RAY, B.; ISOBE, Y.; MATSUMOTO, K.; HABAUE, S.; OKAMOTO, Y.; KAMIGAITO, M.; SAWAMOTO, M. RAFT polymerization of *N*-isopropylacrylamide in the absence and presence of $Y(OTf)_3$: simultaneous control of molecular weight and tacticity. **Macromolecules**, v. 37, p. 1702-1710, 2004.

RAY, B.; ISOBE, Y.; MORIOKA, K.; HABAUE, S.; OKAMOTO, Y.; KAMIGAITO, M.; SAWAMOTO, M. Synthesis of Isotactic poly(*N*-isopropylacrylamide) by RAFT polymerization in the presence of lewis acid. **Macromolecules**, v. 36, p. 543-545, 2003.

RÉ, M. I. Microencapsulação em busca de produtos inteligentes. **Ciência Hoje**, v. 27, p.24-29, 2000.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

RIESS, G. **Interfacial activity of block copolymers**. In: LEGGE, N.; HOLDEN, G.; SCHROEDER, H.; Thermoplastic elastomers: Comprehensive review. New York: Munich, 1987, p. 325-48.

RIESS, G. Micellization of block copolymers. **Progress in Polymer Science**, v. 28, p. 1107-1170, 2003.

RIESS, G.; DUMAS, P.; HURTREZ, G. Block copolymers micelles and assemblies. **Citus Books**, p.69-110, 2002.

RIESS, G.; HURTREZ, G.; BAHADUR, P. Block copolymers. **Encyclopedia of polymer science and engineering**, v. 2, p. 324-434, 1985.

RIETH, M. **Nano-engineering in science and technology: an introduction to the world of nano-design. Series on the Foundations of Natural Science and Technology**, Word Scientific, v. 6, 2003.

RIMMER, S., MOHD RAMLI, A. N. M, LEFEBRE S. Preparation of polystyrene-poly(styrene-g-N-isopropylacrylamide) core-shell particles: Copolymerization of oligo(N-isopropylacrylamide) macromonomers and styrene onto polystyrene seed particles and stability of the resultant particles. **Polymer**, v. 37, p. 4135-4139, 1996.

RIZZARDO, E.; CHIEFARI, J.; CHONG, Y. K.; ERCOLE, F.; KRSTINA, J.; JEFFERY, J.; LE, T. P. T.; MAYADUNNE, R. T. A.; MEIJS, G. F.; MOAD, C L.; MOAD, G.; THANG S. H. Tailored polymers by free radical processes. **Macromol. Symp.**, v. 143, p. 291-307, 1999.

RIZZARDO, E.; CHIEFARI, J.; MAYADUNNE, R. T. A.; MOAD, G.; THANG S. H. **ACS Symp. Ser.**, v. 768, p. 278, 2000.

RIZZARDO, E.; SCHILLI, C. M.; MULLER, A. H. E.; THANG, S. H.; CHONG, Y. K. RAFT polymers: Novel precursors for polymer-protein conjugates. **ACS Symp. Ser.** v. 854, p. 603-618, 2003.

ROCCO, M. C. Reviews of national research programs in nanoparticle and nanotechnology research: nanoparticle and nanotechnology research in the USA. **Journal of Aerosol Science**, v. 29, p. 749-760, 1995.

ROCCO, M. C.; BAINBRIDGE, W. S. **Societal implications of nanoscience and nanotechnology**. NSET Workshop Report, National Science Foundation, 2001.

ROCCO, M. C.; WILLIAMS, R. S. Alivisatos P. **Nanotechnology research directions: Vision for Nanotechnology R&D in the Next Decade**, NSTC/CT/IWGN Workshop Report, 1999. Disponível em: <http://itri.loyola.edu/nano/IWGN.Research.Directions/>.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, J.; CHÉCOT, F.; GNANOU, Y.; LECOMMANDOUX, S. Toward 'smart' nano-objects by self-assembly of block copolymers in solution. **Prog. Polym. Sci**, v. 30, p. 691-724, 2005.

RZAEV, Z. M. O.; DINÇER, S.; PISKIN, E. Functional copolymers of N-isopropylacrylamide for bioengineering applications. **Prog. Polym. Sci**, v. 32, p.534-595, 2007.

SAMOUR, C. M. **Polymeric Drugs in the chemotherapy of microbial infections**. In: Polymer Drugs. Academic Press, 1978, p. 161-184.

SANT'ANNA, J. P. **Minúsculas partículas, grandes negócios**. Disponível em <<http://www.quimica.com.br/revista/qd443/nanotecnologia1.html>> Acesso em abril de 2006.

