

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS

IGOR WALLACE FERREIRA DA SILVA

Síntese de copolímeros anfipáticos para a geração de moldes (templates) para materiais
metálicos nanoestruturados

Lorena
2022

IGOR WALLACE FERREIRA DA SILVA

Síntese de copolímeros anfipáticos para a geração de moldes (templates) para materiais metálicos nanoestruturados

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciência do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais na área de concentração de Materiais Convencionais e Avançados.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Herbst Florenzano

Versão Original

Lorena
2022

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Igor Wallace Ferreira da
Síntese de copolímeros anfipáticos para a geração de
moldes (templates) para materiais metálicos
nanoestruturados / Igor Wallace Ferreira da Silva;
orientador Fábio Herbst Florenzano - Versão
Original. - Lorena, 2022.
78 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Materiais na Área de
Materiais Convencionais e Avançados) - Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.
2022

1. Polimerização raft. 2. Vesículas poliméricas. 3.
Polimerossomos. 4. Nanopartículas metálicas. 5.
Atividade bactericida. I. Título. II. Florenzano,
Fábio Herbst, orient.

Ao meu irmão, que compartilha comigo o mesmo anseio em contribuir, mesmo que diminutamente, com o conhecimento humano.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Fábio, que além de todo apoio e direcionamento dado durante este período de formação, hoje o considero também um grande amigo.

Aos meus pais, que mesmo de longe, se mostram presentes e apoiam com tanto amor minhas decisões.

A todos meus amigos, que tornaram este tempo mais leve, mesmo durante a pandemia, além de me acalentaram em momentos difíceis.

Aos casas do Discas.

Aos professores, técnicos e funcionários da EEL por todo apoio dado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

SILVA, I. W. F. **Síntese de copolímeros anfipáticos para geração de moldes (templates) para materiais metálicos nanoestruturados.** 2022. 78 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

A confecção de materiais metálicos nanoestruturados atrai cada vez mais estudos para este campo, tanto aplicado ao planejamento de estruturas quanto para aplicações nas áreas de catálise, superfícies ativas e outras. Agregados poliméricos podem ser uma opção de moldes (*templates*) para a geração desse tipo de material para diversas aplicações. O mecanismo RAFT de polimerização permite a construção de copolímeros sob medida entre eles os em blocos anfifílicos. Estes agregam-se em meio aquoso levando a diversas morfologias dos agregados poliméricos. A morfologia do agregado depende fortemente da estrutura molecular dos copolímeros. Este trabalho usou a RAFT para desenhar copolímeros anfifílicos que se agreguem gerando diferentes morfologias. A interação de cátions metálicos com esses agregados e posterior redução levando a diferentes materiais metálicos nanoestruturados que foram caracterizados a fundo e testados, por exemplo, via DLS, espectroscopia UV-Vis, MEV e TEM. O entendimento da relação entre a estrutura de diferentes polímeros usados como *templates* e a morfologia dos materiais metálicos finais foi alcançado nesta dissertação. Foi possível observar diferentes proporções entre blocos hidrofóbicos e hidrofílicos geram diferentes tamanhos de nanopartículas metálicas. Por último, o uso de *templates* vesiculares mostrou-se essencial para o aumento da atividade bactericida das nanopartículas de prata.

Palavras-chave: Polimerização RAFT. Vesículas poliméricas. Polimerossomos. Nanopartículas metálicas. Atividade bactericida.

ABSTRACT

SILVA, I. W. F. **Synthesis of amphipathic copolymers for generation of nanostructured metallic materials**. 2022. 78 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

Metallic nanomaterials have attracted much attention lately due both to the different structures that can be produced and by a vast application field for those materials in catalysis, active surfaces and others. Polymeric aggregates may be an option as templates for the design and building of this kind of materials for many applications. To reach that, RAFT polymerization allows the synthesis of tailored amphiphilic copolymers that aggregate in aqueous media in many morphologies that are strongly related to their molecular structures. In this work, RAFT was used for the design of amphiphilic copolymers prone to form aggregates in aqueous media. Metallic cations bound to the surface due to attraction forces can be then chemically reduced to provide nanostructured metallic materials. Such materials were characterized in depth and tested by, e.g., DLS, UV-Vis spectroscopy, SEM, and TEM, concerning their properties. Important advance on the understanding of the relationship of the different hydrophobic and hydrophilic ratio on the polymers used with the different sizes obtained. Lastly, vesicles templating proves it essential to increase bactericide activity of silver nanoparticles.

Keywords: RAFT polymerization. Polymer vesicles. Polymersomes. Metallic nanoparticles. Bactericide activity.

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema proposto para as etapas realizadas neste trabalho, onde as etapas estão separadas por: a) síntese via RAFT dos copolímeros; b) autoformação via troca de solvente miscíveis de polimerossomos; c) geração de nanopartículas de prata por redução química; e d) eliminação de colônias de bactérias com as nanopartículas.	24
Figura 2 – Esquema de polimerização via radical livre, onde In é o iniciador; R é o radical; M é o monômero; n e m números finitos inteiros e H é o hidrogênio.	27
Figura 3 – Esquema do equilíbrio entre as espécies dormentes e ativas que ocorre nas RDRP.	28
Figura 4 – Esquema geral do mecanismo RAFT.	29
Figura 5 – Morfologias possíveis proporcionadas pelo mecanismo RAFT.	31
Figura 6 – Morfologias possíveis para agregados de copolímeros anfífilicos variando a proporção entre as cadeias hidrofílicas e hidrofóbicas.	32
Figura 7 – Estruturas 2D e 3D de lipossomos e polimerossomos de copolímeros diblocos.	33
Figura 8 – Esquema comparativo entre o uso de polimerossomos e micelas como templates.	34
Figura 9 – Esquema diferenciando as interações entre átomos da superfície com átomos internos. O mesmo princípio aplicado para líquido, sólido amorfo e sólido cristalino.	35
Figura 10 – Gráfico relacionando o tamanho dos embriões e energia livre de Gibbs do sistema.	36
Figura 11 – Dinâmica de dissolução e redeposição do material em crescimento (flechas laranjas) ou rápida migração de átomos da superfície (flechas verdes).	37
Figura 12 – Possibilidades de agregação das nanopartículas, onde as nanopartículas estão: a) não agregadas; b) agregadas em cadeia; c) agregadas em glóbulos; d) completamente agregadas (clusters).	38
Figura 13 – Ações bactericidas de nanopartículas de prata.	39
Figura 14 – Monitoramento da polimerização dos macroCTA's de poliestireno (PS) sintetizados via polimerização RAFT: a) PS-1 e b) PS-2. Os símbolos cheios são referentes à massa molar média numérica (Mn) e os vazios referem-se à razão de dispersidade molar (Mw/Mn).	46

Figura 15 – Monitoramento da massa molar durante a síntese do PSPtBA-2 via polimerização RAFT. Os símbolos cheios são referentes à massa molar média numérica (Mn) e os vazios referem-se à razão de dispersidade molecular (Mw/Mn).....	47
Figura 16 – Cromatogramas dos macroCTAs (cinza) e dos copolímeros (preto): a) PS-1 e PSPtBA-1 e b) PS-2 e PSPtBA-2.	48
Figura 17 – Esquema da reação de hidrólise para transformação de PtBA em PAA.	48
Figura 18 – Espectros de FTIR referentes ao PSPAA-1, onde: a) macroCTA (PS); b) PS-b-PtBA e c) PS-b-PAA.	49
Figura 19 – Espectros de FTIR referentes ao PSPAA-2, onde: a) macroCTA (PS); b) PS-b-PtBA e c) PS-b-PAA.	50
Figura 20 – Espectros de RMN- ¹ H referentes ao PSPAA-1, onde: a) macroCTA (PS); b) PS-b-PtBA e c) PS-b-PAA.	51
Figura 21 – Espectros de RMN- ¹³ C referentes ao PSPAA-1, onde: a) macroCTA (PS); b) PS-b-PtBA e c) PS-b-PAA.	52
Figura 22 – Espectros de RMN- ¹ H referentes ao PSPAA-2, onde: a) macroCTA (PS); b) PS-b-PtBA e c) PS-b-PAA.	53
Figura 23 – Espectros de RMN- ¹³ C referentes ao PSPAA-2, onde: a) macroCTA (PS); b) PS-b-PtBA e c) PS-b-PAA.	54
Figura 24 – Titulação feita em DLS das vesículas poliméricas (PSPAA-1) com adição de uma solução de AgNO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ , onde tem-se o comportamento de: (a) tamanho (quadrados cheios) e dispersão (quadrados vazios); e (b) do potencial zeta (triângulos).	59
Figura 25 – Titulação feita em DLS das vesículas poliméricas (PSPAA-2) com adição de uma solução de AgNO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ , onde tem-se o comportamento de: (a) tamanho (quadrados cheios) e dispersão (quadrados vazios); e (b) do potencial zeta (triângulos).	60
Figura 26 – Micrografia TEM dos agregados dos polímeros sintetizados com contraste de acetato de uranila em duas ampliações, onde: (a),(b) PSPAA-1 e (c),(d) PSPAA-2.....	61
Figura 27 – Espectrofotometria UV-Vis de nanopartículas de prata com: agregados poliméricos (preto); sem adição de polímero (vermelho); e sem polímero reduzido por Ácido Ascórbico (verde) e Ácido Cítrico (azul).	63
Figura 28 – Espectroscopia UV-Vis das nanopartículas de prata sem polímero (cinza), com o PSPAA-1 (preto, sólido) e com o PSPAA-2 (preto, tracejado).....	64
Figura 29 – Micrografia SEM comparando de gotas secas de nanopartículas de prata a partir do PSPAA-1 com (a) e sem (b) agregados poliméricos em aumentos de 100x, 500x, 1000x e 4000x (as escalas estão presentes nas imagens).	65

Figura 30 – Micrografia de FEG-SEM das nanopartículas de prata obtidas com o PSPAA-1.	66
Figura 31 – Micrografia TEM de nanopartículas feitas utilizando o PSPAA-1 (a e b) e o PSPAA-2 (c e d) em duas ampliações diferentes.	67
Figura 32 – Micrografia obtida por TEM de alta ampliação das nanopartículas geradas pelo PSPAA-1 (a) e pelo PSPAA-2 (b).	68
Figura 33 – Esquema da placa de 96 poços, onde vesículas poliméricas e nanopartículas confeccionadas a partir dos copolímeros PSPAA-1 e PSPAA-2 foram testadas contra suspensão de <i>E. coli</i> (ATCC 25921), com os devidos controles. Os poços marcados em verde indicam o crescimento de colônias e em branco onde não houve.	69
Figura 34 – Esquema da placa de 96 poços, onde vesículas poliméricas e nanopartículas confeccionadas a partir dos copolímeros PSPAA-1 e PSPAA-2 foram testadas contra suspensão de <i>B. subtilis</i> (PY79), com os devidos controles. Os poços marcados em verde indicam o crescimento de colônias e em branco onde não houve.	70
Figura 35 – Esquema da placa de 96 poços, onde vesículas poliméricas e nanopartículas confeccionadas a partir dos copolímeros PSPAA-1 e PSPAA-2 foram testadas contra suspensão de <i>S. aureus</i> (ATCC 25213), com os devidos controles. Os poços marcados em verde indicam o crescimento de colônias e em branco onde não houve.	71

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Planejamento para a síntese dos materiais poliméricos, onde $x < y$ e $z \approx z^*$	41
Tabela 2 – Materiais sintetizados e caracterizados.	55
Tabela 3 – Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade obtidos por DLS dos agregados autoformados de PSPAA-1 em pH 7,0 repetitivamente.	56
Tabela 4 – Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade obtidos por DLS de agregados autoformados de PSPAA-1 em pH 6,3 repetitivamente.	56
Tabela 5 – Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade obtidos por DLS de agregados autoformados de PSPAA-1 em água a $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$	57
Tabela 6 – Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade obtidos por DLS de agregados autoformados de PSPAA-1 em água a $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$	58
Tabela 7 – Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade obtidos por DLS de agregados autoformados de PSPAA-1 em água a $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$	62
Tabela 8 – MIC em mg mL^{-1} para as nanopartículas de prata confeccionadas na presença e na ausência dos copolímeros PSPAA-1 e PSPAA-2 contra colônias de E.coli, B. subtilis e S. aureus.	72
Tabela 9 – MBC para as nanopartículas de prata confeccionadas na presença dos copolímeros PSPAA-1 e PSPAA-2 testadas contra colônias de E.coli, B. subtilis e S. aureus.	72

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVOS.....	25
3 JUSTIFICATIVA.....	26
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
4.1 Polimerização radicalar	26
4.2 RAFT.....	28
4.3 Polimerossomos.....	31
4.4 Nanopartículas metálicas.....	34
4.5 Mecanismo bactericida.....	38
5 MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1 Confeção dos materiais poliméricos.....	40
5.2 Formação de agregados poliméricos	41
5.3 Confeção de Nanopartículas.....	41
5.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) e da Concentração Mínima Bactericida (MBC).....	42
5.5 Caracterizações.....	43
5.5.1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	43
5.5.2 Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	43
5.5.3 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN - ^1H e ^{13}C).....	44
5.5.4 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta.....	44
5.5.5 Espectrometria de UV e Luz Visível (UV-Vis)	44
5.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).....	44
5.5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	45
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45

6.1 Síntese e caracterização dos materiais.....	45
6.2 Formação de vesículas poliméricas	55
6.3 Confeção de nanopartículas metálicas.....	61
6.4 Testes de atividade bactericida.....	69
7 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O estudo de copolímeros anfifílicos é cada vez mais relevante, principalmente pela capacidade desses materiais formarem diversos tipos de agregados em meio aquoso, destacando-se na atualidade as vesículas poliméricas, também chamados de polimerossomos¹. As aplicações destas estruturas são variadas, podendo ser utilizadas como nanorreatores, sistemas de transporte de fármacos e outros. Tais materiais também podem ser o elemento base para outros tipos de agregados como micelas poliméricas². A proposta deste projeto é usar esses agregados, particularmente os polimerossomos como moldes (*templates*) para a geração de materiais nanoestruturados de prata e subsequente determinação da atividade bactericida.

Para formar vesículas em água, muitas vezes de forma espontânea, os polímeros devem apresentar características anfipáticas. Mais do que isso, em geral é necessária uma separação bastante marcada entre uma região polar e outra apolar na mesma cadeia polimérica. Isso é conseguido por meio da síntese de copolímeros em bloco anfipáticos, por exemplo. Essa síntese se tornou muito mais fácil há cerca de 20 anos³.

Foi com o advento das técnicas de polimerização via radical controlada (PRC)⁴, hoje conhecidas como técnicas de Polimerização por Desativação Reversível de Radicais (*Reversible-Deactivation Radical Polymerization*, RDRP)⁵, que o uso de polímeros para a formação de vesículas se tornou mais factível. Isso porque antes delas a síntese de copolímeros em bloco era uma tarefa difícil e restrita a um conjunto reduzido de monômeros.

Nas diversas variantes de RDRP, mesmo depois da polimerização ter ocorrido, uma extremidade da cadeia fica ligada ao grupo controlador usado. Dessa forma é possível reiniciar a polimerização com outro monômero, facilitando como citado a produção de copolímeros em bloco (anfipáticos, se desejado). Para o desenvolvimento deste estudo optou-se por usar a Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação (RAFT)^{6,7}, uma variante de RDRP que tem se mostrado efetiva e que pode ser aplicada à ampla gama de monômeros.

Em razão da ampla gama de monômeros compatíveis com o uso da RAFT e por permitir a reinicialização, a geração de copolímeros em bloco anfifílicos para uso em vesículas poliméricas é facilitada. Pode-se também alterar, de forma planejada, as proporções entre os blocos polar e apolar, modificando assim a estrutura que será formada. Desta forma, gerando estruturas poliméricas que se assemelham às estruturas fosfolipídicas utilizadas para a confecção de lipossomos, sendo utilizadas então para formar estruturas análogas. Dada as grandes similaridades com as vesículas lipídicas (lipossomos), as vesículas poliméricas são chamadas por polimerossomos, do inglês *polymersomes*⁸.

As aplicações dos polimerossomos vão desde o isolamento de fármacos e enzimas em seu interior aquoso para aplicação direta no meio biológico até nanorreatores para aplicação em larga escala^{3,9,10}. Uma aplicação interessante e de grande potencial é o uso aqui proposto: moldes (*templates*) para a geração de materiais metálicos nanoestruturados¹¹.

Para atuarem como bons *templates*, esses devem se ligar aos cátions para posterior redução e formação de material metálico. Os polimerossomos com carga residual negativa e grupos com pares de elétrons não-compartilhados na sua parte polar podem se ligar a cátions, fixando-os em posição para, após uma reação de redução, gerar o material nanoestruturado, que apresentará um padrão definido pelo *template* polimérico¹². Monômeros ácidos, como o ácido metacrílico e o ácido acrílico podem gerar vesículas carregadas negativamente com capacidade de ligação de cátions, como já foi demonstrado na literatura (vide a seguir).

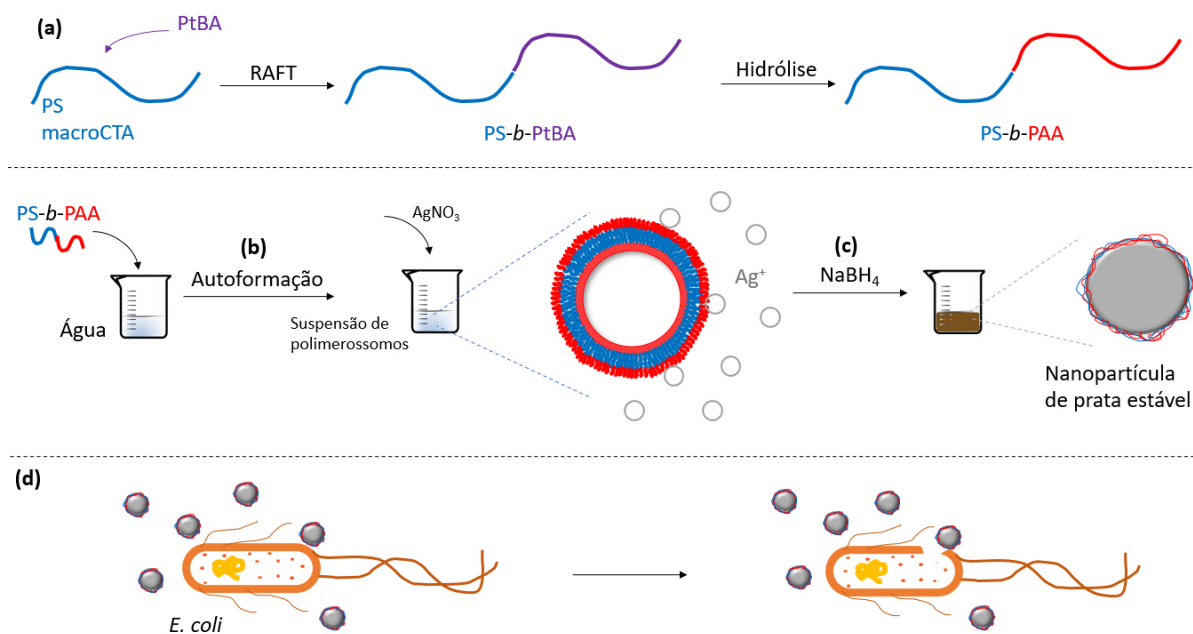
Por exemplo, materiais nanoestruturados de prata metálica são bastante propícios para serem obtidos por meio de *templating*. Nanopartículas de prata já foram obtidas a partir de polimerossomos de PEO-*b*-(PtBA-*stat*-PAA)¹¹. A presença de unidades de ácido acrílico garantiu a ligação dos cátions de Ag (I), que foram posteriormente reduzidos para geração de partículas de dimensões nanométricas. Nesse estudo¹¹, não se explorou, porém, a influência dos parâmetros moleculares do material polimérico nas características das nanopartículas de prata formadas, o que se pretende realizar neste trabalho, usando-se diferentes tamanhos das unidades repetitivas. Naquele estudo gerou-se um material metálico com alta eficiência microbicida.

Mesmo copolímeros que não apresentam carga formal negativa podem ser usados como *templates*. Cao e colaboradores¹³ modularam a morfologia de nanopartículas magnéticas utilizando filmes de poliestireno-*bloco*-poli(metacrilato de metila) (PS-*b*-PMMA) de ultra alta massa molar. Naquele trabalho, apenas variando a concentração das nanopartículas nos filmes conseguiram-se diferentes resultados para propriedades magnéticas e morfologia dessas partículas¹³. Kang e colaboradores utilizaram poli(óxido de etileno)-*bloco*-poli(metacrilato de metila) (PEO-*b*-PMMA), outro copolímero com carga neutra, para gerar nanopartículas de PtCu para uso como catalisador¹⁴.

Em todos os casos citados aqui, copolímeros em bloco foram usados com sucesso para a geração de sistemas metálicos de dimensões nanométricas, que apresentam, portanto, altíssimas áreas específicas, potencializando efeitos que se dão na interface do metal com o meio em que ele está inserido.

Figura 1 – Esquema proposto para as etapas realizadas neste trabalho, onde as etapas estão separadas por: a) síntese via RAFT dos copolímeros; b) autoformação via troca de solvente

miscíveis de polimerossomos; c) geração de nanopartículas de prata por redução química; e d) eliminação de colônias de bactérias com as nanopartículas.



Fonte: autoria própria

A aplicação de polimerossomos de copolímeros em bloco produzidos sob medida usando-se a técnica RAFT como *soft templates* é, portanto, uma janela de oportunidades para a geração de materiais metálicos nanoestruturados e sobretudo para o controle da sua morfologia, vide os exemplos já citados e com os objetivos traçados para este trabalho. Tais materiais podem apresentar futuras aplicações como sistemas antibacterianos, entre outras.

A Figura 1 esclarece visualmente cada etapa deste trabalho de dissertação, onde na primeira etapa (a), após a síntese do primeiro bloco de PS, foi sintetizado os copolímeros via RAFT que passaram por uma síntese posteriormente. Com isto, os polimerossomos foram formados via troca de solventes miscíveis (b) que foram utilizados para gerar nanopartículas metálicas (c). Estes materiais metálicos foram utilizados para impedir o crescimento de colônias de bactérias (d).

2 OBJETIVOS

- Sintetizar e caracterizar, usando a técnica RAFT, copolímeros anfipáticos que apresentem unidades funcionais com potencial de ligar-se a metais em sua porção polar.
- Gerar, e posteriormente caracterizar, agregados nanométricos (polimerossomos preferencialmente) em solução aquosa usando os materiais sintetizados;

- Confeccionar e caracterizar nanopartículas de prata moldadas pelos agregados na presença de soluções do cátion de prata, por meio de reações de redução química;
- Testar a sua atividade bactericida dos materiais gerados;
- Relacionar a morfologia e as propriedades das nanopartículas formadas com a estrutura molecular dos materiais poliméricos utilizados.

3 JUSTIFICATIVA

O uso de polimerossomos como *templates* para materiais nanoestruturados é uma abordagem bastante promissora e ainda pouco explorada, dado que esse tipo de sistema polimérico é relativamente novo. O uso da técnica RAFT permite a obtenção de copolímeros sob medida, facilitando o estudo sistemático da relação entre a estrutura dos copolímeros (e dos polimerossomos por eles formados) e as características e propriedades dos materiais metálicos formados a partir deles. Materiais metálicos nanoestruturados apresentam, devido por exemplo à sua alta área específica, aplicação em áreas como catálise¹⁵, agentes bactericidas¹⁶, fotofísica¹⁵.

