

“Síntese, Caracterização e Estudos em Solução de Terpolímeros Anfífilos Termo-sensíveis e Sensíveis ao pH: Uma Perspectiva para Obtenção de Sistemas Transportadores de Fármacos.”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biofísica Molecular do Instituto de Biociências
Letras e Ciências Exatas – UNESP – SJRP
para obtenção do título de
Doutor em Biofísica Molecular.

Doutorando: **Neide Aparecida Blaz Vieira**
Orientador: **Prof. Dr. Marcio José Tiera**
Co-orientador: **Prof. Dr. João Ruggiero Neto**

“Feliz aquele que pensa que sabe...”

Esta Tese é dedicada especialmente:

*“À memória de meu pai, a pessoa mais honesta e digna que conheci nesta vida; cúmplice
silencioso de meus ideais.
Sua humildade e caráter fizeram-me acreditar no Homem.”.*

“À minha santa mãe, esteio da família que restou, cujo amor me protege e me guia”.

“À Nara e Simone, filhinhas queridas, que dão mais sentido à minha vida”.

“À Umberto, amigo, amante, companheiro, marido. Em todas as horas”.

Agradecimento Especial:

*Ao prof. Marcio: obrigada,
pela orientação,
pela atenção,
pela amizade,
pelo respeito,
pela paciência,
pelo apoio
e pela oportunidade.*

*Às grandes professoras de Química Orgânica, Vera e Iêda, pela amizade, colaboração,
solidariedade e disposição em ajudar sempre.*

*À prof^a Lídia, prof. Maurício, prof. Elizeu, prof. Flávio e prof. Gustavo, pelo apoio e
agradável convivência durante estes anos.*

*Ao prof. João Ruggiero Neto, pela participação no desenvolvimento deste trabalho e pela
disponibilidade dispendida a qualquer momento.*

Ao prof. Elói Feitosa, pela atenção, pela disponibilidade e pela simpatia.

À Nereide e Roberto, irmãos de sangue, pela doce existência.

*À Céci e ao Hamilton, irmãos de coração, pela grande amizade e pelas vezes que levantaram
meu astral nos instantes de desânimo.*

Ao amigo Reinaldo, por compartilharmos problemas em comum e conseguirmos sair ilesos!

À Rita Beatriz, pela amizade, pela competência, apoio, assistência e confidências!

Ao João(em especial), Claudinei e Eliani, pela cooperação e auxílio nos laboratórios.

*À prof^a. Iolanda Cuccovia, prof. Mário Politi, prof^a. Lilian Maddi-Ravazzi, prof.
Sebastião Taboga, Ms Emiliano Barbieri Alvarez, prof^a Carla C. S. Cavalheiro, pela
colaboração em algumas técnicas utilizadas neste trabalho.*

*À memória da prof^a e dr^a Lizette Buíssa que, apostando na minha inexperiência como
docente, abriu as portas para que eu conhecesse minha verdadeira vocação.*

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Introdução Geral.....	1
1.2 -Polímeros.....	2
1.3- Síntese de Polímeros.....	5
1.3.1.- Polimerização de adição por mecanismo radicalar.....	5
1.3.2.- Polimerização Iônica.....	7
1.3.2.1 – Polímeros do tipo bloco.....	8
1.3.3- Polímeros enxertados ou grafitizados.....	8
1.4-Polímeros Inteligentes ou Polímeros “ <i>Smart</i> ”.....	9
1.4.1 - Polímeros Termo-sensíveis.....	11
1.4.2 – Polímeros Sensíveis ao pH.....	15
1.5 – O efeito da força iônica em polímeros inteligentes.....	17
1.6 – Propriedades de Polímeros Inteligentes.....	19
1.6.1 - Auto-organização e Transporte de fármacos nos microdomínios.....	19
1.6.2 – Formação de microcápsulas.....	24
1.7 – Técnicas Fotofísicas Aplicadas ao Estudo de Polímeros Anfifílicos.....	25
1.7.1 – Fluorescência.....	25
1.7.1.1- O pireno como sonda fluorescente.....	27
1.7.1.2- Anisotropia de Fluorescência.....	29

2- OBJETIVOS.....	31
3- PARTE EXPERIMENTAL.....	33
3.1- Materiais.....	33
3.2-Sínteses.....	33
3.2.1- Síntese dos polímeros da série 1.....	33
3.2.1.1- Homopolimerização do NIPAm.....	34
3.2.1.2- Homopolimerização do PEG.....	34
3.2.1.3- Homopolimerização do DOMA.....	35
3.2.1.4- Terpolimerizações.....	36
3.2.2- Síntese dos polímeros da série 2.....	38
3.2.2.1- Homopolimerização do ácido vinil benzóico.....	38
3.2.2.2- Terpolimerizações.....	39
3.3 – Caracterização.....	41
3.3.1- Massa Molar.....	41
3.3.2- Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho.....	41
3.3.3- Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	41
3.3.4 - Caracterização por análise elementar para os polímeros da série 2.....	42
3.3.5- Titulação Condutimétrica para os polímeros da série 2.....	42
3.4- Determinação do ponto de turvação (CP) ou LCST.....	42
3.4.1 -Medidas através de Fotometria no Visível.....	42
3.4.2- Medidas de Microcalorimetria (DSC).....	42
3.5- Investigação da formação de agregados e determinação da concentração de agregação crítica (CAC).....	43
3.5.1- Fluorescência no estado estacionário.....	43

3.5.2- Efeito da temperatura sobre a agregação.....	44
3.5.3- Anisotropia de fluorescência.....	44
3.6 - Determinação do tamanho dos agregados.....	45
3.6.1- Espalhamento de Luz Dinâmico.....	45
3.7- Incorporação de moléculas hidrofóbicas nos agregados hidrofóbicos poliméricos.....	48
3.7.1- Eficiência da Incorporação de pireno.....	48
3.7.2- Incorporação de Doxorubicina (Adriamicina –ADR-HCl).....	48
3.8 - Preparo de Microcápsulas com Polímeros da Série 2.....	49
3.8.1 - Caracterização das Microcápsulas.....	50
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1. – Caracterização.....	51
4.1.1- Polímeros da série 1.....	51
4.1.1.1- Espectroscopia de RMN – ^1H	51
4.1.1.2 - Espectroscopia de infravermelho.....	54
4.1.1.3 – Massa Molar média.....	55
4.1.2- Polímeros da série 2.....	57
4.1.2.1.- Espectroscopia de RMN – ^1H	57
4.1.2.2 – Espectroscopia de infravermelho.....	58
4.1.2.3.- Massa Molar média.....	59
4.1.2.4- Determinação da proporção molar dos monômeros.....	59
4.2- Determinação da temperatura de turvação ou LCST – Série 1.....	63
4.2.1- Fotometria no Visível.....	63
4.2.1.1- Polímeros em solução aquosa.....	63

4.2.1.2 Efeito da força iônica: pH 7,4 – Tampão fosfato	66
4.2.2- Microcalorimetria diferencial de varredura.....	69
4.3- Investigação da formação de microdomínios hidrofóbicos e determinação da CAC (concentração de agregação crítica) para os polímeros da série 1.....	71
4.3.1- Fluorescência.....	71
4.4- Anisotropia de fluorescência- Série 1.....	79
4.5 – Tamanho dos agregados – Espalhamento de luz dinâmico (DLS)- Série 1.....	81
4.6- Incorporação de moléculas hidrofóbicas nos agregados hidrofóbicos poliméricos Série 1.....	85
4.6.1- Incorporação de pireno.....	85
4.6.2 - Incorporação de Doxorubicina (Adriamicina –ADR-HCl).....	87
4.7- Determinação da temperatura de turvação ou LCST- Série 2.....	88
4.7.1- Efeito do pH.....	88
4.7.2- Efeito da força iônica.....	90
4.8- Investigação da formação de microdomínios hidrofóbicos e determinação da CAC (concentração de agregação crítica) para os polímeros da série 2.....	94
4.9- Caracterização das Microcápsulas – Série 2.....	97
5-CONCLUSÕES.....	100
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
7- APÊNDICES.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação genérica dos diferentes tipos de seqüências para homopolímeros e copolímeros.....	4
Figura 2: Esquema para purificação de proteína usando extração em sistema de duas fases utilizando polímero termo-sensível.....	10
Figura 3: Sistema liberador de fármaco, tipo hidrogel, formado por polímero “ <i>smart</i> ”	10
Figura 4: Representação esquemática da transição de fase para polímero termo-sensível.....	11
Figura 5: Solução de um polímero termo-sensível antes e depois da LCST.....	12
Figura 6: Micelas poliméricas constituídas de porção hidrofóbica e porção termo-sensível, em temperatura abaixo e acima da LCST da porção termo-sensível.....	12
Figura 7: Hidrogel constituído de polímero sensível à temperatura e a mudança de tamanho em resposta à mudanças na temperatura.....	13
Figura 8: Comportamento estímulo-resposta de microcápsulas transportadoras de fármacos, com polímero termo-sensível na estrutura da casca.....	13
Figura 9: a) Copolímero de 2-(acrilamida)-2-metilpropanosulfonato de sódio com monômero possuidor de cadeia alquílica com grupo carboxilílico. b) Esquema da resposta do polímero ao pH.....	16
Figura 10: Modelo idealizado para o comportamento de copolímero tri-bloco sensível ao pH e à adição de sal, quando exposto à diferentes seqüências de estímulos.....	18
Figura 11: Esquema geral de formação de micelas de moléculas anfifílicas em solventes polares.....	20
Figura 12: Representação das características anatômicas e fisiológicas de tecido normal e tumoral e o uso de sistemas transportadores poliméricos.....	22
Figura 13: Diagrama de Jablonsky para energia e processos de interconversão.....	26
Figura 14: Espectro de emissão do pireno em soluções de n-octilglicosídeo.....	28
Figura 15: Espectro de emissão do pireno na presença de concentrações crescentes de dextrana hidrofobicamente modificada com cloreto de p-hexilbenzoila.....	29
Figura 16: Estrutura do monômero N-isopropilacrilamida.....	34
Figura 17: Estrutura do monômero monometacrilato de poli(etilenoglicol) metil éter.....	35

Figura 18: Estrutura do monômero n-dodecilmetacrilato.....	36
Figura 19: Estrutura randômica dos terpolímeros da série 1.....	37
Figura 20: Estrutura do monômero ácido vinilbenzóico.....	39
Figura 21: Estrutura randômica dos terpolímeros da série 2.....	40
Figura 22: Estrutura da sonda 4H4A.....	45
Figura 23: Estrutura química da doxorubicina.....	49
Figura 24: Estrutura e espectro de RMN- ^1H do polímero 80:10:10.....	52
Figura 25: Porcentagem em mols na mistura reacional em função da composição determinada nos terpolímeros. a: monômero PEG e b: monômero NIPAM....	54
Figura 26: : Espectro de IV do polímero 67:28:5 comparado com os espectros de NIPAm e PEG.....	55
Figura 27: Estrutura e espectro de RMN- ^1H do polímero 85:10:5.....	57
Figura 28: Espectro de infravermelho do terpolímero 80:10:10.....	58
Figura 29: Gráfico de condutividade em função do volume de solução de NaOH 0,105 molL ⁻¹ para o terpolímero 80:10:10.....	60
Figura 30: Porcentagem em mols na mistura reacional em função da composição calculada nos terpolímeros. a: monômero VBA b: monômero NIPAm.....	62
Figura 31: %Transmitância em função da temperatura para solução aquosa de NIPAm a 0,1% (m/v).....	64
Figura 32: %Transmitância em função da temperatura para solução aquosa dos terpolímeros a 0,1% (m/v).....	64
Figura 33: LCST em função da % PEG incorporada nos polímeros.....	65
Figura 34: %Transmitância em função da temperatura para soluções a 0,1% (m/v) para o polímero 67:28:5 em água e em solução tampão pH 7,4 em força iônica crescente.....	67

Figura 35: %Transmitância em função da temperatura para soluções a 0,1% (m/v) do polímero 60:35:5 em água e em solução tampão pH 7,4, força iônica crescente....	67
Figura 36: Temperatura de turvação de soluções 0,1% (m/v) dos terpolímeros em solução tampão pH 7,4 em função da força iônica.....	68
Figura 37: Temperatura de turvação para o terpolímero 67:28:5 em: (■) solução aquosa e (○) solução tampão pH 7,4 e força iônica 0,15 mol dm ⁻³ em KCl.....	69
Figura 38: Temperatura de turvação do homopolímero de NIPAM:	
a) determinado fotometricamente	
b) determinada por calorimetria diferencial de escaneamento.....	70
Figura 39: Temperaturas de turvação do terpolímero 90:5:5:	
a) determinado fotometricamente	
b) determinada por calorimetria diferencial de escaneamento.....	70
Figura 40: Razão I ₁ /I ₃ do espectro de emissão do pireno em função da concentração para os terpolímeros () 90:5:5 e (○) 80:10:10.....	74
Figura 41: Razão I ₁ /I ₃ do espectro de emissão do pireno em função da concentração para o homopolímero 100:0:0.....	74
Figura 42: Razão I ₁ /I ₃ do espectro de emissão do pireno em função da concentração para os terpolímeros.....	75
Figura 43: Razão I ₁ /I ₃ em função da temperatura para os terpolímeros em solução aquosa 1,0 g dm ⁻³	77
Figura 44: Razão I ₁ /I ₃ em função da temperatura para o homopolímero 100:0:0 em () solução aquosa, em (○) tampão força iônica 0,25 e (Δ) força iônica 0,50 mol dm ⁻³	78
Figura 45: Curvas de I ₁ /I ₃ e transmitância em função da temperatura para o homopolímero 100:0:0 em solução 1,0 g dm ⁻³ força iônica 0,50 mol dm ⁻³	78
Figura 46: Anisotropia de fluorescência em função da temperatura para os terpolímeros a 0,1% (m/v).....	80

Figura 47: Razão I_1/I_3 em função da anisotropia para os terpolímeros, a 20°C.....	80
Figura 48: Diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura para os polímeros (■) 100:0:0, (▲) 85:15:5 e (□) 70:25:5 em solução 5 g dm ⁻³	82
Figura 49: Distribuição do tamanho para os terpolímeros 90:5:5. 80:15:5. 67:28:5 em solução aquosa e na presença de solução tampão pH 7,4 e 1,5 mol dm ⁻³ em KCl., a 20°C.....	84
Figura 49: D_h em função da força iônica. Terpolímero 67:28:5, solução 0,1%(m/v).....	84
Figura 51: D_h em função da concentração de soluções aquosas do polímero 70:25:5 a 20°C.....	85
Figura 52: D_h em função da concentração de soluções aquosas do polímero 80:15:5 a 20°C.....	85
Figura 53: Curva de absorbância em função da concentração de pireno em clorofórmio.....	87
Figura 54: Curva de absorbância em função da concentração de doxorubicina em DMF.....	88
Figura 55: Transmitância em função da temperatura para terpolímeros com maior proporção de VBA, em solução tampão a 0,1% (m/v), força iônica 20 mM.....	91
Figura 56: Transmitância em função da temperatura os terpolímeros em solução tampão a 0,1% (m/v), força iônica 20 mM.....	91
Figura 57: Curvas de LCST em função do pH para os terpolímeros em solução tampão a 0,1% (m/v) e força iônica 20 mM.....	92
Figura 58: Transmitância em função da temperatura para o polímero 70:10:20 em solução tampão a 0,1% (m/v), pH 7,4, em diferentes forças iônicas.....	92
Figura 59: Transmitância em função da temperatura os terpolímeros em solução tampão a 0,1% (m/v), pH 7,4.....	93
Figura 60: Curvas de LCST em função da força iônica para os terpolímeros em solução tampão a 0,1% (m/v), pH 7,4.....	93
Figura 61: Razão I_1/I_3 em função da concentração para os terpolímeros () 80:10:10 e (Δ) 70:10:20 em tampão pH 7,4.....	95
Figura 62: Razão I_1/I_3 em função da concentração para o terpolímero 80:10:10 em solução tampão, com variação do pH.....	96

Figura 63: Razão I_1/I_1 em função da temperatura para o terpolímero 80:10:10 (0,1% m/v) em diferentes valores de pH.....	97
Figura 64: Fotografia em MEV de microcápsulas sem pireno.....	98
Figura 65: Fotografia em MEV de microcápsulas contendo pireno incorporado.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidades em mili-mols e gramas dos monômeros utilizados nas terpolimerizações da série 1.....	38
Tabela 2: Quantidades em mili-mols e gramas dos monômeros utilizados nas terpolimerizações da série 2.....	40
Tabela 3: Proporções molares dos monômeros incorporados nos polímeros obtidas a partir dos espectros de RMN.....	53
Tabela 4: Massa molar média dos polímeros da série 1.....	56
Tabela 5: Massa molar média dos polímeros da série 2.....	59
Tabela 6: Massas dos polímeros e volume de NaOH 0,105 mol dm ⁻³ nas titulações condutimétricas.....	61
Tabela 7: Proporção molar dos polímeros calculada por análise elementar e titulação condutimétrica.....	61
Tabela 8: Valores das temperaturas de turvação de soluções aquosas 0,1% (m/v) dos polímeros determinadas através de espectrofotometria.....	65
Tabela 9: Temperaturas de turvação determinadas utilizando-se fotometria e microcalorimetria para os polímeros, em solução aquosa, em concentrações 0,1% e 0,66%, respectivamente.....	71
Tabela 10: Diâmetro hidrodinâmico dos terpolímeros em solução 0,1% (m/v), a 20°C, (para 90:5:5 e 80:10:10 a temperatura foi de 15°C).....	81
Tabela 11: Quantidade de pireno incorporada nos terpolímeros.....	86
Tabela 12: Tabela de valores da LCST para os polímeros da série 2, em solução aquosa, em diferentes pH e força iônica.....	94

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

UV	Radiação ultravioleta
LCST	<i>Lower Critical Solution Temperature</i>
NIPAm	N- isopropilacrilamida
PNIPAm	poli(N-isopropilacrilamida)
UCST	<i>Upper Critical Solution Temperature</i>
CAC	Concentração de Agregação Crítica
CMC	Concentração Micelar Crítica
EPR	Permeabilidade e Retenção Aumentada
RES	Sistema Retículo-Endotelial
PEG	poli(etilenoglicol)
I ₁	Intensidade de fluorescência da banda do pireno, em 373 nm.
I ₃	Intensidade de fluorescência da banda do pireno, em 384 nm.
r	Anisotropia
DPH	1,6-difenil-1,3,5- hexatrieno
DOMA	n-Dodecilmetacrilato
VBA	Ácido Vinil Benzóico
4H4A	Trans,trans,trans-1-[4-(3-carboxipropil)fenil]-6-(4-butilfenil)-1,3,5-hexatrieno
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DSC	Calorimetria Diferencial de Escaneamento
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PVA	poli(Álcool Vinílico)
M _w	Massa Média da Massa Molecular
M _n	Número Médio da Massa Molecular

M_w / M_n	Polidispersividade (distribuição da massa molar)
FI	Força Iônica
CTAC	Cloreto de cetiltrimetilamônio
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
DTAB	Brometo de Dodeciltrimetilamônio
D_h	Diâmetro Hidrodinâmico
CP	<i>Cloud Point</i>
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
PLA	poli(ácido láctico)
PLGA	poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

RESUMO

A presente tese envolveu a síntese e caracterização de duas séries de polímeros anfífilicos inteligentes. A utilização de quatro monômeros foi feita com o objetivo de se conferir aos polímeros sensibilidade à temperatura e ao pH. Na primeira série, ou série 1, foram sintetizados terpolímeros anfífilicos termo-sensíveis a partir dos monômeros N-isopropilacrilamida (NIPAm), monometacrilato de poli(etilenoglicol)metil éter (PEG) e n-dodecilmacrilato (DOMA), cuja termo-sensibilidade foi controlada variando-se a proporção molar dos monômeros. Os polímeros foram caracterizados utilizando-se as técnicas de ressonância magnética nuclear e cromatografia de permeação em gel (GPC). As propriedades das soluções foram estudadas empregando-se espectrofotometria, fluorescência e espalhamento de luz dinâmico. Os polímeros exibiram temperatura de turvação em solução aquosa entre 17 e 52°C, dependendo da composição. A proporção do monômero hidrofílico (PEG) foi variada com o objetivo de se obter termo-sensibilidade próxima à temperatura do corpo humano (37° C). O aumento da força iônica das soluções pela adição de KCl reduziu a temperatura de turvação pelo efeito “*salting out*”. Os polímeros formaram, em solução aquosa, microdomínios hidrofóbicos, cuja CAC variou de $1,2 \times 10^{-3}$ a 1×10^{-2} g dm⁻³, com o aumento da proporção molar de PEG de 5 a 35%. Os agregados hidrofóbicos tipo micelar apresentaram um tamanho que variou de 50 a 140 nm, dependendo da proporção dos monômeros, e mostraram capacidade para incorporar moléculas hidrofóbicas, como pireno e doxorubicina. As quantidades máximas incorporadas foram de, respectivamente, 6,1 mg/g polímero e 13,5 mg/g polímero para pireno e doxorubicina. Agregados mais hidrofóbicos incorporaram uma quantidade maior do hidrófobo.

Na segunda série, ou série 2, foram sintetizados terpolímeros anfífilicos termo-sensíveis e sensíveis ao pH, substituindo-se o monômero DOMA pelo monômero ácido vinilbenzóico, (VBA), que contém grupo ionizável. Os polímeros foram caracterizados utilizando-se as técnicas de ressonância magnética nuclear e cromatografia de permeação em gel (GPC). As propriedades das soluções foram estudadas empregando-se espectrofotometria, e fluorescência . Uma proporção maior do monômero VBA levou a um aumento na temperatura de turvação (que variou de 34 a 56° C, dependendo do valor do pH) devido à repulsão eletrostática das cadeias ionizadas. A presença de sal nas soluções também deslocou a temperatura de turvação para valores menores. A CAC destes terpolímeros é relativamente alta e variou entre $9,4 \times 10^{-2}$ e 1×10^{-1} g dm⁻³ . A preparação de microcápsulas com esta série de polímeros mostrou resultados satisfatórios, com a obtenção de micropartículas cujo tamanho variou de 3 a 10 µm e que foram capazes de incorporar a molécula hidrofóbica pireno com uma eficiência em torno de 41%.

Abstract

In the present thesis the synthesis and characterization of two series of “intelligent” polymers were performed aiming to construct potential drug carriers. Four monomers were employed to provide thermo and pH sensitivity to the systems. In the first series terpolymers of *N*-isopropylacrylamide, dodecyl methacrylate (DOMA) and poly(ethylene glycol)(PEG) methacrylate, were synthesized by random copolymerization, and the composition was controlled to achieve systems having different thermosensitivities. ¹HNMR spectra and gel permeation chromatography (GPC) were employed to characterize the different samples obtained. The solution properties were studied by employing spectrophotometry, fluorescence, and dynamic light scattering techniques. The chemical compositions in the final terpolymers are close to those in the feed and the composition was controlled aiming to adjust the thermosensitivity close to that of the human body temperature (37°C). The polymers exhibited cloud point temperatures (T_{cs}) varying from 17 to 52 °C. Micropolarity studies using I_1/I_3 ratio of the vibronic bands of pyrene show the formation of amphiphilic aggregates capable of incorporating hydrophobic drugs as the polymer concentration is increased. The critical aggregation concentration (CAC) increases from 1.2×10^{-3} to 1×10^{-2} g.L⁻¹ with the PEG content varying from 5 to 35 mol%. Anisotropy measurements confirm the results obtained by pyrene fluorescence and show that the aggregates resulting from intermolecular interactions present different organizations. The hydrodynamic diameters (D_h) of the aggregates determined by dynamic light scattering (DLS) vary from 40 to 150 nm depending on the terpolymer composition. The T_{cs} and D_h values decreased with the ionic strength, and this behavior was attributed to the dehydration of the polymeric micelles. The capacity of

solubilization of the aggregates was evaluated by employing pyrene and adryamicin and the obtained results confirm the ability to incorporate hydrophobic molecules.

In the second series terpolymers of *N*-isopropylacrylamide, vinyl benzoic acid (VBA) and poly(ethylene glycol)(PEG) methacrylate, were synthesized by random copolymerization, aiming to provide pH sensitivity to the polymers. The polymers were characterized using ^1H NMR and gel permeation chromatography. The composition was determined using elemental analysis and potentiometric titration. The cloud point temperature was varied from 34 to 56 °C by increasing the amount of vinyl benzoic acid incorporated in the terpolymers. The critical aggregation concentrations (CACs) were higher than those obtained for the first series and varied from 9.4×10^{-2} to 1×10^{-1} g.L $^{-1}$. The cloud point temperature was shown to increase with both, VBA content and pH due to electrostatic repulsion between charged carboxylic groups. The solvent evaporation method was employed to prepare microcapsules having sizes varying from 3 to 10 μm with a loading efficiency for pyrene of 41%.

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Introdução Geral

O estudo de polímeros anfífilicos sensíveis à temperatura e ao pH tem sido objeto de interesse há algumas décadas devido à variedade de aplicações, tais como na área farmacêutica (em liberação controlada de fármacos) (EECKMAN et al., 2004), em tecnologia ambiental (remoção de substâncias hidrofóbicas tóxicas em águas contaminadas) (SNOWDEN et al., 1996) em aplicações bioquímicas (imobilização de enzimas e células) (VIRTANEN et al., 2002) e outros. Polímeros anfífilicos em solução aquosa possuem a propriedade de auto-agregação, formando micro-fases onde moléculas hidrofóbicas podem ser alojadas. Esta propriedade, em particular, torna tais polímeros candidatos à utilização como sistemas transportadores de fármacos, já que o fármaco, em geral hidrofóbico, tende a alojar-se nos microdomínios formados.

A síntese de polímeros anfífilicos utilizando-se o monômero N-isopropilacrilamida (NIPAm) tem sido muito estudada devido à sua habilidade de exibir um comportamento estímulo-resposta em solução aquosa, ou seja, por ter uma termo-sensibilidade bastante conhecida. Polímeros termo-sensíveis podem precipitar de sua solução acima de uma certa temperatura conhecida como temperatura de turvação, ou LCST (*lower critical solution temperature*) ou ainda CP (*cloud point*). A termo-sensibilidade de polímeros de NIPAm pode ser controlada pela sua copolimerização com monômeros hidrofílicos (que provocam aumento na temperatura de turvação) e hidrofóbicos (que causam um decréscimo na temperatura de turvação) através de um balanço na proporção molar destes. A adição de sais também permite um controle sobre o ponto de turvação, já que um pequeno aumento na força iônica pode provocar o chamado efeito “*salting out*”, que diminui a temperatura de turvação. A copolimerização de NIPAm com monômeros contendo grupos ionizáveis produz polímeros

cuja termo-sensibilidade pode ser afetada por alterações no pH da solução. A ionização destes grupos torna os polímeros mais hidrofílicos, desviando a temperatura de turvação para valores maiores.

Uma variedade de estratégias tem sido empregada para moldar a temperatura de transição e estudos vêm sendo desenvolvidos para a obtenção de polímeros termo-sensíveis e sensíveis ao pH, cuja temperatura de turvação esteja próxima à do corpo humano no intuito de serem utilizados como transportadores de fármacos. Por causa desta peculiaridade de comportamento, estes polímeros também são conhecidos como polímeros “*smart*” ou inteligentes (EECKMAN et al., 2004), que são sistemas poliméricos que auto-regulam a liberação de um fármaco em resposta a um estímulo específico.

O comportamento de agregação em solução pode ser avaliado por algumas técnicas, como por exemplo, espectroscopia de fluorescência (com a utilização de sondas fluorescentes), espalhamento de luz dinâmico e tensão superficial (PISPAS; HADJYCHRISTIDES, 2003). Tais técnicas permitem estudar o comportamento, em solução aquosa, de propriedades como agregação, organização e tamanho dos agregados. Além disso, os efeitos e parâmetros importantes como pH, força iônica, concentração, temperatura e capacidade de solubilização podem ser avaliados com facilidade.

1.2 – Polímeros

A vida, em sua essência, é polimérica.

Polímeros, tais como proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos estão presentes nos componentes básicos dos sistemas vivos, ou seja, a natureza usa polímeros para a constituição das células mais complicadas e importantes do planeta (GALAEV; MATTIASSON, 1999). O termo polímero vem do grego - muitas partes - e é indefinido, no sentido de que o tamanho da molécula não é especificado. Literalmente, qualquer molécula com algumas partes, isto é,

“meros”, pode ser chamada de polímero. A expressão polímero foi criada por Berzelius, em 1832, para designar composto de massas molares múltiplas. Atualmente não se usa esse conceito e são considerados polímeros as moléculas relativamente grandes, de massas molares da ordem de 10^3 a 10^6 g mol⁻¹, em cuja estruturam encontram-se unidades repetidas simples, conhecidas como “meros”. A expressão “mero” não é usada por todos os autores: é comum dizer-se “unidade química repetida”, ou “monômero”.

Em contraste com as substâncias químicas comuns, os polímeros não são produtos homogêneos, eles contêm uma mistura de moléculas de massas molares variadas, apresentando o que se chama de polimolecularidade. A reação química que leva à formação de polímeros é a polimerização. O grau de polimerização é o número de monômeros da cadeia polimérica. Quando há mais de um tipo de monômero na composição do polímero, este é designado de copolímero, e os monômeros que lhe dão origem de comonômeros. O termo copolímero é geral; quando há três monômeros na constituição do polímero, usa-se a expressão terpolímero. Quando se deseja ressaltar o fato de que o polímero tem apenas um tipo de monômero, usa-se a expressão homopolímero (MANO, 1985). Em relação à sequência monomérica da cadeia do polímero, esta pode ser variada de acordo com o método da síntese. Em geral, quatro tipos de seqüências são encontradas (ALLCOCK; LAMPE, 1990).

1) Polímeros randômicos (estatísticos): não existe seqüência definida das unidades do monômero, que se dispõem ao acaso (figura 1). São freqüentemente formados quando monômeros do tipo olefinas copolimerizam via radical livre.

2) Polímeros regulares (alternados): contêm uma seqüência regular de unidades monoméricas (figura 1) . A polimerização de olefinas feitas através de mecanismos iônicos podem originar polímeros deste tipo.

3) Polímeros em bloco: contêm um bloco de um monômero conectado a um bloco de outro monômero (figura 1) . São geralmente formados por um processo de polimerização

iônica. Para estes três tipos de sequência as propriedades dos polímeros são diferentes das dos homopolímeros correspondentes.

4) Polímeros enxertados ou grafitizados (*graft*): são geralmente preparados ligando-se dois polímeros diferentes (figura 1) . Podem ser preparados por irradiação eletromagnética do tipo raio X de uma mistura de dois homopolímeros. As propriedades destes polímeros estão relacionadas com as dos homopolímeros.

Monômero (nA) -----A-A-A-A-A-A-A-A-A-----
Homopolímero

Monômero (nB) -----B-B-B-B-B-B-B-B-B-----
Homopolímero

Comonômero (nA + nB) -----A-B-A-B-A-B-A-B-A-----
Copolímero alternado

-----A-A-A-B-B-B-A-A-A-----
Copolímero em bloco

-----A-B-B-A-A-B-A-A-A-----
Copolímero randômico

-----A-A-A-A-A-A-A-A-A-----
| |
B B
| |
B B
| |
B B

Copolímero enxertado

Figura 1: Representação genérica dos diferentes tipos de sequências para homopolímeros e copolímeros.

1.3- Síntese de Polímeros

As polimerizações podem ser efetuadas por reações de adição ou de condensação. A polimerização por condensação dá-se quando, pelo menos duas moléculas reagem e há eliminação de uma molécula pequena, como por exemplo, água, HCl ou amônia. Este tipo de polimerização é usado como base para o preparo de polímeros tipo nylon, poliéster, e outros. Na polimerização por adição, as macromoléculas são formadas por reações de adição de olefinas, acetilenos, aldeídos e outros compostos portadores de ligações insaturadas. Poucas polimerizações acontecem espontaneamente. A maioria requer adição de pequenas quantidades de compostos chamados de iniciadores, que iniciam o processo de polimerização. Alguns exemplos de iniciadores são: peróxidos, azo compostos, ácidos de Lewis, espécies organo-metálicas ou ainda irradiação de alta energia (MANO, 1985).

1.3.1. – Polimerização de adição por mecanismo radicalar: (Obtenção de polímeros randômicos)

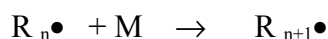
Em uma polimerização de adição via radicalar, o crescimento da cadeia está associado a um elétron não emparelhado de um radical. A adição de cada molécula do monômero à cadeia em crescimento envolve um ataque pelo radical ao monômero insaturado. Então, o elétron não emparelhado é transferido para a nova cadeia em crescimento em cada passo da adição (ALLCOK; LAMPE, 1990). Em algumas situações, as olefinas podem sofrer polimerização instantânea durante sua estocagem. A prevenção desta polimerização indesejada pode ser feita adicionando-se inibidores ao sistema. Os inibidores estabilizam as olefinas e devem ser retirados antes de se iniciar a polimerização. As etapas de uma polimerização radicalar podem ser descritas como:

1- Iniciação da cadeia: é um processo no qual moléculas muito reativas ou centros ativos são formados. A iniciação da polimerização requer a produção de radicais livres em presença do monômero insaturado. A iniciação pode ser produzida diretamente do monômero

(por irradiação com radiação de alta energia, como raios X ou raios γ) mas é mais freqüente a utilização de iniciadores, que são moléculas que se decompõem ou termicamente ou por irradiação gerando um par de radicais iniciadores.



2- Propagação da cadeia: é a adição de moléculas do monômero para o “sítio ativo” da cadeia em crescimento, acompanhado por regeneração do sítio ativo terminal.



3- Transferência de cadeia: envolve a transferência do sítio ativo para outra molécula.



4- Terminação da cadeia: é uma reação na qual os centros ativos da cadeia reagem para formação de uma molécula estável.



Onde:

$\text{R}'\bullet$ = iniciador.

M = monômero.

$\text{R}_n\bullet$ = propagação via radical livre com grau de polimerização n .

YZ = agente de transferência de cadeia, que pode ser solvente, monômero, iniciador ou moléculas de polímero.

P_n = polímero final.

Este tipo de polimerização é geralmente feita em fase líquida, e em alguns casos, o próprio monômero pode funcionar como solvente no estágio inicial da polimerização.

Decomposição térmica dos iniciadores: muitas substâncias decompõem-se em radicais livres, quando aquecidas. Se a temperatura de decomposição corresponde a uma

temperatura conveniente para a polimerização, a substância pode ser usada como iniciador. Tal decomposição térmica geralmente dá origem a dois radicais livres de uma molécula de iniciador por um processo de reação de 1ª ordem. A velocidade de polimerização é proporcional à raiz quadrada da velocidade da concentração do iniciador.:

$$V_p \propto \sqrt{[i]}$$

Esta afirmação é confirmada em uma grande variedade de medidas experimentais. Um aumento na concentração do iniciador tem efeito considerável na velocidade de polimerização, assim como um aumento na temperatura do sistema. A escolha do iniciador e a seleção da temperatura para a iniciação requer um compromisso a ser feito entre a necessidade de obter uma polimerização razoavelmente rápida e a necessidade de se obter um polímero de massa molecular alta (ALLCOK; LAMPE, 1990).

1.3.2. - Polimerização Iônica:

Uma polimerização iônica é uma reação de adição onde a cadeia de crescimento carrega uma carga positiva (polimerização catiônica) ou negativa (polimerização aniônica). Na iniciação iônica, a reação é promovida por carbocátions ou carbânions, resultantes do ataque do iniciador ao monômero. A reação é rápida e pode ser conduzida em temperaturas baixas (MANO, 1985). A iniciação catiônica geralmente se aplica a monômeros contendo insaturações entre carbonos cujos substituintes são doadores de elétrons, como éteres vinílicos, estireno e outros. Os iniciadores mais comuns são em geral halogenetos de Al, B, Ti e outros. A iniciação aniônica utiliza geralmente monômeros do tipo metacrilonitrila, cianeto de vinilideno e outros. Os iniciadores utilizados normalmente são reagentes de Grignard.

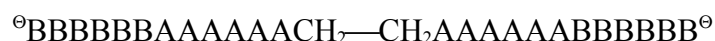
Na polimerização catiônica observa-se os seguintes passos:

- . Adição de um próton ao monômero dando origem a um carbocátion.
- . Adição do carbocátion a outra molécula do monômero gerando novo carbocátion.
- . Perda de um próton.

A cadeia em expansão é um cátion. Na ausência de bons nucleófilos o íon carbocátion intermediário adicionar-se-á a outro monômero formando um cátion de cadeia maior. A continuação do processo levará a um cátion polimérico. O término da polimerização pode ocorrer por perda de um próton da ponta da cadeia em expansão. No caso da polimerização aniônica, o iniciador é um reagente nucleófilo. A adição deste nucleófilo a um monômero vinílico dá origem a um carbânion que adiciona sucessivamente outros monômeros, formando um carbânion de massa molecular grande. Qualquer reação que destrua o carbânion poderá interromper a polimerização.

1.3.2.1 – Polímeros em bloco:

Polímeros em bloco são geralmente preparados por polimerização iônica. A maioria das cadeias iônicas terminais permanecem ativas, principalmente em temperaturas baixas, então, o crescimento da cadeia pode ser continuado pela adição de monômero do mesmo tipo inicial ou de monômero diferente. Se A representa o primeiro monômero e B o segundo monômero, o polímero pode ser representado pela estrutura abaixo (ALLCOK; LAMPE, 1990):



Na seqüência, outro monômero pode ser adicionando, originando copolímeros do tipo bloco.