SAVE, M.; ARMES, S. Atom transfer radical polymerization of 2,3-dihydroxypropyl methacrylate. **Polym Symp**, 2001.

SCHILD, H. G.; TIRREL, D. A. Interaction of poly(*n*-isopropylacrylamide) with sodium normal-alkyl sulfates in aqueous-solution. **Langmuir**, v. 7, p. 665-671, 1991.

SCHILD, H. G.; TIRREL, D. A. Microcalorimetric detection of lower critical solution temperatures in aqueous polymer-solutions. **J. Phys. Chem.**, v. 94, p. 4352-4356, 1990.

SCHILLI, C. M.; ZHANG, M.; RIZZARDO, E.; THANG, S. H.; CHONG, Y. K.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G.; MULLER, A. H. E. A new double-responsive block copolymer synthesized via RAFT polymerization: Poly(*N*-isopropylacrylamide)-block-poly(acrylic acid). **Macromolecules**, v. 37, p. 7861-7866, 2004.

SCHILLI, C.; LANZENDÖRFER, M. G.; MÜLER, H. E. Benzyl and cumyl cithiocarbamates as chain transfer agents in the RAFT polymerization of *N*-isopropylacrylamide. In situ FT-NIR and MALDI-TOF MS investigation. **Macromolecules**, v. 35, p. 6819-6827, 2002.

SCILLI, C.; LANZENDÖRFER, M. G.; MÜLLER, H. E. Benzyl and cumyl dithiocarbamates as chain transfer agents in the RAFT polymerization of *N*-isopropylacrylamide. In situ FT-NIR and MALDI-TOF MS investigation. **Macromolecules**, v. 35, p. 6819-6827, 2002.

SEEMAN, N. C. DNA nanotechnology. **Materials Today**, p. 24-29, 2003.

SENDIL, D.; GURSEL, I.; WISE, D. L.; HASIRCI, V. Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. **J. Control. Rel.**, v. 59, p. 207-217, 1999.

SERRES, A.; BAUDYS, M.; KIM, S. W. Temperature and pH-sensitive polymers for human calcitonin delivery. **Pharm. Res.**, v. 13, p. 196-201, 1996.

SERSHEN, S.; WEST, J. Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 54, p. 1225-1235, 2002.

SHARMA, S.; KAUR P.; JAIN, A.; RAJESWARI, M. R.; GUPTA, M.N. A smart bioconjugate of chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 330-336, 2003.

SHI, G. Y.; TANG, X. Z.; PAN, C. Y. Tadpole-shaped amphiphilic copolymers prepared via RAFT polymerization and click reaction. **Journal of Polymer Science**, v. 46, p. 2390-2401, 2008.

SHUKLA, A. J. **US Patent**, 6193991-B1, 2001.

SOLOMON, D. H.; RIZZARDO, E.; CACIOLI, P. **US Patent**, 4581429, 1986.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices **J. Control. Release**, v. 1, n. 70, p.1-20, 2001.

SOUZA, M. S. M. **Ativos microencapsulados encontram mais aplicação**. Disponível em <<http://www.quimica.com.br/revista/qd388/microencap1.htm>> Acesso em abril de 2006.

STEINBUCHEL A. **Polyhydroxyalkanoic Acids**, New York: Macmillan Publishers, 1991, p. 123-213.

SZWARC, M. Living polymers. **Nature**, v. 178, p. 1168, 1956.

SZWARC, M.; LEVY, M.; MILKOVICH, R. M. Polymerization initiated by electron transfer to monomer - a new method of formation of block polymers. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 78, p. 2656, 1993.

TANAKA, N., TAKEMURA, M., KONNO, T., KUNUGI, S. Pressure effect on the chain shrinkage of poly(vinylpyrrolidone) induced by complexation with a hydrophobic compound in aqueous solution. **Macromolecules**, v. 31, p. 8840-8844, 1998.

TANIGUCHI, T. ; DURACHER, D. ; DELAIR, T. ; ELAISSARI, A. ; PICHOT, C. Adsorption/desorption behavior and covalent grafting of an antibody onto cationic amino-functionalized poly(styrene-N-isopropylacrylamide) core-shell latex particles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 29, p. 53-65, 2003.

THROMBRE, A. G. **Polymeric Mat. Sci. and Eng.**, v. 63, p. 322-326, 1990.

TORCHILIN, V. P. Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. **Pharmaceutical Research**, v. 24, p.1-16, 2007.

TÜDÖS, F.; KELEN, T.; FÖLDES-BEREZSNICH, T.; TURCANYI, B. Analysis of linear methods for determining copolymerization reactivity ratios. 3. Linear graphic method for evaluating data obtained at high conversion levels. **J. Macromol Sci**, v. A10, p. 1513-1540, 1976.

