



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química



Université Montpellier II
Sciences e Techniques
Institut Charles Gerhardt
Ingénierie et Architectures Macromoléculaires

Síntese e caracterização físico-química de novas moléculas anfifílicas formadas por ácidos graxos e um monômero derivado do glicerol

JEFFERSON ROTTA

Tese em regime de co-tutela submetida à Universidade Federal de Santa Catarina e à Universidade de Montpellier II como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Química.

Área de Concentração: Físico-Química

Orientação: Professor Dr. Edson Minatti e Dr. Jean Jacques Robin

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rotta, Jefferson

Síntese e caracterização físico-química de novas moléculas anfífilas formadas por ácidos graxos e um monômero derivado do glicerol / Jefferson Rotta ; orientador, Edson Minatti; co-orientador, Jean Jacques Robin. - Florianópolis, SC, 2013. 141 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. copolímeros anfífilos. 3. Micelas poliméricas. 4. auto-associação.

I. Minatti, Edson . II. Robin, Jean Jacques . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Jefferson Rotta

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NOVAS
MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS FORMADAS POR ÁCIDOS GRAXOS E
UM MONÔMERO DERIVADO DO GLICEROL**

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 06 de maio de 2013.

Professor Almir Spinelli
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Edson Minatti
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Nito Angelo Debacher
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Vera Lucia A. F. Bascuñan
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Arlindo Cristiano Felipe
Universidade Federal da Fronteira Sul

Prof. Vanderlei Gageiro
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Péricles Inácio Khalaf
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes de minha vida: meus pais, Antônio Cláudio e Rosângela e minha esposa Daniela.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida.

A meus pais, Antônio Cláudio Rotta e Rosângela Rotta, pelo amor incondicional e pelo incentivo aos estudos que recebo desde sempre.

À minha esposa Daniela, pelo companheirismo, compreensão e por ter compartilhado comigo os momentos difíceis que passei durante o período que estive longe. Amo-te muito.

Ao professor e grande amigo Jean Jacques Robin, por ter acreditado na realização deste trabalho e ter me aceitado e me acolhido em seu laboratório, durante o período de minha estadia na França.

Ao professor Edson Minatti, pela oportunidade, amizade, orientação e paciência.

Aos membros da banca examinadora.

Aos colegas do POLISSOL e aos inesquecíveis amigos do Institut Charles Gerhardt (ICG), equipe de Ingénierie et Architectures Macromoléculaires (IAM), que foram minha família na França, em especial à Houria, Frederic, Duala, Éverton e ao meu companheiro de bancada Dien, que não mediu esforços para me ajudar na realização deste trabalho.

À Amélia Habas e Jean Pierre Habas, pessoas que estarão sempre em minha memória e em meu coração. Obrigado por tudo.

Ao meu grande amigo Javier Vellé. Obrigado pelo convívio, pela amizade sincera e por ser essa pessoa especial que és.

À Capes, pelo apoio financeiro.

À UFSC, à Coordenadoria de Pós-Graduação em Química e aos seus professores e funcionários.

Enfim, a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho descreve a síntese e a caracterização físico-química de uma nova série de copolímeros anfifílicos, sintetizados a partir de compostos de origem natural, pela telomerização de um monômero derivado do glicerol, o acrilato de carbonato de glicerol (GCA), com dois diferentes ácidos graxos (oléico e láurico), utilizando o mercaptoetanol como agente de transferência. A auto-associação em solução destes copolímeros ocorreu pelo método de diálise, onde grandes aglomerados micelares esféricos (LCM's) foram formados, em solução aquosa. Medidas de Espalhamento de Luz Estático e Dinâmico (SLS e DLS) e observações de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e de Força Atômica (AFM) mostraram que essas nanoestruturas foram capazes de se auto-associar em estruturas esféricas nanométricas em meio aquoso, formando micelas de diferentes tamanhos. O efeito do tamanho dos blocos hidrofílicos e hidrofóbicos na concentração micelar crítica (cmc) e na morfologia dos agregados foi investigado e todos os copolímeros foram caracterizados por medidas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H , Infravermelho (FTIR), Espectrometria de Massa (MS) e Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC). A cmc destes copolímeros está entre 10 e 60 mg/L (determinada por técnicas de fluorescência e DLS). Os resultados também indicaram que a cmc destes copolímeros pode ser ajustada controlando o balanço entre os segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos de suas estruturas.

PALAVRAS-CHAVE: copolímeros anfifílicos, micelas poliméricas, auto-associação

ABSTRACT

This work reports the synthesis and physico-chemical characterization of a new series of amphiphilic polymers, synthesized from totally biosourced compounds by telomerization reaction of a monomer derived from glycerol, the carbonate glycerol acrylate (GCA), with two different fatty acids (oleic and lauric), using the mercaptoethanol like a telogen agent. The self-association in solution of these copolymers occurred by Dialysis method, where large compound micelles (LCM's) were formed, consisting of a hydrophobic core and a hydrophilic shell, in aqueous solution. Dynamic and Static Light Scattering measurements (DLS and SLS), Transmission Electronic Microscopy (TEM) and Atomic Force Microscopy (AFM) observations showed these copolymers were capable of self-assembling into nanosized spherical particles in aqueous solution, forming micelles of different sizes. The effects of the segment length of both blocks in the critical micellar concentration (cmc) and morphology of aggregates were investigated. All the polymers synthesized were characterized by Nuclear Magnetic Resonance (RMN) of ^{13}C and ^1H , Infrared (FTIR), Mass Spectroscopy (MS) and Size Exclusion Chromatography (SEC) measurements.. The cmc of these polymers is in the range of 10 - 60 mg/L (determined by fluorescence and DLS techniques). The results also indicated that the cmc values could be adjusted by controlling the balance of hydrophilic and hydrophobic segments.

KEYWORDS: amphiphilic copolymers, polymeric micelles, self-assembly.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Representação esquemática das várias técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas..... | 2 |
| Figura 2: Perfis de concentração plasmática do fármaco por meio de uma terapia convencional (A) e por meio de uma liberação controlada (B)..... | 7 |
| Figura 3: Diferentes sistemas utilizados na liberação controlada de fármacos. | 8 |
| Figura 4: Estrutura química do polietileno (a), do polipropileno (b) e do poliestireno (c).... | 12 |
| Figura 5: Classificação dos copolímeros de acordo com a disposição de seus monômeros: (a) em bloco, (b) alternado, (c) estatístico e (d) enxertado..... | 13 |
| Figura 6: Diferentes tipos de copolímeros em bloco: dibloco (a), tribloco (b), multibloco (c) e estrela (d)..... | 13 |
| Figura 7: Processo de formação de micelas em meio aquoso..... | 15 |
| Figura 8: Representação esquemática da contribuição das forças de atração e repulsão, para o mecanismo de formação das micelas em meio aquoso..... | 15 |
| Figura 9: Representação esquemática da incorporação do princípio ativo no interior hidrofóbico da micela..... | 16 |
| Figura 10: Representação esquemática dos dois principais métodos de preparação de micelas de copolímeros em bloco..... | 23 |
| Figura 11: Estrutura química do glicerol, ou glicerina, ou 1,2,3-propanotriol..... | 29 |
| Figura 12: (a) Reação global e (b) Reações consecutivas de transesterificação de triglicerídeos. R_1 , R_2 , R_3 e R representam grupos alquilas..... | 31 |
| Figura 13: Fluxograma de produção de biodiesel e tratamento de purificação do glicerol...33 | |

| | |
|--|----|
| Figura 14: Separação do glicerol após tratamento com ácido concentrado. Fase superior: ácidos graxos; fase intermediária: glicerol; fase inferior: glicerol + sais..... | 34 |
| Figura 15: Estrutura química de ácidos graxos saturado e insaturado..... | 39 |
| Figura 16: Estrutura química do ácido graxo oléico..... | 41 |
| Figura 17: Estrutura química do ácido graxo láurico..... | 43 |
| Figura 18: Ilustração das quatro etapas básicas na análise de espectrometria de massa..... | 50 |
| Figura 19: Espectros de emissão de fluorescência do monômero de pireno em etanol..... | 51 |
| Figura 20: Geometria do experimento no equipamento de Espalhamento de Luz..... | 53 |
| Figura 21: Representação esquemática mostrando a diferença entre o raio de giração (R_g) e o raio hidrodinâmico (R_H) para um novelo polimérico aleatório em solução..... | 56 |
| Figura 22: Consumo (α) do agente de transferência mercaptoetanol (ME) e do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA) na razão $R_0= 0,1$ <i>versus</i> tempo. (■ monômero, ○ mercaptoetanol)..... | 77 |
| Figura 23: Espectro Maldi-TOF dos polímeros à base de acrilato de carbonato de glicerol (GCA)..... | 80 |
| Figura 24: Cromatogramas dos três polímeros à base de acrilato de carbonato de glicerol (GCA), determinados por GPC..... | 82 |
| Figura 25: Curva de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) do polímero F18-GCA65..... | 83 |
| Figura 26: Espectro de RMN de ^1H do agente telogênico A ($\text{C}_{18}\text{OOC}_2\text{H}_4\text{SH}$)..... | 85 |
| Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C do agente telogênico A ($\text{C}_{18}\text{OOC}_2\text{H}_4\text{SH}$)..... | 86 |
| Figura 28: Espectro de RMN de ^1H do agente telogênico B ($\text{C}_{12}\text{OOC}_2\text{H}_4\text{SH}$)..... | 87 |
| Figura 29: Espectro de RMN de ^{13}C do agente telogênico B ($\text{C}_{12}\text{OOC}_2\text{H}_4\text{SH}$)..... | 88 |

| | |
|---|-----|
| Figura 30: Espectro de RMN de ^1H da reação de telomerização do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA) com o agente telogênico A ($\text{C}_{18}\text{OOC}_2\text{H}_4\text{SH}$)..... | 89 |
| Figura 31: Espectro de RMN de ^{13}C da reação de telomerização do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA) com o agente telogênico A ($\text{C}_{18}\text{OOC}_2\text{H}_4\text{SH}$)..... | 90 |
| Figura 32: Espectro de RMN de ^1H da Reação de Telomerização do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA) com o agente telogênico B ($\text{C}_{12}\text{OOC}_2\text{H}_4\text{SH}$)..... | 91 |
| Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C da reação de telomerização do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA) com o agente telogênico B ($\text{C}_{12}\text{OOC}_2\text{H}_4\text{SH}$)..... | 92 |
| Figura 34: Espectro de RMN de ^1H do polímero F18- DA_n , após a hidrólise básica..... | 93 |
| Figura 35: Espectro de RMN de ^1H do polímero F12- DA_n , após a hidrólise básica..... | 94 |
| Figura 36: Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos três polímeros, ante e após o processo de hidrólise..... | 96 |
| Figura 37: Perfis da razão I_1/I_3 do espectro de emissão de fluorescência do pireno, em função da concentração dos polímeros: (A) F18-GCA65, (B) F18-GCA27 e (C) F12-GCA24..... | 98 |
| Figura 38: Curvas de distribuição de tamanho das micelas poliméricas F18-GCA65, F18-GCA27 e F12-GCA24, antes e após o processo de diálise..... | 101 |
| Figura 39: Tamanho médio das micelas antes e após o processo de diálise..... | 102 |
| Figura 40: Gráficos de Guinier para os dados de espalhamento de luz estático (SLS). Os valores de raio de giração (R_g) inseridos nos gráficos foram calculados com base no coeficiente angular dos segmentos lineares das curvas..... | 103 |
| Figura 41: Curvas g_2 de autocorrelação de espalhamento de luz dinâmico (DLS), no ângulo de 90° | 104 |

Figura 42: Dependência angular da frequência de relaxação das curvas de autocorrelação do espalhamento de luz dinâmico (DLS). Os valores de R_H foram calculados através da equação de Stokes-Einstein, usando o coeficiente angular das curvas D_0105

Figura 43: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das micelas poliméricas F18-GCA65 (a), F18-GCA27 (b) e F12-GCA24 (c).....108

Figura 44: Imagens topográficas de microscopia de força atômica (AFM) das micelas poliméricas F18-GCA65 (a), F18-GCA27 (b) e F12-GCA24 (c).....109

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1: Valores de ρ para partículas com topologias típicas..... | 57 |
| Tabela 2: Características moleculares dos três polímeros anfifílicos, analisadas por Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC) | 81 |
| Tabela 3: Atribuições das frequências das principais bandas dos polímeros F18-GCA65, F18-GCA27 e F12-GCA24. | 95 |
| Tabela 4: Valores de concentração micelar crítica (cmc) para os três polímeros anfifílicos, a 25°C, medidos por fluorescência e espalhamento de luz dinâmico (DLS) | 99 |
| Tabela 5: Características dos polímeros anfifílicos, a 0,5 mg/mL, determinadas por espalhamento de luz estático e dinâmico (SLS e DLS) | 106 |

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- AFM:** microscopia de força atômica
- AIBN:** 2,2- azobisisobutironitrila
- AUC:** ultracentrifugação analítica
- cac:** concentração de agregação crítica
- CDCl₃:** clorofórmio deuterado
- CD₃CN:** acetonitrila deuterada
- cmc:** concentração micelar crítica
- C(q,t):** função de auto-correlação
- D:** coeficiente de difusão hidrodinâmico aparente
- DLS:** espalhamento de luz dinâmico
- DMAc:** dimetilacetamida
- DMF:** dimetifomamida
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- DMSO-d₆:** dimetilsulfóxido deuterado
- FDA:** Food and Drug Administration
- FTIR:** infravermelho por transformada de Fourier
- GC:** carbonato de glicerol
- GCA:** acrilato de carbonato de glicerol
- GPC:** cromatografia de permeação em gel
- I_p:** índice de polidispersidade
- I(q):** intensidade de espalhamento em função da magnitude do vetor de espalhamento
- ME:** 2-mercaptoetanol
- MS:** espectrometria de massa
- M_n:** massa molar numérica média
- M_w:** massa molar ponderal média
- PE:** polietileno
- PEG:** polietilenoglicol
- PEO:** poli(óxido de etileno)
- PET:** poli(tereftalato de etileno)

PHA: polihidroxialcanoatos
PHB: polihidroxibutiratos
PMMA: polimetilmetacrilato
PP: polipropileno
PS: poliestireno
PUFAs: ácidos graxos polinsaturados
q: vetor de onda do espalhamento
R_g: raio de giração
R_H: raio hidrodinâmico
RMN: ressonância magnética nuclear
SANS: espalhamento de nêutrons
SAXS: espalhamento de raios-X a baixos ângulos
SEC: cromatografia de exclusão por tamanho
SEM: microscopia eletrônica de varredura
SLS: espalhamento de luz estático
TEM: microscopia eletrônica de transmissão
T_g: temperatura de transição vítrea
THF: tetrahidrofurano
Γ: frequência de relaxação
λ: comprimento de onda
ζ: potencial zeta
n_o: índice de refração do solvente
k: constante de Boltzmann
η: viscosidade do solvente
ρ: razão entre R_g e R_H
h: constante de Plank

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1: | 1 |
| 1) Introdução: | 1 |
| 1.1) Objetivos: | 5 |
| CAPÍTULO 2: | 6 |
| 2) Revisão bibliográfica: | 6 |
| 2.1) Polímeros: | 10 |
| 2.2) O processo de micelização: | 14 |
| 2.3) A caracterização estrutural de micelas de copolímeros em bloco: | 17 |
| 2.4) Estabilidade cinética: | 19 |
| 2.5) A corona da micela: | 20 |
| 2.6) O núcleo da micela: | 21 |
| 2.7) Métodos para preparação das micelas: | 22 |
| 2.8) Morfologia micelar e aspectos cinéticos e termodinâmicos no processo de micelização: | 24 |
| 2.9) Glicerol ou glicerina: | 28 |
| 2.10) Características físico-químicas do glicerol: | 29 |
| 2.11) Obtenção e tratamento do glicerol bruto: | 30 |
| 2.12) Bioprodutos obtidos por fermentação microbiana do glicerol: | 34 |

| | |
|--|----|
| 2.13) Avanços tecnológicos no aproveitamento do glicerol no Brasil: | 38 |
| 2.14) Ácidos graxos: | 38 |
| 2.15) Ácido graxo oléico: | 41 |
| 2.16) Ácido graxo láurico: | 42 |
| 2.17) A reação de telomerização: | 44 |
| 2.18) Considerações teóricas sobre as técnicas utilizadas neste trabalho: | 45 |
| CAPÍTULO 3: | 60 |
| 3) Parte Experimental: | 60 |
| 3.1) Material: | 60 |
| 3.2) Síntese do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA): | 60 |
| 3.3) Síntese do agente telogênico A (C₁₈OOC₂H₄SH): | 61 |
| 3.4) Síntese do agente telogênico B (C₁₂OOC₂H₄SH): | 62 |
| 3.5) Reação de Telomerização do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA) com o agente telogênico A (C₁₈OOC₂H₄SH): (F₁₈-GCA_n) | 64 |
| 3.6) Reação de Telomerização do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA) com o agente telogênico B (C₁₂OOC₂H₄SH): (F₁₂-GCA_n) | 65 |
| 3.7) Reação de hidrólise: | 67 |
| 3.8) Cinética de telomerização: | 69 |
| 3.9) Instrumentação: | 70 |
| 3.10) Preparação das micelas poliméricas: | 71 |

| | |
|---|-----|
| 3.11) Caracterização físico-química das micelas poliméricas: | 72 |
| CAPÍTULO 4: | 75 |
| 4) Resultados e discussão: | 75 |
| 4.1) Síntese dos agentes telogênicos A (C₁₈OOC₂H₄SH) e B (C₁₂COOC₂H₄SH): | 77 |
| 4.2) Reação de telomerização: | 78 |
| 4.3) Auto-associação dos polímeros anfífilicos: | 97 |
| 5) Conclusões e perspectivas: | 110 |
| 6) Referências bibliográficas: | 112 |

1) INTRODUÇÃO

Atualmente, a nanotecnologia tem atraído a atenção de muitos grupos de pesquisa em todo o mundo, devido ao seu enorme potencial de aplicação nos mais variados setores industriais e ao impacto que seus resultados podem causar no desenvolvimento tecnológico e econômico ^[1]. O grande interesse que os nanomateriais têm despertado, nos últimos anos, é devido aos efeitos peculiares de suas dimensões atômicas. As propriedades e o tamanho destas nanoestruturas são fatores grandemente influenciados pelas condições experimentais utilizadas na preparação das mesmas. Tratando-se de nanopartículas poliméricas, estas podem ser convenientemente preparadas a partir de polímeros pré-formados ou por polimerização direta de monômeros, usando polireações ou polimerização clássica ^[2]. Métodos como evaporação do solvente, salting-out, diálise, nanoprecipitação e tecnologia de fluido supercrítico (SCF), podem ser utilizados para a preparação de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados. Por outro lado, a miniemulsão, microemulsão, polimerização interfacial, telomerização, etc. são métodos usados para sintetizar estas nanoestruturas a partir da polimerização de monômeros ^[2] (Figura 1).

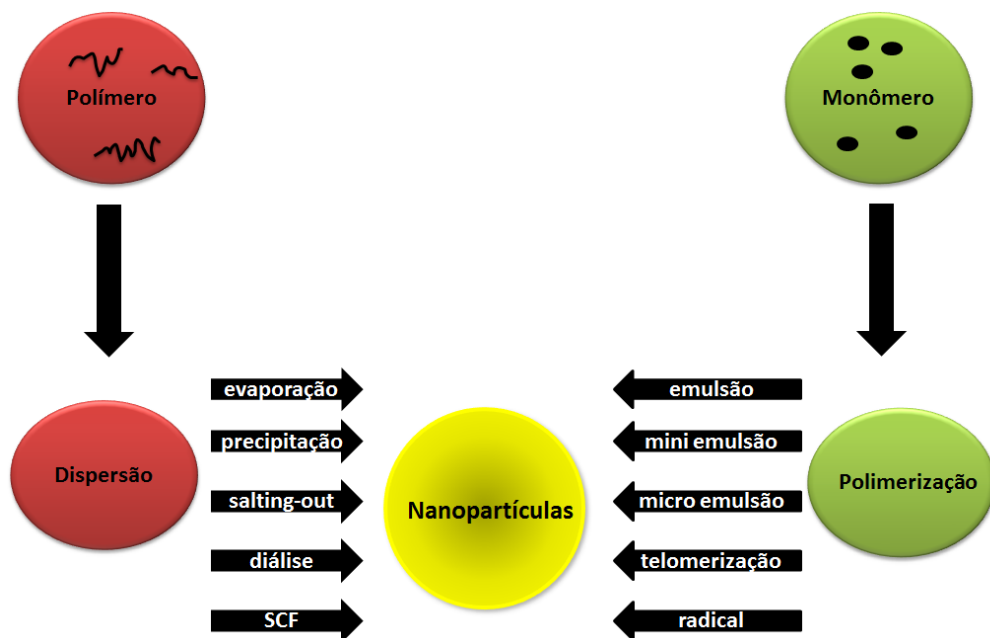


Figura 1: Representação esquemática das várias técnicas de preparação de nanopartículas poliméricas.

Visando diminuir a toxicidade e promover um maior efeito terapêutico, pesquisadores têm demonstrado grande interesse em desenvolver e aprimorar sistemas que permitam a liberação controlada e direcionada de princípios ativos em alvos específicos. Estas pesquisas, voltadas ao desenvolvimento de um sistema transportador ideal, têm resultado em uma grande variedade de carreadores (p.ex. nanopartículas, micelas, etc.) e esta perspectiva tornou-se, hodiernamente, um dos principais desafios para a indústria farmacêutica [3].

Neste contexto, sistemas micelares formados pela auto-organização de copolímeros anfílicos são de grande interesse para tal aplicação. Devido a uma diferença de solubilidade entre os blocos hidrofílico e hidrofóbico em solução aquosa, o copolímero se auto-organiza formando micelas do tipo núcleo-corona. Uma molécula bioativa pode ser fisicamente incorporada no núcleo destas nanoestruturas, que a transportará em concentrações que excedem sua solubilidade intrínseca em água [4].

Uma característica que torna os copolímeros em bloco atrativos para aplicações em liberação controlada de fármacos é o fato de que a composição, a massa molar total e a razão do comprimento dos blocos podem facilmente ser mudadas, permitindo, assim, controlar o tamanho e a morfologia destas micelas ^[5].

As dimensões das micelas, da ordem nanométrica, permitem que estes nanocarreadores sejam utilizados em tratamentos específicos, via injeções intravenosas. As micelas podem também ser projetadas para possuir sítios de reconhecimento celular em sua superfície, aumentando as chances de se obter uma liberação direcionada do princípio ativo em regiões específicas do corpo ^[1-2].

Neste trabalho, os esforços foram concentrados na síntese de polímeros anfifílicos baseados em compostos renováveis, utilizando um procedimento químico versátil e simples. Por meio de uma reação de telomerização de um monômero acrilato, derivado do glicerol (glicerina), com ácidos graxos modificados pelo agente de transferência mercaptoetanol, novas estruturas poliméricas foram obtidas e caracterizadas por medidas de ressonância magnética nuclear (RMN de ¹H e ¹³C), infravermelho (FTIR), espectrometria de massa (MS) e cromatografia de exclusão por tamanho (SEC). Medidas de espalhamento de luz estático e dinâmico (SLS e DLS) e imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e de força atômica (AFM) mostraram que estes copolímeros foram capazes de se auto-organizar em micelas esféricas nanométricas, consistindo de um núcleo hidrofóbico e uma corona hidrofílica, em meio aquoso. Os efeitos do tamanho de ambos os blocos formadores destas nanoestruturas também foram investigados.

Para a realização desta tese, uma grande parceria foi formada entre os laboratórios Polissol, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e o Institut Charles Gerhardt (ICG), equipe de Ingénierie et Architectures Macromoléculaires (IAM), da Universidade de

Montpellier II, localizado no sul da França, um centro de pesquisa de alta tecnologia na síntese e caracterização de polímeros naturais e sintéticos.

1.1) OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo sintetizar e caracterizar uma nova série de copolímeros anfifílicos, a partir de compostos de origem natural.

Objetivos Específicos

- Otimizar o processo de síntese dos novos polímeros formados por meio de uma reação de telomerização de um monômero derivado do glicerol (glicerina) – o acrilato de carbonato de glicerol (GCA) - com dois diferentes ácidos graxos (oléico e láurico).
- Caracterizar os novos polímeros formados, através das técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , FTIR, MS e SEC;
- Preparar micelas poliméricas através do método de diálise;
- Determinar a concentração micelar crítica (cmc) dos copolímeros em solução aquosa, através de duas técnicas: espectrofotometria de fluorescência e DLS;
- Determinar o tamanho e a distribuição de tamanho das micelas, antes e após o processo de diálise, através de medidas de DLS;
- Determinar o raio de giração (R_g) e o raio hidrodinâmico (R_H) das micelas formadas, através das técnicas de SLS e DLS, respectivamente;
- Observar a morfologia das micelas por meio das técnicas de TEM e AFM.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O avanço da nanotecnologia, através do aprimoramento e do desenvolvimento de novos mecanismos para a preparação e liberação controlada de fármacos e princípios ativos, tem trazido muitos benefícios para os setores médico, químico e farmacêutico. Estes sistemas possibilitam a diminuição da toxicidade, melhorando a eficácia do princípio ativo e proporcionando grandes benefícios aos pacientes, possibilitando a abertura, cada vez maior, de novos mercados para tais setores ^[1-2].

Em comparação aos sistemas convencionais, estes mecanismos oferecem muitas vantagens, como, por exemplo, um maior tempo de permanência do fármaco na circulação sanguínea, uma queda significativa dos efeitos tóxicos, uma maior eficácia terapêutica, com a liberação progressiva do fármaco, uma redução dos custos, devido a utilização de uma menor quantidade do princípio ativo, um direcionamento a alvos específicos, entre outras ^[2,3]. A Figura 2 faz um comparativo entre os perfis de concentração do fármaco no organismo quando administrado por um método convencional (2A) e por meio de um sistema de liberação controlada (2B) ^[1-2].

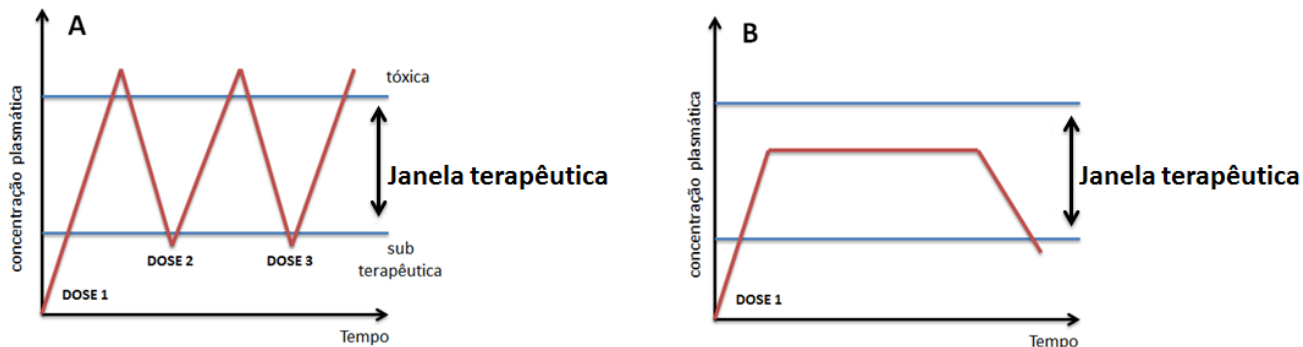


Figura 2: Perfis de concentração plasmática do fármaco por meio de uma terapia convencional (A) e por meio de uma liberação controlada (B).

Pelo método convencional, a concentração plasmática do fármaco, em função do tempo, oscila em torno da janela terapêutica. Inicialmente, há um aumento desta concentração e, com o passar do tempo, começa a declinar, sendo necessária a administração de uma segunda dose. Como os níveis plasmáticos são dependentes das doses administradas, quanto maior a dose, maiores as chances de que a concentração do fármaco no organismo alcance os níveis tóxicos, acarretando em efeitos adversos. Já os sistemas de liberação controlada podem resultar em níveis de fármacos que se encontram dentro da janela terapêutica por um longo período de tempo, com a administração de uma única dose ^[2,3].

Com o objetivo de diminuir os efeitos adversos, minimizar a degradação do fármaco e aumentar a biodisponibilidade de medicamento na zona desejada, vários sistemas de liberação controlada estão sendo desenvolvidos. Entre os sistemas carreadores em estudo, podemos destacar as nanopartículas, as nanoesferas e as nanocápsulas ^[4-8], os lipossomas ^[9-11], os dendrímeros ^[12,13], os cristais líquidos ^[14,15] e as micelas poliméricas ^[16-20], todos obtidos a partir de polímeros sintéticos ou naturais, solúveis ou insolúveis em meio aquoso (Figura 3).



Figura 3: Diferentes sistemas utilizados na liberação controlada de fármacos.

A aplicabilidade e o uso progressivo de muitos fármacos vão depender do desenvolvimento apropriado de carreadores para a sua liberação no corpo. Atualmente, a nanotecnologia tem como exemplo clássico o uso de nanopartículas no transporte de princípios ativos. A forma, juntamente com as características físico-químicas destas nanoestruturas, são fatores determinantes na eficácia, no planejamento e no controle de suas propriedades de liberação ^[3].

Por exemplo, estudos feitos em relação a liberação do fármaco Paclitaxel, através de micelas formadas pelo copolímero em bloco lactato de poli(*n*-(2-hidroxipropil))

metacrilamida e poli(etilenoglicol) (pHPMAmDL-*b*-PEG), cujo bloco formador do núcleo, pHPMAmDL, mostraram que esse sistema apresentou características sensíveis à temperatura e promoveu a gradual dissolução da micela devido a hidrólise do ácido lático ^[21]. Neste estudo, os autores concluem que as características apresentadas pelo sistema, como grande capacidade de solubilização do fármaco, grande estabilidade e tamanho das micelas, em torno de 60 nm, além da facilidade de preparação, tornam-nas destas, excelentes candidatas para a substituição do método de administração convencional.

Outros estudos investigaram as propriedades de micelas poliméricas formadas pelo copolímero poli(2-etil-2-oxazolina)-bloco-poli(ϵ -caprolactona). Estudos *in vitro* comprovaram que a atividade do fármaco, neste sistema, foi comparável à da formulação clinicamente utilizada, sugerindo o emprego destas nanoestruturas como um vantajoso sistema carreador para o fármaco paclitaxel ^[22].

Muitos estudos estão sendo feitos, a fim de demonstrar o potencial dessas nanoestruturas no tratamento de pacientes. Porém, há um número limitado de produtos no mercado. O Abraxane[®] (paclitaxel) foi a primeira nanopartícula quimioterápica aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) e tem-se mostrado mais efetiva que outras formulações do paclitaxel para o tratamento de pacientes com câncer ^[23,24].

2.1) POLÍMEROS

Um polímero é uma macromolécula composta por muitas unidades de repetição denominadas meros, unidas por ligação covalente. A matéria-prima para a produção de um polímero é o monômero, isto é, uma molécula com uma (mono) unidade de repetição [25]. Ou seja, os polímeros são substâncias de alta massa molar, que devem suas propriedades peculiares ao seu tamanho, sua forma tridimensional, sua polidispersidade e, algumas vezes, à sua assimetria.

A polidispersidade de um polímero se dá por variações estatísticas presentes nos processos de polimerização. Num polímero, determina-se o valor médio da massa molar e a sua distribuição, tendo em vista a variação das moléculas que compõem o material [25]. As principais massas molares médias de um polímero são:

- Massa molar viscosimétrica média (M_v): é obtida a partir de medidas de viscosidade e definida segundo a equação:

$$M_v = \left[\frac{\sum_{x=1}^{\infty} W_x \cdot M_x^a}{\sum_{x=1}^{\infty} W_x} \right]^{1/a} = \left[\frac{\sum_{x=1}^{\infty} N_x \cdot M_x^{a+1}}{\sum_{x=1}^{\infty} N_x \cdot M_x} \right]^{1/a} \quad \text{Equação 1}$$

onde a é uma constante, N_x é o número de moléculas de polímero com massa molar M_x e W a massa total de todas as moléculas.

- Massa molar numérica média (M_n): é definida pelo somatório das massas molares de todas as cadeias presentes em uma amostra do polímero, dividido pelo número total de cadeias, de acordo com a equação:

$$M_n = \frac{W}{\sum_{x=1}^{\infty} N_x} = \frac{\sum_{x=1}^{\infty} N_x \cdot M_x}{\sum_{x=1}^{\infty} N_x} \quad \text{Equação 2}$$

- Massa molar ponderal média (M_w): corresponde a média ponderada do tamanho das cadeias, conforme a equação:

$$M_w = \frac{\sum_{x=1}^{\infty} W_x \cdot M_x}{\sum_{x=1}^{\infty} W_x} = \frac{\sum_{x=1}^{\infty} N_x \cdot M_x^2}{\sum_{x=1}^{\infty} N_x \cdot M_x} \quad \text{Equação 3}$$

onde W_x representa a fração ponderal de cadeias com massa molar M_x , sendo definido de acordo com a equação:

$$W_x = N_x \cdot M_x \quad \text{Equação 4}$$

A massa molar ponderal média (M_w) é considerada a mais importante em um polímero por estar mais relacionada às suas propriedades mecânicas. As propriedades mecânicas de um polímero estão relacionadas ao tamanho das cadeias e à fração mássica nas

quais estas cadeias aparecem no material. Desta forma, não é comum utilizar a M_n para definir essa propriedade para um polímero, e sim a M_w . A M_n leva em consideração apenas o número de cadeias com determinada massa molar, enquanto que M_w avalia o número e a massa molar da cadeia, aproximando-se melhor do valor real.

A razão entre M_w e M_n é conhecida como índice de polidispersidade (I_p) e representa o quão dispersa a massa molar do polímero está na amostra ^[25].

As propriedades de cada polímero dependem de como suas unidades monoméricas estão organizadas (reunidas) e este fator conduz à versatilidade dos diferentes polímeros sintéticos encontrados atualmente ^[26]. A Figura 4 mostra alguns polímeros do nosso cotidiano, como o polietileno (PE), o polipropileno (PP) e o poliestireno (PS). Além destes, os poliésteres, o politetrafluoretileno (TEFLON[®]), o polietilenoglicol (PEG) e o poli(tereftalato de etileno) (PET) também são comumente encontrados no nosso dia-a-dia.