1.3.3 - Polímeros enxertados ou grafitizados:

Os polímeros enxertados são obtidos quando um polímero pré-formado contém sítios para o crescimento de ramificações formadas por um novo monômero ou polímero. Algumas técnicas podem ser utilizadas para formar polímeros enxertados. A maioria delas envolve os seguintes passos:

1. Um iniciador tipo radical livre pode ser usado para retirar um átomo de hidrogênio de uma cadeia orgânica de um polímero. O radical polimérico formado origina o crescimento de um monômero vinílico.
2. A proporção da cadeia vinílica do polímero pode retirar um átomo de hidrogênio de um polímero pré-formado durante o passo de transferência de cadeia. O radical polimérico inicia o crescimento da cadeia do monômero.
3. O polímero pode ser irradiado por radiação UV, ou raio-X, ou radiação γ para gerar sítios de radicais livres ao longo da cadeia. Na presença de um monômero, estes sítios iniciam a polimerização enxertada.
4. Os dois polímeros pré-formados são misturados mecanicamente ou sujeitos a vigorosa agitação, em solução. Assim, as cadeias são mecanicamente clivadas.

1.4- Polímeros Inteligentes ou “*Smart*”

O comportamento estímulo-resposta é um processo básico de sistemas vivos (JEONG; GUTOWSKA, 2002). Nas últimas décadas, o desenvolvimento de polímeros sintéticos que imitam o comportamento de polímeros naturais, tem crescido de forma notável. Estas pesquisas levaram à sínteses de polímeros que respondem com mudanças rápidas e amplas em sua estrutura, em resposta a estímulos externos, tais como, alterações na temperatura (SHIBANUMA et al., 2000), pH (YIN; STÖVER, 2002), campo elétrico (KWON et al., 1991) ou magnético (KOST; LANGER, 1990), força iônica (VIRTANEN et al., 2002), ultra-som (RAPOPORT et al., 2003), dentre outros. Estes polímeros foram denominados inicialmente de polímeros sensíveis a estímulos (estímulo-resposta) e, atualmente costuma-se utilizar o termo polímeros inteligentes ou polímeros “*smart*”. Sua composição química é variada, encontrando-se, entre outros, poli(N-isopropilacrilamida) (KUBOTA et al., 1990), poli(óxido de etileno) (CHIU et al., 1998), poli(acrilamida)

(DEGUCHI; LINDMAN, 1999) e derivados de celulose (CABELLO, 2003). Algumas propriedades de sistemas poliméricos podem mudar em resposta a um estímulo. Por exemplo: quando um polímero solúvel é estimulado a precipitar, ele será seletivamente removido da solução, que se tornará turva (KINAM PARK, 1997). Como o comportamento estímulo-resposta destes polímeros ocorre em solução aquosa, um interesse crescente nas áreas médicas e biotecnológicas vem sendo observado, como por exemplo em biocatálise imobilizada, em bio-separação (figura2), em superfícies termo-sensíveis e em sistemas transportadores de fármacos (figura 3) (GALAEV; MATTIASSON, 1999).

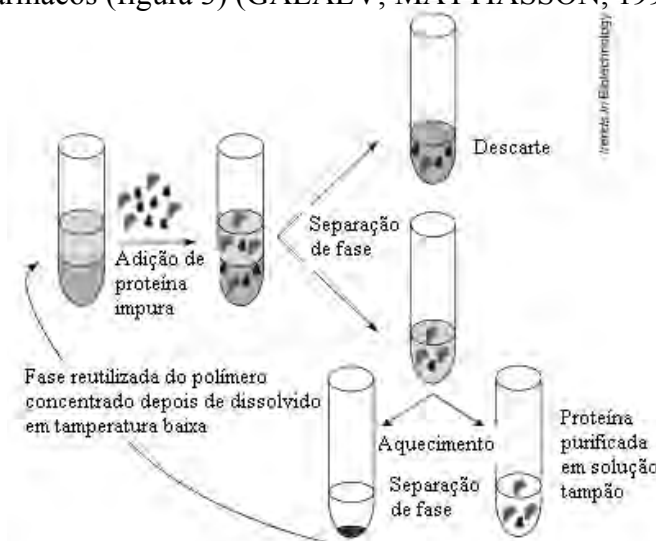


Figura 2: Esquema para purificação de proteína usando extração em sistema de duas fases, onde a fase superior corresponde a um polímero termo-sensível (GALAEV; MATTIASSON, 1999).

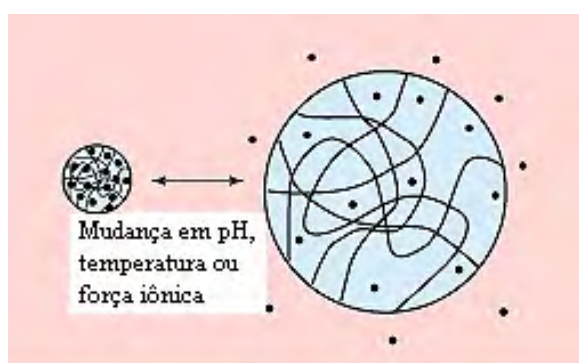


Figura 3: Sistema liberador de fármaco, tipo hidrogel, formado por polímero “smart”. O fármaco transportado pelo sistema é liberado quando o polímero responde a um estímulo externo, aumentando de tamanho, ou “inflando”(PEPPAS, 1997).

1.4.1 - Polímeros Termo-sensíveis

Uma das propriedades interessantes para se conferir à polímeros inteligentes é a sensibilidade à temperatura (LIU et al., 2004). Estes polímeros, conhecidos como polímeros termo-sensíveis, apresentam alteração em sua estrutura e propriedades em resposta a uma mudança na temperatura do sistema (GAO et al., 2005). Em geral, a solubilidade da maioria dos materiais aumenta com o aumento da temperatura (EECKMAN et al., 2002). Na maioria das vezes, soluto e solvente são miscíveis se a temperatura do sistema é maior que a chamada “*upper critical solution temperature*”(UCST) e esses sistemas são ditos terem uma dependência positiva com a temperatura. Se a temperatura apresentar valor menor que a UCST, o sistema exibe uma transição de fase e o soluto precipita. Entretanto, alguns polímeros, em solução aquosa, mostram um comportamento contrastante. Quando a temperatura aumenta acima de certo ponto, comumente chamado de “*lower critical solution temperature*”(LCST), eles tornam-se insolúveis e são ditos terem dependência negativa com a temperatura. Abaixo da LCST o polímero é solúvel em fase aquosa e apresenta cadeia estendida e rodeada por moléculas de água. Acima da LCST, o polímero torna-se insolúvel e ocorre a separação de fase (figura 4 e 5).

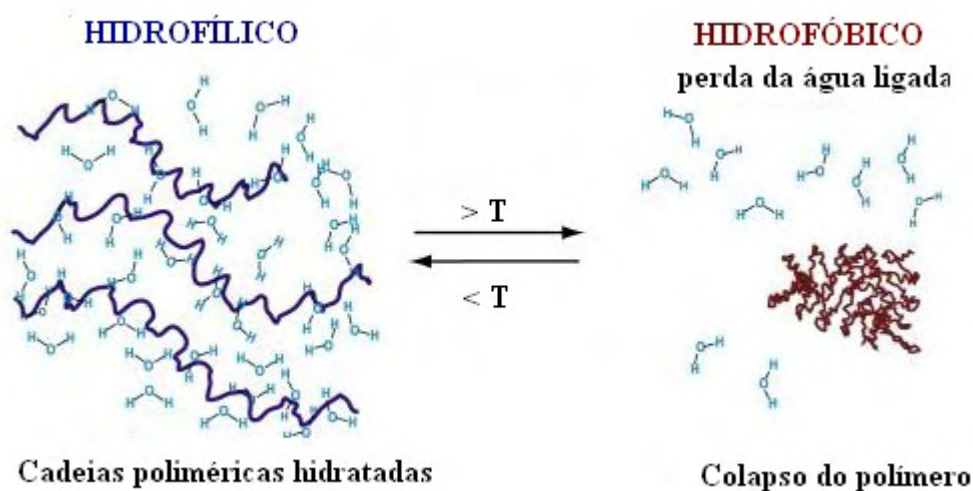


Figura 4: Representação esquemática da transição de fase para um polímero termo-sensível.



Figura 5: Solução de um polímero termo-sensível antes (a) e depois (b) da LCST, respectivamente.

Este comportamento, por um lado é importante para pesquisa básica e teórica e por outro lado pode ser utilizado para formar materiais inteligentes como nano ou micro-materiais, tais como hidrogéis, micelas e cápsulas. As figuras 6, 7 e 8 mostram o comportamento em relação à LCST de sistemas constituídos por micelas poliméricas, hidrogéis e microcápsulas, respectivamente.

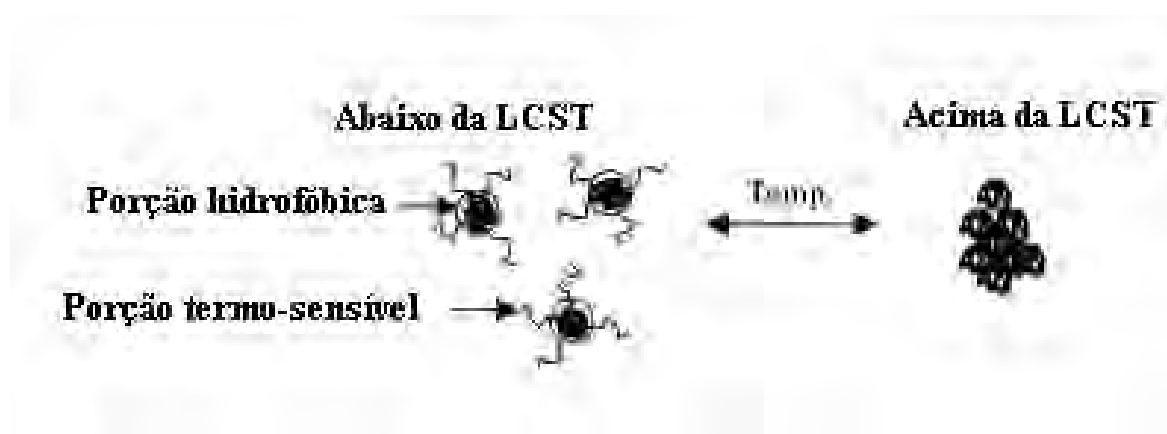


Figura 6: Micelas poliméricas constituídas de porção hidrofóbica e porção termo-sensível, em temperatura abaixo e acima da LCST da porção termo-sensível (GIL et al., 2004).

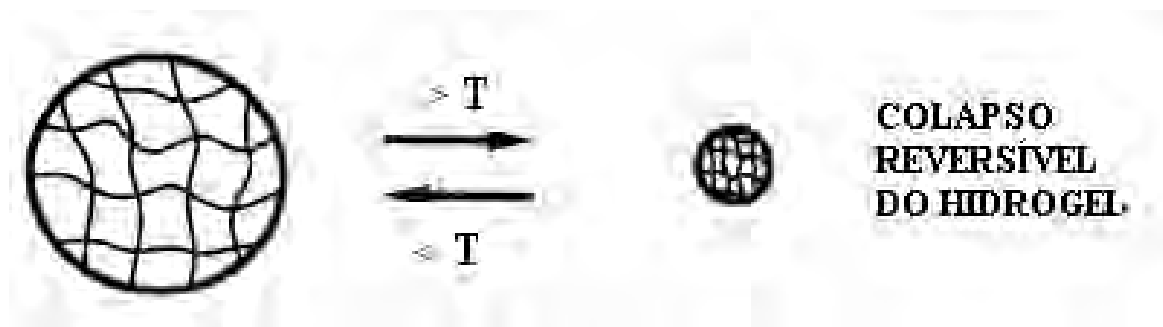


Figura 7: Hidrogel constituído de polímero sensível à temperatura e a mudança de tamanho (“infla-encolhe”) em resposta à mudanças na temperatura (HOFFMAN, 2000).

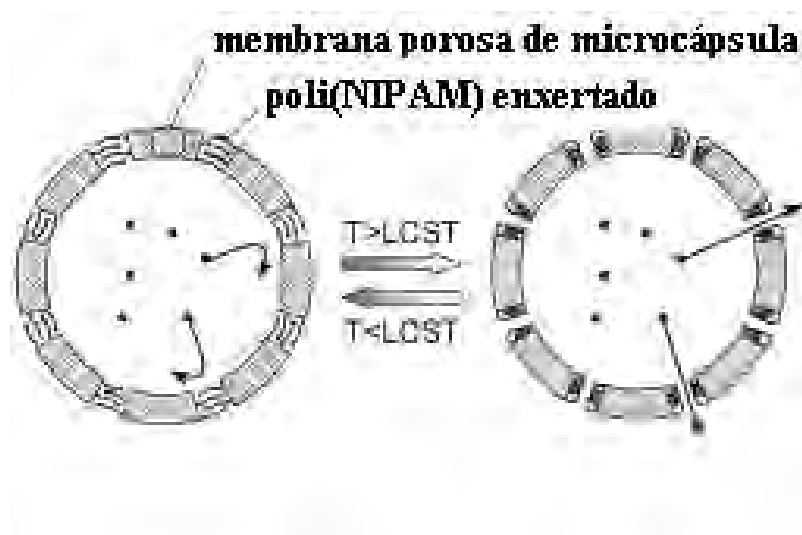


Figura 8: Comportamento estímulo-resposta de microcápsulas transportadoras de fármacos, com polímero termo-sensível na estrutura da casca (CHU et al.,2001).

Poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm) é um polímero termo-sensível típico, com dependência negativa à temperatura, conhecido por apresentar uma LCST em meio aquoso em torno de 32°C, abaixo da qual o polímero é solúvel e acima da qual ele está em uma fase “colapsada” ou insolúvel em água (GAO et al., 2005). PNIPAm não tem somente grupos hidrofílicos (NH, C=O) mas tem também um grupo hidrofóbico (isopropil), portanto, tanto a interação hidrofílica como a interação hidrofóbica podem ter um papel determinante na termo-sensibilidade deste polímero (LIN et al., 1999). A transição de fase do PNIPAm em

solução aquosa é compreendida como um resultado da desidratação das cadeias dos polímeros acima da temperatura de turvação, isto é, a quebra de ligações de hidrogênio entre os grupos amida do PNIPAm e moléculas de água, levando a cadeia do polímero para uma conformação globular. Esta transição é conhecida como transição “*coil*” a globular, e conduz à agregação do polímero e então, à turvação do sistema.

Do ponto de vista termodinâmico, o processo de mistura em temperaturas baixas, é favorecido pela formação de ligações de hidrogênio, o que leva a uma entalpia negativa de mistura. Entretanto, apesar do ganho moderado na entropia composicional resultante do processo de mistura, moléculas de água interagindo por ligações de hidrogênio com cadeias de PNIPAm originam uma entropia orientacional muito baixa. A separação de fase ocorre com o aumento da temperatura devido a uma contribuição desfavorável da entropia para a energia livre (COSTA; FREITAS, 2002). Para que um polímero apresente dependência negativa com a temperatura, há a necessidade de uma entalpia de mistura negativa e de uma entropia de mistura negativa. A entalpia negativa se opõe à separação pois contribui para um decréscimo na energia livre do sistema. No entanto, em uma temperatura suficientemente alta, o termo entrópico ($-T\Delta S$), que é favorável à separação, supera a contribuição entálpica, resultando em uma energia livre positiva, levando à separação de fase. Estes processo de dissolução/precipitação em água em resposta à temperatura, são reversíveis.

Um aspecto importante e útil no estudo de PNIPAm e de outros polímeros termosensíveis, por exemplo, (poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamida lactato) (SOGA et al., 2004), é a possibilidade de modificar a LCST pela adição de grupos hidrofílicos ou hidrofóbicos ou pela adição de cossolventes ou surfactantes (YOO; SUNG, 1997). Barker et al, 2003 sintetizaram NIPAm com N,N-dimetilacrilamida alterando o balanço hidrofílico/hidrofóbico e estudaram o efeito sobre a LCST e Eeckman et al, 2004 sintetizaram NIPAm com N-vinilacetamida e com N-vinil-2-pirrolidinona e estudaram os mesmos efeitos.

Ambos os autores obtiveram polímeros que exibiram um aumento na temperatura de turvação pela adição de monômeros hidrofílicos ao NIPAm. Takeda et al, 2004 sintetizaram NIPAm com N,N-dimetilaminoetilmetacrilato e butilmetacrilato, que são monômeros hidrofóbicos e obtiveram resultados que mostram um decréscimo na temperatura de turvação destes polímeros relativamente ao PNIPAM.

1.4.2 – Polímeros Sensíveis ao pH

A combinação de sensibilidade à temperatura com sensibilidade ao pH em um mesmo polímero, pode tornar a LCST especialmente sensível ao pH, devido à característica hidrofílica do estado ionizado do monômero sensível ao pH (KINAM PARK, 1997). Polímeros contendo grupos ionizáveis em geral, formam uma “estrutura” estendida, quando os grupos estão ionizados, como resultado da repulsão mútua entre os grupos carregados. No caso dos polímeros também possuírem grupos alquila em meio aquoso, então estes estarão sujeitos a interações hidrofóbicas que tenderão a restringir a cadeia alquílica a um volume mínimo, permitindo desta maneira, a ocorrência de fortes ligações de hidrogênio entre as moléculas de água. Este fenômeno, conhecido como efeito hidrofóbico, é a principal força na formação de sistemas tais como os encontrados nas membranas biológicas (TONGE; TIGHE, 2001).

Polímeros que possuem grupos ionizáveis doadores de prótons tornam-se carregados em soluções onde os valores de pH encontram-se acima de seu pKa e, se possuem grupos ionizáveis receptores de prótons tornam-se carregados em soluções onde os valores de pH encontram-se abaixo de seu pKa. A repulsão eletrônica devido à presença de cargas na parcela ionizável do polímero supera as interações atrativas entre as cadeias alquílicas. Isto leva a um estiramento das cadeias poliméricas. Com a diminuição do pH, a proporção dos grupos

carregados diminui e as interações hidrofóbicas das cadeias alquílicas tornam-se predominantes, causando à cadeia polimérica um colapso progressivo, levando à formação de microdomínios hidrofóbicos. Este efeito é conhecido como associação hidrofóbica, um processo que resulta na formação de uma cadeia compacta insolúvel, que muitas vezes pode levar à precipitação.

Portanto, polímeros que possuem grupos alquílicos e grupos fracamente carregados negativamente (por exemplo, grupos carboxílicos) exibem uma cadeia estendida acima de seu pKa e quando o pH é diminuído há um colapso da cadeia (figura 9). Em um copolímero vinílico randômico com sensibilidade tanto à temperatura como ao pH, uma quantidade de monômero ionizável em torno de 10% em mol é suficiente para eliminar a LCST do principal monômero com sensibilidade á temperatura, quando o pH é aumentado a valores maiores do que o pK do monômero sensível ao pH (KINAM PARK, 1997).

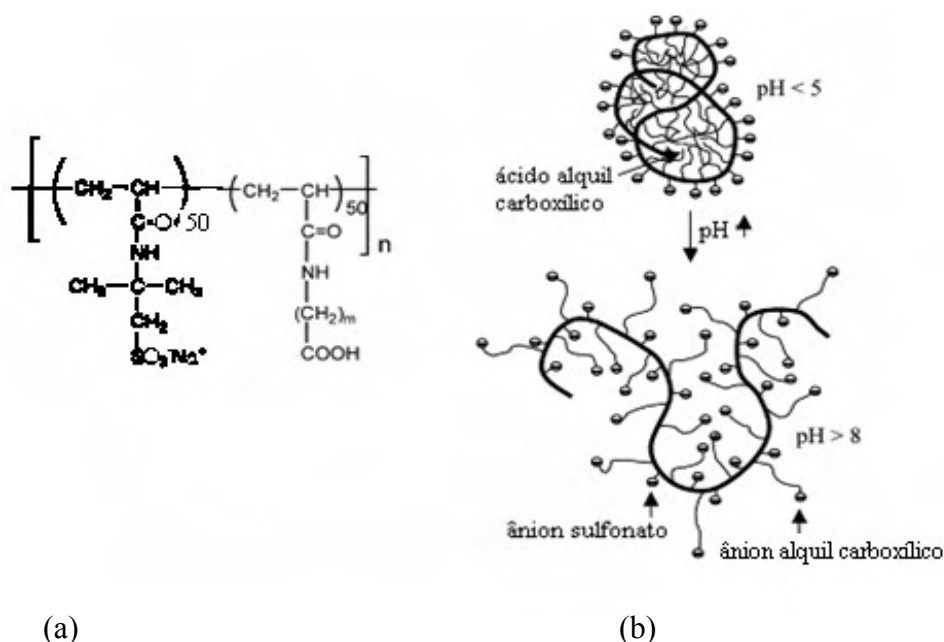


Figura 9: a) Copolímero de 2-(acrilamida)-2-metilpropanosulfonato de sódio com monômero possuidor de cadeia alquílica com grupo carboxílico. b) Esquema da resposta do polímero ao pH (GIL et al., 2004).

1.5 – O efeito da força iônica em polímeros inteligentes

Em geral, quando adiciona-se eletrólitos em dispersões aquosas coloidais, provoca-se floculação. Este fenômeno é chamado de efeito “*salting out*”. Um efeito similar pode ser observado com polímeros termo-sensíveis para os quais há um decréscimo da temperatura de transição na presença de pequenas quantidades de sais (EECKMAN et al., 2001). Liu et al, 2004 estudaram o efeito do sal na transição de fase de copolímeros anfífilicos termo-sensíveis de NIPAm e observaram um efeito significativo na temperatura de transição, sendo que o aumento da concentração de sal provocou um decréscimo na temperatura de turvação de todos os polímeros anfífilicos sintetizados. O processo de “*salting out*” observado para soluções salinas aquosas de PNIPAm pode ser explicado como uma combinação de alguns fatores: mudança da estrutura da água na camada de hidratação do polímero e mudanças das interações do polímero e o solvente, devido à presença de sais (EECKAMN et al., 2001) . Quando PNIPAm é dissolvido em água, ele é rodeado por uma camada de hidratação. A adição de sal à solução aquosa de PNIPAm muda as propriedades da camada de hidratação e pode causar um rompimento das moléculas de água altamente orientadas que rodeiam o polímero. Isto resulta em um aumento do caráter hidrofóbico da cadeia do PNIPAm, com conseqüente diminuição da temperatura de transição do polímero. Alguns sais aumentam a LCST de polímeros, fenômeno conhecido como efeito “*salting in*”. Lee et al, 1999 estudaram o efeito da adição de vários sais inorgânicos em polímeros anfífilicos termo-sensíveis de PEO (poli(óxido de etileno)) e observaram que o tamanho do ânion é importante no efeito do sal sobre a temperatura de turvação. Concluíram que ânions grandes como o I^- provocam o efeito “*salting in*” indicando que agem como destruidores da estrutura da água (ou seja, das ligações intermoleculares da água), sendo assim, as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e as cadeias dos polímeros são favorecidas, resultando numa temperatura de turvação maior. Dois mecanismos são propostos para explicar o efeito “*salting in*” (PERREUR et al., 2005). O

primeiro mecanismo é descrito como indireto: o sal quebra a “conexão” entre o polímero e a água para complexar-se com o polímero. O complexo formado é eletricamente carregado, o que promove atração eletrostática com unidades vizinhas e isto leva a uma maior solubilidade do polímero. O segundo mecanismo é conhecido como direto, e neste caso, as ligações polímero-solvente são pouco afetadas pelas moléculas de sal que estão associadas em volta do polímero, evitando a desidratação.

Ao contrário, o efeito “*salting out*” é baseado na interação entre moléculas de sal e água, o que diminui significativamente a solubilidade do polímero. O efeito “*salting out*” aumenta com a multivalência dos íons e decresce com o aumento do raio dos mesmos, ou seja, quanto maior a carga e menor o raio do íon, mais pronunciado é o efeito (LEE et al., 1999). Eeckman et al, 2001 estudaram o comportamento de soluções de PNIPAM em presença de vários sais que produzem o efeito “*salting out*” e concluíram que para a série de haletos a ordem de eficiência é $F > Cl > Br > I$. A figura 10 mostra um modelo estímulo-resposta para copolímero do tipo “tri-bloco” com blocos sensíveis ao pH e à adição de sais.

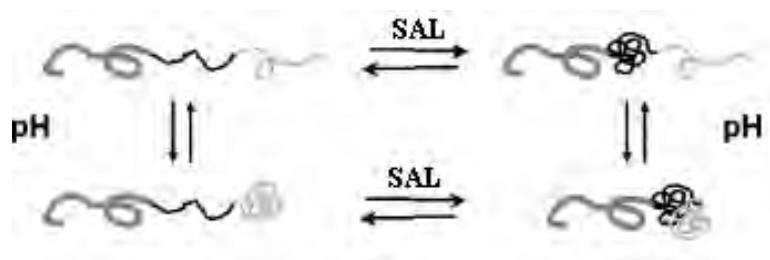


Figura 10: Modelo idealizado para o comportamento de copolímero tri-bloco sensível ao pH e à adição de sal, quando exposto à diferentes seqüências de estímulos (MERTOOGHU et al., 2005).

1.6 – Propriedades de Polímeros Inteligentes

1.6.1 - Auto-organização e transporte de fármacos nos microdomínios

Polímeros anfífilicos têm sido investigados não somente por suas características de auto-organização mas também por sua potencialidade como transportadores de fármacos. As características dos polímeros anfífilicos dependem da natureza de cada segmento. As propriedades de superfície das micelas auto-organizadas podem ser muito dependentes do segmento hidrofílico. Por outro lado, as características do miolo micelar podem ser determinadas pela estrutura do segmento hidrofóbico. Este comportamento micelar pode ser investigado utilizando-se técnicas fluorescentes, espalhamento de luz, tensiometria e microscopia de transmissão de elétrons (CHANG et al., 2002). Em solução aquosa, há algumas forças que controlam a agregação de polímeros anfífilicos, isto é, associações entre segmentos hidrofóbicos, ligações de hidrogênio entre segmentos hidrofílicos e moléculas de água e ligação de hidrogênio entre cadeias hidrofílicas (CHANG et al., 2002). A força motriz para a auto-associação de polímeros anfífilicos em meio aquoso é a associação entre segmentos hidrofóbicos. As ligações de hidrogênio entre cadeias hidrofílicas tendem a contrai-las enquanto que as ligações de hidrogênio entre cadeia hidrofílica-água atuam como uma força repulsiva para evitar a agregação destas cadeias e estabilizar os agregados.

Para polímeros sensíveis à temperatura, a auto-associação das cadeias hidrofóbicas torna-se maior em temperatura superior à LCST e reduz a solubilidade do polímero. Os segmentos hidrofílicos sofrem uma transição de fase reversível de solúvel para insolúvel e agregados hidrofóbicos são formados acima da LCST. Esses dois efeitos diminuem a solubilidade do polímero em água (LIU et al., 2004). A formação dos agregados tipo micelas é espontânea se uma parte do polímero é hidrofóbica favorecendo a construção de uma estrutura miolo-casca (figura 11) (CHANG et al., 2002).

Micelas poliméricas são distintas de outros transportadores de drogas particulados pelas seguintes propriedades: o menor tamanho comparado a lipossomos e micropartículas; a ausência de um compartimento interior aquoso; a existência de um interior hidrofóbico e, dependendo da composição, a proteção efetiva de uma casca hidrofílica.

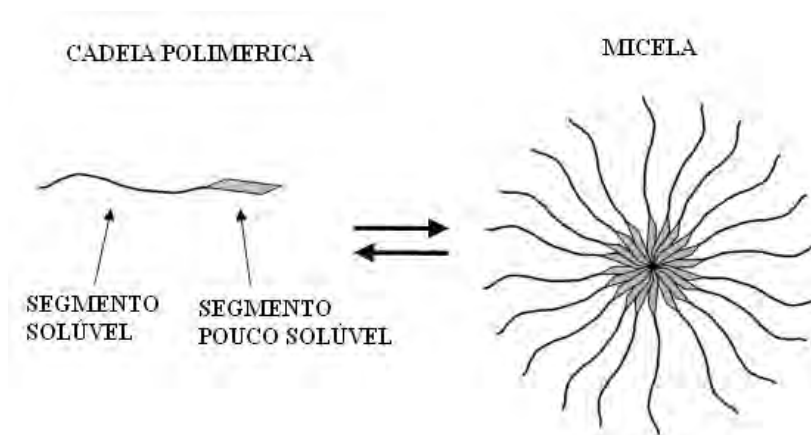


Figura 11: Esquema geral de formação de micelas de moléculas anfifílicas em solventes polares. (TORCHILIN, 2001)

Ao contrário dos lipossomos, que incorporam fármacos solúveis em seu interior aquoso, as micelas poliméricas podem ser transportadores para fármacos pouco solúveis em água. Os requisitos termodinâmicos essenciais para a formação de micelas de polímeros anfifílicos são os mesmos que para a micelização de qualquer anfifílico de baixa massa molar. A força motriz da auto-associação é o decréscimo da energia livre do sistema devido à remoção de fragmentos hidrofóbicos do meio aquoso, com conseqüente formação de uma micela estabilizada pelas cadeias hidrofílicas expostas à água.

Da mesma maneira que para os surfactantes de baixa massa molar, que apresentam uma CMC (concentração micelar crítica), o parâmetro que caracteriza a formação de agregados tipo micelas é a CAC (concentração de agregação crítica), e indica a concentração

na qual um polímero anfifílico em solução inicia o processo de formação de micelas. Nesta condição, existe um equilíbrio polímero-micela. (TORCHILIN, 2001).

Copolímeros anfifílicos em geral exibem uma CAC (CMC) mais baixa que surfactantes de baixa massa molecular. Chiu et al, 1998 sintetizaram copolímeros anfifílicos com poli(etilenoglicol)metacrilato, metilmetacrilato e ácido acrílico para serem utilizados como transportadores de fármacos e encontraram valores para a CMC das micelas obtidas em torno de $2 \times 10^{-3} \text{ mg dm}^{-3}$ e Xu et al, 1991 mediram a CMC de copolímeros de PEG e poli(estireno, encontrando valor de $4 \times 10^{-3} \text{ mg dm}^{-3}$. Na CMC e levemente acima dela, as micelas ainda estão soltas e contém um pouco de água em seu miolo. Com adicional aumento na concentração do anfifílico, o equilíbrio unimicelar desloca –se em direção à formação de micelas que tornam-se mais rígidas e estáveis, perdem o solvente residual do miolo e diminuem de tamanho. Isto é importante do ponto de vista farmacológico, desde que, na corrente sanguínea, somente micelas com baixos valores de CMC podem existir, enquanto micelas com alto valor de CMC provavelmente dissociam-se e precipitam no sangue, podendo liberar o fármaco antes do alvo desejado (TORCHILIN, 2001).

O miolo hidrofóbico das micelas ou dos agregados, rodeado e estabilizado pela casca externa, aumenta a dispersão, inibe interações intermicelares e interações com outros agregados. Ele pode solubilizar moléculas hidrofóbicas, devido ao seu microambiente apolar. Esta estrutura ordenada e heterogênea apresenta oportunidades para a construção de sistemas transportadores de fármacos (TORCHILIN, 2001). Transportadores poliméricos solúveis são interessantes pois melhoram a farmacocinética do fármaco, ou seja, melhoram a velocidade com que os fármacos atingem o sítio de ação e são eliminados pelo organismo (CHIN; FERREIRA, 1999), e levam a um aumento do acúmulo do fármaco livre devido ao chamado efeito EPR (permeabilidade e retenção aumentada). Micelas poliméricas com fármacos

incorporados podem acumular em tumores com uma extensão maior do que o fármaco livre (JONES, 1999).

A estrutura anatômica dos vasos tumorais desempenha um papel importante na distribuição do fármaco no espaço intersticial, pois apresentam aumento da permeabilidade micro-vascular em relação ao vaso normal, permitindo a penetração de macromoléculas. Os tecidos tumorais são caracterizados por alta pressão intersticial, o que pode retardar o extravasamento de moléculas. Além disso, a falta de um sistema linfático para drenagem resulta em um acúmulo de macromoléculas no interior dos tecidos tumorais (figura 12) (CHIN; FERREIRA, 1999).

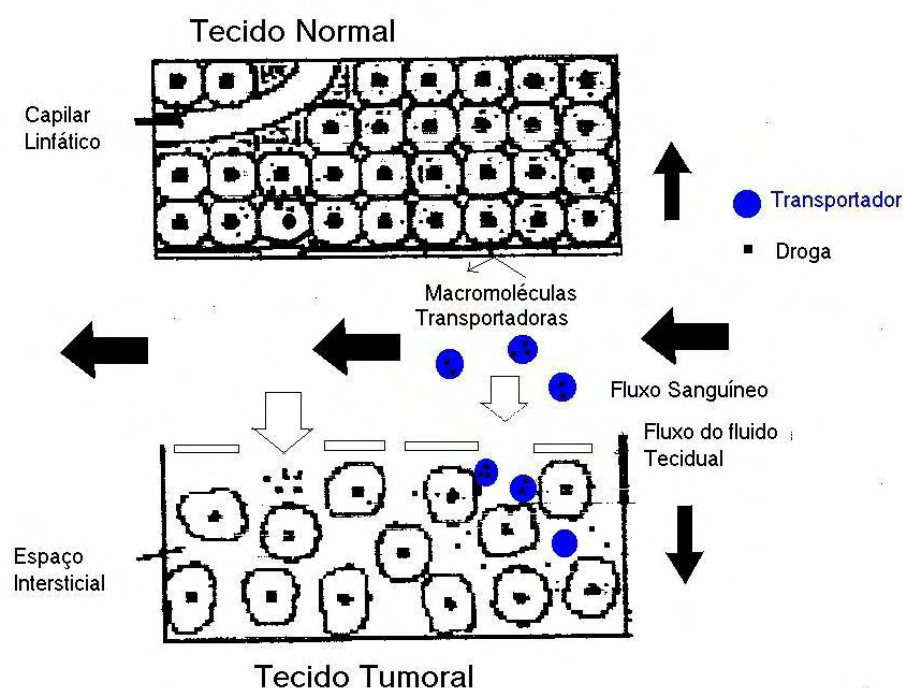


Figura 12: Representação das características anatômicas e fisiológicas de tecido normal e tumoral e o uso de sistemas transportadores poliméricos (CHIN; FERREIRA, 1999).

Estando no interior da micela, o fármaco é protegido de possíveis inativações devidas a ambientes biológicos que o rodeia, não provoca efeitos colaterais indesejáveis e a sua bioeficiência é aumentada. A micela é estruturada de tal modo que sua superfície externa

exposta ao meio aquoso impede a adsorção de opsoninas (proteínas do plasma) que levaria a um reconhecimento rápido pelo sistema retículo-endotelial. Esta peculiaridade estrutural permite à micela ficar por um tempo longo no sangue (e em tecidos) sem ser reconhecida pelas células fagocíticas. O tempo de vida da micela no sistema sangüíneo é um fator extremamente importante no uso de micelas como transportadores de fármacos (STURESSON; CARFORS, 2000).

Alguns tipos de sistemas transportadores, microesferas, lipossomos e polímeros, têm sido investigados especialmente para serem utilizados em liberação de fármacos anti-câncer. Entretanto, a limpeza não-seletiva pelo sistema retículo-endotelial (RES) é uma barreira que os sistemas transportadores enfrentam. Um sistema transportador de fármaco formado por micelas poliméricas minimiza este problema em relação ao sistema transportador convencional, utilizando algumas características de micelas poliméricas. Dependendo da composição a casca externa altamente hidratada das micelas poliméricas pode inibir agregações intermicelares do miolo hidrofóbico. Conseqüentemente, micelas poliméricas mantêm o fármaco hidrofóbico dentro do miolo hidrofóbico. Além disso, o tamanho das micelas poliméricas (menor que 100 nm) pode inibir a limpeza não-seletiva pelo RES. O reconhecimento pelo RES é considerado baixo para partículas menores que 200 nm. Similarmente, a acumulação de partículas dentro de tumores é determinada pela sua habilidade de penetrar através de poros vasculares, o que é fortemente dependente de seu pequeno tamanho (LIU et al., 2000).

Copolímeros que contêm poli(óxido de etileno), também conhecido como poli(etilenoglicol) (PEG) vêm sendo freqüentemente sintetizados e estudados e têm sido sugeridos como veículos em sistemas transportadores de fármacos, devido, principalmente, à sua biocompatibilidade e não-toxicidade. PEG com massa molecular 4000 é 98% excretado em humanos. A inclusão de PEG em sistemas poliméricos fornece ao polímero propriedades

de superfície muito benéficas dentro do corpo, por causa de sua habilidade em repelir proteínas em meio aquoso. Esta repulsão inibe a adsorção de opsoninas para a superfície do polímero e então, previne muitas interações células-polímeros (UHRICH, 1999). Além disso, a utilização de PEG como segmento hidrofílico é interessante pois o custo é relativamente acessível. Recentemente, várias tentativas têm sido feitas para minimizar o problema da remoção de sistemas transportadores pelo RES. Stolnik et al, 1994 mostraram que nanoesferas de poli(lactide-co-glicolide) (PLGA) revestidos pelo copolímero biodegradável poli(L-lactide)-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) foram menos suscetíveis ao aprisionamento hepático que nanosferas de PLGA não revestidas. Nanosferas de PEG-PLGA e nanopartículas de PEG-PLA permaneceram na circulação sanguínea por um tempo mais longo, favorecendo maior retenção do fármaco no alvo desejado

1.6.2 – Formação de microcápsulas

Microcápsulas são partículas pequenas que contêm um agente ativo ou miolo rodeado por uma casca ou cobertura. Não há ainda um consenso para a classificação do tamanho da partícula, mas em geral, comercialmente considera-se como microcápsulas aquelas com tamanho entre 3 e 800 μm . Abaixo de 1 μm a partícula passa a chamar-se nanocápsula (STOLNIK et al., 1994). Um fato interessante referente à microcápsulas é que elas não se destinam apenas à área médica, mas também podem ser aplicadas nos campos da agricultura (SOUZA, 2001), cosméticos e alimentação (PARK et al., 2004). A maioria das microcápsulas para uso médico presentes no mercado atual destina-se a aplicações orais, mas vem crescendo visivelmente a aplicação via parenteral (intramuscular ou subcutânea) (CHIAPPETTA, 2000). A microencapsulação de medicamentos surgiu na década de 50 com a finalidade de se conseguir uma liberação segura e prolongada de fármacos. A aspirina foi o primeiro fármaco a ser encapsulado com a intenção de prevenir irritações gástricas (SIMON BENITA, 1996).

