

Karine Modolon Zepon

**ESTUDO DA AUTO-ASSOCIAÇÃO DE COPOLÍMEROS
HÍBRIDOS DIBLOCOS EM MEIO AQUOSO E ORGÂNICO:
TRANSIÇÃO MORFOLÓGICA SOLVENTE-INDUZIDA E
APLICAÇÃO COMO *TEMPLATE* NA PREPARAÇÃO DE
NANOESTRUTURAS POROSAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

Co-orientador: Prof. Dr. Alfredo Tibúrcio Nunes Pires

Florianópolis
2015

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

Zepon, Karine

Estudo da auto-associação de copolímeros híbridos diblocos em meio aquoso e orgânico: transição morfológica solvente induzida e aplicação como template na preparação de nanoestruturas porosas / Karine Zepon ; orientador, Valdir Soldi ; coorientador, Alfredo Tibúrcio Nunes Pires. - Florianópolis, SC, 2015.

139 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. Físico-química. 3. Copolímeros híbridos. 4. Auto-associação. 5. Sistemas nanoparticulados sólidos e porosos. I. Soldi, Valdir. II. Tibúrcio Nunes Pires, Alfredo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Karine Modolon Zepon

**ESTUDO DA AUTO-ASSOCIAÇÃO DE COPOLÍMEROS
HÍBRIDOS DIBLOCOS EM MEIO AQUOSO E ORGÂNICO:
TRANSIÇÃO MORFOLÓGICA SOLVENTE-INDUZIDA E
APLICAÇÃO COMO *TEMPLATE* NA PREPARAÇÃO DE
NANOESTRUTURAS POROSAS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

Florianópolis, 07 de dezembro de 2015

Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.
Coordenador do Programa

Banca examinadora

Prof. Dr. Valdir Soldi
(Orientador – UFSC)

Prof. Dr. Alexandre Luís Parize
(DQ – UFSC)

Prof. Dr. Alfredo T. N. Pires
(Co-orientador – UFSC)

Prof^a. Dra. Irene C. K.
Guerreiro (UFRGS – RS)

Prof^a. Dra. Rosane A. Ligabue
(Relatora – PUC-RS)

Prof. Dr. Luiz A. Kanis
(UNISUL– SC)

*Dedico este trabalho a todos aqueles
que compartilharam comigo ensinamentos
e experiências, tornando este período
tão especial para mim.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Ele...

Ao meu orientador Prof. Dr. Valdir Soldi pela oportunidade, confiança e orientação.

Ao meu co-orientador Prof. Alfredo Tibúrcio pelas agradáveis conversas, aconselhamentos e orientação.

Ao Prof. Dr. Luiz Kanis pelo seu constante incentivo durante esses mais de 10 anos de convívio, tornando-se para mim um modelo de professor e pesquisador.

Ao orientador do doutorado no exterior Dr. Redouane Borsali pela oportunidade e orientação.

Aos pesquisadores e funcionários do CERMAV, Sami Halila, Cyrille Rochas, Christine Lancelon-Pin, Isabelle Caldara e Christophe Travelet.

Ao pesquisador Dr. Issei Otsuka pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência e pelo constante incentivo nos momentos desanimadores.

Aos amigos/família de coração Cony Gauche, Clarice Zornio e Luis Silva por tornarem minha estadia em qualquer lugar do mundo tão agradável e especial.

No entanto, minha estadia na França não seria tão completa sem a valiosa ajuda do Monsieur Mariano. Marcos, obrigado por ter sido companheiro em todos os momentos, por ouvir minhas angustias, pela paciência, pelos abraços e por me motivar todos os dias a ser uma pessoa melhor.

Aos amigos e colegas do Polimat, em especial a Fernanda, Marly e a Carmen.

Aos amigos e colegas do CERMAV, em especial a Carol, Nívea, Soraia, Yoko, Anne e Djamilia.

Aos amigos e colegas da UNISUL/TECFARMA

*Às meninas do mestrado, Carla, Ida, Deyse, Denise, et al., amigas
sempre presentes e exportadoras de pipocas Bilu.*

*À Jaira e Jennifer pela acolhida em Florianópolis e a Luiza, pelos
abraços de corredor que tanto me acalentaram nos momentos
angustiantes.*

Ao Jadir e Grace, sempre muito prestativos.