VASCONCELOS, Y. **Pesquisa**, v. 80, p. 68-72, 2002.

WAHLUND P.; GALAEV, I.; KAZAKOV, S.; LOZINSKY, V.; MATIASO, B. "Protein-like" copolymers: effect of polymer architecture on the performance in bioseparation process. **Macromol Biosci**, v. 2, p. 33-42, 2002.

WALLEN, L. L.; ROHWEDDER, W. K. Poly-beta-hydroxyalkanoate from activated-sludge. **Environ Sci Technol**, v. 8, p. 576- 579, 1974.

WANG, H.; YINGLI, A.; HUANG, N.; RUJIANG, M., SHI, L. Investigation of the cononsolvency effect on micellization behavior of polystyrene-b-poly(*N*-isopropylacrylamide). **J. Colloid and Interface Science**, v. 317, p. 637-642, 2008.

WANG, J. S., MATYJASZEWSKI, K., **J. Am. Chem. Soc.**, v. 117, p. 5614, 1995.

WEI, H.; CHEN, W. Q.; CHANG, C.; CHENG, C.; SI-XUE, C.; ZHANG, X. Z.; ZHUO, R. X. Synthesis of star block, thermosensitive poly(*L*-lactide)-star block-poly(*N*-isopropylacrylamide-*co-N*-hydroxymethylacrylamide) copolymers and their self-assembled micelles for controlled release. **J. Phys. Chem.**, v. 112, p. 2888-2894, 2008.

WEI, H.; ZHANG, X.; CHENG, C.; CHENG, S.X.; ZHUO, R.X. Self-assembled, thermosensitive micelles of a star block copolymer based on PMMA and PNIPAAm for controlled drug delivery. **Biomaterials**, v. 28, p. 99-107, 2007.

WEI, H.; ZHANG, X.; CHENG, H.; CHEN, W.; CHENG, S.X.; ZHUO, R.X.; Self-assembled thermo-and pH-responsive micelles of poly(10-undecenoic acid-b-N-isopropylacrylamide) for drug delivery. **J. of Controlled Release**, v. 116, p. 266-274, 2006.

WEI, H.; ZHANG, X.; ZHOU, Y.; CHENG, S.; ZHUO, R. Self-assembled thermoresponsive micelles of poly(N-isopropylacrylamide-b-methyl methacrylate). **Biomaterials**, v. 27(I), p.2028-2034, 2006.

WILHEM, M.; ZHAO, CL; WANG, Y.; XU, R.L.; WINNIK, M.A.; MURA, J.L. Poly(styrene-ethylene oxide)block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study. **Macromolecules**, v. 24, p. 1033-1040, 1991.

WILLIAMSON, D.H.; WILKINSON, J.F. **J Gen Microbiol.**, v. 19, p. 198-209, 1958.

XIE, I.; XIE, D. Molecular design, synthesis and properties of block and graft copolymers containing PEO segments. **Polym Sci**, v. 24, p. 275-313, 1999.

XU, L.; LIU, K. L.; LI, J.; TAN, E. P.; CHAN, L. M.; LIM, C. T.; GOH, S. H. Synthesis, characterization, and Morphology studies of biodegradable amphiphilic

poly[(R)-3-hydroxybutyrate]-alt-poly(ethylene glycol) multiblock copolymers. **Biomacromolecules**, v.7, p.3112-3119, 2006.

XU, R. L.; WINNIK, M. A.; HALLET, F. R.; RIESS, G.; CROUCHER, M. D. Light-scattering study of the association behavior of styrene-ethylene oxide block copolymers in aqueous solution. **Macromolecules**, v. 24, p. 87-93, 1991.

YAMATO, M.; OKUHARA, M.; KARIKUSA, F.; KIKUCHI, A.; SAKURAI, Y.; OKANO, T. Signal transduction and cytoskeletal reorganization are required for cell detachment from cell culture surfaces grafted with a temperature-responsive polymer. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 44, p. 44-52, 1999.

YANG, C.; LING, Y., C. RAFT Synthesis of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(methacrylic acid) homopolymers and block copolymers: Kinetics and characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, p. 1191-1201, 2006.

YOKOYAMA, M. Gene delivery using temperature-responsive polymeric carriers. **Drug Discov. Today**, v. 7, p. 426-432, 2002.

YOO, M. K., SUNG, Y. K., LEE, Y. M., CHO, C. S. Effect of polyelectrolyte on the lower critical solution temperature of poly(N-isopropyl acrylamide) in the poly(NIPAAm-co-acrylic acid) hydrogel. **Polymer**, v. 41, p. 5713-5719, 2000.