Devido à sua grande versatilidade, polímeros são geralmente utilizados no preparo de microcápsulas, podendo ser polímeros naturais (quitosana, dextrana e outros) ou sintéticos. Entre os métodos de preparação, geralmente o mais utilizado é o método de evaporação do solvente. Esta técnica é baseada na evaporação da fase interna de uma emulsão, por agitação (SIMON BENITA, 1996). Para analisar a morfologia das microcápsulas geralmente utiliza-se a microscopia eletrônica de varredura, que permite também detectar uma possível agregação das partículas, assim como determinar o tamanho das mesmas. As microcápsulas poliméricas oferecem vantagem ainda com respeito à estabilidade, visto que elas são armazenadas na forma de pó liofilizado a ser reconstituído imediatamente antes de sua utilização (CHIAPPETTA, 2000). Park et al., 2004 prepararam microcápsulas com o polímero poli(l-lactide)-poli(etilenoglicol) pelo método de evaporação do solvente, incorporando o antibiótico eritromicina, obtendo micropartículas de tamanho entre 40 a 57 μm , com eficiência de encapsulação entre 40 a 57%. Avaliaram a liberação do fármaco in vitro. Liu et al., 2003 prepararam microcápsulas sensíveis à temperatura a partir do polímero PNIPAM – PLA pelo método de evaporação do solvente e encapsularam serum albumina bovina (BSA) como modelo de proteína. Obtiveram microcápsulas com tamanho variando de 29 a 35 μm e eficiência de incorporação de 90% e avaliaram a liberação de BSA in vitro.

Outra vantagem da encapsulação de fármacos é que o princípio ativo é liberado de forma controlada e, graças ao recobrimento do fármaco com um material adequado, é possível conseguir uma liberação gradual e segura do mesmo (SIMON BENITA, 1996).

1.7 – Técnicas Fotofísicas Aplicadas ao Estudo de Polímeros Anfífilicos .

1.7.1 – Fluorescência

A fluorescência é o processo de emissão de radiação entre estados eletrônicos de mesma multiplicidade (fig 13). Estas transições são rápidas, ocorrendo na escala de $10^{-7} - 10^{-9}$

segundos. A fluorescência tem sido empregada como técnica para investigação de estrutura e dinâmica de sistemas anfífilicos, por ser sensível e por a molécula da sonda empregada não afetar a estrutura destes sistemas organizados (LACERDA, 2001).

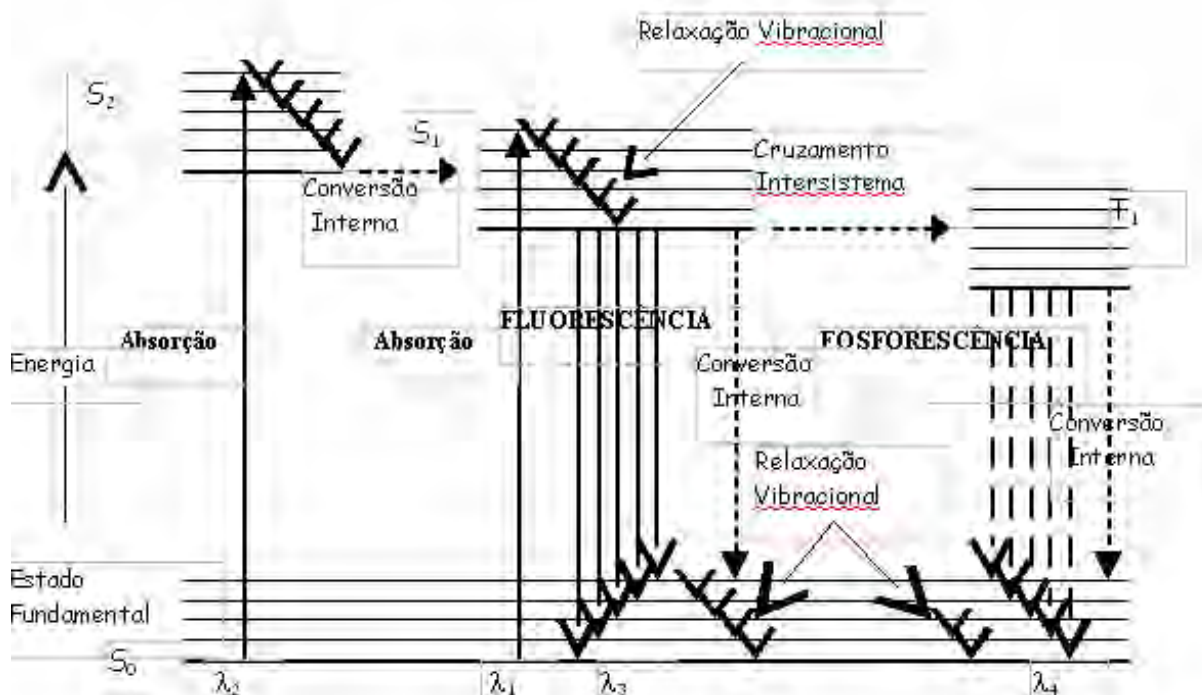
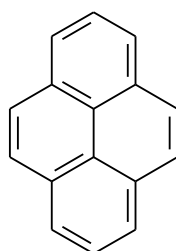


Figura 13: Diagrama de Jablonsky para energia e processos de interconversão (LACERDA, 2001).

As soluções aquosas de polímeros anfífilicos constitui uma classe de sistema micro-heterogêneos de particular interesse tecnológico desde que tais sistemas apresentam propriedades incomuns e úteis. O uso de sondas fluorescentes revela a presença de sítios hidrofóbicos (que se pode supor serem agregados semelhantes à micelas) em solução aquosa destes polímeros. Sondas fluorescentes são moléculas sensíveis à mudança de polaridade e à microviscosidade do meio que as rodeiam. As sondas usadas não são solúveis ou são muito pouco solúveis em água, mas dissolvem-se na presença dos polímeros e são encontradas

técnicas fluorescentes para verificar a presença de sítios hidrofóbicos em copolímeros de ácido acrílico-ácido metacrílico-metilmetacrilato-butilmetacrilato, utilizando o pireno como sonda fluorescente. Itoh et al, 1996 utilizaram o pireno como sonda fluorescente para estimar a hidrofobicidade do microambiente em micelas de n- β -octilglicoside e Nilsson et al, 1999 estudaram o comportamento de associação de hidroxietilcelulose modificada hidrofobicamente, com a utilização de sondas fluorescentes, para obter informações sobre a microviscosidade e polaridade dos microdomínios formados pelo sistema anfifílico.

1.7.1.1- O pireno como sonda fluorescente



A molécula de pireno tem uma série de vantagens para ser usada como sonda fluorescente: ela mostra uma mudança relativa na estrutura de seu espectro de fluorescência em resposta à mudança de polaridade do meio; a eficiência de formação de excímeros, que pode ser monitorada pelo espectro de fluorescência do pireno em torno de 480 nm, pode ser usado para indicar se uma única molécula de pireno está dentro de uma micela; a molécula do pireno não contém partes hidrofílicas que poderiam ser atraídas à interface dos sistemas micro-heterogêneos (LACERDA, 2001). Portanto, a molécula de pireno deve penetrar no interior hidrofóbico destes sistemas. A estrutura fina do espectro de emissão do pireno mostra 5 picos predominantes. A emissão dos chamados picos 1 e 3 mostram uma variação da intensidade com a polaridade do meio. Então, a razão das intensidades dos picos 1 e 3 (I_1/I_3) fornece um indicativo da polaridade do meio. Pireno solubilizado em ambientes apolares mostra valores para I_1/I_3 menores do que aqueles obtidos em ambientes polares. Por exemplo:

em água, $I_1/I_3 = 1,9$, enquanto em um solvente apolar (ciclo hexano), $I_1/I_3 = 0,58$ (CAPEK, 2002). A figura 14 mostra o espectro de emissão do pireno em soluções de n-octilglicosídeo (ITOH et al., 1996) e a figura 15 mostra espectros de emissão do pireno em dextranas hidrofobicamente modificada, com a formação de excímeros (BLAZ VIEIRA et al, 2003).

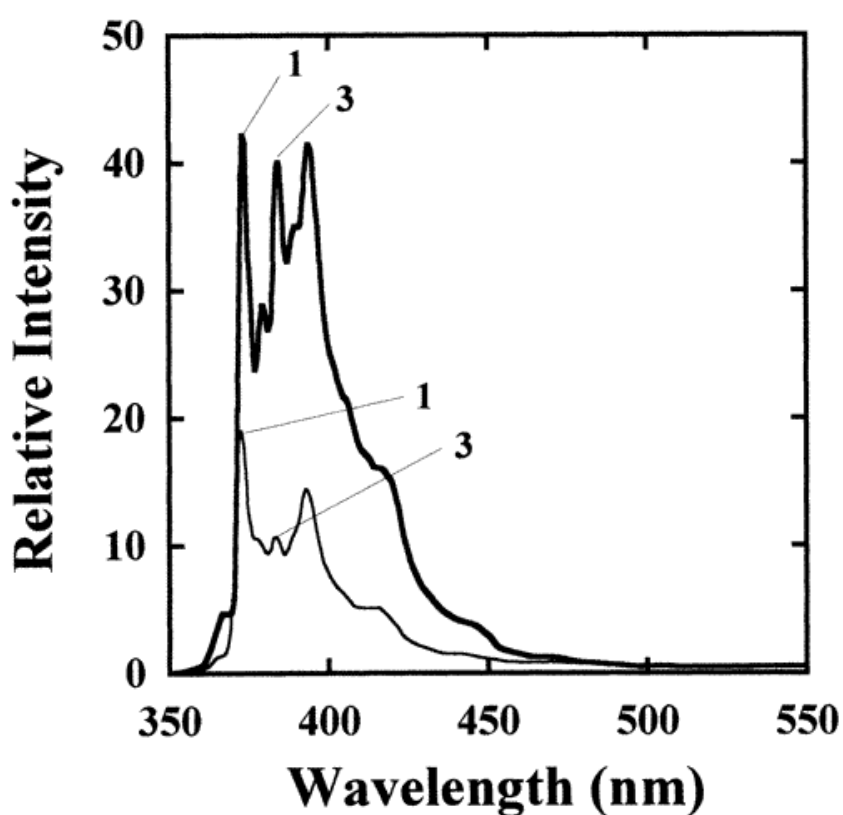


Figura 14: Espectro de emissão do pireno (1,5 μ M) em soluções de n-octilglicosídeo a 25° C. Linha fina: 6 mM. Linha espessa: 35 mM (Itoh et al., 1996)).

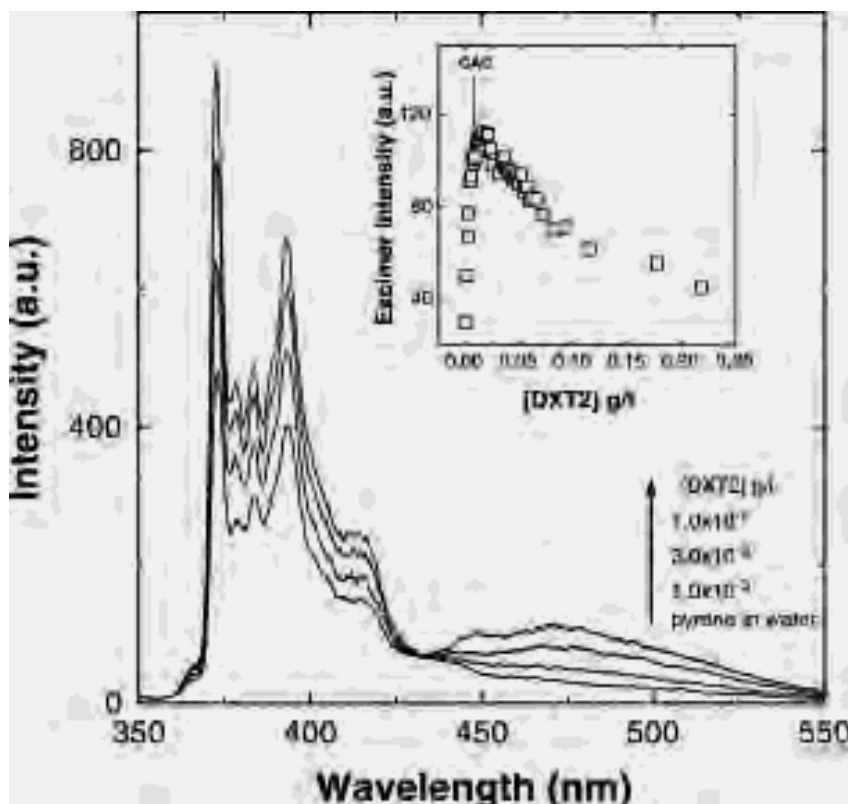


Figura 15: Espectro de emissão do pireno (1μM) na presença de concentrações crescentes de dextrana hidrofobicamente modificada com cloreto de p-hexilbenzoila. No encarte: Emissão do excímero em função da concentração da dextrana modificada (BLAZ VIEIRA et al., 2003).

1.7.1.2- Anisotropia de Fluorescência

Uma das técnicas mais utilizadas na medida de fluidez de membranas lipídicas é a polarização da fluorescência ou anisotropia (r), onde cromóforos incorporados às membranas são usados como medida da intensidade do movimento ao acaso da sonda, durante o tempo de vida no estado excitado, que é limitado pelo grau de ordem das cadeias hidrocarbônicas. O método fornece uma medida do grau de ordem das cadeias. Esta técnica pode inclusive ser

utilizada para avaliar a microviscosidade dos microdomínios hidrofóbicos formados pelos sistemas poliméricos anfífilicos (BONASSI, 1998).

Uma sonda excitada por uma luz polarizada terá emissão máxima se, durante o tempo de vida do estado excitado singlete, a sonda não variar sua posição ou orientação, o que ocorre quando a sonda está em um meio rígido. Em um meio fluido o movimento da sonda tenderá a tirar a orientação do momento de dipolo imposta pela polarização de excitação. A difusão rotacional de fluoróforos que determina a anisotropia depende da viscosidade da região na qual estão incorporados os fluoróforos. Variações na viscosidade de microdomínios hidrofóbicos com a temperatura, pH e força iônica pode ser investigada monitorando-se a anisotropia de fluorescência (KALYANASUNDARAM, 1987). Chang et al, 2002 utilizaram esta técnica, com a sonda DPH (1,6-difenil-1,3,5- hexatrieno), para determinar a microviscosidade do miolo micelar de copolímeros de poli(fosfazeno)-poli(óxido de etileno). Valores de anisotropia são diretamente relacionados com a liberdade rotacional da sonda: altos valores de anisotropia indicam um microdomínio mais rígido enquanto que valores menores indicam um meio mais fluido (GHOSH et al., 1995).

2- OBJETIVOS

Os objetivos da presente tese estão fundamentados no fato de polímeros termo-sensíveis e sensíveis ao pH constituírem um caminho para o desenvolvimento de sistemas inteligentes para o transporte e liberação de fármacos. A utilização da temperatura vem sendo, há vários anos, sugerida como estímulo para liberação de fármacos encapsulados em lipossomos. A combinação com hipertermia, por exemplo, no tratamento de câncer, pode em princípio aumentar três importantes características destes sistemas : a acumulação do fármaco no tumor, a distribuição intratumoral e a biodisponibilidade. Por outro lado, o pH tem sido indicado como um estímulo também importante, uma vez que possíveis alterações locais no pH podem, da mesma forma, ser exploradas para disparar a liberação e acúmulo do fármaco. Tais parâmetros, relacionados ao estudo e desenvolvimento de sistemas anfífilicos poliméricos, são uma área promissora, uma vez que a utilização de diferentes rotas de síntese, bem como a escolha adequada de monômeros podem, em princípio, permitir a otimização da incorporação, transporte e liberação do fármaco.

Sob este ponto de vista, polímeros anfífilicos que apresentem transições de fase acima de determinadas temperaturas podem ser sintetizados para apresentarem-se solúveis quando injetados in vivo, e tornarem-se insolúveis em regiões localmente aquecidas ou com pH alterado. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos numa primeira etapa :

- i) A síntese e caracterização de polímeros anfífilicos sensíveis à temperatura e ao pH, utilizando-se os monômeros N-isopropilacrilamida, monometacrilato de poli(etilenoglicol)metiléter e n-dodecilmetacrilato/ácido vinilbenzóico.
- ii) Variar as proporções molares destes, com objetivo de provocar alterações na temperatura de turvação dos terpolímeros e estudar a influência do balanço hidrofílico/hidrofóbico nesta variação.

- iii) Avaliar o efeito da força iônica na temperatura de turvação, buscando-se sistemas que se assemelhem às condições de temperatura e força iônica fisiológicas, para uma possível utilização como transportadores de fármacos.

Numa segunda etapa, estudar:

- iv) A formação de microdomínios hidrofóbicos dos polímeros anfífilicos em solução e o tamanho das nano e/ou micropartículas obtidas, relacionando as propriedades dos sistemas com o balanço hidrofílico/hidrofóbico dos monômeros.
- v) A capacidade ou eficiência de incorporação de moléculas hidrofóbicas no interior das nanopartículas/micropartículas dos sistemas mais promissores através da utilização de um modelo hidrofóbico e de um fármaco anti-câncer.

3- PARTE EXPERIMENTAL

3.1- Materiais

N-isopropilacrilamida (NIPAm) – Aldrich –Recristalizado duas vezes de n-hexano.

n-dodecilmetacrilato (DOMA) – Polysciences,In, desinibido com De-hibit 200.

Monometacrilato de poli(etilenoglicol)₄₀₀ monometil éter (PEG) - Polyscience In., desinibido com De-hibit 200.

Ácido Vinil Benzoico (VBA) – Polyscience In, utilizado como recebido.

1,4-dioxano – Merck.

4,4'-azobis-4-ácido cianoaléico – Aldrich.

n-Hexano – Merck.

Pireno – Aldrich – Recristalizado duas vezes de etanol.

Hidrocloreto de Doxorubicina – Calbiochem, utilizada como recebido.

Trans,trans,trans-1-[4-(3-carboxipropil)fenil]-6-(4-butilfenil)-1,3,5-hexatrieno(4H4A)-
(cedida pelo Prof. Dr. Laerte Miola)

3.2- Sínteses

3.2.1- Síntese dos Polímeros da série 1: A série 1, que é constituída por terpolímeros sensíveis à temperatura, foi sintetizada utilizando-se o monômero N-isopropilacrilamida, que é termo-sensível, o monômero monometacrilato de poli(etilenoglicol), metil éter, que é hidrofílico e o monômero n-dodecilmetacrilato, que é hidrofóbico. Foram sintetizados 3 homopolímeros a partir dos monômeros citados acima e 7 terpolímeros, onde foi variada a proporção molar dos monômeros.

3.2.1.1- Homopolimerização do N-isopropilacrilamida(NIPAm):

Em um balão de 2 bocas de 100 ml, foram adicionadas as seguintes massas, obtidas em balança analítica com sensibilidade de 0,0001 g: 3,0000 gramas de NIPAm, cuja estrutura é mostrada na figura 16, 0,0300 g de 4,4'-azobis-4-ácido cianoaléico e a este balão foram adicionados 20 mL de 1,4-dioxano. Nitrogênio foi borbulhado para se obter uma atmosfera inerte e o sistema foi mantido por 16 horas a 65°C, sob agitação. A seguir, após atingir a temperatura ambiente, o polímero foi precipitado em n-hexano, filtrado sob vácuo, lavado 4 vezes com n-hexano em filtro com membrana porosa e deixado em dessecador com P₂O₅ sob vácuo, até obtenção de massa constante.

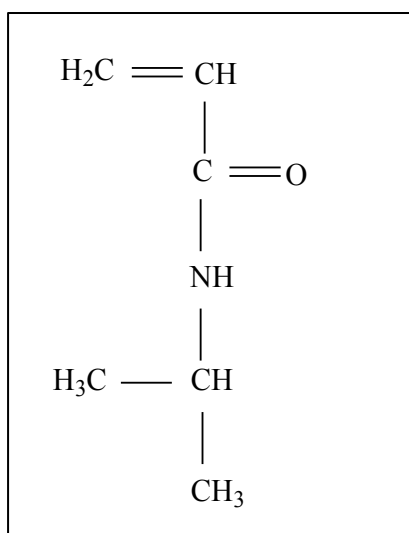


Figura 16: Estrutura do monômero N-isopropilacrilamida.

3.2.1.2- Homopolimerização do monometacrilato de poli(etilenoglicol)₄₀₀ metil éter(PEG):

Em um balão de 2 bocas de 100 mL, foram adicionados 13,2500 g de monometacrilato de poli(etilenoglicol)₄₀₀ metil éter, cuja estrutura é apresentada na figura 17, 0,1325g de

4,4'-azobis-4-ácido cianoaléxico e 20 mL de 1,4-dioxano. Nitrogênio foi borbulhado para se obter uma atmosfera inerte e o sistema foi deixado por 16 horas a 65°C, sob agitação. A seguir, após atingir a temperatura ambiente, o polímero foi precipitado em n-hexano. O solvente foi removido em roto-evaporador sob vácuo lavado, 4 vezes com n-hexano em filtro com membrana porosa e deixado em dessecador com P₂O₅, sob vácuo, até obtenção de massa constante.

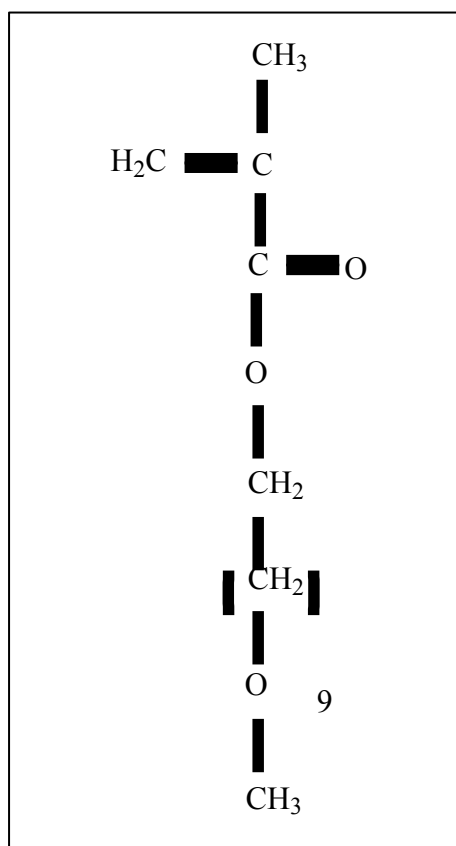


Figura 17: Estrutura do monômero monometacrilato de poli(etilenoglicol)₉ metil éter.

3.2.1.3- Homopolimerização de n-dodecilmacrilato (DOMA):

Em um balão de 2 bocas de 100 mL foram adicionados 6,7400 g de n-dodecilmacrilato, cuja estrutura está representada na figura 18, 0,0674g de 4,4'-azobis-4-

ácido cianoaléico e 20 mL de 1,4-dioxano. Nitrogênio foi borbulhado para se obter uma atmosfera inerte e o sistema foi deixado por 16 horas a 65°C, sob agitação. Ao final, após atingir a temperatura ambiente, o polímero foi precipitado em n-hexano. O solvente foi retirado em roto-evaporador, sob vácuo, lavado 4 vezes com n-hexano em filtro com membrana porosa e deixado em dessecador com P₂O₅, sob vácuo até obtenção de massa constante.

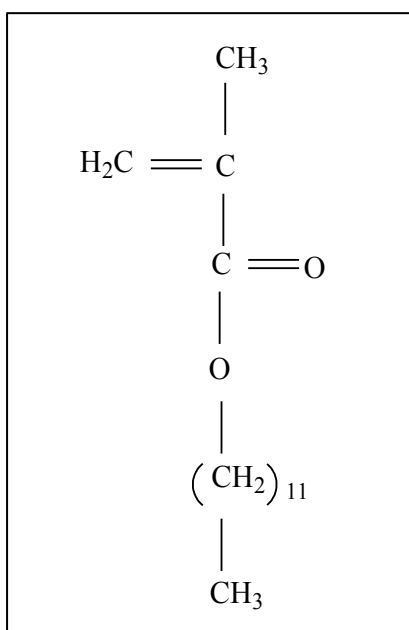


Figura 18: Estrutura do monômero n-dodecilmacrilato.

3.2.1.4- Terpolimerizações:

As terpolimerizações foram feitas seguindo a mesma metodologia das homopolimerizações. Em balão de 2 bocas de 100 mL foram adicionadas quantidades de N-isopropilacrilamida, monometacrilato de poli(etilenoglicol), metil éter, n-dodecilmacrilato, 4,4'-azobis-4-ácido cianoaléico e 1,4-dioxano em quantidades suficientes (tabela 1) para a

obtenção de terpolímeros denominados 90:5:5; 80:10:10; 80:15:5; 70:25:5; 60:35:5; 65:30:5 e 67:28:5, onde os números representam, respectivamente, as proporções molares de N-isopropilacrilamida (NIPAm) , monometacrilato de poli(etilenoglicol)₉ metiléter (PEG) e n-dodecilmacrilato (DOMA) .A estrutura, suposta randômica, do terpolímero é apresentada na figura 19.

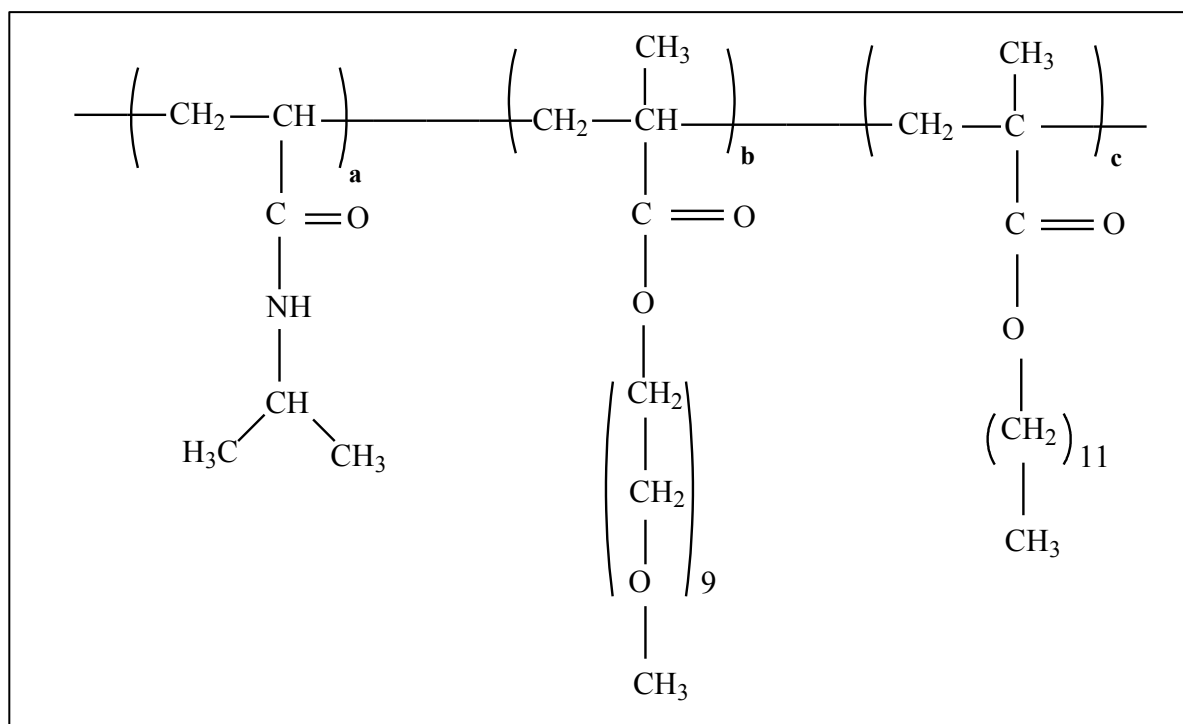


Figura 19: Estrutura, suposta randômica, dos terpolímeros da série 1.

Tabela 1: Quantidades em mili-mols e gramas dos monômeros utilizados nas terpolimerizações.

Proporção	NIPAm		PEG		DOMA	
	mMol	massa(g)	mMol	massa(g)	mMol	massa(g)
100:0:0	26,50	3,0000	0	0	0	0
0:100:0	0	0	26,50	13,2500	0	0
0:0:100	0	0	0	0	26,50	6,7400
90:5:5	23,80	2,6900	1,35	0,6750	1,35	0,3430
80:10:10	21,20	2,4000	2,65	1,3300	2,65	0,6740
80:15:5	21,20	2,4000	3,98	1,9900	1,35	0,3430
70:25:5	18,55	2,1000	6,63	3,3300	1,35	0,3430
60:35:5	15,90	1,8000	9,25	4,6300	1,35	0,3430
65:30:5	17,20	1,9500	7,95	3,9800	1,35	0,3430
67:28:5	17,76	2,0100	7,39	3,4000	1,35	0,3430

3.2.2- Síntese dos Polímeros da série 2:

A série 2, que é constituída por terpolímeros sensíveis à temperatura e ao pH, foi sintetizada utilizando-se o monômero N-isopropilacrilamida, que é termo-sensível, o monômero monometacrilato de poli(etilenoglicol), metil éter, que é hidrofílico e o monômero ácido vinil benzóico, que é ionizável. Foram sintetizados um homopolímero e 5 terpolímeros, variando-se a proporção molar dos monômeros.

3.2.2.1- Homopolimerização do ácido vinil benzóico

Em um balão de 2 bocas, de 100 mL, foram adicionados 3,9260 g de ácido vinil benzóico, cuja estrutura é mostrada na figura 20, 0,03923 g de 4,4'-azobis-4-ácido cianoaléico e 30 mL de 1,4-dioxano. Nitrogênio foi borbulhado para se obter uma atmosfera inerte e o sistema foi mantido sob agitação, por 16 horas a 65°C. A seguir, após atingir a temperatura ambiente, o polímero foi precipitado em n-hexano, filtrado sob vácuo, lavado 4 vezes com n-hexano em funil com membrana porosa e deixado em dessecador com P₂O₅, sob vácuo, até obtenção de massa constante.

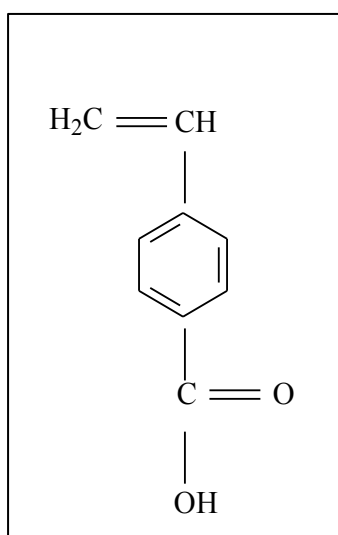


Figura 20: Estrutura do monômero Ácido vinilbenzóico.

3.2.2.2- Terpolimerizações:

As terpolimerizações foram feitas seguindo-se a mesma metodologia da homopolimerização. Em balão de 2 bocas de 100 mL foram adicionadas quantidades de N-isopropilacrilamida, monometacrilato de poli(etilenoglicol)₄₀₀ monometil éter, ácido vinil benzóico, 4,4'-azobis-4-ácido cianoaléico e 1,4- dioxano em quantidades suficientes (tabela 2) para a obtenção dos terpolímeros 90:5:5; 85:10:5; 80:10:10; 75:10:15 e 70:10:20, onde os números representam, respectivamente, as proporções molares de N-isopropilacrilamida (NIPAm), monometacrilato de poli(etilenoglicol), monometiléter (PEG) e ácido vinil benzóico (VBA). A estrutura, suposta randômica, do terpolímero está representada na figura 21.

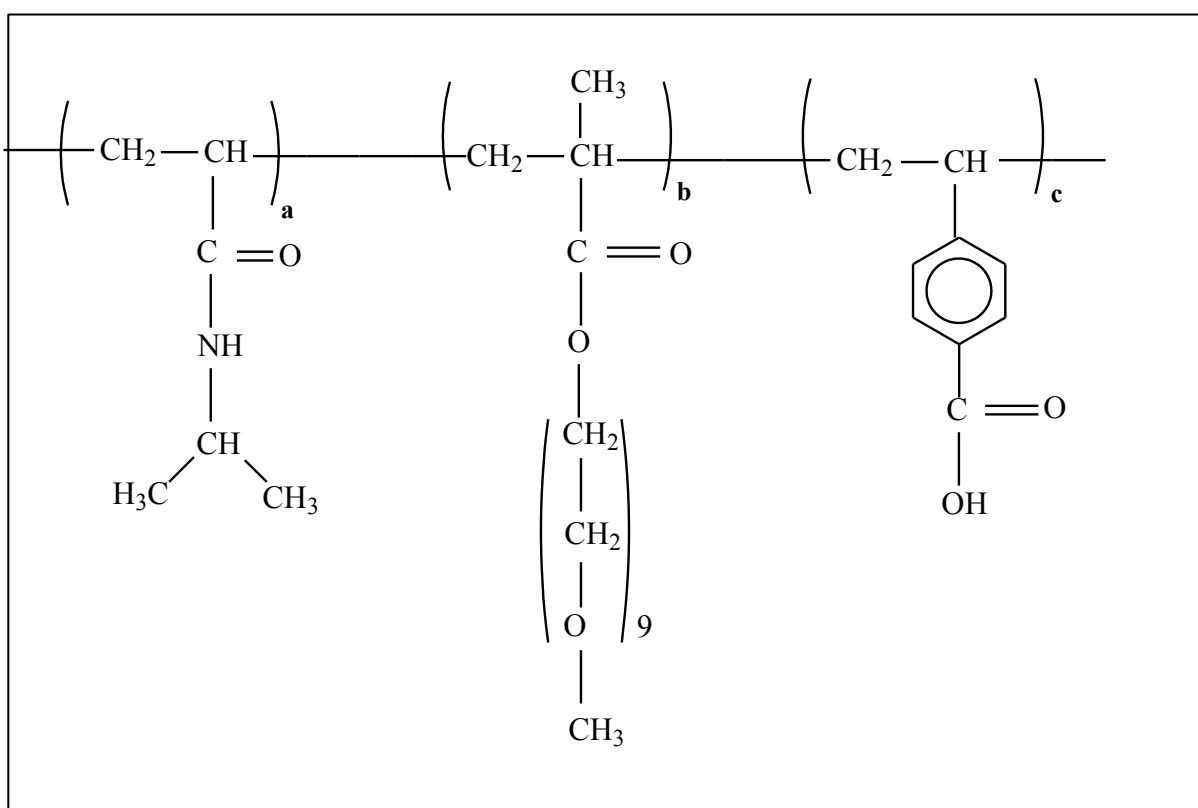


Figura 21: Estrutura, suposta randômica, dos terpolímeros da série 2.

Tabela 2: Quantidades em mili-mols e gramas dos monômeros utilizados nas terpolimerizações.

Proporção	NIPAm		PEG		VBA	
	mMol	massa(g)	mMol	massa(g)	mMol	massa(g)
0:0:100	0	0	0	0	26,50	3,9260
90:5:5	23,85	2,6990	1,35	0,6625	1,35	0,1963
85:10:5	22,55	2,5490	2,65	1,3250	1,35	0,1963
80:10:10	21,20	2,3900	2,65	1,3250	2,65	0,3926
75:10:5	19,87	2,2490	2,65	1,3250	3,97	0,5889
70:10:20	18,55	2,0990	2,65	1,3250	5,30	0,7852

3.3 - Caracterização

3.3.1- Massa Molar

As massas molares e suas distribuições, para os polímeros das séries 1 e 2, foram determinadas por cromatografia de permeação em gel (GPC), em um cromatógrafo da marca Shimadzu HPLC com um detector de índice de refração. Uma combinação de duas colunas: Styragel HR4 e Styragel HR5 foi usada e os resultados foram calculados por comparação com um Kit de poli(metilmetacrilato) da American Polymer Standards Corp. As análises foram realizadas no Instituto de Química – USP – São Carlos, com a colaboração da Dr^a Carla C. S. Cavalheiro.

3.3.2- Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho foi utilizada para confirmação da estrutura química dos polímeros. Amostras sólidas dos polímeros das séries 1 e 2 foram prensadas com KBr para obtenção de pastilhas que foram analisadas em Espectrofotômetro ABB Bomem MB100,

em uma faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} ; cada espectro correspondendo à média de 10 varreduras.

3.3.3- Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A estrutura química e a composição molar dos terpolímeros das séries 1 e 2 foram determinadas a partir de espectros de RMN- ^1H . As amostras dos polímeros foram preparadas como soluções a 3% de dimetilsulfóxido deuterado e analisadas em Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker AC 200 - frequência de prótons de 200 MHz. As medidas foram feitas à temperatura ambiente. Estas análises foram realizadas no Instituto de Química-USP – São Carlos.

3.3.4 – Caracterização através de análise elementar para os polímeros da série 2

Microanálise elementar de C, H e N foram feitas em um equipamento EA 1110 CHNS-O da CE Instruments, para determinação da proporção molar do monômero NIPAm nos terpolímeros. Estas análises foram realizadas no Instituto de Química – USP – São Carlos.

3.3.5- Titulação Condutimétrica para os polímeros da série 2

Para a determinação da proporção do ácido vinil benzóico, utilizou-se a técnica da titulação condutimétrica. Massas conhecidas dos polímeros foram solubilizadas em água ultra-pura e a solução foi titulada com solução de NaOH 0,105 mol dm^{-3} . O equipamento utilizado foi um Condutivímetro Digimed- modelo 31, com célula de condutividade modelo DMC-010M, $K = 1\text{cm}^{-1}$. As análises foram feitas à temperatura ambiente e os dados de condutividade foram colocados em um gráfico em função da concentração da base utilizada.