À minha Família...

Aos membros da banca.

*A CAPES e o CNPq pelo auxílio financeiro no Brasil e na França,
respectivamente.*

*"A vida é muito curta para ser pequena."
Benjamin Disraeli*

RESUMO

Este trabalho descreve o comportamento de auto-associação em solução de um copolímero híbrido dibloco, investigando o efeito do solvente nas propriedades morfológicas e a aplicabilidade como modelo na preparação de nanoestruturas porosas. O copolímero foi obtido a partir da acoplagem da maltoheptaose (bloco natural) ao poli(metacrilato de metila) (bloco sintético), sendo sua auto-associação investigada em água e acetona. Técnicas de espectroscopia, microscopia, ressonância magnética e espalhamento de luz foram empregues na caracterização morfológica e dimensional dos sistemas nanoparticulados. Em água, a auto-associação do copolímero maltoheptaose-*bloco*-poli(metacrilato de metila) (MH-*b*-PMMA) leva à formação de *large compound micelles* (LCMs) esféricas com valores de raio hidrodinâmico (R_H) entre 14–21 nm para o copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e 16–23 nm para o copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) dependendo das condições de velocidade de agitação e concentração do copolímero. Em acetona, o copolímero se auto-associa em micelas esféricas do tipo reversa com valores de R_H entre 5–8 nm para o copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e de *ca.* 5 nm para MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k). Para ambos os solventes, houve também a formação de agregados micelares.

A habilidade dos sistemas nanoparticulados obtidos a partir da auto-associação dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em inverter sua estrutura conformacional em resposta a mudança na polaridade do solvente foi confirmada pelas técnicas de RMN de ^1H , DLS e ângulo de contato. Logo, a adição de um excesso de água à solução de acetona leva à uma inversão conformacional de micelas do tipo reversa para LCMs. Esta inversão conformacional foi ainda confirmada por espectroscopia de fluorescência mediante à encapsulação e transferência numa interface polar/apolar do corante vermelho do Nilo (corante hidrofóbico).

A preparação de nanoestruturas porosas usando LCMs reticuladas como modelo foi investigada pelas técnicas de espalhamento de luz, de microscopia eletrônica e ressonância magnética. Usando um protocolo de nanoprecipitação, micelas (R_H de *ca.* 10 nm) e agregados micelares (R_H de *ca.* 64 nm) foram obtidas a partir da auto-associação do copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k). A reticulação dos segmentos de maltoheptaose presentes na corona micelar usando DVS como agente reticulante foi confirmada por espectroscopia de infravermelho. Esta estratégia visou fornecer às LCMs o suporte estrutural necessário para evitar sua ruptura após a remoção dos segmentos de PMMA presentes

no núcleo micelar *via* fotodegradação por exposição à radiação ultravioleta ($\lambda = 254$ nm).

A capacidade do copolímero em se auto-associar em meio aquoso e orgânico, invertendo sua estrutura mediante mudança na polaridade do meio, aliada à aplicabilidade como modelo na preparação de nanoestruturas porosas faz do mesmo um candidato em potencial frente a sua aplicação na elaboração de sistemas de liberação direcionada de fármaco, de biossensores, entre outros.

Palavras-chave: Auto-associação; copolímero híbrido dibloco; micelas.

ABSTRACT

This study describes the state-solution self-assembly behavior of a hybrid diblock copolymer aiming to investigate the solvent effect upon the morphological properties and also the applicability as template for the preparation of porous nanostructures. The copolymer was obtained from the click of maltoheptaose (natural block) to poly(methyl methacrylate) (synthetic block), which their self-assembly was investigated in water and acetone. Light scattering, microscopy, spectroscopy and magnetic resonance techniques were used to characterize nanoparticle structure. In water, maltoheptaose-*block*-poly(methyl methacrylate) (MH-*b*-PMMA_{*x*}) self-assemble into spherical large compound micelles (LCMs) with hydrodynamic radii values (R_H -values) around 14–21 nm for the MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) and 16–23 nm for the MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k). The R_H -values were dependent on the stirring speed and also of the copolymer concentration. In acetone, the copolymer self-assemble into spherical reverse micelle-type with R_H -values around 5–8 nm for the MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) and *ca.* 5 nm for the MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k). Both solvents showed the presence of micellar aggregates.