Características esperadas para serem controladas podem ser, por exemplo, tamanho das nanopartículas e morfologia (esferoides). Estes são atributos são visados para aumentar a razão superfície e volume dessas partículas e, assim, potencializar sua atividade bactericida.

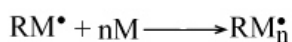
As relações entre as características dos materiais poliméricos e dos polimerossomos com as características e propriedades dos materiais metálicos formados a partir deles são de fundamental importância para a geração racional de materiais metálicos com propriedades específicas e alta eficiência, para qualquer que seja a aplicação desejada. A busca por essas relações é parte fundamental para expandir os horizontes de aplicações desses sistemas com uma nova vertente intimamente relacionada à área de materiais funcionais.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Polimerização radicalar

A polimerização via radical livre (PRL) permite uma grande de aplicações tecnológicas e comerciais. Com um conjunto simples de reações radicalares (indicado no esquema da Figura 2 abaixo), pode-se confeccionar variados materiais a partir de monômeros vinílicos, como os (met)acrilatos, estirênicos e muitos outros.

Figura 2 – Esquema de polimerização via radical livre, onde In é o iniciador; R é o radical; M é o monômero; n e m números finitos inteiros e H é o hidrogênio.



Fonte: imagem adaptada de Gehlen et al¹⁷.

Como visto no esquema acima, a PRL começa na iniciação a partir da quebra homolítica de uma ligação específica de um iniciador escolhido, formando os radicais que irão ligar-se a monômeros dando início as cadeias poliméricas. Na etapa seguinte de propagação, os monômeros vão ligando-se a cadeia até chegar à etapa de terminação. Esta última pode ocorrer de duas formas: combinação ou desproporcionamento.

Na combinação, duas cadeias em crescimento se encontram e os radicais de cada formam uma ligação, terminando o crescimento. Já no desproporcionamento, o hidrogênio beta de uma das cadeias em crescimento sofre uma quebra homolítica e liga ao outro radical da outra cadeia. Os dois carbonos alfa e beta com um elétron desemparelhado ligam-se formando uma ligação dupla, tudo isso simultaneamente. Este já um primeiro motivo para as cadeias terminarem em tamanhos variados, além disso o tempo total de crescimento e término de uma cadeia é muito curto, ou seja, conforme o tempo de reação passa, as cadeias formadas no começo da síntese podem divergir em massa molecular e em composição daquelas formadas em tempos avançados de síntese. Outro problema bastante frequente é a possibilidade de ocorrer ramificações nas cadeias por um mecanismo parecido ao desproporcionamento porém no meio de uma cadeia já formada.

Para diversas aplicações, a PRL é suficiente e extremamente eficiente. Entretanto, devido aos problemas relacionados à terminação enunciados acima, há aplicações para as quais é necessário um controle mais fino das características poliméricas como, por exemplo, baixos valores dispersividade molar (\bar{M}_w/\bar{M}_n) e reiniciação de cadeias. Para isso são necessárias técnicas como as de Polimerização por Desativação Reversível de Radicais (RDRP).

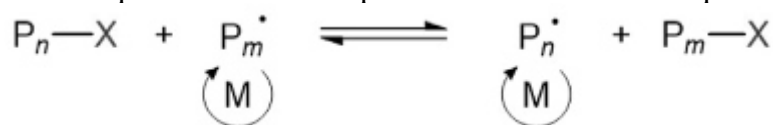
Importante ressaltar características de polímeros melhoradas através do uso das RDRPs e que são sempre em consideração na caracterização de polímeros. Primeiramente,

algumas determinações de tamanho das cadeias poliméricas baseiam-se em valores de massa molar média numérica (M_n), que é a média numérica da massa molar das cadeias poliméricas. Também é bastante utilizado valores de massa molar média ponderada em massa (M_w), que se leva em consideração o quanto cada cadeia contribui para obtenção da massa molar média, fazendo assim uma média ponderada na massa molar de cada cadeia. Com isso, pode-se obter a razão M_w/M_n , também chamada de dispersidade molar, para determinar a distribuição dos tamanhos de cada cadeia. A dispersidade molar tem valor mínimo (ideal) de 1, quando todas as cadeias tem a mesma massa molar.

4.2 RAFT

Dentre as RDRP, a Polimerização mediada por Nitróxido (NMP), Polimerização Radical por Transferência de Átomo (ATRP) e a Transferência de Cadeia por Adição-Fragmentação Reversível (RAFT) são as mais consolidadas. Uma característica das técnicas de RDRP se destaca no contexto da temática aqui tratada: a possibilidade de reiniciação de uma cadeia pré-formada, alongando-a com um monômero diferente. Isso facilita, sobremaneira, a síntese de copolímeros em bloco¹⁸, bloco fundamental para a montagem de nanoestruturas que servirão de *template*. Os fundamentos da RAFT que embasam essa característica serão discutidos a seguir.

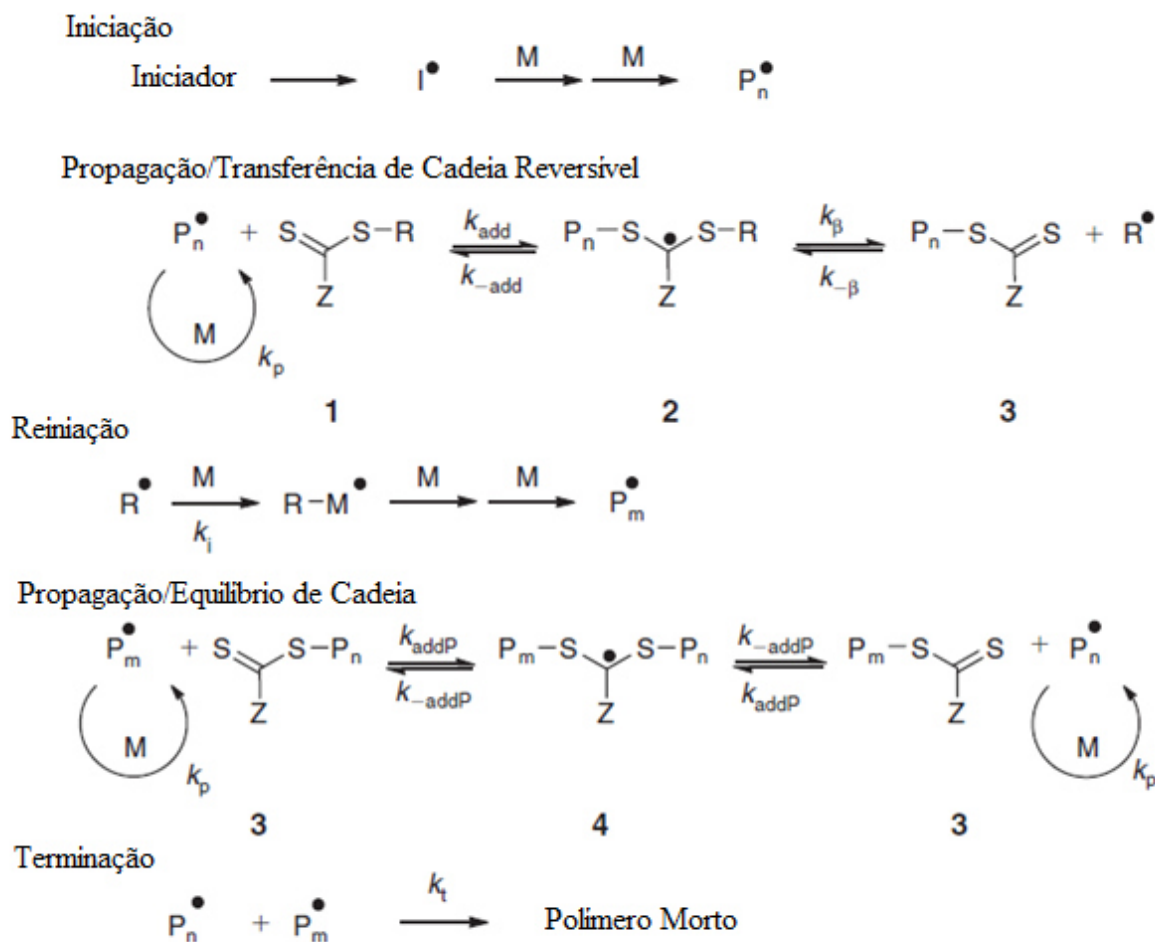
Figura 3 – Esquema do equilíbrio entre as espécies dormentes e ativas que ocorre nas RDRP.



Fonte: imagem adaptada de Corrigan et al¹⁹.

O trunfo das RDRP se dá pelo retardo na terminação das cadeias, isto é, as cadeias vivas (espécies dormentes e ativas) crescem sem que terminem enquanto alternam entre um estado dormente e um ativo (no qual ocorre a incorporação quase simultânea de novos monômeros as cadeias), como pode-se ver na Figura 3. Desta maneira, todas as cadeias podem crescer quase simultaneamente, diminuindo muito o problema de formar cadeias de tamanhos heterogêneos que ocorre na PRL¹⁹. Para isto a quantidade de radicais disponíveis no sistema deve se manter baixa, assim evitando que espécies radicalares se encontrem e terminem, gerando cadeias “mortas” (cadeias que não propagam mais).

Figura 4 – Esquema geral do mecanismo RAFT.



Fonte: imagem adaptada de Moad, Rizzardo e Thang⁷.

O mecanismo RAFT se baseia na presença de ligações fracas C-S no agente de transferência de cadeia (CTA)^{7,20}. Vale ressaltar que diferente dos outros mecanismos RDRP, a RAFT utiliza mecanismo da PRL comum, somente diminui (em muito) as terminações definitivas radiculares através de compostos sulfurados que mediam reações de transferência de cadeia, como os ditioésteres e tritiocarbonatos⁴.

No esquema geral da RAFT visto na Figura 4, observa-se que a iniciação se dá pela quebra homolítica de um iniciador radicalar qualquer, que reage com monômeros formando oligômeros. Então essas pequenas cadeias em crescimento reagem com o CTA entrando num equilíbrio de transferência de cadeia, isto é, a formação de intermediário radicalares que levam à liberação de novos radicais, começando novas cadeias na etapa de reiniciação. Esta etapa intermediária, conhecida como pré-equilíbrio, está diretamente relacionada com a taxa de polimerização (P_n^\bullet) e a taxa de transferência de cadeia (radical propagante proveniente do agente RAFT, R^\bullet). Destarte, tipicamente, a taxa de adição (k_{add}) é bastante alta enquanto que

as taxas de fragmentação ($k_{\text{-add}}$ e k_{β}) são baixas. Desta maneira, a constante de equilíbrio associada a essa etapa (K e K_R) levam ao crescimento controlado e (quase)simultâneo de todas as cadeias⁷.

De forma simultânea, formam-se novos radicais e oligômeros até que as cadeias entram em um equilíbrio dinâmico, denominado equilíbrio de cadeia. Similarmente à etapa anterior, as cadeias crescem conjuntamente enquanto permanecem num equilíbrio químico formando um intermediário com o CTA e liberando outra cadeia para este mesmo crescimento. Esta reação é regida pela constante de equilíbrio K_P , que relaciona as taxas K_{addP} e $K_{\text{-addP}}$, interligado às duas cadeias em crescimento e o intermediário⁷. Por fim, apesar de uma tentativa de evitar ao máximo, os radicais inevitavelmente vão se encontrar levando a reações de terminações definitivas. Encontrar 10% de cadeias mortas ao final de uma síntese RAFT é considerado um valor aceitável.

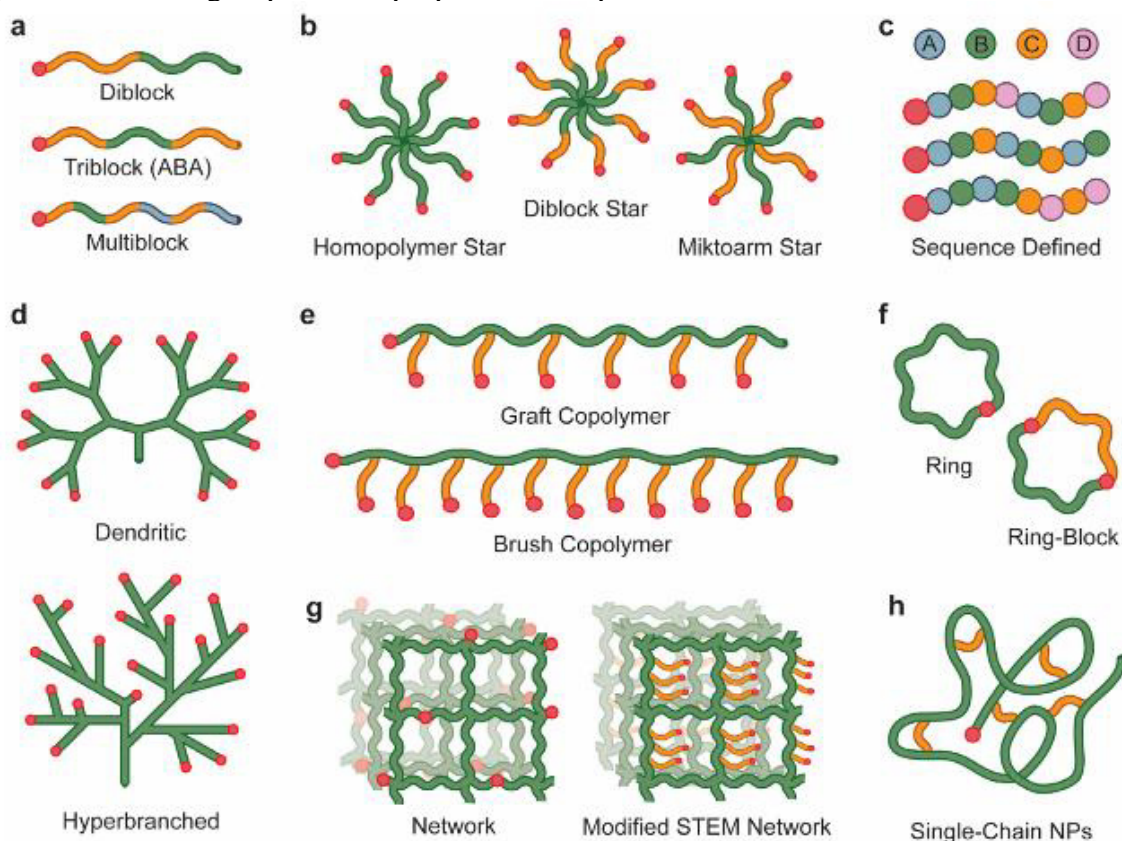
Nota-se que a escolha do CTA é de extrema importância, pois os grupos Z e R interferem de forma decisiva nas constantes de equilíbrio. O grupo R relaciona-se ao radical de saída de transferência de cadeia na etapa de pré-equilíbrio, isto é, o k_{β} é diretamente dependente da escolha do grupo de saída R. O grupo Z relaciona-se com a ativação e desativação da dupla ligação da tiocarbonila do agente RAFT, assim como com a estabilidade dos radicais intermediários formados tanto na etapa de pré-equilíbrio quanto no equilíbrio principal. Moad, Rizzardo e Thang⁷ listam algumas condições para uma polimerização RAFT eficaz:

- Agente inicial RAFT e polímero-agente RAFT devem ter uma dupla ligação C=S reativa (k_{add});
- Os radicais intermediários, de ambos equilíbrios, devem fragmentar-se rapidamente (suficientemente alto k_{β} e fraca ligação S-R no intermediário) e não ocorrer reações paralelas;
- A clivagem do intermediário no pré-equilíbrio deve ocorrer a favor de produtos ($k_{\beta} \geq k_{\text{-add}}$);
- O radical de saída ($R\bullet$) deve eficientemente reiniciar a polimerização ($k_i > k_p$).

A má escolha da combinação monômero e CTA pode acarretar num mal controle das cadeias ($D > 1,4$) ou incompatibilização de diferentes monômeros, por exemplo na tentativa de formar copolímeros⁷. Outro fator que pode levar a problemas na copolimerização é a ordem de estabilidade dos monômeros, uma vez que por deslocalização eletrônica e substituintes dos radicais vinílicos a serem formados interferem muito na reatividade das espécies dormentes. Portanto, geralmente, esta ordem de reatividade é seguida para ordem de síntese de cada

monômero. A ordem de estabilidade dos radicais resultantes, dos monômeros mais utilizados, é metacrilatos > estirenos > acrilatos. Importante ressaltar que esta ordem não é absoluta e pode-se levar em consideração diversos fatores como: estabilidade de radicais; efeitos polares e efeitos estéricos^{4,21,22}.

Figura 5 – Morfologias possíveis proporcionadas pelo mecanismo RAFT.



Fonte: imagem adaptada de Corrigan et al¹⁹.

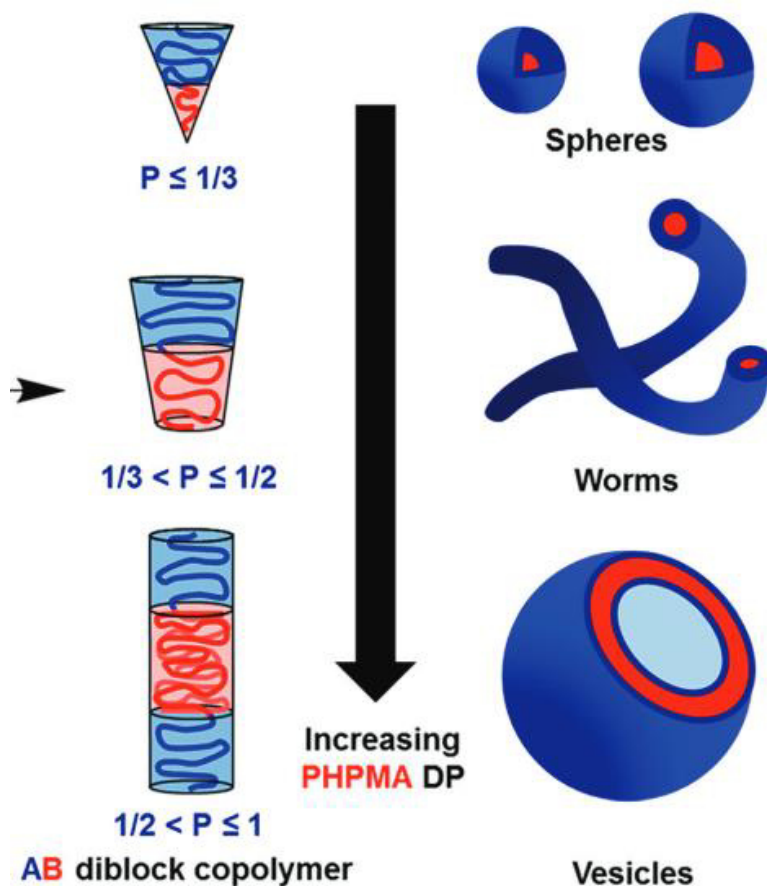
Como após o fim das reações, o CTA continua ligado ao final das cadeias é possível recomenciar-las, caso queira-se aumentar a massa molar média adquirida, ou até mesmo engenheirar polímeros em diversas configurações, como mostrado por Corrigan et al¹⁹ na Figura 5. Estas características são um dos motivos do uso da técnica de polimerização neste presente trabalho, onde a partir homopolímeros hidrofóbicos foi possível sintetizar copolímeros dibloco anfílicos que puderam ser utilizados para cumprirem com os objetivos propostos.

4.3 Polimerossomos

A síntese de copolímeros em bloco que contenham uma porção apolar e outra polar, copolímeros anfílicos, permite a confecção e diversos tipos de agregados em solução aquosa,

como de micelas e vesículas. Assim, a RAFT tornou-se uma importante ferramenta para geração de materiais que levam a essas estruturas, uma vez que a síntese de diferentes blocos vinílicos com diferentes funcionalidades é bastante facilitada, podendo ainda ter posteriores modificações.

Figura 6 – Morfologias possíveis para agregados de copolímeros anfifílicos variando a proporção entre as cadeias hidrofílicas e hidrofóbicas.



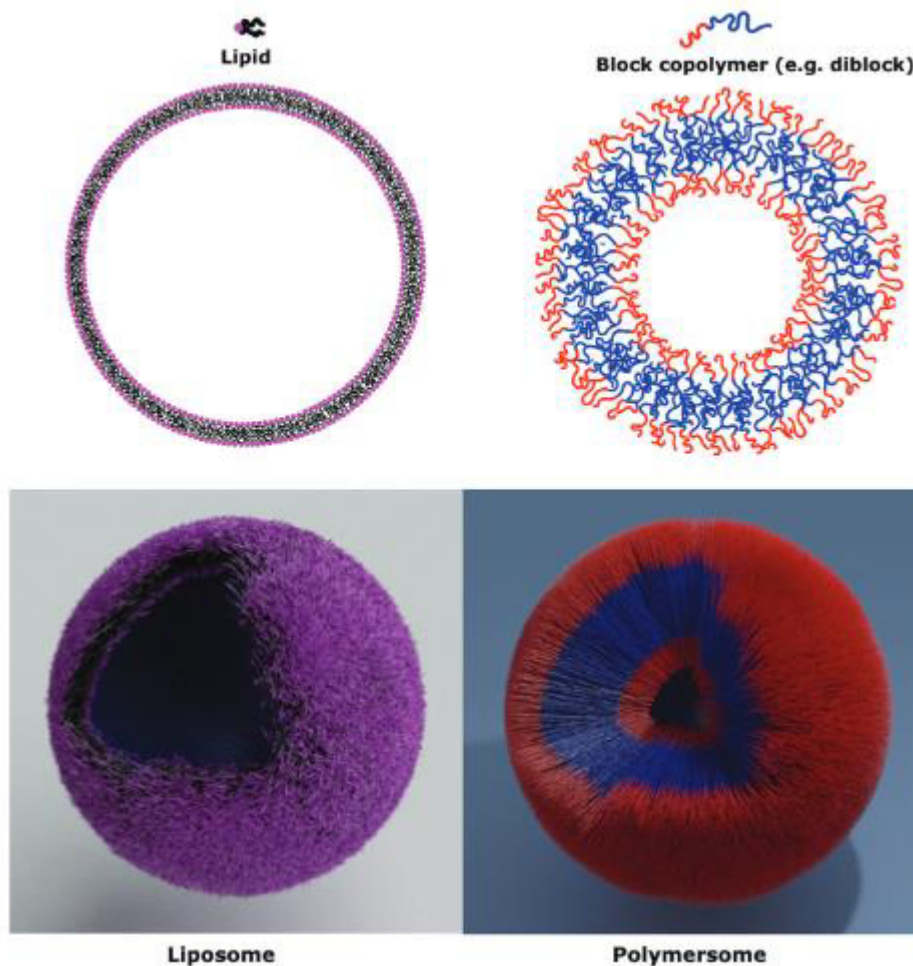
Fonte: imagem de adaptada de Rideau et al²³.

Mais do que a simples produção destas estruturas, é possível, pelo controle da polimerização, obter diferentes agregados a partir da composição relativa dos blocos, algumas das possibilidades podem ser observadas na Figura 6. Por exemplo, aproximando a proporção entre as porções polares e apolares, consegue-se obter, muitas vezes, agregados autoformados poliméricos, isto é, vesículas poliméricas²⁴.