YOSHIDA, M.; ASANO, M.; KUMAKURA, M.; KATAKAI, R; MASHIMO, T; YUASA, H; IMAI, K; YAMANAKA, H. A new biodegradable polydepsiptide

microsphere for application in drug delivery systems

Colloid Polym. Sci., v. 268, p. 726-730, 1990.

YOU, Y.; ZHOU, Q. H.; MANICKAM, D. S.; WAN, L.; MAO, G. Z.; OUPICKY, D. Dually responsive multiblock copolymers via reversible addition – fragmentation chain transfer polymerization: synthesis of temperature and redox-responsive copolymers of poly(*N*-isopropylacrylamide) and poly(2-(dimethylamino)ethylmethacrylate).

Macromolecules, v. 40, p. 8617-8624, 2007.

YU, K.; EISENBERG, A. Bilayer morphologies of self-assembled crew-cut aggregates of amphiphilic PS-*b*-PEO diblock copolymers in solution. **Macromolecules**, v. 31, p. 3509, 1998.

ZAKIR, M. O. R.; DINÇER S.; PISKIN, E. Functional copolymers of *N*-isopropylacrylamide for bioengineering applications. **Polymer**, v. 32, p. 534-595, 2007.

ZHANG, L.; EISENBERG, A. Formation of crew-cut aggregates of various morphologies from amphiphilic block copolymers in solution. **Polymers for advanced technologies P.A.T.**, v. 9, p. 677, 1998.

ZHANG, L.; EISENBERG, A. **Science**, v. 268, p. 1728, 1995.

ZHANG, L.F.; EISENBERG, A. Multiple morphologies of « crew-cut » aggregates of polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) block copolymers. **Science**, v. 272, p.1777-1779, 1996.

ZHAO, C.L.; WINNIK, M.A.; REISS, G.; CROUCHER, M.D. Fluorescence probe techniques to study micelle formation in water-soluble block copolymers. **Langmuir**, v. 6, p. 514-516, 1990.

ZHU, J.; ZHU, X.; ZHOU, D.; CHEN, J.; WANG, X. Study on reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization of MMA in the presence of 2-cyanoprop-2-yl 1-dithiophenanthrenate (CPDPA.). **European Polymer Journal**, v. 40, p. 743-749, 2004

Anexo 1

Determinação da concentração crítica de agregação (CAC)

A1. Introdução

Uma informação importante para os copolímeros em bloco anfifílicos é a sua concentração crítica de agregação (CAC), ou seja, a quantidade mínima de copolímeros em bloco que é adicionada em água para que estes se agreguem na forma de micelas poliméricas ou nanopartículas. Uma técnica que poderia ser empregada na determinação da CAC de um copolímero em bloco anfifílico é a tensiometria. (CHUNG et al., 1997). Neste anexo estão apresentados alguns resultados da determinação das CAC da PNIPAAm (reação C1, Tabela 5.1 do Capítulo V) e de dois copolímeros em bloco, um contendo PNIPAAm (reação CB7, Tabela 6.1 do capítulo VI) e outro contendo PNIPAAmAA (reação CBAA3, Tabela 6.1 do Capítulo VI). No entanto, estes resultados não foram conclusivos, necessitando a realização de novas análises.

A.2. Determinação da concentração crítica de agregação (CAC)

Os resultados encontrados neste estudo exploratório estão apresentados na Figura A1. Os valores de CAC dos polímeros foram caracterizados como sendo o ponto de mínimo das curvas de tensão superficial *versus* concentração de polímero.

Para os copolímeros em bloco obtidos os valores de CAC obtidos foram: $4,6 \times 10^{-3}$ mg/mL para o copolímero em bloco PHBHV-b-PNIPAAm e 5×10^{-4} mg/mL para o copolímero em bloco PHBHV-b-PNIPAAmAA. O perfil da tensão superficial *vs* concentração de polímero da PNIPAAm foi ligeiramente diferente dos demais resultados, neste caso não foi observado um ponto de mínimo. Segundo CHUNG e colaboradores (CHUNG et al., 1997) este resultado está relacionado ao caráter hidrofílico da PNIPAAm e

a presença dos grupos isopropila de sua estrutura. A diferença entre as CACs dos dois copolímeros em bloco poderia ser atribuída a estrutura química do polímero hidrofílico empregada na síntese dos mesmos. A presença de AA no segmento do copolímero de bloco PHBHv-b-PNIPAAmAA poderia contribuir para estabilização das micelas poliméricas numa concentração inferior àquela necessária para estabilizar as micelas formadas pelo PHBHv-b-PNIPAAm.