The ability of the glyco-nanoparticles obtained from the MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) and MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) self-assembly in change their conformational structure in response to changes in the solvent polarity was determined by ^1H NMR, DLS and water contact angle. The addition of excess water to the acetone copolymer solution leads to a conformational inversion of the reverse micelle-type to LCMs. This conformational inversion of the glyco-nanoparticles was further confirmed by encapsulation and release in a polar-apolar interface of hydrophobic guest molecule, Nile red, characterized by fluorescence spectroscopy.

The preparation of hollow nanoparticles using cross-linked LCMs as template was also investigated by DLS, SLS, MEV, TEM and ^1H NMR. Using a nanoprecipitation protocol, micelles (R_H *ca.* 10 nm) and micellar aggregates (*ca.* 64 nm) were obtained from the MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) self-assembly. The infrared spectroscopy was used to confirm that the maltoheptaose segments present in the micellar corona were crosslinked with DVS (crosslinker). This approach aimed to give to the LCMs the structural support needed to avoid their rupture after removing the PMMA segments from their core by photodegradation under ultraviolet radiation ($\lambda = 254$ nm).

The copolymer ability to self-assembly in aqueous and organic media changing their structure in response to changing in the media polarity combined with their applicability as template for the fabrication of porous nanostructures makes it a potential candidate for the development of triggered-release nanoparticles, biosensors, among others.

Keywords: Self-assembly; hybrid diblock copolymer; micelles.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Linha do tempo mostrando os avanços relativos à pesquisa e comercialização de sistemas nanoparticulados nos últimos 50 anos..... 34
- Figura 2. Exemplos de sistemas nanoparticulados obtidos a partir de homopolímeros e copolímeros. 35
- Figura 3. Regra empírica que relaciona a morfologia esperada a partir da auto-associação de copolímeros com diferentes porcentagens de volume do bloco hidrofílico (adaptado de DISCHER e AHMED, 2006). 39
- Figura 4. Sistemas nanoparticulados obtidos pela dissolução do copolímero PAA-*b*-PS em uma mistura DMF/água igual a 94.5/5.5 (m/m) com diferentes concentrações: (A) 1.0; (B) 2.0; (C) 2.5; (D) 3.0 e (E) 3.5% em massa (ZHANG; EISENBERG, 1999a)..... 40
- Figura 5. Sistemas nanoparticulados obtidos a partir da auto-associação do copolímero PAA₁₈-*b*-PS₂₀₀ em diferentes misturas de DMF/THF igual a: (A) 100/0; (B) 95/5; (C) 90/10; (D) 75/25; (E) 60/40; (F) 50/50; (G) 33/67 e (H) 0/100% em massa (YU; ZHANG; EISENBERG, 1998). 42
- Figura 6. Comportamento de sistemas nanoparticulados esféricos e não-esféricos nos vasos sanguíneos (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015). 44
- Figura 7. Disposição das moléculas de poli(etileno glicol) sobre a superfície de sistemas nanoparticulados quando recoberta em (a) menor e (b) maior quantidade (OWENS; PEPPAS, 2006)..... 46
- Figura 8. Classificação dos copolímeros considerando a disposição das unidades de repetição na cadeia macromolecular..... 47
- Figura 9. Efeito hidrofóbico: disposição das moléculas de água em torno do bloco hidrofóbico antes e após o processo de auto-associação de um copolímero dibloco. 48
- Figura 10. Comportamento em solução do copolímero dex-*b*-PS de acordo com a fração em mol de PS e o solvente (adaptado de HOUGA *et al.*, 2009)..... 55