As vesículas poliméricas possuem grande similaridades com as vesículas lipídicas (lipossomos), tanto quanto ao conceito como quanto a algumas aplicações mais óbvias. Por conta disso, as vesículas poliméricas começaram a ser chamadas por polimerossomos, do inglês *polymersomes*⁸. Assim como nos lipossomos, observa-se que o bloco apolar está relacionado à resistência mecânica das vesículas assim como o bloco polar está relacionado à carga na

interface entre a vesícula e os meios internos e externos²⁵. É possível conferir a diferença estrutural, e suas semelhanças, através dos esquemas 2D e 3D de um lipossomo e um polimerossomo de copolímeros dibloco na Figura 7.

Figura 7 – Estruturas 2D e 3D de lipossomos e polimerossomos de copolímeros diblocos.



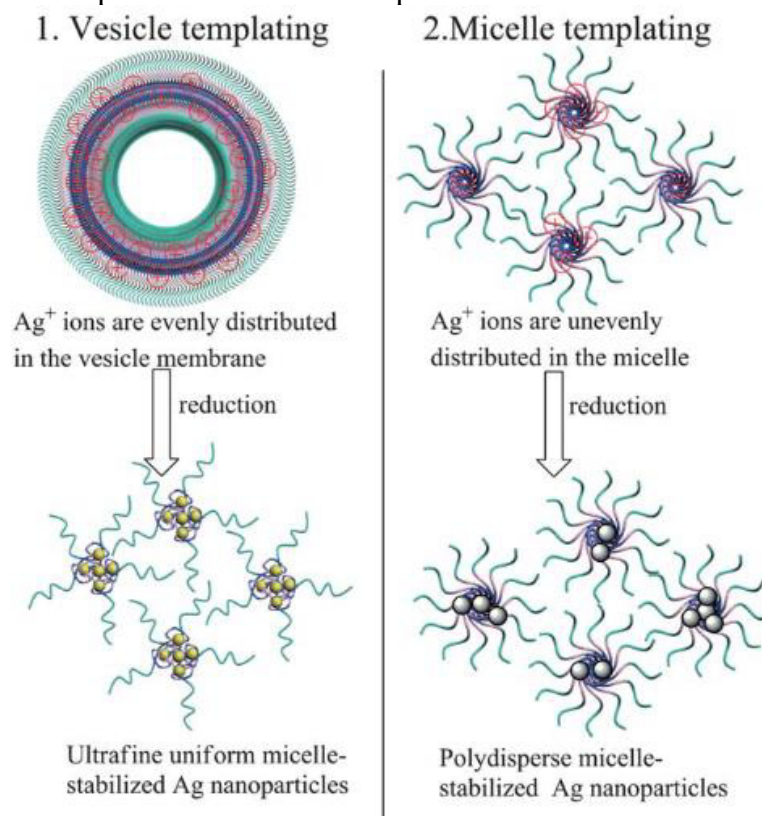
Fonte: imagem adaptada de Rideau et al²³.

Dadas as semelhanças, vale ressaltar algumas diferenças, ou até mesmo vantagens, das vesículas poliméricas em relação às lipídicas. Uma vantagem bastante clara é a grande diversificação na estrutura proporcionado pelas RDRP, assim como o controle dos tamanhos de cadeia, que podem proporcionar agregados maiores, na ordem das centenas de nanômetros e maior resistência do agregado quando comparado às vesículas lipídicas.²³ Outra característica, que diferencia bastante os dois tipos, inclusive na aplicação, é a possibilidade de planejamento também da parte polar dos polimerossomos, o que aumenta a variabilidade de aplicações possíveis, como a visada por este trabalho.

Desta maneira, há várias possibilidades a serem exploradas apenas modificando-se estas duas porções, como diferentes tamanhos de vesículas e estabilidade dos agregados. Por

isso, este trabalho explorou duas cadeias de PS (apolar) com 2 diferentes tamanhos para comparar a estabilidade dos autoagregados mantendo-se o tamanho próximo dos blocos polares. Para atuarem como bons *templates*, estes devem se ligar aos cátions para posterior redução e formação de material metálico.

Figura 8 – Esquema comparativo entre o uso de polimerossomos e micelas como templates.



Fonte: imagem adaptada de Lu et al¹¹.

Os polimerossomos com carga residual negativa e grupos com pares de elétrons não-compartilhados na sua parte polar podem se ligar a cátions, fixando-os em posição para, após uma reação de redução, gerar o material nanoestruturado, que apresentará um padrão definido pelo *template* polimérico¹². Além disso, o uso de polimerossomos, em vez de micelas, permite uma captação mais homogênea dos cátions na parte hidrofílica, gerando nanopartículas mais finas e homogêneas, como mostra a Figura 8.¹¹

4.4 Nanopartículas metálicas

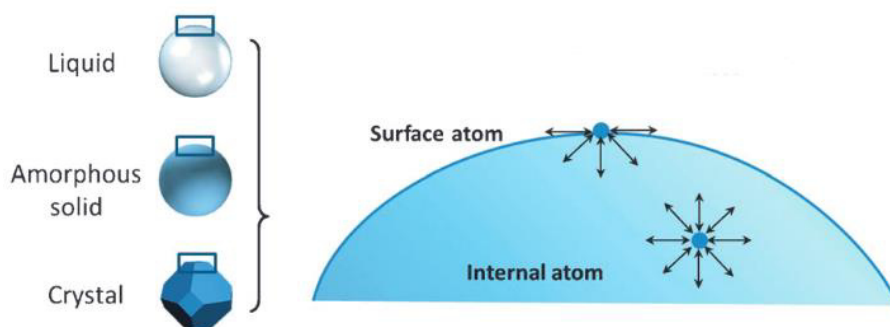
O estudo da formação de nanopartículas metálicas por redução química já é bastante consolidado devido ao controle estrutural suficientemente bom, velocidade de reação e baixo custo²⁶. Contudo, o estudo de estabilizadores que agem como *capping agent* ou *templates* ainda

é bastante relevante para melhorar suas aplicações e estabilidades destes materiais metálicos nanoestruturados.

Há dois tipos de *templates* que se destacam pelos seus usos, *hard* e *soft*. Os polimerossomos se enquadram no segundo caso que tem como principal vantagem – em relação aos chamados *hard templates* – o fato de serem removidos com facilidade após a preparação do material e por isso mesmo manterem a nanoestrutura metálica intacta¹¹. O uso de polímeros como estabilizadores na formação de nanopartículas metálicas por redução química já se provou bastante promissor, como o álcool polivinílico (PVA)^{26–29}. Portanto, a utilização de agregados poliméricos como *templates* se mostra cada vez mais emergente devido ao maior controle das propriedades das nanopartículas.

As vesículas poliméricas atuam na superfície das nanopartículas tanto antes da formação (captando os cátions) quanto após ligando-se aos átomos da superfície. Como mostra a Figura 9, a falta de ligantes aos átomos da superfície aumenta a energia superficial, ou seja, diminui a estabilidade. Os grupos aniônicos do copolímero proposto ligam-se a estes átomos diminuindo a energia superficial das nanopartículas, facilitando sua formação, além de sua estabilização termodinâmica³⁰.

Figura 9 – Esquema diferenciando as interações entre átomos da superfície com átomos internos. O mesmo princípio aplicado para líquido, sólido amorfo e sólido cristalino.



Fonte: imagem adaptada de Wang et al³⁰.

Diferentemente de líquidos e sólidos amorfos, no caso de sólidos cristalinos tem de se levar em consideração os planos mais estáveis para formação em suas superfícies. Como pode-se considerar analogamente a uma gota de líquido em que os átomos internos são mais estáveis por possuírem mais interações com átomos vizinhos, o mesmo ocorre para metais e ligações metálicas. Por exemplo, metais cfc, como prata e ouro, tem o plano (111) como o plano de maior densidade atômica, isto é, este é o plano onde um átomo terá maior ligações metálicas com seus átomos vizinhos. Por isso, a energia de superfície varia depende do plano a qual esta superfície é formada da seguinte forma: $\gamma_{(111)} < \gamma_{(100)} < \gamma_{(110)} < \text{qualquer outro plano}$ ³¹.

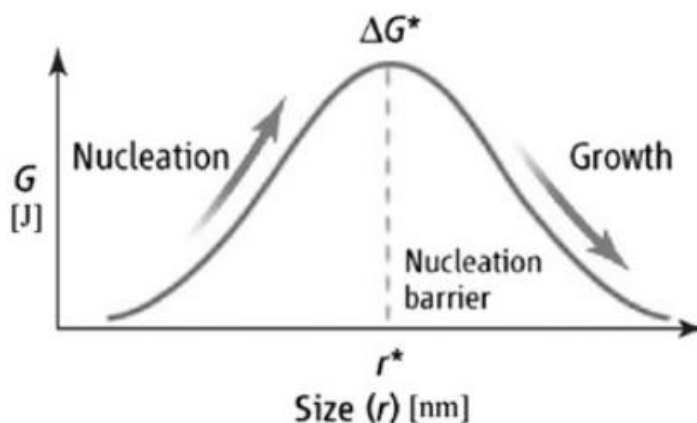
Dependendo, todavia, do ligante utilizado é possível vencer o aspecto termodinâmico selecionando planos preferencias. Estabilizando planos mais energéticos num rápido crescimento a partir de interações orientadas pelos ligantes presentes^{32,33}. Alguns exemplos de ligantes conhecidos são: polivinilpirrolidona (PVP) gerando faces Ag(100) e nanopartículas cúbicas^{34,35}; íons citrato gerando faces Ag(111)^{36,37}; e cloreto de hexadeciltrimetilamônio (CTAC) gerando faces Au(221)³⁸.

A formação de nanopartículas metálicas pelo método de redução química consiste em dois estágios: nucleação e, posterior, crescimento. Termodinamicamente, é necessário vencer uma barreira de energia livre para que a nucleação ocorra e prossiga com o crescimento durante a redução de cátions para metal. A variação de energia livre é a soma da energia livre de formação do novo volume e a energia da nova superfície criada, assim como demonstra a Equação 1 do cálculo de energia livre de Gibbs (ΔG) para a formação de partículas esféricas³⁹.

$$\Delta G = -\frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v + 4\pi r^2 \gamma \quad (1)$$

Onde ΔG_v é a energia livre do novo volume formado, r é o raio do embrião formado e γ é a energia livre de superfície por unidade de área. Dada esta equação, obtém-se um valor máximo da energia livre total no valor de raio crítico (r^*), no qual este valor será a energia de ativação do sistema (ΔG^*) para que a nucleação ocorra. Assim, um embrião de raio r formado precisa que $r \geq r^*$ para que este embrião se torne um núcleo para que seu crescimento resulte num estado de menor energia, como demonstrado graficamente na Figura 10 abaixo⁴⁰.

Figura 10 – Gráfico relacionando o tamanho dos embriões e energia livre de Gibbs do sistema.

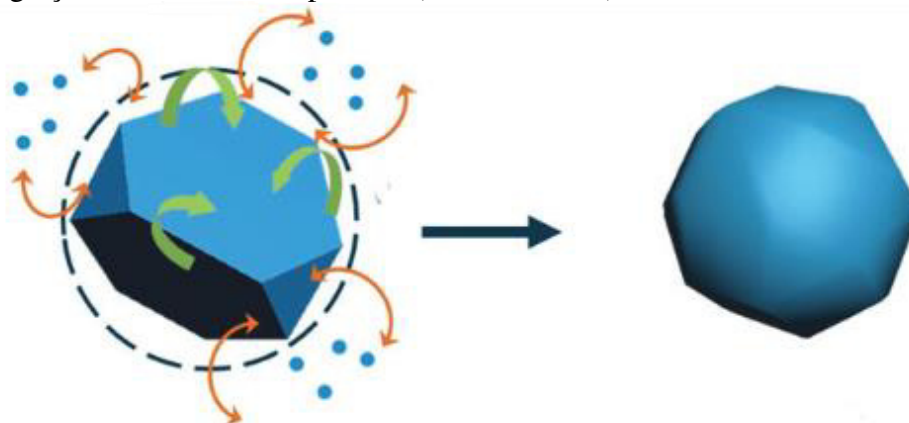


Fonte: imagem adaptada de Zhang et al⁴⁰.

Após a barreira termodinâmica ser vencida, os fatores cinéticos possuem maior predominância no crescimento contínuo dos núcleos, podendo ser por adição molecular, crescimento secundário ou engrossamento de Ostwald²⁶. Na adição molecular os átomos são adicionados na superfície dos núcleos e o processo depende fortemente da taxa de nucleação e crescimento. Quanto maior a taxa de nucleação, menor a taxa de crescimento e desta maneira obtêm-se partículas menores e maior uniformidade na distribuição de tamanho.

Outro mecanismo é o crescimento secundário que se dá pela colisão e agregação entre as partículas. Ainda assim, depois que as partículas estabilizarem pelo tamanho alcançado, partículas de maior tamanho continuam a crescer consumindo partículas menores até serem completamente dissolvidas. Este fenômeno é conhecido como engrossamento de Ostwald.

Figura 11 – Dinâmica de dissolução e redeposição do material em crescimento (flechas laranjas) ou rápida migração de átomos da superfície (flechas verdes).



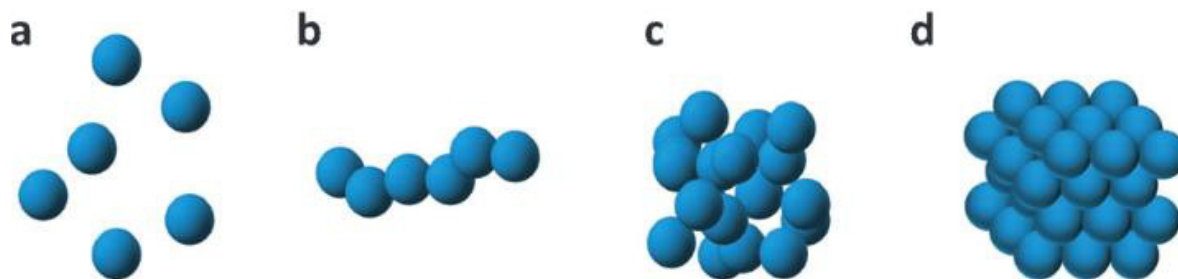
Fonte: imagem adaptada de Wang et al.³⁰

Importante ressaltar que apesar de teoricamente estes mecanismos de formação serem análogos a solidificação de metais, na prática são bastantes distintos. As nanopartículas são formadas em meio aquoso através da redução a partir de um composto químico, isto é, os mecanismos de crescimento não se dão por simples difusão atômica (já que ocorrem em baixas temperaturas para isto). Provavelmente os mecanismos ocorrem concomitantemente, por exemplo, através de um equilíbrio de dissolução e redeposição na superfície (Figura 11), complementando outros meios de crescimento³⁰.

Outro fenômeno indesejável, e ainda mais impactante que o crescimento das nanopartículas, é a agregação e formação de *clusters*. Para diminuir a energia superficial e devido a fortes interações coesivas, os agregados estabilizam o sistema até o ponto de sair de uma suspensão metaestável para a precipitação destas estruturas. Como mostra a Figura 12 abaixo, há diversas possibilidades de agregação que podem ocorrer no material até a formação de *clusters* (Figura 12d), que já implicam na perda de área superficial disponível. O uso de

templates, como estabilizadores da interface das nanopartículas, se mostra essencial para evitar este fenômeno, isolando as nanopartículas para algo como a Figura 12a mostra.

Figura 12 – Possibilidades de agregação das nanopartículas, onde as nanopartículas estão: a) não agregadas; b) agregadas em cadeia; c) agregadas em glóbulos; d) completamente agregadas (clusters).



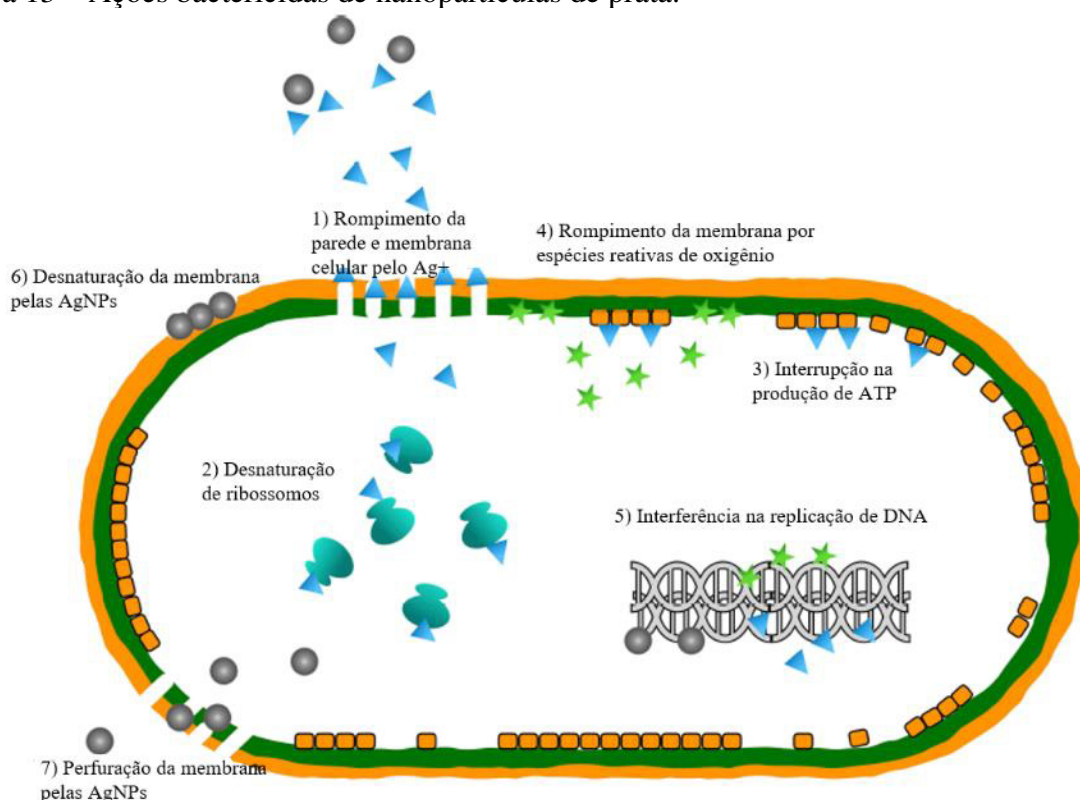
Fonte: imagem adaptada de Wang et al³⁰.

Importante também, além do entendimento da formação de nanopartículas, é o papel destas estruturas poliméricas para uso como *templates*. Para confecção de nanopartículas, muitas vezes se mostra necessário a utilização de estabilizadores, que também agem como *capping agents*, que funcionam como mais uma barreira termodinâmica, diminuindo a tensão superficial, contra a agregação de partículas²⁶. A estabilização através de macromoléculas é a partir de ancoragem das partículas com porções que envolvem a nanopartículas e conseguindo assim distanciar partículas umas das outras⁴¹⁻⁴³. O uso de vesículas poliméricas supri essas necessidades para a geração de nanopartículas metálicas, além de permitir um controle mais fino da morfologia e do tamanho destas partículas.

4.5 Mecanismo bactericida

As bactérias podem ser divididas em dois tipos, gram-positivas e gram-negativas, dependendo da organização básica de sua parede celular.⁴⁴ Esta distinção é importante para esta dissertação na questão da resistência associada as membranas de cada tipo. As paredes celulares das bactérias são compostas por uma rede macromolecular, chamada peptidoglicano. As bactérias gram-negativas são compostas por poucas (ou uma) camadas de peptidoglicano ligados a lipoproteínas na membrana externa, que com outros compostos formam a membrana externa⁴⁴. As bactérias gram-positivas possuem paredes celulares com muitas camadas de peptidoglicano e vários componentes que formam uma estrutura mais complexa e espessa⁴⁴.

Figura 13 – Ações bactericidas de nanopartículas de prata.



Fonte: imagem adaptada de Yin et al⁴⁵.

Estas diferenças entre as paredes celulares, tornam as bactérias gram-positivas mais resistentes do que bactérias gram-negativas, por exemplo impedindo a penetração das nanopartículas de prata pela parede celular⁴⁶. Os mecanismos antibacterianos das nanopartículas de prata são vários, como a liberação de íons que pode aderir aos compostos sulfurados da proteína levando à permeação na membrana citoplasmática e ao rompimento da membrana.⁴⁷ Desta maneira, as enzimas respiratórias podem ser desativadas gerando espécies reativas de oxigênio e interromper produção de ATP.⁴⁸ Estas espécies reativas são os principais agentes para rompimento da parede celular e modificação do DNA, impedindo replicação de DNA, reprodução celular, síntese de proteínas por desnaturação dos ribossomos, levando a morte da célula.⁴⁹ As nanopartículas de prata (AgNP) podem também perfurar a membrana, desnaturar a membrana citoplasmática rompendo organelas e interromper a transdução de sinal bacteriano levando a apoptose celular.^{50,51} Dado os diversos mecanismos, Yin et al⁴⁵ propuseram um esclarecedor esquema, como pode-se ver na Figura 13.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Confeção dos materiais poliméricos

Neste trabalho, dois materiais à base de PS-*b*-PAA foram confeccionados conforme os protocolos a seguir. Primeiramente, foi feita a síntese em massa do bloco apolar do material, usando-se estireno (99 %, *Sigma Aldrich*). O CTA utilizado foi o tritiocarbonato de cianometildodecila (98 %, *Sigma Aldrich*) e o iniciador utilizado foi o 2,2-azobis(2-metilpropionitrila), AIBN, (98%, *Sigma Aldrich*). O AIBN foi reprecipitado em etanol frio, seco e guardado a baixas temperaturas. A razão molar [CTA]:[iniciador] utilizada foi de 5:1. A síntese se deu num balão de três bocas em atmosfera inerte de gás argônio, acoplado a um condensador, sob banho de glicerina a 70°C e agitação magnética a 500 rpm.

O crescimento do bloco de PS foi acompanhado por GPC, assim quando o polímero chegou a um valor de massa molar média numérica desejável, parou-se a reação. O bloco de PS que foi posteriormente usado como CTA, sendo chamado a partir de agora de macroCTA e, foi purificado duas vezes em metanol (*Sigma Aldrich*), sendo ressolubilizado em tetraidrofurano (THF). A proporção volumétrica da mistura reacional por metanol foi de 1:8. Depois o material foi seco na capela até o excesso de metanol ser evaporado e depois ficou algum tempo na estufa até que a massa não variasse mais. O macroCTA purificado foi caracterizado por GPC, FTIR e RMN ¹H e ¹³C.

Com o mesmo sistema anterior, agora para a confecção de PS-*b*-PtBA, utilizou-se o macroCTA purificado, acrilato de terc-butila (tBA), 98% *Sigma Aldrich*, como monômero e AIBN como iniciador. Diferentemente, esta síntese foi feita em solução com 40 %v. de dioxano (*Sigma Aldrich*). Dada a velocidade de reação, a síntese foi interrompida assim que a viscosidade do meio reacional aumentou a ponto de impossibilitar a rotação do agitador magnético. O copolímero formado foi purificado duas vezes, utilizando uma proporção volumétrica mistura reacional e metanol de 1:7 e gotejando água destilada até que a solução ficasse transparente, não havendo mais precipitado perceptível. Depois o material foi seco inicialmente seco em capela até o excesso de metanol ser evaporado e posteriormente em estufa até que massa permanecesse constante. O copolímero purificado foi caracterizado por GPC, FTIR e RMN ¹H e ¹³C.