3.4- Determinação do ponto de turvação ou LCST

3.4.1 - Medidas através de Fotometria no Visível

O ponto de turvação dos terpolímeros das séries 1 e 2 foram determinados através de fotometria no visível, utilizando-se um Espectrofotômetro Cary-100 equipado com compartimento de amostra termostatizado por sistema Peltier 1x1. As determinações foram feitas em celas de quartzo de caminho óptico de 1 cm, onde foram adicionadas soluções dos polímeros na concentração $1,0 \text{ g dm}^{-3}$. A transmitância foi registrada em comprimento de onda de 450 nm, em intervalos de temperatura de 1 a 2°C , aguardando-se um tempo de 10 a 15 minutos após cada variação de temperatura, para o sistema atingir o equilíbrio térmico. O ponto de turvação dos terpolímeros foi determinado em solução aquosa e em solução tampão fosfato, pH 7,4, cuja força iônica foi variada pela adição de KCl. Os gráficos foram construídos colocando-se os dados de transmitância em 450 nm em função da temperatura..

3.4.2- Medidas de Microcalorimetria (DSC):

As soluções aquosas dos terpolímeros da série 1 , na concentração de $6,6 \text{ g dm}^{-3}$ foram submetidas à análise em um Microcalorimeter VP-DSC, MicroCal Incorporated, equipado com duas celas de 0,5 mL cada, para os polímeros e solvente (referência), com velocidade de escaneamento de 30°C h^{-1} , de 15 a 80°C , sendo feitas duas determinações para cada amostra de polímero. A temperatura de transição foi obtida pela intersecção da linha base e a porção linear do pico do termograma. Estas análises foram realizadas no Instituto de Química-UNICAMP, com a colaboração do Prof. Dr. Watson Loh.

3.5- Investigação da formação de agregados e determinação da concentração de agregação crítica (CAC)

3.5.1- Fluorescência no estado estacionário

Medidas de fluorescência no estado estacionário foram realizadas utilizando-se um espectrofluorímetro Hitachi F-4500, adaptado com banho de circulação Fisher Scientific. Os espectros de emissão foram obtidos com uma velocidade de varredura de 240 nm/min e as fendas de excitação e emissão foram de 5,0 e 1,0 nm, respectivamente. Em uma cela de quartzo de 1 cm foram adicionados 2,0 mL de água ultra-pura e 2 μL de solução estoque de pireno de concentração $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, obtendo-se concentração final de pireno de $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. A esta cela foram adicionadas alíquotas de soluções 1 g dm^{-3} dos polímeros (estas soluções continham pireno a uma concentração de $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, de modo a manter constante a concentração de pireno na cela), mantendo-se uma temperatura de 15°C . A intensidade de fluorescência dos picos 1 e 3 do espectro de emissão do pireno foram registradas em 373 e 384 nm, respectivamente, após cada adição de solução do polímero. O comprimento de onda de excitação foi de 310 nm. Os gráficos foram obtidos colocando-se a razão I_1/I_3 em função da concentração dos polímeros.

3.5.2- Efeito da temperatura sobre a agregação

Para avaliar-se o efeito da temperatura na polaridade dos agregados, 2,0 mL das soluções dos polímeros das séries 1 e 2, preparados com pireno, como descrito anteriormente, foram adicionadas à cela de quartzo e a intensidade de fluorescência dos picos 1 e 3 do espectro de emissão do pireno foi monitorada em função da temperatura, com variações de 15°C a 70°C e gradiente de 2°C . A temperatura do compartimento da amostra foi controlada com um banho Fisher Scientific e acompanhada com um termômetro termopar introduzido

dentro da cubeta. Os gráficos foram construídos colocando-se a razão I_1/I_3 em função da temperatura.

3.5.3- Anisotropia de fluorescência

Medidas de anisotropia de fluorescência foram efetuadas com o objetivo de avaliar a rigidez dos miolos hidrofóbicos, em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500, com cela termostatzada, com controle de temperatura por um banho de circulação Fisher Scientific. O espectrofluorímetro foi equipado com um acessório de polarização que possui um único canal de emissão (ou o chamado formato “L”). Em uma cela de quartzo de 1 cm foram adicionados 2 mL de solução dos polímeros na concentração $1,0 \text{ g dm}^{-3}$ e $10 \text{ }\mu\text{L}$ da sonda 4H4A (trans,trans,trans-1-[4-(3-carboxipropil)fenil]-6-(4-butilfenil)-1,3,5-hexatrieno), cuja estrutura é mostrada na figura 22, na concentração $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. A concentração final da sonda foi de $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. As medidas da intensidade da fluorescência foram feitas em $\lambda_{\text{exc}} = 357 \text{ nm}$, fendas de excitação e emissão de $2,5 \text{ nm}$, utilizando-se as lentes polarizadoras, variando-se a temperatura a cada 2°C .

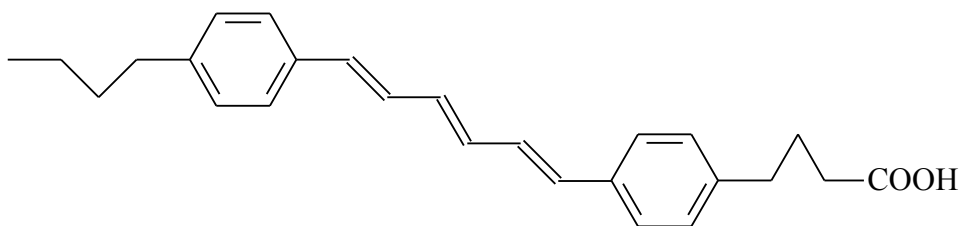


Figura 22: Estrutura da sonda 4H4A

Os cálculos para a anisotropia foram realizados de acordo com as equações apresentadas abaixo:

$$r = \frac{I_{//} - G I_{\perp}}{I_{//} + 2 (G I_{\perp})} \quad (1)$$

onde G é um fator de correção para fluorímetros que possuem um único canal de emissão, ou seja, em formato L.

$$G = \frac{i_{\perp}}{i_{//}} \quad (2)$$

onde:

$I_{//}$ = intensidade paralela ($0^{\circ}_{exc}/0^{\circ}_{em}$)

$I_{\perp}$ = intensidade perpendicular ($0^{\circ}_{exc}/90^{\circ}_{em}$)

$i_{//}$ = intensidade paralela ($90^{\circ}_{exc}/90^{\circ}_{em}$)

$i_{\perp}$ = intensidade perpendicular ($90^{\circ}_{exc}/0^{\circ}_{em}$)

3.6 – Determinação do tamanho dos agregados

3.6.1- Espalhamento de Luz Dinâmico

Experimentos de espalhamento de luz dinâmico permitem obter o raio hidrodinâmico de partículas, que está relacionado com o coeficiente de difusão (D) pela equação de Stokes-Einstein (equação 3):

$$D = \frac{K_B T}{6\pi \eta r_h} \quad (3)$$

onde D = coeficiente de difusão

K_B = constante de Boltzman

η = viscosidade

T = temperatura absoluta

r_h = raio hidrodinâmico

Partículas dispersas em um meio líquido movem-se ao acaso (movimento Browniano). Esse movimento causa flutuações de concentrações em um dado volume de solução em função do tempo. Em medidas de espalhamento de luz dinâmico a intensidade de espalhamento é registrada em função do tempo, e flutuações nessa intensidade de espalhamento são observadas como variações de concentração no volume de espalhamento. O tempo necessário para as flutuações na intensidade da luz espalhada acontecerem é a característica mais importante do sinal, uma vez que esse tempo contém informações sobre as propriedades dinâmicas das moléculas do soluto. A informação mais simples obtida é o coeficiente de difusão. Uma partícula maior terá coeficiente de difusão menor que uma partícula pequena e as flutuações ocorrem mais vagarosamente. Existe uma correlação entre a velocidade de flutuação da luz espalhada e o coeficiente de difusão das partículas. Há também uma função de auto-correlação da intensidade da luz espalhada ($G(\tau)$)

$$G(\tau) = \langle I_{(t_0)} \times I_{(t_0 + \tau)} \rangle \quad (4)$$

onde $I_{(t_0)}$ e $I_{(t_0 + \tau)}$ são as intensidades de luz espalhada nos instante t_0 e $(t_0 + \tau)$.

No tempo $t = t_0 = 0$, a intensidade de espalhamento é $I(0)$ e a função de auto-correlação tem um valor máximo. Com o passar do tempo, a intensidade de espalhamento em um tempo $(t_0 + \tau)$ terá uma menor correlação com a intensidade de espalhamento inicial e a média sobre os produtos das intensidades, que é $G(\tau)$ tende a zero. Admite-se que $G(\tau)$ decai exponencialmente em função do tempo.

Para partículas esféricas e monodispersas a função de auto-correlação tem a expressão:

$$G(\tau) = A e^{-2\Gamma\tau} + B \quad (5)$$

A e B são constantes e Γ é a constante de decaimento da curva exponencial gerado pela função de auto-correlação, e

$$\Gamma = D q^2 \quad (6)$$

onde D = coeficiente de difusão

q = vetor de onda da luz espalhada

$$q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda_0} \right) \sin(\theta/2) \quad (7)$$

onde n = índice de refração do líquido que dispersa as partículas

θ = ângulo de detecção da luz espalhada

λ_0 = comprimento de onda da luz incidente

Então, um experimento de espalhamento de luz dinâmico permite, a partir da função de correlação, obter uma curva exponencial e desta obter o valor da constante de decaimento Γ . Tendo esse valor, a partir da equação 6, obtém-se o coeficiente de difusão, que por sua vez está relacionado com o raio hidrodinâmico pela equação 3.

Para determinar o tamanho dos agregados dos polímeros da série 1, medidas de espalhamento de luz dinâmico foram efetuadas em um equipamento BTC – Brookhaven Instruments Corporation, laser He-Ne, 60 mW, em comprimento de onda de 532nm. As medidas foram feitas utilizando-se soluções aquosas dos polímeros em concentrações que variaram de 1,0 a 10,0 g dm⁻³, previamente filtradas em membranas Milli-Pore de 0,45 µm, a uma temperatura de 20°C, exceto para polímeros com LCST inferior a este valor, onde aplicou-se temperatura de 15°C. Avaliou-se também o tamanho dos agregados em função da força iônica da solução, pela adição de KCl. Além disso, monitorou-se o comportamento do tamanho dos agregados com a variação da temperatura, de 10,0 a 60,0°C. Os experimentos foram efetuados em um ângulo de espalhamento de 90°.

3.7- Incorporação de moléculas hidrofóbicas nos agregados hidrofóbicos poliméricos

3.7.1- Eficiência da incorporação de pireno

A incorporação de pireno nos agregados hidrofóbicos dos polímeros da série 1 foi feita de acordo com Liu et al., 2004. 5,0 mg do polímero, 2,0 mg de pireno e 6,0 mL de água ultra-pura, foi submetida à agitação vigorosa, mantida por 24 horas a uma temperatura de 20°C. Após este tempo, o sistema foi filtrado 3 vezes em membrana de 0,45µm, até obtenção de solução límpida. O filtrado foi liofilizado e as micropartículas sólidas obtidas foram dissolvidas em clorofórmio e analisadas em espectrofotômetro UV, em 338 nm. A quantidade de pireno incorporada nos agregados foi calculada utilizando-se curva padrão de pireno em clorofórmio.

3.7.2- Eficiência da incorporação de Doxorubicina (Adriamicina –ADR-HCl)

Doxorubicina é uma fármaco anti-câncer hidrofóbico que tem sido utilizado em pesquisas que envolve sua incorporação em microdomínios poliméricos hidrofóbicos.

A incorporação da doxorubicina (figura 23) nos agregados hidrofóbicos dos polímeros da série 1 foi feita de uma adaptação da metodologia proposta por Xiao et al., 1996. Preparou-se uma solução contendo 1,5 mg de doxorubicina em 0,6 mL de uma mistura de clorofórmio e trietilamina (6 mL de clorofórmio e 23 µL de trietilamina). Esta solução foi adicionada, gota a gota, a uma solução contendo 5,0 mg do polímero em 10,0 mL de água ultra-pura. Para se obter uma quantidade maior de doxorubicina incorporada é necessário utilizar a amina livre na forma não ionizada. A trietilamina é então adicionada para promover a remoção do hidrocloreto da doxorubicina (KOHORI et al.,2002). O sistema foi mantido sob agitação vigorosa, à temperatura ambiente, por uma noite. Em seguida foi filtrado 3 vezes em membrana Milli-Pore de 0,45µm e liofilizado. As micropartículas secas obtidas foram dissolvidas em dimetilformamida (DMF) e a solução resultante foi analisada em

espectrofômetro UV, em comprimento de onda de 485 nm. A quantidade de doxorubicina incorporada foi calculada utilizando-se curva padrão de doxorubicina em DMF.

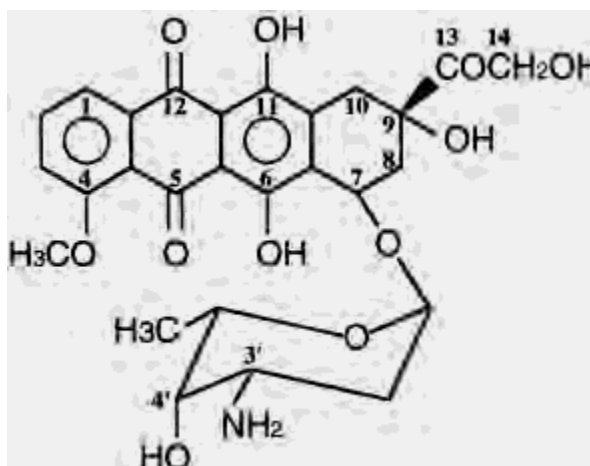


Figura 23: Estrutura química da doxorubicina

3.8 - Preparo de Microcápsulas com Polímeros da Série 2

O método utilizado para preparo das microcápsulas foi o método da evaporação do solvente. No preparo das microcápsulas sem o agente ativo, 20 mg de polímero foram dissolvidos em 10 mL de diclorometano, sob agitação. Esta solução foi adicionada a 20 mL de solução de poli(álcool vinílico) (PVA) a 1% m/v em água, sob agitação vigorosa por 15 minutos. O sistema foi mantido sob agitação por uma noite, para evaporação do solvente diclorometano. A mistura heterogênea obtida foi centrifugada por 15 minutos a 9.000 rpm e lavada 3 vezes com solução de PVA. Após, foi ressuspensa em água ultra-pura e liofilizada. As microesferas obtidas foram armazenadas em freezer. O preparo de microcápsulas com o agente ativo incorporado foi feito de maneira semelhante, sendo que, juntamente com os 20,0 mg do polímero adicionou-se 5,0 mg de pireno. O procedimento posterior foi igual ao relatado para as microesferas. Para o cálculo da quantidade de pireno incorporada nas microcápsulas, as mesmas foram dissolvidas em clorofórmio e a solução

obtida foi analisada em espectrofotômetro UV, em comprimento de onda de 335 nm. Os valores obtidos foram comparados com curva padrão de pireno em clorofórmio.

3.8.1 - Caracterização das Microcápsulas

A caracterização das microcápsulas foi feita em Microscópio Eletrônico de Varredura Leo 435 VPi, utilizando-se um aumento de 15.000 vezes. Amostras sólidas das micropartículas foram pinceladas em fita de cobre, metalizadas com ouro, e analisadas no microscópio eletrônico de varredura, onde observou-se o tamanho e a estrutura das micropartículas.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 -Caracterização

4.1.1- Polímeros da série 1 -

4.1.1.1 - Espectroscopia de RMN – ^1H :

Os espectros de RMN comprovam a terpolimerização pela presença característica dos prótons dos três monômeros. De acordo com a figura 24, nota-se a presença de um sinal em 7,2 ppm, que corresponde ao hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo amida do monômero NIPAm. Em 3,8 ppm há um sinal que corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono do grupo isopropil e em 0,84 ppm há sinal correspondente aos hidrogênios do grupo metil terminal do dodecilmacrilato. Shi et al., 2000 sintetizaram NIPAm com octadecilacrilato e encontraram picos em valores correspondentes a este trabalho. Em 3,2 ppm há um sinal correspondente aos hidrogênios do grupo metil terminal do monometacrilato de poli(etilenoglicol) metil éter. Os sinais dos prótons metínicos e metilênicos são observados entre 1,0 e 2,5 ppm. Xiao et al., 1996 sintetizaram PEG com acrilamida e obtiveram picos correspondentes para caracterização dos polímeros nestes mesmos valores. A fração molar dos três monômeros nos

polímeros foi determinada por RMN – ^1H , pela integração dos sinais pertencentes a cada monômero, isto é, a integração do sinal em 7,2 ppm pertencente ao monômero NIPAm, em 3,2 ppm pertencente ao monômero PEG e em 0,84 ppm pertencente ao monômero DOMA. No caso do DOMA, como existe uma sobreposição entre o pico do CH_3 terminal de DOMA e o pico do NIPAm, foi utilizado o programa Origin para integrar somente a área correspondente ao CH_3 de DOMA (ver encarte na figura 24). Por exemplo, para o terpolímero 80:10:10, cujo espectro de RMN e estrutura podem ser vistos na figura 24.

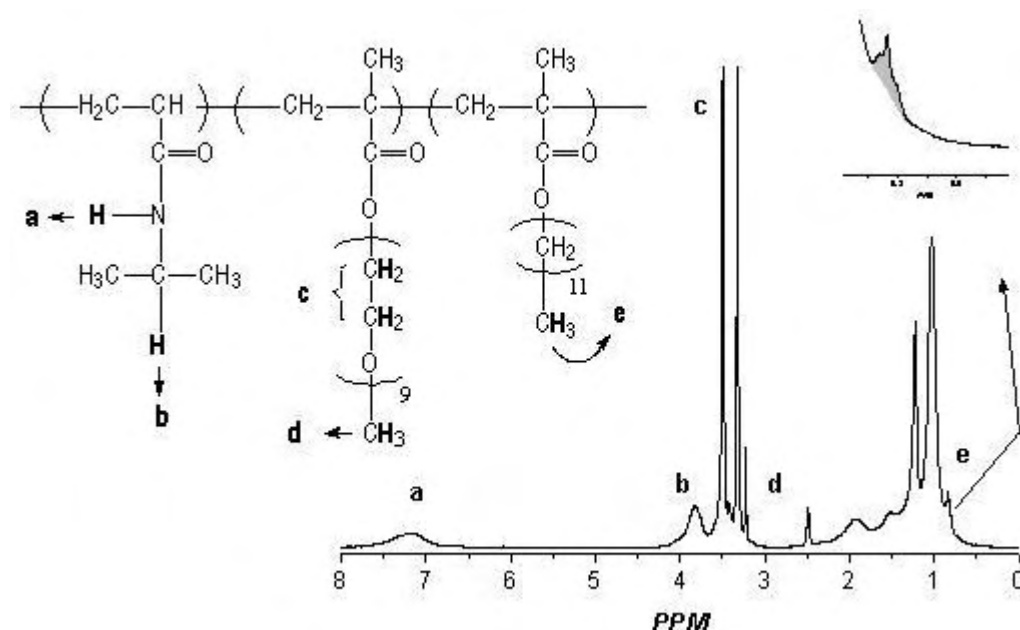


Figura 24: Estrutura e espectro de RMN- ^1H do polímero 80:10:10.

A fração molar do NIPAm no terpolímero é dada pela equação 8:

$$F_{\text{NIPAm}} = (I_{7,2} / n_{p1}) / [(I_{7,2} / n_{p1}) + (I_{3,2} / n_{p2}) + (I_{0,84} / n_{p3})] \quad (8)$$

onde F_{NIPAm} é a fração molar do NIPAm no terpolímero; $I_{7,2}$, $I_{3,2}$ e $I_{0,84}$ são as integrais dos sinais dos prótons de NIPAm, PEG e DOMA, respectivamente. n_{p1} , n_{p2} e n_{p3} são o número de prótons de NIPAm, PEG e DOMA, respectivamente. As frações molares de PEG e de DOMA foram calculadas por metodologia similar, utilizando-se as equações (9) e (10), respectivamente.

$$F_{\text{PEG}} = (I_{3,2}/n_{p2}) / [(I_{7,2}/n_{p1}) + (I_{3,2}/n_{p2}) + (I_{0,84}/n_{p3})] \quad (9)$$

$$F_{\text{DOMA}} = (I_{0,84}/n_{p3}) / [(I_{7,2}/n_{p1}) + (I_{3,2}/n_{p2}) + (I_{0,84}/n_{p3})] \quad (10)$$

As composições dos terpolímeros calculadas utilizando-se as equações acima descritas são apresentadas na tabela 3.

Tabela 3: Proporções molares dos monômeros incorporados nos polímeros obtidas a partir dos espectros de RMN.

Polímero	NIPAm	PEG	DOMA
90: 5: 5	93,6	4,0	2,4
80: 10: 10	88,0	6,7	5,3
80: 15: 5	88,1	9,3	2,6
70: 25: 5	81,4	15,6	3,0
67: 28: 5	76,4	20,5	3,1
65: 30: 5	71,0	24,1	4,9
60: 35: 5	69,0	28,0	3,0

Os resultados obtidos mostram que há uma maior incorporação do monômero NIPAm, o que pode ser atribuído possivelmente a uma maior reatividade deste monômero na síntese

realizada. Xiao et al., 1996 copolimerizaram macromônômeros de PEG com acrilamidas e encontraram que a conversão da acrilamida foi sempre maior que a dos macromônômeros e isso sugere que a reatividade da acrilamida foi maior que a dos macromônômeros de PEG, sob as mesmas condições polimerização. Alava et al., 2005 copolimerizaram NIPAm com PEG e encontraram razões de reatividade de 1,2 e 0,13 para NIPAm e PEG, respectivamente, mostrando uma incorporação maior do NIPAm no copolímero. A figura 25 mostra a incorporação real em função da incorporação teórica dos monômeros nos terpolímeros.

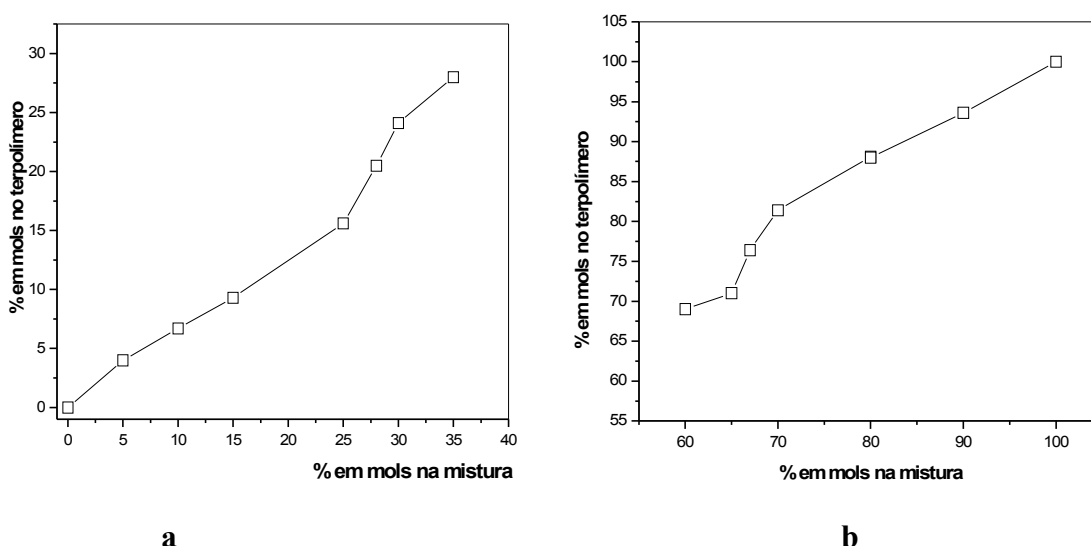


Figura 25: Porcentagem em mols na mistura reacional em função da composição determinada nos terpolímeros. **a:** monômero PEG e **b:** monômero NIPAM

4.1.1.2- Espectroscopia de infravermelho

Os espectros de infravermelho obtidos apresentam as bandas características esperadas e os espectros de poli(N-isopropilacrilamida), poli[(monometacrilato de poli(etilenoglicol), metil éter] e do terpolímero 67:28:5 são apresentados comparativamente na figura 26.

A ausência de picos atribuídos à C=C entre $1610-1635\text{ cm}^{-1}$, característicos de monômeros vinílicos, evidencia a polimerização. A presença de banda de absorção em torno de 1730 cm^{-1} , atribuída à carbonila em éster alifático, evidencia a presença dos grupos metacrilatos.

Em 1650 cm^{-1} a banda da carbonila de amidas evidencia a presença de N-isopropilacrilamida. Em torno de 1540 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} , respectivamente, estão as bandas de deformação e estiramento N-H. Em torno de 1130 cm^{-1} há uma banda característica de éter (C-O-C), presente na unidade de poli(etilenoglicol). Os demais espectros de infravermelho dos terpolímeros encontram-se no apêndice 2.

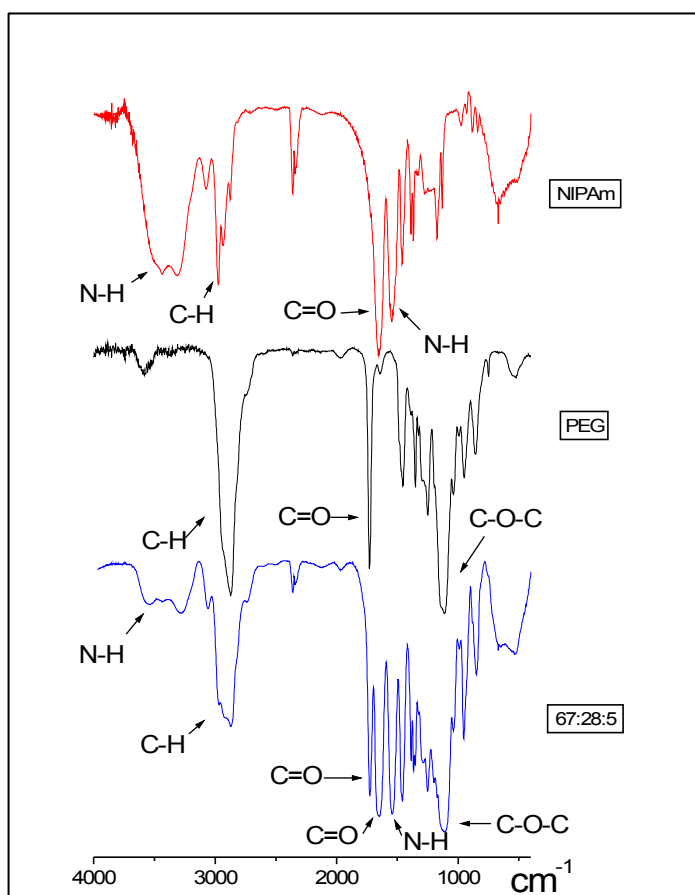


Figura 26: Espectro de IV do polímero 67:28:5 comparado com os espectros de NIPAm e PEG.

4.1.1.3 – Massa Molar Média

A massa molar média dos polímeros da série 1 foi determinada através da técnica de GPC, como descrito no item 3.3.1 e os resultados obtidos são apresentados na tabela 4. Os

cromatogramas obtidos não revelaram picos que pudessem ser atribuídos a monômeros livres. A curva de calibração e os cromatogramas são apresentados no Apêndice 1.

Tabela 4: Massa molar média dos polímeros da série 1

Polímero	$M_w(\text{g mol}^{-1})$	$M_n(\text{g mol}^{-1})$	M_w/M_n
100: 0: 0	116 507	62 111	1,825
0: 100: 0	5 817	5 450	1,067
90: 5: 5	78 308	32 507	2,408
80:10: 10	62 525	51 121	1,223
80: 15: 5	31 740	18 520	1,714
70: 25: 5	19 237	16 149	1,191
67:28:5	37.240	23.718	1,570
65:30:5	36.914	25.844	1,428
60:35:5	14.744	12.359	1,193

Os resultados mostram que, à medida que o conteúdo de PEG é aumentado, há uma diminuição na massa molar. Os terpolímero 67:28:5 e 65:30:5, embora apresentem massa molar ligeiramente maior que os de composição similar, ainda assim, seguem sendo menores que aqueles com menor conteúdo de PEG. Entretanto, pequenas variações na temperatura de copolimerização podem levar a mudanças na massa molar. Estes efeitos foram observados por Park et al.,2004, que copolimerizaram PEG com acrilamida em temperatura variando de 25 a 40°C, para avaliar o efeito da temperatura na massa molar e os resultados mostraram que a massa molar foi dependente da temperatura. Obtiveram copolímeros com massa molar de $3 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ quando a temperatura foi efetuada em 25°C e $1 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ em 40°C. Uma possível razão conferida a este efeito é que a transferência de cadeia para o macromonômero é mais facilmente favorecida do que para a acrilamida, resultando em um copolímero com menor massa molar. Esta suposição também tem sido proposta por outros autores como Shawiki; Hamilec, 1979 e Schulz et al., 1987.

4.1.2- Polímeros da série 2:

4.1.2.1 - Espectroscopia de RMN – ^1H :

Os espectros de RMN comprovam a terpolimerização. A figura 27 mostra a presença de um sinal em 7,2 ppm, que corresponde ao hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo amida do monômero NIPAm; em 3,8 ppm há sinal que corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono do grupo isopropil. Em 3,2 ppm há um sinal correspondente aos hidrogênios do grupo metil terminal do monometacrilato de poli(etilenoglicol), metil éter. Os sinais dos prótons metínicos (H de CH) e metilênicos (H de CH_2) são observados entre 1,0 e 2,5 ppm. A formação do polímero também fica evidente pelo aparecimento de sinais dos prótons aromáticos entre 7,5 e 8,0 ppm.

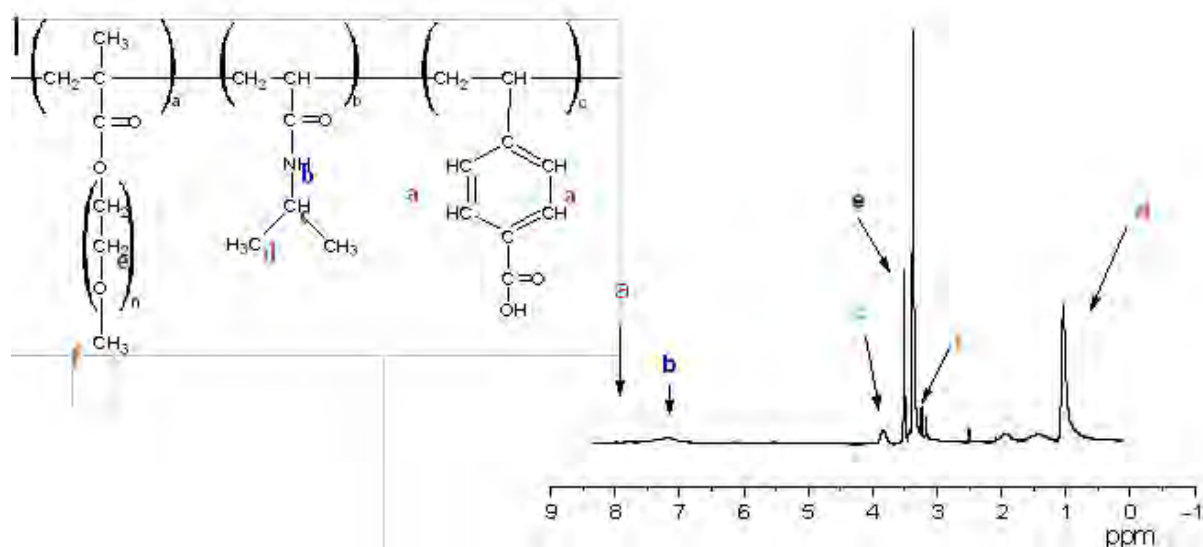


Figura 27: Estrutura e espectro de RMN- ^1H do polímero 85:10:5 .

4.1.2.2- Espectroscopia de Infravermelho

A figura 28 mostra o espectro de infravermelho do terpolímero 80:10:10. A presença de um pico em torno de 1730 cm^{-1} é atribuído à carbonila do grupo éster do metacrilato. A presença de um pico em torno de 1650 cm^{-1} evidencia a presença da carbonila do grupo amida. Um pico em torno de 3080 cm^{-1} é devido deformação axial de C-H do aromático presente no polímero. Picos em 1540 e 3500 cm^{-1} são atribuídos, respectivamente, à deformação e estiramento N-H do monômero de acrilamida. Entre 750 e 780 cm^{-1} há presença de C-H do aromático (deformação angular fora do plano). Um pico em torno de 1130 cm^{-1} é devido ao C-O-C do grupo éster do monômero de PEG. Picos entre 1590 e 1465 cm^{-1} evidenciam deformações axiais das ligações C=C do aromático. Os demais espectros encontram-se no apêndice 4.

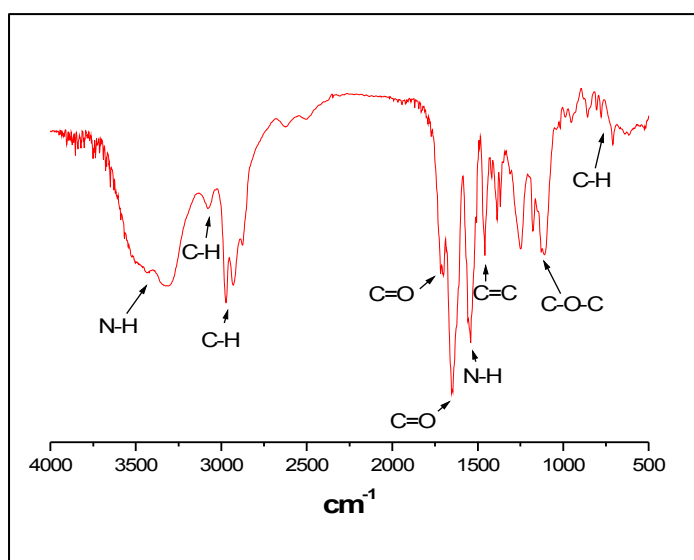


Figura 28: Espectro de infravermelho do terpolímero 80:10:10

4.1.2.3 - Massa Molar Média dos Polímeros da série 2

A massa molar dos polímeros da série 2 feita através da técnica de GPC, pode ser vista na tabela 4 . Os cromatogramas obtidos não revelam picos que possam ser atribuídos a monômeros livres. Os cromatogramas são apresentados no Apêndice 1.

Tabela 5: Massa molar média dos polímeros da série 2.

Polímero	$M_w(\text{gmol}^{-1})$	$M_n(\text{gmol}^{-1})$	M_w/M_n
0:0:100	*		
90:5:5	12.386	10.197	1.21
85:10:5	8.324	6.504	1.28
80:10:10	7.884	6.491	1.21
75:10:15	5.641	4.466	1,26
70:10:20	**		

*não determinado, **: parcialmente solúvel

A massa molar média para os polímeros da série 2 apresentou valores menores do que os esperados, o que se sugere que, além da possibilidade de PEG estar agindo como agente de transferência de cadeia interrompendo a polimerização, também o ácido vinil benzóico parece afetar a reação, uma vez que as mesmas condições de reação utilizadas para a série 1 foram mantidas para a série 2.

4.1.2.4 – Determinação da proporção molar dos monômeros :

A determinação da porcentagem do monômero N-isopropilacrilamida foi feita por análise elementar através da determinação da porcentagem de nitrogênio nos terpolímeros. Os resultados das análises encontram-se no anexo 5. A porcentagem do monômero ácido vinilbenzóico foi determinada através de titulação condutimétrica. A figura 29 mostra a titulação para o terpolímero 80:10:10.

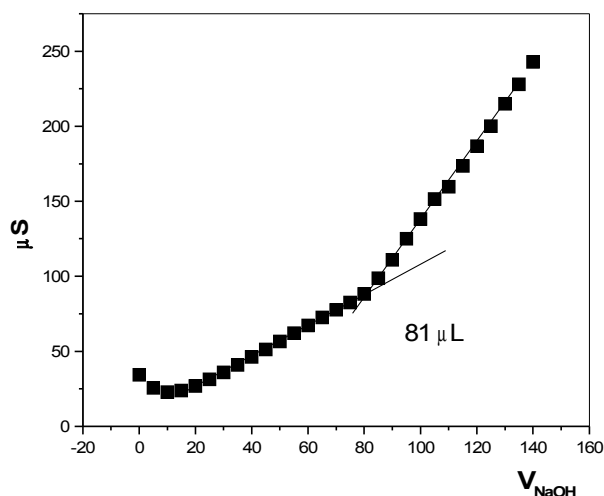


Figura 29: Gráfico de condutividade em função do volume de solução de NaOH 0,105 mol dm⁻³ para o terpolímero 80:10:10.

O ácido vinilbenzóico é um ácido orgânico relativamente fraco e inicialmente, em solução, existem íons hidrogênio e íons vinilbenzoatos contribuindo para um certo valor de condutividade. A contribuição do íon hidrogênio é maior devido à sua maior mobilidade. À medida que a reação avança os íons hidrogênio vão sendo neutralizados pela base e a quantidade de íons vinilbenzoatos liberada aumenta até ser atingido o ponto de equivalência e, a partir daí, sua concentração permanece constante. Ao mesmo tempo, a quantidade de cátions provenientes da base continua a aumentar. Após o ponto de equivalência, a condutividade aumenta bruscamente devido ao acúmulo dos íons sódio e hidróxidos (EWING,1972). A determinação da quantidade de ácido vinilbenzóico incorporada no terpolímero é calculada a partir do ponto de equivalência, pelas equações normais de volumetria. As massas dos polímeros e os volumes de base utilizados são apresentados na tabela 6. Para a determinação da quantidade do monômero de PEG utilizou-se a equação 6:

$$\% \text{ PEG} = 100 - (\% \text{ NIPAm} + \% \text{ VBA}) \quad (6)$$

Os resultados da proporção molar dos monômeros nos terpolímeros encontram-se na tabela 7 e as demais curvas das titulações condutimétricas encontram-se no apêndice 6.

Tabela 6: Massas dos polímeros e volume de NaOH 0,105 molL⁻¹ utilizado nas titulações condutimétricas.