Figura 11. Representação esquemática da estrutura química do PMMA.	56
Figura 12. Representação esquemática da estrutura química da maltoheptaose.	58
Figura 13. Representação esquemática da estrutura química do copolímero MH- <i>b</i> -PMMA.	62
Figura 14. Intensidade de espalhamento de luz normalizada (I_{SC}^N) vs. diferentes frações em massa de água obtida a partir de soluções (1 g L^{-1}) de MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(2.4k) monitorada em $\theta = 90^\circ$. Gráfico <i>inset</i> mostra a I_{SC}^N para soluções mais concentradas, 5 g L^{-1}	70
Figura 15. Intensidade de espalhamento de luz normalizada (I_{SC}^N) vs. diferentes frações em massa de água obtida a partir de soluções (1 g L^{-1}) de MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(4.8k) monitorada em $\theta = 90^\circ$. Gráfico <i>inset</i> mostra a I_{SC}^N para soluções mais concentradas, 5 g L^{-1}	70
Figura 16. (A) Função de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) e correspondente distribuição do raio hidrodinâmico ($A(q,t)$) (<i>z-average</i>) monitorada em $\theta = 90^\circ$; (B) Frequência de relaxação $\Gamma(1/\tau)$ vs. o quadrado do módulo do vetor de espalhamento q^2 para MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(2.4k).	72
Figura 17. (A) Função de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) e correspondente distribuição do raio hidrodinâmico ($A(q,t)$) (<i>z-average</i>) monitorada em $\theta = 90^\circ$; (B) Frequência de relaxação $\Gamma(1/\tau)$ vs. o quadrado do módulo do vetor de espalhamento q^2 para MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(4.8k).	73
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H do copolímero MH(1.2k)- <i>b</i> - PMMA(2.4k) dissolvido numa mistura binária de acetona- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$ na proporção de 0.70/0.30 (m/m).....	74
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do copolímero MH(1.2k)- <i>b</i> - PMMA(4.8k) dissolvido numa mistura binária de acetona- d_6 e D_2O na proporção 0.78/0.22 (m/m).	75
Figura 20. Gráfico da I_{SC}^N vs. logaritmo da concentração dos copolímeros MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(2.4k) e MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(4.8k). 76	
Figura 21. Funções de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) para as soluções de MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(2.4k) com diferentes concentrações preparadas por	

diluição direta em água sob agitação igual a: (A) 100 rpm; (B) 500 rpm; e (C) 1000 rpm. Gráfico *inset* apresenta as distribuições de raio hidrodinâmico (A (q,t)) (*z-average*) monitoradas em $\theta = 90^\circ$ 78

Figura 22. Funções de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) para as soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) com diferentes concentrações preparadas por diluição direta em água sob agitação igual a: (A) 500 rpm e (B) 1000 rpm. Gráfico *inset* apresenta as distribuições de raio hidrodinâmico (A (q,t)) (*z-average*) monitoradas em $\theta = 90^\circ$ 82

Figura 23. Distribuição de tamanho por número para soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) com concentração igual a 0.4 g L^{-1} obtidas por diluição direta em água sob agitação de: (A) 100; (B) 500; e (C) 1000 rpm. 86

Figura 24. Distribuição de tamanho por número para soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) com concentração igual a 0.4 g L^{-1} obtidas por diluição direta em água sob agitação de: (A) 500 e (B) 1000. 87

Figura 25. Micrografias obtidas por MET das soluções (0.4 g L^{-1}) de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) preparadas por diluição direta em água sob agitação igual a: (A) 100; (B) 500; e (C) 1000 rpm. 88

Figura 26. Micrografias das soluções (0.4 g L^{-1}) de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparadas por diluição direta em água sob agitação igual a: (A) 500; e (B) 1000 rpm. 89

Figura 27. Funções de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) para as soluções de (A) MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e (B) MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) com diferentes concentrações preparadas por diluição direta em acetona. Gráfico *inset* apresenta as distribuições de raio hidrodinâmico (A (q,t)) (*z-average*) monitoradas em $\theta = 90^\circ$ 90

Figura 28. Espectros de RMN de ^1H obtidos a partir das soluções de (A) MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e (B) MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparadas *via* diluição direta em acetona- d_6 92

Figura 29. Imagem topográfica (A) com a respectiva imagem de fase (B) e secção transversal (C) para a solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) preparada *via* diluição direta em acetona. 94

Figura 30. Imagem topográfica (A) com a respectiva imagem de fase (B) e secção transversal (C) para a solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparada *via* diluição em acetona. 94