Com objetivo de hidrolisar o PS-*b*-PtBA a PS-*b*-PAA, dissolveu-se o material numa proporção 1:10 de copolímero purificado (em massa) em diclorometano (em volume). Adicionou-se então ácido trifluoracético (TFA), 99% *Sigma Aldrich*, numa proporção molar de

1:5 entre o número de mols de ésteres de terc-butila e o TFA. A reação se deu a temperatura ambiente, sob agitação por 20 h em sistema fechado⁵². Após o tempo de reação, o sistema foi aberto até total evaporação do diclorometano, o sistema foi então colocado em banho de água a 75 °C para total evaporação do ácido. O material foi seco na estufa para evaporar o álcool formado na hidrólise. O material obtido foi caracterizado por GPC, FTIR e RMN ¹H e ¹³C.

Os copolímeros foram gerados com o objetivo de se obter materiais com variação sistemática dos blocos, conforma a Tabela 1 abaixo. PS-1 é um macroCTA menor que PS-2, isto é, x é menor que y ($x < y$). Os blocos de PtBA foram planejados para que tivessem tamanhos próximos em ambos copolímeros ($z \approx z^*$).

Tabela 1 – Planejamento para a síntese dos materiais poliméricos, onde $x < y$ e $z \approx z^*$.

Código	Material
PS-1	PS _x
PSPtBA-1	PS _x - <i>b</i> -PtBA _z
PSPAA-1	PS _x - <i>b</i> -PAA _z
PS-2	PS _y
PSPtBA-2	PS _y - <i>b</i> -PtBA _{z*}
PSPAA-2	PS _y - <i>b</i> -PAA _{z*}

Fonte: autoria própria

5.2 Formação de agregados poliméricos

Para a autoagregação destes materiais sintetizados, foi preparada uma solução de 20 mg mL⁻¹ de copolímero em THF. Esta solução foi injetada vagarosamente em água destilada ou solução-tampão fosfato em diferentes pH, sob forte agitação e em temperatura ambiente por 20 min, a fim de obter uma solução de 50, 100 e 200 µg mL⁻¹ de copolímero. Os agregados foram caracterizados por DLS e de seus potenciais zeta. Foi testado também o comportamento das vesículas na presença de nitratos, principalmente o nitrato de prata (AgNO₃).

5.3 Confeção de Nanopartículas

Aos agregados poliméricos, foi adicionado AgNO₃ 0,1 mol L⁻¹, mantendo-se em agitação magnética por 30 min em câmara escura. A quantidade adicionada foi calculada para que se atingisse uma razão molar 1:2 e 1:1,6 de prata em relação a carboxila ([Ag⁺]:[COO⁻]) para o PSPAA-1 e o PSPAA-2, respectivamente. Após a homogeneização, foi adicionado 0,1

mL solução de tetraidroboreto de sódio (NaBH_4) contendo o equivalente à razão mássica de 3:1 ($\text{NaBH}_4:\text{Ag}$), assim manteve-se sob agitação em câmara escura por 4 h. Este protocolo foi adaptado a partir do método utilizado por Lu et al¹¹. Também foram testados a redução química utilizando ácido ascórbico e ácido cítrico. As nanopartículas de prata foram caracterizadas por DLS, medição do potencial zeta, espectrometria UV-Vis e SEM.

Para os testes da atividade antimicrobiana das nanopartículas, foram feitas suspensões mais concentradas, igualmente testadas para que mesmo com o aumento da concentração as características do material se mantivessem.

5.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) e da Concentração Mínima Bactericida (MBC)

Os ensaios para a determinação da concentração mínima das nanopartículas metálicas necessária para inibir o crescimento de bactérias foram feitos de acordo com Wiegand et al⁵³. As espécies de bactérias utilizadas no ensaio em duplicata foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (PY79) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Primeiramente, 10 mL do meio de caldo de Müller-Hinton (MHB) foi inoculado com um pequeno número de bactéria a partir de uma única colônia depositada numa placa de ágar sólido. As bactérias foram incubadas durante a noite a 37 °C e sob agitação de 250 rpm. A suspensão de células foi então diluída 50 vezes no meio MHB e incubada novamente a 37 °C. Alcançando a densidade ótica a 600 nm em aproximadamente 0,4, a suspensão de células foi novamente diluída 250 vezes no meio MHB, resultando numa suspensão de bactérias de aproximadamente 10^6 CFU mL⁻¹. Paralelamente, numa placa de 96 poços de polipropileno com fundo em U, uma diluição (em duas vezes) seriada de duplicatas das nanopartículas no meio MHB foram preparadas com duas vezes mais concentradas em relação ao volume final de nanopartículas, de tal forma que a concentração de prata variasse entre 53 e 0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e num volume de 75 μL . Foram preparados também controles em concentrações equivalentes aos sistemas de nanopartículas das: vesículas poliméricas (sem prata) do PSPAA-1 e do PSPAA-2; nanopartículas de prata geradas sem a presença de agregados poliméricos; e do redutor somente na presença de água. Em seguida, 75 μL da suspensão de células foram adicionados às suspensões de nanopartículas anteriormente preparadas, resultando numa suspensão de bactérias de aproximadamente 5×10^5 CFU mL⁻¹. A suspensão de bactérias adicionada à placa de 96 poços teve sua concentração final checada a partir de uma diluição em 1000 vezes, de aproximadamente de 10^6 para 10^3 CFU mL⁻¹, e assim plaqueando pontos de 10 μL numa placa

de LB-agar sólida que foi incubada a 37 °C por 18 h. O número de colônias de cada ponto foi contado e normalizado para a concentração final de bactérias usada no ensaio. MHB inoculado com 75 µL da suspensão de bactérias foi usado como controle positivo e MHB esterilizado como controle negativo. Após 18 h, o crescimento de bactérias foi checado visualmente para determinação da MIC e as 3 menores concentrações foram plaqueadas a 37 °C durante a noite para determinar a MIC e a MBC. Estas análises foram feitas com auxílio e no Laboratório de Sistema Biomiméticos do Instituto de Química da USP (IQ-USP) seguindo os protocolos de Carretero et al⁵⁴.

5.5 Caracterizações

5.5.1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Os ensaios de GPC foram feitos utilizando um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, com injetor automático (Sil-20A), detector de índice de refração (RID-A) da *Shimadzu*, uma pré-coluna Phenogel 5 µ linear/Mixed e mais duas colunas Phenogel 5 µ 10E6A e 10E4A da marca Phenomenex®. Os padrões utilizados foram de poli(metacrilato de metila) (PMMA). A fase móvel utilizada foi de THF + 0,3% trietilamina (TEA) a uma razão de 0,8000 mL min⁻¹. As medidas foram realizadas no Laboratório de Química de Polímeros do Departamento de Materiais (DEMAR) da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL-USP). Para determinação da cinética do crescimento das cadeias durante a polimerização dos materiais, foi extraída periodicamente uma gota da mistura reacional do balão reator e dissolvido em 2 mL de fase móvel. Os materiais purificados foram dissolvidos na fase móvel obtendo uma solução 4 mg mL⁻¹. Após a preparação das soluções, todas amostras foram filtradas utilizando um filtro de membrana de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofóbico 0,22 µm (Analítica) para assim realizar a análise.

5.5.2 Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Pastilhas de brometo de potássio (KBr) dos materiais purificados foram preparadas no Laboratório de Reciclagem de Polímeros do DEMAR da EEL-USP. As amostras foram analisadas em espectrômetro de infravermelho IR Prestige 21, *Shimadzu*, situado no mesmo laboratório. Correções via *software* foram realizadas para remoção de pico da atmosfera, suavização da curva e ajuste da linha base.

5.5.3 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN - ^1H e ^{13}C)

As amostras foram preparadas na concentração de 5 mg mL^{-1} em clorofórmio deuterado ($\text{CDCl}_3\text{-d}_1$), para o PS e o PS-*b*-PtBA, e dimetil sulfóxido deuterado ($(\text{CD}_3)_2\text{SO-d}_6$), para o PS-*b*-PAA. As análises foram feitas num INOVA 300 MHz pela Central Analítica do Instituto de Química da USP.

5.5.4 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

Tanto para as vesículas preparadas em diferentes condições quanto para as nanopartículas metálicas confeccionadas, os diâmetros hidrodinâmicos, a polidispersividade e a taxa de contagem média foram determinados por DLS, em 5 medidas por análise. O equipamento utilizado foi um *ZetaPlus/BI-PALS* (*Brookhaven Instrument Corp.*) acoplado com um laser interno (660 nm) situado no Laboratório de Química de Polímeros do DEMAR da EEL-USP.

Foram realizadas também análises de DLS, num Zetasizer Nano (Malvern), no Laboratório de Sistemas Biomiméticos do IQ-USP para determinação do *Z-Average*, média numérica e obtenção gráfica dos resultados. No mesmo equipamento, foi possível determinar o potencial zeta das estruturas obtidas em diversas condições.

5.5.5 Espectrometria de UV e Luz Visível (UV-Vis)

Todas as nanopartículas metálicas formadas foram escaneadas de 300 a 800 nm, numa taxa de 600 nm min^{-1} no espectrômetro UV-Vis, em cubeta de quartzo. O equipamento utilizado foi um Thermo Scientific Evolution 201 UV/Vis disponível no Laboratório de Química de Polímeros do DEMAR da EEL-USP.

5.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

Para preparação das amostras para a utilização do SEM, cuidadosamente foi colocada uma gota da suspensão de nanopartículas de prata em cima de uma fita de carbono, evaporando a água a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 h. As análises foram feitas num SEM de bancada, da marca HITACHI, modelo TM3000, disponível no DEMAR da EEL-USP.

Para o preparo das amostras de SEM, acoplado a um FEG, foi similar ao anterior, porém as amostras foram metalizadas com ouro. A análise foi feita no Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), usando um microscópio eletrônico de emissão de campo JEOL JSM-7401F, com um detector de elétrons secundários, sob uma voltagem de aceleração de 5,0 kV. A distância de trabalho de aproximadamente 3,0 nm e uma resolução de 1,5 nm.

5.5.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

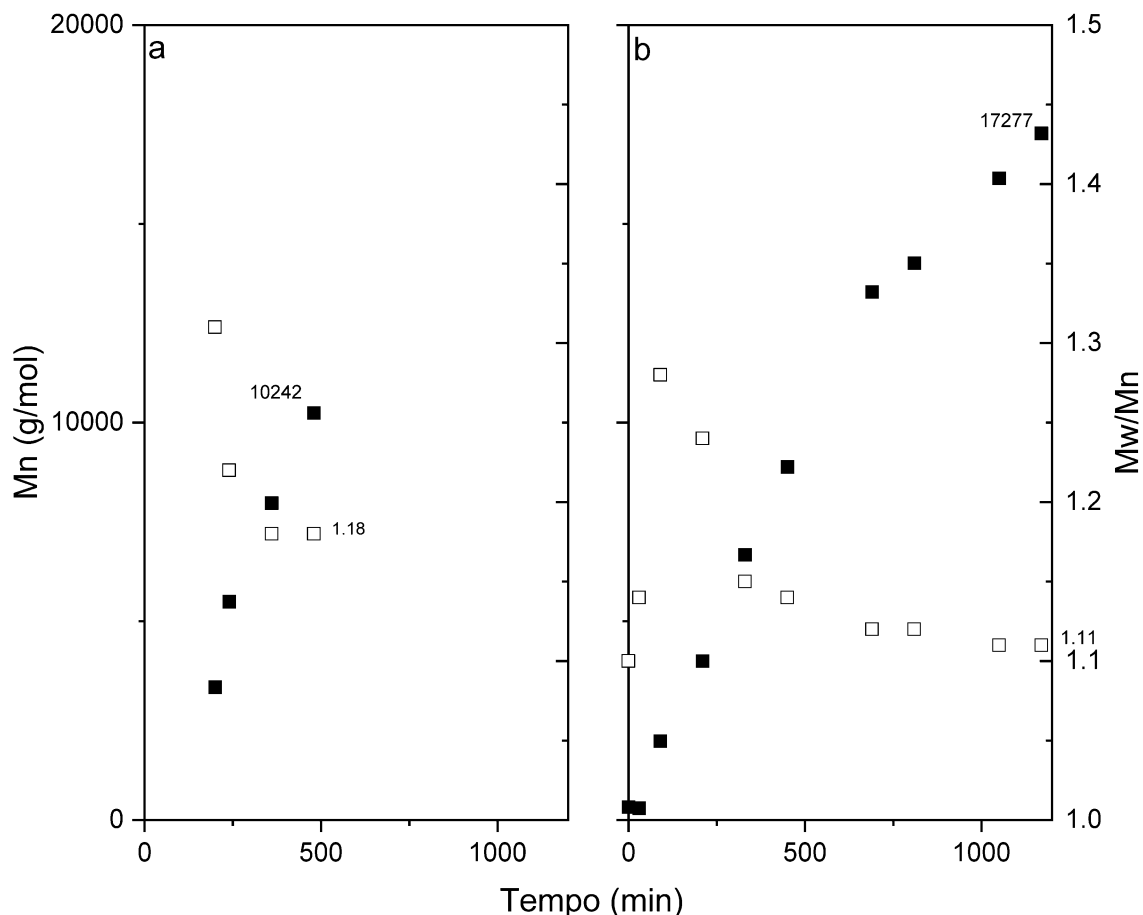
Para o preparo das amostras, as grades foram carregadas negativamente utilizando o equipamento glow discharge (PELCO easiGlow) aplicando os seguintes parâmetros: vácuo de 0,37 mBar, plasma de 15 mA e 25 seg de Glow. As grades foram incubadas com as amostras (5 μ L) por 1 minuto, o excesso de amostra foi retirado cuidadosamente com papel filtro (Qualy Prolab, 501.009), rapidamente lavadas duas vezes com água mQ e secadas com papel filtro (Qualy Prolab, 501.009) e imediatamente cobertas com uma solução de 2% de acetato de uranila (3 μ L), duas vezes por 30 segundos e secadas com papel filtro. O preparo foi feito com o auxílio do Laboratório do Prof. Shaker Chuck Farah do IQ-USP. As análises foram feitas no microscópio disponível na Central Analítica do IQ-USP.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Síntese e caracterização dos materiais

Os materiais propostos (os homopolímeros de PS que foram utilizados como macroCTA e dois copolímeros de PS-b-PtBA) foram sintetizados com sucesso via polimerização RAFT. Pode-se acompanhar o aumento da massa molar média das cadeias conforme a reação se dava a partir do uso do GPC. A Figura 14 abaixo mostra o crescimento das cadeias de PS dos dois macroCTAs sintetizados. Visto que são dois materiais de composição química igual, isto é, a principal diferença entre os materiais é o tamanho do bloco hidrofóbico, adotou-se PS-1 e PS-2 para melhor designar os materiais de menor e maior massa molar média, respectivamente. Conforme estes macroCTAs forem usados para a confecção de outros materiais, a numeração permanecerá a mesma (por exemplo, o PS-1 formará o PSPtBA-1 e então o PSPAA-1). As Tabelas 1 e 2 esclarecem melhor os códigos utilizados para designar cada material sintetizado.

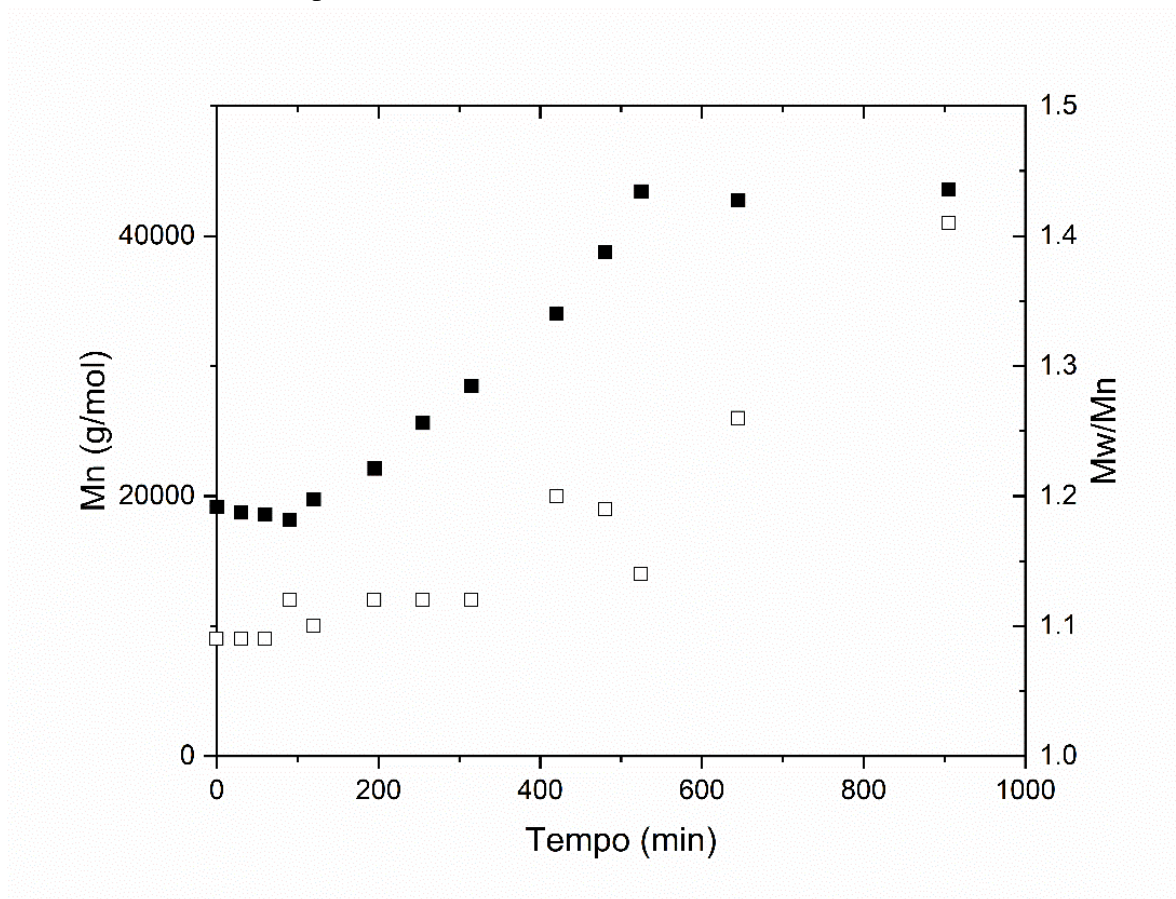
Figura 14 – Monitoramento da polimerização dos macroCTA's de poliestireno (PS) sintetizados via polimerização RAFT: a) PS-1 e b) PS-2. Os símbolos cheios são referentes à massa molar média numérica (Mn) e os vazios referem-se à razão de dispersidade molar (Mw/Mn).



Fonte: autoria própria.

Obteve-se macroCTA's de poliestireno (PS-1 e PS-2) de forma controlada via RAFT, com bons valores de \bar{D} (Mw/Mn) e com valores distintos de massa molar média, oferecendo características diferentes dos materiais a serem utilizados mais à frente (Figura 14 e 15). A partir deles, deu-se andamento ao crescimento dos blocos hidrofílicos (do material final), crescendo um bloco de PtBA primeiramente. O PSPtBA-1 teve uma reação muito rápida, por causa disso não foi possível fazer um acompanhamento do crescimento das cadeias, o cromatograma final se encontra na Figura 16. Portanto, na Figura 15, pode-se acompanhar o crescimento do PSPtBA-2, que foram feitos ajustes no protocolo (aumento da quantidade de solvente).

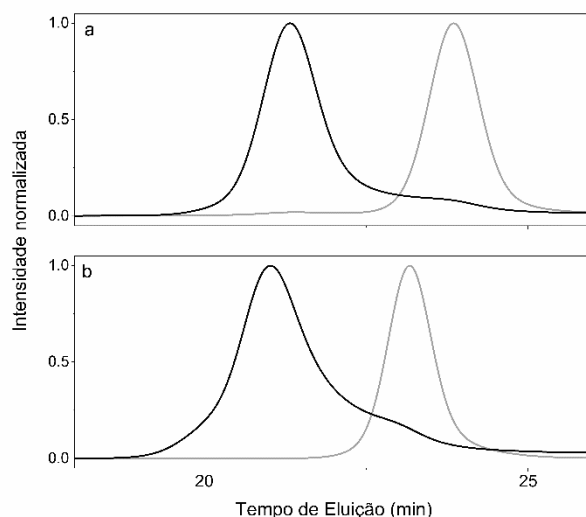
Figura 15 – Monitoramento da massa molar durante a síntese do PSPtBA-2 via polimerização RAFT. Os símbolos cheios são referentes à massa molar média numérica (M_n) e os vazios referem-se à razão de dispersidade molecular (M_w/M_n).



Fonte: autoria própria.

Na Figura 15, há um segundo momento nesta reação, quando a massa molar média alcança um *plateau* e a dispersidade molecular passa a crescer. Este momento se inicia quando houve a adição de mais monômero, o que deve ter levado ao crescimento de novas cadeias, provavelmente de homopolímero de PtBA, alargando a distribuição dos tamanhos de cadeia. Isso acontece devido à alta reatividade dos monômeros acrílicos. Seus radicais formados centrados em carbono secundário apresentam baixa deslocalização eletrônica fazendo com que estes radicais sejam pouco estáveis, isto é, muito reativos. Por isso, é necessária parcimônia ao trabalhar com estes monômeros. Apesar disso, foi possível facilmente purificar este material obtendo um copolímero com baixa dispersidade molecular e com um tamanho de PtBA similar entre os dois polímeros como pode-se conferir posteriormente na Tabela 2. Desta maneira, os cromatogramas da Figura 16 para elucidar como o crescimento ficou claro destes materiais. Além da estreita distribuição de cadeias, que indica que foi possível confeccionar copolímeros dibloco pela polimerização RAFT.

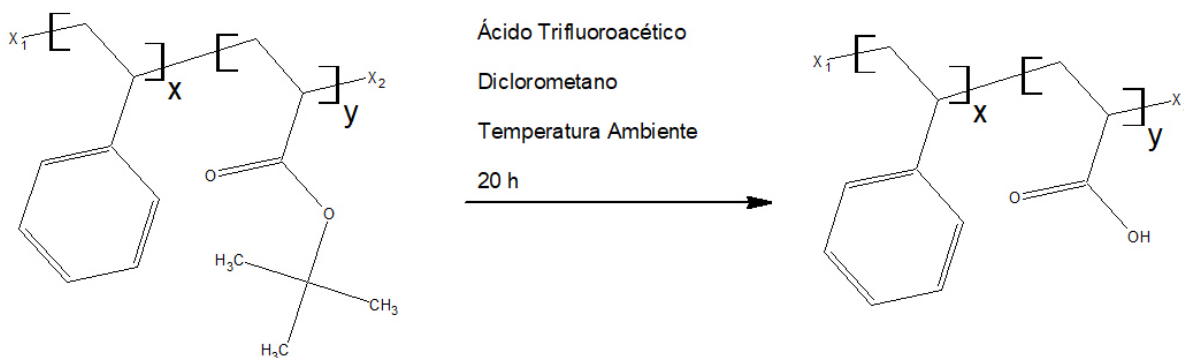
Figura 16 – Cromatogramas dos macroCTAs (cinza) e dos copolímeros (preto): a) PS-1 e PSPtBA-1 e b) PS-2 e PSPtBA-2.