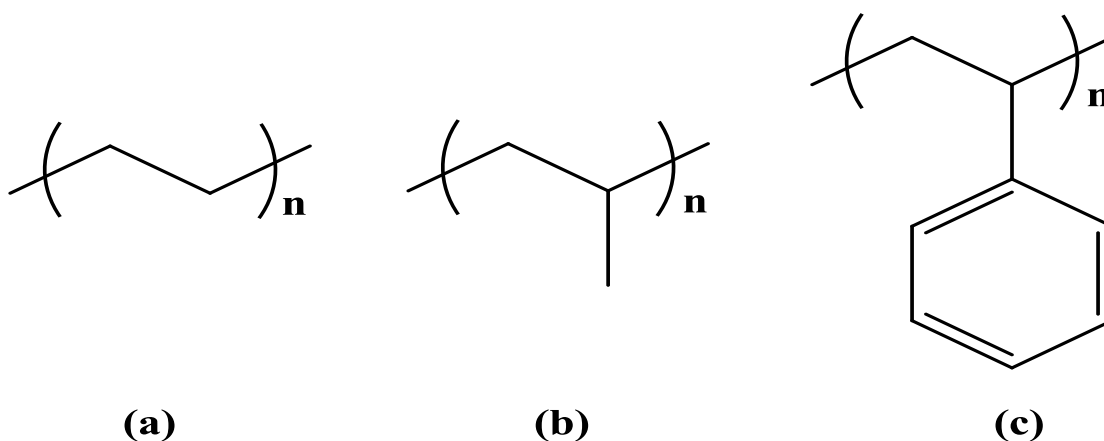


Figura 4: Estrutura química do PE (a), PP (b) e PS (c).

Polímeros que contêm apenas uma unidade monomérica são chamados de homopolímeros (por exemplo, o PEG), enquanto os que contêm duas ou mais unidades monoméricas diferentes são conhecidos como copolímeros. De acordo com a disposição de seus monômeros, conforme representado na Figura 5, os copolímeros podem ser divididos em quatro classes: em bloco, alternado, estatístico (ou aleatório) e enxertado ^[25].

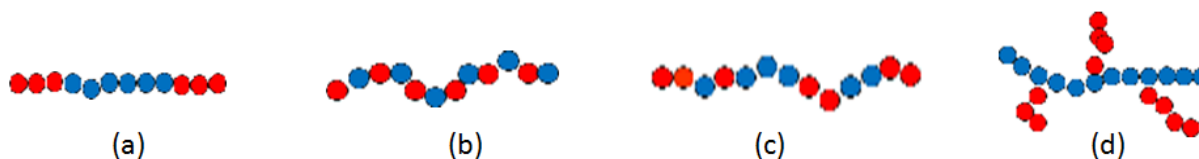


Figura 5: Classificação dos copolímeros de acordo com a disposição de seus monômeros: (a) em bloco, (b) alternado, (c) estatístico (ou aleatório) e (d) enxertado.

Os copolímeros em bloco são formados por uma sequência de monômeros A, unidos por ligação covalente a uma sequência de monômeros B. Esta classe de copolímeros pode ser classificada em grupos, de acordo com a disposição de seus blocos, como mostra a Figura 6.

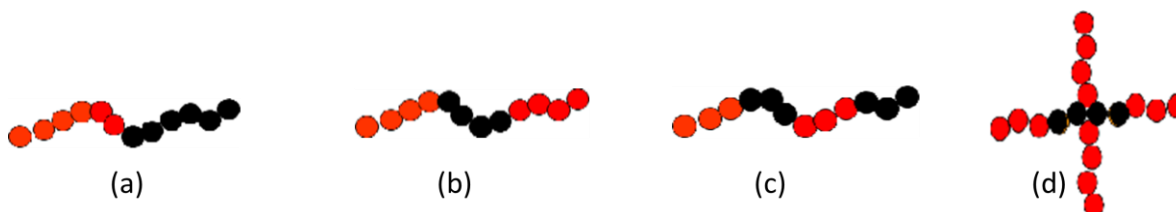


Figura 6: Diferentes tipos de copolímeros em bloco: (a) dibloco, (b) tribloco, (c) multibloco e (d) estrela.

O mais simples copolímero em bloco é o tipo AB, onde o homopolímero A encontra-se ligado ao homopolímero B, sendo chamado de copolímero dibloco (Figura 6a). O segundo tipo de copolímero, chamado de tribloco, é constituído do homopolímero B com ambas as

terminações ligadas a homopolímeros A (Figura 6b). O terceiro tipo, chamado multibloco, tem os segmentos A e B ligados e repetidos muitas vezes (Figura 6c). O quarto tipo de copolímero em bloco é chamado de estrela, onde a unidade A, com muitos braços funcionalizados, copolimeriza em bloco com os blocos B e apresenta-se na forma de estrela. O número de braços depende do número de grupos funcionais no bloco A (Figura 6d) ^[27].

2.2) O PROCESSO DE MICELIZAÇÃO

Muitos copolímeros têm caráter anfifílico, ou seja, possuem um bloco com características apolares (hidrofóbico) e outro bloco com características polares (hidrofílico). Estas estruturas, em meio aquoso (ou em um solvente seletivo para apenas uma das sequências de blocos), tendem a se concentrar nas interfaces do sistema, por um mecanismo de adsorção, reduzindo, assim, a energia livre do sistema onde se encontram ^[28]. Além disso, acima de uma determinada concentração, a chamada concentração micelar crítica (cmc), estas estruturas se auto-organizam, formando micelas ou agregados micelares ^[16].

A força motriz responsável pela formação destas micelas é impulsionada pelo efeito hidrofóbico das porções apolares de suas moléculas (Figura 7).

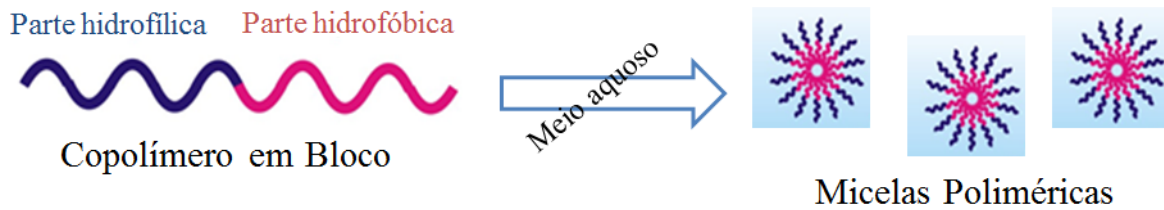


Figura 7: Processo de formação de micelas em meio aquoso.

Além disso, há dois tipos de forças atuando na formação destas estruturas: forças atrativas (que tendem a unir as moléculas) e forças repulsivas (que limitam o número de moléculas que podem se auto-associar) (Figura 8). Assim, em meio aquoso, essas moléculas podem se agregar de diferentes formas (esféricas, cilíndricas, lamelares, em disco), com sua porção hidrofóbica constituindo a parte interna (núcleo) e a porção hidrofílica a parte externa (corona) ^[29].

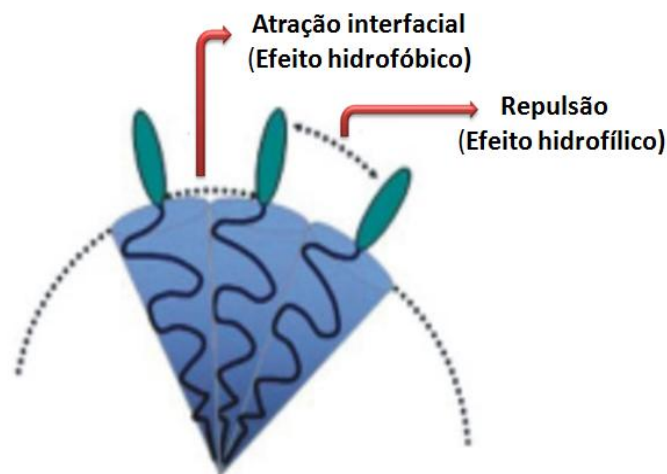


Figura 8: Representação esquemática da contribuição das forças de atração e repulsão, para o mecanismo de formação das micelas em meio aquoso.

O núcleo hidrofóbico da micela serve como um microambiente ideal para a encapsulação e liberação de fármacos ou princípios ativos de caráter hidrofóbico, enquanto que a corona serve como uma interface estabilizante entre o núcleo hidrofóbico e o meio externo (Figura 9) ^[30, 31, 32].

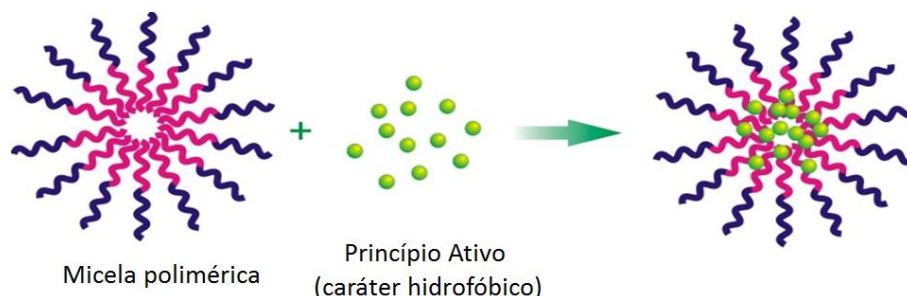


Figura 9: Representação esquemática da incorporação do princípio ativo no interior hidrofóbico da micela.

A auto-associação destas macromoléculas anfifílicas em solventes seletivos, formando micelas poliméricas, têm merecido grande atenção, principalmente na aplicação como sistemas de liberação controlada de medicamentos (*drug delivery system*) ^[33]. O uso destas nanoestruturas como sistemas carreadores de fármacos teve seu início em 1984, com Ringsdorf et al. ^[34]. Estes pesquisadores, partindo de um copolímero de poli(óxido etileno)-*b*-poli(*L*-lisina), fixaram covalentemente o fármaco ciclofosfamida sobre o bloco de *L*-lisina, conduzindo a formação de micelas com um núcleo hidrofóbico de lisina modificada, circundada por poli(óxido etileno) ^[35].

Trabalhos cada vez mais elaborados vêm demonstrando a síntese, a manipulação e as propriedades de nanopartículas poliméricas, com potencial aplicação em sistemas de liberação controlada. Desde 1990, Kataoka et al. ^[36-40] vêm estudando e utilizando três

sistemas de micelas poliméricas como carreadores de fármacos: *i*) micelas formando conjugados de copolímeros em bloco e fármaco, onde o fármaco é ligado covalentemente a uma das sequências do copolímero; *ii*) fármacos não-covalentemente incorporados às micelas; e *iii*) complexos polieletrólitos formados entre polinucleotídeos e copolímeros em bloco catiônicos.

Utilizar polímeros naturais para sintetizar e manipular nanoestruturas carreadoras é uma estratégia bastante atraente em formulações farmacêuticas. Porém, poucos sistemas utilizam ácidos graxos polinsaturados (PUFAs, do inglês *Polyunsaturated Fatty Acids*) no desenvolvimento de nanopartículas micelares. A síntese de novos copolímeros, através da combinação de diferentes blocos hidrofílicos e hidrofóbicos, é uma excelente maneira de se obter sistemas com diferentes propriedades físico-químicas e diferentes características, importantes para viabilizar a sua utilização como sistemas carreadores de fármacos ^[30].

2.3) A CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE MICELAS DE COPOLÍMEROS EM BLOCO

Devido às suas várias aplicações em potencial, o estudo da estrutura e das propriedades de micelas poliméricas tem recebido crescente interesse. Há diversos trabalhos na literatura que tratam da morfologia ^[41], da cmc ^[42], da distribuição de tamanho das micelas, ^[43] das dimensões da corona e do núcleo em função da composição da macromolécula ^[44], das transições do tipo ordem/desordem, etc. ^[45]. As técnicas tipicamente utilizadas para caracterizar tais sistemas incluem espalhamento de luz estático (SLS) e dinâmico (DLS), cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), viscosimetria,

ultracentrifugação analítica (AUC), espalhamento de nêutrons (SANS) ou de raios-X a baixos ângulos (SAXS), fluorescência, infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), microscopias, etc. ^[46-54].

Apesar da cmc depender da composição do copolímero, ela é muito mais afetada pelo tamanho do bloco insolúvel. O tamanho e o número de agregação da micela também dependem da composição do copolímero. Quanto maior o bloco insolúvel, maior será o número de agregação e o tamanho da micela. O bloco solúvel tem exatamente o efeito contrário. A distribuição de tamanho das micelas é usualmente estreita e é influenciada pela polidispersidade dos copolímeros ^[55].

A geometria esférica das micelas é a morfologia mais comumente formada em soluções de copolímeros em bloco. A micela assume esta geometria em uma ampla faixa de composição, especialmente quando o bloco solúvel é o componente predominante, devido à forte repulsão existente entre os blocos constituintes da corona. No entanto, agregados não-esféricos têm sido descritos em vários sistemas ^[55]. Em estudos utilizando espalhamento de luz, através da determinação de parâmetros como o raio de giração (R_g), raio hidrodinâmico (R_H) e coeficiente de difusão, foi possível detectar, em alguns sistemas, geometrias esféricas ou em forma de bastões, a depender da composição do copolímero ^[56]. Em experimentos de SAXS, empregando-se luz síncrotron, em soluções de poliestireno-*b*-poli(isopreno) em anilina, onde os blocos de poli(isopreno) se associam para formar agregados, concluiu-se que o modelo vesicular descreve melhor o sistema que o modelo esférico, quando o bloco de poliestireno é relativamente curto ^[57]. Além disso, regiões de coexistência de micelas cilíndricas e esféricas, formadas a partir de

copolímeros tribloco de poli(óxido de etileno)-*b*-poli(óxido de propileno) foram identificados também por SAXS ^[58].

Outras geometrias, não usuais e de modelamento não óbvio, têm sido determinadas sob a observação direta através de microscopia eletrônica, como por exemplo, as micelas do tipo *worm-like*, *onion-like* e muitas outras ^[55].

Há muitas teorias que versam sobre micelas esféricas formadas a partir de copolímeros em bloco ^[59]. Apesar de cada uma dessas teorias abordar o assunto segundo diferentes pontos de vista, todas elas convergem quanto à proposição de relações entre os parâmetros estruturais da micela e as características moleculares dos blocos constituintes.

2.4) ESTABILIDADE CINÉTICA

A estabilidade cinética de um sistema micelar depende de muitos fatores, como por exemplo, a natureza do bloco formador do núcleo, o tamanho deste bloco, a presença de solubilizantes hidrofóbicos, dentre outros. O bloco formador do núcleo apresenta características mais relevantes sobre a cmc, de modo que quanto maior seu tamanho, menor será o valor da cmc em água. Se o bloco formador da corona é mantido constante, um aumento na massa molar do bloco formador do núcleo causa um decréscimo na cmc. Mas, se o bloco formador do núcleo for mantido constante, um aumento no tamanho do bloco hidrofílico causa um aumento na cmc ^[30].

Copolímeros anfifílicos, ao se auto-associarem, diminuem a energia livre do sistema, devido à remoção dos fragmentos hidrofóbicos do meio aquoso em função da formação da

micela ^[23]. Além do processo de agregação, há também um aumento no processo de entropia, devido à desordenação provocada nas moléculas de água, que antes solvatava as cadeias livres, e devido a um maior número de arranjos conformacionais da cadeia hidrofóbica dentro do núcleo da micela ^[60].

A reticulação química (processo que ocorre quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por ligações covalentes), tanto do núcleo quanto da corona das micelas, normalmente provoca um aumento na sua estabilidade, mesmo a concentrações abaixo da sua cmc, podendo, desta forma, serem isoladas e redissolvidas como nanopartículas, com menor probabilidade de sofrerem colapso, por exemplo, na circulação sanguínea, conduzindo a um aumento no tempo de circulação ^[61]. Há também evidências de que a incorporação de compostos hidrofóbicos no interior destas micelas pode melhorar a estabilidade das mesmas ^[30]. Portanto, é de extrema importância conhecer a cmc de um copolímero, cujos valores podem apresentar uma variação de acordo com o método de detecção utilizado ^[62].

2.5) A CORONA DA MICELA

O bloco formador da corona da micela é responsável por sua biodistribuição, pelos parâmetros farmacocinéticos, biocompatibilidade, estabilidade e proteção estérica, especificidade e adsorção da superfície por proteínas plasmáticas. Já os parâmetros físicos de grande influência são: a densidade da superfície das cadeias hidrofílicas, que aumentam com o aumento do número de agregação, a carga, a hidrofílicidade e o comprimento do bloco ^[63].

Poli(óxido de etileno) (PEO) tem sido o polímero hidrofílico mais utilizado na preparação de carreadores de fármacos. É um polímero não-iônico, cristalino, termoplástico e solúvel em água. Seu alto grau de hidratação e grande contração de volume induzem às forças repulsivas que contribuem para a estabilização de uma superfície revestida por PEO. Outros polímeros também empregados como segmentos formadores do revestimento da micela incluem a poli(vinil pirrolidona), que é bastante utilizada por ser altamente biocompatível, o poli(álcool vinílico), e o poli(ácido acrílico), dentre outros^[23, 30, 32].

2.6) O NÚCLEO DA MICELA

A escolha adequada do bloco formador do núcleo de uma micela polimérica é um parâmetro fundamental para inferir em importantes propriedades, tais como estabilidade, capacidade de encapsulação, perfil de liberação de um fármaco, etc.^[32].

Poliésteres e derivados de poli(aminoácidos) como segmento hidrofóbico constituem a grande maioria dos copolímeros em bloco anfifílicos utilizados em sistemas de liberação de fármacos. Poli(ácido láctico), poli(ϵ -caprolactona) e poli(ácido glicólico) são todos poliésteres biocompatíveis e biodegradáveis aprovados pela FDA para aplicações biomédicas. Poli(aminoácidos), como o poli(ácido aspártico), poli(ácido glutâmico) e poli(L-lisina), têm sido extensivamente estudados, devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e versatilidade estrutural^[17].

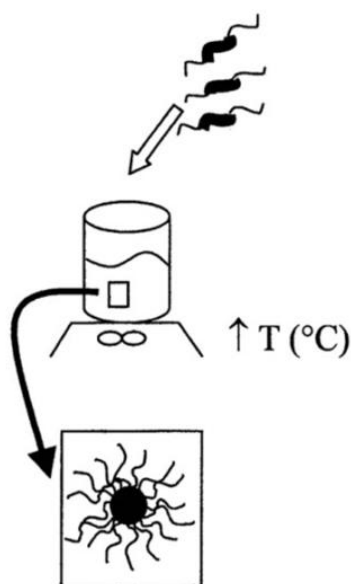
2.7) MÉTODOS PARA A PREPARAÇÃO DAS MICELAS

O método a ser escolhido para a preparação de micelas poliméricas vai depender, principalmente, da solubilidade do copolímero em água.

Dentre os mais utilizados para a preparação deste tipo de sistema, destacam-se dois principais: o método de dissolução direta e o método de diálise (Figura 10) ^[20, 30].

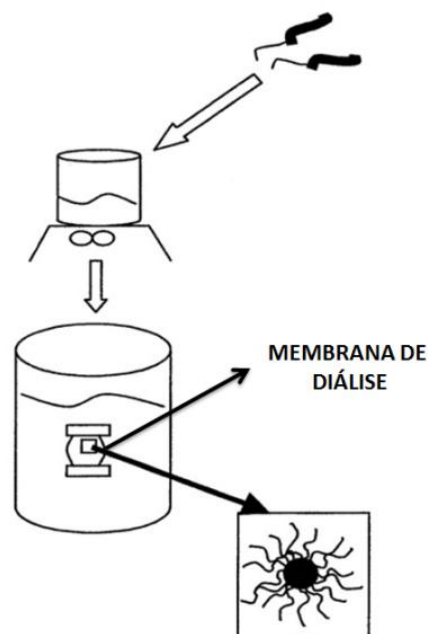
Se o polímero é solúvel em água, a dissolução direta é o método empregado. Neste caso, o polímero é adicionado a uma concentração acima da sua cmc e, sob agitação lenta, a auto-organização do sistema começa a ocorrer progressivamente, até que o sistema alcance um equilíbrio termodinâmico. Muitas vezes, neste método, a mistura é aquecida acima da temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero, para garantir o processo de micelização. A cinética de auto-associação depende de vários parâmetros, como o tipo de solvente, a temperatura, a presença de aditivos e ainda da massa molar, razão da fração em volume entre os blocos hidrofílicos e hidrofóbicos e T_g . Em meio aquoso, é mais adequada a escolha de copolímeros cujo bloco hidrofílico é muito maior do que o bloco hidrofóbico ^[20, 30].

MÉTODO DE DISSOLUÇÃO DIRETA



Dissolução do copolímero em água ou solução tampão

DIÁLISE



Dissolução do copolímero em solvente orgânico (DMF, THF, DMSO, DMAc)

Figura 10: Representação esquemática dos dois principais métodos de preparação de micelas de copolímeros em bloco ^[20].

Já o método de diálise é utilizado quando o copolímero é insolúvel em água. Aqui, o copolímero é primeiramente dissolvido em um solvente orgânico, termodinamicamente bom para os dois blocos e miscível em água, como tetraidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMAc), dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, água é adicionada à fase orgânica contendo o polímero dissolvido, a uma quantidade e taxa controladas. Gradualmente, a qualidade do solvente muda em direção oposta para cada bloco, tornando-se bom para um bloco e pobre para outro. Em seguida, a mistura é dialisada para remover o solvente orgânico e, alternativamente, a micelização pode ser induzida pela evaporação deste solvente. O tamanho, a distribuição de tamanho, bem como outras propriedades, vão depender do tipo de solvente utilizado ^[30].

O mecanismo de formação de nanopartículas e micelas pelo método de diálise não é totalmente compreendido até o presente. Acredita-se que isto pode estar baseado num mecanismo semelhante ao de nanoprecipitação, proposto por Fessi et al. ^[64]. Inúmeros trabalhos já foram realizados envolvendo a preparação de micelas poliméricas pelo método de diálise. Como exemplos, podemos citar o trabalho realizado por Oh et al. ^[65], onde estes pesquisadores relataram a formação de nanopartículas de poli(γ -benzil-*L*-glutamato)-*b*-poli(óxido de etileno), utilizando como solvente DMF. Nanopartículas de poli(ácido lático)-*b*-poli(óxido de etileno) foram preparadas por Lee et al. ^[66] utilizando DMF como solvente. O solvente utilizado na preparação da solução polimérica afetou a morfologia e a distribuição de tamanho das nanopartículas. Akagi et al. ^[67] prepararam nanopartículas de poli(γ -ácido glutâmico) utilizando solventes tais como DMSO, DMF, DMAc e observaram que, no caso do DMSO, a morfologia das nanopartículas foi esférica, com diâmetros que variaram numa escala de 100 a 200 nm. Em outro trabalho, realizado pelo grupo de Na et al. ^[68], nanopartículas de poli(*L*-ácido lático)-*b*-poli(etilenoglicol), de forma esférica, com uma escala de tamanho de 90-330 nm, foram preparadas empregando DMSO como solvente.

2.8) MORFOLOGIA MICELAR E ASPECTOS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS NO PROCESSO DE MICELIZAÇÃO

Para se obter diferentes nanoestruturas, com diferentes morfologias, devemos ter um balanço entre os segmentos hidrofílico e hidrofóbico dos copolímeros. Além da morfologia, este balanço determina parâmetros estruturais como tamanho da partícula, dimensões do núcleo e número de agregação ^[30]. Tudo isto é alcançado por meio das forças envolvidas no grau de estiramento dos segmentos que formam o núcleo, da energia interfacial entre o

núcleo das micelas e o solvente e das interações entre os segmentos que compõem a corona da micela. A forma micelar resultante será aquela que melhor satisfaça estas exigências e isso irá depender do tamanho relativo dos blocos polares e apolares.

A formação das diferentes morfologias, devido à auto-organização dos copolímeros em bloco, é resultado de fatores termodinâmicos e cinéticos. Portanto, é interessante investigar a relação entre estes fatores, tanto no processo de micelização quanto nas transições morfológicas.

Evans et al. ^[69] propõem dois modelos para descrever o mecanismo de micelização de copolímeros em bloco: o modelo aberto e o modelo fechado. O modelo aberto considera que o processo de micelização ocorre em etapas, progressivamente, segundo uma série de equilíbrios consecutivos. As etapas envolvem todos os tipos possíveis de tamanhos e número de agregação das micelas, iniciando-se com dímeros até chegar a estruturas de equilíbrio, não apresentando uma concentração crítica distinta ^[70]. Já o modelo fechado assume que há um único estágio de equilíbrio entre unímeros e micelas, com um certo número de agregação, o qual ocorre a uma determinada concentração crítica. Devido ao fato do modelo Fechado apresentar uma concentração de micelização bem definida, geralmente ele é mais aceito no estudo dos processos de micelização. A contribuição mais importante deste modelo é o cálculo da energia livre de micelização, segundo a relação simplificada:

$$\Delta G^o \approx RT \ln(cmc)$$

Equação 5

Sabendo-se que o número de agregação é independente da temperatura, a entalpia de micelização, ΔH , pode ser determinada a partir da dependência da cmc com a temperatura, através da equação de Gibbs-Helmoltz ^[69]:

$$\Delta H^o \approx R \frac{d \ln(cmc)}{d(T)} = -RT^2 \frac{\partial \ln(cmc)}{\partial T} \quad \text{Equação 6}$$

Por meio desta equação, é possível estimar a contribuição do termo entálpico para a energia livre de micelização.

Conhecendo-se ΔG e ΔH , podemos concluir que:

$$\Delta S^o = \frac{\Delta H^o - \Delta G^0}{T} \quad \text{Equação 7}$$

A influência da variação da concentração inicial de copolímero na morfologia e nas transições morfológicas, sob os aspectos termodinâmicos e cinéticos, foi estudada por Zhang e Eisenberg ^[71,72]. Como dito anteriormente, estes pesquisadores comprovaram que, termodinamicamente, a morfologia dos agregados é controlada principalmente pelo balanço de forças envolvendo as interações repulsivas das cadeias da corona, a energia interfacial corona/núcleo e a deformação dos blocos hidrofóbicos no núcleo. O efeito de alterar a concentração inicial na morfologia pode ser entendido considerando-se que o número de agregação (N_{agg}) é função da concentração total (c) de copolímero e da cmc,

que é a concentração abaixo da qual as cadeias não estão associadas (unimoleculares). Esta relação pode ser escrita como:

$$N_{agg} \sim \left(\frac{c}{cmc} \right)^2 \quad \text{Equação 8}$$

Estudos feitos por Zhang e Eisenberg ^[73] comprovam que a cmc depende, principalmente, do conteúdo de água presente na solução. Portanto, a uma concentração de água constante, o N_{agg} deve crescer quanto maior a concentração de polímero. Devido às dimensões do núcleo serem função do N_{agg} , à medida que a concentração inicial aumenta, as transições morfológicas ocorrerão quando o estiramento do bloco hidrofóbico no núcleo atingir um certo valor crítico de extensão ^[73].

Em termos cinéticos, há dois mecanismos para se atingir as transições morfológicas. O primeiro mecanismo envolve a contínua inserção de cadeias isoladas a uma micela esférica. A inserção dessas cadeias aumenta o N_{agg} e, conseqüentemente, as dimensões do núcleo, fazendo com que a morfologia esférica sofra uma eventual transição para a morfologia bastão. Outro possível mecanismo envolve colisões de pequenas micelas esféricas, as quais aumentam o N_{agg} e formam micelas de diâmetro maior e morfologia idêntica. Novamente, em um determinado ponto, a morfologia muda para a forma bastão. Em ambos os casos, subseqüentes inserções de cadeias e/ou colisões adesivas, promoverão um aumento das dimensões dos bastões ^[30, 69].

Em relação à liberação de fármacos, é possível utilizar estas várias morfologias em diferentes aplicações, pois sabe-se que cada tipo morfológico tem influência direta e

diferente sobre a capacidade de encapsulação e a cinética de liberação. Por exemplo, as micelas do tipo bastão podem ser usadas para a preparação de formulação do aerossol, uma vez que facilitam o acesso a diferentes partes do pulmão. Vesículas podem ser projetadas para conter compostos hidrofílicos, assim como uma combinação entre vesículas e micelas pode ser utilizada para a liberação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos ^[30].

Por este motivo, é de suma importância conhecer as características morfológicas dos sistemas estudados.

2.9) GLICEROL (OU GLICERINA)

Descoberto em 1779 por Carl W. Scheele, o glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol (Figura 11). Seus sinônimos são glicerina, triidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano. Na natureza, o glicerol está presente nos óleos vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê) e na gordura animal, na forma combinada de glicerol com ácidos graxos, para formar a molécula de triglicerol (triglicerídeo). No sistema metabólico de microrganismos, é considerado um composto fundamental, pois atua como precursor de numerosos compostos e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares ^[74].

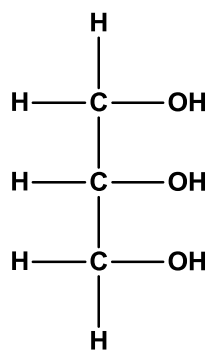


Figura 11: Estrutura química do glicerol, ou glicerina, ou 1,2,3-propanotriol.

Em humanos, o glicerol participa na termorregulação do corpo, na resistência a altas temperaturas, na resistência dos músculos em atividades físicas e na resposta neural da variação da glicemia ^[75].

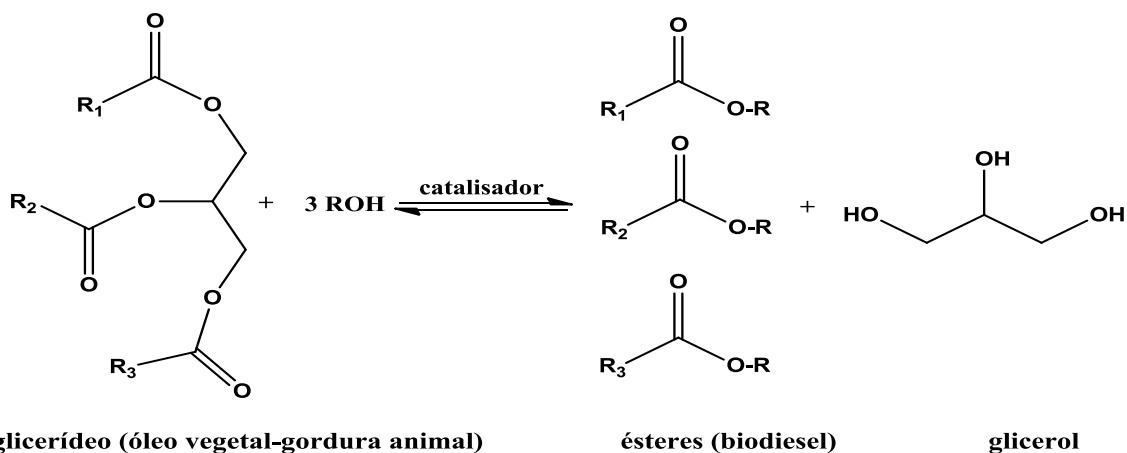
2.10) CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO GLICEROL

Na sua forma pura, o glicerol apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, com sabor doce, solúvel em água e álcool e insolúvel em éter e em clorofórmio. Devido às suas características físicas e químicas e ao fato de ser inócuo, o glicerol puro apresenta diferentes aplicações na indústria de cosméticos, farmacêutica, de detergentes, na fabricação de resinas, de aditivos e na indústria de alimentos. Apesar de apresentar estas aplicações na forma pura, poucos estudos estão sendo direcionados para a utilização de glicerol bruto na forma direta ^[75].

2.11) OBTENÇÃO E TRATAMENTO DO GLICEROL BRUTO

Subproduto natural do processamento de óleos e gorduras, o glicerol pode ser obtido mediante reação de saponificação de ácidos graxos (óleos, azeites ou sebo) com hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, como co-produto da fabricação de biodiesel e, em menor proporção, mediante síntese microbiana. A produção sintética de glicerol a partir de cloreto de alil via epiclorigrina encontra-se em declínio, devido ao excesso no mercado de glicerol oriundo do processamento do biodiesel. Dentro deste contexto, o glicerol constitui o maior subproduto gerado no processo de produção do biodiesel via esterificação de ácidos graxos vegetais ou gordura animal com álcool (metanol ou etanol) para produzir ésteres e glicerol na presença de catalisador (KOH ou NaOH) ^[76]. A equação global de transesterificação é apresentada na Figura 12a, onde são necessários três mols de álcool por cada mol de triglicerídeo utilizado. Esta reação global é consequência de um número de reações reversíveis e consecutivas mostradas na Figura 12b. A primeira consiste na conversão de triglicerídeos em diglicerídeos, seguida da conversão destes diglicerídeos em monoglicerídeos, e, finalmente, de glicerídeos a glicerol, rendendo uma molécula de éster de álcool por cada glicerídeo em cada etapa da reação.

a)



b)

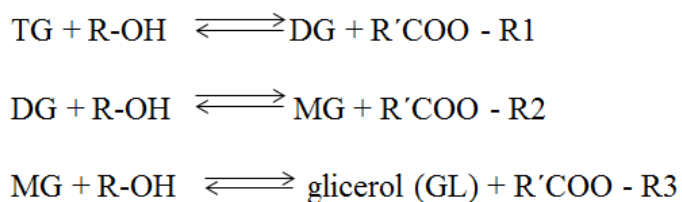


Figura 12: (a) Reação global e (b) Reações consecutivas de transesterificação de triglicerídeos. R1, R2, R e R3 representam grupos alquilas e TG = triglicerídeo; DG = diglicerídeo e MG = monoglicerídeo.