Figura 31. Distribuição do raio hidrodinâmico aparente para as soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) obtidas por diluição direta em acetona (A) e após adição de excesso de água à essa solução (B). 95

Figura 32. Imagem da gota de água sobre o substrato recoberto com soluções de (A) MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e (B) MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparadas em acetona; e soluções de (C) MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e (D) MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) obtidas após adição de 9 mL de água. 97

Figura 33. Espectros RMN de ^1H das soluções do (A) copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) quando dissolvido na mistura binária acetona- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$, em acetona- d_6 (por diluição direta) e após adição de um excesso de D_2O e do (B) copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) quando dissolvido na mistura binária acetona- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$, em acetona- d_6 (por diluição direta) e após adição de um excesso de D_2O 99

Figura 34. Espectros de fluorescência do corante vermelho do Nilo em água (linha azul) e encapsulado nos sistemas nanoparticulados obtidos a partir dos copolímeros (A) MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e (B) MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) antes (linha preta) e após (linha vermelha) transferência numa interface polar/apolar. *Inset* aparência da solução antes (lado esquerdo) e após (lado direito) transferência do corante a partir dos sistemas nanoparticulados presente em água (fase inferior) para o tolueno (fase superior). 100

Figura 35. (A) Função de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) e correspondente distribuição do raio hidrodinâmico (A (q, t)) (*z-average*) monitorada em $\theta = 90^\circ$; (B) Γ vs. q^2 para a solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k). 107

Figura 36. (A) DLS, distribuição de tamanho por número e (B) MET, micrografia dos sistemas nanoparticulados obtidos da auto-associação do MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em água. 108

Figura 37. (A) Espectros de FTIR para (I) DVS puro, (II) solução não-reticulada e (III) solução reticulada de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) e (B) espectros de FTIR na região de 1045-1200 cm⁻¹ 110

Figura 38. (A) Valores de R_H aparente para a (□) solução não-reticulada de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) (modo de relaxação lento), (◻) solução não-reticulada de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) (modo de relaxação rápido) e (Δ) solução reticulada de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em função do tempo de exposição à radiação UV ($\theta = 90^\circ$) e (B) aparência das soluções não-reticulada (lado esquerdo) e reticulada (lado direito) de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) após 48 horas de exposição à radiação UV. 111

Figura 39. (A) Função de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) e (B) distribuição do raio hidrodinâmico aparente ($\theta = 90^\circ$) de uma solução de maltoheptaose pura em concentração igual a 2 g L⁻¹ 113

Figura 40. Espectros de RMN de ¹H para a solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) quando exposta à radiação UV em diferentes tempos. . 113

Figura 41. Mecanismo de fotólise do PMMA induzido pela exposição à radiação UV ($\lambda = 254$ nm) (adaptado de WOCHNOWSKI; ELDIN; METEV, 2005)..... 114

Figura 42. (A) Função de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) e correspondente distribuição do raio hidrodinâmico ($A(q,t)$) (*z-average*) monitorada em $\theta = 90^\circ$; (B) Γ vs. q^2 para a solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) reticulada após exposição à radiação UV por 24 horas. 115

Figura 43. Gráfico de Guinier obtido da parte elástica da luz espalhada da solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) reticulada após exposição à radiação UV por 24 horas..... 116

Figura 44. Fotomicrografias de MEV-FEG obtidas a partir da solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) reticulada antes (A) e após (B) exposição à radiação UV..... 118

Figura 45. Fotomicrografias de MET obtidas a partir da solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) reticulada antes (A) e após (B) exposição à radiação UV..... 118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de R_H das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) com diferentes valores de concentrações obtidas a partir da diluição direta em água em diferentes velocidades de agitação..... 81

Tabela 2. Valores de R_H das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) com diferentes valores de concentrações obtidas a partir da diluição direta em água em diferentes velocidades de agitação..... 83