Fonte: autoria própria.

Os copolímeros foram então submetidos a hidrólise a fim de transformar PtBA em PAA, como mostra a Figura 17. Baseado no protocolo utilizado, a reação se mostrou bem-sucedida e permitiu uma fácil purificação do material final, uma vez que o solvente e o ácido utilizados são voláteis, assim como o subproduto formado, terc-butanol.

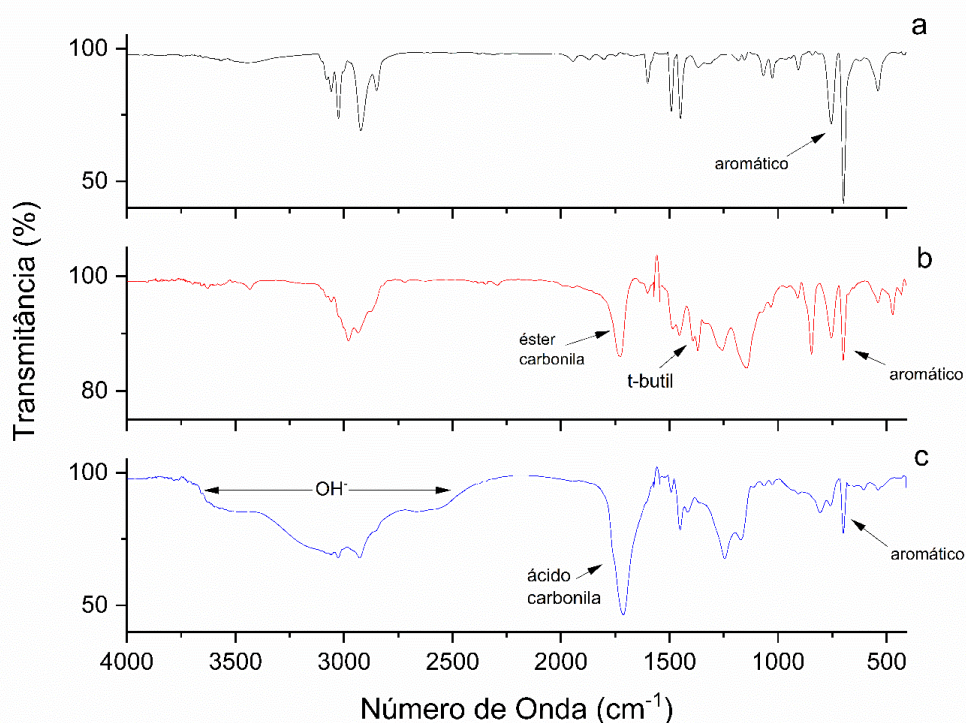
Figura 17 – Esquema da reação de hidrólise para transformação de PtBA em PAA.



Fonte: autoria própria.

As caracterizações por FTIR de todos os materiais sintetizados se encontram nas Figuras 18 (PS-1, PSPtBA-1 e PSPAA-1) e Figuras 18 (PS-2, PSPtBA-2 e PSPAA-2) a seguir. Estas caracterizações têm como fim além de confirmar as estruturas sintetizadas, também determinar se a hidrólise teve êxito em seu propósito, transformar o bloco de PtBA em um hidrofílico de PAA.

Figura 18 – Espectros de FTIR referentes ao PSPAA-1, onde: a) macroCTA (PS); b) PS-b-PtBA e c) PS-b-PAA.



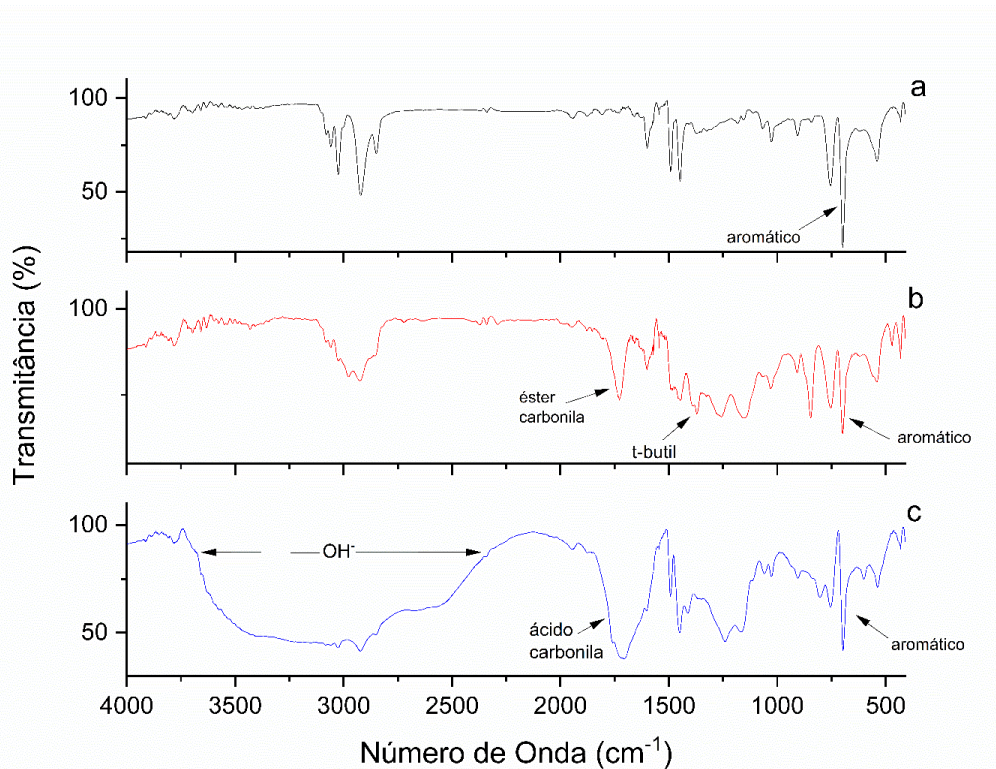
Fonte: autoria própria.

Na Figura 18, referente ao material PSPAA-1, pode-se destacar vários sinais importantes desde o bloco PS de partida (macroCTA) e que notavelmente se encontram posteriormente nos polímeros adiante. Os dois sinais de 695 e 754 cm⁻¹, referentes às deformações de dobramento para fora do plano nas ligações C-H do anel aromático, presente em todos os materiais apesar do sinal de maior número de onda acabar sendo encoberto pela presença de outros picos no material hidrolisado. Já as fracas bandas que aparecem na região entre 1350 e 1000 cm⁻¹ são referentes a deformações das ligações C-H no plano do anel aromático. Na região entre 1515 e 1420 cm⁻¹ aparecem marcantes bandas que são geralmente referentes a estiramentos vibracionais de carbono-carbono, dependendo do substituinte ligado ao anel aromático (cadeia principal no caso). As bandas que aparecem na região entre 3100 e 3000 cm⁻¹, são referentes aos estiramentos das ligações C-H do anel aromático, assim como suas fracas bandas de sobretons que aparecem na região entre 2000 e 1650 cm⁻¹. A banda com sinal em 2920 cm⁻¹ presente posteriormente em todos os espectros é referente aos grupos -CH₂.⁵⁵

O pico da carbonila é de importante confirmação quando se trabalha com ésteres (1724 cm⁻¹) e ácidos carboxílicos (1712 cm⁻¹), presentes no material não hidrolisado e no hidrolisado,

respectivamente. O próprio deslocamento do pico na região da carbonila de 1724 para 1712 cm^{-1} é um ótimo indicativo de uma hidrólise sucedida. Outro fator para analisar a eficácia da hidrólise é a larga banda da hidroxila ($-\text{OH}^-$) bastante presente entre 3650 e 2450 cm^{-1} , além, é claro do desaparecimento da banda do terc-butila (1381 cm^{-1}). Dois estiramentos vibracionais assimétricos presentes em ésteres, diferenciando-os de ácidos, aparecem na região entre 1300 e 1000 cm^{-1} . O primeiro centrado em 1249 cm^{-1} referente à $\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}$ e o segundo em 1153 cm^{-1} referente à $\text{O}-\text{C}-\text{C}$. Com isso, vale ressaltar as bandas esperadas referentes a ácidos carboxílicos, como das deformações por estiramento da $\text{C}-\text{O}$ na região de 1320-1210 cm^{-1} e dobramento da $\text{O}-\text{H}$ na região de 1440-1395 cm^{-1} .⁵⁵

Figura 19 – Espectros de FTIR referentes ao PSPAA-2, onde: a) macroCTA (PS); b) PS-b-PtBA e c) PS-b-PAA.

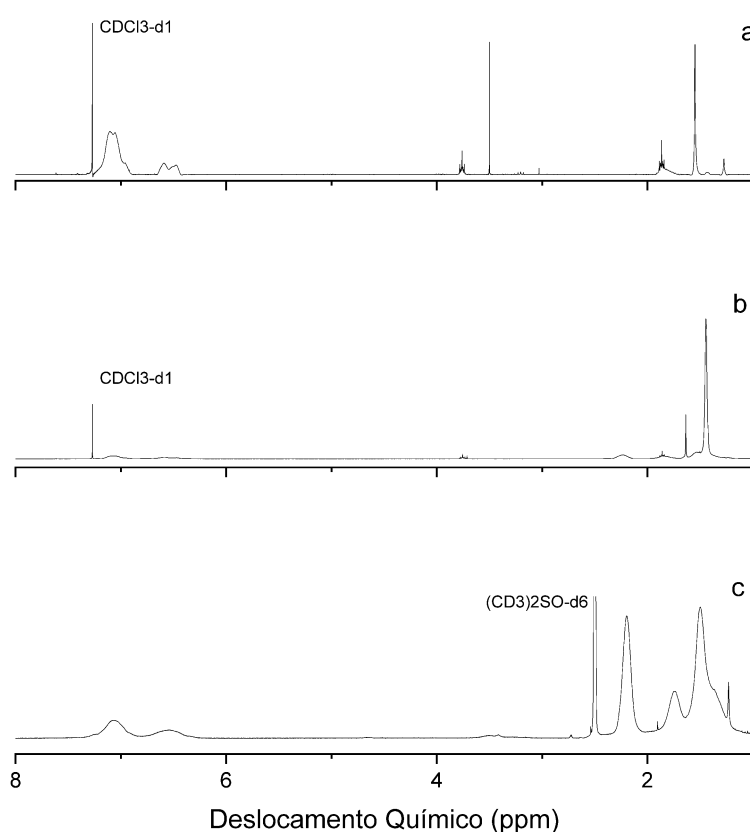


Fonte: autoria própria.

Na Figura 19, referente ao material PSPAA-2, observam-se resultados similares. Todas as bandas têm exatamente os mesmos valores de número de onda das bandas discutidas acima para a Figura 18. Uma ressalva clara, é o espectro FTIR para o material hidrolisado, no qual as bandas da Figura 19 aparentam ter um certo alargamento em relação à Figura 18. Este efeito deve ser devido a umidade, apesar dos mesmos cuidados no preparo terem sido tomados.

RMN de ^1H e ^{13}C possibilitaram confirmação das estruturas esperadas e já indicadas nos estudos de FTIR. Além disso, pode-se confirmar de forma mais precisa a eficácia da hidrólise, dada a maior precisão quantitativa da técnica. Outra informação que foi possível obter foram os números médios de medos de cada bloco (n e m dos copolímeros sintetizados [por exemplo, $(\text{PS})_n\text{-}b\text{-(PAA)}_m$]) e que permitiram a composição da Tabela 2. Os espectros de RMN- ^1H relativos ao material 1 encontram-se na Figura 20.

Figura 20 – Espectros de RMN- ^1H referentes ao PSPAA-1, onde: a) macroCTA (PS); b) PS- b -PtBA e c) PS- b -PAA.

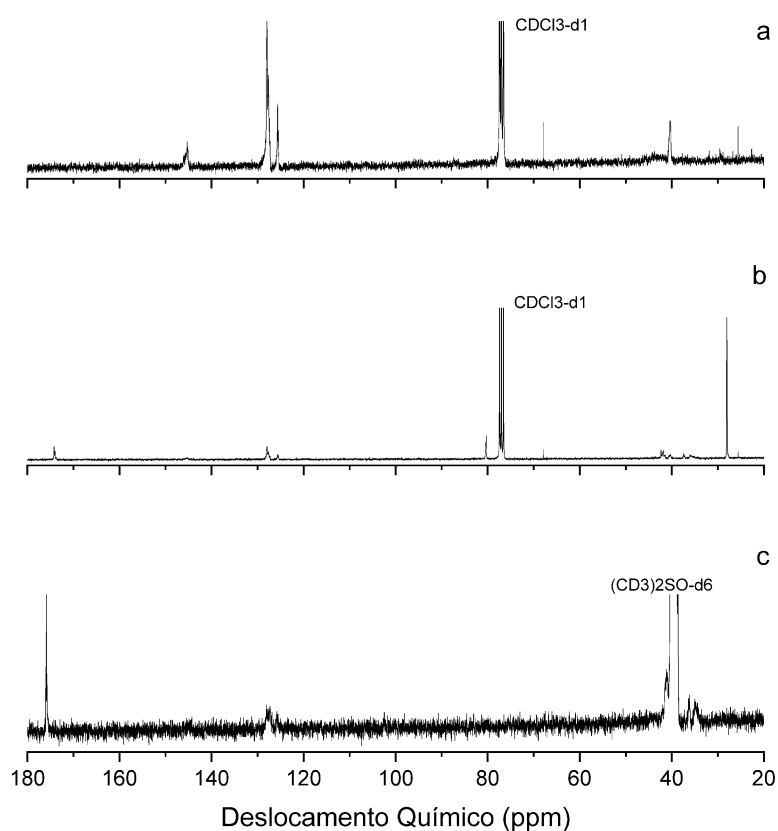


Fonte: autoria própria.

Os sinais característicos dos prótons (C-H) do anel aromático estão presentes no deslocamento químico de 6,3-7,2 ppm. O sinal em 7,09 ppm é referente aos prótons da posição para e meta, e o pico de 6,54 ppm referente aos prótons na posição orto. Mostram-se presentes também os picos referentes aos prótons do grupo -CH (1,87 ppm) e -CH₂ (1,55 ppm).⁵⁵ Assim como na análise de FTIR, é importante ressaltar estes sinais para a identificação nos espectros dos copolímeros e também agora para determinar a proporção entre cadeias, a partir do cálculo da área dos picos do aromático e dos picos de alguma função característica dos outros blocos.

O espectro do copolímero PSPtBA-1 (Figura 20b), o sinal característico esperado era o agudo pico em 1,45 ppm característico dos prótons de -CCH₃ proveniente do t-butil, tanto que outros sinais referentes aos grupos relativos ao bloco de PtBA -CH (2,25 ppm) e CH₂ (1,63 ppm) aparecem bem menos marcados neste espectro⁵⁵. Entretanto, como pode-se ver, foi necessário fazer algumas considerações para o cálculo da área uma vez que os sinais de prótons relativos aos -CH e -CH₂ de ambos blocos apareceram muito próximos a este pico específico. A fim de obter a proporção entre cadeias de PS e PtBA/PAA, foi feito o cálculo da área da metade do pico de t-butila e multiplicou o valor por 2 para comparar os valores de áreas referentes a cada pico, utilizado posteriormente pela Equação 2 e na Tabela 2. Desta maneira, descontando os erros a sobreposição de picos próximos.

Figura 21 – Espectros de RMN-¹³C referentes ao PSPAA-1, onde: a) macroCTA (PS); b) PS-b-PtBA e c) PS-b-PAA.



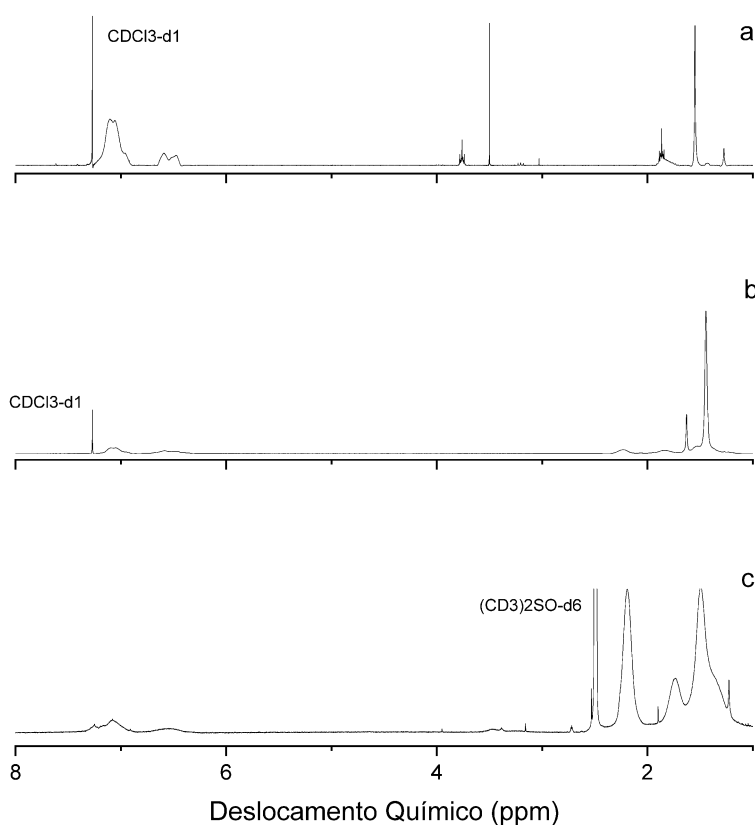
Fonte: autoria própria.

O espectro do material hidrolisado, PSPAA-1, também pode confirmar o êxito do protocolo de hidrólise, uma vez que o pico agudo dos prótons do t-butil (1,45 ppm) não está mais presente. Pode-se verificar também que os sinais relativos aos prótons -CH (2,20 ppm) e -CH₂ (região de 2 a 1 ppm) da cadeia principal estão mais marcantes e largos, provavelmente

devido a menor blindagem química devido a mudança de função química proveniente da hidrólise (éster para ácido carboxílico). Outra evidência para confirmar as estruturas finais após a hidrólise é através do RMN- ^{13}C na Figura 21.

O espectro de carbono mostra os carbonos referentes ao anel aromático estão presentes tanto no homopolímero de PS como nos copolímeros, no qual temos 4 tipos de carbonos: um carbono ligado à cadeia principal (145,3 ppm), dois carbonos na posição orto (128,0 ppm), dois carbonos na posição meta (127,6 ppm) e um carbono na posição para (125,6 ppm). O pico (40,4 ppm) mais largo foi atribuído aos carbonos dos grupos $-\text{CH}$ e $-\text{CH}_2$.⁵⁵ Nota-se que tanto para o espectro de prótons como para de ^{13}C , aparecem sinais não esperados às estruturas químicas formadas dos polímeros. Portanto, estes sinais foram atribuídos aos grupos terminais das cadeias provenientes do CTA.

Figura 22 – Espectros de RMN- ^1H referentes ao PSPAA-2, onde: a) macroCTA (PS); b) PS-b-PtBA e c) PS-b-PAA.

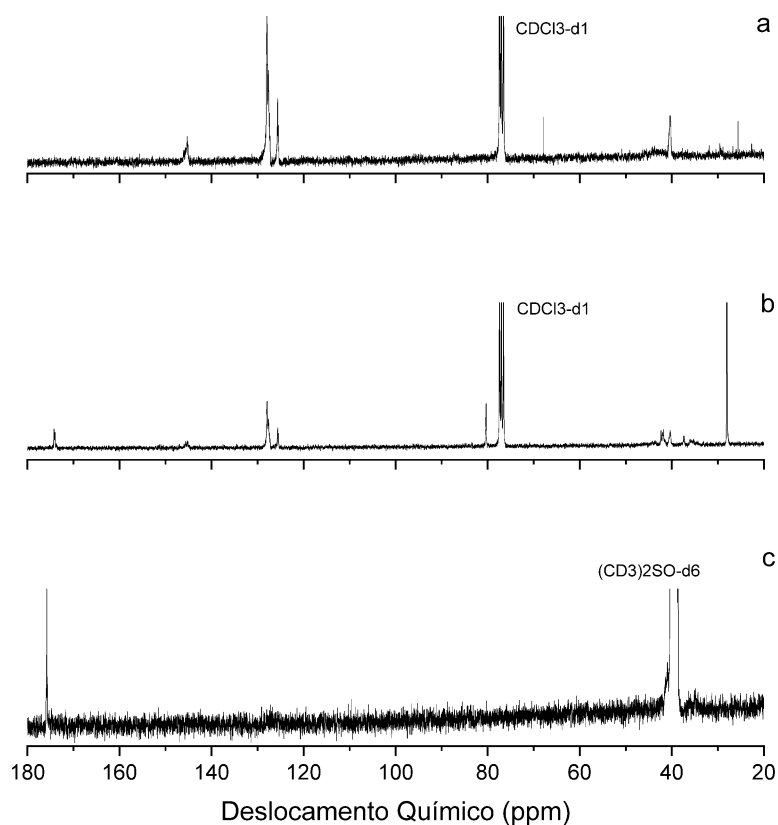


Fonte: autoria própria.

Um sinal importante e esperado, é o sinal da carbonila que aparece para o éster (174 ppm) e para o ácido carboxílico (176 ppm). É esperado que o ácido tivesse um valor um pouco acima do éster devido a menor blindagem neste carbono devido a distribuição eletrônica do

grupo ácido. Dois sinais marcantes para a caracterização do bloco de tBA, são o do carbono quarternário $-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ (80 ppm) e dos carbonos metil ligados a este (28 ppm).⁵⁵ Picos estes que não aparecem para o espectro de PSPAA-1. Confirmando assim, a hidrólise e todos os protocolos utilizados levando em consideração que 100% dos grupos éster foram hidrolisados. Os picos que aparecem em 37,5 e 36,1 ppm referentes aos carbonos dos grupos do bloco de PtBA $-\text{CH}$ e $-\text{CH}_2$ respectivamente. No copolímero hidrolisado, vê-se uma mudança para 36,2 e 35,1 referentes aos mesmos grupos, porém agora ligados a carbonila de um ácido e não mais de um éster. Devido ao uso de outro solvente (DMSO- d_6) para este material os picos referentes a estes grupos do bloco de PS, foram sobrepostos pelo pico do solvente.

Figura 23 – Espectros de RMN- ^{13}C referentes ao PSPAA-2, onde: a) macroCTA (PS); b) PS-b-PtBA e c) PS-b-PAA.



Fonte: autoria própria.

Assim como no FTIR, os sinais para o PSPAA-2 se encontram nos mesmos valores de deslocamento químico do que para os PSPAA-1, porém para o RMN de prótons a relação entre sinais do bloco de PS e do bloco de PtBA ou PAA são diferentes. Obtendo assim dois materiais com distribuição dos blocos diferentes entre si. Os espectros de RMN- ^1H podem ser conferidos na Figura 22 e os de RMN- ^{13}C na Figura 23.

A distribuição entre blocos obtidas pelo cálculo da área de picos relevantes e não comuns relativos a cada bloco do espectro de RMN-¹H, como mostra a Equação 2.

$$\frac{5m}{9n} = \frac{A_{\text{pico-PS}}}{A_{\text{pico-PtBA}}} \quad (2)$$

Onde m e n são os números das unidades repetitivas do bloco de PS e PtBA, respectivamente, $A_{\text{pico-PS}}$ é a área referente aos cinco hidrogênios do anel aromático e $A_{\text{pico-PtBA}}$ são a área referente aos nove hidrogênios das metilas da terc-butila. As áreas foram calculadas através do programa *ACD/NMR Processor*®.