No final da etapa de transesterificação, o glicerol e ésteres formam uma massa líquida de duas fases, que são facilmente separáveis por decantação ou centrifugação. A fase superior contém os ésteres metílicos ou etílicos constituintes do biodiesel. A fase inferior encontra-se composta de glicerol bruto e impurezas. O glicerol bruto apresenta-se na forma de líquido viscoso pardo escuro, que contém quantidades variáveis de sabão, álcool (metanol ou etanol), monoacilglicerol, diacilglicerol, oligômeros de glicerol, polímeros e água ^[77]. A porcentagem de glicerol na mistura varia entre 65 a 70 % (m/m), sendo a maior parte das

impurezas sabão, formado pela reação dos ácidos graxos livres com excesso de catalisador (saponificação). Dessa forma, o aspecto do glicerol bruto encontra-se estreitamente relacionado ao conteúdo de sabão, que proporciona aparência de viscoso e escuro. Para reduzir o sabão gerado, recomenda-se conduzir a reação de transesterificação com matérias primas (triglicerídeos) com baixo conteúdo em ácidos graxos livres e água, ao mesmo tempo de reduzir a quantidade de catalisador ^[77]. A mistura residual resultante é submetida ao processo de acidificação com ácido concentrado (HCl, H₂SO₄, ou H₃PO₄) para a separação de glicerol e ácidos graxos do sabão (Figura 13). No entanto, a maior parte dos processos de tratamento de glicerol é conduzida utilizando HCl ou H₂SO₄, sendo o H₃PO₄ restrito pelo alto custo. Durante a acidulação, forma-se certa quantidade de sal (reação do ácido inorgânico com íon do sabão) que se deposita na fase inferior de um líquido trifásico, estando a fase superior constituída pelos ácidos graxos livres e a fase intermediária composta principalmente por glicerol e álcool (Figura 14). O glicerol recuperado alcança concentrações superiores a 80 % (m/m), com quantidades variáveis de água, corantes e álcool. Posteriormente, o glicerol com excesso de ácido é neutralizado com solução de NaOH e submetido a tratamento térmico (70° C) para eliminar os componentes voláteis (recuperação de álcool) ^[77,78]. Nesta forma, parcialmente livre de impurezas, o glicerol pode ser utilizado como substrato de fermentação por várias espécies de microrganismos.

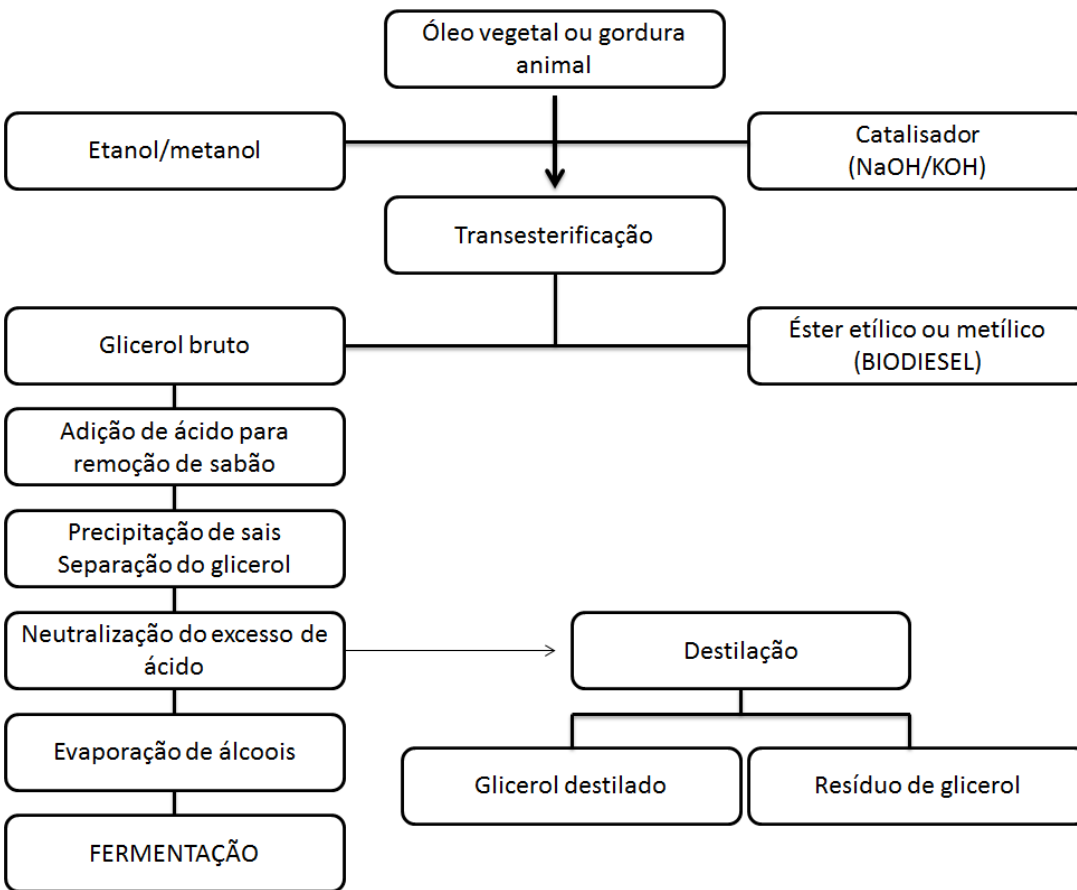


Figura 13: Fluxograma de produção de biodiesel e tratamento de purificação do glicerol.

As características físicas, químicas e nutricionais do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo (gordura animal ou óleo vegetal) e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel. No entanto, a procura pelo glicerol purificado é muito maior, devido ao seu valor econômico. A aplicação do glicerol na indústria está condicionada ao grau de pureza, que deve ser igual ou superior a 95%. Para obter grau de pureza superior a 95% (m/m) (grau alimentício ou farmacêutico), o glicerol deve ser submetido à destilação, mas sob custo elevado. Por outro lado, o glicerol bruto contém elementos nutricionais, como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, que são factíveis de serem utilizados por microrganismos para o seu crescimento durante processos fermentativos [79].

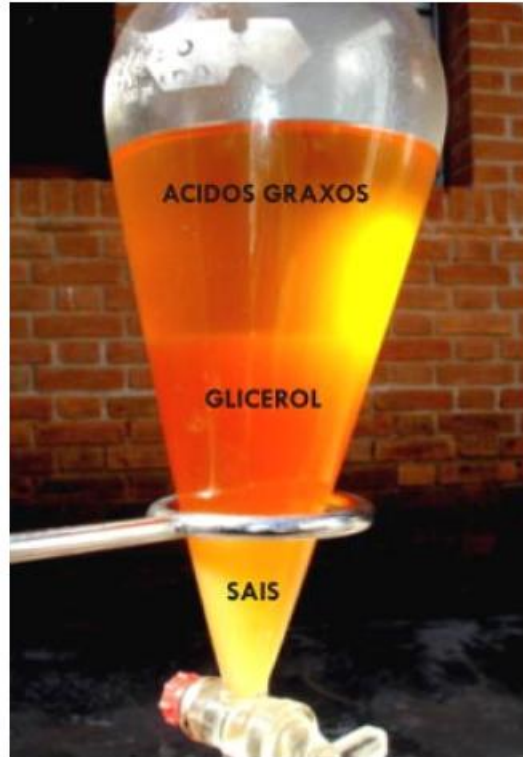


Figura 14: Separação do glicerol após tratamento com ácido concentrado. Fase superior: ácidos graxos; fase intermediária: glicerol; fase inferior: glicerol + sais.

2.12) BIOPRODUTOS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO MICROBIANA DO GLICEROL

O crescente aumento da indústria de biodiesel, tanto no Brasil quanto no mundo, vem originando grandes volumes do seu principal co-produto, o glicerol. Esta superprodução está afetando de forma negativa o preço do biodiesel no mercado e isto está fazendo com que a ciência, a pesquisa e a tecnologia busquem novas alternativas e aplicações para este co-produto. Neste contexto, o glicerol vem sendo investigado como a futura fonte de carbono em processos microbianos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado. Dentre

estes bioprodutos, destacam-se o 1,3-propanodiol, o etanol, os ácidos graxos polinsaturados, os ácidos orgânicos e os polihidroxicanoatos, sobre os quais será feito um breve comentário a seguir.

a) 1,3-Propanodiol

Sabemos que processos químicos tradicionais de produção de vários polímeros são altamente nocivos, devido aos compostos tóxicos gerados. Pesquisas recentes no campo da biotecnologia, através do uso de microrganismos, têm utilizado o glicerol bruto na produção do composto 1,3-propanodiol ^[80,81]. Este composto é um intermediário na síntese de compostos cíclicos e de monômeros para produção de poliésteres, poliuretanos e polipropileno tereftalato. O campo de aplicação deste composto é amplamente abrangente, pois diferentes setores, como a indústria de polímeros, tintas, resinas de poliéster, lubrificantes, até produção de cosméticos, fazem uso deste produto. Mediante processos fermentativos do glicerol bruto por microrganismos (por ex.: *Klebsiella pneumoniae*), foram obtidos concentrações de até 56 g/L em escala de laboratório do composto 1,3-propanodiol. No entanto, sua produção em escala industrial encontra-se limitada, devido ao fato de que a maioria dos microrganismos produtores (*Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Propionibacterium* e *Anaerobiospirillum*) são considerados patogênicos e requerem condições estritas de anaerobiose e nutrientes específicos para seu desenvolvimento ^[82]. Uma solução futura para o *scale-up* consistiria na utilização de ferramentas da engenharia genética para inserir genes que expressem enzimas geradoras de 1,3-propanodiol em microrganismos mais adaptados às condições industriais ^[83]. Notoriamente, muitas espécies apresentam a capacidade de fermentar o glicerol, produzindo 1,3-propanodiol. Dentre elas, podemos citar: *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium butyricum*, *Enterobacter agglomerans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* e

Bacillus welchii ^[80, 81, 82]. Recentemente, González-Pajuelo et al. ^[84] comparando uma espécie natural de *Clostridium butyricum* VPI 3266 com outra geneticamente modificada *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5) (contendo genes para produção de 1,3-propanodiol), observaram que no tempo de 47 horas de fermentação em batelada alimentada, a cepa modificada alcançou maior produtividade (1,7 g/L) que a cepa natural (1,2 g/L).

b) Etanol

Etanol, butanol, e outros compostos são produzidos durante a fermentação do glicerol ^[86]. Ito et al. ^[86] demonstraram a possibilidade de produzir etanol e hidrogênio por *Enterobacter aerogenes* HU-101 utilizando efluentes da indústria de biodiesel contendo até 41% (m/m) de glicerol. Em outros trabalhos, etanol e ácido fórmico foram os principais produtos da fermentação de glicerol pela bactéria *Klebsiella planticola*, em concentrações equimolar acima de 2 g/L ^[87]. Estes resultados estimulam a procura de novos microrganismos para a fermentação de glicerol visando a produção de etanol e hidrogênio.

c) Ácidos graxos polinsaturados ômega-3 (ω -3)

De conhecidas propriedades terapêuticas contra inúmeras enfermidades, como doenças cardiovasculares, câncer e Alzheimer, os ácidos graxos polinsaturados da família ômega-3 (ω -3) são geralmente obtidos a partir de fontes naturais, como óleos vegetais ou de peixes. Recentemente, foram desenvolvidos trabalhos para a produção de ω -3 a partir da microalga heterotrófica *Schizochytrium limacinum*, que possui capacidade de produzir altos níveis de ácido docosahexaenóico (DHA). Pyle e Wen ^[88] observaram que após 5 dias de crescimento em frascos Erlenmeyer (pH = 8, 20°C), aproximadamente 18 g/L de células da microalga se formavam em meios independentes contendo glicose, glicerol puro e glicerol bruto, na concentração de 90 g/L. O trabalho demonstra que um leque de oportunidades pode

ser aberto com pesquisas utilizando exclusivamente algas heterotróficas e glicerol como fonte de carbono.

d) Ácidos orgânicos

Há inúmeros trabalhos direcionados para a produção de ácido cítrico e ácido succínico por fermentação de glicerol. Estes compostos são de ampla aplicação na indústria de alimentos e constituem importantes intermediários para a indústria de polímeros e produção de compostos químicos, como o 1,2-butanodiol e 2,4-butanodiol. Papanikolaou et al. ^[89] obtiveram considerável quantidade de ácido cítrico, da ordem de 35 g/L, mediante fermentação de glicerol por *Yarrowia lypolitica*. Rymowicz et al. ^[91] publicaram estudos de assimilação de glicerol desenvolvidos com três cepas mutantes de *Yarrowia lypolitica*, obtendo concentrações de até 124,5 g/L de ácido cítrico. A produção de ácido succínico e ácido acético a partir de glicerol por *Anaerobiospirillum succiniciproducens* resultou em concentrações 6,5 vezes superiores às aquelas obtidas utilizando glicose como única fonte de carbono ^[90].

e) Polihidroxialcanoatos

A preocupação pela redução dos contaminantes ambientais vem acelerando novas pesquisas para a produção de polímeros biodegradáveis. Espécies de *Pseudomonas* produzem naturalmente polihidroxialcanoatos (PHA), poliésteres lineares com uma ampla faixa de aplicações, devido às suas propriedades físicas e de biodegradabilidade ^[91]. Muitos microrganismos acumulam PHA sob condições de estresse, principalmente quando submetidos à falta de nitrogênio, fósforo ou oxigênio, e utilizam esse polímero quando a fonte externa de carbono é limitada. Historicamente, os ácidos graxos foram utilizados extensivamente para a síntese de PHA ^[91]. Glicerol proveniente da produção de biodiesel apresenta-se como uma opção de substrato econômico para a produção deste tipo de

biopolímero. Borman e Roth ^[92] utilizaram *Methylobacterium rhodesianum* para produzir polihidroxibutirato (PHB) na concentração de 10,5 g/L em fermentação por batelada com meio contendo 5 g/L de glicerol e caseína peptona.

2.13) AVANÇOS TECNOLÓGICOS NO APROVEITAMENTO DO GLICEROL NO BRASIL

É cada vez maior a pesquisa e a publicação de trabalhos na busca de soluções biotecnológicas para a utilização de glicerol originado da produção de biodiesel. Estudos têm demonstrado a potencialidade da utilização do glicerol, proveniente da produção de biodiesel, como fonte de carbono para a produção de compostos químicos e de grande interesse comercial. Novas linhas de pesquisas estão sendo definidas para obter compostos de maior valor agregado, que incluam principalmente moléculas bioativas, como proteínas e ribonucleotídeos, para a indústria alimentícia e farmacêutica. A utilização de biorrefinarias para conversão de glicerol bruto apresenta-se como uma estratégia promissora para evitar futuros problemas de acumulação deste subproduto, ao tempo de aumentar a rentabilidade da produção de biodiesel.

2.14) ÁCIDOS GRAXOS

São denominados ácidos graxos todos os ácidos monocarboxílicos alifáticos, ou seja, que possuem uma longa cadeia, saturada ou insaturada, constituída de átomos de carbono e hidrogênio (hidrocarbonetos) ligada a um grupo terminal carboxila (-COOH).

Os ácidos graxos livres ocorrem em quantidades pequenas nos óleos e gorduras. No entanto, participam da construção das moléculas de glicerídeos e de certos não-glicerídeos, representando até 96% da massa total dessas moléculas ^[93].

Com algumas exceções, todos os ácidos graxos encontrados na natureza têm alta massa molar, apresentam cadeia linear, são saturados e insaturados (Figura 15). Poderão ter também substituintes na cadeia, como grupos metílicos, hidroxílicos ou carbonílicos. Os principais ácidos graxos saturados são o láurico (cadeia carbônica com 12 átomos de carbono), o palmítico (16 átomos de carbono) e o esteárico (18 átomos de carbono). Já os insaturados são o ácido oléico (cadeia carbônica com 18 átomos de carbono e 1 insaturação), o linoléico (18 átomos de carbono e 2 insaturações) e o linolênico (18 átomos de carbono e 3 insaturações) ^[93].

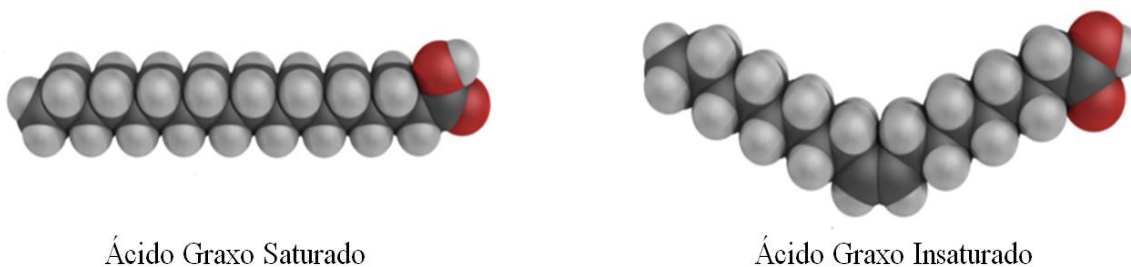


Figura 15: Estrutura química de ácidos graxos saturado e insaturado.

A gordura animal e os óleos vegetais têm ácidos graxos com cadeia de dezesseis a dezoito átomos de carbono, com predominância destes últimos. Ácidos graxos com vinte ou mais carbonos são comuns em gorduras de animais marinhos. A grande maioria dos ácidos graxos encontrados em gorduras naturais tem número par de átomos de carbono na cadeia e,

quando insaturados, na maioria das vezes, têm a configuração *cis* (os átomos de carbono adjacentes estão do mesmo lado da dupla ligação) ^[93].

Os ácidos graxos apresentam características marcantes, como, por exemplo, os pontos de fusão e ebulição, que aumentam de maneira mais ou menos uniforme quanto maior o tamanho da cadeia carbônica, e são influenciados pela presença de ramificações e substituintes e pelo número e posição das duplas ligações ^[94].

Ácidos graxos insaturados de cadeia linear têm sempre pontos de fusão ou ebulição mais baixos do que os saturados; a configuração *cis* tem sempre pontos de fusão ou ebulição mais baixos do que a configuração *trans*. Os ácidos graxos não-ramificados, com número par de átomos de carbono, sempre fundem a uma temperatura mais alta do que o próximo ácido da série, pelo fato de que no estado sólido, as cadeias de carbono dos ácidos, quando estendidas, formam um zig-zag ^[94].

Nas cadeias com número par de átomos de carbono, os grupos terminais (metílico e carboxílico) estão situados em lados opostos (o que não acontece com as cadeias de número ímpar de átomos de carbono), se ajustando melhor umas às outras e permitindo, assim, a ação das forças de van der Waals ^[94].

Os ácidos graxos apresentam o fenômeno do polimorfismo, isto é, cristalizam em mais de uma forma, com a mesma composição química, mas com algumas propriedades físicas e químicas diferentes. Este fenômeno é bastante observado na indústria alimentícia, uma vez que a consistência de gorduras hidrogenadas, manteiga, margarina, gorduras animais, vai depender também da forma cristalina dos ácidos graxos ^[94].

2.15) ÁCIDO GRAXO OLÉICO (C18:1)

É um ácido graxo encontrado em gordura animal e em óleos vegetais (oliva, palma, abacate, amêndoas, gergelim, nozes, uva, etc). Na natureza, ocorre em maiores quantidades que qualquer outro ácido graxo. No óleo de oliva (azeite), sua concentração é superior a 70% [95].

Quimicamente, o ácido oléico é um ácido graxo monoinsaturado, com uma cadeia carbônica contendo 18 átomos de carbono e uma dupla ligação localizada simetricamente entre os carbonos C9 e C10. Sua estrutura química é mostrada na Figura 16.

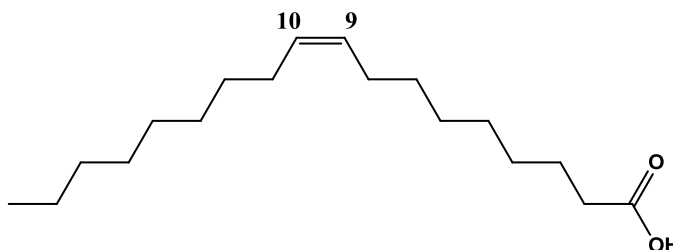


Figura 16: Estrutura química do ácido graxo oléico.

Sua fórmula empírica é $C_{18}H_{34}O_2$ e seu nome na IUPAC é *cis*-9-ácido octadecenóico [96].

O ácido oléico é obtido a partir da hidrólise da gordura animal e de certos óleos vegetais, onde, após a separação do glicerol (glicerina), ele é submetido a uma destilação sob alto vácuo e separado por cristalização fracionada da estearina, através do abaixamento da

temperatura. Para se obter um ácido oléico altamente puro, ele deve ser bidestilado e fracionado até se chegar na concentração acima de 95% ^[96].

Quando purificado, apresenta-se como um líquido amarelo-claro, insolúvel em água, solúvel em solventes orgânicos, com densidade de 0,895 g.mL⁻¹, ponto de fusão de 16,3 °C e ponto de ebulição de 360 °C ^[96].

O ácido oléico é muito utilizado como aditivo em base de sabões, sabonetes, cremes, emulsões cosméticas e bronzeadores, dando lubricidade, emoliência e proteção a peles ressecadas e com problemas de escamação. É considerado um ácido graxo essencial, ômega-9 (ω -9), participando do metabolismo e desempenhando um papel fundamental na síntese de hormônios ^[96].

Um estudo realizado por Menendez, da escola de medicina de Feinberg, na Universidade de Northwestern, em Chicago, revelou que o ácido oléico bloqueia a ação da proteína HER-2/neu (receptor do fator de crescimento epidérmico), causadora de câncer, encontrada em cerca de 30% dos pacientes com câncer de mama. O ácido oléico suprimiu a ação do câncer e melhorou a efetividade da droga Herceptin (Roche[®]), um medicamento utilizado na terapia contra a oncogênese ^[96].

2.16) ÁCIDO GRAXO LÁURICO (C12:0)

Também conhecido como ácido dodecanóico, o ácido graxo láurico é encontrado principalmente no óleo de coco e no óleo de palmiste, compondo aproximadamente 50% da gordura total desses óleos. Em menores quantidades, é encontrado no leite materno (6%) e

no leite de vaca (4%). Assim como outros ácidos graxos, o ácido láurico apresenta baixo custo, tem uma longa vida de prateleira e não é tóxico. Devido a essas características, é muito utilizado na produção de sabões e cosméticos ^[97].

Quimicamente, é um ácido graxo saturado de cadeia média, com 12 átomos de carbono. Sua estrutura química é mostrada na Figura 17.

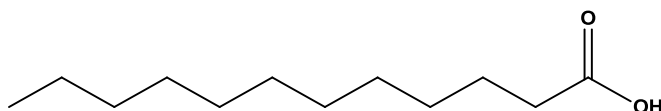


Figura 17: Estrutura química do ácido graxo láurico.

Sua fórmula empírica é $C_{12}H_{24}O_2$ e seu nome na IUPAC é ácido dodecanóico ^[98].

Apresenta-se como um sólido branco à temperatura ambiente, mas funde-se facilmente, pois seu ponto de fusão é baixo (44 a 46 °C). É insolúvel em água, solúvel em éter e benzeno. Tem uma massa molar de 200,31 g/mol, densidade de 0,88 g/cm³ e ponto de ebulição de 225 °C ^[98].

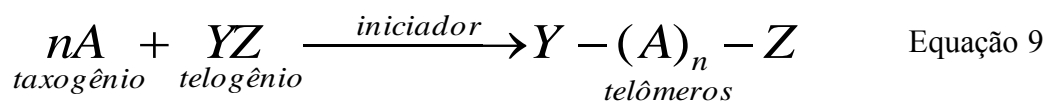
Encontra seu uso limitado na indústria alimentícia, mas é extensivamente usado nas indústrias química, farmacêutica e cosmeceutica, devido suas propriedades tensoativas (surfactante).

Pesquisas científicas demonstraram que o ácido láurico possui a capacidade de aumentar o sistema imunológico, pela ativação da liberação de uma substância chamada interleucina, que faz a medula óssea fabricar mais células brancas. Além disso, o ácido

láurico age como antiinflamatório, inibindo a síntese local de prostaglandinas (PGE2), substância pró-inflamatória presente em quadros reumáticos, artrites e inflamações musculares. Um estudo recente mostrou que o ácido láurico inibiu o crescimento de bactérias da pele, incluindo *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, em concentrações 15 vezes inferiores as de peróxido de benzoíla. O peróxido de benzoíla é o agente oxidante tópico mais utilizado no tratamento da acne, tanto isoladamente como em conjunto com alguma medicação via oral [99].

2.17) A REAÇÃO DE TELOMERIZAÇÃO

A telomerização é definida como um processo reacional, onde uma molécula YZ, denominada telogênio, reage com um composto polimerizável A, com insaturação etilênica, denominada taxogênio ou monômero, para formar produtos denominados telômeros, de fórmula Y(A)_nZ: (Equação 9)



O agente telogênico YZ sofre fácil clivagem por radicais livres (formados de acordo com as condições de iniciação), levando a um radical Y*, o qual será capaz de reagir com mais monômeros. Após a propagação do monômero, a etapa final consiste na transferência do telogênio para o crescimento da cadeia polimérica.

Na reação de telomerização, os polímeros formados são produtos intermediários entre compostos orgânicos ($n = 1$) e espécies macromoleculares ($n = 100$), a cadeia terminal do polímero apresenta importantes funcionalidades e é uma técnica que pode ser realizada utilizando todos os mecanismos envolvidos na polimerização aniônica, catiônica, de transferência de grupos, por radicais livres e policondensação^[100,101]. As principais diferenças entre a telomerização e a polimerização são:

- na telomerização, fragmentos do iniciador induzem a ruptura do agente telogênico, enquanto na polimerização, eles adicionam-se aos monômeros;

- como dito anteriormente, o número de unidades A do composto final é baixo ($n < 100$), mas diferente de 1;

- os grupos terminais da cadeia são significantes de um ponto de vista químico, porque suas massas molares são baixas;

Inicialmente, e sob impulso das patentes da DuPont[®], a definição de telomerização estava relacionada a um sistema radical, mas, pouco a pouco, pesquisadores trabalhando com polimerização aniônica, catiônica, de coordenação, etc. adotaram o termo telomerização cada vez que a estrutura molecular era bem definida, com dois grupos terminais na cadeia, tais como Y e Z e as massas molares eram baixas ou relativamente baixas.

2.18) CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS SOBRE AS TÉCNICAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

a) Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica analítica que fornece informações estruturais e dinâmicas sobre a matéria e que se baseia na detecção das

propriedades magnéticas dos núcleos que constituem os átomos desta matéria. É uma técnica que permite determinar o número e o tipo de grupos químicos num composto, sendo uma análise valiosa para a obtenção de informações sobre a estrutura de moléculas ^[102-104].

A espectroscopia de RMN pode ser utilizada tanto para a análise qualitativa como quantitativa e as suas aplicações vão desde a análise de compostos químicos simples a seres vivos intactos, de um modo não-invasivo e não-destrutivo ^[105]. Enquanto a espectroscopia no infravermelho (FTIR) revela os tipos de grupos funcionais presentes na molécula, a RMN oferece informações sobre o número de átomos magneticamente distintos do isótopo estudado. A combinação de dados de FTIR com os de RMN é, muitas vezes, suficiente para determinar completamente a estrutura de uma molécula desconhecida ^[106].

A espectroscopia de RMN não apenas constitui o melhor e mais eficiente método de análise de compostos orgânicos (no sentido de que é o método capaz de fornecer sozinho o maior número de informações sobre a estrutura molecular, além de permitir recuperação integral da amostra), como também tem se tornado um método extremamente conveniente para observar o interior do corpo humano (as inofensivas ondas de rádio são muito penetrantes e atravessam facilmente grande parte de nosso corpo) num processo frequentemente designado pela sigla inglesa MRI (Magnetic Resonance Imaging) ^[107].

b) Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC)

A cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), uma das modalidades da cromatografia de permeação em gel (GPC), é uma técnica que utiliza uma coluna empacotada com material poroso com o objetivo de separar moléculas de acordo com seu tamanho molecular efetivo em solução ^[108-110]. Este tamanho, ou seja, o volume hidrodinâmico que esta molécula ocupa em solução, é dependente das características

moleculares do polímero e do solvente utilizado a uma determinada temperatura. A massa molar e a distribuição de massa molar são as características mais importantes de um polímero, pois suas propriedades mecânicas são fortemente influenciadas por esses parâmetros^[111]. A determinação da massa molar e de sua distribuição pode ser conseguida de forma bem rápida e fácil por meio da técnica de SEC. Os materiais utilizados no empacotamento das colunas de SEC são partículas esféricas com porosidade permanente (estado seco) ou que apresentam porosidade quando inchadas por um solvente. Esses materiais podem ser substâncias orgânicas ou inorgânicas com uma estrutura tridimensional [108, 110, 112]

Em SEC, o tamanho da partícula do material de empacotamento é um dos fatores mais importantes para uma boa separação. Partículas grandes e com uma larga distribuição de tamanho limitam a resolução da coluna. Por outro lado, a presença de partículas muito pequenas reduz a permeabilidade da coluna, sendo necessária a aplicação de uma alta pressão para se obter uma vazão adequada de escoamento^[113, 114].

A estrutura porosa e as propriedades de inchamento dos materiais utilizados nas colunas de SEC são a base para o processo de separação de moléculas. Essas características são governadas pelo tipo de diluente, pelo grau de diluição dos monômeros e pelo teor de agente de reticulação utilizado em sua síntese^[115]. O tamanho dos poros do material de inchamento determina a faixa de tamanho molecular na qual ocorre a separação de moléculas [108]

Na SEC, as massas molares médias obtidas são valores relativos e não absolutos, isto é, os valores de massa molar obtidos para uma dada distribuição são calculados a partir de uma curva de calibração, obtida para amostras padrão. A curva de calibração obtida só é válida para amostras que possuem a mesma relação entre massa molar e volume

hidrodinâmico que aquela apresentada pelos padrões empregados. O volume hidrodinâmico indica quão grande é o novelo em solução, não informando sobre a distribuição de massa no interior da solução. Portanto, para uma dada amostra, quanto maior for sua massa molar, maior será seu volume hidrodinâmico ^[116].

Os fatores que afetam a relação entre massa molar e volume hidrodinâmico são:

- a configuração da cadeia polimérica;
- a conformação da cadeia polimérica;
- a interação entre o polímero e o solvente;
- temperatura ^[116].

c) Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho possibilita identificar grupos funcionais presentes em uma amostra, pois tais grupos apresentam vibrações moleculares características na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Além disso, esta técnica é bastante utilizada em estudos de modificações poliméricas a nível molecular e, neste trabalho, foi utilizada para verificar as possíveis interações existentes, bem como mudanças a nível molecular que podem ter ocorrido durante os processos de formação destes materiais ^[117].

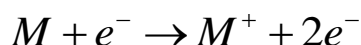
A condição para que ocorra absorção da radiação infravermelha é que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula, como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional (o momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre dois centros de carga). Somente nessas circunstâncias o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com a molécula, originando os espectros. De outra forma, pode-se dizer que o espectro de absorção no infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem um componente com frequência correspondente a

uma transição entre dois níveis vibracionais. A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia coerente com a região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho (100 a 10.000 cm^{-1}). Porém, a região mais utilizada pelos químicos vai de 500 cm^{-1} a 4.000 cm^{-1} .

O espectro infravermelho de um composto químico é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características e, por conta disto, a espectroscopia na região do infravermelho tem extensa aplicação na identificação de compostos ^[118].

d) Espectrometria de Massa (MS)

A espectrometria de massa (MS) é uma importante ferramenta de análise orgânica, cujo propósito central é converter uma substância em sub-produtos (fragmentos moleculares) mensuráveis que são indicativos da estrutura da molécula original. Conforme mostra a figura 18, quatro etapas básicas estão envolvidas nesta técnica. Na primeira etapa, ocorre a ionização da amostra, através da remoção de um elétron da camada de valência, formando uma espécie altamente energética que se degrada a tal ponto que os produtos formados são cátions, ânions, radicais e pequenas moléculas neutras. A substância a ser analisada é introduzida na câmara de ionização do Espectrômetro de Massa, onde é vaporizada e as moléculas, no estado gasoso e sob baixa pressão, são bombardeadas com um feixe de elétrons de alta energia (70 eV, ou aproximadamente 1600 kcal/mol). No primeiro momento, ocorre a remoção de um elétron da camada de valência, produzindo um íon molecular carregado positivamente. Este íon molecular, contendo um número ímpar de elétrons, é, na verdade, um cátion radical.



Os íons moleculares cátion radical (M^+), formados inicialmente, contêm um excesso de energia que não é igual para todos os íons. Este excesso de energia é suficiente para produzir a quebra de ligações (a energia das ligações covalentes está na faixa de 50 a 100 kcal/mol), resultando na segunda etapa da técnica, ou seja, na fragmentação do íon molecular em partículas menores, originando vários novos cátions, ânions, radicais livres e pequenas moléculas neutras, todos no estado gasoso. Em uma terceira etapa, os íons positivos são separados da mistura resultante com base nas suas razões massa/carga (m/z) e na quarta e última etapa, as suas abundâncias relativas são registradas num gráfico de intensidade vs m/z , que é o que chamamos de espectro de massa ^[119].

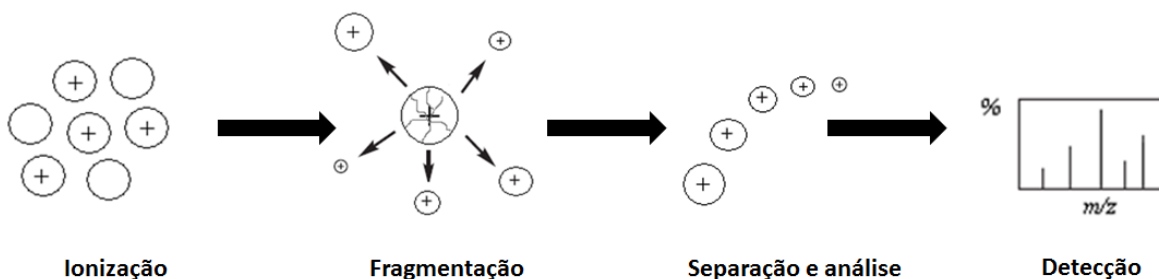


Figura 18: Ilustração das quatro etapas básicas na análise de Espectrometria de Massa.

e) Fluorescência

Esta técnica descreve o processo de fotoluminescência que ocorre com átomos e moléculas que são excitados ao absorverem radiação eletromagnética. Ao retornarem ao estado fundamental, eles liberam energia através da emissão de radiação. A fluorescência tem sido muito utilizada para estudar a interação entre polímeros, polieletrólitos e seus derivados hidrofobicamente modificados. Para avaliar tais interações, é necessário a presença

de uma sonda fluorescente na solução, ou seja, moléculas e/ou íons que, sob apropriada excitação eletromagnética, emitem luz. Na prática, as características da banda de emissão da sonda são exploradas para fins de monitoramento do microambiente de sistemas moleculares organizados e estão atreladas a fatores como polaridade do meio. O pireno é a sonda fluorescente mais utilizada para este fim. Dentre as propriedades que tornam o pireno uma sonda atraente está a alta sensibilidade à polaridade dos microambientes ^[120]. A particularidade é que o espectro de emissão exibe bandas de vibração finas, cujas intensidades relativas são sensíveis à polaridade do meio. Enumerando as bandas de vibração de 1 a 5, que são observadas na temperatura ambiente (Figura 19), a banda I₃, em 384 nm, mostra pouca sensibilidade aos solventes, enquanto que a banda I₁, em 372,8 nm, muda a intensidade em função do solvente, aumentando em solventes polares.