Tabela 3. Valores de R_H das soluções obtidas a partir da diluição direta em acetona dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) nas diferentes concentrações investigadas..... 91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A(t) – Distribuição do tempo de relaxação
AC – Acetato de celulose
ACA – Ângulo de contato aparente
AFM – Microscopia de força atômica
CMC – Concentração micelar crítica
CMD – Carboximetildextrana
 $g^{(2)} - 1$ – Função de correlação temporal
D – Coeficiente aparente de difusão
DLS – Espalhamento de luz dinâmico
DMSO – Dimetilsulfóxido
DVS – Divinil sulfona
RMN de ^1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
 $I(q)$ – Intensidade de luz espalhada em função da magnitude do vetor de espalhamento
 I_{SC}^{N} – Intensidade de espalhamento de luz normalizada
LCMs – *Large compound micelles*
LCST – *Low critical solution temperature*
kDa – Quilo Dalton
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
MEV-FEG – Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo
MH – Maltoheptaose
MPEO – Metoxi-poli(óxido etileno)
 N_{AG} – Número de agregação
PAA-*b*-PS – Poli(ácido acrílico)-*b*-poli(estireno)
PMMA – Poli(metacrilato de metila)
PNIPAM – Poli(N-isopropilacrilamida)
PTFE – Poli(tetra flúor etileno)
 q – Vetor de espalhamento
 R_{H} – Raio hidrodinâmico
 R_{G} – Raio de giração
SLS – Espalhamento de luz estático
UCST – *Upper critical solution temperature*
UV – Ultravioleta
 Γ – Frequência de relaxação
 δ – Parâmetro de solubilidade de Hildebrand
 η – Viscosidade
 n – Índice de refração
 θ – Ângulo de contato ou espalhamento

λ – Comprimento de onda
 τ – Tempo de decaimento
 κ – Constante de Boltzmann

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	29
1.1 OBJETIVOS	30
1.1.1 Objetivo Geral.....	31
1.1.2 Objetivos Específicos	31
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
2.1 NANOTECNOLOGIA	33
2.2 ASPECTOS GERAIS – SISTEMAS NANOPARTICULADOS	35
2.2.1 Morfologia dos sistemas nanoparticulados	35
2.2.2 Racionalização morfológica e dimensional: parâmetros moleculares	37
2.2.2.1 Composição química	37
2.2.2.2 Fração em volume dos blocos hidrofílico e hidrofóbico	39
2.2.3 Racionalização morfológica e dimensional: parâmetros de solução	39
2.2.3.1 Efeitos da concentração do copolímero em solução	40
2.2.3.2 Efeitos do solvente na auto-associação em solução.....	41
2.2.4 Propriedades morfológicas e dimensionais vs. resposta <i>in vivo</i>	42
2.2.4.1 Efeito da geometria.....	43
2.2.4.2 Efeito da carga superficial	44
2.2.4.3 Efeito da natureza química da corona.....	45
2.2.4.4 Efeito do tamanho dos sistemas nanoparticulados	46
2.3 COPOLÍMEROS EM BLOCO.....	47
2.3.1 Definição	47
2.3.2 Princípios da auto-associação de copolímeros em solução	47
2.3.2.1 Estabilidade termodinâmica de sistemas nanoparticulados constituídos por copolímeros anfífilicos.....	49
2.3.2.2 Estabilidade cinética de sistemas nanoparticulados constituídos por copolímeros anfífilicos.....	50
2.3.3 Copolímeros responsivos	51
2.3.4 Copolímeros híbridos em bloco.....	53
2.3.4.1 Visão Geral.....	53
2.3.4.2 Bloco Sintético – Poli(metacrilato de metila) (PMMA) .	55
2.3.4.3 Bloco Natural – Maltoheptaose	58