Após as caracterizações destes materiais, pôde-se compilar todas as informações importantes na Tabela 2, como a massa molar média (Mn), as dispersidades moleculares obtidas por GPC e o código referente a cada material para melhor designação e discussão dos resultados.

Tabela 2 – Materiais sintetizados e caracterizados.

Código	Material ^a	Mn [g mol ⁻¹] ^b	Đ ^b
PS-1	PS ₉₈ (macroCTA)	10236	1,22
PSPtBA-1	PS _{98-b} -PtBA ₃₄₃	49959	1,20
PSPAA-1	PS _{98-b} -PAA ₃₄₃	34953 ^c	1,20
PS-2	PS ₁₈₃ (macroCTA)	19151	1,09
PSPtBA-2	PS _{183-b} -PtBA ₃₄₇	55315	1,23
PSPAA-2	PS _{183-b} -PAA ₃₄₇	44152 ^c	1,23

Fonte: autoria própria

a Razão m/n (PS (m) e PtBA/PAA (n)) determinada pela área dos picos de RMN-¹H e pela massa total calculado por GPC

b Dados obtidos por GPC

c Determinado a partir da soma de Mn do macroCTA com o produto de unidade repetitiva de PAA pela massa molar do ácido acrílico

6.2 Formação de vesículas poliméricas

Para testar se estes materiais formavam algum tipo de agregado em solução aquosa pelo método de injeção de solução polimérica em meio aquoso, primeiramente, foram realizados experimentos de DLS em soluções-tampão sob diferentes pHs como mostram as Tabelas 3 e 4. Os resultados obtidos em pH 10, provavelmente não levaram a formação de

vesículas, mas sim algum outro tipo de agregado, visto que alguns dias depois o tamanho está completamente diferente. Isto pode se dar devido ao maior grau de ionização neste pH.

Tabela 3 – Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade obtidos por DLS dos agregados autoformados de PSPAA-1 em pH 7,0 repetitivamente.

Experimentos	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Polidispersidade
1	170,1 ± 10,7	0,340 ± 0,017
1*	127,5 ± 9,9	0,349 ± 0,008
2	315,3 ± 11,3	0,380 ± 0,021
2*	392,5 ± 20,2	0,385 ± 0,013
3	513,1 ± 31,4	0,388 ± 0,029
3*	445,8 ± 18,3	0,363 ± 0,011
4	163,2 ± 6,9	0,353 ± 0,015
4*	378,0 ± 22,2	0,365 ± 0,022
5	521,4 ± 62,9	0,496 ± 0,008
5*	470,1 ± 25,6	0,380 ± 0,012

Fonte: autoria própria

* uma semana em temperatura ambiente

Tabela 4 – Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade obtidos por DLS de agregados autoformados de PSPAA-1 em pH 6,3 repetitivamente.

Experimentos	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Polidispersidade
1	410,9 ± 50,7	0,372 ± 0,032
1*	511,1 ± 41,2	0,360 ± 0,032
2	202,4 ± 37,0	0,320 ± 0,022
2*	283,4 ± 24,7	0,292 ± 0,019
3	192,4 ± 23,0	0,342 ± 0,006
3*	437,4 ± 31,1	0,358 ± 0,019
4	568,1 ± 90,5	0,385 ± 0,016

(continua)

4*

541,1 ± 24,5

0,399 ± 0,022

Fonte: autoria própria

*Um mês à temperatura ambiente

(conclusão)

Nas Tabelas 3 e 4, tem-se algo semelhante com o que ocorre a pH 10, porém mais estável e mais típico de agregados autoformados. Além do pH, outro efeito que pode interferir nos tamanhos hidrodinâmicos observados é o efeito das interações iônicas, que são fortemente moduladas pela presença de sais em solução (altas forças iônicas diminuem a intensidade dessas interações). Por isso, após os testes feitos em soluções-tampão em diferentes pH, testou-se estas estruturas também formavam em água destilada, assim como a Tabela 5 abaixo mostra.

Tabela 5 – Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade obtidos por DLS de agregados autoformados de PSPAA-1 em água a 0,05 mg mL⁻¹.

Amostra	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Polidispersidade
1	114,2 ± 0,6	0,279 ± 0,007
1*	230,3 ± 6,6	0,303 ± 0,012
2	107,8 ± 6,0	0,271 ± 0,004
2*	149,9 ± 3,0	0,297 ± 0,010
3	189,8 ± 3,8	0,310 ± 0,006
0,25 mg mL ⁻¹	445,0 ± 12,3	0,257 ± 0,023

Fonte: autoria própria

* Após uma semana a temperatura ambiente

As amostras após a autoformação em água destilada apresentaram pH na faixa de 4,7-4,9. Provavelmente isso se deu devido à desprotonação do ácido acrílico na formação em água. Na Tabela 5, é possível ver que os diâmetros hidrodinâmicos dos agregados são mais homogêneos, provavelmente devido a menor interação iônica, isto é, na presença do tampão as interações dos íons fosfato podem ter algum tipo de interação com os grupos carboxilas, podendo ter alguma correlação com a homogeneidade dos sistemas. Outro teste feito foi de aumentar a concentração final dos sistemas para que assim tivesse mais prata no sistema final, os resultados estão na Tabela 6 abaixo. Por conta desses pontos, todos os agregados feitos a partir deste ponto foram formados em água destilada a 0,10 mg mL⁻¹.

Tabela 6 – Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade obtidos por DLS de agregados autoformados de PSPAA-1 em água a 0,10 mg mL⁻¹.

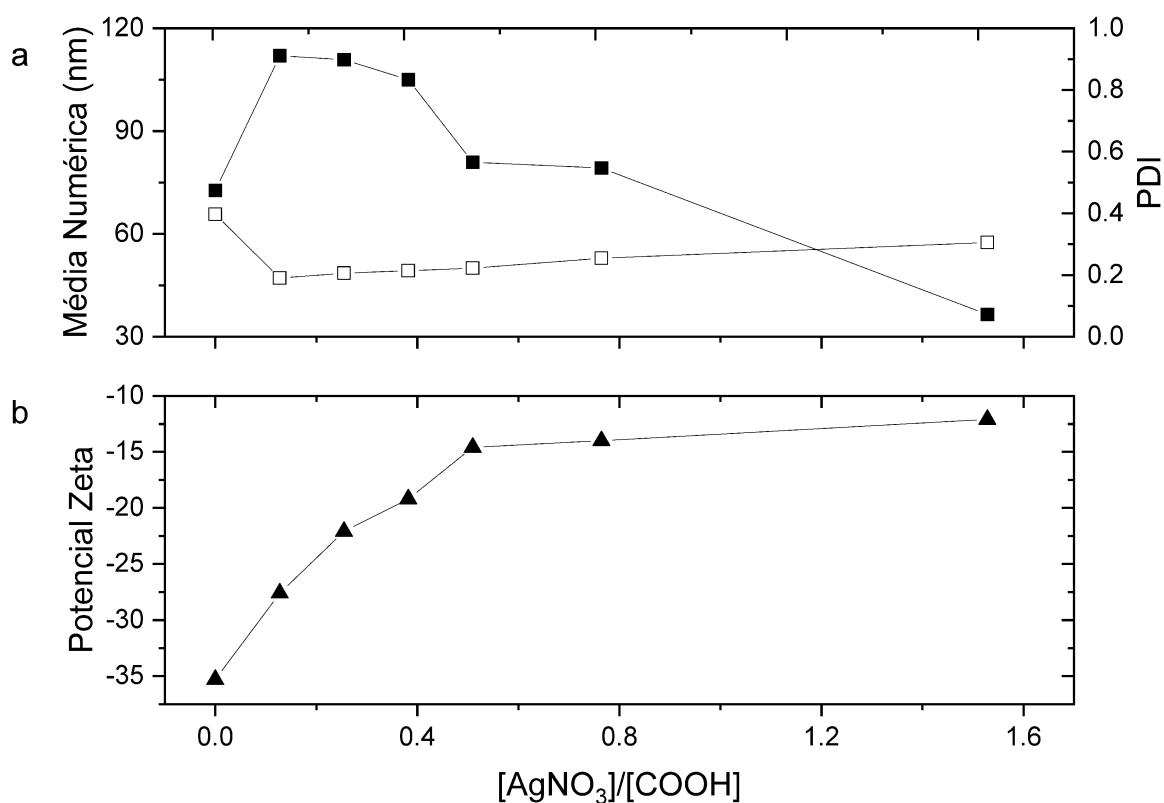
Experimentos	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)		Polidispersidade	
	t = 0	1 semana depois	t = 0	1 semana depois
1	206,5 ± 25,4	217,6 ± 8,5	0,279 ± 0,036	0,306 ± 0,012
2	159,6 ± 7,1	262,2 ± 12,9	0,306 ± 0,020	0,318 ± 0,016
3	355,2 ± 22,8	574,8 ± 16,7	0,362 ± 0,012	0,354 ± 0,013
4	407,0 ± 84,4	665,7 ± 57,3	0,597 ± 0,038	0,455 ± 0,021
5	187,7 ± 43,3	687,6 ± 59,3	0,654 ± 0,027	0,398 ± 0,011

Fonte: autoria própria

Estes dados sugerem a formação de vesículas poliméricas (*polymersomes*) devido aos diâmetros hidrodinâmicos obtidos (>50 nm) e aspecto da curva de correlação obtida por DLS. Uma vez que as interações iônicas com as vesículas poliméricas se mostraram importantes, fez-se testes de estabilidade, desde tempos curtos (minutos) até tempos longos (dias). Outro teste realizado foi do comportamento dos agregados na presença de íons de prata e nitrato. Para isso, foram feitas “titulações” utilizando-se uma solução de AgNO₃ para acompanhar a mudança de potencial zeta conforme foram feitas as adições da solução.

Na Figura 24, é possível observar que conforme são feitas adições da solução de AgNO₃ 0,1 mol L⁻¹, tem-se primeiro um aumento do tamanho médio numérico dos agregados de PSPAA-1 e em seguida o tamanho diminui. O tamanho diminui para valores muito baixos (36,5 nm) em maiores concentrações de AgNO₃, o que indica uma desestruturação das vesículas para outro tipo de agregado qualquer. Isso deve se dar, provavelmente, à ligação dos grupos -COO⁻ do bloco hidrofílico aos cátions Ag⁺, o que é corroborado pela queda no potencial zeta dos agregados. A abrupta redução do PDI com pouca adição da solução salina pode indicar uma desagregação das vesículas. O sutil retorno de crescimento do PDI pode ser devido à agregação após a desestruturação. Na Figura 24b, observa-se que a adição do cátion aumenta o potencial zeta dos agregados, indicando uma captação do cátion pelas carboxilas desprotonadas.

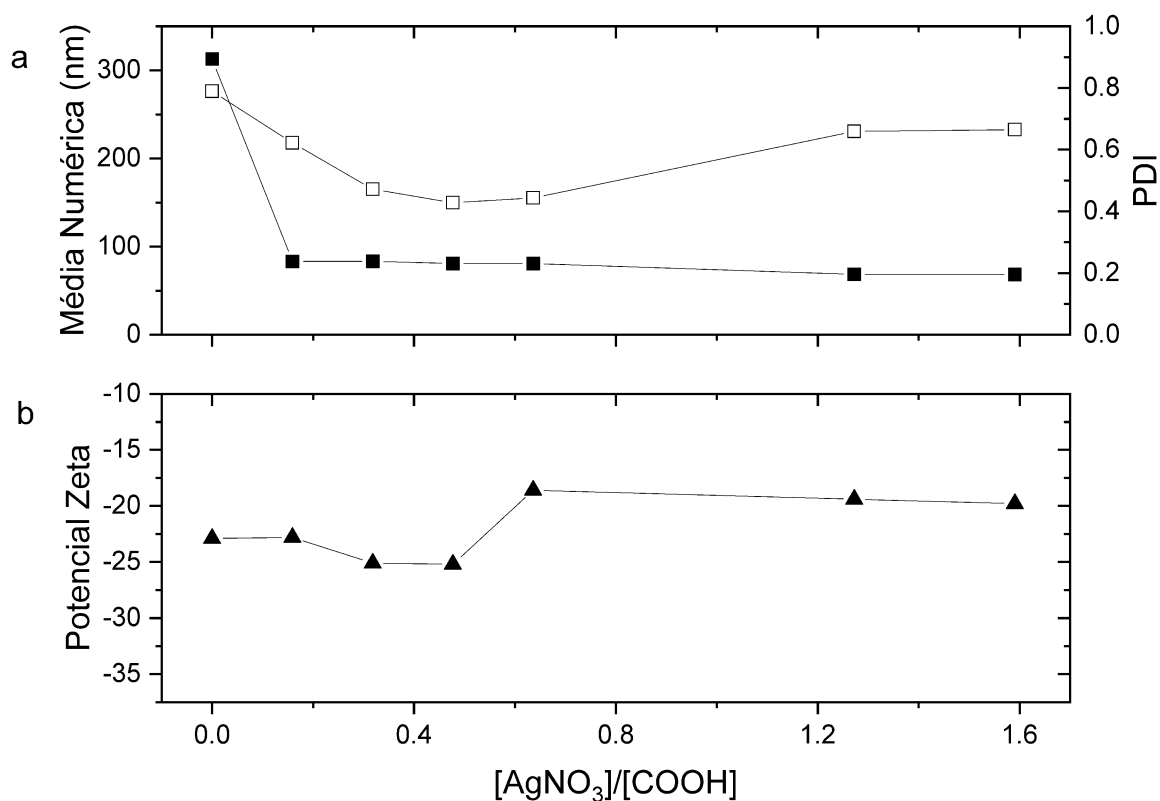
Figura 24 – Titulação feita em DLS das vesículas poliméricas (PSPAA-1) com adição de uma solução de AgNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, onde tem-se o comportamento de: (a) tamanho (quadrados cheios) e dispersão (quadrados vazios); e (b) do potencial zeta (triângulos).



Fonte: autoria própria.

Na Figura 25, podemos ver o mesmo experimento feito para o PSPAA-2. Apesar dos tamanhos e PDI muito mais elevados, provavelmente devido à maior porção apolar do material (acarretando numa menor estabilidade no meio aquoso), vemos o mesmo comportamento em relação a adição da solução salina, onde deve estar acontecendo o mesmo fenômeno de desestruturação das vesículas poliméricas. O segundo polímero apresentou uma grande diferença na curva de potencial zeta, isso pode ser devido a menor estabilidade destes agregados de maior porção hidrofóbica, levando a precipitações no meio. Desta forma, tendo menos grupos $-\text{COO}^-$ disponíveis no meio, levando a o maior potencial zeta apresentado. Todavia, na razão $[\text{Ag}^+]/[\text{COO}^-]$ utilizada para redução dos agregados, 0,51 para o PSPAA-1 e 0,64 para o PSPAA-2, os materiais apresentaram tamanhos médios numéricos muito próximos (81 nm). O potencial zeta dos dois sistemas nestas condições também não foram tão diferentes, -14,6 mV para o PSPAA-1 e -18,6 mV para o PSPAA-2. A diferença maior entre os dois materiais é que o segundo material apresenta um PDI bem mais elevado que o primeiro.

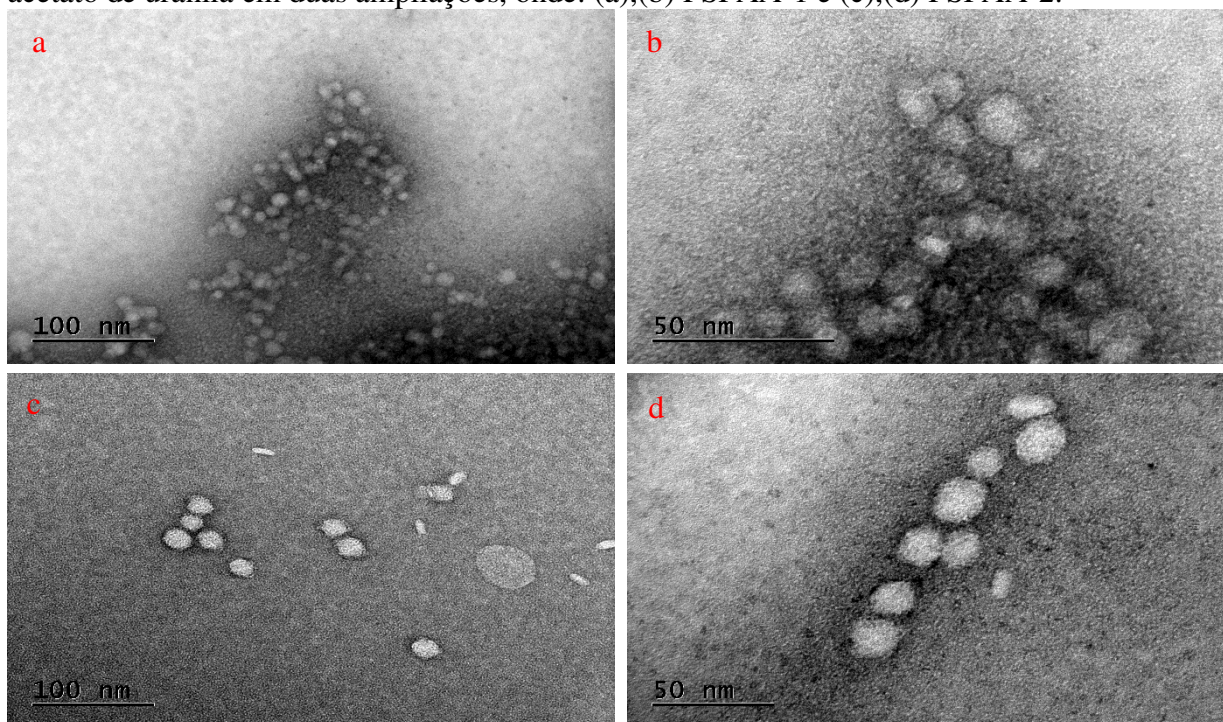
Figura 25 – Titulação feita em DLS das vesículas poliméricas (PSPAA-2) com adição de uma solução de AgNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, onde tem-se o comportamento de: (a) tamanho (quadrados cheios) e dispersão (quadrados vazios); e (b) do potencial zeta (triângulos).



Fonte: autoria própria.

As micrografias obtidas por TEM, mostradas a seguir na Figura 26, mostram que os agregados de ambos polímeros, PSPAA-1 e PSPAA-2, são mais condizentes com tamanhos médios numéricos do DLS, por apresentarem alta agregação. Outro resultado notável é que os tamanhos se mostraram muito menores quando obtidos das micrografias TEM e comparados com o DLS. Como pode-se ver no experimento de titulação, a ligação dos cátions as carboxilas levam a pequenos tamanhos, desestruturando as vesículas. Portanto, dado o protocolo utilizado e que a uranila (UO_2) pode-se ligar a até duas carboxilas, provavelmente o que se vê nas micrografias são agregados poliméricos (de tamanhos entre 10 e 30 nm) que não vesículas, para ambos os materiais. Vale ressaltar novamente a menor estabilidade do PSPAA-2, como pode-se ver em suas micrografias, temos dois tipos de partícula, uma sombreada e outra não. Foi inferido que as partículas sombreadas eram vesículas que carregadas com UO_2 desestruturaram-se e formando outro tipo de agregado menor. Já as partículas não sombreadas nas micrografias (Figura 26c e 26d), podem ser ao polímero que precipitou em solução aquosa e, portanto, não interagiu de mesma maneira com uranila.

Figura 26 – Micrografia TEM dos agregados dos polímeros sintetizados com contraste de acetato de uranila em duas ampliações, onde: (a),(b) PSPAA-1 e (c),(d) PSPAA-2.



Fonte: autoria própria.

Apesar de ser possível obter informações relevantes das micrografias, não foi possível fazer uma comparação de tamanho efetiva dos valores obtidos por DLS e através da TEM, já que não estavam mais sob as mesmas condições (agregados dispersos em água x agregados ligados à uranila).

6.3 Confeção de nanopartículas metálicas

Com o protocolo da formação de vesículas poliméricas bem estabelecido, pôde-se dar início aos testes com a redução química do AgNO_3 utilizando o NaBH_4 , ácido ascórbico e o ácido cítrico. A Tabela 7 compara os diâmetros obtidos com cada redutor e também o tamanho na presença ou não dos agregados poliméricos como estabilizadores.

As nanopartículas confeccionadas a partir dos agregados autoformados pelo PSPAA-1, apresentam valores de diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade consistentes com as referências já citadas nessa dissertação. Isto indica que as vesículas poliméricas além de complexar e ancorar as nanopartículas de prata, permitem uma formação mais homogênea de todas as partículas, devido a formação em menor concavidade (vesículas). Além disso, retarda em muito a aglomeração das partículas e crescimentos posteriores indesejáveis (como um mecanismo similar ao engrossamento de Ostwald), visto que estes sistemas são estáveis por

meses e sem precipitação visível (diferente da situação sem polímero, que precipita em poucos dias).

Tabela 7 – Diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade obtidos por DLS de agregados autoformados de PSPAA-1 em água a $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$.

Amostra	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	Polidispersidade	Avg. Count Rate (kcps)
Vesícula sem Ag	$258,5 \pm 36,0$	$0,395 \pm 0,027$	11,0
AgNP 1:20 em água (com polímero)	$55,2 \pm 0,6$	$0,325 \pm 0,006$	396,7
Ag 1:50 em água (sem polímero)	$116,1 \pm 1,5$	$0,329 \pm 0,006$	965,5
Ag + ác. Ascórbico 1:30 em água (sem polímero)	$99,4 \pm 0,7$	$0,237 \pm 0,020$	575,2
Ag + ác. Cítrico (sem polímero)	$194,1 \pm 0,9$	$0,247 \pm 0,006$	68,2

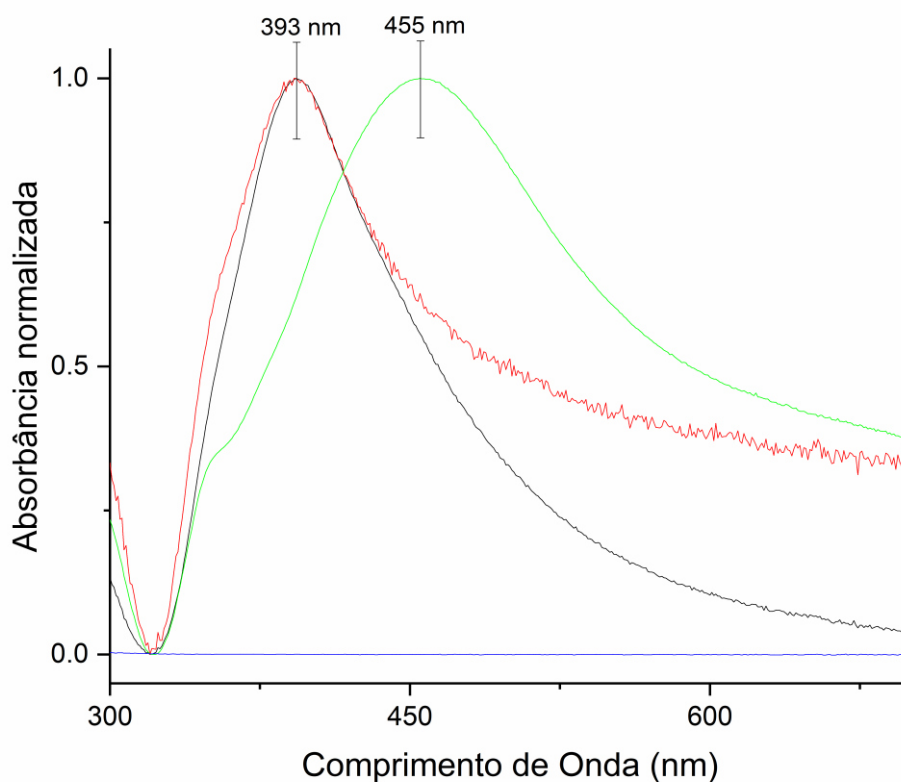
Fonte: autoria própria.