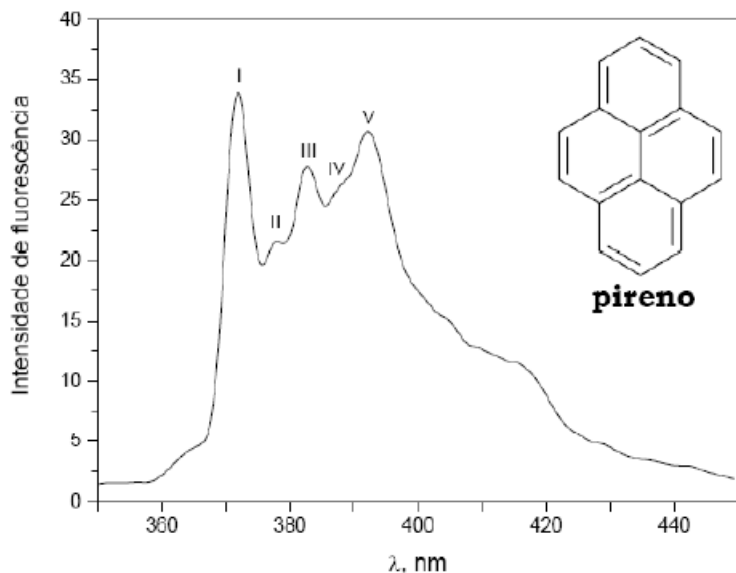


Figura 19: Espectros de emissão de fluorescência do monômero de pireno em etanol.

A medida da polaridade relativa é expressa em termos da relação I_1/I_3 e é utilizada como critério para avaliar a micropolaridade do meio e de microambientes de agregados

micelares. A cmc e a concentração de agregação crítica (cac) podem ser obtidas pela mudança da razão I_1/I_3 em função da concentração de polímero ou surfactante. Assim, no início da formação da micela, a razão I_1/I_3 diminui acentuadamente, o que reflete na solubilização do pireno em um ambiente hidrofóbico. A sensibilidade do pireno com relação a polaridade do meio também possibilita utilizar esta técnica como uma forma de caracterizar as modificações hidrofóbicas realizadas nos polímeros ^[121].

f) Espalhamento de luz estático (SLS) e dinâmico (DLS)

A técnica de espalhamento de luz foi uma das bases para o desenvolvimento deste trabalho. Portanto, é necessário esclarecer alguns aspectos importantes a respeito da teoria que norteia as informações que foram obtidas nos experimentos.

O espalhamento de luz designa um conjunto de técnicas, nas quais o evento básico é a interação da radiação eletromagnética com a matéria. É um dos métodos mais utilizados na caracterização de polímeros, pois fornece informações a respeito da massa molar ponderal média (M_w), da magnitude das interações polímero-solvente, do tamanho médio das partículas, raio de giração (R_g), raio hidrodinâmico (R_H), etc. ^[122].

A figura 20 é uma representação esquemática do experimento de espalhamento de luz, onde a amostra está representada por micelas poliméricas.

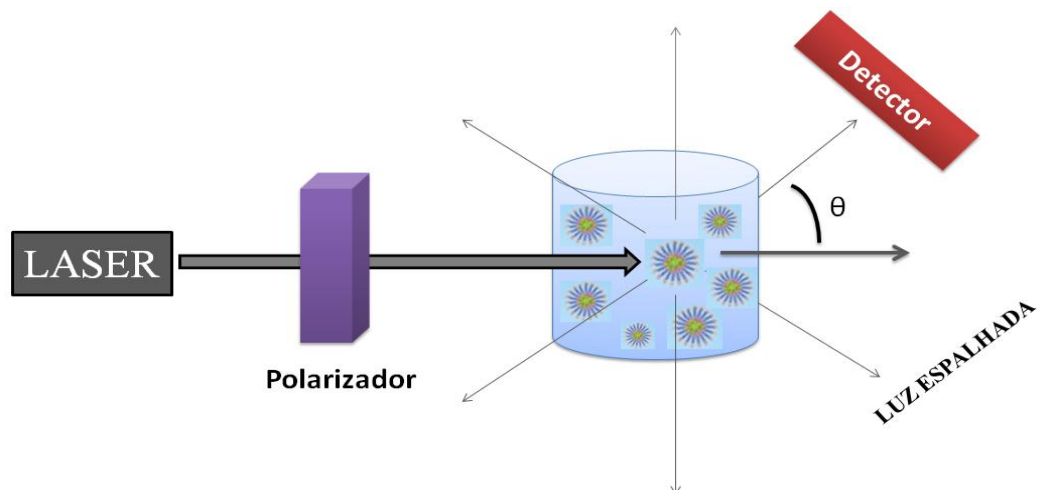


Figura 20: Geometria do experimento no equipamento de Espalhamento de Luz.

Quando um feixe de luz incide sobre uma amostra, uma solução ou uma suspensão aquosa observa-se o espalhamento de fótons deste feixe para direções (ângulos θ) diferentes da direção do feixe incidente ($\theta = 0$). A intensidade de luz espalhada I tem uma dependência angular (q) e é uma função do número de espécies espalhadoras presentes na amostra, da morfologia destas espécies, da concentração e da natureza química das mesmas, além da dependência com a viscosidade, índice de refração e polaridade do solvente. A variável q (Equação 10) é o vetor de onda que expressa a dependência angular como:

$$\vec{q} = q = \frac{4\pi n_o \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda} \quad \text{Equação 10}$$

Onde n_o é o índice de refração do meio solvente e λ é o comprimento de onda do laser.

Quanto menor o valor de q , menor é a magnitude da estrutura observada ^[122].

No SLS mede-se apenas a dependência angular da intensidade de espalhamento de luz, $I(q)$, sem levar em conta as flutuações da intensidade. Na prática, conta-se o número de fótons que chega a um detector posicionado em cada ângulo θ , em um determinado intervalo de tempo, e obtém-se, então, $I(q)$ para a amostra.

A curva $I(q)$ pode fornecer diversas informações sobre o sistema, de acordo com o formalismo teórico ou aproximação utilizada para interpretação desta. Neste trabalho as curvas foram interpretadas com a aproximação de Guinier, onde a intensidade da curva é expressa em função da equação 11.

$$\ln I = \ln I_o - q^2 \left(\frac{Rg^2}{3} \right) \quad \text{Equação 11}$$

De acordo com a aproximação de Guinier, é possível se obter o raio de giração (Rg) a partir do coeficiente angular da seção linear das curvas no limite $q \rightarrow 0$ ^[123].

Já no DLS, a distribuição de tamanho das partículas é uma característica físico-química muito importante das suspensões coloidais ^[124].

O DLS é umas das técnicas mais utilizadas para medir o tamanho e a polidispersão de nanopartículas, pois analisa o movimento difusivo (Browniano) destas nanoestruturas em suspensão. Além dela, há também os diferentes tipos de microscopias, como a de varredura (SEM), a de transmissão (TEM) e a de força atômica (AFM), que permitem a análise morfológica e a determinação do tamanho através da observação das partículas. Porém, suas desvantagens em relação à DLS é a necessidade de contagem de um número grande de partículas, a fim de se obter uma estatística confiável, assim como a possibilidade de haver modificações nas partículas durante o processo de secagem e produção de contraste.

As vantagens da DLS são o curto tempo para realização das análises e o custo relativamente baixo dos equipamentos ^[124,125].

Através do DLS, podemos obter o coeficiente de difusão de macromoléculas em solução, a partir da análise da distribuição de frequência das flutuações na intensidade de luz espalhada a um ângulo fixo. Estas flutuações originam-se das variações no índice de refração dentro do volume de espalhamento, devido ao movimento browniano das partículas. Sendo assim, as flutuações locais dentro do volume de espalhamento estão relacionadas com o coeficiente de difusão hidrodinâmico aparente e o vetor de onda do espalhamento, segundo a equação 12.

$$D_o = \frac{\Gamma}{q^2} \quad \text{Equação 12}$$

Onde Γ é a constante de correlação ou de relaxação, D é o coeficiente de difusão hidrodinâmico aparente e q é o vetor de onda do espalhamento.

A partir de um valor de D , é possível determinar o raio hidrodinâmico (R_H) da partícula espalhadora, através da equação de Stokes-Einstein.

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D_o} \quad \text{Equação 13}$$

Onde k é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), T é a temperatura e η é a viscosidade do solvente.

É interessante descrevermos o significado físico do valor de R_H . Este corresponde a um valor hipotético do raio de uma esfera rígida, que difunde com a mesma velocidade que a partícula em estudo. Entretanto, muitas partículas não são esféricas e estão solvatadas. Portanto, o valor de R_H calculado reflete um tamanho aparente da partícula, levando em conta a sua hidratação ou solvatação. Por esse motivo, e como dito anteriormente, quando o tamanho de uma partícula é analisado por técnicas de microscopia (por exemplo, de transmissão - TEM e de força atômica - AFM), sua dimensão apresenta-se um pouco menor que quando analisada por DLS, devido ao fato de que por TEM e AFM a amostra sofre um processo de secagem antes de ser analisada.

A figura 21 ilustra as diferenças entre R_g e R_H para um novolo polimérico em solução. A linha pontilhada representa a dimensão R_H e a linha cheia a dimensão R_g .

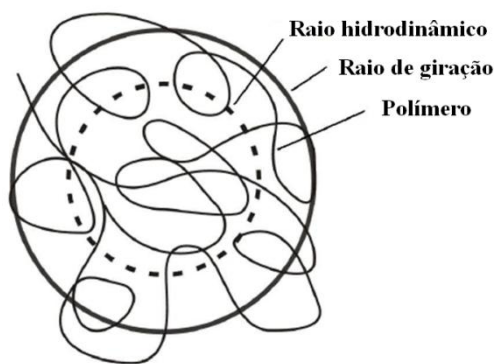


Figura 21: Representação esquemática mostrando a diferença entre o raio de giração (R_g) e o raio hidrodinâmico (R_H) para um novolo polimérico aleatório em solução^[124].

Ao relacionarmos o R_g da equação de Guinier com o R_H da equação de Stokes-Einstein, obtemos a razão topológica (ρ), que é representada pela equação 14.

$$\rho = \frac{R_g}{R_H} \quad \text{Equação 14}$$

Portanto, as medidas de R_g e R_H fornecem informações a respeito do grau de anisotropia, ou seja, da forma geométrica das partículas em função da concentração ^[126].

A tabela 1 mostra os valores de ρ calculados teoricamente para as topologias mais frequentemente encontradas.

Tabela 1: Valores de ρ para partículas com topologias típicas ^[126].

| Topologia | Razão topológica (ρ): (R_g/R_H) |
|-------------------------|--|
| Microgel | 0,3 – 0,5 |
| Esfera rígida homogênea | ~ 0,8 |
| Esfera oca | 1,0 |
| Novelo aleatório | ~1,7 |
| Bastão rígido | Maior que 2 |

g) Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Por volta dos anos 20, a microscopia eletrônica teve seu início com a ocorrência de dois eventos: um foi a descoberta de que um feixe de elétrons, assim como a luz visível, comporta-se como onda e como partícula. De acordo com a equação de De Broglie (1924), o comprimento de onda de uma partícula é inversamente proporcional ao seu momento e a sua energia:

$$\lambda = \frac{h}{m.v} \quad \rightarrow \quad \lambda = \frac{1,22}{E^{1/2}} \quad \text{Equação 15}$$

Onde h é a constante de Plank, m e v correspondem à massa e à velocidade da partícula, respectivamente, e E é a energia do elétron.

Outro evento foi a demonstração realizada por Bush, em 1926, onde lentes magnéticas podem ser apropriadamente projetadas para direcionar elétrons e, assim, serem usadas na construção de um microscópio. Busk e Ruska iniciaram seus estudos com lentes eletromagnéticas em 1929-1930, sendo o termo “Microscópio Eletrônico” primeiramente proposto em 1932, em uma publicação de Ruska^[127].

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) emprega lentes magnéticas ou elétricas de foco ajustável. Esta propriedade, aliada ao comprimento de onda extremamente pequeno do feixe de elétrons ($\lambda \sim 10$ pm), é o que confere à TEM seu alto poder de resolução e magnitude. Há equipamentos capazes de operar em magnitudes de até um milhão de vezes, ou seja, uma partícula de tamanho real de 10 nm aparecerá como uma imagem de 1 cm na tela^[128].

Um conjunto de lentes magnéticas condensa o feixe de elétrons livres emitidos no vácuo por um filamento pontual. Ao incidir na amostra, outra lente eletrônica, a objetiva, foca o feixe de elétrons transmitido em uma imagem intermediária, a qual é aumentada pelas lentes objetivas para formar, finalmente, a imagem na tela fluorescente (ecram). A voltagem de aceleração varia de 30 a 400 kV, dependendo do equipamento e do tipo de amostra^[129].

A alta resolução conferida pela microscopia eletrônica permite a análise de defeitos e fases internas dos materiais, bem como discordâncias, defeitos de empilhamento e pequenas partículas de segunda fase, pois os elétrons que são gerados reagem diretamente com o núcleo dos átomos e não com uma grande área, como ocorre no caso da luz incidente em um microscópio ótico ^[130]. A possibilidade de grandes ampliações faz da TEM uma ferramenta valiosa em pesquisas médicas, químicas, biológicas, etc.

h) Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica que fornece informações importantes sobre a morfologia da superfície de uma molécula. Permite obter imagens reais, em três dimensões, da topografia da superfície, com uma resolução espacial que se aproxima das dimensões atômicas ^[131].

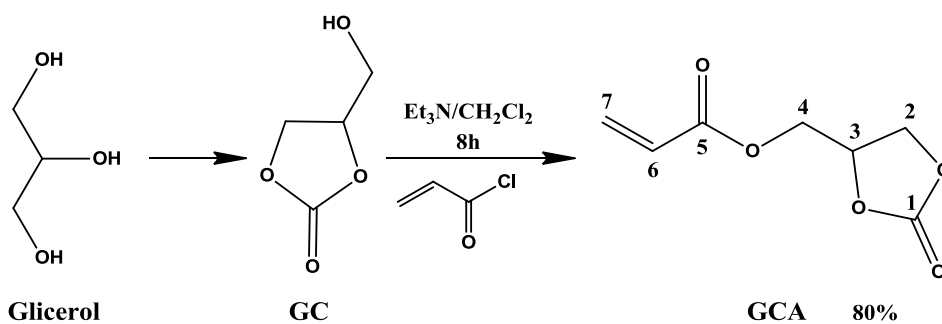
Nesta técnica, é efetuada uma varredura da superfície da amostra, utilizando uma sonda sensível à força (sensor de força), que consiste numa ponta de dimensões atômicas, integrada num braço em movimento. À medida que a sonda se aproxima da superfície, seus átomos interagem com os átomos e moléculas da superfície do material, causando a deflexão do braço do microscópio. Esta deflexão é medida através da mudança de direção (angular) de um feixe de laser emitido por um diodo de estado sólido e refletido pelo braço do microscópio, sendo este feixe de laser captado por um fotodetector de fendas ^[132]. A sonda de AFM segue os contornos da superfície e, durante seu deslocamento, o computador registra, em cada posição da superfície, a força de interação entre a ponta do microscópio e a amostra, traçando a topografia das amostras ^[133].

3) PARTE EXPERIMENTAL

3.1) Material

Ácido oléico, ácido láurico, cloreto de acrilóila, trietilamina e 2-mercaptoetanol (ME) foram obtidos da Aldrich[®] e usados como recebidos. A acetonitrila foi destilada de acordo com procedimentos padrões. Os solventes deuterados foram obtidos da companhia SDS[®] e foram usados sem prévia purificação. O carbonato de glicerol (GC) foi gentilmente doado pela empresa ONIDOL. A 2,2-Azobisisobutironitrila (AIBN) foi purificada duas vezes por recristalização em metanol e seca, sob vácuo. Os reagentes e solventes disponíveis comercialmente foram purificados e secos, quando necessário, por métodos padrões.

3.2) Síntese do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA)



Esquema 1

4-(Hidroximetil)-1,3-dioxolan-2-ona (carbonato de glicerol - GC) (85,44 g, 724 mmol) e trietilamina (78,30 g, 774 mmol) foram dissolvidos em 500 mL de diclorometano e a solução foi resfriada em nitrogênio líquido, por 15 minutos. Cloreto de acrilóila (66,84 g, 738 mmol) foi dissolvido em 200 mL de diclorometano e esta solução foi gotejada à solução

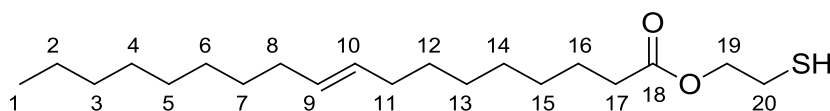
prévia sob um período de 2 horas. Após, a mistura final foi mantida em agitação por uma hora, a 0 °C e, então, aquecida sob agitação, por 8 horas, até atingir temperatura ambiente. O subproduto precipitado branco foi filtrado e a solução do produto limpo foi lavada com água (3 × 200 mL) e salmoura (2 × 100 mL) e seca sob Na₂SO₄ anidro, filtrado e evaporado sob pressão reduzida, para produzir, ao final, acrilato de carbonato de glicerol (GCA) como um óleo amarelado, com rendimento de 80% (99,62 g).

RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 4,25–4,41 (3H, H₂ e H₄), 4,51–4,56 (1H, H₂), 4,93 (1H, H₃), 5,86–5,89 (1H, H₇), 6,04–6,13 (1H, H₆), 6,34–6,42 (1H, H₇).

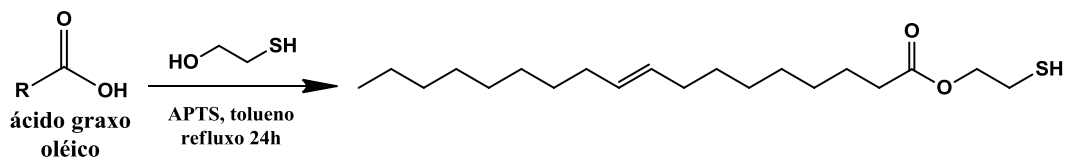
RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 63,2 (C₂), 66,1 (C₄), 74,0 (C₃), 127,2 (C₆), 132,3 (C₇), 154,7 (C₁), 165,3 (C₅).

FTIR (cm⁻¹): 1731 (C=O éster), 1785 (C=O carbonato), 2943 (C-H).

3.3) Síntese do agente telogênico A: (C₁₈OOC₂H₄SH)



a) A partir do ácido graxo oléico



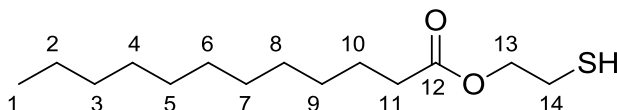
Esquema 2

Ácido oléico (2,685 g, 9,5 mmol), 2-mercaptoetanol (0,816 g, 10,45 mmol) e ácido *p*-toluenossulfônico (APTS) (0,164 g, 0,95 mmol) foram dissolvidos em 20 mL de tolueno. Um sifão (receptor de destilação modificado) Dean–Stark e um condensador refrigerado foram ajustados em um frasco e a solução foi refluxada, a 120°C, por 24 horas. O frasco foi resfriado até atingir temperatura ambiente e a solução foi transferida para um funil de separação de 100 mL. A solução orgânica foi lavada sucessivas vezes com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (3 × 25 mL) e salmoura (2 × 25 mL) e, após, seca sob Na₂SO₄ anidro. Após filtração, a solução orgânica foi concentrada, sob vácuo. O produto foi purificado em uma coluna cromatográfica de sílica gel 60 (mesh de 230 - 400) (CH₂Cl₂:*n*-hexano = 60:40), obtendo-se, ao final, um produto incolor com um rendimento de 71%.

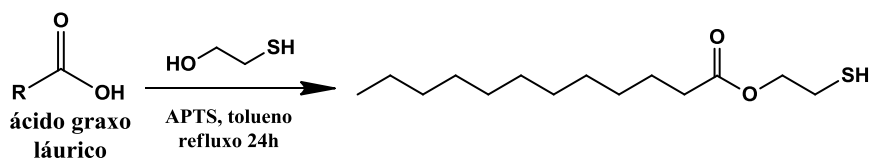
RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 0,78–0,84 (3H, H₁), 1,1–1,6 (26H, H₂₋₇, H₁₂₋₁₆), 1,8–2,0 (4H, H₈, H₁₁), 2,20–2,29 (2H, H₁₇), 2,62–2,73 (2H, H₂₀), 4,09–4,16 (2H, H₁₉), 5,21–5,41 (2H, H₉, H₁₀).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 12,3 (C₁), 20,8–30,3 (C₂₋₈, C₁₁₋₁₇), 27,3 (C₂₀), 63,7 (C₁₉), 128,3 (C₉/C₁₀), 128,6 (C₉/C₁₀), 171,6 (C₁₈).

3.4) Síntese do agente telogênico B (C₁₂OOC₂H₄SH)



a) A partir do ácido graxo láurico



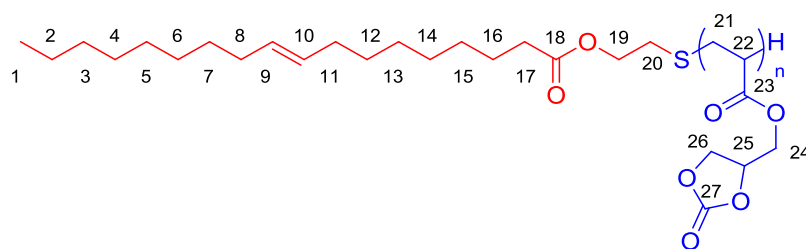
Esquema 3

Ácido láurico (10 g, 50 mmol), 2-mercaptoetanol (4,3 g, 55 mmol), ácido *p*-toluenossulfônico (APTS) (0,858 g, 5 mmol) foram dissolvidos em 100 mL de tolueno. Um sifão (receptor de destilação modificado) Dean–Stark e um condensador refrigerado foram ajustados em um frasco e a solução foi refluxada a 120 °C, por 24 horas. O frasco foi resfriado até temperatura ambiente e a solução foi transferida para um funil de separação de 250 mL. A solução orgânica foi lavada sucessivas vezes com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (3 × 100 mL) e salmoura (2 × 100 mL) e, após, seca sob Na₂SO₄ anidro. Após filtração, a solução orgânica foi concentrada, sob vácuo. O produto foi purificado em uma coluna cromatográfica de sílica gel 60 (mesh de 230 - 400) (CH₂Cl₂:*n*-hexano = 60:40), obtendo-se, ao final, um produto incolor com um rendimento de 64%.

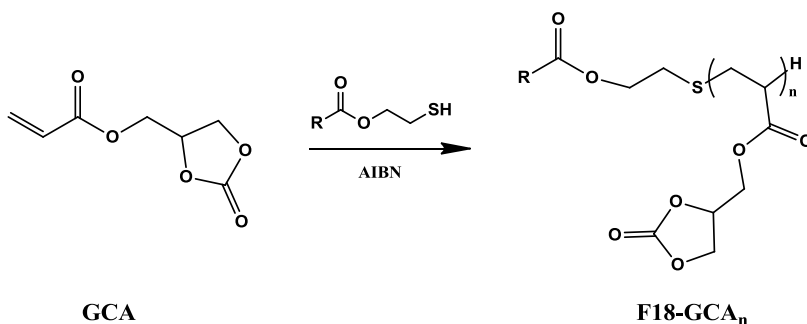
RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm): 0,89–0,94 (3H, H₁), 1,20–1,45 (16H, H₂₋₉), 1,62 – 1,69 (2H, H₁₀), 2,34–2,39 (2H, H₁₁), 2,75–2,82 (2H, H₁₄), 4,21–4,25 (2H, H₁₃).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 15,3 (C₁), 23,9–35,4 (C₂₋₁₁, C₁₄), 66,8 (C₁₃), 174,7 (C₁₂).

3.5) Reação de telomerização do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA) com o agente telogênico A ($C_{18}OOC_2H_4SH$): ($F_{18}-GCA_n$)



Esquema 4



A reação de telomerização do acrilato de carbonato de glicerol (GCA) foi realizada em acetonitrila, na presença do agente telogênico A ($C_{18}OOC_2H_4SH$), com diferentes razões molares, $R_0 = 0,1$ e $R_0 = 0,2$ ($R_0 = n_{\text{telogênio}}/n_{\text{monômero}}$). O acrilato de carbonato de glicerol (GCA) (1,5 g, 8,72 mmol) e o agente telogênico A, $C_{18}OOC_2H_4SH$, em duas diferentes concentrações, (0,3 g, 0,872 mmol) ou (0,6 g, 1,75 mmol) foram introduzidos em um balão de 100 mL, equipado com um condensador e um septo. A solução foi diluída para 20 mL com acetonitrila anidra e borbulhada com nitrogênio por 30 minutos antes de ser aquecida a 80 °C. Finalmente AIBN (0,007 g, 0,043 mmol) ($C_0 = n_{\text{iniciador}}/n_{\text{monômero}} = 0,5$) em 1 mL de acetonitrila anidra foi adicionado com uma seringa através do septo e, após 8 horas de reação, o polímero foi precipitado em etanol frio, para remoção do agente telogênico e monômero que não reagiram. Após, o polímero foi filtrado e, então, seco sob vácuo. Os

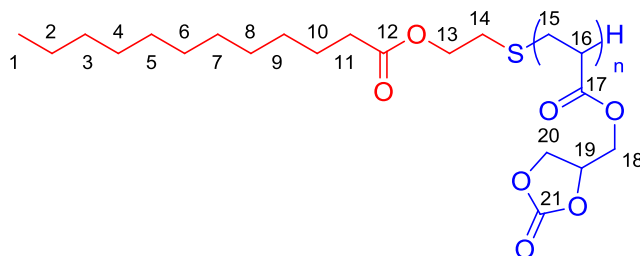
polímeros foram identificados por F18-GCA65 (C18, n = 65, ou seja, cadeia carbônica com 18 carbonos e uma parte hidrofílica n = 65) e F18-GCA27 (C18, n = 27, cadeia carbônica com 18 carbonos e uma parte hidrofílica n = 27) e tiveram um rendimento de 65-73%.

RMN de ^1H (DMSO, 300 MHz) δ (ppm): 0,56–2,28 (33H+3nH, H₁₋₈, H₁₁₋₁₇, H₂₁, H₂₂), 4,06 (3nH, H₂₄, H₂₆), 4,37 (1nH, H₂₆), 4,81 (1nH, H₂₅), 5,12 (2H, H₉₋₁₀).

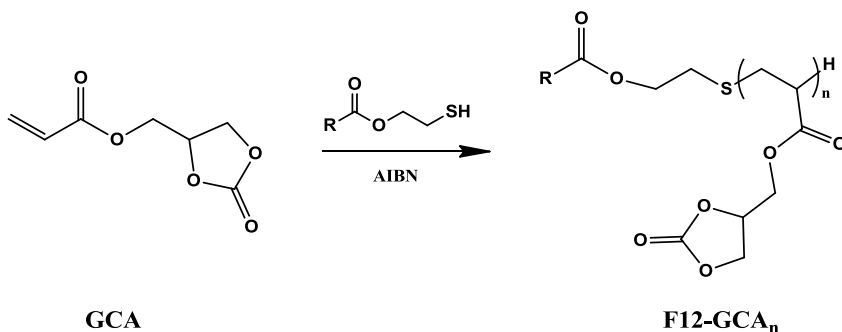
RMN de ^{13}C (DMSO, 75 MHz) δ (ppm): 13,8 (C₁), 22,1, 24,3 (C₂₋₁₈), 28,9 (C₂₁), 34,3 (C₂₂), 63,7 (C₂₆), 66 (C₂₄), 74,1 (C₂₅), 154,6 (C₂₇), 173,4 (C₂₃).

FTIR (cm⁻¹): 1731 (C=O éster), 1785 (C=O (carbonato)), 2943 (C-H).

3.6 Reação de telomerização do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA) com o agente telogênico B (C₁₂OOC₂H₄SH): (F12-GCA_n)



Esquema 5



A reação de telomerização do acrilato de carbonato de glicerol (GCA) foi realizada em acetonitrila, na presença do agente telogênico B (C₁₂OOC₂H₄SH), com razão molar R₀ =

0,2 ($R_0 = n_{\text{telogênico}}/n_{\text{monômero}}$). Acrilato de carbonato de glicerol (GCA) (3 g, 17,5 mmol) e o agente telogênico B ($C_{12}OOC_2H_4SH$) (0,91 g, 3,5 mmol) foram introduzidos em um frasco de 100 mL, equipado com um condensador e um septo. A solução foi diluída para 60 mL com acetonitrila anidra. A solução foi borbulhada com nitrogênio por 30 minutos antes de ser aquecida a 80°C. Finalmente, AIBN (0,014 g, 0,0875 mmol) ($C_0 = n_{\text{iniciador}}/n_{\text{monômero}} = 0,5$) em 1 mL de acetonitrila anidra foi adicionado com uma seringa, através do septo e, após 8 horas de reação, o polímero foi precipitado em etanol frio para remoção do monômero e do agente telogênico que não reagiram e, então, seco sob vácuo. O polímero foi identificado por F12-GCA24 (C_{12} , $n = 24$, ou seja, cadeia carbônica com 12 carbonos e uma parte hidrofílica $n = 24$) e teve um rendimento de 62%.

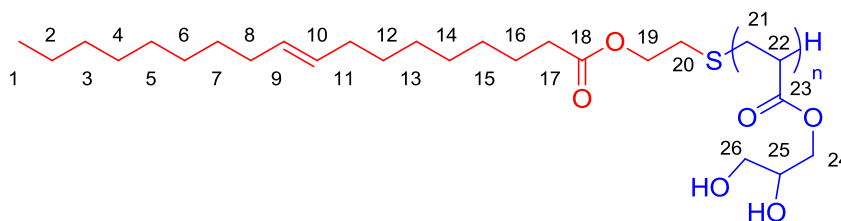
RMN de 1H (CD_3CN , 300 MHz) δ (ppm): 0,66 (3H, H_1), 0,92-1,16 (18H, H_{2-10}), 1,53-1,82 (2H+2nH, H_{11} , H_{15}), 2,07-2,37 (1nH, H_{16}), 2,51 (2H, H_{14}), 3,89-4,23 (2H+3nH, H_{13} , H_{18} , H_{20}), 4,36 (1nH, H_{20}), 4,77 (1nH, H_{19}).

RMN de ^{13}C (CD_3CN , 75 MHz) δ (ppm): 13,1 (C_1), 22,1- 33,3 (C_{2-11}), 34,1 (C_{15}), 40,8 (C_{16}), 63,4 (C_{20}), 65,9 (C_{18}), 74,0 (C_{19}), 154,7 (C_{21}), 173,7 (C_{17}).

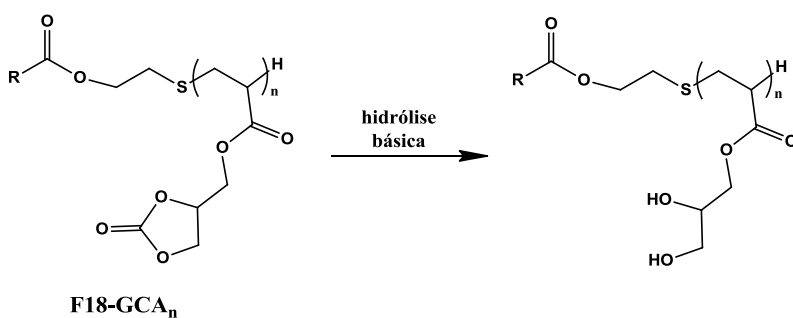
FTIR (cm^{-1}): 1731 (C=O éster), 1785 (C=O (carbonato)), 2943 (C-H).

3.7) Reação de hidrólise

a) Hidrólise básica dos polímeros F18-GCA65 e F18-GCA27



Esquema 6

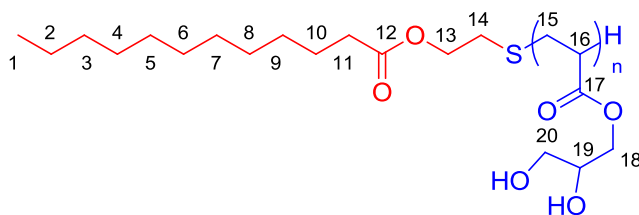


Para a reação de hidrólise, 0,68 gramas de ambos os polímeros, F18-GCA65 e F18-GCA27, foram dissolvidos em 10 mL de piridina e 10 mL de água e a mistura foi aquecida, em refluxo, por 8 horas. A piridina em excesso foi removida, sob pressão reduzida. Uma subsequente purificação foi realizada por diálise, durante 48 horas, para remoção de impurezas. Ao final, o polímero foi seco por liofilização para dar um rendimento de 75%.

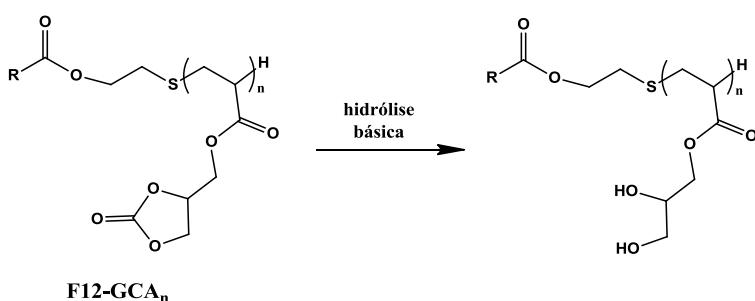
RMN de ^1H (DMSO, 300 MHz) δ (ppm): 0,9 (3H, H_1), 1,29 (28H, H_5 , H_{2-8} , H_{11-17}), 1,50 – 2,13 (2nH, H_{21}), 2,44 (1nH, H_{22}), 3,49-3,82 (2nH, H_{26}), 3,96 (1nH, H_{25}), 4,16 (2nH, H_3).