Polímero	Massa(mg)	Vol. (μL)
90:5:5	23,0	24,8
80:10:10	10,4	81,0
85:10:5	9,9	40,7
75:10:15	5,3	66,4
70:10:20	5,3	110,1

Tabela 7: Proporção molar dos polímeros calculada por análise elementar e titulação condutimétrica.

Polímero	NIPAm	PEG	VBA
90:5:5	75,7	22,6	1,7
80:10:10	66,0	22,0	12,0
85:10:5	69,4	24,3	6,3
75:10:15	58,3	22,2	19,5
70:10:20	50,8	16,9	32,3

Pelos resultados obtidos na tabela 6 observa-se um desvio da proporção na mistura reacional. Este comportamento provavelmente está relacionado com a razão de reatividade dos monômeros. A reatividade do NIPAm nesta síntese parece ser menor que a reatividade do PEG e do VBA, sendo que a reatividade do VBA parece se sobrepôr à razão de reatividade do PEG. A figura 30 mostra a incorporação real em função da incorporação teórica dos monômeros nos polímeros.

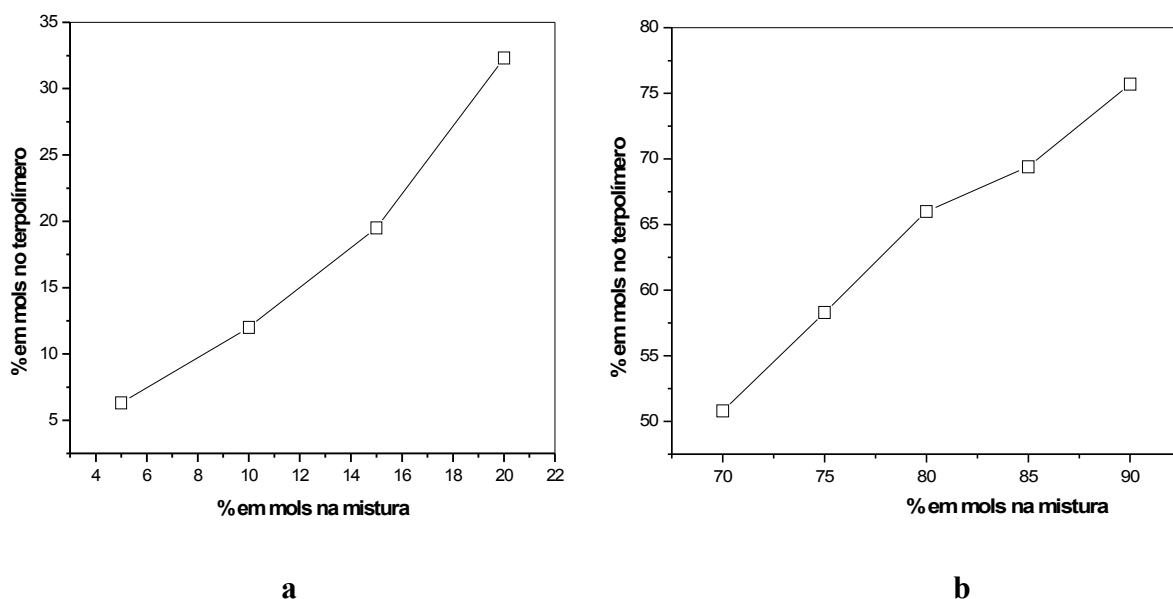


Figura 30: Porcentagem em mols na mistura reacional em função da composição calculada nos terpolímeros. **a:** monômero VBA **b:** monômero NIPAm

A copolimerização de N-isopropilacrilamida com monômeros hidrofílicos e hidrofóbicos têm sido registrada na literatura há algum tempo. Shi et al, 2000 sintetizaram copolímeros de NIPAm e octadecilacrilato, via radicalar, com sucesso. Szczubialka; Nowakowska, 2003 obtiveram terpolímeros randômicos de NIPAm, cinamoiletilmetacrilato e 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfonato de sódio. Eeckman et al, 2004 sintetizaram copolímeros de NIPAm com comonômeros hidrofílicos (N- vinilpirrolidona e N- vinilacetamida) para estudo de propriedades termosensíveis. Xiao et al, 1996 fizeram a síntese de monômeros de PEG com acrilamidas e obtiveram polímeros randômicos, assim como Baskar; Chandrasekar, 2004, que sintetizaram polímeros de PEG com dodecilmetacrilato. Polímeros sensíveis ao pH e à temperatura também têm sido sintetizados com sucesso. Jones, 1999 utilizou os monômeros NIPAM e ácido acrílico para obtenção de polímeros randômicos.

Portanto, para os polímeros sintetizados neste trabalho, é esperada uma disposição ao acaso dos monômeros ao longo da cadeia principal, ou seja, a obtenção de polímeros randômicos.

4.2 - Determinação da temperatura de turvação ou LCST - Série 1

4.2.1- Fotometria no visível:

4.2.1.1- Polímeros em solução aquosa:

O fenômeno da turvação é conhecido surgir da remoção rápida da camada de hidratação protetiva ou seja, do rompimento das ligações de hidrogênio com a cadeia polimérica. Isso expõe o caráter hidrofóbico do polímero levando à separação de fase (EECKMAN et al., 2001). O homopolímero de N-isopropilacrilamida apresenta um valor para a temperatura de turvação em torno de 31°C, como pode ser visto pela figura 31, obtido da intersecção da curva da porcentagem de transmitância em função da temperatura de uma solução de PNIPAm a 0,1% (m/v). A copolimerização de NIPAm com monômeros hidrofílicos e hidrofóbicos alteram o ponto de turvação para valores acima e abaixo do ponto de turvação do PNIPAm, respectivamente. A figura 32 mostra os valores de transmitância em função da temperatura para os terpolímeros sintetizados neste trabalho utilizando-se os monômeros NIPAm-PEG-DOMA em diferentes proporções molares. Os resultados mostram que, mantendo-se a proporção de DOMA baixa (em torno de 5% em mol), o aumento na proporção de PEG leva como esperado, a um aumento no valor do ponto de turvação. Os valores dos pontos de turvação podem ser vistos na tabela 8. Na figura 33 observa-se o aumento do valor do ponto de turvação em função do aumento da proporção de PEG. Devido ao caráter hidrofílico do PEG, o aumento da proporção deste monômero leva a uma maior hidratação dos terpolímeros, cuja solubilidade é aumentada.

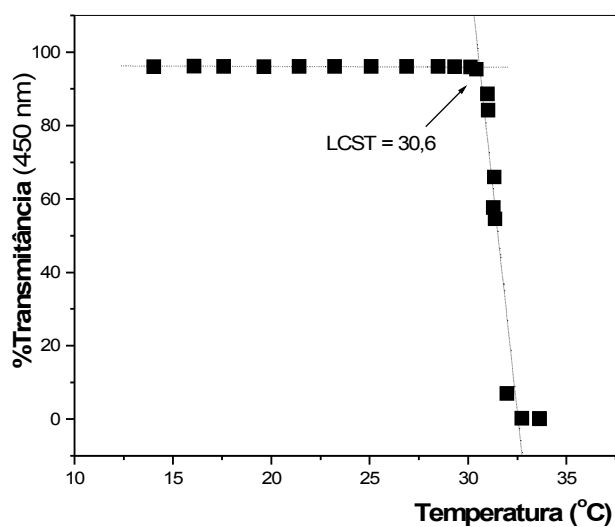


Figura 31: %Transmitância em função da temperatura para solução aquosa de PNIPAm a 0,1% (m/v).

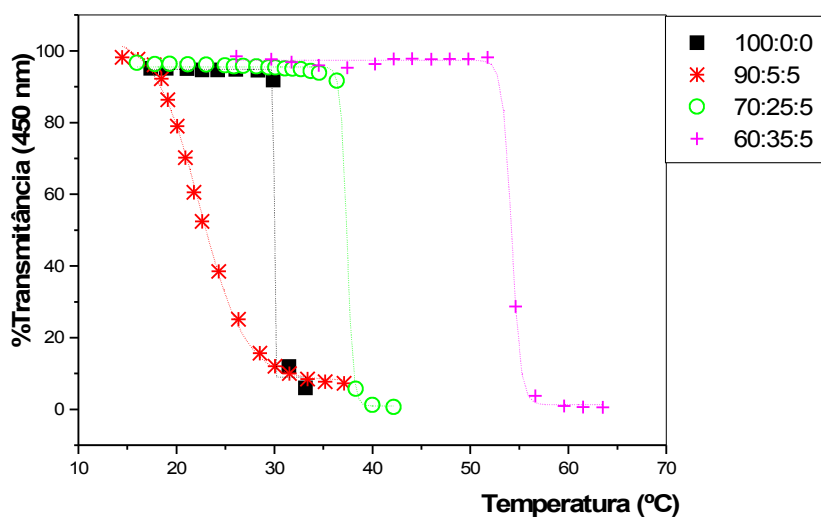


Figura 32: %Transmitância em função da temperatura para solução aquosa dos terpolímeros a 0,1% (m/v).

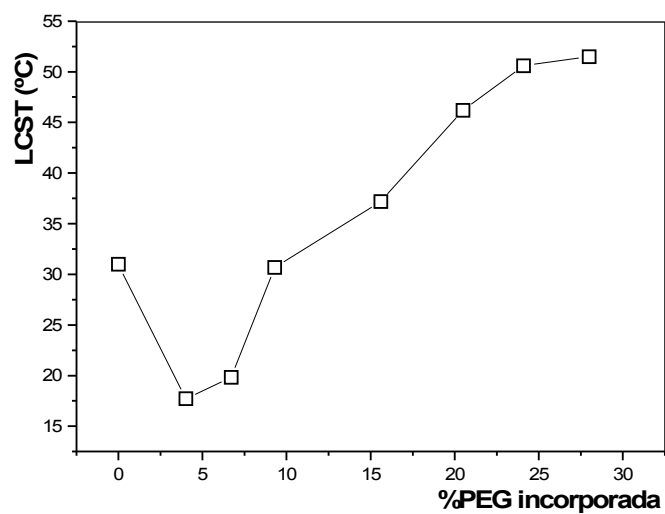


Figura 33: LCST em função da % PEG incorporada nos polímeros.

Tabela 8: Valores da LCST de soluções aquosas 0,1% (m/v) dos polímeros determinadas através de fotometria.

Polímero	LCST (°C)
100:0:0	31,0
90:5:5	17,7
80:10:10	19,8
80:15:5	30,7
70:25:5	37,2
67:28:5	46,2
65:30:5	50,6
60:35:5	51,5

Quando a terpolimerização é feita com aumento simultâneo dos monômeros de PEG e de DOMA, observa-se uma diminuição do ponto de turvação, que pode ser creditado a um efeito maior do monômero hidrofóbico sobre o monômero hidrofílico. Este efeito pode ser observado nos terpolímeros 90:5:5 e 80:10:10, cujas temperaturas no ponto de turvação são, respectivamente, de 17,7°C e de 19,8°C.

4.2.1.2- Efeito da força iônica: pH 7,4 – Tampão fosfato

O efeito da força iônica sobre a temperatura de turvação foi estudado para avaliar o comportamento dos sistemas poliméricos pela adição de quantidades crescentes de sal. O valor de 7,4 para o pH foi escolhido por ser aproximadamente o pH fisiológico e atenção maior foi dada ao comportamento da temperatura de transição em força iônica 0,15 mol dm⁻³ por ser esta também a força iônica fisiológica aproximada.

A adição de pequenas quantidades de sal à solução dos polímeros provoca um decréscimo na temperatura de transição, conforme pode ser visto nas figuras 34, 35 e 36, que mostram os resultados obtidos para os valores da temperatura de turvação variando-se a força iônica das soluções pela adição de KCl, obtendo-se soluções com força iônica de 0,15 a 0,50 mol dm⁻³. Pela análise dos dados obtidos, observa-se que quando a força iônica da solução aumenta, há um decréscimo no valor da temperatura de turvação dos polímeros. Este decréscimo é causado por mudanças das interações entre o polímero e o solvente, devido à presença de sais, efeito conhecido como “salting out”. A adição de sal pode alterar a hidratação promovida pelas moléculas de água altamente orientadas que rodeiam o polímero. Isto resulta em um aumento do caráter hidrofóbico da cadeia polimérica, com conseqüente diminuição da sua temperatura de transição (Eeckman et al., 2001). A presença de sal aumenta a polaridade do meio aquoso, então, aumenta as interações hidrofóbicas. O incremento das interações favorece a agregação, fato que resulta em uma solubilidade menor

do polímero em água e conseqüentemente, há decréscimo na temperatura de turvação (LIU et al., 2004).

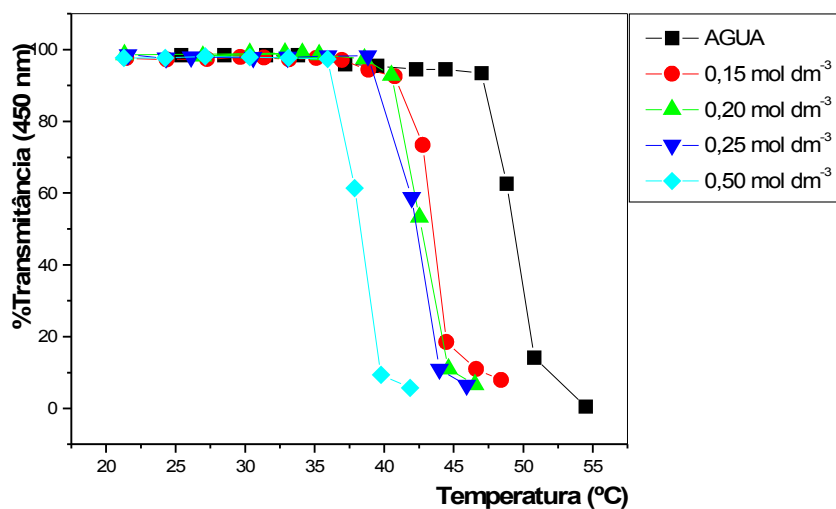


Figura 34: %Transmitância em função da temperatura para soluções a 0,1% (m/v) para o polímero 67:28:5 em água e em solução tampão pH 7,4 em força iônica crescente.

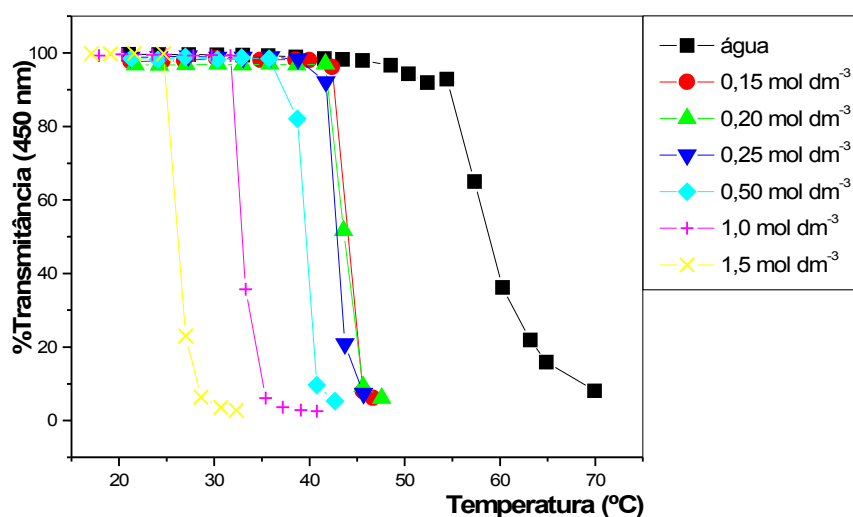


Figura 35: %Transmitância em função da temperatura para soluções a 0,1% (m/v) do polímero 60:35:5 em água e em solução tampão pH 7,4 em força iônica crescente.

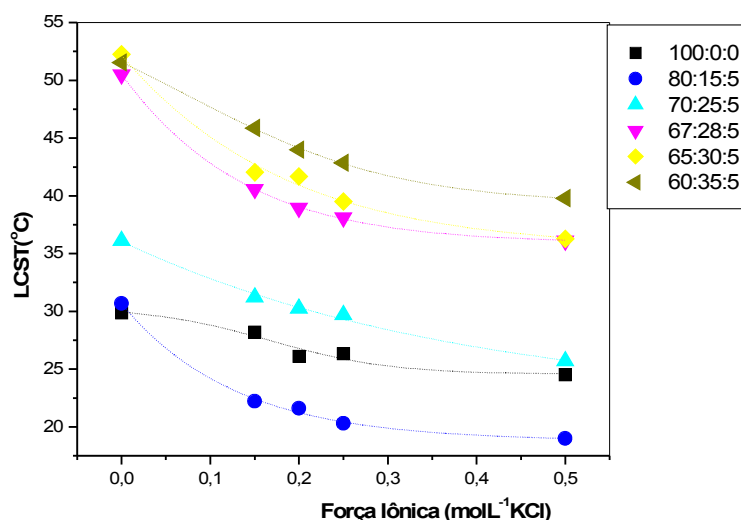


Figura 36: Temperatura de turvação de soluções 0,1% (m/v) dos terpolímeros em solução tampão pH 7,4 em função da força iônica.

A figura 36 mostra que para o terpolímero 80:15:5 o efeito da força iônica é mais pronunciado que para os outros polímeros, incluindo o PNIPAm. Isto pode ser devido a uma maior interação hidrofóbica quando as cadeias são desidratadas, devido à presença do monômero hidrofóbico DOMA e ao conteúdo relativamente pequeno de PEG. Como resultado, há uma forte tendência para o polímero sofrer agregação e diminuir a temperatura de turvação.

O terpolímero 67:28:5 pode ser sugerido como uma proposta para a utilização em sistema transportador de fármaco, desde que, em pH 7,4 e força iônica 0,15 mol dm⁻³ ele apresenta uma temperatura de turvação de aproximadamente 40°C (figura 37). Valores próximos a esta temperatura têm sido utilizados para aquecer locais do corpo onde existem tumores, tratamento conhecido como hipertermia. Pesquisas recentes têm mostrado que o tratamento com agentes quimioterápicos tradicionais tem pouco efeito em câncer em ratos, enquanto que há um aumento significativo do efeito quando o fármaco está encapsulado e o local de atuação da droga é aquecido. Pesquisas com hipertermia para liberação controlada de

fármacos também estão sendo realizadas em seres humanos com resultados significativos (BLACKWELL et al., 2002).

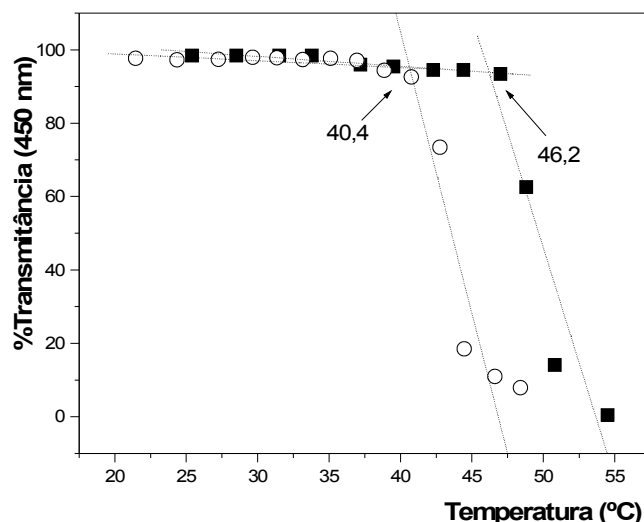


Figura 37: Temperatura de turvação para o terpolímero 67:28:5 em: (■) solução aquosa e (○) solução tampão pH 7,4 e força iônica $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ em KCl.

4.2.2 - Microcalorimetria diferencial de varredura

Medidas de microcalorimetria diferencial de escaneamento (DSC) efetuadas para os polímeros em solução aquosa, mostraram que os pontos de turvação estão de acordo com aqueles determinados através de fotometria no visível. Nas figuras 38 e 39 os termogramas dos polímeros 100:0:0 e 90:5:5 indicam uma LCST bem próxima da que foi determinada por fotometria. A temperatura do ponto de turvação reportada por análises de DSC é tradicionalmente obtida pela intersecção da linha base e a porção linear do pico do termograma. Esta temperatura é referida como temperatura “on set” e é indicada por T_{eo} . Os termogramas para os demais polímeros encontram-se no apêndice 7. Na tabela 9 são apresentados os valores da temperatura de turvação feita pelos dois métodos e observa-se que há boa concordância nos resultados.

Esta concordância sugere que os dois métodos são bons para avaliação da temperatura de turvação dos polímeros e, apesar do método da microcalorimetria ser mais sensível, as duas técnicas podem ser comparadas.

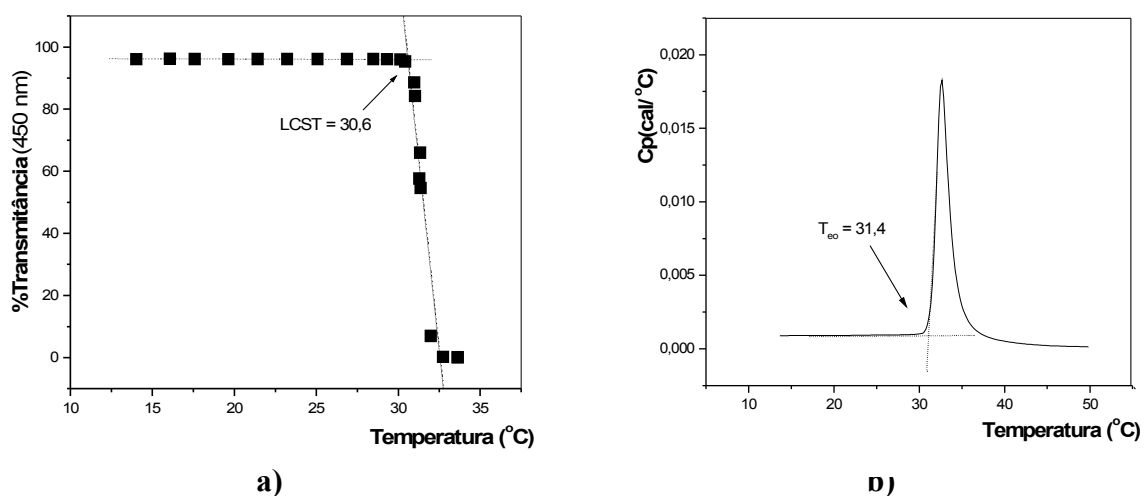


Figura 38: Temperatura de turvação do homopolímero de NIPAM:
a) determinada por fotometricamente.
b) determinada por calorimetria diferencial de escaneamento.

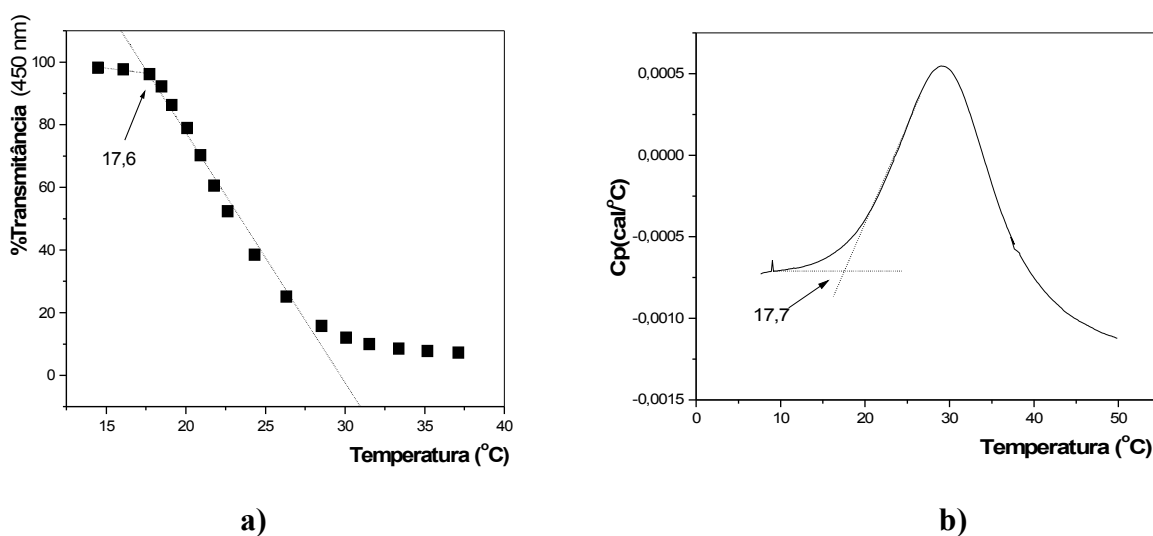


Figura 39: Temperaturas de turvação do terpolímero 90:5:5:
a) determinada fotometricamente.
b) determinada por calorimetria diferencial de escaneamento.

Tabela 9: Temperaturas de turvação determinadas utilizando-se fotometria e microcalorimetria para os polímeros em solução aquosa, em concentrações 0,1% e 0,66%, respectivamente.

Polímero	Fotometria(°C)	DSC (°C)
100:0:0	30,6	31,4
90:5:5	17,6	17,7
80:10:10	19,8	17,9
80:15:5	30,7	-----
70:25:5	37,2	36,5
67:28:5	46,2	44,5
65:30:5	50,6	45,8
60:35:5	51,5	50,0

4.3 Investigação da formação de microdomínios hidrofóbicos e determinação da CAC (concentração de agregação crítica) para os polímeros da série 1.

4.3.1- Fluorescência

A CAC (ou CMC) pode ser determinada por diferentes técnicas (tensão superficial, espalhamento de luz, condutividade) capazes de indicar mudanças rápidas no parâmetro medido nas proximidades ou na CAC. Entretanto, para polímeros anfifílicos, cuja CAC apresenta valores muito baixos, o método que tem sido preferencialmente usado é o que envolve a utilização de sondas fluorescentes (JONES; LEROUX, 1999).

As medidas de fluorescência foram realizadas utilizando-se a razão I_1/I_3 do pireno para obter informações sobre o processo de agregação desses terpolímeros anfífilos. A razão do primeiro e terceiro picos vibracionais do espectro de emissão do pireno (I_1/I_3), é uma medida da micropolaridade em um certo meio. A sonda pireno dissolvida em água pura apresenta um valor para I_1/I_3 de aproximadamente 1,9 e este valor decresce quando a polaridade do meio diminui. Por exemplo, em ciclo hexano, a razão I_1/I_3 é de 0,58. Em polímeros anfífilos espera-se que os grupos hidrofóbicos associem-se para formar micro-fases de natureza hidrofóbica, com propriedades similares às de micelas de surfactantes (WINNICK et al., 1992). A figura 40 apresenta a razão I_1/I_3 do espectro de emissão do pireno em função da concentração para os terpolímeros 90:5:5 e 80:10:10, que apresentam maior proporção hidrofóbica. O intercepto representa a concentração de agregação crítica (CAC), com um valor em torno de $3,6 \times 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$ e $1,2 \times 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$, respectivamente. Observa-se que, os valores da razão I_1/I_3 permanecem relativamente constantes abaixo da CAC, e a partir de determinada concentração a razão I_1/I_3 tem uma queda acentuada, denotando que o pireno, como molécula hidrofóbica, aloja-se nos microdomínios hidrofóbicos do terpolímero. À medida que a concentração aumenta, a razão I_1/I_3 chega a valores em torno de 1,3 e permanece praticamente constante. Acima da CAC, observa-se uma queda substancial na razão I_1/I_3 indicando que as cadeias formam agregados intermoleculares.

Copolímeros randômicos de AMPS (2-acrilamida-2-metilpropanosulfonato de sódio) e DOMA foram sintetizados e associações intermoleculares foram observadas, que sugerem a formação de micelas multipoliméricas. Tem-se reportado que, quando o tamanho da cadeia hidrocarbônica de um monômero é aumentado, como no caso do DOMA, interações intermoleculares são mais favoráveis (NODA et al., 2000). As moléculas de pireno migram para estes microdomínios hidrofóbicos até que a razão I_1/I_3 permaneça inalterada, denotando a migração total do pireno, como esperado. Deve-se também considerar que o aumento da

concentração do polímero pode induzir o aumento do tamanho do agregado, com a concomitante expulsão de água dos microdomínios, o que pode contribuir para o decréscimo da razão I_1/I_3 .

O homopolímero PNIPAm, cuja curva da razão I_1/I_3 em função da concentração é mostrada na figura 41, indica que o homopolímero não sofre qualquer tipo de agregação, uma vez que a sonda não exibiu nenhuma mudança, ou seja, não houve mudança de polaridade.

Nos terpolímeros observa-se que aumentando-se a proporção do monômero hidrofílico PEG na síntese e mantendo-se constante a porção hidrofóbica (DOMA), o valor da CAC aumenta, o que pode ser visto na figura 42. Os valores baixos encontrados para as concentrações de agregação crítica dos terpolímeros sintetizados neste trabalho torna-os similares a surfactantes formadores de micelas, podendo então ser dito que os agregados formados são similares a micelas de surfactantes, com a vantagem de apresentarem-se estáveis em regime altamente diluído. Valores similares a estes foram encontrados por Cammas et al, 1997 que sintetizaram copolímeros do tipo bloco com PNIPAm e poli(estireno) e avaliaram o comportamento das micelas formadas utilizando pireno como sonda fluorescente. O estudo mostrou que a sonda ficou incorporada no miolo das micelas poliméricas. Estes autores estenderam o estudo visando explorar esta propriedade para a incorporação de drogas anti-câncer nos agregados. A CMC encontrada para esses copolímeros foi da ordem de $10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$. Noda; Kamachi, 2000 encontraram valores de CMC em torno de $3 \times 10^{-4} \text{ g dm}^{-3}$ para copolímeros randômicos sintetizados a partir de AMPS e PEG monodeciléter.

Para os polímeros com uma maior proporção do monômero PEG encontraram-se valores da razão I_1/I_3 similares aos dos surfactantes CTAC ($I_1/I_3 = 1,35$) e CTAB ($I_1/I_3 = 1,30$) (LIU et al., 2003), enquanto que para os polímeros mais hidrofóbicos (90:5:5 e 80:10:10)

os baixos valores para a razão I_1/I_3 encontrados (1,1 e 1,2, respectivamente) são muito próximos ao valor observado para micelas de SDS (NODA; KAMACHI, 1999).

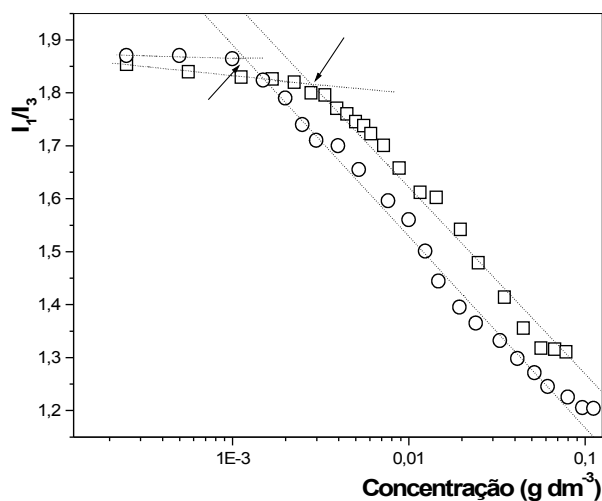


Figura 40: Razão I_1/I_3 do espectro de emissão do pireno em função da concentração para os terpolímeros ($\square$) 90:5:5 e ($\circ$) 80:10:10.

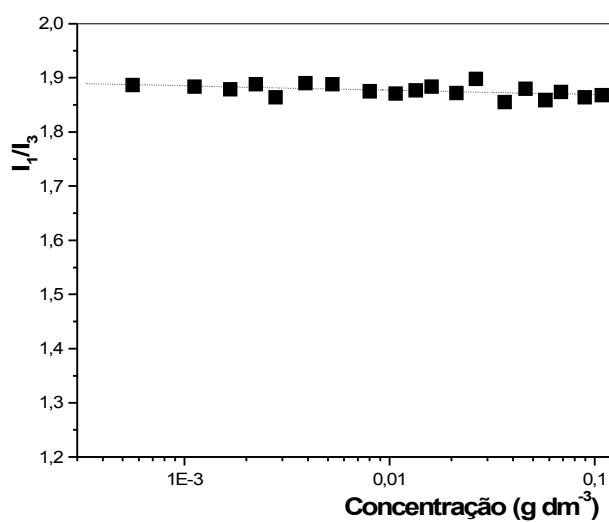


Figura 41: Razão I_1/I_3 do espectro de emissão do pireno em função da concentração para o homopolímero 100:0:0.

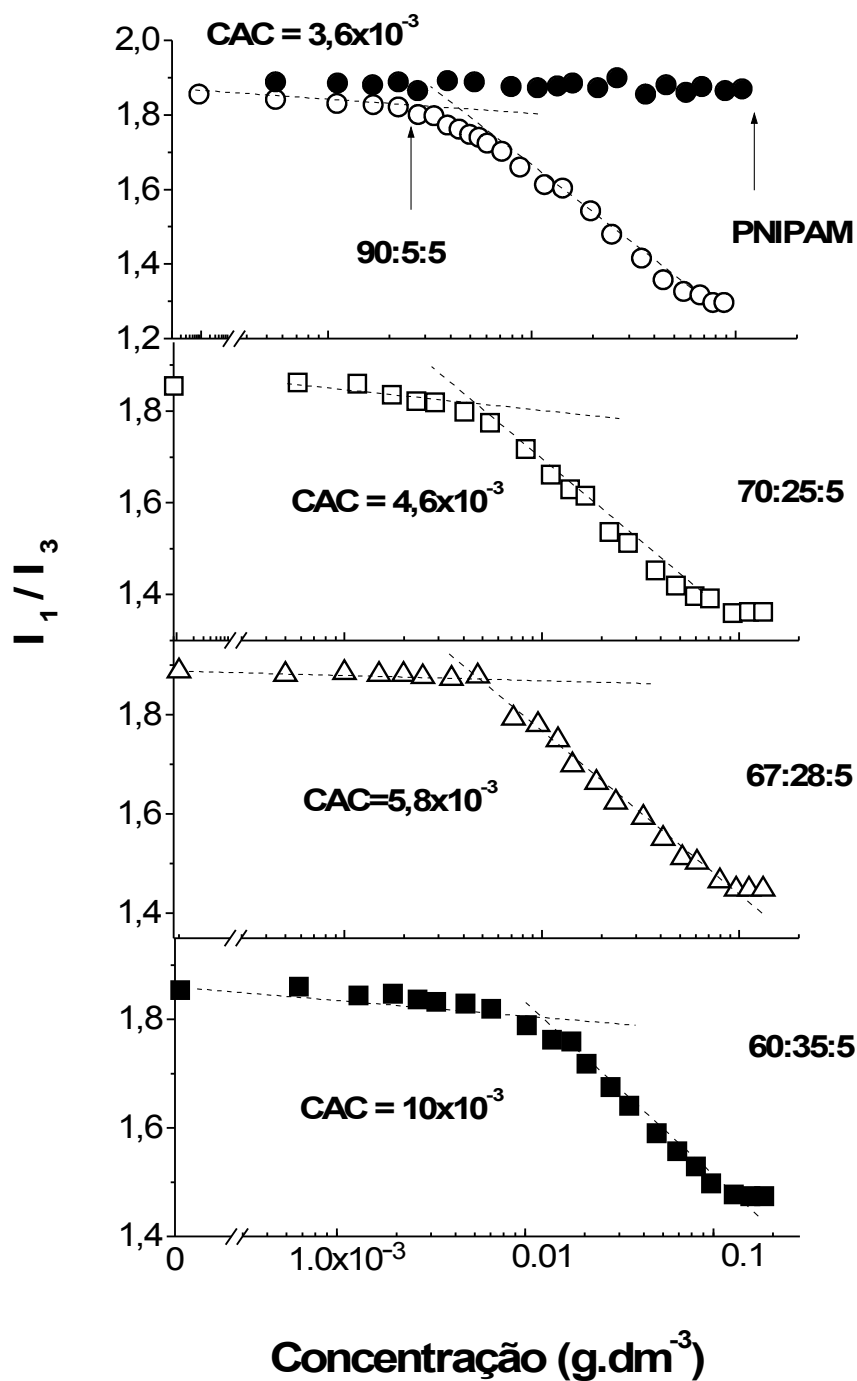


Figura 42: Razão I_1/I_3 do espectro de emissão do pireno em função da concentração para os terpolímeros, temperatura 15°C .

O estudo do efeito da temperatura sobre soluções aquosas dos terpolímeros de concentração $1,0 \text{ g dm}^{-3}$ foi feito utilizando a sonda pireno. Nesta concentração os polímeros encontram-se no estado agregado e a sonda completamente alojada nos domínios

hidrofóbicos. Neste estudo, foi variada a temperatura das soluções de 15 a 60°C em função da razão I_1/I_3 para averiguação do comportamento dos agregados, quando a temperatura é aumentada, ou seja, como a temperatura acima e abaixo da temperatura de turvação influencia a polaridade dos microambientes (figura 43).

Na presença do homopolímero 100:0:0, para temperaturas abaixo do ponto turvação a razão I_1/I_3 não é afetada já que este polímero não forma agregados em solução. Quando a temperatura é aumentada até a LCST o polímero sofre turvação, expondo as cadeias hidrofóbicas, passando do estado “coil” a globular, então a razão I_1/I_3 decresce notadamente, significando a transferência da sonda para a fase hidrofóbica precipitada do polímero (figura 43). Para os terpolímeros, a razão I_1/I_3 permanece baixa, ou seja, não há variação a ser considerada, indicando que a sonda pireno encontra-se associada à unidade hidrofóbica do polímero agregado de tal maneira que o ambiente da sonda não é perturbado pela desidratação das unidades das cadeias de NIPAm na LCST. O ambiente do microdomínio hidrofóbico formado pelos agregados parece ser ligeiramente menos polar que o provocado pelo colapso da cadeia do NIPAm. Observa-se um decréscimo mais pronunciado na razão I_1/I_3 nos terpolímeros 80: 10: 10 e 90: 5: 5 e isto pode ser atribuído ao maior caráter hidrofóbico destes polímeros, ou seja, a sonda pireno encontra-se em um ambiente de menor polaridade.