Uma segunda análise comparando os redutores, ácido ascórbico e NaBH_4 , mostrou que, na ausência de polímero, formam-se partículas de prata de tamanhos homogêneos com a diferença que a taxa de contagem média do ácido ascórbico é bem menor (indicando um menor número de partículas). Outro fator é que grandes partículas foram formadas, eliminadas (eletronicamente) via a função *cut-off* do software. Então, pela baixa velocidade de reação, este redutor propiciou um efeito de crescimento das partículas. O ácido cítrico é bastante conhecido por formar complexos com os cátions de prata, o que pode propiciar esse crescimento. Para melhor discutir estas hipóteses, é necessário analisar o espectro da Figura 27.

Na Figura 27, além do que já foi discutido sobre o ácido cítrico no parágrafo anterior, é notável a diferença entre os sistemas com e sem polímero. Apesar do comprimento de onda máximo (393 nm) ser o mesmo, com o polímero a curva é mais “lisa”, possivelmente devido a maior homogeneidade do sistema. Visto que, sem polímero, as partículas se agregam e podem

interagir com o laser passante de formas diferentes, causando ruído. O ácido ascórbico, provavelmente por seguir mecanismos um pouco diferentes para a redução dos cátions de prata e também formar algum tipo de complexo, obteve um pico máximo de absorbância a um valor bastante distinto do NaBH_4 , 455 nm.

Figura 27 – Espectrofotometria UV-Vis de nanopartículas de prata com: agregados poliméricos (preto); sem adição de polímero (vermelho); e sem polímero reduzido por Ácido Ascórbico (verde) e Ácido Cítrico (azul).

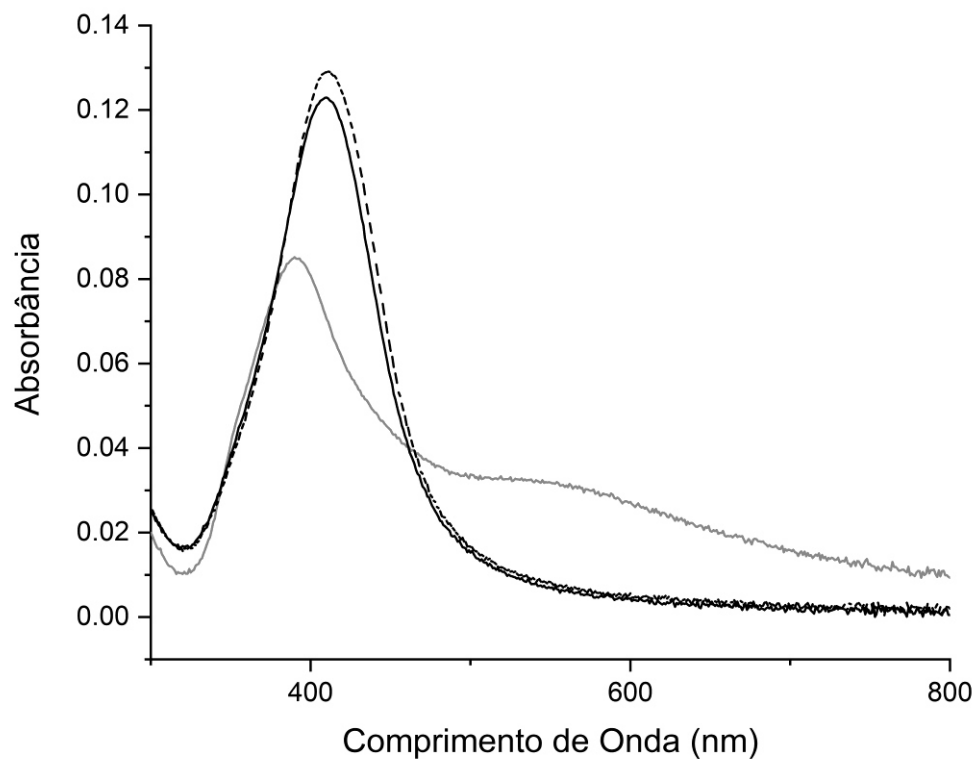


Fonte: autoria própria.

Na Figura 28, tem-se um comparativo entre a absorbância das nanopartículas geradas a partir das vesículas poliméricas do PSPAA-1 (em linha preta sólida) e do PSPAA-2 (em linha preta tracejada) e de nanopartículas geradas sem presença dos copolímeros (em linha cinza) com os protocolos devidamente estabelecidos (agregados poliméricos em água a $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$ e posterior confecção das nanopartículas de prata pela redução do NaBH_4). Cada material gerado apresenta diferentes valores da frequência de ressonância plasmônica, as nanopartículas sem a presença dos copolímeros apresentam o pico a 390 nm, já as nanopartículas geradas a partir do PSPAA-1 e PSPAA-2 apresentam picos a 409 e 410 nm, respectivamente. Além disso, na presença de polímeros, o perfil do espectro é muito mais estreito e possui valor de

absorbância maior, indicando uma maior uniformidade de morfologia e menores tamanhos das partículas, como prevê a teoria de Ressonância Plasmônica de Superfície.⁵⁶

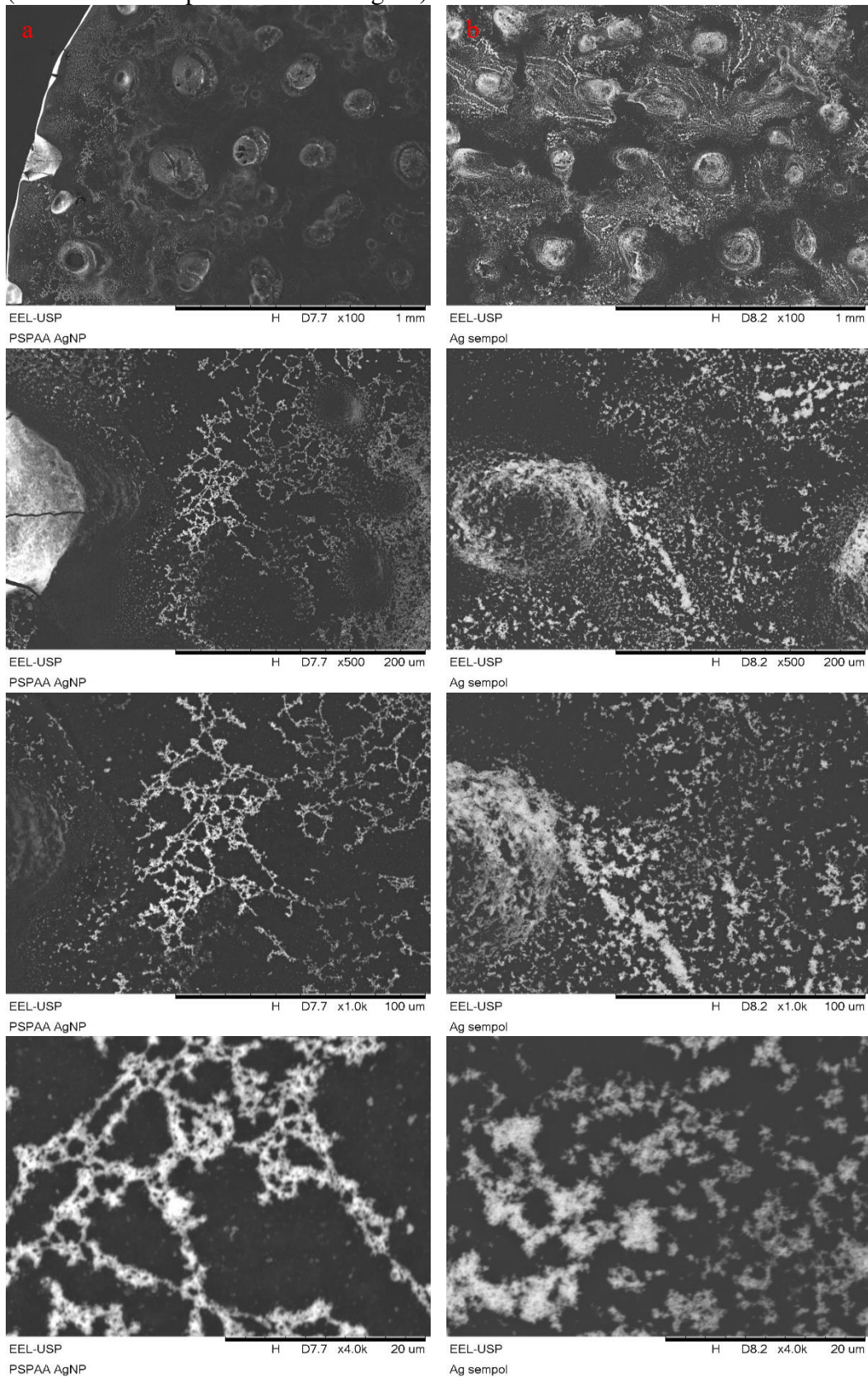
Figura 28 – Espectroscopia UV-Vis das nanopartículas de prata sem polímero (cinza), com o PSPAA-1 (preto, sólido) e com o PSPAA-2 (preto, tracejado).



Fonte: autoria própria.

Para comparar a morfologia das nanopartículas de prata, com e sem polímero (PSPAA-1), foram feitas micrografias de SEM a partir de uma gota seca dos sistemas, como mostra a Figura 29.

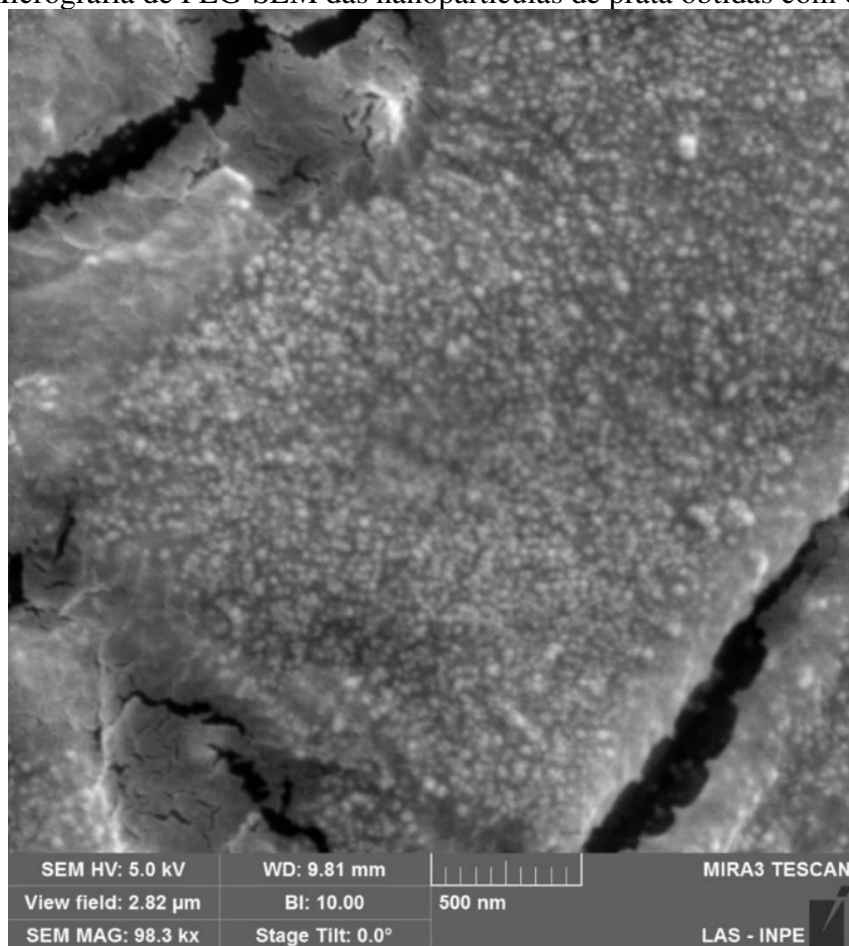
Figura 29 – Micrografia SEM comparando de gotas secas de nanopartículas de prata a partir do PSPAA-1 com (a) e sem (b) agregados poliméricos em aumentos de 100x, 500x, 1000x e 4000x (as escalas estão presentes nas imagens).



Fonte: autoria própria.

Na Figura 29 é possível ver diferentes padrões das nanopartículas de prata, com ou sem polímero, ao secar uma gota. Enquanto na Figura 29b as NPs fixam-se aleatoriamente ao substrato, na Figura 29a pode-se ver um certo alinhamento, o que indica a complexação e ancoragem das NPs ao polímero quando o sistema é seco. A micrografia de FEG-SEM pode ser vista na Figura 30 em maior ampliação.

Figura 30 – Micrografia de FEG-SEM das nanopartículas de prata obtidas com o PSPAA-1.



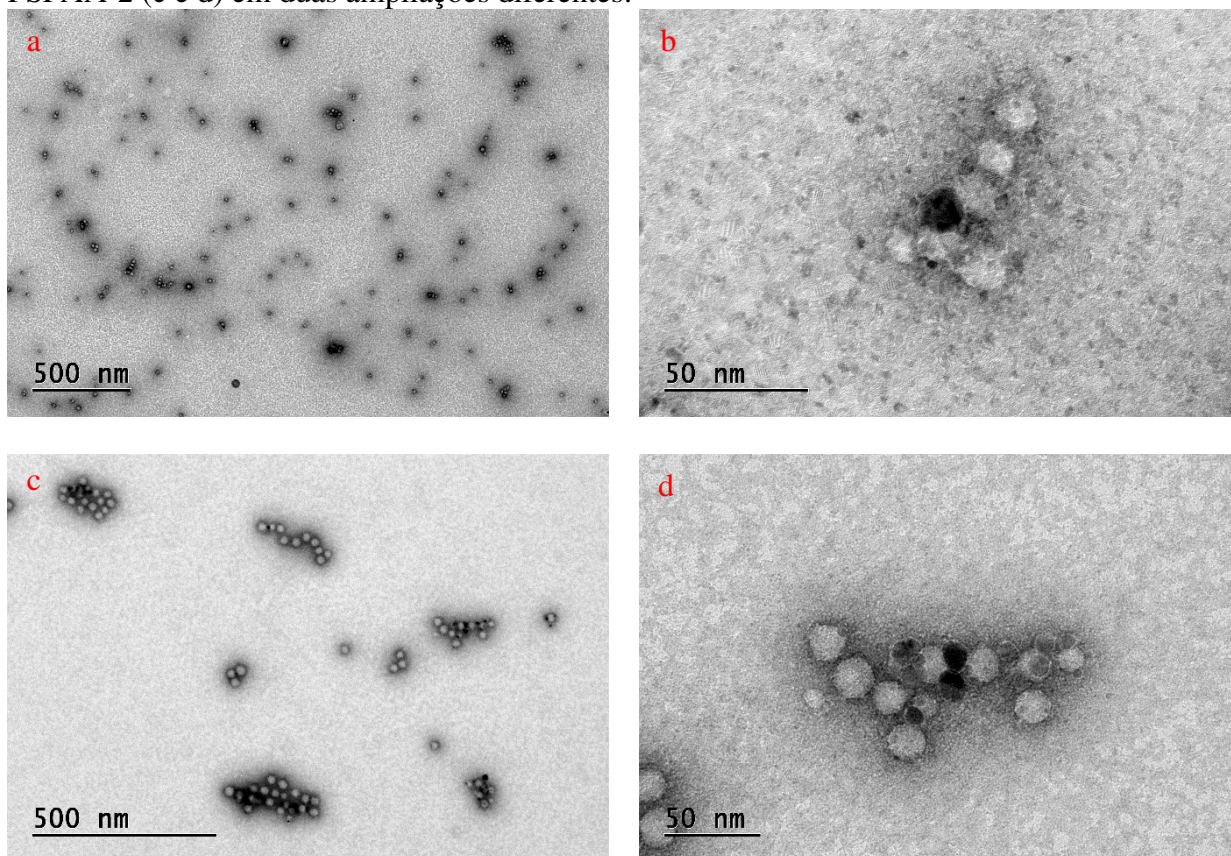
Fonte: autoria própria.

A Figura 30 mostra nanopartículas de prata, como esperado, esferoidais. Esta característica permite uma maior área específica de superfície que aumenta a atividade inibitória e bactericida. Importante também ressaltar, novamente, que o uso de templates vesiculares é preferível do que templates micelares devido a habilidade de formar nanopartículas esferoides, como discutido na Figura 8 e por Lu et al¹¹.

As micrografias de TEM das nanopartículas também mostram a formação de esferóides e devido à preparação para esta análise é possível ver que as amostras se apresentam dispersas, com as nanopartículas feitas a partir do PSPAA-1 (Figura 31a) bem mais dispersas,

talvez devido à menor porção hidrofóbica (menor estabilidade dos agregados poliméricos e/ou maior aglomeração desta porção entre as nanopartículas, vide Figura 31c).

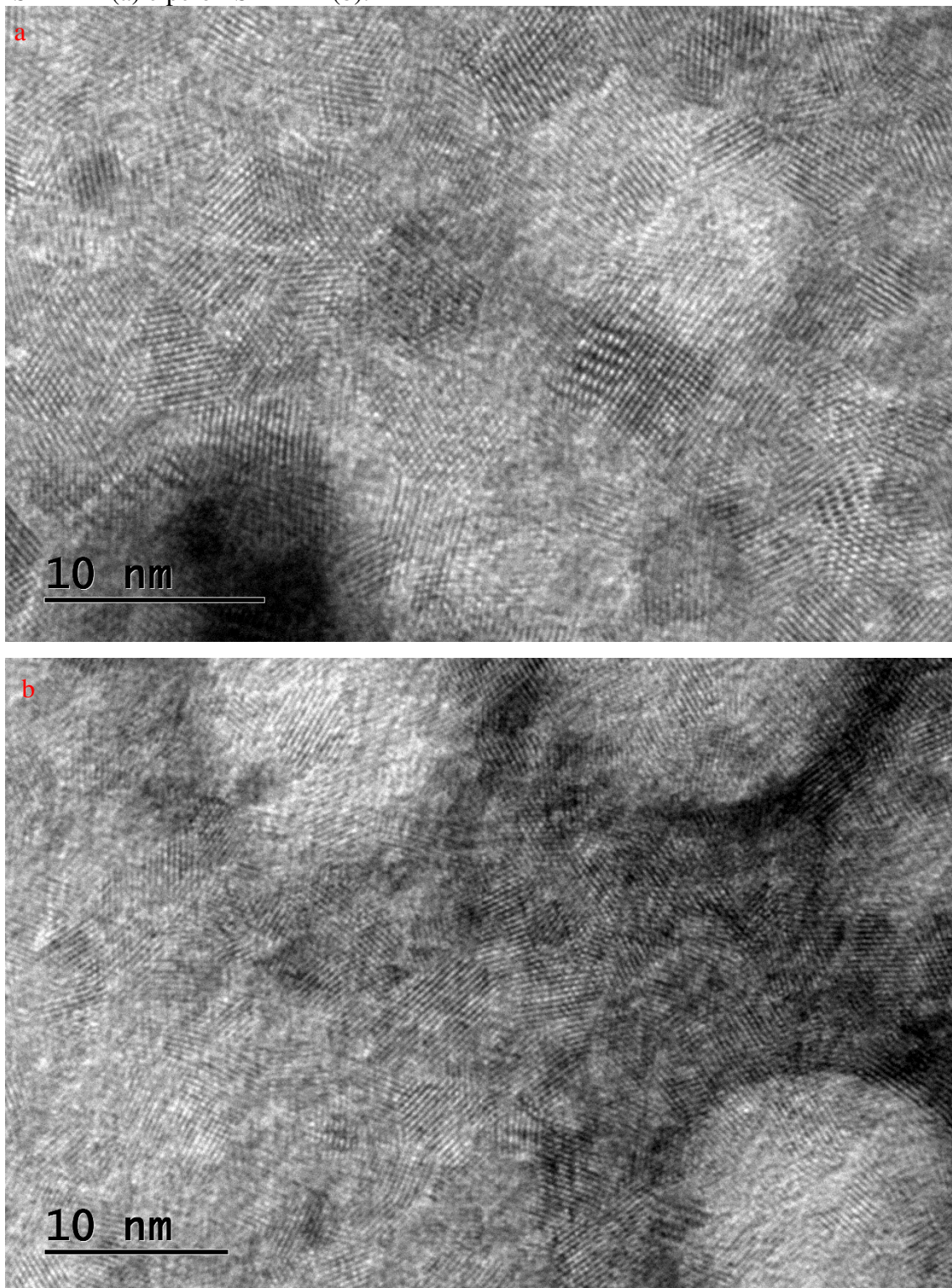
Figura 31 – Micrografia TEM de nanopartículas feitas utilizando o PSPAA-1 (a e b) e o PSPAA-2 (c e d) em duas ampliações diferentes.



Fonte: autoria própria.

O sombreamento presente ao redor das nanopartículas indica que após a redução química, os polímeros continuam a recobrirem, já que o sombreamento vem do acetato de uranila ligado ao polímero presente. Os tamanhos obtidos a partir da análise das micrografias de TEM foram de 12,4 nm para as nanopartículas do PSPAA-1 e de 19,0 nm do PSPAA-2, condizentes com os valores obtidos por DLS, 11,0 nm para as nanopartículas do PSPAA-1 e 17,4 nm do PSPAA-2. O potencial zeta para as nanopartículas foi parecido para as nanopartículas dos dois materiais, -28 mV, indicando que os íons de prata foram todos reduzidos para prata metálica, a carga é referente aos grupos carboxila ligadas às nanopartículas. Mais um indicativo da ligação dos polímeros após a formação das nanopartículas.

Figura 32 – Micrografia obtida por TEM de alta ampliação das nanopartículas geradas pelo PSPAA-1 (a) e pelo PSPAA-2 (b).



Fonte: autoria própria.