FTIR (cm^{-1}): 1731 (C=O éster), 2943 (C-H), 3319 (OH).

b) Hidrólise básica do polímero F12-GCA24



Esquema 7



Uma amostra contendo 0,68 gramas do polímero F12-GCA24 foi dissolvida em 10 mL de piridina e 10 mL de água e, então, a mistura foi aquecida, em refluxo, por 8 horas. O excesso de piridina foi removido sob pressão reduzida. Uma subsequente purificação foi realizada por diálise, durante 48 horas, para remoção de impurezas. Ao final, o polímero foi seco por liofilização para dar um rendimento de 68%.

RMN de ^1H (DMSO, 300 MHz) δ (ppm) : 0,88 (3H, H_1), 1,27 (20H+2nH, H_{2-11} , H_{15}), 1,49 (1nH, H_{16}), 2,12-2,28 (2H, H_{14}), 3,22-3,54 (5nH, H_{18-20}), 3,91 (2H, H_{13}), 4,04 (2nOH).

FTIR (cm^{-1}):1731 (C=O éster), 2943 (C-H), 3319 (OH).

3.8) Cinética de Telomerização

Os parâmetros cinéticos envolvidos na reação de telomerização foram estudados através da relação concentração de telogênio e monômero *versus* tempo de reação.

O consumo do agente telogênico foi realizado pela conversão do grupo tiol, utilizando uma titulação dos grupos SH com uma solução de iodo 0,002 mol.L⁻¹, preparada a partir de uma solução de iodo padrão (0,105 mol.L⁻¹), de acordo com a reação representada a seguir.



A concentração do grupo tiol ([RSH]) *versus* tempo é dada pela seguinte equação:

$$[RSH]_t = \frac{Veq_{I_2} \cdot [I_2]}{V_{RSH}} \quad \text{Equação 16}$$

onde Veq_{I_2} é o volume da solução de iodo adicionado à solução de tiol, em minutos, V_{RSH} é o volume de tiol retirado da reação. $[I_2]$ é a concentração de iodo usado na titulação e $[RSH]_t$ é a concentração da solução de tiol, em minutos.

Já o consumo do monômero GCA foi calculado por RMN de ¹H, com acetonitrila D₃ (CD₃CN) como solvente deuterado. A amostra foi analisada comparando a razão integral do monômero GCA com o polímero:

$$\ln \frac{[ME]_0}{[ME]_t} = C_t \cdot \ln \frac{[M]_0}{[M]_t} \quad \text{Equação 17}$$

3.9) Instrumentação

3.9.1) Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

No presente trabalho, a espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C foi registrada usando um espectrômetro Bruker AC 200, com clorofórmio (CDCl_3), acetonitrila (CD_3CN) e dimetilsulfóxido (DMSO- d_6) como solventes deuterados.

3.9.2) Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC)

As análises de SEC foram realizadas em um equipamento Spectra-Physics, equipado com um detector de índice de refração Shodex RI. Foram utilizadas duas colunas de PL-gel, a 50°C , com uma taxa de fluxo de $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, em dimetilacetamida (DMAc) (0,1% LiCl) como eluente, calibradas com padrões de polimetilmetacrilato (PMMA).

3.9.3) Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Neste trabalho, os espectros de infravermelho foram registrados em um espectrômetro Perkin-Elmer 100, equipado com um cristal para realizar as análises de reflectância total atenuada das amostras.

3.9.4) Espectrometria de Massa (MS)

Esta técnica foi conduzida em um espectrômetro de massa Bruker Ultra-Flex MALDI-TOF, equipado com um laser de nitrogênio (LSI, 337nm, 10ns de comprimento de pulso) e um detector. Uma mistura de peptídeos foi utilizada para a calibração externa. Os íons foram acelerados por um potencial de 25 kV e refletidos com um potencial de 26,3 kV. Todas as medidas foram registradas no modo de reflexão, usando ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) como matriz, com NaI. Cada espectro acumulou 300 passagens.

3.10) Preparação das micelas poliméricas

Após todas as etapas de síntese, purificação e caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C , SEC, FTIR e MS, os três polímeros, F18-GCA65, F18-GCA27 e F12-GCA24, foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração inicial de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Testes de solubilidade foram realizados com água, DMF, DMAc e THF, mas o único solvente seletivo para os três polímeros foi o DMSO.

Cada solução polimérica foi sonicada por 1 hora, agitada por 24 horas à temperatura ambiente e, então, dialisada com água Milli-Q por um período de 24 horas, usando uma membrana de diálise MWCO 1000D, Spectra/Por[®], para a eliminação do solvente orgânico. A água Milli-Q foi substituída a cada 3 horas e, ao final, cada solução foi purificada, passando-as por um filtro Millipore de $0.45 \mu\text{m}$, antes da realização das análises físico-químicas.

A concentração final foi determinada com base no volume final da solução e na concentração inicial do polímero, assumindo que não houve perdas durante a diálise.

3.11) Caracterização físico-química das micelas poliméricas

3.11.1) Fluorescência

A espectrofotometria de fluorescência foi registrada com um Espectrômetro Luminescente LS55, da Perkin-Elmer®. Pireno, uma molécula altamente hidrofóbica, foi usado como prova fluorescente para medir a cmc dos polímeros, causando mudanças nas suas propriedades fotofísicas. Alíquotas de 6µL de uma solução de pireno 6.10^{-6} mol.L⁻¹ em acetona foram adicionadas a cubetas de plástico e deixadas para evaporar. Após, 3 mL das soluções poliméricas, em 10 diferentes concentrações (0,5 a 0,000488 mg.mL⁻¹), foram adicionados às cubetas e as soluções foram mantidas à temperatura ambiente, por 24 horas, para alcançar uma solubilização equilibrada do pireno na fase aquosa. A excitação foi realizada a 340 nm e o espectro de emissão foi registrado na escala de 350 a 500 nm. As fendas de excitação e emissão do monocromador foram ajustadas para 5 nm e 10 nm, respectivamente. Sabendo-se que a razão intensidade-altura do primeiro pico (I_1 em 372 nm) ao terceiro pico (I_3 em 384 nm) no espectro de emissão do pireno pode ser usada como um parâmetro sensível para representar a polaridade do microambiente, as razões I_1/I_3 foram plotadas em função de cada concentração do polímero ^[121]. Os valores de cmc foram determinados a partir da interseção da tangente da curva no ponto de inflexão com a tangente horizontal.

3.11.2) Espalhamento de Luz

A dependência angular do espalhamento de luz estático $I = I(q)$ das amostras foi investigada pelo uso de um Goniômetro ALV-7002 multicorrelador, com faixa de detecção de 32° a 150°, operando com laser (638,2nm) de Ne/Ar de 22 mV, a 25°C. As amostras

foram colocadas em uma cubeta cilíndrica de 5 mL e as medidas foram feitas entre 40° a 140°, em intervalos de 10°, durante 300s. Todas as medidas foram feitas com temperatura controlada de 25°C. Esta técnica foi realizada no *Centre de Recherche sur les Macromolécules Vegetales* (CERMAV), em Grenoble, na França, um centro de pesquisa referência no estudo de macromoléculas e que possui grandes colaborações com alguns laboratórios do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

As medidas de DLS foram realizadas por um equipamento Malvern Zetasizer 3000HSA, equipado com um laser (633nm) de He/Ne de 10mW, operando a 25°C, com um ângulo de detecção de 90°. As soluções das amostras foram filtradas com filtro Millipore de 0,45 µm e seladas antes de serem analisadas. Esta operação removeu qualquer partícula de poeira presente na solução. Além disso, a técnica de DLS também foi utilizada para determinar a cmc das amostras.

3.11.3) Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Neste trabalho, as análises de TEM foram realizadas utilizando um equipamento PHILIPS CM 200, operando a 18 kV, para observar a morfologia das micelas poliméricas. As amostras foram colocadas em uma tela de cobre, revestidas com carbono, secas à temperatura ambiente e, então, examinadas por coloração negativa com uma solução de ácido fosfotúngstico.

3.11.4) Microscopia de Força Atômica (AFM)

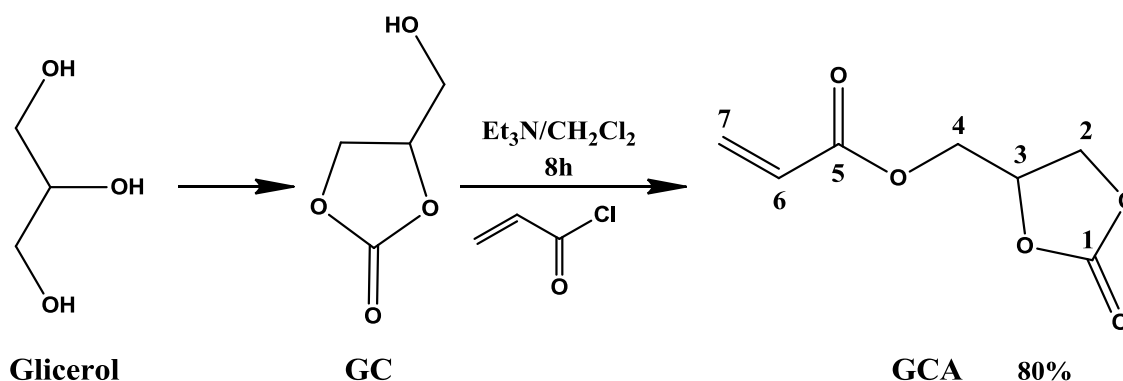
Para obter as imagens de AFM, as soluções poliméricas foram diluídas 10 vezes e uma gota foi colocada na superfície de uma folha de mica e seca à temperatura ambiente. As

observações foram realizadas no modo intermitente (Tapping Mode), em um microscópio Nanoscope V-Nanoman 3100, com nanosensores de silício do tipo PPP-FM-50, com uma resistividade de 0,01 - 0,02 Ωcm e uma frequência de ressonância de 54 kHz.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

O controle do tamanho da cadeia na polimerização do acrilato foi realizado usando a reação de telomerização, a qual, segundo Robin et al.^[134], provou ser uma forma eficiente e conveniente de se obter diversos polímeros funcionais.

Para a realização deste trabalho, foi utilizado o carbonato de glicerol (GC), precursor do monômero de interesse, o acrilato de carbonato de glicerol (GCA). O carbonato de glicerol (GC) é um composto disponível comercialmente e seu tratamento, com trietilamina, em diclorometano, à temperatura ambiente, por 8 horas, conforme procedimento descrito na seção 3.2 do capítulo 3 e mostrado no Esquema 1 da página 60 e repetido abaixo, proporcionou um rendimento de 80% do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA).



Após a obtenção do monômero GCA, realizou-se a síntese dos agentes telogênicos A (C₁₈OOC₂H₄SH) e B (C₁₂OOC₂H₄SH), na presença do ME e de AIBN^[135,136], conforme procedimento descrito na seção 3.3 e 3.4 do capítulo 3. O ME é um agente de transferência

altamente reativo e que permite, durante o processo de síntese de novas arquiteturas, um bom controle do grau de polimerização^[135,136]. A telomerização do GCA foi realizada com 2 diferentes razões molares R_0 ($R_0 = n_{\text{telogênio}}/n_{\text{monômero}}$), sendo 0,1 e 0,2.

Quando realizada a síntese do monômero GCA sem a presença de AIBN, pôde-se observar que o ME poderia não reagir com o anel ciclocarbonato do monômero GCA. Nenhum traço do subproduto foi detectado por RMN de ^{13}C . O sinal característico do $\text{C}=\text{O}_{\text{ciclocarbonato}}$, em δ 154,7 ppm, permaneceu intacto (Figuras 31 e 33). Além disso, nenhum decréscimo da banda característica de $\text{C}=\text{O}_{\text{ciclocarbonato}}$, em 1785 cm^{-1} , foi observado por espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Figura 36).

O consumo (α) do monômero GCA foi calculado por RMN de ^1H , com acetonitrila (CD_3CN) como solvente deuterado, com gradual desaparecimento dos prótons etilênicos (Figura 22). O valor de α foi deduzido da integração dos sinais característicos do H_6 , atribuído ao CH na posição α da dupla ligação, localizada em δ 5,95 - 5,98 ppm e ao H_3 , correspondente ao CH na posição α ciclocarbonato, em δ 5,02 ppm, usando a seguinte equação:

$$1 - \alpha = \frac{[\text{GCA}]_t}{[\text{GCA}]_o} = \frac{\int H_6(5,95 - 5,98\text{ ppm})}{\int H_3(5,02\text{ ppm})} \quad \text{Equação 18}$$

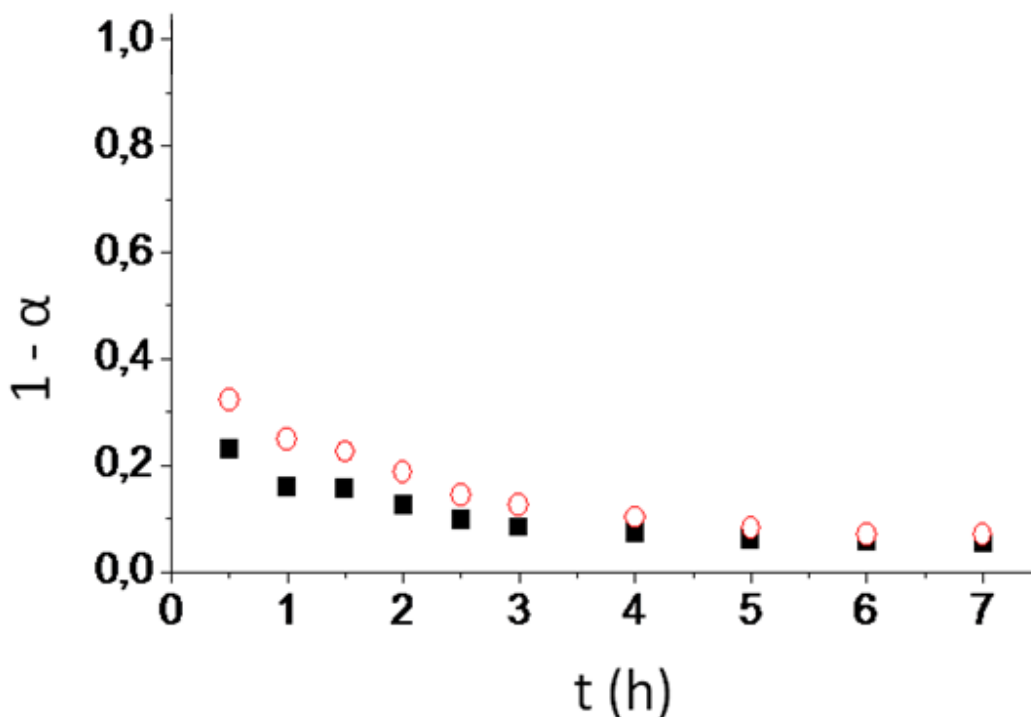


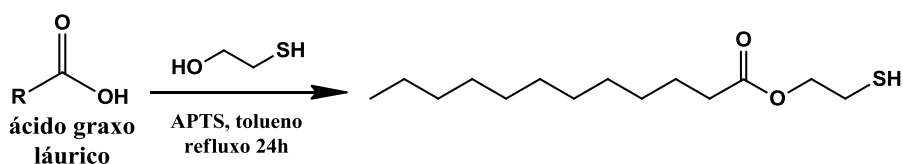
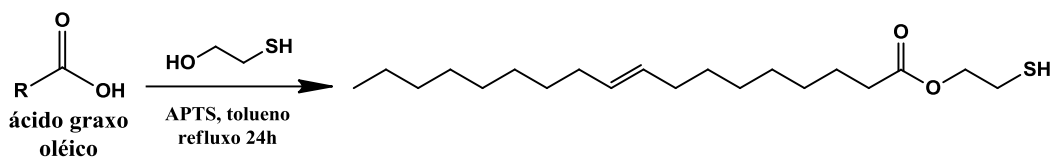
Figura 22: Consumo (α) do agente de transferência ME e do monômero GCA na razão $R_0 = 0,1$ versus tempo. (■ monômero, ○ mercaptoetanol).

Já o consumo do ME, conforme procedimento experimental descrito na seção 3.8 do capítulo 3, foi seguido por titulação do iodo, onde alíquotas foram retiradas ao longo da reação. O tempo de reação, tanto do monômero GCA quanto do ME, foi de aproximadamente 5-6 horas. Analisando a Figura 22, podemos perceber que a concentração do monômero GCA diminuiu mais rapidamente que a do ME.

4.1) Síntese dos agentes telogênicos A ($C_{18}OOC_2H_4SH$) e B ($C_{12}COOC_2H_4SH$)

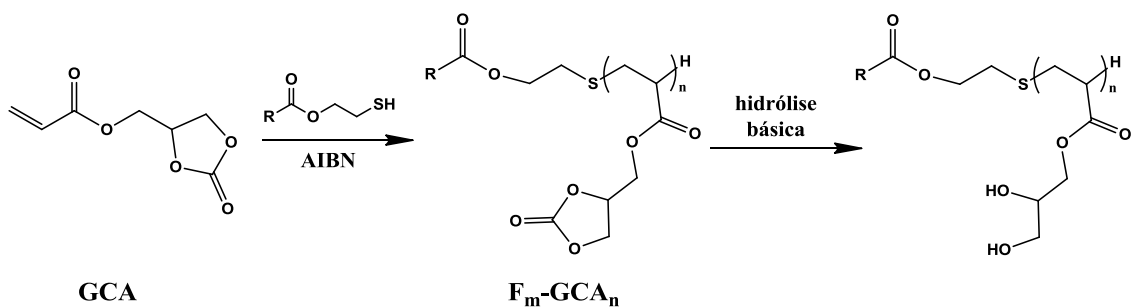
Os agentes telogênicos A ($C_{18}OOC_2H_4SH$) e B ($C_{12}COOC_2H_4SH$) foram preparados por esterificação dos ácidos graxos oléico e láurico, respectivamente, com ME, um dos tióis

mais utilizados para este fim, de acordo com os esquemas 2 e 3 das páginas 62 e 63, respectivamente, e mostrados novamente abaixo.



4.2) Reação de telomerização

A reação por radicais livres do monômero GCA, derivado do glicerol, ocorreu em acetonitrila, na presença de AIBN e dos agentes telogênicos A e B, a 80 °C, por 8 horas, conforme Esquemas 4 e 5 das páginas 64 e 65, respectivamente e demonstrado novamente abaixo, de acordo com o mecanismo descrito por Boutevin et al.^(135,136). O procedimento experimental está explicado nas seções 3.5, 3.6 e 3.7 do capítulo 3.



Para fornecer evidências da estrutura dos polímeros, medidas de espectrometria de massa Maldi-TOF foram realizadas. Esta é uma poderosa técnica na análise de polímeros, pois fornece informações sobre os grupos terminais, unidades base, massas molares e distribuições de massas molares. O espectro foi registrado no modo de reflexão, usando cátions Na^+ em uma matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico. A Figura 23 mostra o espectro onde apenas uma série de picos é demonstrada, com intervalos regulares de 172 para a massa molar, correspondente a unidade monomérica do acrilato de carbonato de glicerol (GCA). A distribuição de massa molar revelou uma forma Gaussiana e a presença de grupos terminais H e $\text{C}_{18}\text{-OOCH}_2\text{CH}_2\text{-S}$ confirmou a eficiência do processo de telomerização.

O estudo de espectrometria de massa Maldi-TOF demonstrou uma boa correlação entre os valores de massa molar média (M_n) teórico e experimental (vide tabela da Figura 23) e confirmou a compatibilidade do anel ciclocarbonato com o radical livre, na presença do AIBN. Esta característica pôde também ser confirmada por FTIR, a qual mostrou o caráter insensível do anel ciclocarbonato durante o processo de telomerização por radicais livres, uma vez que nenhuma diminuição significativa da banda característica C=O , em 1785 cm^{-1} , foi observada.

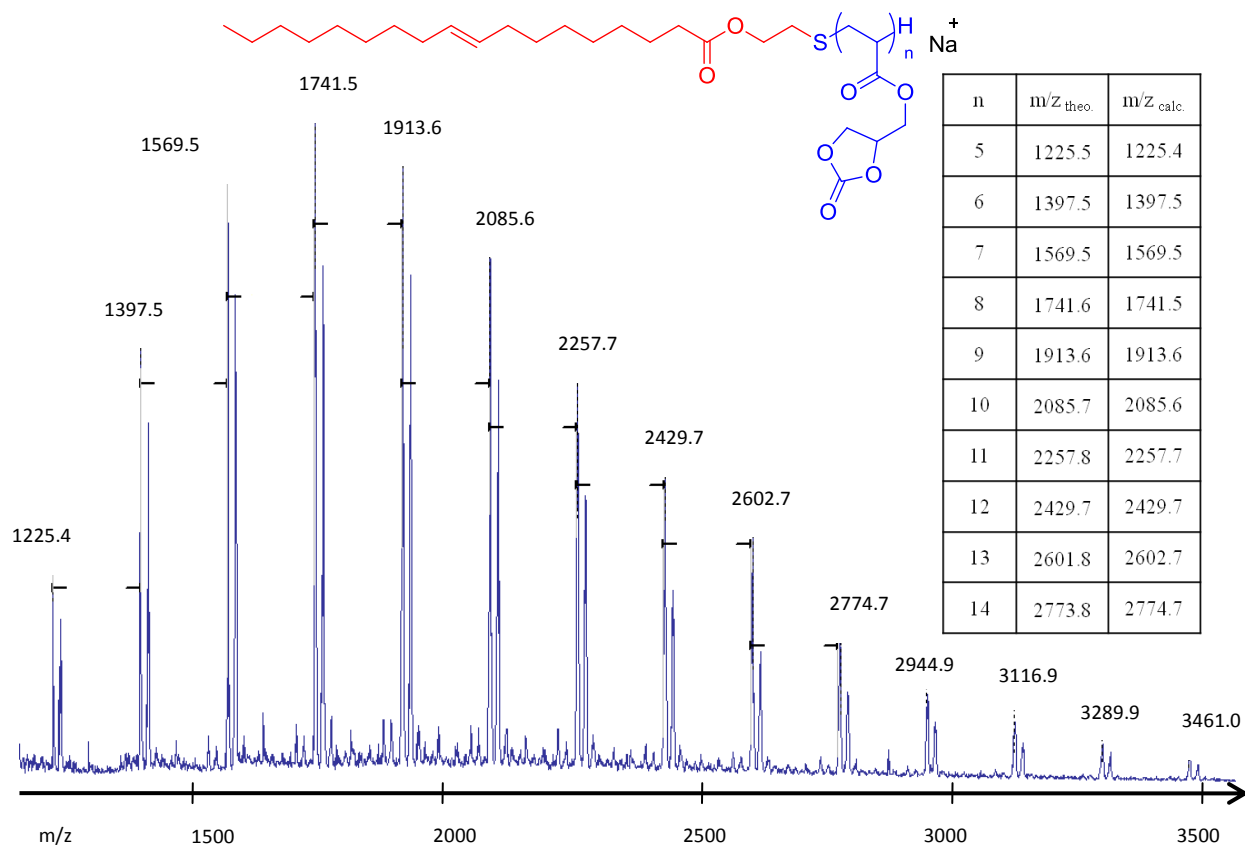


Figura 23: Espectro Maldi-TOF dos polímeros à base de acrilato de carbonato de glicerol (GCA).

Neste trabalho, a técnica de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), aplicada aos três polímeros, revelou uma distribuição polidispersa monomodal, com uma massa molar numérica média (M_n) de 11.200 g/mol para o polímero F18-GCA65, 5.000 g/mol para o polímero F18-GCA27 e 4.100 g/mol para o polímero F12-GCA24. A tabela 2 mostra a massa molar numérica média (M_n) e a massa molar ponderal média (M_w) dos três polímeros. O índice de polidispersidade (I_p) foi superior a 1,0 e inferior a 1,3 em todos os casos, o que, segundo Liu Yang et al.^[137], está de acordo com uma estreita distribuição de massa molar. O I_p é considerado um parâmetro muito importante na definição de um determinado polímero,

pois para fins de aplicação industrial, é adequada a utilização de polímeros polidispersos. A igualdade das massas molares médias (polímeros monodispersos) dificulta o processamento dos materiais ^[138].

A Figura 24 mostra as curvas de SEC dos três polímeros e a Figura 25 ilustra a polidispersidade monomodal do polímero F18-GCA65.

Tabela 2: Características moleculares dos três polímeros anfifílicos, analisadas por SEC.

| POLÍMERO | M_w (g.mol⁻¹) | M_n (g.mol⁻¹) | I_p (M_w/M_n) |
|------------------|--|--|--|
| F18-GCA65 | 11.994 | 11.200 | 1,08 |
| F18-GCA27 | 5.142 | 5.000 | 1,02 |
| F12-GCA24 | 4.523 | 4.100 | 1,10 |

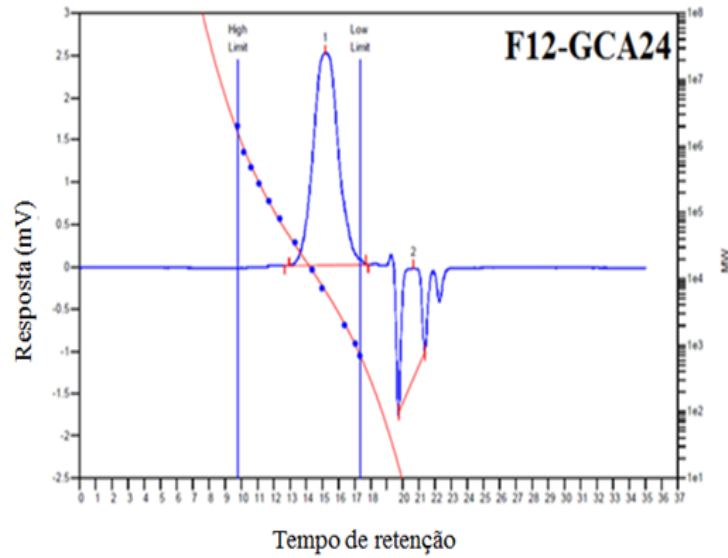
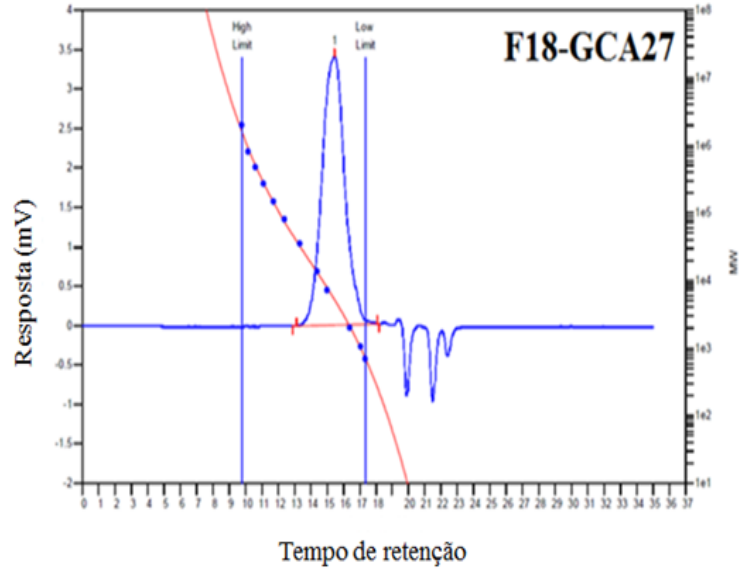
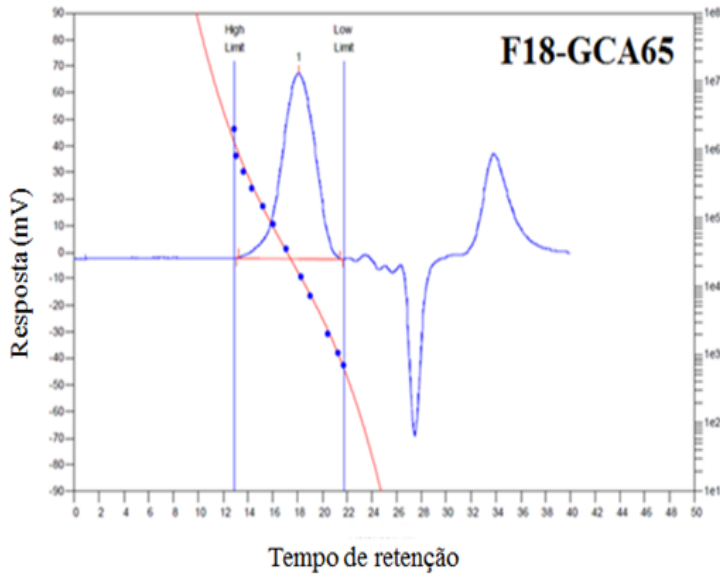


Figura 24: Cromatogramas dos três polímeros à base de acrilato de carbonato de glicerol (GCA), determinados por GPC.

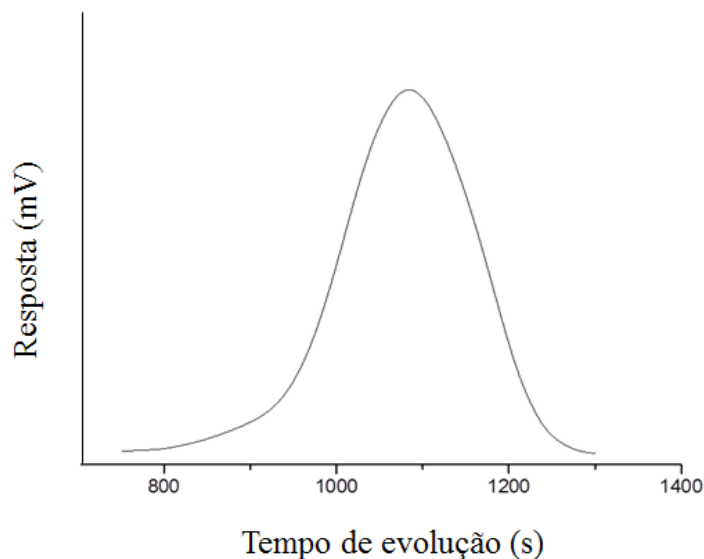


Figura 25: Curva de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) do polímero F18-GCA65.

A RMN é a mais importante técnica de caracterização estrutural de copolímeros em bloco. Deslocamentos químicos (δ) diferentes ocorrem para os carbonos do interior da cadeia e para os carbonos terminais. Atualmente, a RMN de ^1H é considerada a metodologia de maior exatidão para amostras em solução. A partir desta informação, podemos fazer um comparativo entre os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos agentes telogênicos A e B com seus respectivos espectros após a reação de telomerização com o monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA). As Figuras 26 e 27 mostram, respectivamente, os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do agente telogênico A, obtido a partir da reação entre o ácido graxo oléico e o agente de transferência 2-mercaptoetanol. Na Figura 27, os picos característicos dos carbonos metilênicos C19 (em 63,7 ppm) e C20 (em 27,3 ppm) confirmaram a eficiência na obtenção do agente telogênico A, com um rendimento de 71%. Já as Figuras 28 e 29 mostram, respectivamente, os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do agente telogênico B, obtido

a partir da reação entre o ácido láurico e o radical livre 2-mercaptoetanol. É possível detectar o sinal característico do C13 em δ 66,8 ppm, confirmando a eficiência no processo da reação, com um rendimento de 64%.

As Figuras 30 e 31 estão relacionadas aos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , respectivamente, do copolímero anfifílico F18-GCA_n, obtido após a reação de telomerização do agente telogênico A com o monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA). Embora o comportamento anfifílico de uma molécula dificulte sua caracterização, os sinais da Figura 31 confirmam a eficiência da reação de telomerização, em DMSO, com um rendimento de 65-73%. Já as Figuras 32 e 33 mostram os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , respectivamente, do copolímero anfifílico F12-GCA_n, obtido após reação de telomerização do agente telogênico B com o monômero GCA. No espectro de RMN de ^{13}C , figura 33, é possível identificarmos os sinais característicos, que confirmam o sucesso da reação, apresentando um rendimento de 62%.

As Figuras 34 e 35 referem-se aos espectros de RMN de ^1H dos polímeros F18-DA_n e F12-DA_n, respectivamente, após estes sofrerem um processo de hidrólise básica. O polímero F18-DA_n apresentou um rendimento de 75% e o polímero F12-DA_n um rendimento de 68%.