CAPÍTULO 3. ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE AUTO-ASSOCIAÇÃO DE COPOLÍMEROS HÍBRIDOS DIBLOCOS EM MEIO AQUOSO E ORGÂNICO: TRANSIÇÃO MORFOLÓGICA INDUZIDA POR SOLVENTE	61
3.1 INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO	61
3.2 MATERIAIS	62
3.3 EFEITO DO SOLVENTE SOBRE O COMPORTAMENTO DE AGREGAÇÃO EM SOLUÇÃO DOS COPOLÍMEROS HÍBRIDO DIBLOCO	63
3.3.1 Avaliação do comportamento de agregação do MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(2.4k) e MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(4.8k) numa mistura binária dos solventes acetona e água	63
3.3.2 Determinação do tamanho relativo dos copolímeros MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(2.4k) e MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(4.8k) dissolvidos em uma mistura binária acetona e água.....	63
3.3.3 Investigação da conformação estrutural dos copolímeros MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(2.4k) e MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(4.8k) dissolvidos em uma mistura binária acetona e água.....	64
3.4 AUTO-ASSOCIAÇÃO EM ÁGUA E ACETONA	64
3.4.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)	64
3.4.2 Auto-associação <i>via</i> diluição direta em água	64
3.4.3 Auto-associação <i>via</i> diluição direta em acetona	65
3.4.4 Efeito da polaridade do solvente.....	65
3.4.4.1 Avaliação do efeito da polaridade do solvente sobre a morfologia dos sistemas nanoparticulados	65
3.4.5 Propriedade de encapsulação e transferência do corante vermelho do Nilo	65
3.4.5.1 Encapsulação do corante vermelho do Nilo nos sistemas nanoparticulados obtidos <i>via</i> técnica de nanoprecipitação.....	65
3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS	66
3.5.1 Espalhamento de Luz Dinâmico e Estático (DLS e SLS)	66
3.5.2 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	67
3.5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	67
3.5.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)	67
3.5.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹ H).....	68

3.5.6 Ângulo de Contato Aparente (ACA)	68
3.5.7 Espectroscopia de Fluorescência	68
3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.6.1 Comportamento de agregação do MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) em diferentes misturas binárias de acetona e água	69
3.6.2 Determinação do tamanho relativo das cadeias individuais dos copolímeros MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k)	72
3.6.3 Conformação estrutural dos copolímeros MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k)	74
3.6.4 Determinação da CMC dos copolímeros MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k)	76
3.6.5 Auto-associação em água <i>via</i> diluição direta	77
3.6.5.1 Auto-associação em água – DLS	77
3.6.5.2 Auto-associação em água – NTA	85
3.6.5.3 Auto-associação em água – MET	87
3.6.6 Auto-associação em acetona <i>via</i> diluição direta	89
3.6.6.1 Auto-associação em acetona – DLS	89
3.6.6.2 Auto-associação em acetona – RMN de ¹ H.....	92
3.6.6.3 Auto-associação em acetona – AFM	93
3.6.7 Efeito da polaridade do solvente	95
3.6.7.1 Propriedade solvente-responsiva – DLS e ACA.....	95
3.6.7.2 Propriedade solvente-responsiva – RMN de ¹ H	98
3.6.7.3 Propriedade solvente-responsiva – Espectroscopia de fluorescência.....	100
3.7 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO	102

CAPÍTULO 4. OBTENÇÃO DE LCMs POROSOS A PARTIR DA FOTODEGRADAÇÃO DO NÚCLEO MICELAR INDUZIDA POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA..... 103

4.1 INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO	103
4.2 MATERIAIS	104
4.3 AUTO-ASSOCIAÇÃO DO COPOLÍMERO MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k)	104
4.4 RETICULAÇÃO DA CORONA DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS	104
4.5 RADIAÇÃO UV	105

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS	105
4.6.1 Espalhamento de Luz Dinâmico e Estático (DLS e SLS)	105
4.6.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	106
4.6.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H).....	106
4.6.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	106
4.6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura com canhão de emissão de campo (MEV-FEG)	107
4.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
4.7.1 Auto-associação por nanoprecipitação do copolímero MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(4.8k) – DLS e MET	107
4.7.2 Reticulação da corona micelar - FTIR.....	109
4.7.3 Exposição dos sistemas nanoparticulados de MH(1.2k)- <i>b</i> - PMMA(4.8k) à radiação UV – DLS, SLS e RMN de ^1H	111
4.7.4 Caracterização morfológica dos sistemas nanoparticulados de MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(4.8k) após exposição à radiação UV – MEV-FEG e MET.....	117
4.8 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO	119
5. CONCLUSÃO	121
6. REFERÊNCIAS.....	123
7. APÊNDICE.....	139