Medidas da razão I_1/I_3 do homopolímero 100: 0: 0 em função da temperatura com variação da força iônica da solução são mostradas na figura 44. Comparando-se, pelo gráfico desta figura, os valores de I_1/I_3 no início do experimento, observa-se que para o polímero em solução aquosa estes valores estão em torno de 1,9 e em solução salina em torno de 1,4. A adição de sal provoca um decréscimo na razão I_1/I_3 e isto é explicado pela retirada da camada de hidratação da cadeia polimérica, efeito este provocado pelo sal, expondo mais o caráter hidrofóbico da cadeia, que sofre agregação. É o chamado efeito “*salting out*”. Sendo assim, a sonda tende a se alojar nos microdomínios hidrofóbicos formados pela agregação, o que

provoca diminuição na razão I_1/I_3 . Com o aumento da temperatura o polímero atinge o ponto de turvação, há aumento na formação de agregados por maior exposição das cadeias hidrofóbicas e I_1/I_3 decresce até a estabilidade (em torno de 1,1) quando todo o pireno está incorporado pelos agregados. Para os terpolímeros o efeito da força iônica sobre a razão I_1/I_3 não foi significativo e portanto não está sendo considerado. Devido à formação prévia de agregados em solução aquosa, a sonda já está incorporada e portanto, a desidratação das unidades de N-isopropilacrilamida não afeta o ambiente da sonda.

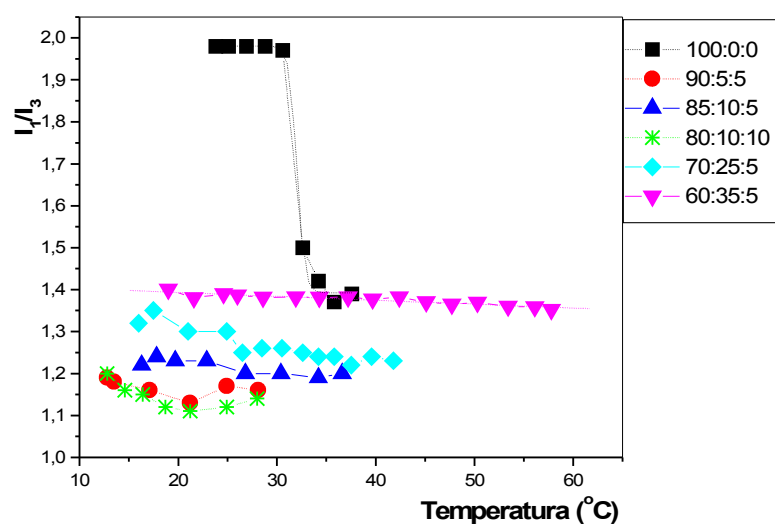


Figura 43: Razão I_1/I_3 em função da temperatura para os terpolímeros em solução aquosa $1,0 \text{ g dm}^{-3}$.

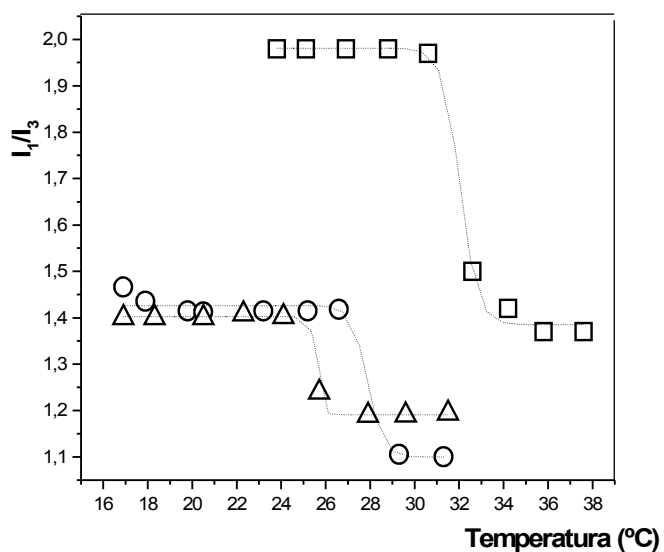


Figura 44: Razão I_1/I_3 em função da temperatura para o homopolímero 100:0:0 em (□) solução aquosa, em (○) tampão força iônica $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$ e (Δ) força iônica $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$.

A figura 45 mostra que se encontram em concordância as metodologias UV-Visível e fluorescência utilizadas para determinação do ponto de turvação do homopolímero 100:0:0.

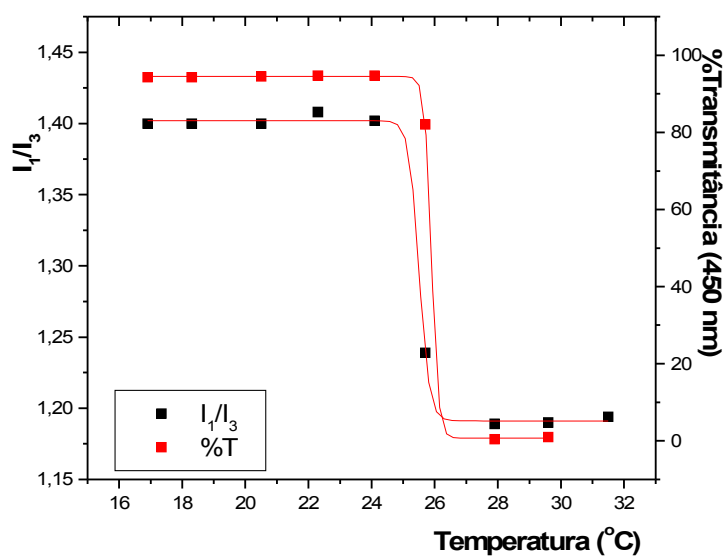


Figura 45: Curvas de I_1/I_3 e transmitância em função da temperatura para o homopolímero 100:0:0 em solução $1,0 \text{ g dm}^{-3}$ força iônica $0,50 \text{ mol dm}^{-3}$.

4.4 – Anisotropia de Fluorescência – Série 1

A rigidez do ambiente dentro de uma micela ou de qualquer microdomínio hidrofóbico, pode em princípio, ser determinada por polarização da fluorescência (anisotropia) de sondas solubilizadas em tais domínios, originadas pela depolarização da sonda devido à sua difusão rotacional. O valor da anisotropia diminui com o decréscimo da microviscosidade do miolo micelar porque a difusão rotacional da sonda é aumentada. A sonda utilizada para esta avaliação (4H4A) é muito sensível à organização do microdomínio onde se encontra alojada (BONASSI, 1998). É possível, então, para os polímeros sintetizados, verificar como a composição do polímero, ou seja, o balanço hidrofílico/hidrofóbico afeta a organização dos agregados formados.

A figura 45 mostra os valores obtidos para a anisotropia dos polímeros mais hidrofóbicos (90:5:5 e 80:10:10) e para os mais hidrofílicos (65:30:5 e 60:35:5) bem como para o homopolímero de NIPAm (100:0:0). Os cálculos efetuados para determinação da anisotropia (r) encontram-se descritos na parte experimental desta tese.

Para os polímeros mais hidrofóbicos, os valores de anisotropia encontrados foram próximos de 0,3. Este valor é semelhante aos obtidos para os surfactantes DTAB e CTAB utilizando a mesma sonda, indicando que esta comporta-se como se estivesse em micelas de surfactantes catiônicos (BLAZ VIEIRA et al., 2005). Para os polímeros mais hidrofílicos, os valores da anisotropia são menores do que os valores dos polímeros hidrofóbicos, apresentando valores na faixa de 0,25 a 0,28, indicando que os microambientes parecem ser estruturas mais hidratadas, ou ainda, os valores mais baixos para a anisotropia podem ser devido à maior flexibilidade do conteúdo do miolo hidrofóbico, que causa um aumento na difusão rotacional da sonda. Estes resultados estão de acordo com os estudos feitos com a sonda pireno, que avaliou a razão I_1/I_3 de soluções dos polímeros. Esta comparação pode ser observada na figura 47, que mostra a curva da razão I_1/I_3 em função de valores de anisotropia

e nota-se que, valores maiores para a anisotropia correspondem à valores menores para a razão I_1/I_3 .

Analisando os gráficos para o homopolímero de NIPAm observa-se que, antes do ponto de turvação, os valores para a anisotropia variam de 0,15 a 0,18, que corresponde aos valores para a sonda 4H4A em meio aquoso, confirmando os dados obtidos com a sonda pireno. Quando o ponto de turvação é atingido, o valor para a anisotropia aumenta consideravelmente, confirmando mais uma vez os estudos deste polímero com a sonda pireno.

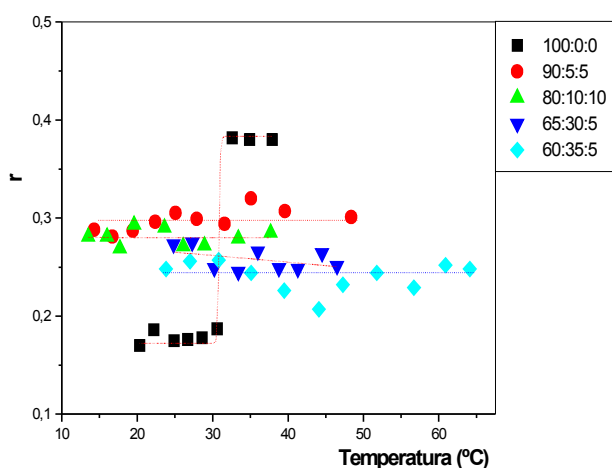


Figura 46: Anisotropia de fluorescência em função da temperatura para os terpolímeros a 0,1% (m/v)

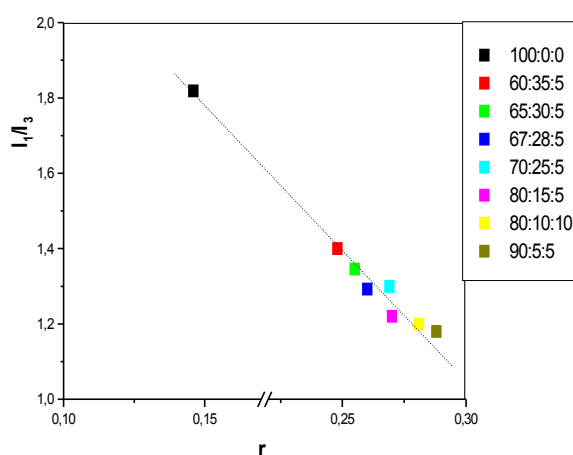


Figura 47: Razão I_1/I_3 em função da anisotropia para os terpolímeros a 20°C.

4.5 – Tamanho dos agregados – Espalhamento de luz dinâmico (DLS) - Série 1

Análises efetuadas através de espalhamento de luz dinâmico (DLS) mostraram que o tamanho dos agregados, em solução, aumenta com o aumento da porção hidrofílica do monômero PEG. Polímeros com menor conteúdo de PEG apresentaram diâmetro hidrodinâmico em torno de 50 nm enquanto para os mais hidrofílicos o diâmetro variou de 120 a 150 nm. Estes valores podem ser vistos na tabela 10.

Tabela 10: Diâmetro hidrodinâmico dos terpolímeros em solução 0,1% (m/v), a 20°C, (para 90:5:5 e 80:10:10 a temperatura foi de 15°C)

Terpolímeros	D_H(nm)
90:5:5	52,6 ± 6
80:10:10	71,0 ± 6
80:15:5	35,5 ± 6
70:25:5	39,1 ± 5
60:35:5	120,1 ± 15
65:30:5	136,4 ± 20
67:28:5	142,8 ± 15

O polímero 80:10:10, apesar de ter baixo conteúdo de PEG, apresentou agregados maiores, com diâmetro em torno de 70 nm, o que pode ser atribuído à interações hidrofóbicas entre as cadeias de DOMA, já que este polímero apresenta uma proporção maior deste monômero. O menor tamanho para os agregados dos terpolímeros 80:15:5, 70:25:5 e 90:5:5 deve-se provavelmente ao aumento de entropia causado pela tendência da porção hidrofóbica (DOMA) de evitar o contato desfavorável com o meio aquoso. Este efeito deve levar as cadeias poliméricas a sofrerem organização no sentido de formar agregados mais rígidos com diâmetros menores. Além disso, a casca hidrofílica de PEG deve proteger o miolo hidrofóbico de outras interações (CHUNG et al., 1997). Esta suposição explica a baixa polaridade dos agregados e a anisotropia relativamente alta dos mesmos, obtida através dos experimentos com sondas fluorescentes.

Estudos avaliando o efeito da temperatura no tamanho dos agregados podem ser vistos na figura 48.

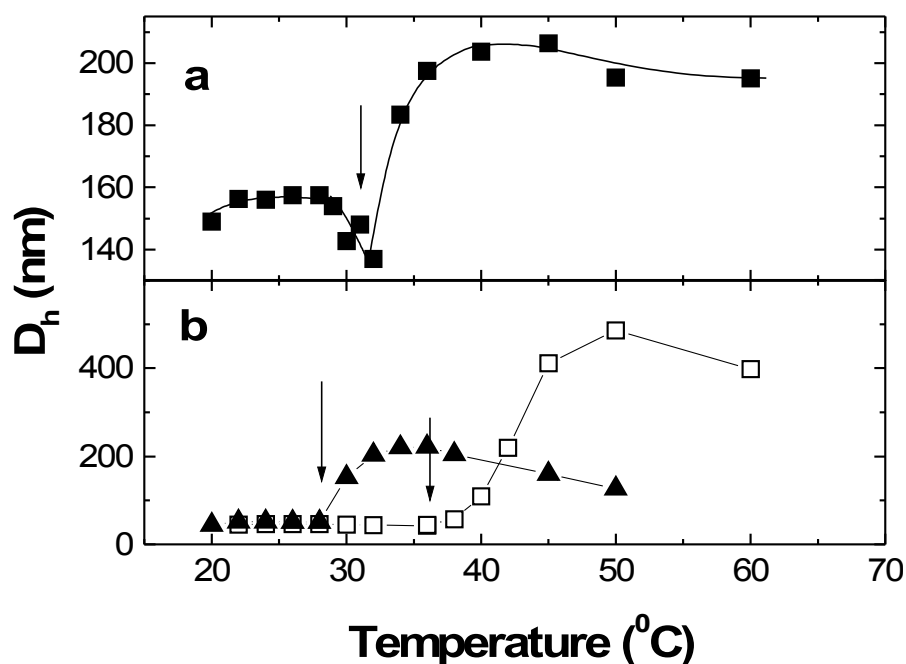


Figura 48: Diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura para os polímeros (■) 100:0:0, (▲) 85:15:5 e (□) 70:25:5 em solução 5 gL^{-1} , as setas indicam os pontos de turvação determinados por medidas fotométricas.

Da figura observa-se que, para os terpolímeros, quando a temperatura atinge a LCST há um aumento substancial do diâmetro das partículas, provavelmente devido às interações hidrofóbicas entre as cadeias expostas após a turvação, ou seja, a agregação das partículas formam estruturas com diâmetros maiores. Após alcançar a transição de fase, observa-se um decréscimo no diâmetro das partículas sugerindo-se que, a água, gradualmente torna-se um solvente pobre para as partes hidrofóbicas expostas e tende, então, a ser expelida, efeito que causa contração dos agregados, diminuindo o tamanho das partículas. Por sua vez, não se pode descartar o fato de que, uma vez iniciada a agregação, as partículas maiores decantem, ficando em suspensão somente as partículas menores, o que levaria a um decréscimo aparente do raio hidrodinâmico.

O homopolímero de NIPAm, observado na figura 48-a, mostra um decréscimo do diâmetro antes da temperatura de transição e, logo após esta ser atingida, há um aumento significativo em D_h . A diminuição do diâmetro antes da LCST pode ser explicada pela

transição “*coil*” a globular que o polímero sofre pouco antes do estado de transição. Após o colapso da cadeia, com o aumento da temperatura, há a precipitação do polímero e ocorre interação entre as cadeias expostas, causando um aumento no diâmetro das partículas.

A figura 49 mostra a distribuição do tamanho das partículas como sendo bimodal abaixo da LCST, para os terpolímeros em solução aquosa. Quando os terpolímeros estão em solução tampão e presença de força iônica, a distribuição de tamanho torna-se unimodal, indicando que, em presença de sais, o colapso é favorecido, como consequência da desidratação dos agregados.. Como já discutido acima, a desidratação pode ocorrer tanto nas cadeias de PNIPAm como nas de PEG, então os agregados apresentam um menor tamanho. A figura 50 confirma o decréscimo do tamanho dos agregados com o aumento da força iônica. Observa-se que, quanto maior a força iônica, menor o diâmetro hidrodinâmico das partículas. Sugere-se a mesma explicação para a desidratação das cadeias.

É conhecido que a presença de sais induz a transição de fase para temperaturas mais baixas. Isto sugere que a porção do polímero sensível à temperatura é mais desidratada em solução tampão apresentando força iônica que em água. Este efeito provoca desidratação das partes hidrofílicas das nanopartículas poliméricas, o que resultará em um tamanho menor para os agregados. Além disso, íons podem desidratar parcialmente cadeias de PEG, resultando em agregação das partículas (JEONG et al.,1998).

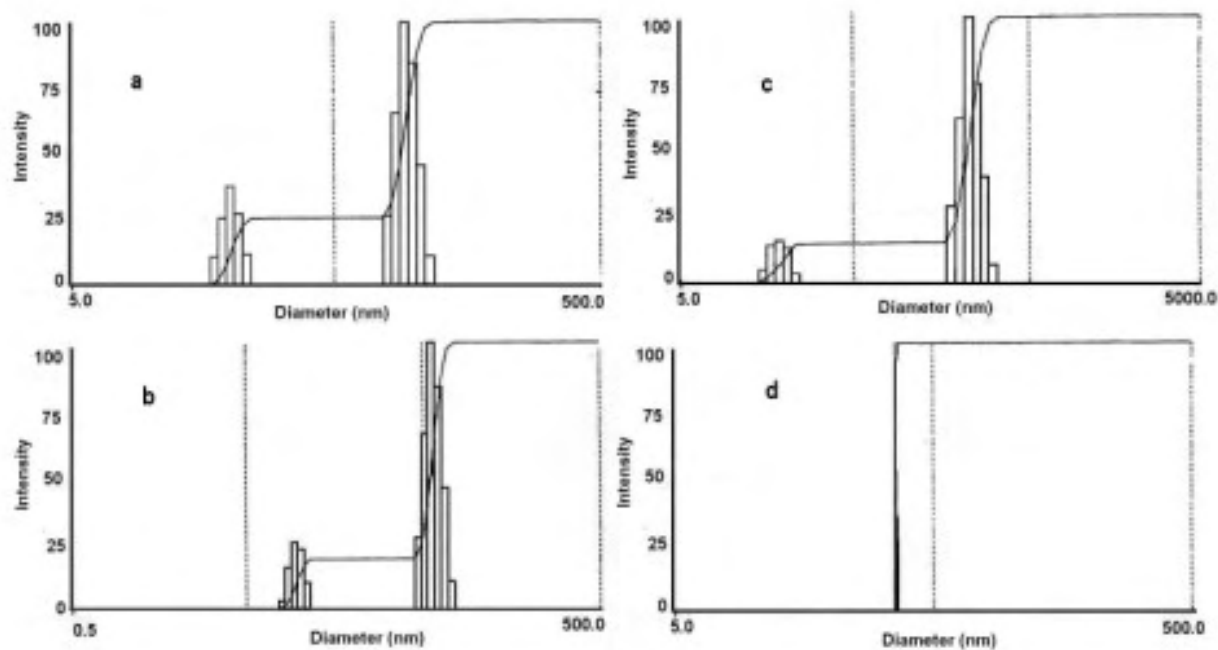


Figura 49: Distribuição do tamanho para os terpolímeros (a) 90:5:5 (b) 80:15:5 (c) 67:28:5 em solução aquosa e (d) 67:28:5 em solução tampão pH 7,4 e $1,5 \text{ mol dm}^{-3}$ em KCl., a 20°C ..

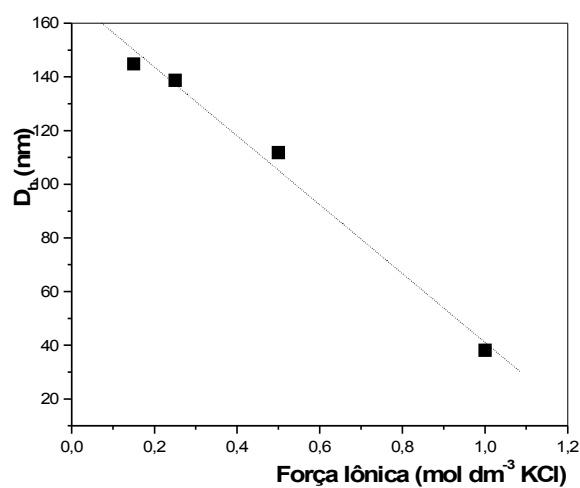


Figura 50: D_h em função da força iônica. Terpolímero 67:28:5, solução 0,1% (m/v), a 20°C .

O efeito da concentração das soluções no diâmetro das partículas também foi avaliado e observou-se um aumento no tamanho dos agregados com o aumento da concentração (figuras 51 e 52). Provavelmente, com o aumento da concentração, a probabilidade de agregação interpolímeros aumenta, resultando em partículas maiores. Neradovic et al, 2004 estudaram este efeito em copolímeros bloco de PNIPAm- PEG e PNIPAm- N-(2-hidroxipropil) metacrilamida- dilactato e encontraram resultados similares.

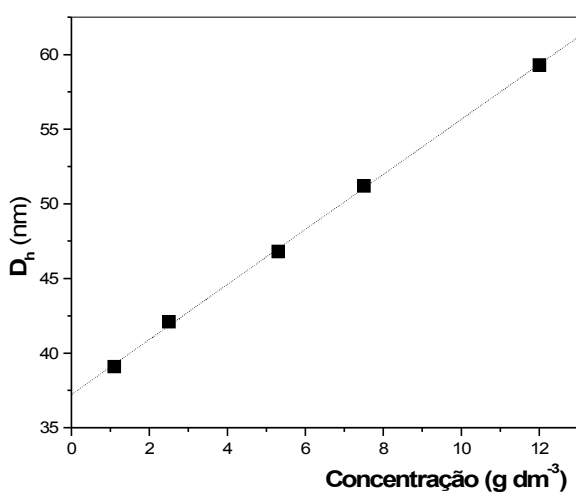


Figura 51: D_h em função da concentração para o polímero 70:25:5, em solução aquosa, a 20°C.

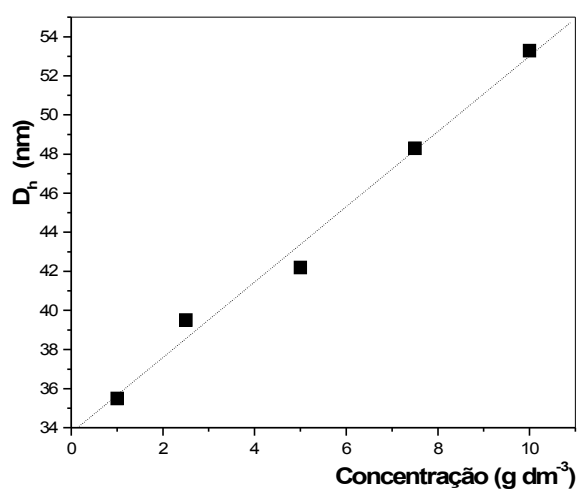


Figura 52: D_h em função da concentração para o polímero 80:15:5, em solução aquosa, a 20°C.

4.6 - Incorporação de moléculas hidrofóbicas nos agregados hidrofóbicos poliméricos – Série 1

4.6.1- Incorporação de pireno

Para avaliar a aplicabilidade destes polímeros como possíveis transportadores de fármacos, o pireno foi empregado como modelo de agente hidrofóbico. A metodologia utilizada é discutida no item 3.7.1 e as nanopartículas sólidas obtidas foram dissolvidas em clorofórmio e analisadas por espectroscopia UV em 338nm.

A tabela 11 mostra os resultados da incorporação do pireno nos terpolímeros, obtidos por comparação em curva padrão de pireno em clorofórmio (figura 53). Pode ser observado que há uma incorporação maior para polímeros contendo maior proporção de monômero hidrofóbico. Como estes terpolímeros apresentam um miolo mais hidrofóbico, pode haver um aumento da compatibilidade entre o pireno e tais microdomínios das nanopartículas. Zhang et al, 2004 incorporaram pireno em nanopartículas formadas por PEG-b-PLA com tamanho variando entre 52 a 117 nm e obtiveram incorporação de 3,7 a 8,0 mg/g. Liu et al, 2004 sintetizaram polímeros termo-sensíveis grafítizados utilizando o polímero randômico PNIPAm-N-hidroximetilacrilamida com colesterol. A temperatura de turvação foi de 40,5°C e a CMC de $4 \times 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$, com micelas de tamanho variando entre 25 e 34 nm. Incorporaram a quantidade de 4,4 mg de pireno por grama de polímero.

Tabela 11: Quantidade de pireno incorporada nos terpolímeros

Terpolímeros	mgpireno/gpolímero
90:5:5	$3,63 \pm 0,10$
80:10:10	$6,14 \pm 0,15$
85:10:5	$3,61 \pm 0,20$
70:25:5	$2,58 \pm 0,19$
65:30:5	$2,65 \pm 0,33$
67:28:5	$3,18 \pm 0,21$
60:35:5	$2,49 \pm 0,24$

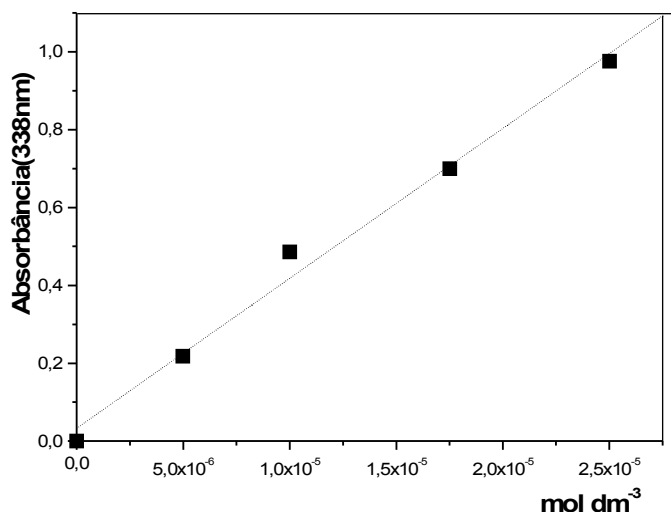


Figura 53: Curva de absorvância em função da concentração de pireno em clorofórmio.

4.6.2 - Incorporação de Doxorubicina (Adriamicina –ADR-HCl) – Série 1

Doxorubicina, um dos fármacos anti-câncer mais potentes, atua por inibir a síntese de ácidos nucleicos dentro de células cancerosas, mas leva a um número indesejável de efeitos colaterais, e isso tem restringido a sua utilização. Muitos pesquisadores têm estudado caminhos que levam a doxorubicina às células cancerosas com diminuição dos efeitos colaterais. A aplicação de injeções intravenosas de doxorubicina encapsulada em nanopartículas de quitosana de diâmetro de aproximadamente 100 nm mostrou redução de 60% do volume do tumor em ratos, com poucos efeitos colaterais (PEPPAS et al.,2004).

A incorporação de doxorubicina nos agregados poliméricos foi efetuado apenas para o terpolímero 67:28:5, que foi o que mostrou características mais próximas para ser empregado no corpo humano. A quantidade de doxorubicina incorporada no polímero 67:28:5 apresentou valor de $13,46 \pm 0,67 \text{ mg}_{\text{doxo}}/\text{g}_{\text{polímero}}$, obtido por comparação com uma curva padrão de doxorubicina em DMF (figura 54), com uma eficiência de incorporação de $4,8 \pm 0,2\%$. Estes dados estão consistentes com Kang et al, 2003 que copolimerizaram NIPAM com N,N-

dimetilacrilamida e sulfametoxipiridazina. Eles obtiveram partículas com diâmetro de 40 nm e CAC de $1,2 \times 10^{-3} \text{ g dm}^{-3}$ onde incorporaram doxorubicina e obtiveram uma quantidade incorporada entre 13,8 e 15,7 mg/g com uma eficiência de incorporação de 5,5 a 6,3%. Shuai et al, 2004 copolimerizaram blocos de poli(ϵ -caprolactona)-monometoxiPEG e obtiveram uma eficiência de incorporação de doxorubicina entre 3,3 a 4,3%.

A princípio, pode-se sugerir que os terpolímeros com agregados mais hidrofóbicos possivelmente irão incorporar uma maior quantidade de doxorubicina, já que este fármaco é de caráter hidrofóbico e portanto terá maior compatibilidade em microdomínios com menor polaridade.

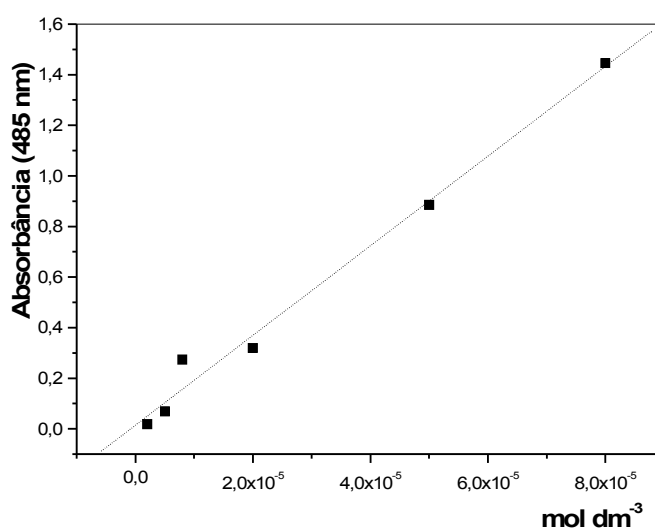


Figura 54: Curva de absorvância em função da concentração de doxorubicina em dimetilformamida.

4.7 – Determinação da temperatura de turvação ou LCST - Série 2

4.7.1 – Efeito do pH

O ponto de turvação ou LCST dos terpolímeros sintetizados a partir de NIPAm, PEG e VBA foram determinados por espectrofotometria UV-Visível e a temperatura de transição foi calculada como o ponto de inflexão da curva de transmitância em função da temperatura.

A variação do pH de soluções aquosas de PNIPAm não tem efeito significativo na LCST do homopolímero (JONES, 1999). A copolimerização de NIPAm com monômeros que são sensíveis ao pH, como o VBA, resulta em um material polimérico com sensibilidade à temperatura e ao pH. Os resultados apresentados nas figuras 56 e 57 mostram que a sensibilidade ao pH dos terpolímeros aumenta à medida que cresce a proporção do monômero que contém grupos ionizáveis. Tiera et al, 2005 estudaram estas propriedades para polímeros de NIPAm-Ácido acrílico-etilmetacrilato e obtiveram resultados semelhantes. Portanto, o terpolímero 70:10:20 deve apresentar uma maior sensibilidade ao pH. Na verdade, este terpolímero, com uma proporção relativamente grande (20% em mol) de VBA, apesar de ter uma sensibilidade maior ao pH, tem sua sensibilidade à temperatura diminuída. A dissolução do polímero só foi possível a partir de pH 6,5, onde obteve-se um valor para a temperatura de turvação de 56,5°C. Em pH 7,0 e 7,4 o terpolímero não apresentou sensibilidade à temperatura. Um copolímero que contenha monômeros sensíveis à temperatura e ao pH perde a sensibilidade à temperatura se sua porção ionizável foi superior à 10% em mol e o pH da solução polimérica for superior ao pKa do monômero ionizável (EECKMAN et al., 2001). Este fenômeno pode ser visto na figura 55 para os terpolímeros 75:10:15 e 70:10:20. Para estes polímeros, em pH 7,0 e 7,4 não foi observada termo-sensibilidade. Isto parece ser devido ao fato de que, em pH alto os grupos carboxílicos do VBA estão ionizados e a cadeia do polímero é expandida devido à repulsão eletrostática entre os grupos carregados ao longo das cadeias poliméricas. As interações polímero-solvente também aumentam com a ionização. Juntos, estes efeitos resultam em um aumento da temperatura de separação de fase com o grau de ionização (BASKAR; CHANDRASEKAR, 2004). A solubilidade do polímero 70:10:20 em pH mais baixos não foi possível, provavelmente porque nestes valores de pH a proporção dos grupos carregados diminui e as interações hidrofóbicas entre as cadeias alquílicas e aromáticas tornam-se predominantes, causando à cadeia polimérica um colapso progressivo,

levando à formação de microdomínios hidrofóbicos. Este efeito é conhecido como associação hidrofóbica, um processo que resulta na formação de uma estrutura compacta, insolúvel, que precipita da solução aquosa.

Nos demais terpolímeros observa-se que, quando a proporção do monômero ionizado é relativamente pequena em relação ao NIPAm, a sensibilidade ao pH é igualmente pequena, ou seja, variações de pH não alteraram significativamente o ponto de turvação. Isto pode ser visto na figura 53 para os terpolímeros 90:5:5 e 85:10:5.

4.7.2 – Efeito da Força Iônica

Quando a força iônica da solução foi aumentada, o terpolímero 70:10:20 apresentou termo-sensibilidade em solução tampão para valores de força iônica entre 1,0 e 1,5 mol dm⁻³ de KCl (figura 58). As figuras 59 e 60 mostram os efeitos da força iônica nos terpolímeros da série 2, onde observa-se que o aumento da força iônica traduz-se em uma diminuição da LCST. Já foi citado para os polímeros da série 1 que o efeito do sal é devido principalmente à mudanças na estrutura da água pela adição do sal, efeito conhecido como “salting out”. Ainda na figura 59 os mesmos efeitos em relação à proporção molar do monômero ionizável e à adição de sal podem ser observados para demais terpolímeros.

Na tabela 12 podem ser vistos os valores da LCST para os polímeros da série 2.

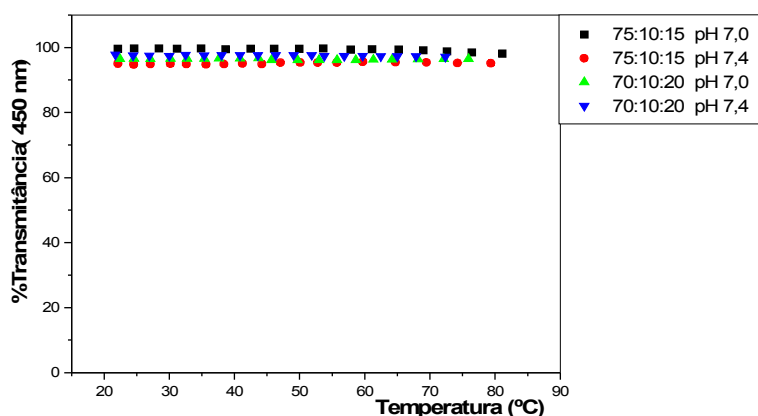
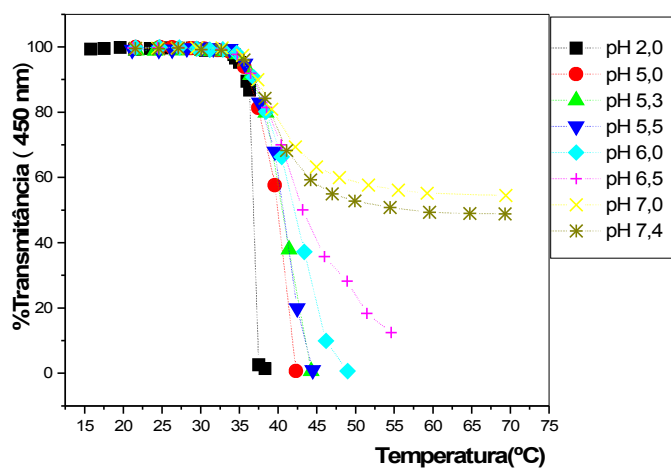
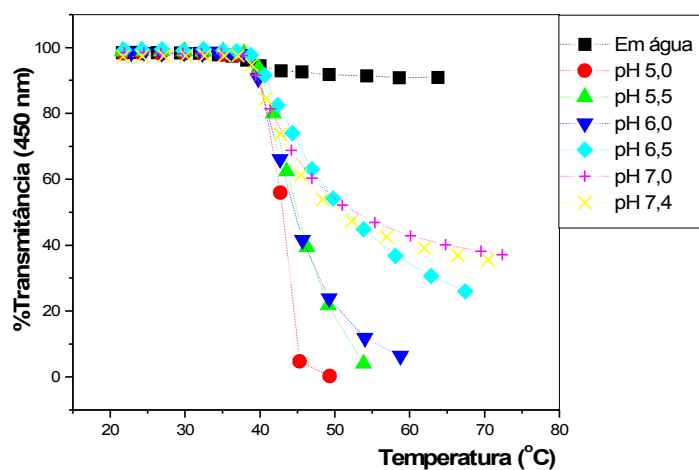


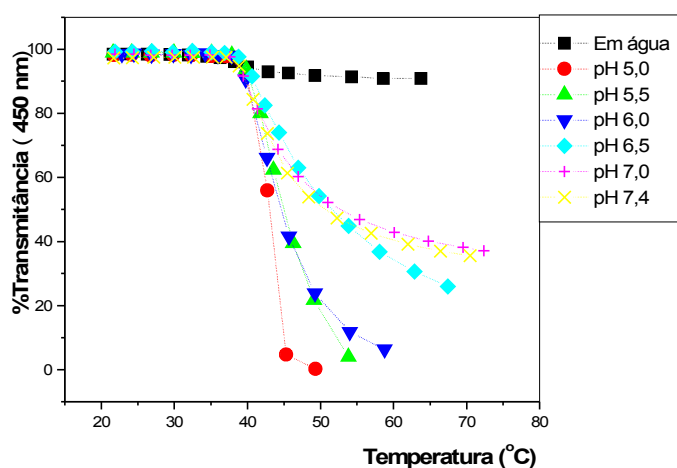
Figura 55: Transmitância em função da temperatura para terpolímeros com maior proporção de VBA, em solução tampão a 0,1% (m/v), força iônica 20 mM .