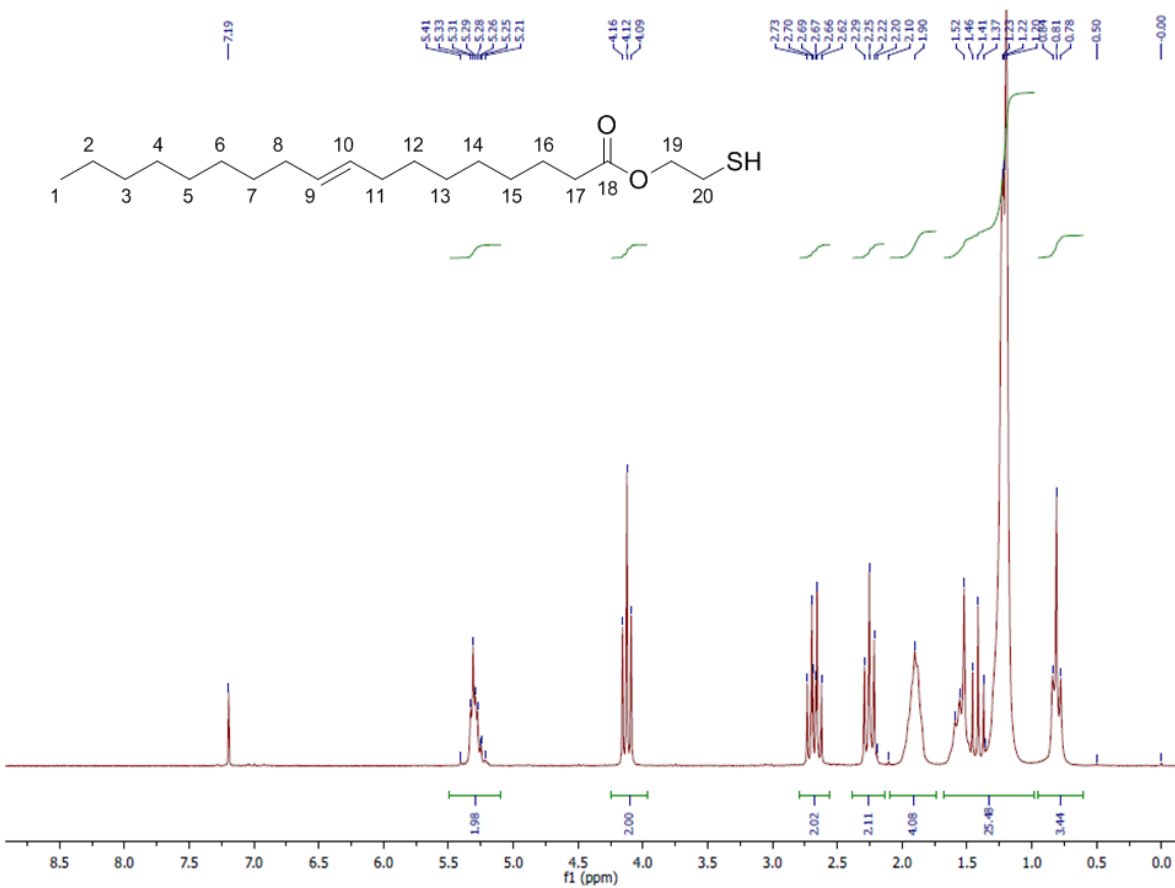


Figura 26: Espectro de RMN de ¹H do agente telogênico A (C₁₈OOC₂H₄SH)

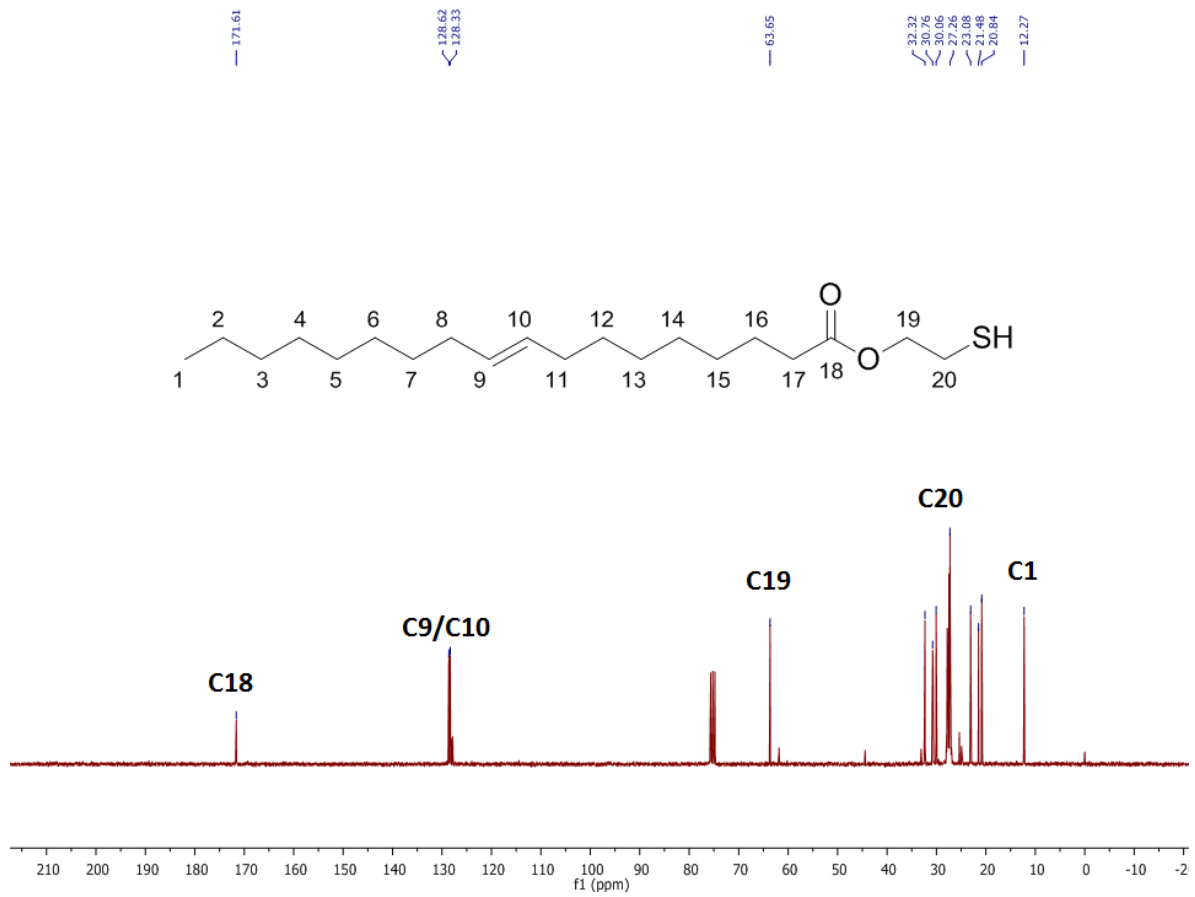


Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C do agente telogênico A ($C_{18}OOC_2H_4SH$)

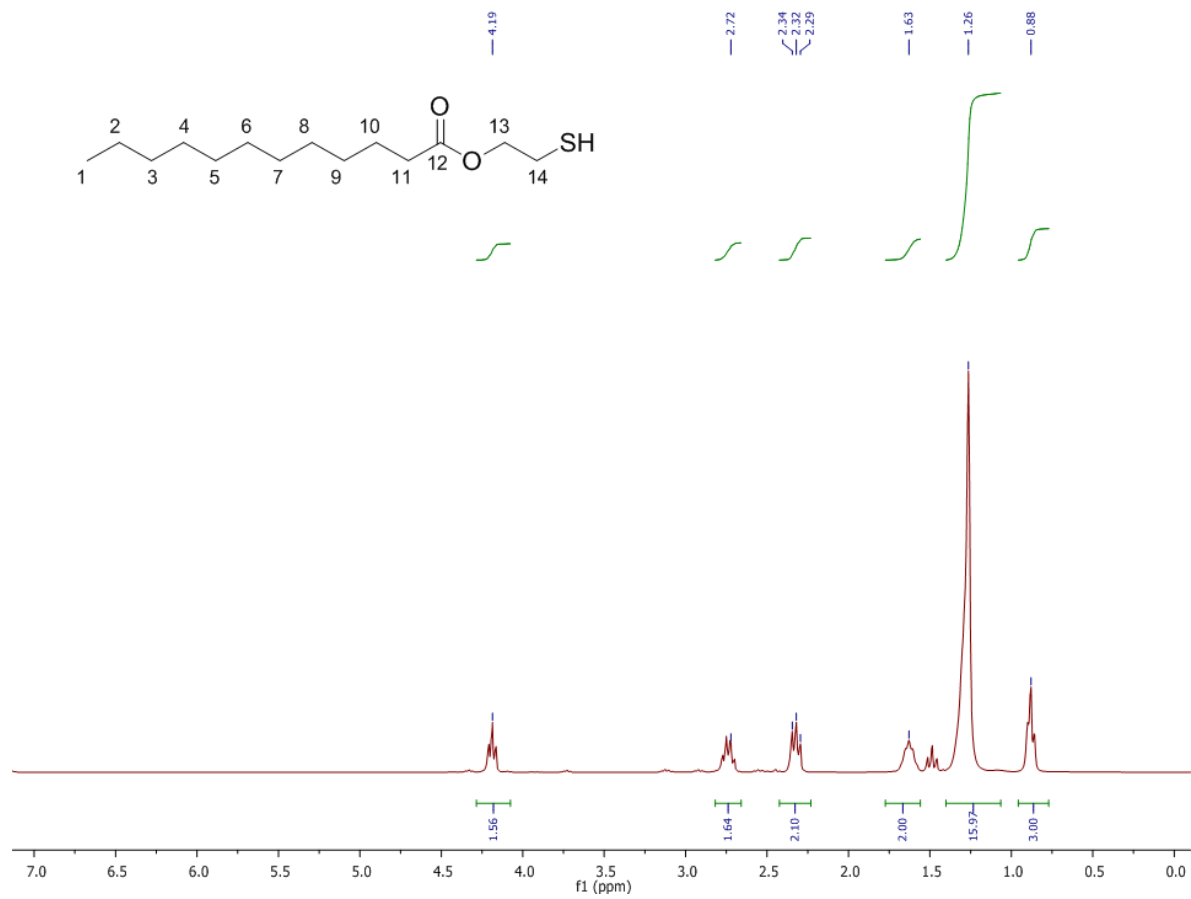


Figura 28: Espectro de RMN de ¹H do agente telogênico B (C₁₂OOC₂H₄SH)

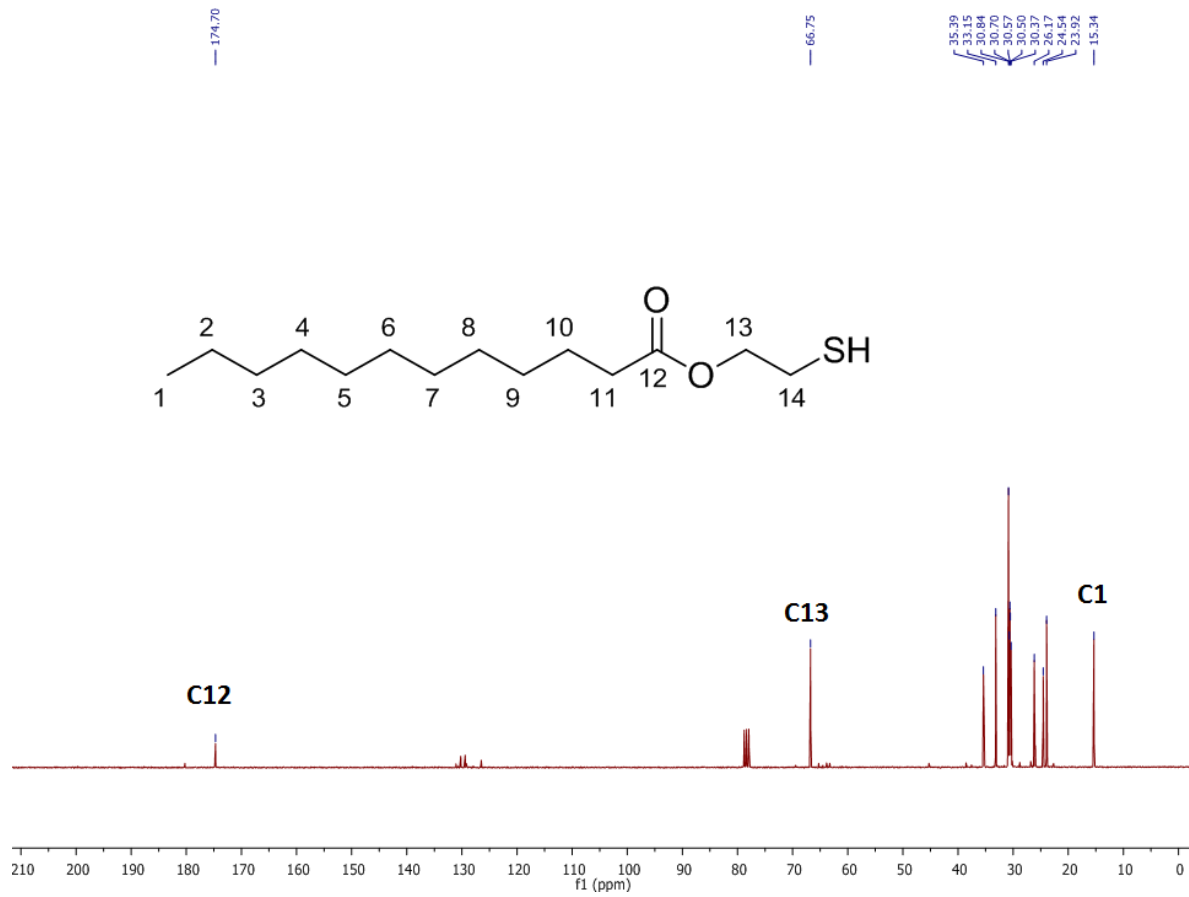


Figura 29: Espectro de RMN de ^{13}C do agente telogênico B ($C_{12}OOC_2H_4SH$)

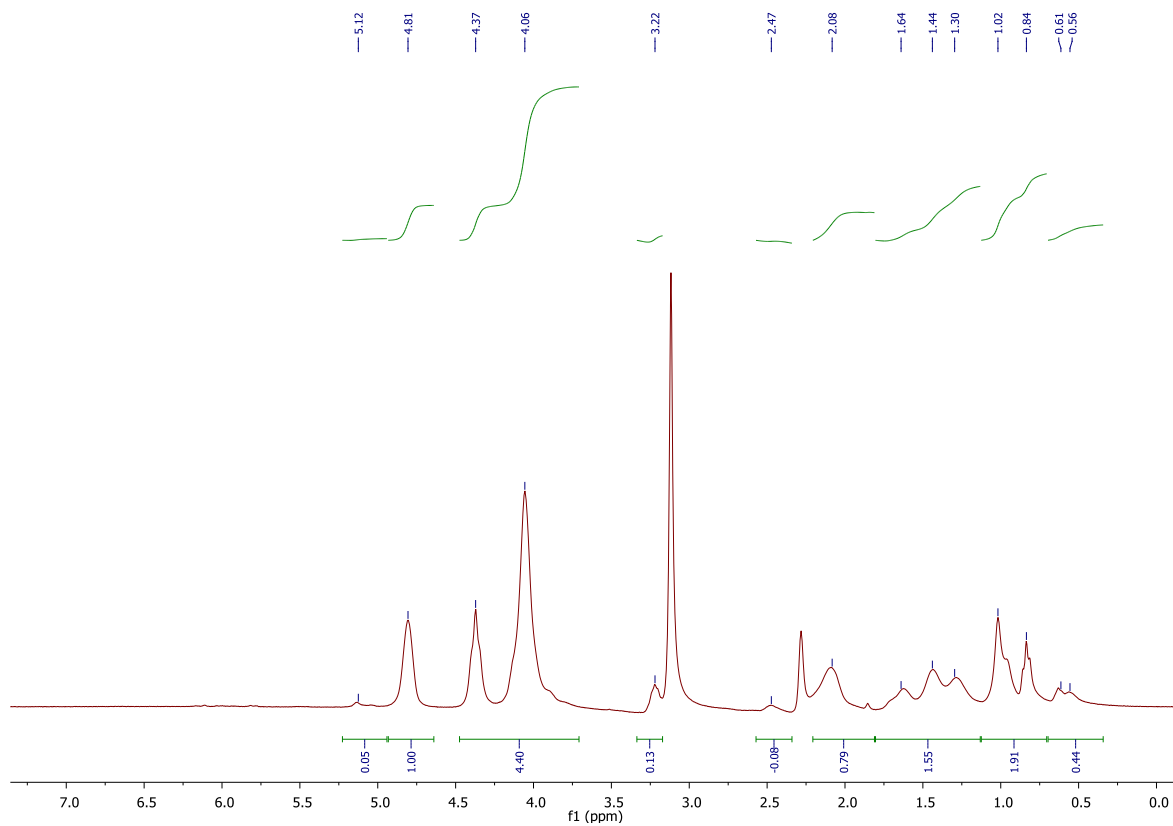


Figura 30: Espectro de RMN de ^1H da Reação de Telomerização do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA) com o agente telogênico A ($\text{C}_{18}\text{OOC}_2\text{H}_4\text{SH}$)

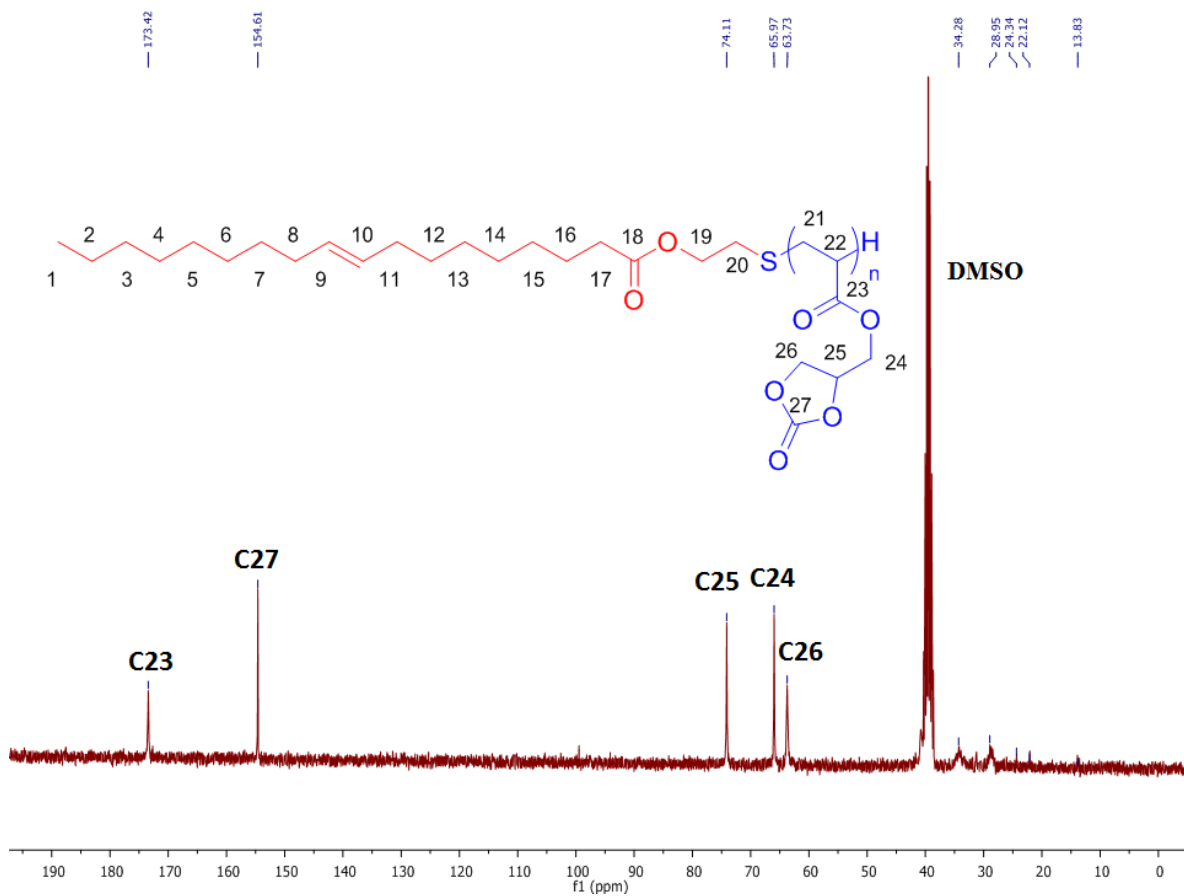


Figura 31: Espectro de RMN de ^{13}C da Reação de Telomerização do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA) com o agente telogênico A ($\text{C}_{18}\text{OOC}_2\text{H}_4\text{SH}$)

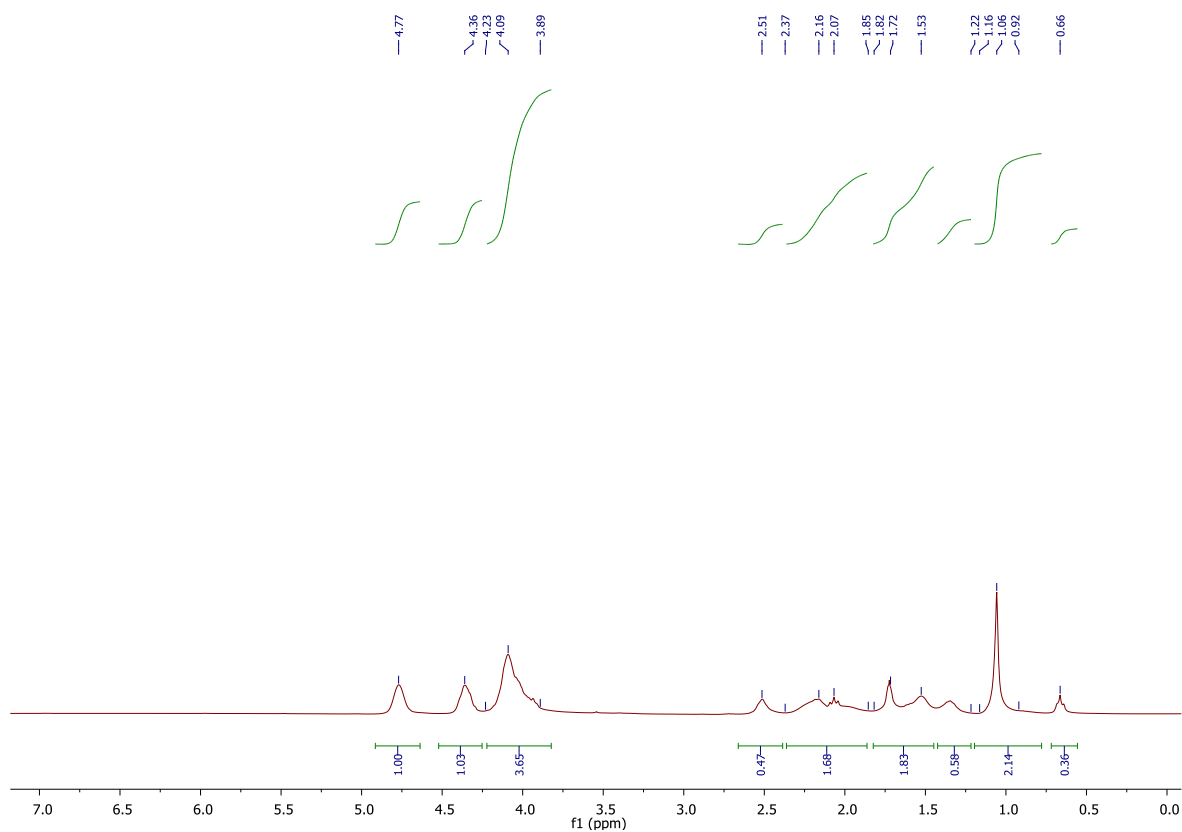


Figura 32: Espectro de RMN de ^1H da Reação de Telomerização do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA) com o agente telogênico B ($\text{C}_{12}\text{OOC}_2\text{H}_4\text{SH}$)

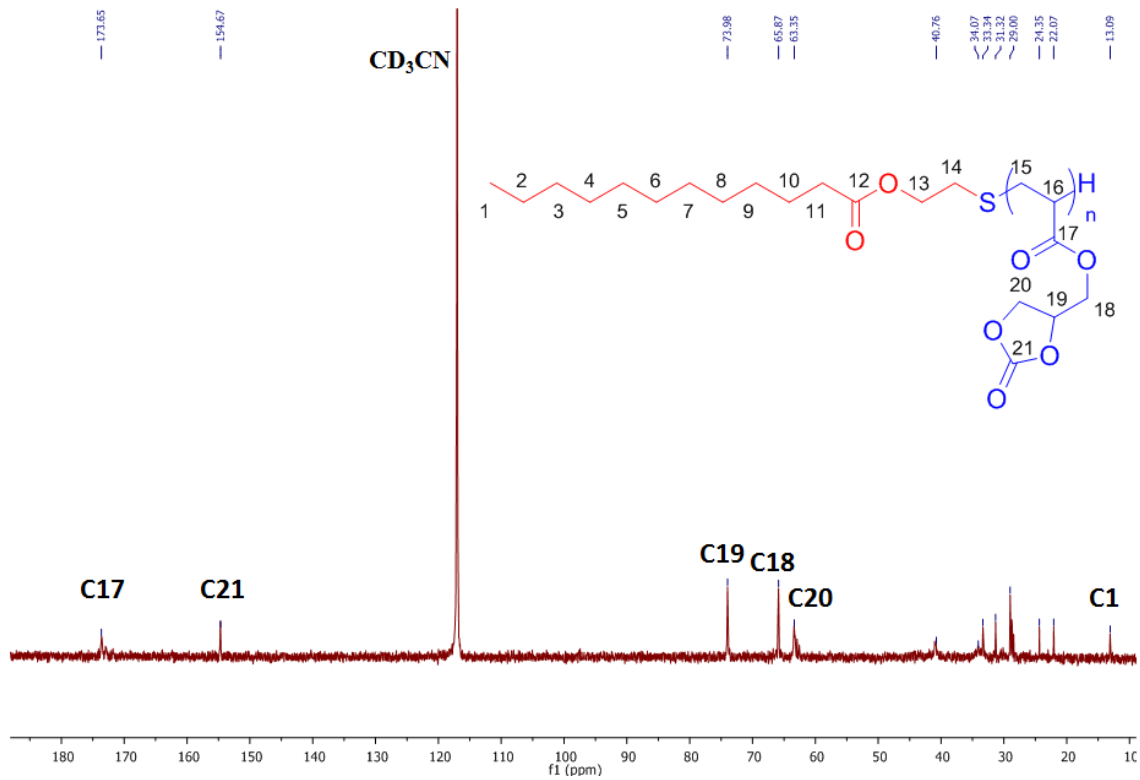


Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C da Reação de Telomerização do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA) com o agente telogênico B ($\text{C}_{12}\text{OOC}_2\text{H}_4\text{SH}$)

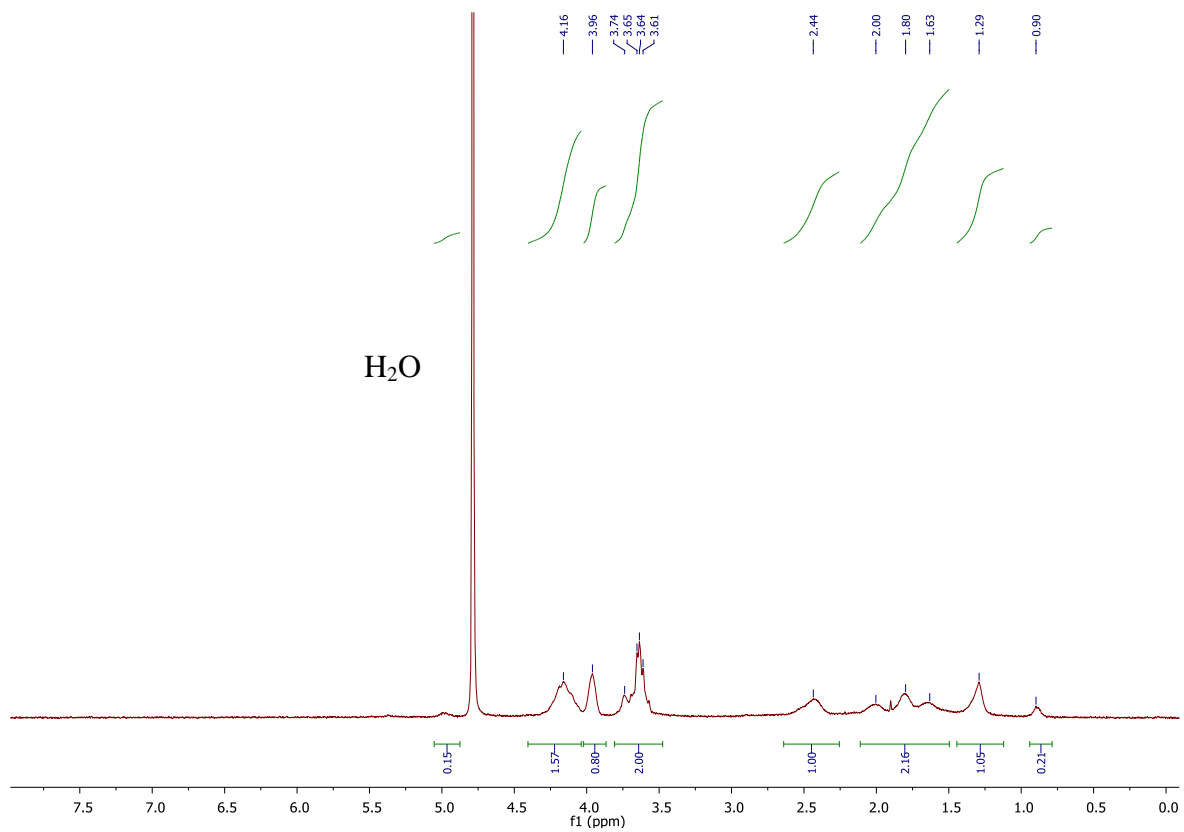


Figura 34: Espectro de RMN de ^1H do polímero F18-DA_n, após a hidrólise básica.

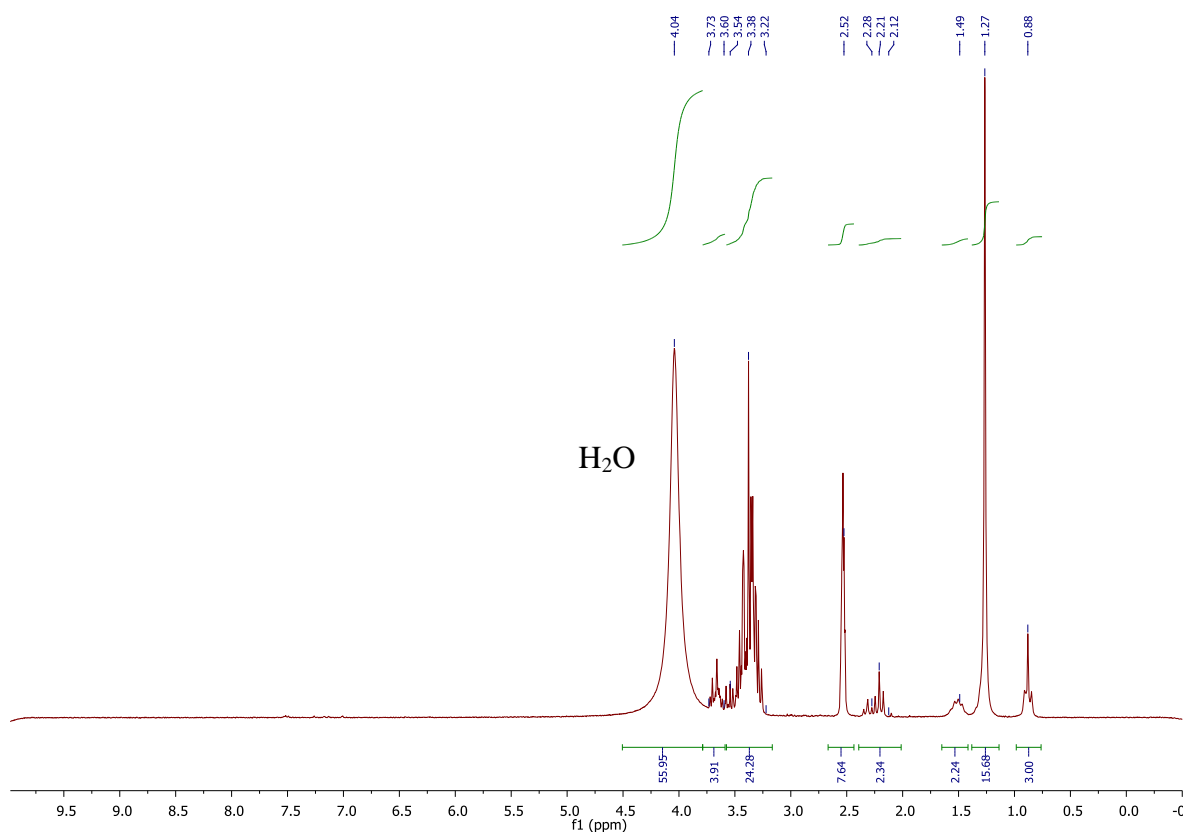


Figura 35: Espectro de RMN de ^1H do polímero F12-DA_n, após a hidrólise básica.

Após a obtenção dos polímeros anfifílicos, realizamos as análises de FTIR, para confirmar os principais grupos funcionais presentes nas três amostras. Os polímeros apresentaram, praticamente, as mesmas bandas de absorção, em que as principais bandas características observadas foram em 1731 cm^{-1} , referente ao grupo C=O da função éster; em 1785 cm^{-1} , referente ao grupo C=O do anel carbonato e em 2943 cm^{-1} , referente ao grupo C-H. Em seguida, realizamos a hidrólise do monômero acrilato de carbonato de glicerol (GCA), sob condições básicas, como mostrado por Robin et al.^[134]. Neste caso, o que ocorreu foi uma abertura do anel carbonato, onde as análises FTIR mostraram o total

desaparecimento do grupo carbonil em 1785 cm^{-1} e o aparecimento de uma banda larga em 3319 cm^{-1} , atribuída as funções hidroxil. A Tabela 3 resume as principais bandas características dos três polímeros e na Figura 36 é possível observar estas bandas, antes e após o processo de hidrólise.