Na Figura 32, podemos ver um ordenamento dos planos cristalinos da prata metálica. Como é visto mais de uma direção na mesma partícula, pode-se inferir que as nanopartículas de prata formadas são policristalinas, para ambos materiais. Corroborando que as

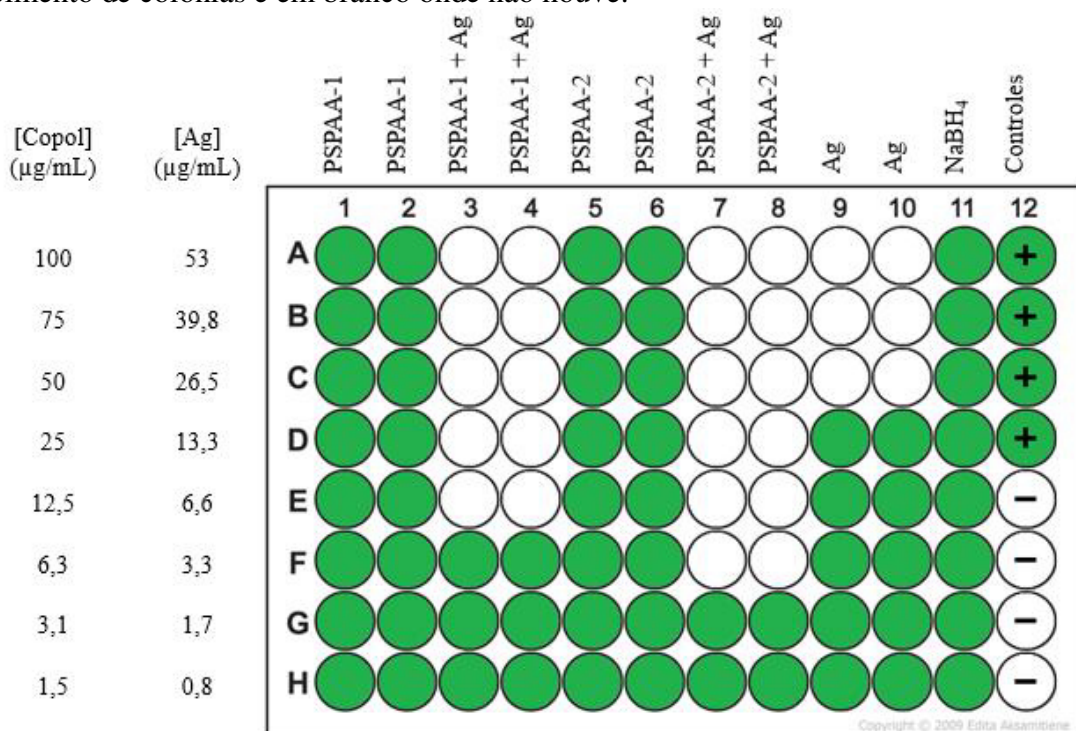
nanopartículas apresentam formato esferoidais, mas com morfologia cristalina como mostrado anteriormente na Figura 9.

6.4 Testes de atividade bactericida

Os testes foram seguidos como a metodologia descrita para as vesículas poliméricas e as nanopartículas a partir dos copolímeros PSPAA-1 e PSPAA-2. Além dos controles padrões para colônia sem reagente e meio esterilizado, os controles das nanopartículas sem a presença dos copolímeros e do redutor em água também foram adicionados. Os testes de MIC foram realizadas nestas condições contra uma colônia de bactéria gram-negativa, *E. coli*, e duas gram-positivas, *B. subtilis* e *S. aureus*. É importante testar contra os dois tipos de bactérias, devido a suas diferenças na membrana celular discutidas na seção 4.5.

A Figura 33 mostra a placa de 96 poços, onde os reagentes foram testados contra uma suspensão de *E. coli* (ATCC 25921). Os poços marcados em verde são onde colônias cresceram e em branco onde não cresceram.

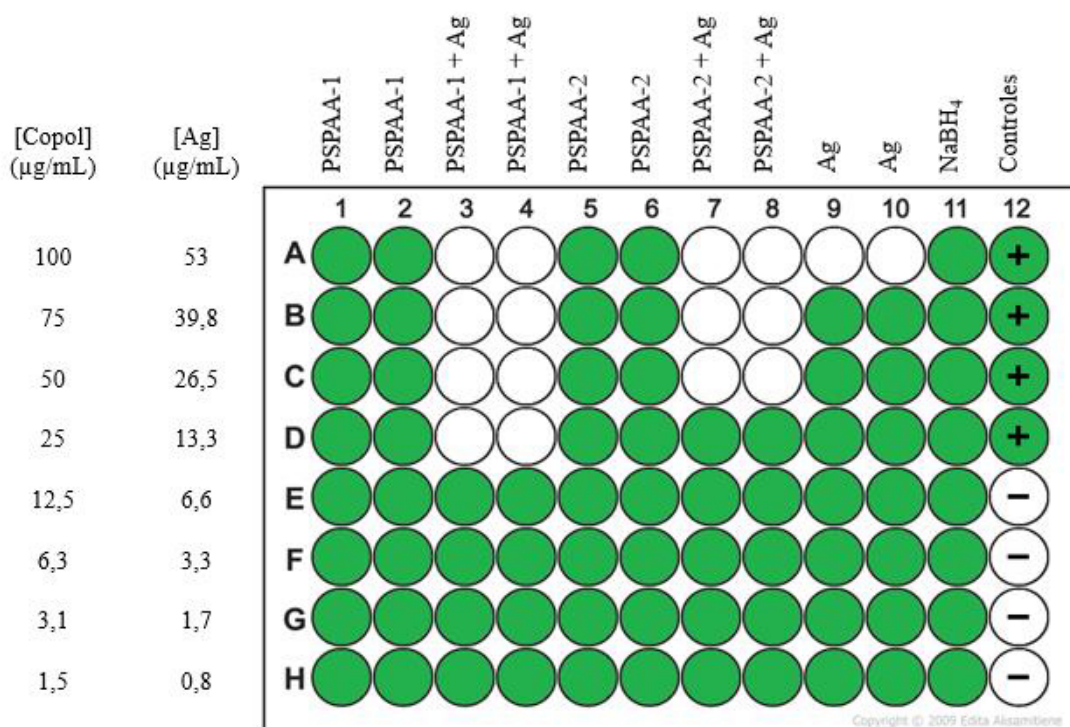
Figura 33 – Esquema da placa de 96 poços, onde vesículas poliméricas e nanopartículas confeccionadas a partir dos copolímeros PSPAA-1 e PSPAA-2 foram testadas contra suspensão de *E. coli* (ATCC 25921), com os devidos controles. Os poços marcados em verde indicam o crescimento de colônias e em branco onde não houve.



Fonte: autoria própria.

Neste experimento, é possível observar que as nanopartículas geradas a partir dos copolímeros possuem uma atividade antimicrobiana mais acentuada do que as sem copolímero. Isto provavelmente acontece pelo efeito de estabilização que estes materiais poliméricos provem às nanopartículas, isto é, os copolímeros após a redução devem estar, como já foi discutido, inibindo a agregação das nanopartículas e permitindo menores tamanhos mais estáveis. Desta forma, a área superficial é maior, permitindo maior contato da prata com as bactérias e, assim, inibindo o crescimento de colônias. As 4 últimas concentrações (poços 3C, 3D, 3E, 3F, 7C, 7D, 7E, 7F) que inibiram o crescimento das colônias de bactéria foram plaqueadas para determinação da MIC e da MBC, posteriormente apresentado nas Tabelas 8 e 9. Após a noite a 37 °C, somente a placa referente ao poço 3F ([PSPAA-1] = 6,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [Ag] = 3,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou crescimento de colônias, indicando um efeito inibitório e não bactericida. Geralmente, é esperado que bactérias gram-negativas, como a *E. coli*, tenham menor resistência devido a membrana celular mais simples. Com isso, as Figuras 34 e 35 apresentam o mesmo teste para duas bactérias gram-positivas: *B. subtilis* e *S. aureus*.

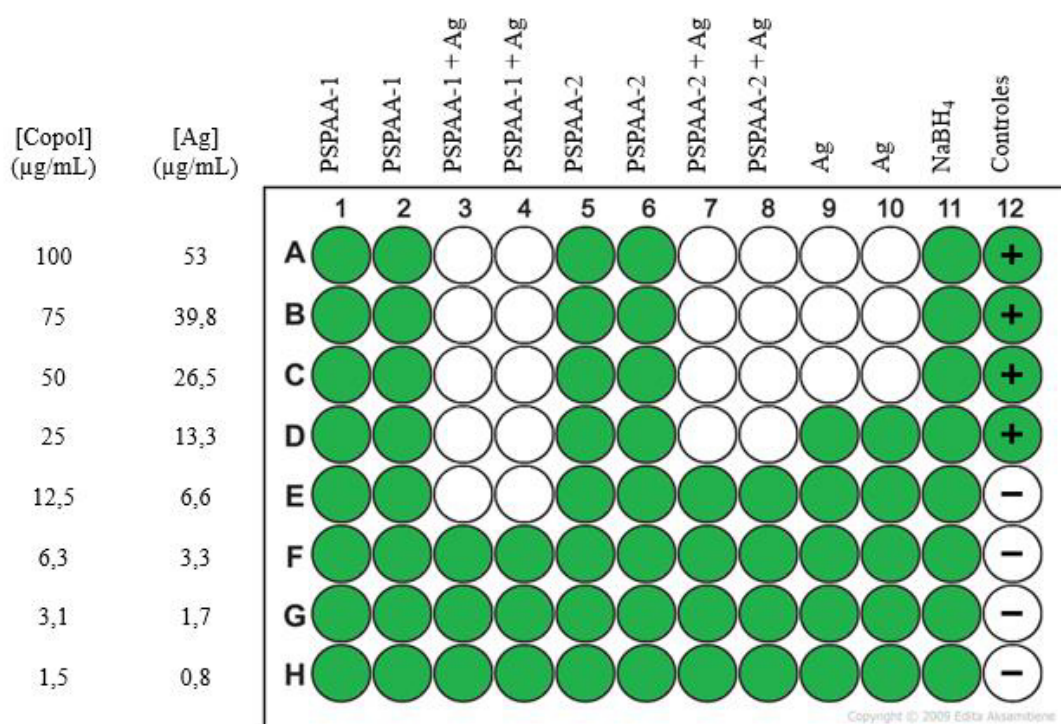
Figura 34 – Esquema da placa de 96 poços, onde vesículas poliméricas e nanopartículas confeccionadas a partir dos copolímeros PSPAA-1 e PSPAA-2 foram testadas contra suspensão de *B. subtilis* (PY79), com os devidos controles. Os poços marcados em verde indicam o crescimento de colônias e em branco onde não houve.



Fonte: autoria própria.

Nos testes contra a *B. subtilis* (Figura 34) foi observado um menor efeito antimicrobiano, o que era esperado devido as diferenças na morfologia na membrana celular entre bactérias gram-positivas e gram-negativas. Ainda que esperados menores valores de MIC para bactérias gram-positivas (devido a membrana mais robusta), testes contra a *S. aureus* (Figura 35) apresentaram menores valores de MIC do que contra a *B. subtilis*.

Figura 35 – Esquema da placa de 96 poços, onde vesículas poliméricas e nanopartículas confeccionadas a partir dos copolímeros PSPAA-1 e PSPAA-2 foram testadas contra suspensão de *S. aureus* (ATCC 25213), com os devidos controles. Os poços marcados em verde indicam o crescimento de colônias e em branco onde não houve.



Fonte: autoria própria.

Os valores de MIC foram melhores expressos na Tabela 8. Após o plaqueamento dos poços como descrito na metodologia, foi possível determinar a MBC para as condições testadas, os resultados estão na Tabela 9.

Tabela 8 – MIC em mg mL⁻¹ para as nanopartículas de prata confeccionadas na presença e na ausência dos copolímeros PSPAA-1 e PSPAA-2 contra colônias de *E.coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*.

Condição	MIC (mg mL ⁻¹) <i>E.</i>	MIC (mg mL ⁻¹) <i>B.</i>	MIC (mg mL ⁻¹) <i>S.</i>
	<i>coli</i>	<i>subtilis</i>	<i>aureus</i>
Sem polímero	26,5	53	26,5
PSPAA-1	6,6	13,3	6,6
PSPAA-2	3,3	26,5	13,3

Fonte: autoria própria.

Independente da bactéria, todos os sistemas mostraram uma eficiência inibitória muito maior na presença dos copolímeros do que sem a presença deles. Como discutido acima, a estabilidade que estes materiais fornecem às nanopartículas para que se mantenham com menores tamanhos (maior área superficial) faz com que em todos os casos tenham uma maior eficiência, provavelmente. A Tabela 9, apresenta quais as concentrações mostradas no teste MIC são consideradas bactericidas, isto é, a determinação da MBC.

Tabela 9 – MBC para as nanopartículas de prata confeccionadas na presença dos copolímeros PSPAA-1 e PSPAA-2 testadas contra colônias de *E.coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*.

Condição	MBC (mg mL ⁻¹) <i>E.</i>	MBC (mg mL ⁻¹) <i>B.</i>	MBC (mg mL ⁻¹) <i>S.</i>
	<i>coli</i>	<i>subtilis</i>	<i>aureus</i>
PSPAA-1	13,3	13,3	13,3
PSPAA-2	3,3	26,5	13,3

Fonte: autoria própria.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível sintetizar e caracterizar dois copolímeros diblocos anfifílicos aniônicos com diferentes razões entre blocos via polimerização RAFT e posterior hidrólise. Dadas estas características, foi possível gerar e agregar desses materiais em fase aquosa pelo método de injeção de solvente, captar cátions de prata e gerar nanopartículas de prata após redução química. A presença das vesículas poliméricas se mostrou imprescindível para formação das nanopartículas, devido à estabilidade que oferecem ao sistema. Devido a isto, os menores tamanhos estáveis, e esféricos, proporcionados pelos *templates* baseados em vesículas

poliméricas, proporcionando a geração mais homogênea destes materiais na superfície dos agregados poliméricos. O copolímero de menor porção hidrofílica (PSPAA-1) apresentou uma maior estabilidade, facilitando no manuseio e estoque do sistema, e maior reprodutibilidade.

Estas características permitiu um maior efeito bactericida, MIC pelo menos 4x menor para PSPAA-1 e 2x menor para PSPAA-2 em relação as nanopartículas sem polímero. Desta forma, este trabalho contribui para o entendimento da aplicação de polímeros funcionais para a confecção de complexos sistemas metal/polímero orgânico podendo assim ampliar ainda mais aplicações de um bactericida e catalisador conhecido. Para complementar as aplicações deste sistema, é visado o recobrimento de superfícies para a confecções de superfícies antimicrobianas, uma vez que os polímeros se mostraram ótimos estabilizadores para as nanopartículas e também os monômeros escolhidos para a confecção permitem tal aplicação.

REFERÊNCIAS

1. DISCHER, D. E.; EISENBERG, A. Polymer vesicles. **Science** v. 297, n. 5583, p. 967–973, 2002.
2. BLANAZS, A.; ARMES, S. P.; RYAN, A. J. Self-assembled block copolymer aggregates: From micelles to vesicles and their biological applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 30, p. 267–277, 2009.
3. APOLINÁRIO, A. C.; PACHIONI-VASCONCELOS, J.A.; PESSOA, A.; RANGEL-YAGUI, C.O. Polimerossomos Versus Lipossomos: A Evolução Da “bala Mágica.” **Química Nova**, v. 40, n. 3, p. 810–817, 2017.
4. BRAUNECKER, W. A.; MATYJASZEWSKI, K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, p. 93–146, 2007.
5. JENKINS, A. D.; JONES, R. G.; MOAD, G.; Terminology for reversible-deactivation radical polymerization previously called “controlled” radical or “living” radical polymerization (IUPAC recommendations 2010). **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, p. 483–491, 2010.
6. CHIEFARI, J. *et al.* Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. **Macromolecules**, v. 31, p. 5559–5562, 1998.
7. MOAD, G.; RIZZARDO, E.; THANG, S. H. Living radical polymerization by the RAFT process a third update. **Australian Journal of Chemistry**, v. 65, p. 985–1076, 2012.
8. DISCHER, D. E.; AHMED, F. Polymersomes. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 323–341, 2006.
9. DISCHER, B. M. *et al.* Polymersomes: Tough vesicles made from diblock copolymers. **Science**, v. 284, p. 1143–1146, 1999.
10. BRINKHUIS, R. P.; RUTJES, F. P. J. T.; VAN HEST, J. C. M. Polymeric vesicles in biomedical applications. **Polymer Chemistry**, v. 2, p. 1449–1462, 2011.
11. LU, H.; YU, L.; LIU, Q.; DU, J. Ultrafine silver nanoparticles with excellent antibacterial efficacy prepared by a handover of vesicle templating to micelle stabilization. **Polymer Chemistry**, v. 4, p. 3448–3452, 2013.
12. AIZAWA, M.; BURIK, J. M. Block copolymer templated chemistry for the formation of metallic nanoparticle arrays on semiconductor surfaces. **Chemistry of Materials**, v. 19, p. 5090–5101, 2007.

13. CAO, W. *et al.* Self-Assembly of Large Magnetic Nanoparticles in Ultrahigh Molecular Weight Linear Diblock Copolymer Films. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 12, p. 7557–7564, 2020.
14. KANG, Y. *et al.* Mesoporous PtCu Alloy Nanoparticles with Tunable Compositions and Particles Sizes Using Diblock Copolymer Micelle Templates. **Chemistry - A European Journal**, v. 25, p. 343–348, 2019.
15. DANIEL, M.C.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n.1, p.293-346, 2004.
16. MORONES, J. R. *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, p. 2346–2353, 2005.
17. GEHLEN, M. H.; BUCHVISER, S. F.; RODRIGUES, M. R.; NEUMANN, M. G. Fotoiniciação de polimerização vinílica. *Química Nova*, v. 21, n.6, p. 794-801, 1998.
18. MATYJASZEWSKI, K.; Davis, T. P. (eds) **Handbook of radical polymerization**. [s.l.]: John Wiley&Sons, 2002.
19. CORRIGAN, N. *et al.* Reversible-deactivation radical polymerization (Controlled/living radical polymerization): From discovery to materials design and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 111, ,2020.
20. PERRIER, S. 50th Anniversary Perspective: RAFT Polymerization - A User Guide. **Macromolecules**, v. 50, p. 7433–7447, 2017.
21. BERTIN, D.; GIGMES, D.; MARQUE, S. R. A.; TORDO, P. Polar, steric, and stabilization effects in alkoxyamines C-ON bond homolysis: A multiparameter analysis. **Macromolecules**, v. 38, p. 2638–2650, 2005.
22. CHARTON, M. **Progress in Physical Organic Chemistry**. [s.l.]: John Wiley&Sons, 1981.
23. RIDEAU, E.; DIMOVA, R.; SCHWILLE, P.; WURM, F. R.; LANDFESTER, K. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. **Chem Soc Ver**, v. 47, p. 8572–8610, 2018.
24. LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 259–269, 2007.
25. AHMED, M.; NARAIN, R. Progress of RAFT based polymers in gene delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 767–790, 2013.

26. TAN, K. S.; CHEONG, K. Y. Advances of Ag, Cu, and Ag-Cu alloy nanoparticles synthesized via chemical reduction route. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, 2013.
27. KNETSCH, M. L. W.; KOOLE, L. H. New strategies in the development of antimicrobial coatings: The example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. **Polymers**, v. 3, p. 340–366, 2011.
28. GHOBASHY, M. M.; MOHAMED, T. M. Radiation Preparation of Conducting Nanocomposite Membrane Based on (Copper/Polyacrylic Acid/Poly Vinyl Alcohol) for Rapid Colorimetric Sensor of Mercury and Silver Ions. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 28, p. 2297–2305, 2018.
29. GRATZL, G. *et al.* Mechanistic approaches on the antibacterial activity of poly(acrylic acid) copolymers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 98–105, 2015.
30. WANG, Y.; HE, J.; LIU, C.; CHONG, W. H.; Chen, H. Thermodynamics versus kinetics in Nanosynthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, p. 2022–2051, 2015.
31. WANG, Z. L. Transmission electron microscopy of shape-controlled nanocrystals and their assemblies. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, p. 1153–1175, 2000.
32. XIA, Y.; XIONG, Y.; LIM, B.; SKRABALAK, S. E. Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: Simple chemistry meets complex physics? **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 48, p. 60–103, 2009.
33. TAO, A. R.; HABAS, S.; YANG, P. Shape control of colloidal metal nanocrystals. **Small**, v. 4, p. 310–325, 2008.
34. Sun, Y.; Xia, Y. Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. **Science**, v. 298, p. 2176–2179, 2002.
35. ZHANG, Q.; LI, W.; WEN, L. P.; CHEN, J.; XIA, Y. Facile synthesis of Ag nanocubes of 30 to 70 nm in edge length with CF₃COOAg as a precursor. **Chemistry - A European Journal**, v. 16, p. 10234–10239, 2010.
36. ZENG, J. *et al.* Controlling the shapes of silver nanocrystals with different capping agents. **J Am Chem Soc**, v. 132, p. 8552–8553, 2010.
37. KILIN, D. S.; PREZHDO, O. V.; XIA, Y. Shape-controlled synthesis of silver nanoparticles: Ab initio study of preferential surface coordination with citric acid. **Chemical Physics Letters**, v. 458, p. 113–116, 2008.
38. ZHOU, M.; CHEN, S.; ZHAO, S. Synthesis of icosahedral gold nanocrystals: A thermal process strategy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 4510–4513, 2006.

39. BURDA, C.; CHEN, X.; NARAYANAN, R.; EL-SAYED, M. A. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 1025–1102, 2005.
40. ZHANG, R.; KHALIZOV, A.; WANG, L.; HU, M.; XU, W. Nucleation and growth of nanoparticles in the atmosphere. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 1957–2011, 2012.
41. Shi, J. Literature review on Steric Stabilization. **MSE**, 2002.
42. POMOGAILO, A. D.; KESTELMAN, V. N. Principles and Mechanisms of Nanoparticle Stabilization by Polymers. **Metallopolymer Nanocomposites**. [s.l.]: Springer, 2005.
43. DOBBIE, J.W.; EVANS, R.; GIBSON, D.V.; SMITHAM, J.B. Enhanced Steric Stabilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.45, n. 3, p. 557-565, 1973.
44. TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. [s.l.]: Artmed, 2017.
45. YIN, I.X. *et al.* The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 2555–2562, 2020.
46. MEIKLE, T. G. *et al.* Preparation, Characterization, and Antimicrobial Activity of Cubosome Encapsulated Metal Nanocrystals. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 12, p. 6944–6954, 2020.
47. KHORRAMI, S.; ZARRABI, A.; KHALEGHI, M.; DANAEI, M.; MOZAFARI, M. R. Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 8013–8024, 2018.
48. RAMKUMAR, V.S. *et al.* Biofabrication and characterization of silver nanoparticles using aqueous extract of seaweed *Enteromorpha compressa* and its biomedical properties. **Biotechnology Reports**, v. 14, p. 1–7, 2017.
49. DURÁN, N.; NAKAZATO, G.; SEABRA, A. B. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 6555–6570, 2016.
50. LIAO, C.; LI, Y.; TJONG, S. C. Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, 2019.
51. LI, L. *et al.* Silver nanoparticles induce protective autophagy via Ca²⁺/CaMKK β /AMPK/mTOR pathway in SH-SY5Y cells and rat brains. **Nanotoxicology**, v. 13, p. 369–391, 2019.
52. MA, Q.; WOOLEY, K.L. The Preparation of t-Butyl Acrylate, Methyl Acrylate, and Styrene Block Copolymers by Atom Transfer Radical Polymerization: Precursors to Amphiphilic and Hydrophilic Block Copolymers and Conversion to Complex

- Nanostructured Materials. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 38, p. 4805-4820, 2000.
53. WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, p. 163–175, 2008.
54. CARRETERO, G.P.B. *et al.* Naphthalimide-containing bp100 leads to higher model membranes interactions and antimicrobial activity. **Biomolecules**, v. 11, 2021.
55. SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X.; Kiemle, D.J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. [s.l.]: John Wiley&Sons, 2005.
56. SANTOS, J.F.L. *et al.* Ressonância de plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. **Química Nova**, v. 39, p. 1098–1111, 2016.