Figura A1. Determinação da CAC de uma amostra de PNIPAAm obtida na reação C1 e de dois copolímeros em bloco obtidos nas reações CB7 e CBAA3.

Anexo 2

Curvas de DSC

A2. Introdução

Duas amostras de copolímero foram submetidas à análise de DSC. As amostras analisadas foram: PHBHV-b-PNIPAAm sintetizado de acordo com as condições experimentais da reação CB8 (Tabela 6.1 do capítulo VI) e uma segunda amostra constituída de uma mistura física do PHBHV e da PNIPAAm que foram empregados na síntese do PHBHV-b-PNIPAAm obtido na reação CB8. No entanto, estes resultados não foram conclusivos, necessitando a realização de novas análises para confirmação dos resultados.

A.2. Curvas de DSC

A2.1. Curvas de DSC do PHBHV-b-PNIPAAm obtido na reação CB8 e de uma amostra da mistura física do PHBHV e da PNIPAAm que foram empregados na síntese do PHBHV-b-PNIPAAm obtido na reação CB8. (primeira etapa de aquecimento)

A2.2. Curvas de DSC do PHBHV-b-PNIPAAm obtido na reação CB8 e de uma amostra da mistura física do PHBHV e da PNIPAAm que foram empregados na síntese do PHBHV-b-PNIPAAm obtido na reação CB8. (segunda etapa de aquecimento)

Anexo 3

Produção Bibliográfica

Este trabalho gerou a seguinte produção bibliográfica:

Congressos:

J. C. Cazotti, A. M. Oliveira, A. M. Santos, D. Hirayama, **Polímeros inteligentes sintetizados por um novo mecanismo de polimerização: mecanismo RAFT** – 6º Congresso Brasileiro de Engenharia Química - Iniciação Científica – VI COBEQ-IC 2005.

J. C. Cazotti, A. M. Oliveira, A. M. Santos, J. C. S. Barbosa, P. C. Oliveira, **Synthesis and characterization of Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) by RAFT polymerization** – French-Brazilian Meeting on Polymers - FBPOL 2005.

J. C. Cazotti, A. M. Oliveira, A. M. Santos, **Síntese e caracterização do Poli(N-isopropilacrilamida-co-Ácido acrílico) por polimerização via radical livre controlada (RAFT)** - 7º Simpósio de Iniciação Científica da FAENQUIL - SEVAP 2004.

J. C. Cazotti, A. M. Oliveira, A. M. Santos, P. Silva, F. C. Biaggio, **Síntese e caracterização da Poli(N-isopropilacrilamida) por polimerização via radical livre viva** - 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – SIICUSP 2004.

J. C. Cazotti, A. M. Oliveira, A. M. Santos, P. Silva, F. C. Biaggio, **Síntese e caracterização de agentes de transferência de cadeia (CTAs) e seu emprego em reações de polimerização da n-isopropilacrilamida** - 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – SIICUSP 2004.

P. Silva, A. M. Santos, F. C. Biaggio, **Síntese de um agente de transferência de cadeia (CTA) e seu emprego em reações de polimerização**. In: 110 SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 2003, São Carlos. 110 SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 2003.

Artigos submetidos à publicação:

S. R. Montoro, A. M. Oliveira, M. L. T. Sordi, M. I. Ré, A. M. Santos, **Redução da massa molar e funcionalização do poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (phbhv) para aplicações em sistemas de liberação controlada: estudo comparativo entre hidrólise ácida e transesterificação via catálise ácida**.

Submetido ao periódico Polímeros: Ciência e Tecnologia

A. M. de Oliveira, P. C. Oliveira, A. M. Santos, M. H. A. Zanin, M. I. Ré, **Synthesis and characterization of thermo-responsive particles of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)-b-poly(n-isopropylacrylamide)**

Submetido à edição especial de nanotecnologia do periódico Brazilian Journal of Physics

Artigos em elaboração:

A. M. Oliveira, P. Silva, J. C. Cazotti, F. C. Biaggio, J. C. S. Barbosa, A. M. Santos, **Síntese de agentes de transferência de cadeia funcionalizados do tipo ditioester e sua utilização em polimerização via radical livre viva.**

A. M. Oliveira; J. C. Cazotti; A. M. Santos, **Síntese da PNIPAAmAA pelo mecanismo raft empregando um agente de transferência de cadeia funcionalizado**

Patente em fase de redação e depósito:

“Método de produção de nanopartículas sensíveis á temperatura e pH para uso em liberação controlada de produtos ou ativos e produto”