Tabela 3: Atribuições das frequências das principais bandas dos polímeros F18-GCA65, F18-GCA27 e F12-GCA24.

| Número de onda (cm^{-1}) | Atribuições |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 1731 | $\nu\text{ C=O}$ (éster) |
| 1785 | $\nu\text{ C=O}$ (anel carbonato) |
| 2854 | $\delta\text{ CH}_2$ |
| 2943 | $\delta\text{ CH}_3$ |
| 3319 | OH |

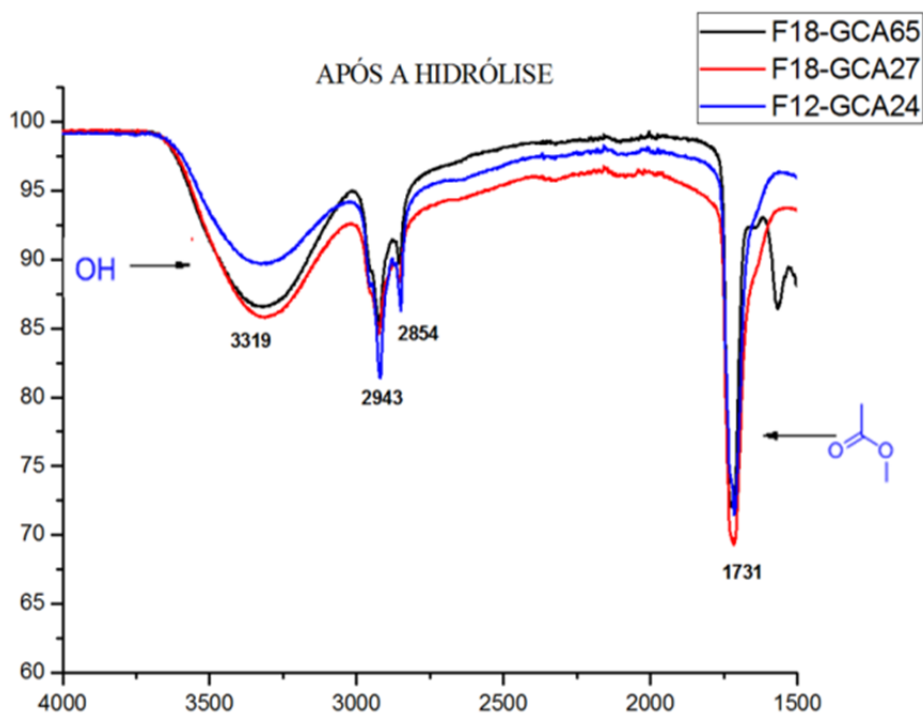
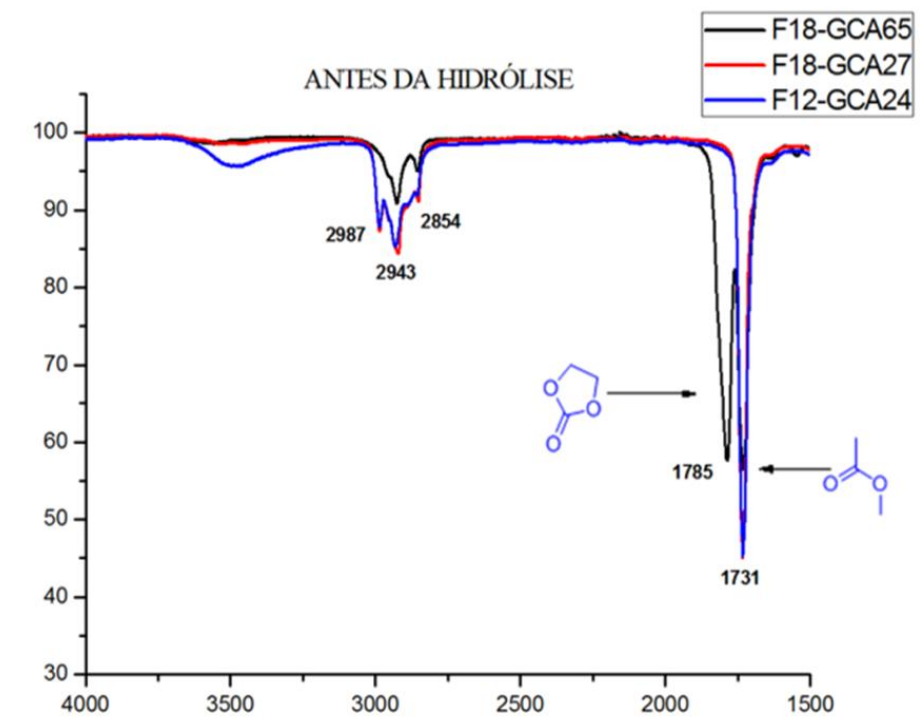


Figura 36: Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos três polímeros, ante e após o processo de hidrólise.

4.3) Auto-associação dos polímeros anfílicos

Testes foram feitos em relação à solubilidade dos polímeros obtidos, em diferentes solventes. As três amostras foram insolúveis em água e também na maioria dos solventes orgânicos testados, como, por exemplo, dimetilacetamida (DMAc), tetrahidrofurano (THF) e dimetilformamida (DMF). Entretanto, foram rapidamente solúveis em dimetilsulfóxido (DMSO), onde ocorreu a formação de nanoagregados em solução.

Após a solubilização dos polímeros em DMSO, realizou-se a diálise das amostras com água Milli-Q, conforme procedimento descrito na seção 3.10, do capítulo 3. Ao término desta etapa, calculou-se a cmc dos três polímeros anfílicos por duas diferentes técnicas: fluorescência e DLS. Pireno foi escolhido como sonda fluorescente, devido a sua alta sensibilidade à polaridade local do meio ^[139]. Quando agregados poliméricos e micelas são formados, o pireno preferencialmente particiona-se em microambientes hidrofóbicos com uma mudança simultânea nas intensidades de fluorescência. A partir dos espectros de emissão de fluorescência, foram obtidos os gráficos da intensidade de fluorescência *versus* o logaritmo da concentração do polímero (mg.L^{-1}) (Figura 37).

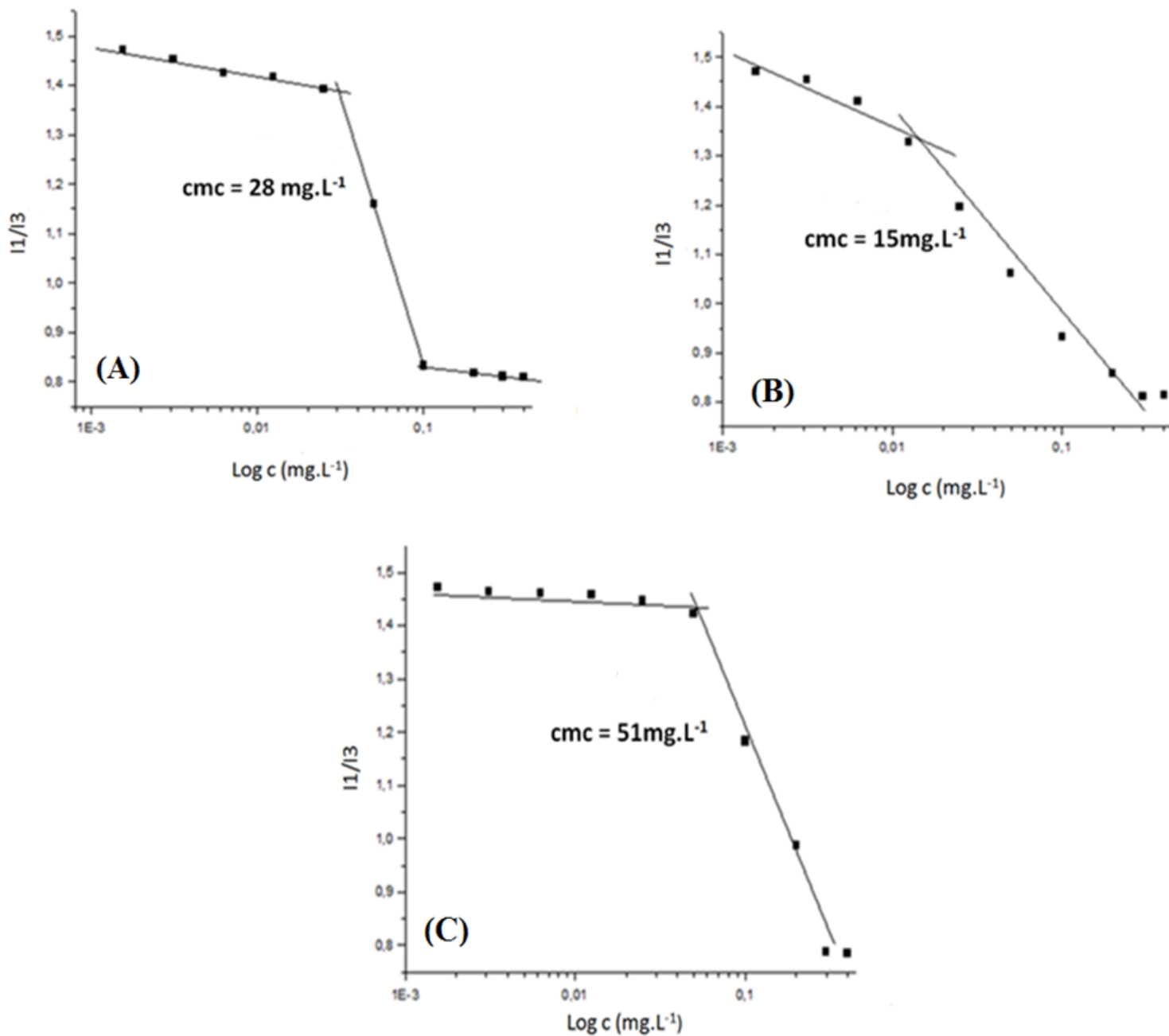


Figura 37: Perfis da razão I_1/I_3 do espectro de emissão de fluorescência do pireno, em função da concentração dos polímeros: (A) F18-GCA65, (B) F18-GCA27 e (C) F12-GCA24

O valor da cmc do polímero F18-GCA65 obtido por fluorescência foi de 28 mg.L^{-1} e por DLS foi de 35 mg.L^{-1} . A cmc do polímero F18-GCA27 foi de 15 mg.L^{-1} , obtido por fluorescência e de 18 mg.L^{-1} , obtido por DLS. Já o polímero F12-GCA24 teve uma cmc de

51 mg.L⁻¹, determinada por fluorescência, e de 58 mg.L⁻¹, determinada por DLS. A Tabela 4 expõe todos esses valores de cmc, a 25 °C. Os resultados foram expressos em termos de massa (mg.L⁻¹), uma vez que esta é a forma usual de se avaliar as aplicações de soluções aquosas de polímeros.

Tabela 4: Valores de concentração micelar crítica (cmc) para os três polímeros anfifílicos, a 25°C, determinados por fluorescência e DLS.

| cmc (mg.L ⁻¹) | F18-GCA65 | F18-GCA27 | F12-GCA24 |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Fluorescência | 28 | 15 | 51 |
| DLS | 35 | 18 | 58 |

Comparando os resultados de cmc obtidos por ambas as técnicas, podemos observar que os valores foram muito próximos e seguiram a mesma tendência, ou seja, a mudança nos valores de cmc está relacionada ao tamanho dos blocos hidrofílico e hidrofóbico dos diferentes polímeros. Quando a parte hidrofílica é aumentada, mantendo o mesmo tamanho da parte hidrofóbica (no caso, os polímeros F18-GCA65 e F18-GCA27), o valor da cmc aumenta. Isto ocorre devido à solvatação mais forte do polímero na presença de água. Quanto maior o número de ligações de hidrogênio, maior a interação destas com o meio aquoso, aumentando, assim, a solubilidade e, conseqüentemente, a cmc. Por outro lado, um comportamento oposto é observado quando se aumenta o bloco hidrofóbico: o valor de cmc torna-se menor (caso dos polímeros F18-GCA65 e F12-GCA24 ou F18-GCA27 e F12-GCA24), uma vez que a micelização reduz as interações desfavoráveis da cadeia hidrofóbica

com a água e o efeito hidrofóbico aumenta com o aumento da cadeia alquílica do respectivo ácido graxo ^[140,141].

Estudos de DLS foram realizados em relação ao tamanho e a distribuição de tamanho das micelas poliméricas, antes e após o processo de diálise, conforme o procedimento experimental descrito na seção 3.11.2, do capítulo 3. Podemos observar, na Figura 38, que os três polímeros apresentaram uma distribuição de tamanho monomodal, com apenas um pico característico. O diâmetro médio das micelas formadas esteve em uma escala de 168-365 nm antes da diálise (DMSO) e de 80-204 nm após a diálise (água) (Figura 39). Mesmo sendo o DMSO um bom solvente para ambos os blocos hidrofílico e hidrofóbico dos copolímeros, houve o surgimento de picos antes do processo de diálise. Isso se deve às fortes ligações de hidrogênio dos segmentos hidrofílicos, mesmo em DMSO, dificultando, assim, a solvatação das respectivas moléculas. Entretanto, esse tamanho é maior do que se deveria esperar para micelas esféricas originadas da auto-associação de moléculas anfifílicas. Isso pode ser justificado pelo fato de ter ocorrido a formação de agregados ^[141] ou devido às grandes interações eletrostáticas intermicelares, levando à formação dos chamados clusters, ou grandes aglomerados micelares esféricos - LCMs (do inglês large compounds micelles)^[142]. A associação intermicelar é um comportamento típico de moléculas anfifílicas não-iônicas. Uma vez que a atração intermolecular entre as cadeias hidrofílicas de nossos polímeros é muito forte, devido ao elevado número de possíveis ligações de hidrogênio nas moléculas à base de glicerol, as pequenas micelas podem sofrer um processo de agregação intermicelar, formando, assim, inúmeros clusters^[142].

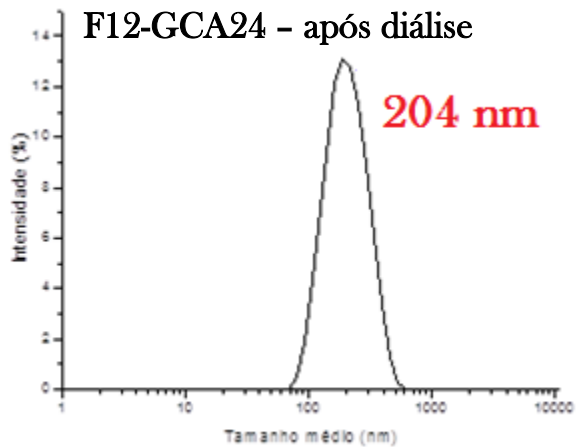
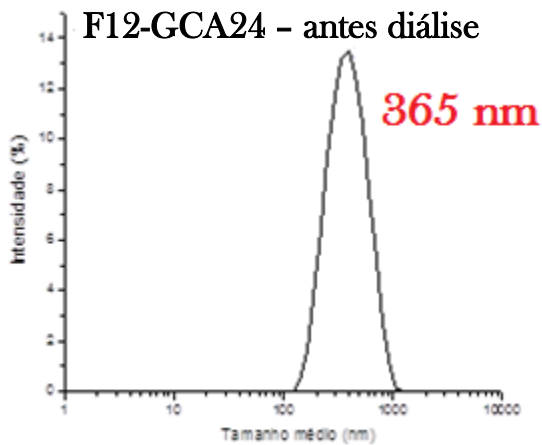
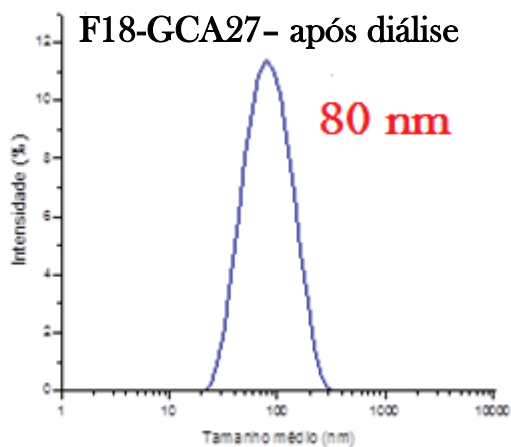
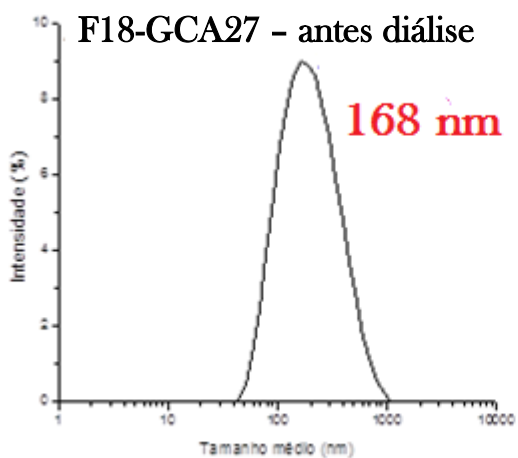
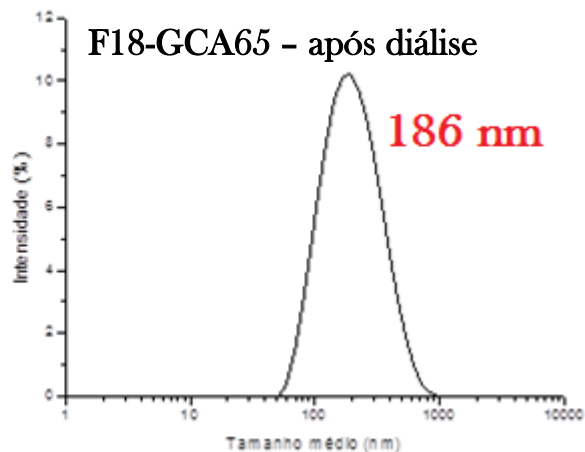
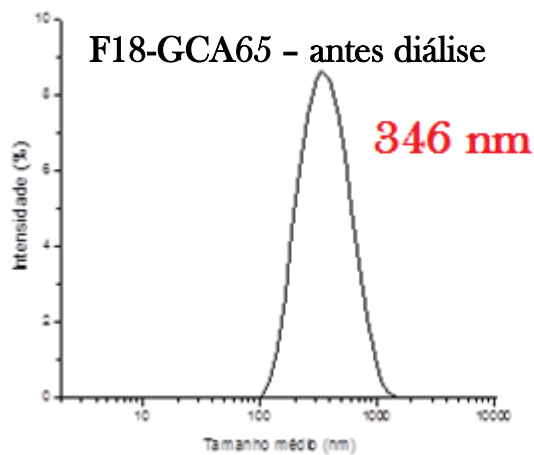


Figura 38: Curvas de distribuição de tamanho das micelas poliméricas F18-GCA65, F18-GCA27 e F12-GCA24, antes e após o processo de diálise.

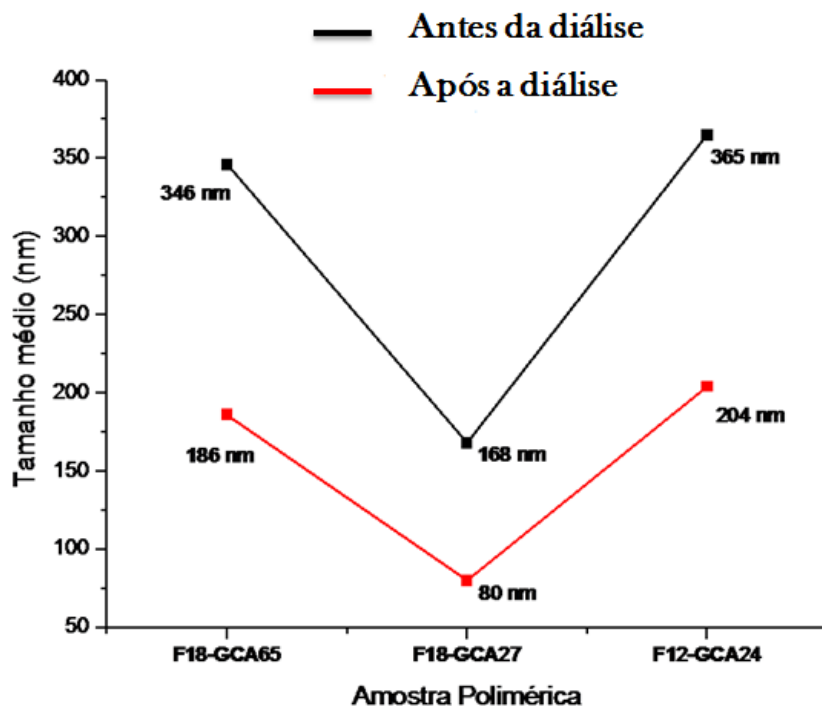


Figura 39: Tamanho médio das micelas antes e após o processo de diálise.

A dependência angular da intensidade de espalhamento de luz também foi investigada. A Figura 40 exibe os gráficos de Guinier, de acordo com a aproximação dada pela equação 12.

De acordo com a aproximação de Guinier, é possível se obter o R_g das micelas, ou seja, a raiz quadrática média das distâncias de todos os elétrons em relação ao seu centro de gravidade, a partir do coeficiente angular da seção linear das curvas no limite $q \rightarrow 0$.

Analisando a Figura 40, é possível observar a ausência de uma correlação linear perfeita em toda a faixa angular, sendo isto um indicativo de sistemas polidispersos em solução.

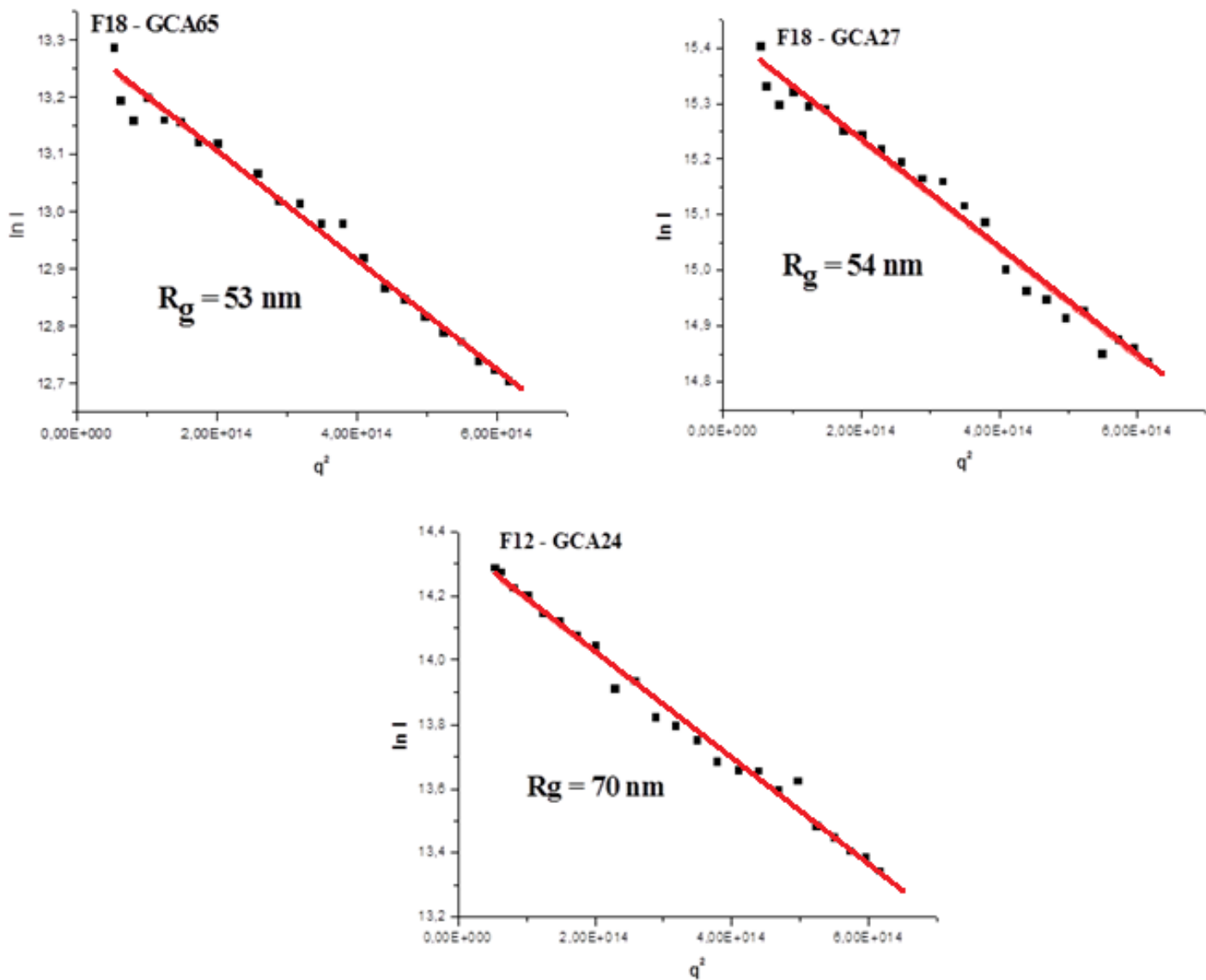


Figura 40: Gráficos de Guinier para os dados de SLS. Os valores de R_g inseridos nos gráficos foram calculados com base no coeficiente angular dos segmentos lineares das curvas.

Simultaneamente, mediu-se também o DLS das três amostras poliméricas. Na Figura 41 estão apresentadas as curvas de autocorrelação g_2 de DLS, no ângulo de 90° . Pode-se observar que a curva do polímero F12-GCA24 tem um tempo de relaxação maior do que o

apresentado pelos polímeros F18-GCA65 e F18-GCA27. Isso ocorreu devido ao fato de sua solução apresentar estruturas micelares com tamanhos superiores aos tamanhos obtidos para as soluções das outras amostras, fato que foi comprovado pelos valores mostrados nas Figuras 38 e 39 e obtidos para R_g .

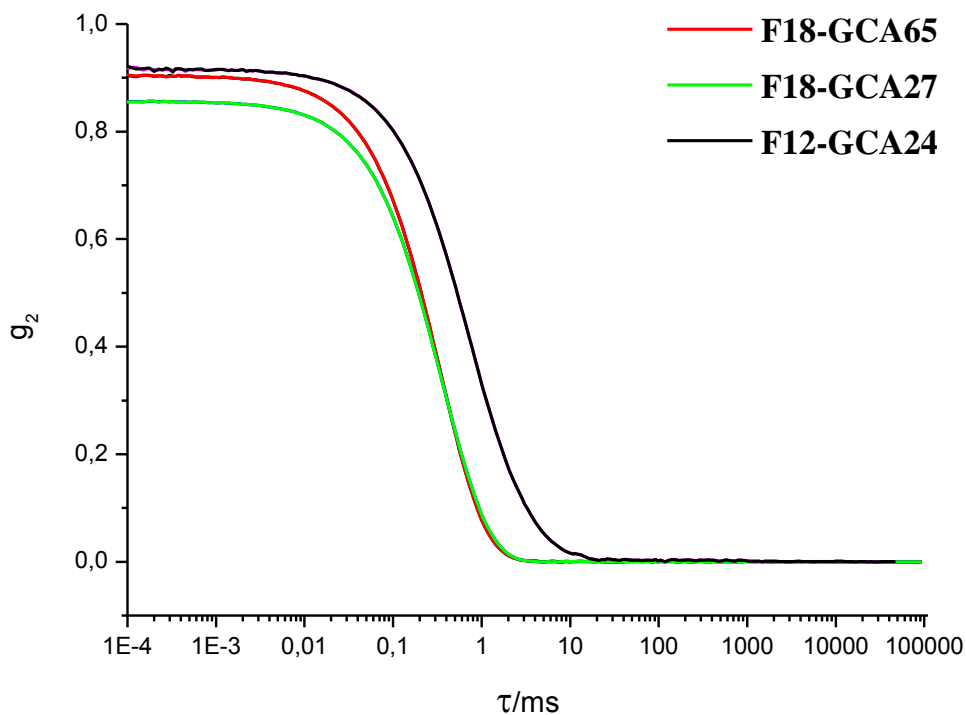


Figura 41: Curvas g_2 de autocorrelação de DLS, no ângulo de 90° .

A Figura 42 apresenta a dependência angular da frequência média de relaxação das curvas de autocorrelação de DLS e os respectivos raios hidrodinâmicos médios (R_H), calculados com base na equação de Stokes-Einstein (Equação 14).

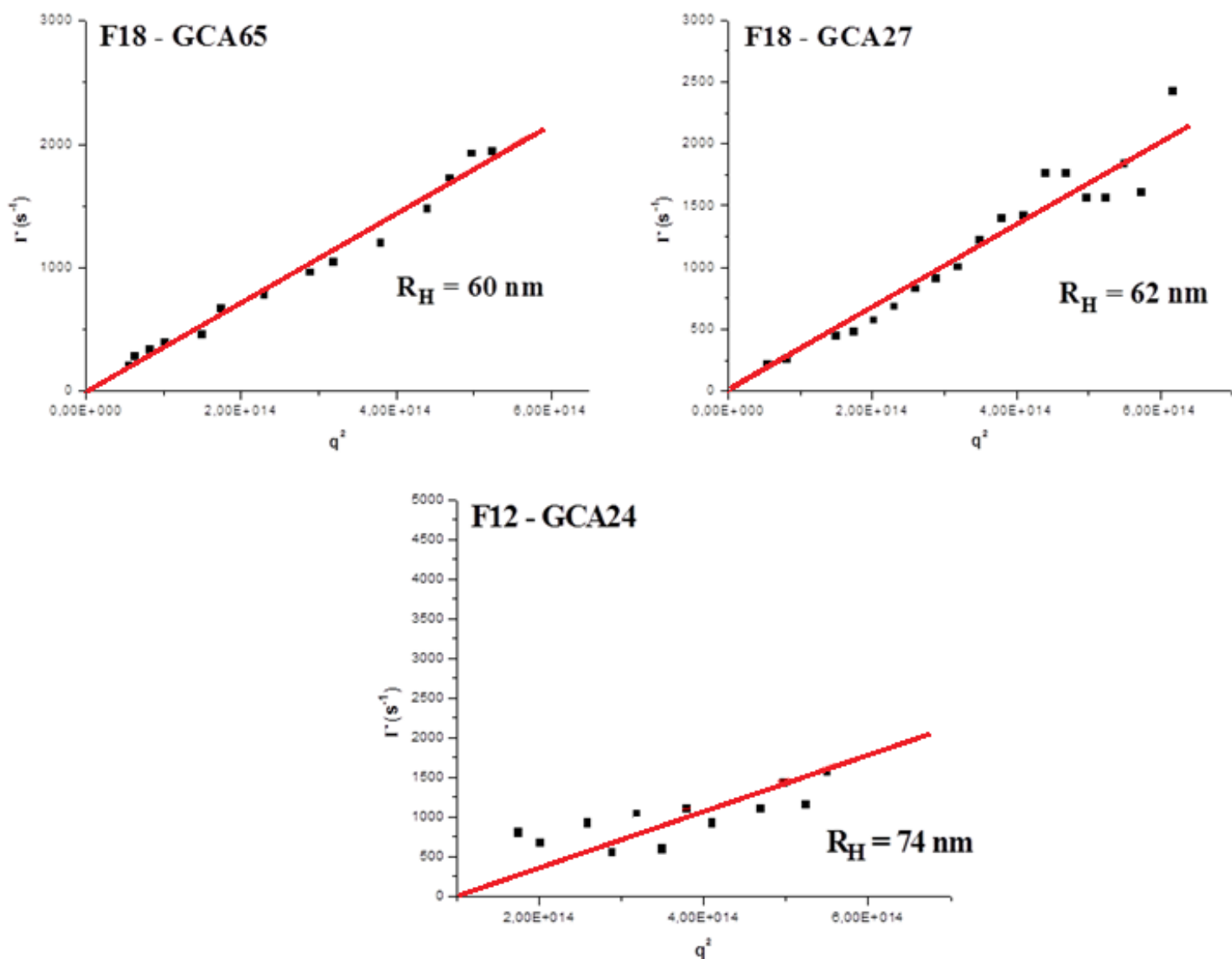


Figura 42: Dependência angular da frequência de relaxação das curvas de autocorrelação do DLS. Os valores de R_H foram calculados através da equação de Stokes-Einstein, usando o coeficiente angular das curvas D_0 .

Conforme o procedimento experimental descrito na seção 3.11.2, do capítulo 3, o R_H das micelas poliméricas F12-GCA24 teve um valor médio de 74 nm, enquanto as micelas dos polímeros F18-GCA65 e F18-GCA27 tiveram um R_H médio de 60 nm e 62 nm,

respectivamente. Segundo Liu et al., ^[143] as ligações de hidrogênio intermoleculares são aumentadas quanto maior a parte hidrofóbica de um copolímero anfifílico, aumentando, assim, seu número de agregação. Com isso, ocorre um aumento na densidade da partícula e, conseqüentemente, uma diminuição no seu tamanho.

A razão entre R_H médio com seus respectivos R_g nos fornece o grau de despolarização da luz espalhada (ρ). O valor de ρ dá um indício da morfologia de uma amostra polimérica. Ao se relacionar os valores de R_H e de R_g , obtiveram-se os valores de ρ que ficaram em torno de 0,8, o que, segundo Pecora e Berne ^[122], é o valor esperado para nanoestruturas com geometria esférica.

Tabela 5: Características dos polímeros anfifílicos, a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, determinadas por SLS e DLS).

| | R_H (nm) | R_g (nm) | ρ (R_g/R_H) | Índice de polidispersidade (I_p) |
|------------------|---------------|---------------|-------------------------|--|
| F18-GCA65 | 60 | 53 | 0,88 | 0,2 |
| F18-GCA27 | 62 | 54 | 0,87 | 0,2 |
| F12-GCA24 | 74 | 70 | 0,94 | 0,3 |

As estruturas micelares formadas pelos três polímeros também foram observadas por técnicas de imagem, onde realizou-se análises de TEM e AFM, conforme ilustram as Figuras 43 e 44, respectivamente. O tamanho médio das micelas obtido por DLS foi maior do que o tamanho médio obtido pelas análises de ambas as microscopias. Ao analisar a morfologia e o tamanho de micelas poliméricas, tanto em TEM quanto em AFM, as amostras precisam

sofrer um processo de secagem (desidratação), uma vez que para obter tais imagens, uma alíquota de cada solução é depositada sobre uma grade de cobre e seca. Esta secagem causa uma deformação na estrutura da micela, “encolhendo” sua corona e, conseqüentemente, diminuindo seu tamanho. O que se mede no DLS é o diâmetro hidrodinâmico das micelas em meio aquoso, enquanto que na TEM e na AFM mede-se seus tamanhos no estado seco. No entanto, as imagens de TEM e AFM mostram que as micelas apresentaram uma morfologia praticamente esférica, com diferentes diâmetros, uma ampla distribuição de tamanho e com a formação de alguns agregados. Na Figura 43, é possível perceber que as três amostras apresentaram dimensões inferiores a 200 nm e na Figura 44, os diâmetros ficaram abaixo de 100 nm. Tanto a morfologia quanto o tamanho das micelas não mudaram dentro de várias semanas.