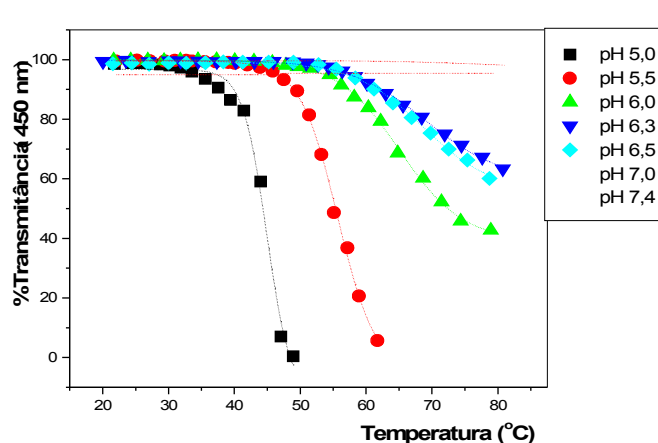
90:5:5



85:10:5



80:10:10



75:10:15

Figura 56: Transmitância em função da temperatura os terpolímeros em solução tampão a 0,1% (m/v), força iônica 20 mM .

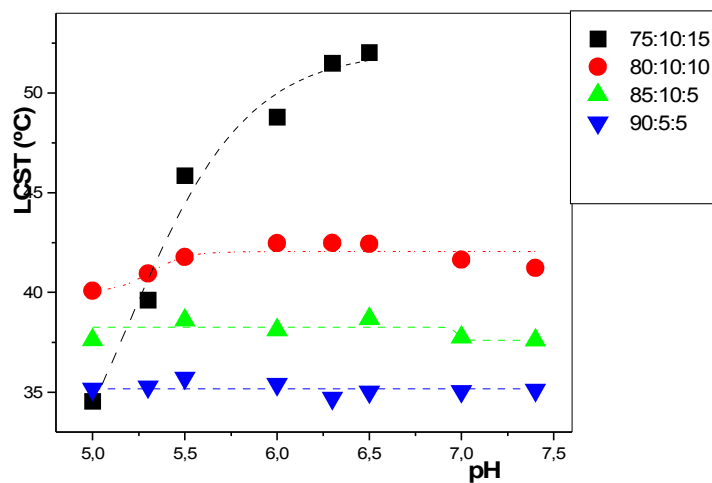


Figura 57: Curvas de LCST em função do pH para os terpolímeros em solução tampão a 0,1% (m/v) e força iônica 20 mM.

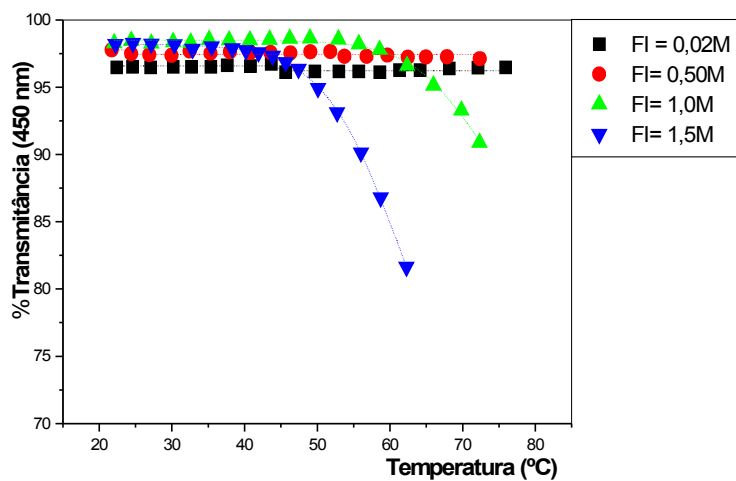


Figura 58: Transmissão em função da temperatura para o polímero 70:10:20 em solução tampão a 0,1% (m/v), pH 7,4, em diferentes forças iônicas.

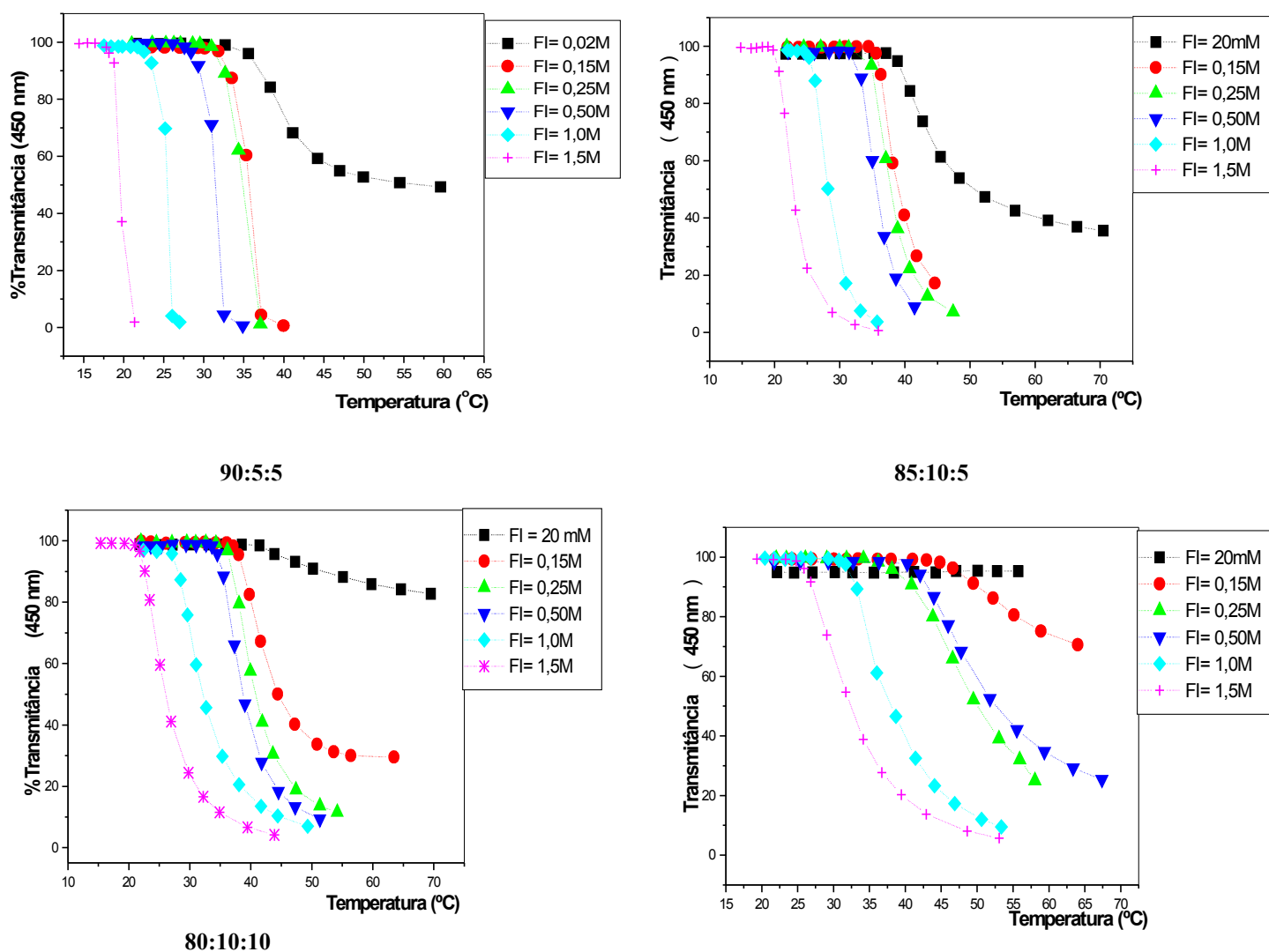


Figura 59: Transmitância em função da temperatura os terpolímeros em solução tampão a 0,1% (m/v), pH 7,4.

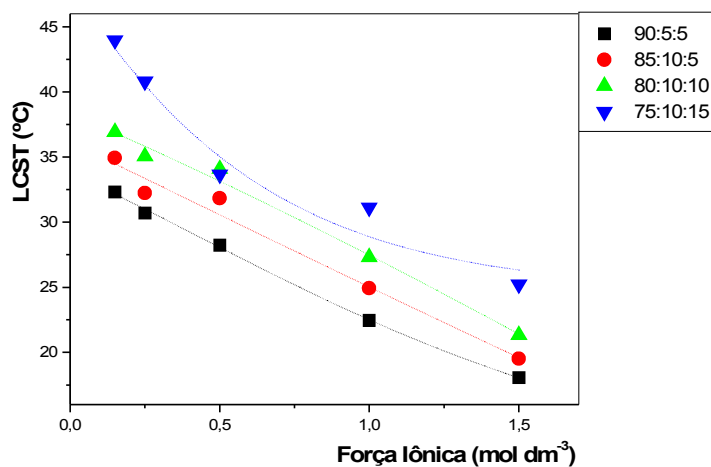


Figura 60: Curvas de LCST em função da força iônica para os terpolímeros em solução tampão a 0,1% (m/v), pH 7,4.

Tabela 12: Tabela de valores da LCST (°C) para os polímeros da série 2, em solução aquosa em diferentes pH e força iônica..

Polímero	água	Efeito do pH						Efeito da Força Iônica				
		pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,4	FI 0,15	FI 0,25	FI 0,50	FI 1,0	FI 1,5
90:5:5	34,6 2	35,16	35,70	35,39	35,01	35,0 3	35,0 9	33,2 1	30,7 0	28,2 3	22,4 6	18,07
85:10:5	34,7 5	37,62	38,60	38,12	38,68	37,7 5	37,6 0	34,9 3	32,2 4	31,8 4	24,9 2	19,52
80:10:10	*	40,08	41,77	42,19	42,43	41,6 4	41,7 0	36,9 2	35,0 6	34,0 8	27,3 1	21,32
75:10:15	*	34,5 3	45,8 5	48,7 9	52,0 3	#	#	43,9 7	36,4 7	33,6 5	31,1 0	25,21
70:10:20	*	*	*	*	56,49	#	#	#	#	#	54,9 1	45,02

* não dissolução e # não turvação

4.8 - Investigação da formação de microdomínios hidrofóbicos e determinação da CAC (concentração de agregação crítica) para os polímeros da série 2.

Os terpolímeros que foram sintetizados com monômero ionizável apresentam valores de CAC maiores que os terpolímeros da série 1. Os valores encontrados através de estudos espectrofluorimétricos, utilizando-se o pireno como sonda fluorescente, mostrou valores em torno de $10^{-1} \text{ g dm}^{-3}$. Estes valores são considerados relativamente altos para que os agregados poliméricos possam ser utilizados como sistemas transportadores de fármacos. Polímeros anfífilos com valores altos para a CAC ou CMC (valores entre 0,01 e 10%) são considerados instáveis em solução aquosa, pois podem se dissociar facilmente depois da diluição (JONES et al., 1999).

A figura 61 apresenta os dados para determinação da CAC para os terpolímeros 80:10:10 e 70:10:20 em solução tampão fosfato pH 7,4 e os valores obtidos são, de $9,4 \times 10^{-2}$ e $1,0 \times 10^{-1} \text{ g dm}^{-3}$, respectivamente. O terpolímero 75:10:15 mostrou valor para a CAC de $1,1 \times 10^{-1} \text{ g dm}^{-3}$. Para estes polímeros o pH e a proporção do monômero VBA controlam não somente a termo-sensibilidade, mas também a agregação. Para os polímeros contendo uma baixa proporção de VBA (90:5:5 e 85:10:5) o pH elevado acima do pKa do monômero ($pK \cong 4,2$) confere aos polímeros uma maior hidrofilicidade, e a repulsão eletrostática entre as cadeias deve contribuir para impedir a agregação. Deve-se considerar também que as massas molares médias para esses polímeros são consideravelmente menores que aquelas obtidas para os polímeros da série 1, o que leva a um aumento da CAC. Como pode ser observado da figura 61, os valores da razão I_1/I_3 são relativamente altos, ou seja, para esta concentração de polímero a sonda encontra-se em um ambiente altamente hidratado.

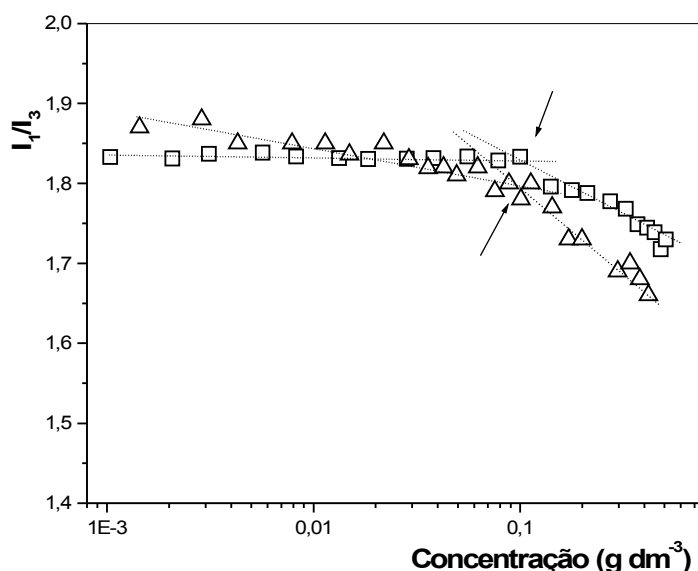


Figura 61 : Razão I_1/I_3 em função da concentração para os terpolímeros
(□) 80:10:10 e (Δ) 70:10:20 em tampão pH 7,4.

A figura 62 apresenta curvas da razão I_1/I_3 em função da concentração para o terpolímero 80:10:10 em solução tampão fosfato, onde foi variado o pH. Observa-se pelos

valores da CAC encontrados, que em pH mais baixos, onde o monômero VBA está pouco ionizado, o valor para a CAC é menor, presumindo-se que a repulsão eletrostática entre os grupos carregados é menor e então o efeito hidrofóbico das cadeias alquílicas e aromáticas sobrepõem-se. Portanto, o polímero agrega em concentrações relativamente menores que aquelas observadas em pH mais elevados. Este resultado pode ser explicado considerando-se que a maior repulsão eletrostática deixa as cadeias estendidas e dificulta a formação de microdomínios hidrofóbicos. O aumento da força iônica não afetou de forma significativa os valores de CAC.

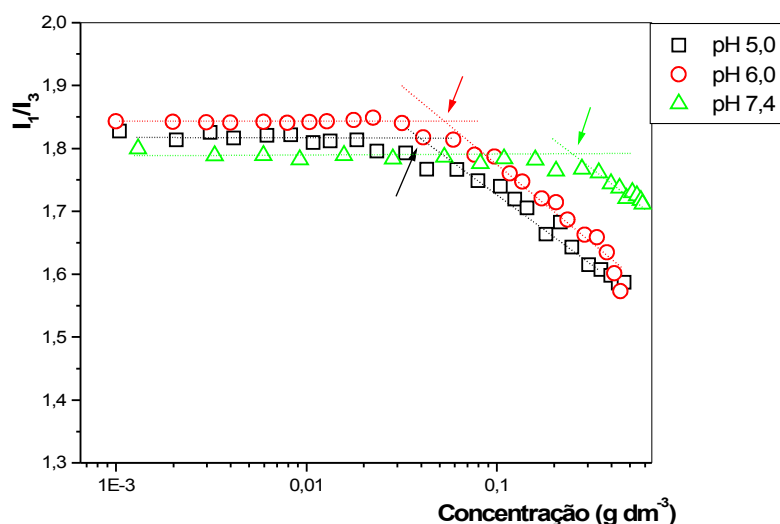


Figura 62: Razão I_1/I_3 em função da concentração para o terpolímero 80:10:10 em solução tampão, com variação do pH.

Para esta série de polímeros também foi avaliado o efeito da temperatura nas soluções dos polímeros utilizando-se a razão I_1/I_3 do espectro de emissão do pireno. Este efeito pode ser observado na figura 63 para o terpolímero 80:10:10 (0,1% m/v) em diferentes valores de pH. Para valores mais baixos de pH, a razão I_1/I_3 inicia em torno de 1,5 indicando a presença de microdomínios hidrofóbicos, possivelmente originados por agregação das cadeias.

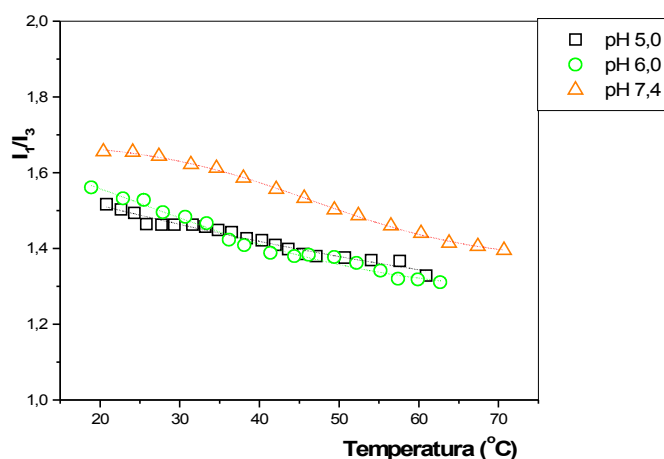


Figura 63: Razão I_1/I_3 em função da temperatura para o terpolímero 80:10:10 (0,1%*m/v*) em diferentes valores de pH.

À medida que a temperatura é aumentada, há um decréscimo quase linear da razão I_1/I_3 , que atinge valor em torno de 1,3 quando a temperatura chega a 60°C, indicando que a sonda encontra-se em um ambiente mais apolar. A temperatura de turvação deste polímero em pH 5,0 é em torno de 40°C e, como a partir deste valor a razão I_1/I_3 ainda continua decrescendo, sugere-se que esta queda seja efeito da expulsão de água de dentro dos microdomínios hidrofóbicos, provocado pelo aumento de temperatura. Não pode ser descartado o fato de que pode haver uma pequena colaboração do efeito da temperatura sobre a razão I_1/I_3 da sonda em água. O mesmo comportamento é observado para os outros valores de pH, diferindo apenas no valor da razão I_1/I_3 que é maior para maiores valores de pH, como resultado de maior ionização dos grupos carboxílicos do VBA.

4.9 - Caracterização das Microcápsulas – Série 2

Para preparo e caracterização das microcápsulas foi utilizado o polímero 80:10:10 da série 2. Sua temperatura de turvação em tampão pH 7,4 e força iônica 0,15 mol dm^{-3} é em torno de 37°C. As micocápsulas (sem pireno) formadas podem ser vistas na figura 64 e as microcápsulas com pireno na figura 65.

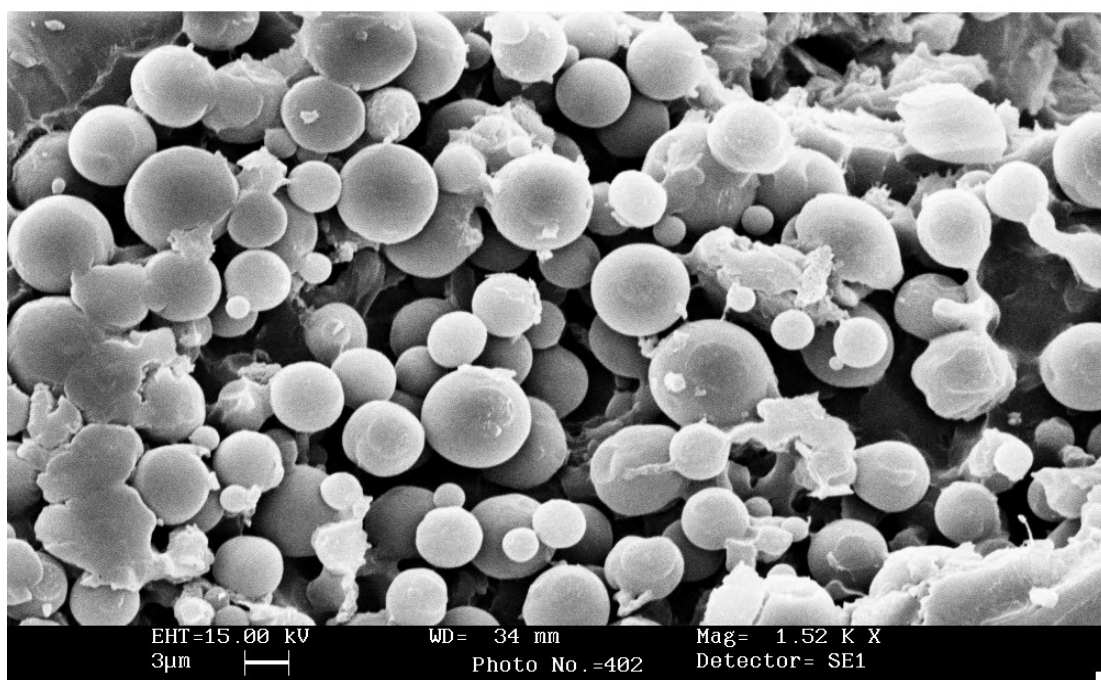


Figura 64: Fotografia em MEV de microcápsulas sem pireno.

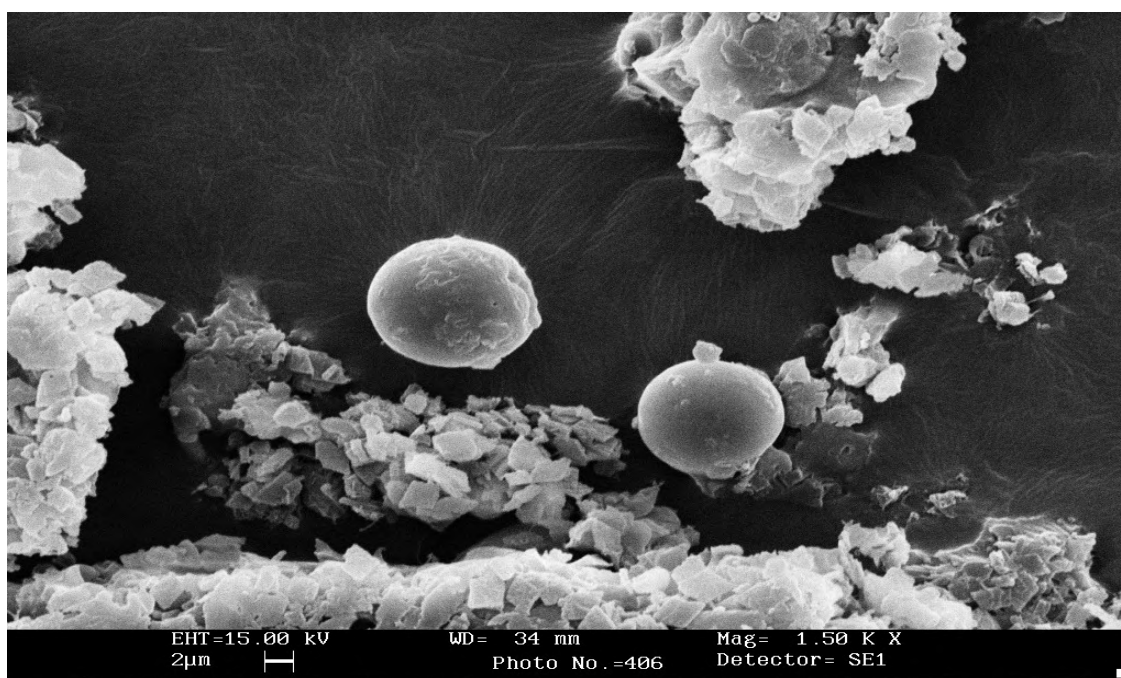


Figura 65: Fotografia em MEV de microcápsulas contendo pireno incorporado.

O tamanho das microcápsulas sem o modelo de fármaco estar incorporado apresentou valores entre 3 e 10 µm e sua superfície parece ser lisa e regular. O tamanho obtido também

parece apropriado para injeções intramuscular ou subcutânea. (WOO et al., 2001). Pela figura 65, pode-se notar que as microcápsulas com pireno incorporado apresentam tamanho um pouco maior (em torno de 13 a 15 μm) e uma superfície menos lisa em relação às micropartículas que não contém o modelo hidrofóbico, ou seja, a superfície parece mais rugosa e há certa irregularidade nas esferas. Teifur et al, 2002 prepararam microcápsulas de poli(ácido láctico) pelo método da evaporação do solvente, incorporando um antibiótico para enfermidades ósseas e observaram que as microcápsulas com medicamento apresentaram uma superfície mais rugosa em relação às que não tinham o antibiótico incorporado e não houve variação significativa no tamanho das mesmas.

A quantidade de pireno incorporada foi calculada através de curva padrão de absorbância de pireno em clorofórmio. O resultado obtido foi uma eficiência de incorporação de 41%. O ideal é que seja obtido um valor maior, pois quanto maior a eficiência de incorporação do princípio ativo, ou seja, do fármaco, maior o interesse do ponto de vista econômico.

A eficiência da incorporação é diretamente relacionada à rápida eliminação do solvente e ao rápido encolhimento da partícula durante a evaporação. O que pode acontecer é durante o encolhimento a substância encapsulada ser drenada com a expulsão do solvente, afetando a eficiência de incorporação (ROSCA et al., 2004).

Entretanto, Ito; Makino, 2004 incorporaram rifampicina (RFP) em microcápsulas de PLGA e encontraram eficiência entre 40 e 50%. Park et al, 2004 incorporaram eritromicina em microcápsulas de PLA-PEG e encontraram eficiência de incorporação entre 42 e 56%. Woo et al, 2001 prepararam microcápsulas de PLA, incorporando Leprolide (medicamento para tratamento hormonal) pelo método de evaporação do solvente e obtiveram eficiência de incorporação de 81,2%.

5- CONCLUSÕES

Neste trabalho foram desenvolvidas as sínteses de terpolímeros anfifílicos sensíveis à temperatura e ao pH e estudadas as propriedades destes sistemas em solução.

Para os polímeros da série 1, conclui-se que os monômeros utilizados são eficientes para obter polímeros sensíveis à temperatura, onde a proporção hidrofílica/hidrofóbica pode ser alterada, no intuito de obtenção de sistemas com termo-sensibilidade variada. A maior proporção de monômero hidrofílico (PEG) levou a sistemas que deslocam a LCST para valores mais altos. Quando a proporção hidrofílico/hidrofóbico é semelhante, o efeito hidrofóbico se sobrepõe e a LCST é deslocada para valores menores.

A presença de sais afeta sensivelmente a LCST dos polímeros, deslocando-a para valores menores, devido ao efeito “salting out”. Estudos utilizando sondas fluorescentes mostraram que os polímeros sofrem agregação, que os microdomínios hidrofóbicos formados são relativamente rígidos (parecidos com micelas de surfactantes) e que se formam a concentrações também relativamente baixas, da ordem de 10^{-3} g dm⁻³, valores que são similares à CMC de surfactantes. Quanto maior a porção hidrofóbica do polímero menor o valor para a CAC. O tamanho dos agregados formados é dependente da concentração de polímeros, da força iônica da solução e da temperatura. Quanto maior a concentração de polímero maior o tamanho do agregado. A presença de sais diminui o diâmetro hidrodinâmico e o aumento da temperatura aumenta o tamanho dos agregados pela ocorrência de agregações de cadeias hidrofóbicas expostas. Estes agregados mostraram eficiência na incorporação de moléculas hidrofóbicas e, quanto mais hidrofóbico for o miolo, maior a quantidade de hidrófobo incorporada.

A incorporação de doxorubicina teve eficiência satisfatória, similar àquela reportada na literatura. A proposta para esta série é a utilização do terpolímero 67:28:5 como

transportador de fármacos em seus microdomínios hidrofóbicos, por apresentar, em força iônica similar à do corpo humano, LCST compatível para o uso de hipertermia.

Os polímeros da série 2 apresentaram sensibilidade à temperatura e ao pH. Portanto, os monômeros são eficientes para a síntese proposta. Alterando-se a proporção dos monômeros utilizados, observou-se que a LCST pode ser controlada. Os estudos mostraram que a sensibilidade ao pH cresce com a proporção de monômero ionizável. A temperatura de transição pode ser deslocada variando-se o pH do meio. Quanto menor o pH do meio mais a LCST desloca-se para valores menores. A presença de sais também desloca a LCST para valores mais baixos.

Estudos utilizando-se o pireno como sonda fluorescente mostrou que os polímeros agregam em concentrações relativamente altas (da ordem de $10^{-1} \text{ g dm}^{-3}$), não sendo interessante o estudo deste microdomínios para incorporação de hidrófobos.

A preparação de microcápsulas foi interessante do ponto de vista da utilização destes sistemas como transportadores de fármacos. Microcápsulas preparadas com o polímero 80:10:10 mostraram eficiência de incorporação de pireno em torno de 40%, valor aproximado aos que alguns autores encontraram na literatura.

Estudos sobre a biocompatibilidade, toxicidade e biodegradabilidade destes sistemas fornecem caminho para uma continuidade deste trabalho. Testes para avaliar a liberação in vitro dos fármacos também abrem proposta de continuidade, e, com uma possível parceria da área biomédica, testes in vivo seriam interessantes.

Estudos visando melhor controle do tamanho dos agregados e das microcápsulas bem como o aumento das eficiências de incorporação tornariam a aplicação destes sistemas economicamente mais viável.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVA, C.; SAUNDER, B.R.; *Colloids and Surfaces A*, v. 270, p.18, 2005.

ALCOK, H. R.; LAMPE, F.W.; *Contemporary Polymer Chemistry*. New Jersey: Prentice Hall, 1990.

BARKER, I. C.; COWIE, J.M.G.; HUCKERBY, I.N.; SHAW, D.A.; SOUTAR, I.; SWANSON, I.; *Macromolecules*, v. 36, p. 7765, 2003.

BASKAR, G.; CHANDRASEKAR, B.S.R.; *Polymer*, v. 45, p. 6507, 2004.

BLACKWELL, K.; DEWHIRST, M.; JONES, E.; *Women's Health Weekly*, jun, p.3, 2002.

BLAZ VIEIRA, N. A.; MOSCARDINO, M. S.; TIERA, V. A. O.; TIERA, M. J.; *Carbohydrate Polymer*, v. 53, p. 137, 2003.

BONASSI, N. M.; “*Estudos de Sondas Fluorescentes Derivadas dos trans-difenil polienos tS, DPB e DPH na Caracterização de Sistemas Vesiculares de Fosfolípidos*”. 1998. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular), Ibilce, UNESP, São José do Rio Preto, 1998.

CABELLO, R.; *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, nº 5, 2001.

CAMAS, S.; MATSUMOTO, T.; OKANO, T.; SAKURAI, Y.; KATAOKA, K.; *Materials Science & Engineering C*, v. 4, p. 241, 1997.

CAPEK, I.; *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 97, p. 91, 2002.

CHANG, Y.; PRANGE, R.; ALLCOK, H. R.; *Macromolecules*, v. 35, p. 8556, 2002.

CHIAPPETTA, D. A.; *Microencapsulacion de Medicamentos*, publicado na Revista de Farmacia y Bioquímica da Facultad de Farmacia y Bioquímica; Universidad de Buenos Aires, 2000.

CHIN, C.M.; FERREIRA, E.I.; *Química Nova*, v. 22, p. 75, 1999.

CHIU, H.C.; CHERN, C.S.; LEE, C. K.; CHANG, H. F.; *Polymer*, v. 39, p. 1609, 1998.

CHU, L. Y.; PARK, S. H.; YAMAGUCHI, T.; NAKAO, S.; *Journal of Membrane Science*, v. 192, p. 27, 2001.

CHUNG, J. E.; YOKOYAMA, M.; SUZUKI, K.; AOYAG, T.; SAKURAI, Y.; OKANA, T.; *Colloids and Surfaces B*, v. 9, p. 37, 1997.

COSTA, R.O.R.; FREITAS, R.F.S.; *Polymer*, v. 43, p. 5879, 2002.

EECKMAN, F.; AMIGHI, K.; MÖES, A. J.; *International Journal of Pharmaceutics*, v. 222, p. 259, 2001.

- EECKMAN, F.; MÖES, A. J.; AMIGHI, K.; *International Journal of Pharmaceutics*, v. 241, p. 113, 2002.
- EECKMAN, F.; MÖES, A. J.; AMIGHI, K.; *European Polymer Journal*, v. 40, p. 873, 2004.
- EWING, G. W.; *Métodos Instrumentais de Análise Química*. Brasil: Editora Edgar Blücher, 1972.
- GALAEV, I.Y.; MATTIASSON, B.; *Trends in Biotechnology*, v. 17, p. 335, 1999.
- GAO, G.; MOHWALD, H.; SHEN, J.; *Polymer*, v. 46, p. 4088, 2005.
- GHOSH, A. K.; BASU, R.; DEY, S.; DAS, S.; NAYAK, N. P.; BARAT, B.; NANDY, P.; *Colloids and Surfaces B*, v. 4, p. 309, 1995.
- GIL, S.E.; HUDSON, S.M.; *Progress in Polymer Science*, v. 29, p. 1173, 2004.
- HERAS, C.; PENNADAM, S.; ALEXANDER, C.; *Chemical Society Reviews*, v. 34, p. 276, 2005.
- HOFFMAN, S.A.; *Clinical Chemistry*, v. 46, p. 1478, 2000.
- ITO, F.; MAKINO, K.; *Colloids and Surfaces B*, v. 38, p. 17, 2004.
- ITOH, H.; ISHIDO, S.; NOMURA, M.; HAYAKANA, T.; MITAKU, S.; *Journal of Physical Chemistry*, v. 100, p. 9047, 1996.
- JEONG, Y.; CHEON, J. B.; KIM, S. H.; NAH, J. W.; LEE, Y. M.; SUNG, Y. K.; AKAIKE, T.; CHO, C. S.; *Journal of Controlled Release*, v. 51, p. 169, 1998.
- JEONG, B.; GUTOWSKA, A.; *Trends in Biotechnology*, v. 20, p. 305, 2002.
- JONES, M. S.; *European Polymer Journal*, v. 35, p. 705, 1999.
- JONES, M. C.; LEROUX, J. C.; *European Journal of Pharmaceutics*, v. 48, p. 101, 1999.
- KALYANASUNDARAM, K.; *Photochemistry in Microheterogeneous Systems*, New York: Academic Press, 1987.
- KANG, S.; NA, K.; BAE, Y. H.; *Colloids and Surfaces A*, v. 231, p. 103, 2003.
- KOHORI, F.; YOKOYAMA, M.; SAKAI, K.; OKANO, T.; *Journal of Controlled Release*, v. 78, p. 155, 2002.
- KOST, J.; LANGER, R.; CRC, Boca Raton, FL., p.3, 1990.
- KINAM PARK, editor; *Controlled Drug Delivery Challenges and Strategies*, Washington: American Chemical Society, 1997.

- KUBOTA, K.; FUJISHIGE, S.; ANDO, I.; *Journal of Physical Chemistry*, v. 94, p. 5154, 1990.
- KWON, I.; BAE, Y. H.; OKANO, T.; KIM, S. W.; *Nature*, v. 9, p. 291, 1991.
- LACERDA, S. H. P.; “*Estudo Fotofísico do efeito da temperatura na dinâmica micelar*”. 2001. Tese de Doutorado, F.F.C.L.R.P., USP, Ribeirão Preto, 2001.
- LIN, S.Y.; CHEN, K.S.; CHU, L.R.; *Polymer*, v. 40, p. 2619, 1999.
- LIU, H.; FARRELL, S.; UHRICH, J.; *Journal of Controlled Release*, v. 68, p. 167, 2000.
- LIU, S. Q.; YANG, Y. Y.; LIU, X. M.; TONG, Y. W.; *Biomacromolecules*, v. 4, p. 1784, 2003.
- LIU, X. M.; WANG, L. S.; WANG, L.; HUANG, J.; HE, C.; *Biomaterials*, v. 25, p. 5659, 2004.
- MANO, E. B.; *Introdução a Polímeros*, Brasil: Editora Edgard Blücher, 1985.
- MERTOIGHU, M.; GARNIER, S.; LASCHEWSKY, A.; SKRABANIAK, J.; *Polymer*, v. 46, p. 7726, 2005.
- NERADOVIC, D.; SOGA, O.; VAN NOSTRUM, C. F.; HENNINK, W. E.; *Biomaterials*, v. 25, p. 2409, 2004.
- NODA, T.; KAMACHI, M.; *Macromolecules*, v. 14, p. 6059, 1999.
- NODA, T.; HASHIDZUNE, A.; MORISHIMA, Y.; *Macromolecules*, v. 33, p. 3694, 2000.
- PARK, S. J.; KIM, S. H.; *Colloid and Interface Science*, v. 271, p. 336, 2004.
- PEPPAS, L. B.; *Arquivos em Medical Plastics and Biomaterial Magazine*, nov, 1997.
- PEPPAS, L. B.; BLANCHETTE, J. O.; *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 1649, 2004.
- PERREUR, C.; HABAS, J. P.; PERYLASSE, J.; *Polymer*, in press, aceito nov 2005.
- PISPAS, S.; HADJYCHRISTIDES, N.; *Langmuir*, v. 19, p. 48, 2003.
- RAPOPORT, N.; PITT, W. G.; SUN, H.; NELSON, J. L.; *Journal of Controlled Release*, v. 91, p. 85, 2003.
- ROSCA, I. D.; WATARI, F.; UO, M.; *Journal of Controlled Release*, v. 99, p. 271, 2004.
- SHAWIKI, S.; HAMIELEC, A. E.; *Journal of Applied Polymer Science*, v. 23, p. 3323, 1979.
- SHI, X.; LI, J.; SUN, C.; WU, S.; *Colloids and Surfaces A*, v. 175, p. 41, 2000.

- SHIBANUMA, T.; SAKURAI, Y.; OKANO, T.; *Macromolecules*, v. 33, p. 444, 2000.
- SHUAI, X.; Ai, H.; NASONGKLA, N.; KIM, S.; GAO, J.; *Journal of Controlled Released*, v. 98, p. 415, 2004.
- SCHULZ, D. N.; KALASA, J. J.; MAURER, J. J.; BACK, J.; PACE, S. J.; SCHULZ, W. W.; *Polymer*, v. 28, p. 2110, 1987.
- SIMON BENITA, editor, *Microencapsulation Methods and Industrial Applications* New York: Marcel Dekker, 1996.
- SNOWDEN, M. J.; MURRAY, M. J.; CHOWDRY, B. Z.; *Society of Chemical Industry*, v. 14, p. 531, 1996.
- SOGA, O.; VAN NOSTRUM, C. F.; RAMZI, A.; VISSER, T.; SOULEMANI, F.; FREDERIK, P. M.; BORNANS, P. H. H.; HENNINK, W. E.; *Langmuir*, v. 20, p. 9939, 2004.
- STOLNIK, S.; DUN, S. E.; GARNELT, M. C.; DARRES, M. C.; *Pharmaceutical Research*, v. 11, p. 1800, 1994.
- STURESSON, J. E.; CARFORS, J.; *Journal of Controlled Release*, v. 67, p. 117, 2000.
- SZCZUBIALKA, K.; NOWAKOWSKA, M.; *Polymer*, v. 44, p. 5269, 2003.
- TAKEDA, N.; NAKAMURA, E.; YOKOYAMA, M.; OKANO, T.; *Journal of Controlled Release*, v. 95, p. 343, 2004.
- TEIFUR, S.; ARRIBAS, G.; URBINA de Navarro, C.; CERROLAZA, M.; TORTOLERO, M.; “*Síntesis de polímeros biodegradables usados en microencapsulación de medicamentos*”, publicado na Revista de La Facultad de Ingeniería; Universidad Central de Venezuela, 2005.
- TIERA, M. J.; SANTOS, G. R.; TIERA, V. A. O.; BLAZ VIEIRA, N. A.; FROLINI, E.; SILVA, R. C.; LOH, W.; *Colloid Polymer Science*, v. 283, p. 662, 2005.
- TONGE, S. R.; TIGHE, B. J.; *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 53, p. 109, 2001.
- TORCHILIN, V. P.; *Journal of Controlled Release*, v. 73, p. 137, 2001.
- UHRICH, K. E.; *Chemical Reviews*, v. 99, p. 3181, 1999.
- VIRTANEEN, J.; AROTÇARENA, M.; HEISE, B.; ISHAYA, S.; LASHEWSKY, A.; TENHER, H.; *Langmuir*, v. 18, p. 5360, 2002.
- WINNICK, F. M.; DAVIDSON, A. R.; HAMER, G.; *Macromolecules*, v. 25, p. 1876, 1992.
- WOO, B. H.; KOSTANSKI, J. W.; GEBREKIDAN, S.; DANI, B. A.; THANOO, B.C.; Deluca, P. P.; *Journal of Controlled Release*, v. 75, p. 307, 2001.
- XIAO, H.; PELTON, R.; HAMILEC, A.; *Polymer*, v. 37, p. 7, 1996.

XU, R.; WINNIK, M. A.; HALLET, F. R.; RIESS, G.; CROUCHER, M. D.; *Macromolecules*, v. 24, p. 87, 1991.

XU, G. Y.; CHEN, A. M.; YANG, Y. L.; YUAN, S. L.; ZHENG, L.; *Colloids and Surface A*, v. 256, p. 69, 2005.

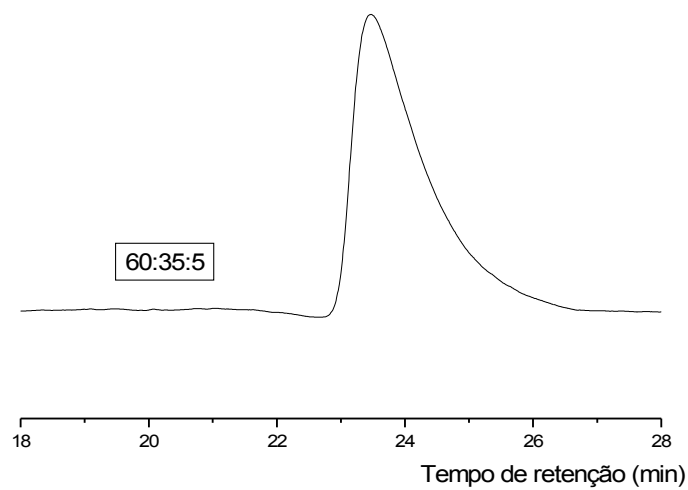
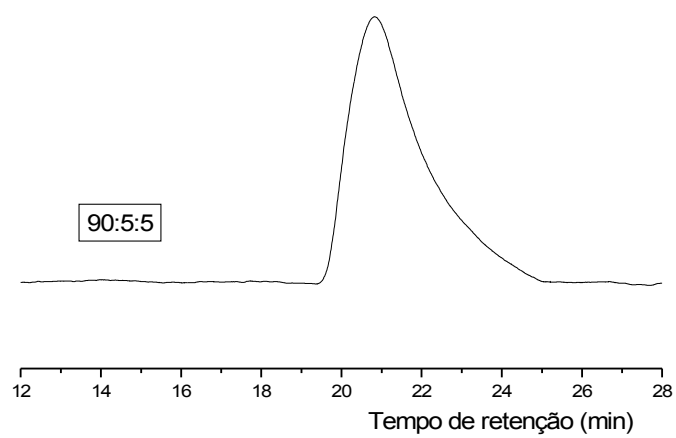
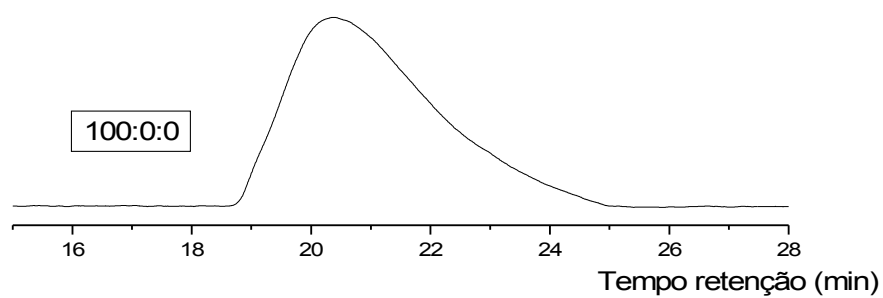
YIN, X.; STÖVER, D. H. H.; *Macromolecules*, v. 35, p. 10178, 2002.

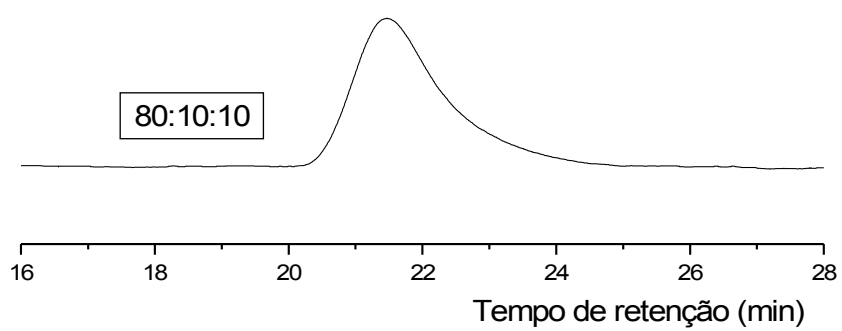
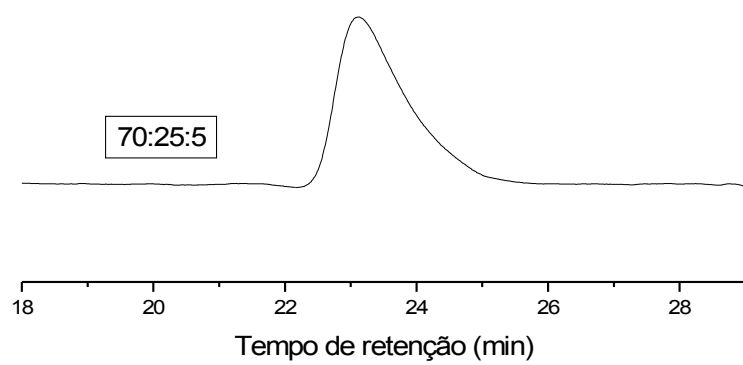
YOO, M. K.; SUNG, Y.K.; *Polymer*, v. 37, p. 2759, 1997.

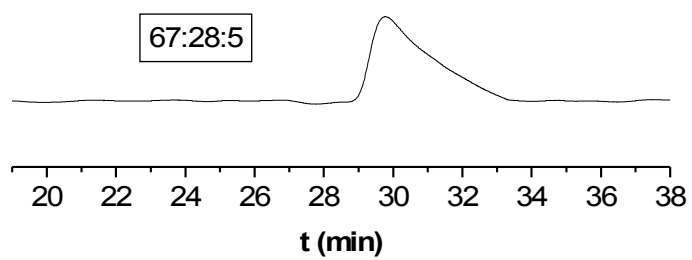
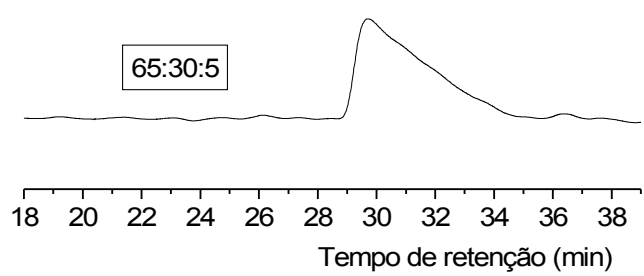
ZHANG, Y. Z.; ZHANG, Q.; ZHA, L.; YANG, W.; WANG, C.; JIANG, X.; FU, S.; *Colloid and Polymer Science*, v. 282, p. 1323, 2004.

Apêndice 1

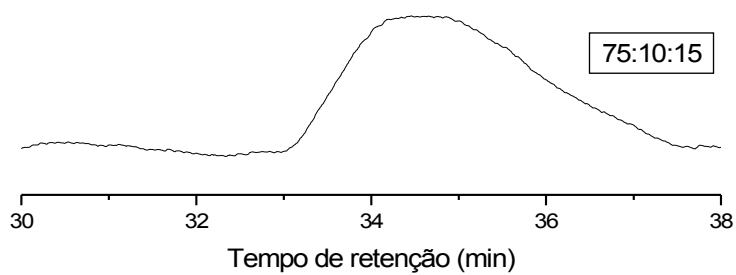
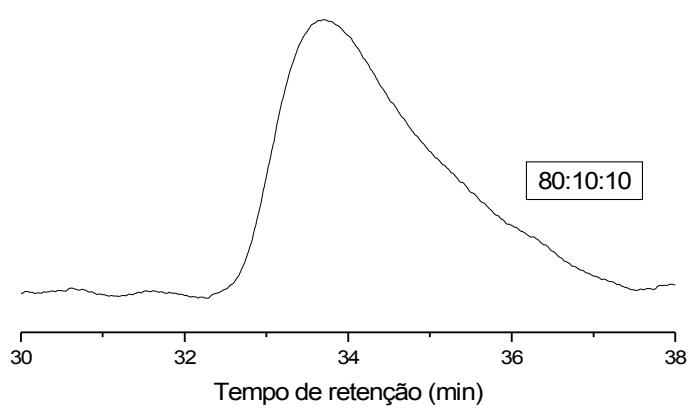
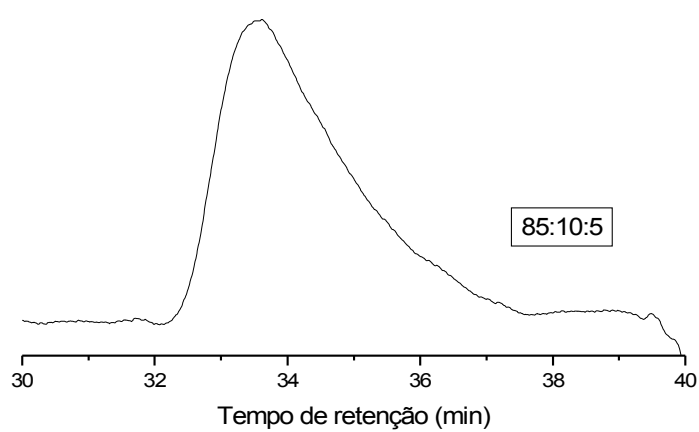
Cromatogramas da série 1



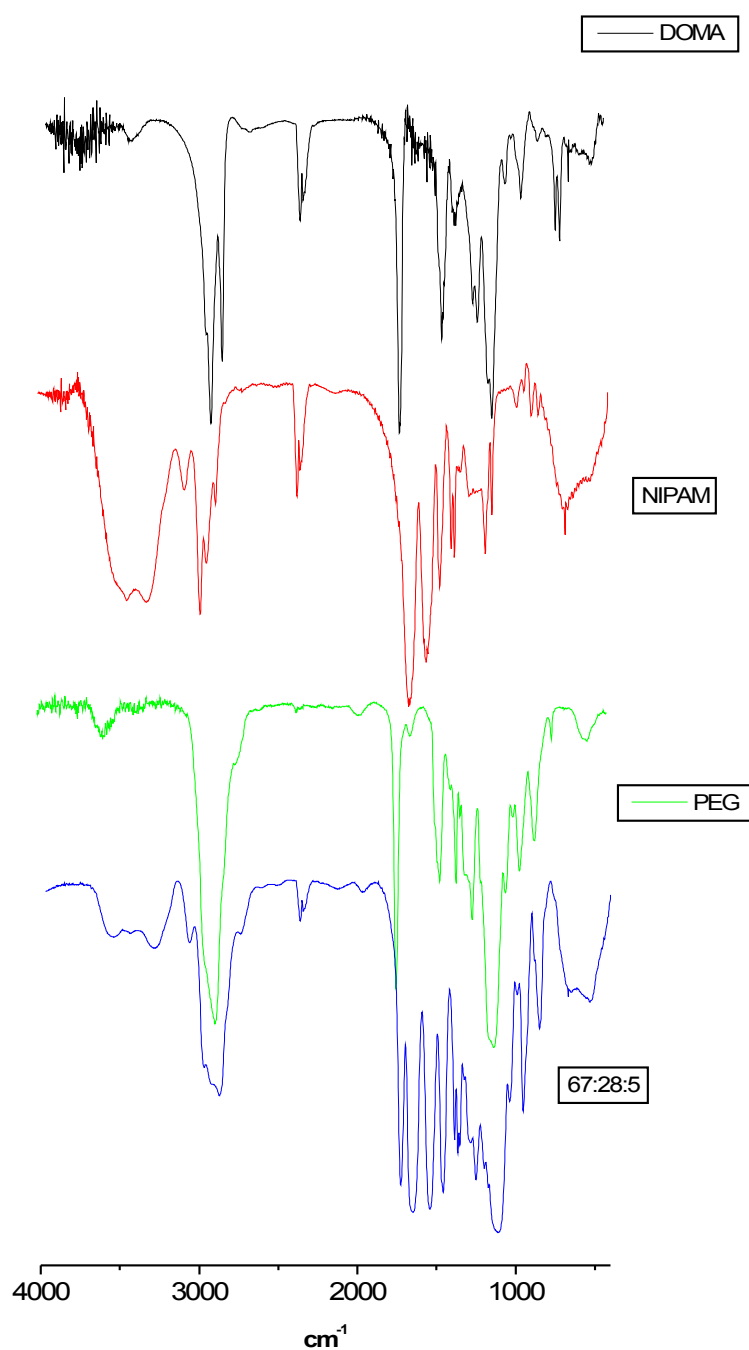




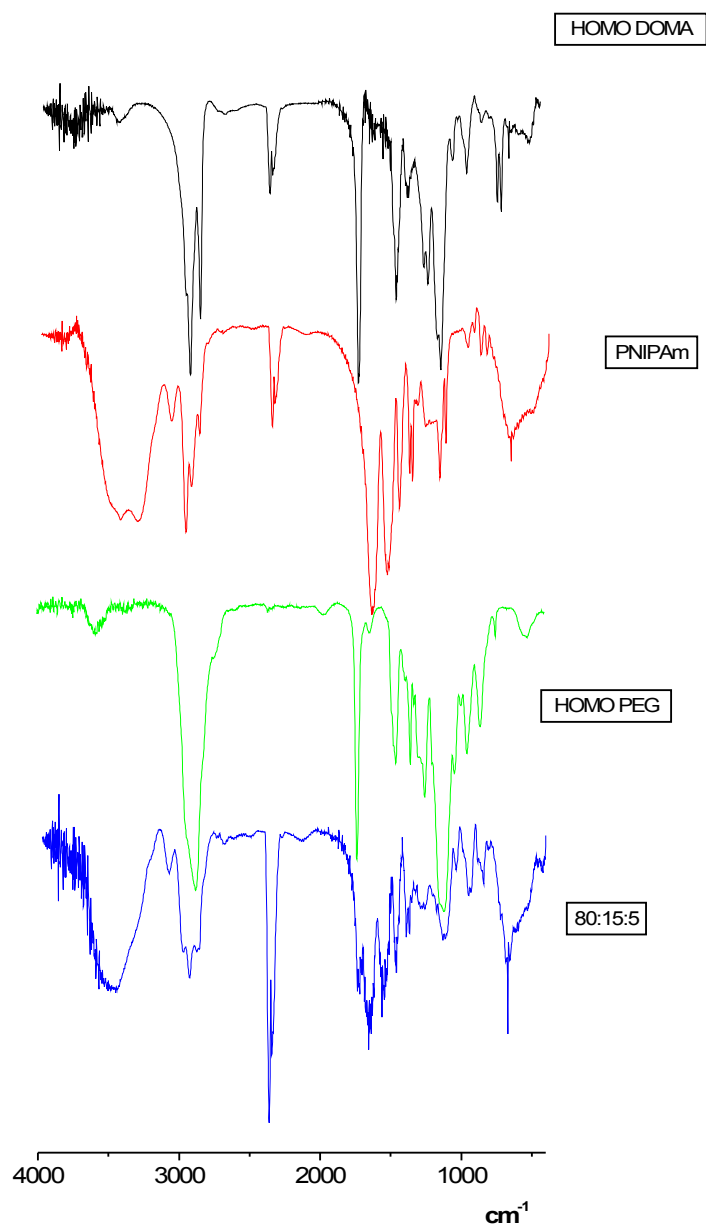
Apêndice 1-
Cromatogramas da série 2



Apêndice 2: Espectros Infravermelho – série 1



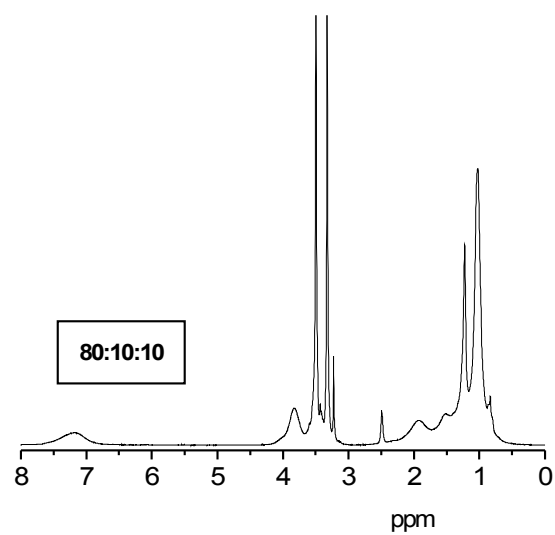
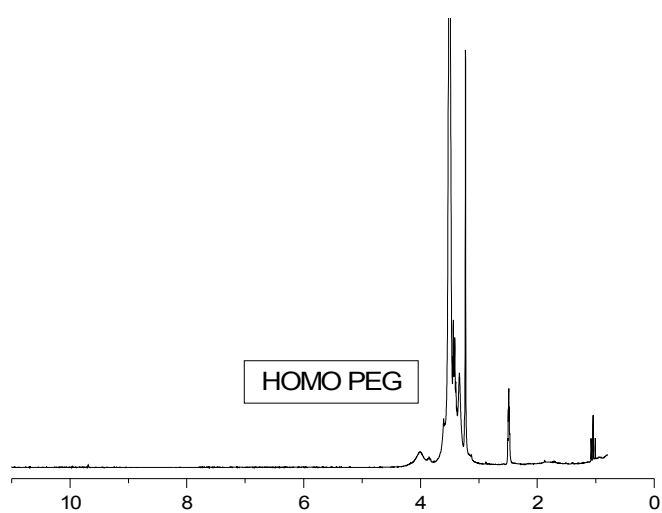
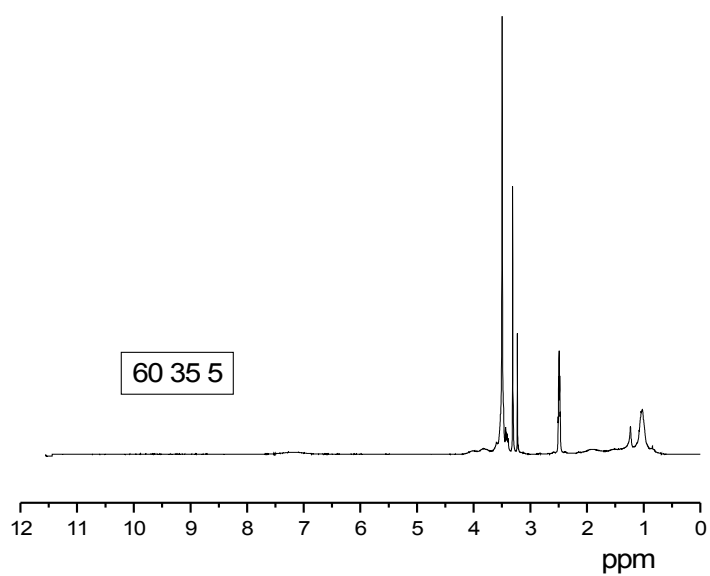
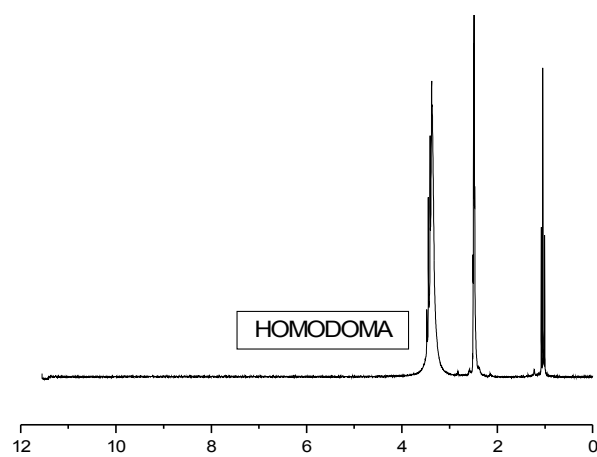
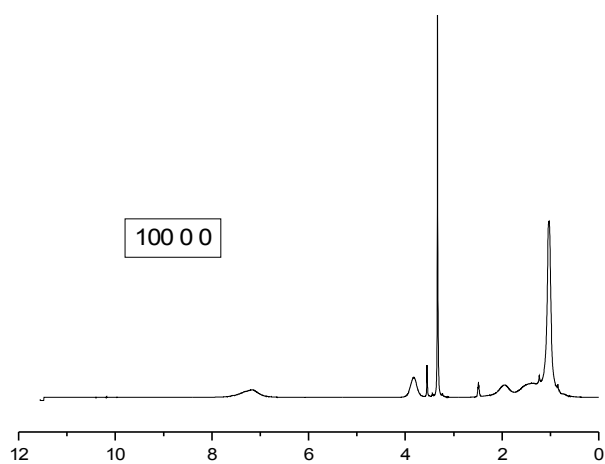
Espectro IV, série 1, comparando o terpolímero 67:28:5 com os homopolímeros

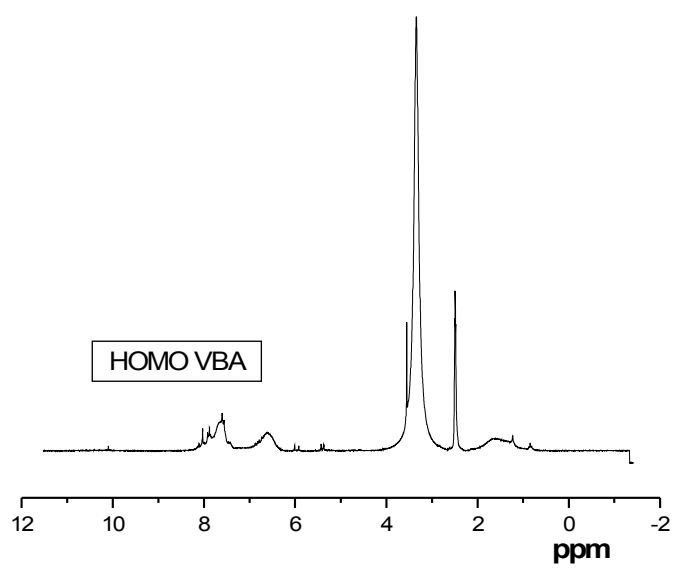
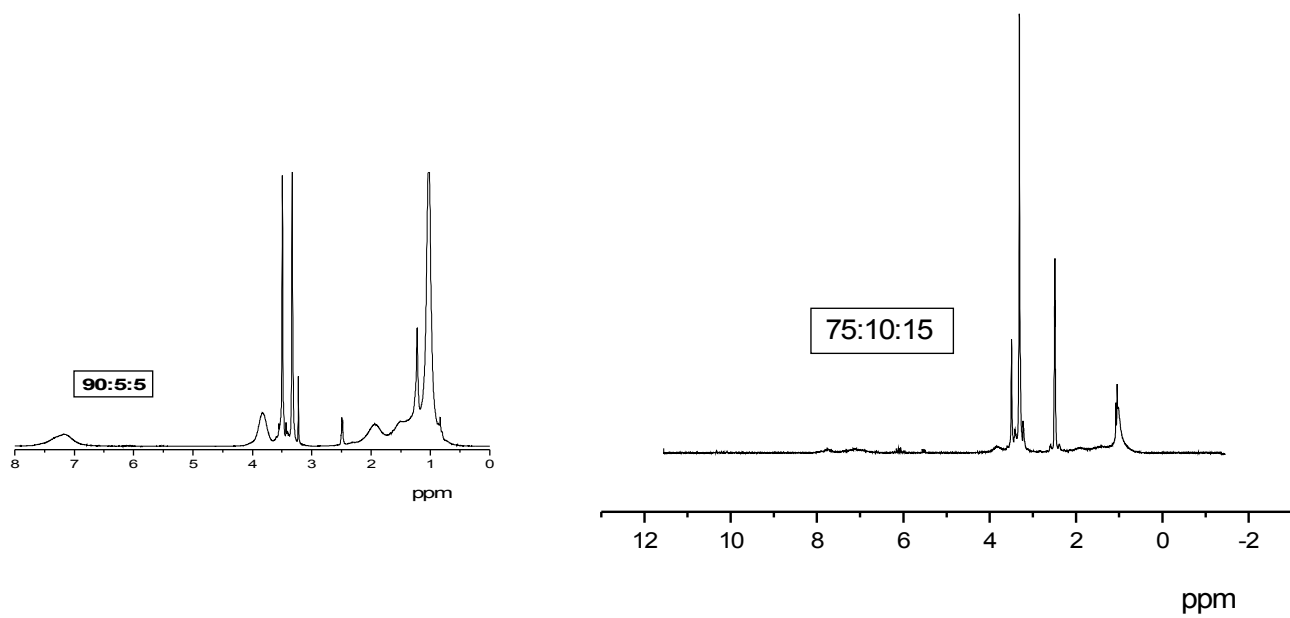


Espectros IV, série 1, comparando 80:15:5 com os homopolímeros

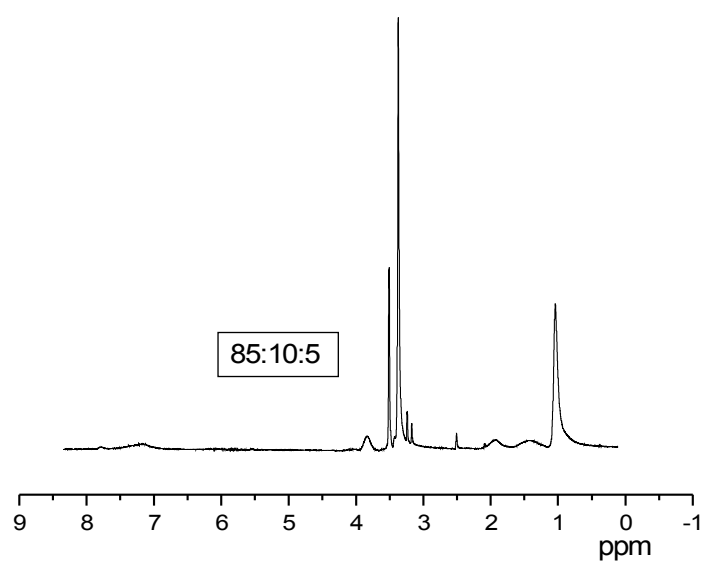
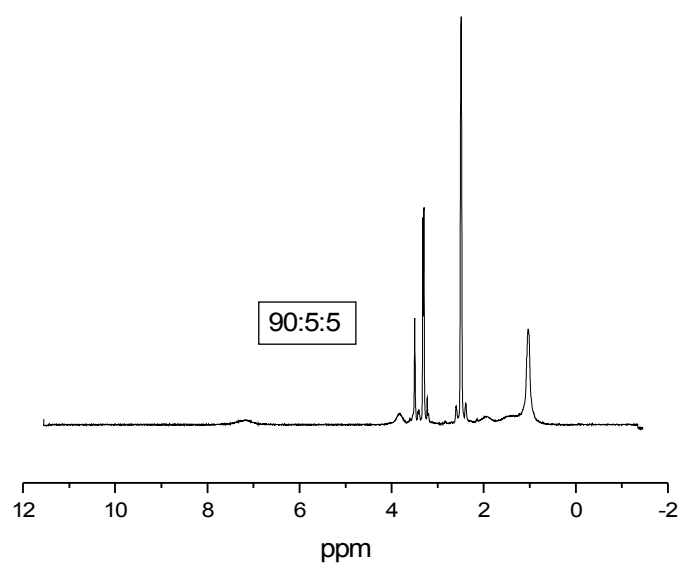
Apêndice 3

Espectros de RMN dos terpolímeros série 1



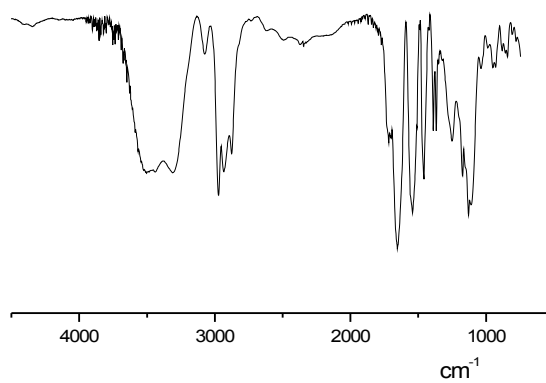


Espectros de RMN dos terpolímeros - Série 2

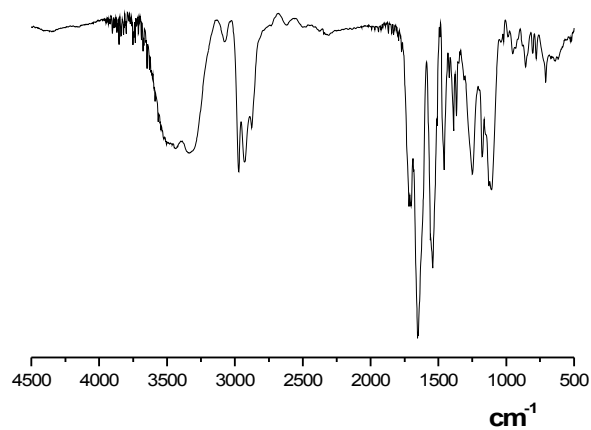


Apêndice 4 – Infravermelho da série 2

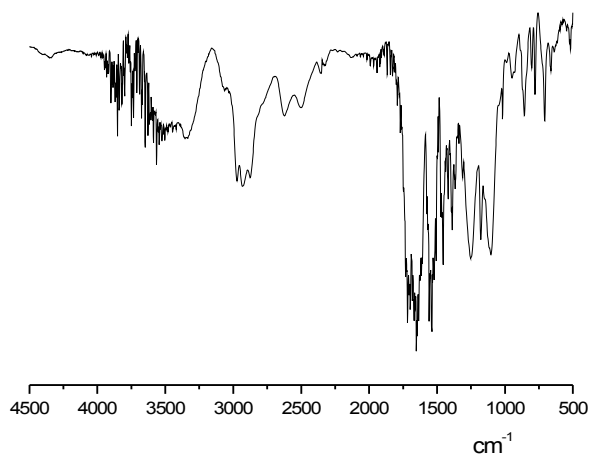
85:10:5



75:15:5



70:10:20



Apêndice 5

Resultados de Análise Elementar para os terpolímeros da série 2

80:10:10 %N=7.656
 %C=57.349
 %H=9.31

85:10:5 %N=8.051
 %C=56.559
 %H=9.362

75:10:15 %N=6.767
 %C=58.526
 %H=9.233

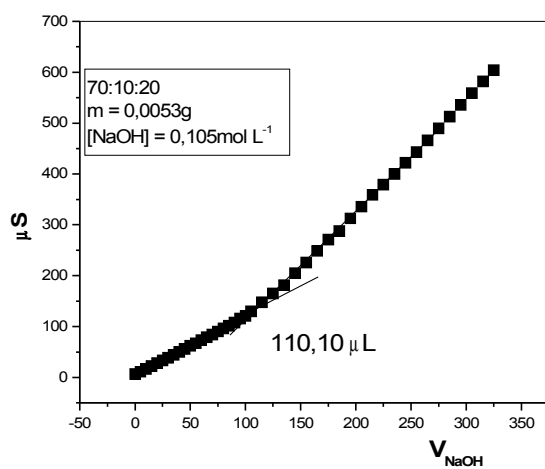
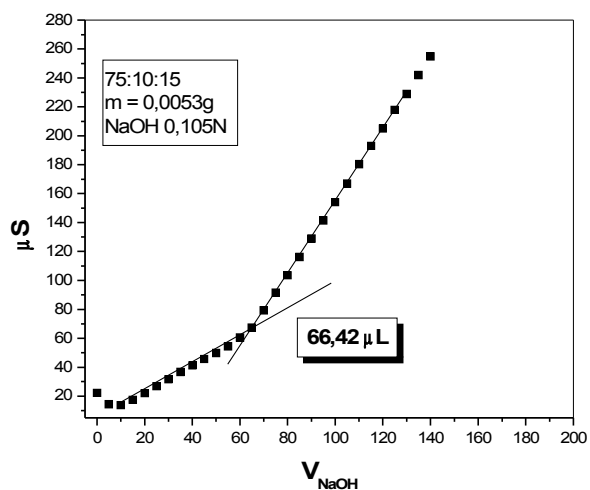
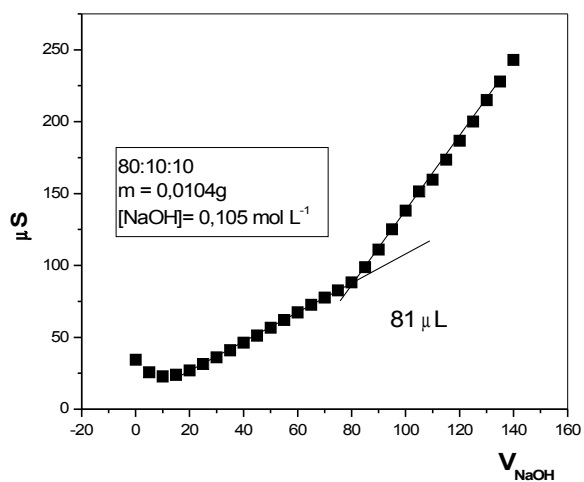
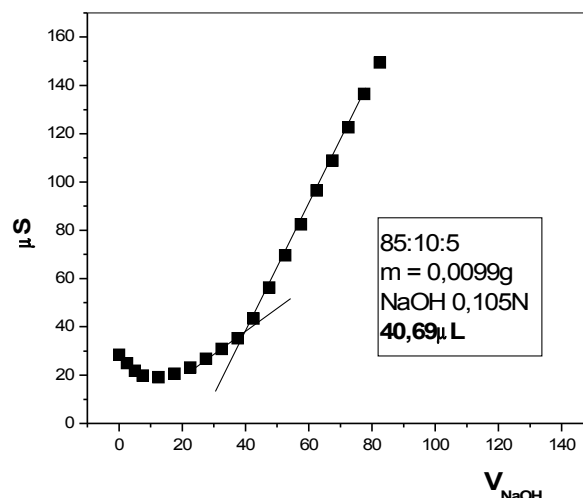
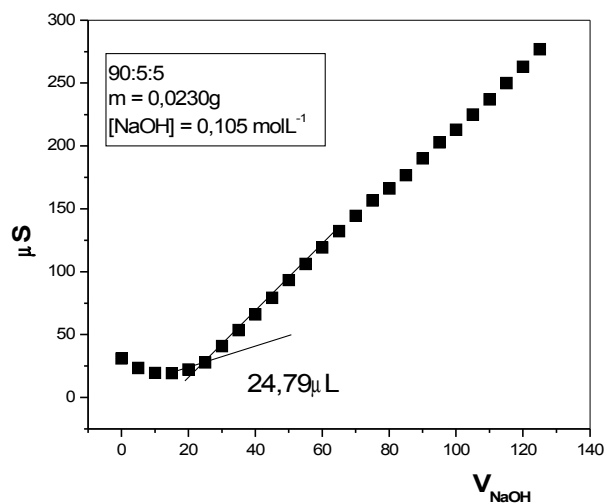
90:5:5 %N=8.799
 %C=55.514
 %H=10.267

70:10:20 %N=5.9
 %C=59.478
 %H=8.8

100:0:0 %N=11,61
 %C=61,17
 %H=10,28

Apêndice 6

Curvas de Titulação Condutimétrica



Apêndice 7