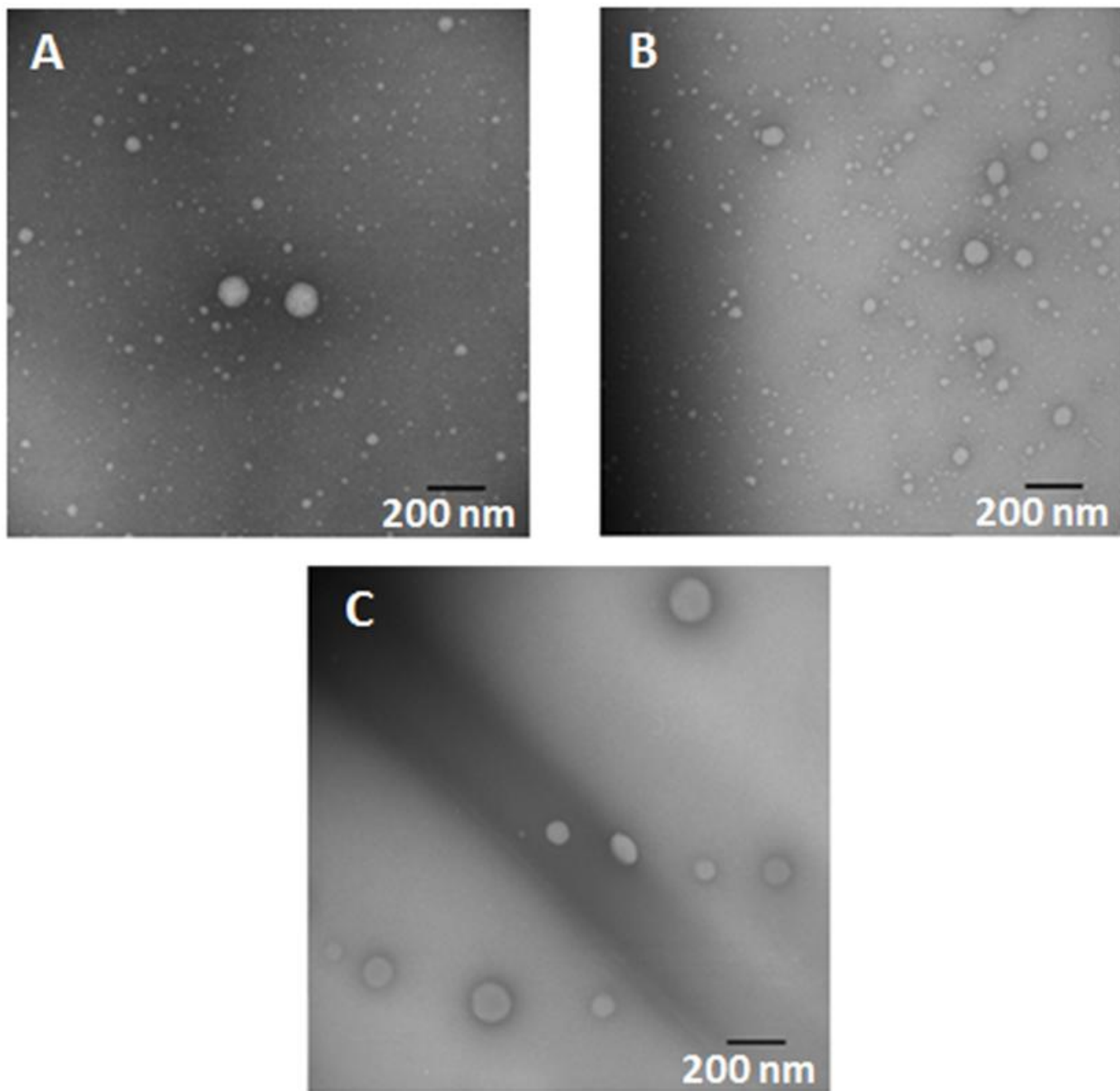


Figura 43: Imagens de TEM das micelas poliméricas F18-GCA65 (a), F18-GCA27 (b) e F12-GCA24 (c).

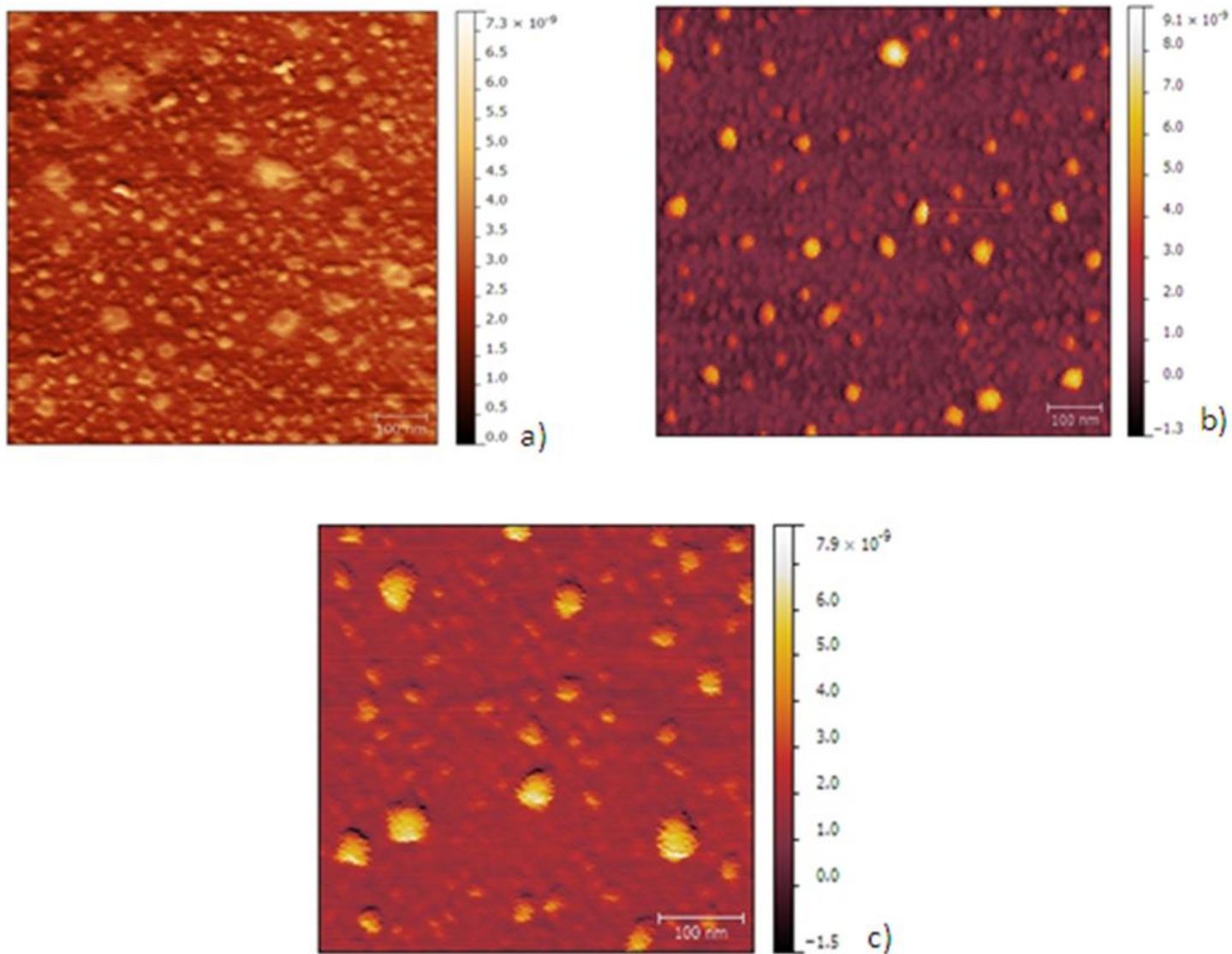


Figura 44: Imagens topográficas de AFM das micelas poliméricas F18-GCA65 (a), F18-GCA27 (b) e F12-GCA24 (c).

5) CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente trabalho, objetivou-se obter sistemas micelares formados a partir de copolímeros em bloco e mostrar um amplo estudo em relação à síntese e a caracterização físico-química de três tipos de copolímeros anfifílicos, consistindo de diferentes segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos, obtidos a partir de uma reação de telomerização de dois diferentes ácidos graxos, o ácido graxo oléico e o ácido graxo láurico, com um monômero derivado do glicerol (GCA). Testes realizados em água e com diferentes solventes orgânicos, miscíveis em água, possibilitaram escolher o DMSO como o melhor solvente para solubilização dos três copolímeros em questão. As propriedades desses materiais, tanto em meio orgânico quanto em meio aquoso, foram investigadas por diferentes técnicas, dentre elas as de DLS e SLS. Os três polímeros sintetizados formaram grandes aglomerados micelares esféricos - LCMs - e seus valores de cmc aumentaram com o aumento da porção hidrofílica do polímero e diminuíram com o aumento da porção hidrofóbica. O diâmetro das micelas foi medido por diferentes técnicas e, devido às fortes ligações de hidrogênio intermoleculares, ocorreu a formação dos LCMs. A razão entre o tamanho dos segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos afeta o diâmetro das estruturas micelares, ou seja, mudando o tamanho dos blocos hidrofílicos e hidrofóbicos nos três polímeros, pode-se modular os valores de cmc e, conseqüentemente, o tamanho das micelas auto-associadas.

Polímeros baseados em precursores naturais conduzem a materiais que podem encontrar inúmeras aplicabilidades como carreadores biodegradáveis, nas mais diferentes áreas, tais como na indústria farmacêutica, cosmecêutica, alimentícia, agroquímica, etc. Portanto, estudos mais detalhados sobre as propriedades destes polímeros são de suma

importância, tais como a citotoxicidade, a eficiência de encapsulação e a vetorização, dentre outras.

Os resultados apresentados nesta tese são promissores e de grande valia e estudos adicionais destes sistemas anfílicos estão previstos para serem efetuados. A intenção é focar estes estudos nas propriedades de encapsulação de fármacos e princípios ativos hidrofóbicos, bem como na biocompatibilidade e na habilidade de interação com células tumorais.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Geckeler KE, Stirn J. Polyreaktionen – Mechanismen, Systematik, Relevanz. *Naturwissenschaften* 1993;80:487–500.
- [2] Langer R. New methods of drug delivery. *Science*, v. 249, p. 1527-1533, 1990.
- [3] Robinson J. R.; Lee V. H. L. **Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications**, v. 29, 1978.
- [4] Yuan H.; Miao J.; Du Y-Z.; You J.; Hu F-Q.; Zeng S. Cellular uptake of solid lipid nanoparticle and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 348, p. 137-145, 2008.
- [5] Esmaeili F.; Ghahremani M. H.; Esmaeili B.; Khoshayand M. R.; Atyabi F.; Dinarvand R. PLGA nanoparticles of different surface properties: Preparation and evaluation of their body distribution. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 349, p. 249-255, 2008.
- [6] Pereira M. A.; Mosqueira V. C. F.; Vilela J. M. C.; Andrade M. S.; Ramaldes G. A.; Cardoso V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with Technetium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and proton correlation spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, p. 42-51, 2008.
- [7] Morales M. A.; Finotelli P. V.; Coaquira J. A. H.; Rocha-Leão M. H. M.; Diaz-Aguila C.; Baggio-Saitovitch E. M.; Rossi A. M. In situ synthesis and magnetic studies of iron oxide nanoparticles in calcium-alginate matrix for biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 253-257, 2008.
- [8] Jones M-C.; Leroux J-C. Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 48, p. 101-111, 1999.
- [9] Zamboni W. C. Liposomal, nanoparticle and conjugate formulations of anticancer agents. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 8230-8234, 2005.
- [10] Briones E.; Colino C. I.; Iñano J. M. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. **Journal of Controlled Release**, v. 125, p. 210-227, 2008.
- [11] Ruozi B.; Tosi G.; Leo E.; Vandelli M. A. Application of atomic force microscopy to characterize liposomes as drug and gene carriers. **Talanta**, v. 73, p. 12-22, 2007.
- [12] Agarwal A.; Saraf S.; Asthana A.; Gupta U.; Gajbhiye V.; Jain N. K. Ligand based dendritic system for tumor targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, *In Press*, 2007.

- [13] Gupta U.; Pharm B.; Agashe H. B.; Pharm M.; Asthana A.; Pharm M.; Jain N. K.; Pharm M. A review of in vitro-in vivo investigations on dendrimers: the novel nanoscopic drug carriers. **Pharmacology**, v. 2, p. 66-73, 2006.
- [14] Saulinier P.; Anton N.; Heurtault B.; Benoit J-P. Liquid crystals and emulsions in the formulation of drug carriers. **C. R. Chimie, In Press**, 2007.
- [15] Goymann C. C. M. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, p. 343-356, 2004.
- [16] Kataoka K.; Harada A.; Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 113-131, 2001.
- [17] Gaucher G.; Dufresne M-H.; Sant V. P.; Kang N. Block copolymer micelles : preparation, characterization and application in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 109, p. 169-188, 2005.
- [18] Xie Z.; Guan H. G.; Chen X.; Lu C.; Chen L.; Hu X.; Shi Q.; Jing X. A novel polymer–paclitaxel conjugate based on amphiphilic triblock copolymer. **Journal of Controlled Release**, v. 117, p. 210-216, 2007.
- [19] Chertok B.; Moffat B. A.; David A. E.; Yu F.; Bergemann C.; Ross B. D.; Yang V. C. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. **Biomaterials**, v. 29, p. 487-496, 2008.
- [20] Letchford K.; Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticles structures: micelles, nanosphers, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 259-269, 2007.
- [21] Soga O.; van Nostrum C. F.; Fens M.; Rijcken C. J. F.; Schiffelers R. M.; Storm G.; Hennink W. E. Thermosensitive and biodegradable polymeric micelles for paclitaxel delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 103, p. 341-353, 2005.
- [22] Lee S. C.; Kim C.; Kwon I. C.; Chung H.; Jeong S. Y. Polymeric micelles of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(ϵ -caprolactone) copolymer as a carrier for paclitaxel. **Journal of Controlled Release**, v. 89, p. 437-446, 2003.
- [23] Torchilin V. P. Micelar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. **Pharmaceutical Research**, v. 24, p. 1-16, 2007.
- [24] Caruthers S. D.; Wickline S. A.; Lanza G. Nanotechnological applications in medicine. **Current opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 26-30, 2007.

- [25] Canevarolo Jr., Sebastião V. **Ciência dos Polímeros – Um Texto Básico para Tecnólogos e Engenheiros**. Artliber Editora. São Paulo, 2002.).
- [26] Stevens, M. P., **Polymer chemistry: an introduction**, 3. ed., New York: Oxford University Press, 1999.
- [27] Kumar, N., Ravikumar, M. N. J., Domb, Biodegradable block copolymers, **Advanced Drug Delivery Reviews**, Volume 53, Issue 1, 3 December 2001, Pages 23-44
- [28] Myers, D., **Surfactant Science and Technology**, 2. ed. New York: VCH Publishers, 1992.
- [29] Rodríguez-Hernández J.; Chécot F.; Gnanou Y.; Lecommandoux S. Towards “smart” nano-objects by self-assembly of block copolymers in solution. **Progress in Polymer Science**, v. 30, p. 691-724, 2005.
- [30] Allen C.; Maysinger D.; Eisenberg A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 16, p. 3-27, 1999.
- [31] Chan S-C.; Kuo S-W.; Lee H-F.; Chang F-C. Synthesis and characterizations of the multiple morphologies formed by the self-assemble of the semicrystalline P4VP-*b*-PCL diblock copolymers. **Polymer**, v. 48, p. 5059-5068, 2007.
- [32] Rijcken C. J. F.; Soga O.; Hennink W. E.; van Nostrum C. F. Triggered destabilisation of polymeric micelles and vesicles by changing polymers polarity: An attractive tool for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 120, p. 131-148, 2007.
- [33] Vinogradov, S.V.; Bronich, T.K.; Kabanov, A.V. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells **Advanced Drug Delivery Reviews**, Volume 54, Issue 1, 17 January 2002, Pages 135-147
- [34] Bader H.; Ringsdorf H.; Schimidt B. Water soluble polymers in medicine. **Angewandte Makromolekulare Chemie**, v. 123/124, p. 457-485, 1984.
- [35] Riess G. Micellization of block copolymers. **Progress in Polymer Science**, v. 28, p. 1107-1170, 2003.
- [36] Yokoyama M.; Kwon G.S.; Okano T.; Sakurai Y.; Seto T; Kataoka K. Preparation of micelle-forming polymer-drug conjugates. **Bioconjugate Chemistry**, v. 3, p. 295-301, 1992.
- [37] Kwon G. S.; Kataoka K. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, p. 295-309, 1995.
- [38] Kataoka K.; Harada A. Selection between block- and homo-polyelectrolytes through polyion complex formation in aqueous medium. **Soft Matter**, v. 4, p. 162-167, 2008.

- [39] Cammas S.; Suzuki K.; Sone C.; Sakurai Y. Kataoka K.; Okano T. Thermo-responsive polymer nanoparticles with a core-shell micelle structure as site-specific drug carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 48, p. 157-164, 1997.
- [40] Harada A.; Kataoka K. Supramolecular assemblies of block copolymers in media as nanocontainers relevant to biological applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 949-982, 2006.
- [41] Foster, S.; Berton, B.; Hentze H.P.; Kramer, E.; Antonietti, M.; Lindner, P. **Macromolecules** 2001, 34, 4610.
- [42] Karine, K.; Astafieva, I.; Eisenberg, A. **Macromolecules** 1994, 27, 6341.
- [43] (a) Gao, Z.; Eisenberg, A **Macromolecules** 1993, 26, 7353. (b) Alexandridis, P.; Nivaggioli, T.; Hatton, T.A. **Langmuir** 1995, 11, 1468.
- [44] (a) Shen, H.; Eisenberg, A. **Macromolecules** 2000, 33, 2561. (b) Pochan, D.J.; Gido, S.P.; Zhou, J.; Mays, J.W.; Whitmore, M.; Ryan, A.J. **J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Phys.** 1997, 35, 2629.
- [45] Keizer, A.; Cohen Stuart, M.A. **Macromolecules** 1999, 32, 8441.
- [46] Goloub, T.; Keizer, A.; Cohen Stuart, M.A. **Macromolecules** 1999, 32, 8441.
- [47] Han, D.C.; Vaidya, N.Y.; Kim, D.; Shin, G.; Yanagushi, D.; Hashimoto, T. **Macromolecules** 2000, 33, 3767.
- [48] (a) Christoff, M.; Silveira, N.P.; Samios, D. **Langmuir**, 2001, 17, 2885. (b) Bohidar, H.B.; Behboudnia, M. **Colloids and Surfaces A: Phys. Chem. and Eng. Aspects** 2001, 178, 313.
- [49] Desjardins, A.; Eisenberg, A. **Macromolecules** 1991, 24, 5779.
- [50] Madema, W.; Zeldenrust, H.; Emeiss, C.A.; **Makromol. Chem.** 1979, 180, 1521.

[51] Schuch, H.; Klinger, J.; Rossmanith, P.; Frechen, T.; Gerst, M.; Feldthusen, J.; Müller, A.H.E. **Macromolecules** 2000, 33, 1734.

[52] Brandon, D.; Kaplan, W.; **Microstructural Characterization of Materials**, John Wiley & Sons Ltd: Londres: 1999. Cap. 2.

[53] (a) Lee, S.C.; Chang, Y.; Yoon, J.S.; Kim, C.; Kwon, I.C.; Kim, Y.H.; Jeong, S.Y. **Macromolecules** 1999, 32, 1847. (b) Vorobyova, O.; Lau, W.; Winnik, M.A. **Langmuir** 2001, 17, 1357. (c) Wen, X.G.; Verral, R.E.; Liu, G.J. **J. Phys. Chem. B** 1999, 103, 2620.

[54] Cheon, J.B.; Jeong, Y.; Cho, C.S. **Polymer** 1999, 40, 2041. (b) Bütün, V.; Billingham, N.C.; Armes, S.P. **J. Am. Chem. Soc.** 1998, 120, 11818.

[55] (a) Cameron, N.S.; Corbierre, M.K.; Eisenberg, A. **Can.J.Chem.** 1999; 77, 1311. (b) Maskos, M.; Harris, J.R. **Macromol. Rapid Comm.** 2001, 22, 271. (c) Loos, K.; Müller, A.H.E. **Biomacromolecules** 2002, 3, 368.

[56] (a) Zhao, J.Q.; Pearce, E.M.; Kwei, T.K.; Jeon, H.S.; Kesani, P.K.; Balsara, N.P.; **Macromolecules** 1995, 28, 1972. (b) Förster S, Zisenis M, Wenz E, Antonietti M. **J. Chem. Phys.** 1996; 104 (24): 9956.

[57] Zhou, Z.; Chu, B. **Macromolecules** 1988, 21, 2548.

[58] Glatter, O.; Schillén K.; Brown, W. **Macromolecules** 1994, 27, 6046.

[59] (a) de Gennes, P.G. **Scaling Concepts in Polymer Physics** 4a. Ed. Cornell University Press: Londres, 1991. (b) Nagarajan, R.; Ganesh, K. **J. Chem. Phys.** 1989, 90, 5843.

[60] Astafieva I.; Zhong X. F.; Eisenberg A. Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions. **Macromolecules**, v. 26, p. 7339-7352, 1993.

- [61] Rösler A.; Vandermeulen G. W. M.; Klok H-A. Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, p. 95-108, 2001.
- [62] Moffitt M.; Khougaz K.; Eisenberg A. Micellization of ionic block copolymers. **Accounts of Chemical Research**, v. 29, p. 95-102, 1996.
- [63] Moreira J. C.; Wang S. H. Síntese de copolímeros em bloco de p-acetoxiestireno com isopreno através de polimerização “viva” via radical livre. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n. 3, p.171-175, 2004.
- [64] Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int J Pharm** 1989;55:R1-4.
- [65] Oh I, Lee K, Kwon HY, Lee YB, Shin SC, Cho CS, Kim CK. Release of adriamycin from poly(-benzyl-glutamate)/poly(ethylene oxide) nanoparticles. **Int J Pharm** 1999;181:107-15.
- [66] Lee J, Cho EC, Cho K. Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(D,L-lactide)-blockpoly(ethylene oxide) micelles. **J Control Release** 2004;94:323-35.
- [67] Akagi T, Kaneko T, Kida T, Akashi M. Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on poly(γ -glutamic acid) with L-phenylalanine as a protein carrier. **J Control Release** 2005;108:226-36.
- [68] Na K, Lee KH, Lee DH, Bae YH. Biodegradable thermo-sensitive nanoparticles from poly(L-lactic acid)/poly(ethylene glycol) alternating multi-block copolymer for potential anti-cancer drug carrier. **Eur J Pharm Sci** 2006;27:115-22.
- [69] Evans, D.F.; Wennerstrom, H. **The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry and Biology and Technology Meet**, 1^a Edição, VCH Publishers: Nova Iorque, 1994. p 135-144.
- [70] Hamley, I.W. Em Block Copolymers in Dilute Solution, **The Physics of Block Copolymers**, Oxford University Press: Nova Iorque, 1988. Cap.3.
- [71] Zhang, L.; Eisenberg, A. **Macromolecules**, 1999, 32, 2239.

[72] Zhang, L.; Eisenberg, A. Self-Assembly of Block Polyelectrolytes **Amphiphilic Block Copolymers**, 2000, Pages 87-113

[73] Zhang, L.; Eisenberg, A. **Polym. Adv. Technol.** 1998, 9, 677.

[74] Lages, F.; Silva-Graça, M.; Lucas, C.; **Microbiology**, 1999, 45, 2577

[75] Yang, X.J.; Kow, L.M.; Funabashi, T.; Mobbs, C.V.; **Diabetes** 1999, 48, 1763

[76] Dieckelmann, G.; Heinz, H.J. Em **The Basics of Industrial Oleochemistry**. Publisher P. Pomp, 1988, 123.

[77] Ooi, T.L.; Yong, K.C.; Hazimah, A.H.; Dzulkefly, K.; Wan-Yunus, W.M.Z.; **J. Oleo Sci.** 2004, 53.

[78] Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, I.; **J. Biosci. Bioeng.** 2001, 92, 405

[79] Thomson, J.C.; He, B.; **Appl. Eng. Agric.** 2006, 22, 261.

[80] González-Pajuelo, M.; Meynial-Salles, I.; Mendes, F.; Soucaille, P.; Vasconcelos, I.; **Appl. Environ. Microbiol.** 2006, 72, 96

[81] Xiu, Z-L.; Chen, X.; Sun, Y-Q.; Zhang, D-J.; **Biochem. Eng J.** 2007, 33, 42

[82] Barbirato, F.; Astruc, S.; Soucaille, P.; Camarasa, C.; Salmon, J.M.; Bories, A.; **Microbiology** 1997, 143, 2423.

[83] Dharmadi, Y.; Murarka, A.; González, R.; **Biotechnol. Bioeng.** 2006, 94, 821.

[84] González-Pajuelo, M.; Andrade, J.C.; Vasconcelos, I.; **J. Ind. Microbiol. Biot.** 2005, 32, 391.

[85] Dabrock, B.; Bahl, H.; Gottschalk, G.; **Appl. Environ. Microb.** 1992, 58, 1233.

[86] Ito, T.; Nakashimada, Y.; Senba, K.; Matsui, T.; Nishio, M.; **J. Biosci. Bioeng.** 2005, 100, 260.

[87] Jarvis, G.N.; Moore, E.R.B.; Thiele, J.H.; **J. Appl. Microbiol.** 1997, 83, 166.

- [88] Pyle, D.; Wen, Z. Production of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid from Biodiesel—Waste Glycerol by Microalgal Fermentation. 2007 **ASABE Annual International Meeting**. [http:// asae.frymulti.com/abstract](http://asae.frymulti.com/abstract)
- [89] Papanikolaou, S.; Muniglia, L.; Chevalot, I.; Aggelis, G.; Marc, I.; **J. Appl. Microb.** 2002, 92, 737.
- [90] Rymowicz, W.; Rywinska, A.; Zarowska, B.; Juszczak, P.; **Chem. Papers** 2006, 60, 391.
- [91] Ashby, R.D.; Solaiman, D.K.Y.; Foglia, T.A. **Biomacromolecules**, 2005, 6, 2106.
- [92] Bormann, E.J.; Roth, M.; **Biotechnol Lett.** 1999, 21, 1059.
- [93] <http://bioquimica.ufcspa.edu.br/pg2/pgs/nutricao/quimicanut/lipidios.pdf>
- [94] Dietary Guidelines Advisory Committee Report 2005. Part D: Science Base, Section 4: Fats. 54 pp.
- [95] Rickman, E., 2004. <<http://www.cas.astate.edu/draganjac/Oleicacid.html>>
- [96] Reuters. 2005. Oleic acid key to olive oil's anti-cancer effect. <<http://www.msnbc.msn.com/id/6807702>>
- [97] Marash, S., Gubler, R., Yagi, K. "Fats and Oils Industry Overview," **Chemical Economics Handbook**, SRI, Menlo Park, California, 2001.
- [98] Modler, R., Gubler, R., Yagi, K., "Natural Fatty Acids," **Chemical Economics Handbook**, SRI, Menlo Park, California, 2002.
- [99] <http://www.nature.com/jid/journal/v129/n10/pdf/jid200993a.pdf>
- [100] Boutevin, B.; Pietrasanta, Y. **Comprehensive Polymer Science**; Eastmond, G. C.; Ledwith, A.; Russo, S.; Sigwalt, P., Eds.: Pergamon, NY, 1989.
- [101] Boutevin, B.; Ameduri, B. **Encyclopedia of Advances Materials**; Bloor, D.; Flemings, M. C.; Brook, R. J.; Mahajan, S., Eds.: Pergamon, Oxford, England, 1994.
- [102] Timothy, D.W., **High-resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**, Elsevier, 1999.

- [103] Evans, J.N.S., **Biomolecular NMR Spectroscopy**, Oxford University Press, Oxford, 1995.
- [104] Abraham, R., Fischer, J., Loftus, P., **Introduction to NMR Spectroscopy**, Wiley, Chichester, 1988.
- [105] Harris, R.K., Becker, E.D., Cabral de Menezes, S.M., Goodfellow, R., Granger, P., **Pure Appl. Chem.** 2001, 73, 1795–1818.
- [106] Bancroft, D.P., Lepre, C.A., Lippard, S.J., **Journal American Chemistry Society**, 1990, 112, 6860–6871.
- [107] Luzyanin, K.V., Haukka, M., Bokach, N.A., Kuznetsov, M.L., Kukushkin, V. Yu., Pombeiro, A.J.L., **Journal Chemistry Society**, Dalton Trans., 2002, 1882–1887.
- [108] Johnson J.F.; “**Chromatography**” em H.F. Mark, N.M. Bikales, C.G. Overberger, G. Menges; “**Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**”, Vol. 3, John Wiley & Sons, New York, (1986).
- [109] Mickey C.D.; “**Separation Technology I - Chromatography**”; Chemical Principles Revisited, 58, 997 (1981).
- [110] Glöckner G.; “Polymer Characterization by Liquid Chromatography” em **Journal of Chromatography Library**, Vol. 34, Elsevier Science Publishers, New York (1987).
- [111] Boletim Water Associates; USA, 1975.
- [112] Tanaka Y. and Takeda J.; “**Gel permeation chromatographic packing and process for producing same utilizing suspension polymerization**”, Patente Americana, nº 4.338.404 (1982).
- [113] Ellingsen T., Ugelstad J., Kulin L. and Flopin P.; “Monosized polymer particles in size-exclusion chromatography”; **Journal Chromatography.**, 514, 1 (1990).
- [114] Ellingsen T., Aune O., Ugelstad J. and Hagen S.; “Monosized stationary phases for chromatography”; **Journal Chromatography**, 535, 147 (1990).
- [115] Poinescu I.C., Vlad C., Carpov A. and Ioanid A.; “On the structure of macroreticular styrene divinylbenzene copolymers”; **Angew. Makromol. Chem.**, 156, 105 (1988).
- [116] Michel, R. C., “**Métodos Físicos Aplicados a Polímeros (MMP-712)**”; Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano, IMA/UFRJ, Rio de Janeiro, 2012.
- [117] Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Spectrometric identification of organic compounds, **Journal of Chemical Education**, 39 (1962) 546.
- [118] Sparkman, O. D., Mass spectrometry desk reference. Pittsburgh 2000.

- [119] Winnik, M. A., Bystryak, S. M. Interaction of Pyrene-Labeled Poly(ethylene imine) with Sodium Dodecyl Sulfate in Aqueous Solution. **Macromolecules**, 1999, 32, 624-632.
- [120] Winnik, F. M., Regismond, S. T. A. Fluorescence methods in the study of the interactions of surfactants with polymers. **Colloids Surf., A**. 1996, 118, 1 - 39.
- [121] Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolivar, J.A., Carnero Ruiz, C., On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. **Journal of Colloid and Interface Science** 258 (2003) 116–122).
- [122] Pecora, R.; Berne, B. J. **Dynamic Light Scattering with applications to chemistry, biology and physics**. New York; **Dover Publications**, Inc. 2000.
- [123] Wolfgang, S., **Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions**, Springer, Berlin, 2007.
- [124] Magenheim, B.; Benita, S., Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.
- [125] Bootz, A.; Vogel, V.; Schubert, D.; Kreuter, J., Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, p. 369-375, 2003.
- [126] Burchard, W.; Richtering, W.; **Progress in Colloid and Polymer Science**. 1989, 80, 151.
- [127] Ruska, E. The emergence of the electron microscope: Connection between Realization and First Patent Application, Documents of an Invention **Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research**, Volume 95, Issues 1–3, April–June 1986, Pages 3-28.
- [128] Williams, D.B.; Carter, C.B. **Transmission Electron Microscopy: a Textbook for Materials Science**, **Plenum Press**: Nova Iorque, 1996. vol 1, p 5.
- [129] Watt, I., **The Principles and Practice of Electron Microscopy**; 2a. Ed, Cambridge University Press: Nova Iorque, 1997. p 18.

- [130] Brandon, D.; Kaplan, W.; *Microstructural Characterization of Materials*, John Wiley & Sons Ltd: Londres: 1999. Cap. 1 e 4.
- [131] Miles, M., **Science** 277 (1997) 1845.
- [132] Bonnell, D. A., Huey, B. D., *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy. Theory, Techniques, and Applications*, 2.^a ed., Wiley-VCH, New York, 2001, capítulo 2, 7.
- [133] Wiesendanger, R., *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Methods and Applications*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1994.
- [134] Robin, J. J.; Jerome, R.; Henriouille-Granville M.; Boutevin, B.; Telechelic polymers: Synthesis, characterization and applications; **Progress in Polymer Science**, Volume 16, Issue 5, October 1991, Pages 837-906
- [135] Boutevin, B; Boyer, C.; Robin, J. J.; **Polymer** 2004, 45, 7863
- [136] Rokicki, G.; Rakoczy, P.; Parzuchowski, P.; Sobiecki, M., **Green Chemistry**, 2005, 7, 529-539.
- [137] Yang, L.; Qi, X.; Liu, P.; El Ghzaoui, A.; Li, S., Aggregation behavior of self-assembling polylactide/poly(ethylene glycol) micelles for sustained drug delivery, **International Journal of Pharmaceutics**, 394 (2010) 43–49.
- [138] Klug, P.; Pilz, F. M.; Kluth, G.; Steffanut, P.; Meder, M. In Cosmetic or pharmaceutical compositions, emulsions comprising modified polysiloxanes with at least one carbonate group; **Chemical Indexing Equivalent** to 149:408948 (EP), 2009.
- [139] Wilhelm, M., et al., Polymer micelle formation .3. poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water - a fluorescence probe study. **Macromolecules**, 1991, 24(5): p. 1033-1040.
- [140] Kellarakis, A., Havedraki, V., Yu, G.-E., Derici, L., Booth, C., **Macromolecules**, 1998, 31, 944.
- [141] Attwood, D., Zhou, Z., Booth., C., **Expert Opin. Drug Delivery.**, 2007, 4, 533.
- [142] Vamvakaki M, Papoutsakis L, Katsamanis V, Afchoudia T, Fragouli PG, Iatrou H, Hadjichristidis N, et al. Micellization in pH-sensitive amphiphilic block copolymers in aqueous media and the formation of metal nanoparticles. **Faraday Discuss** 2005;128:129–47.
- [143] Liu, S. Y., Zhu, H., Zhao, H. Y., Jiang, M., & Wu, C. Interpolymer hydrogen bonding complexation induced micellization from polystyrene-b-poly(methyl methacrylate) and PS(OH) in toluene. **Langmuir**, 2000, 16, 3712–3717.