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Copolímeros anfifílicos em bloco – moléculas que apresentam em sua estrutura ao menos um segmento solvofílico e um solvofóbico ligados entre si covalentemente – são capazes de se auto-associar em solução, no sentido da orientação em direção ao solvente do segmento solvofílico e em direção ao núcleo da partícula do segmento solvofóbico (GRÖSCHEL; MÜLLER, 2015). Logo, o processo de auto-associação em solução permite a formação espontânea de diferentes sistemas micro- ou nanoparticulados que incluem, mas não se limitam a, micelas esféricas e cilíndricas, vesículas e bicamadas (MAI; EISENBERG, 2012)

Particularmente, há uma grande atenção voltada ao planejamento e a síntese de novos copolímeros anfifílicos em bloco, uma vez que as características de cada bloco podem ser variadas de forma independente (KUMARI *et al.*, 2015). Desta forma, uma ampla gama de possibilidades quanto à variação na composição química, na massa molecular, no número, sequência e no tamanho relativo dos blocos podem ser acessadas (SMART *et al.*, 2008; VENKATARAMAN *et al.*, 2011). Esta infinidade de possibilidades na etapa de planejamento e síntese de copolímeros em bloco tem fomentado a aplicação destes nas mais diversas áreas, especialmente nas áreas médica e farmacêutica (HEIN; LIU; WANG, 2008).

E, mesmo sabendo que a síntese do primeiro copolímero data meados dos anos 50 (JATZKEWITZ, 1954), somente nas últimas três décadas é que a popularização do uso destes nas áreas médica e farmacêutica deu-se de forma efetiva (LEE; YUN; PARK, 2015). Estas áreas, por sua vez, vêm primando pelo desenvolvimento de sistemas nanoparticulados que mimetizem estruturas celulares (MAGNANI; ERNST, 2009) e sistemas responsivos que têm sua estrutura alterada mediante exposição à estímulos externos (LI *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de sistemas nanoparticulados miméticos tornou-se, hodiernamente, uma realidade factível diante da possibilidade de síntese de copolímeros anfifílicos híbridos *i.e.*, copolímeros que apresentam ao menos um bloco composto por um polímero sintético acoplado a um bloco composto por um polímero natural (OTSUKA *et al.*, 2010). Logo, a auto-associação destes em água leva à formação de sistemas micro- ou nanoparticulados cuja parte externa é composta pelo bloco de polímero natural, enquanto que sua parte interna é composta pelo bloco sintético (DONG, 2011). A presença do bloco natural na

parte externa desses sistemas nanoparticulados permite que o mesmo mimetize a superfície celular, haja visto que todas as células humanas são recobertas por uma camada de carboidratos cuja função está atrelada ao bioreconhecimento celular (ERNST; MAGNANI, 2009).

As áreas médica e farmacêutica experimentam igualmente um rápido progresso quanto ao desenvolvimento de sistemas nanoparticulados responsivos, *i.e.*, sistemas cuja estrutura varia em resposta à estímulos externos que incluem, variação no pH (HOUGA *et al.*, 2009), temperatura (OTSUKA *et al.*, 2012) e solvente (HEVUS *et al.*, 2012). Com efeito, o controle sobre a auto-associação/dissociação do copolímero *via* estímulo externo reflete diretamente na eficiência de encapsulação e no comportamento de liberação do agente ativo (SAVOJI; ZHU, 2015).

Em consonância com o supracitado, este trabalho de tese trata da preparação de sistemas nanoparticulados a partir da auto-associação em água e acetona de um copolímero híbrido dibloco – maltoheptaose-*bloco*-poli(metacrilato de metila). Assim, a primeira etapa deste trabalho visou avaliar o efeito (1) dos parâmetros moleculares (razão do bloco hidrofóbico/hidrofílico) e (2) de solução (concentração do copolímero e velocidade de agitação) sobre as características estruturais e dimensionais dos sistemas nanoparticulados obtidos a partir da diluição direta em água e acetona do copolímero em questão. Ainda, dando seguimento a esta etapa, foi avaliado a capacidade dos sistemas nanoparticulados em (3) encapsular um corante hidrofóbico e (4) liberá-lo numa interface polar/apolar devido à inversão estrutural decorrente da mudança na polaridade do meio.

A segunda etapa deste trabalho teve por intento investigar a uso dos sistemas nanoparticulados como modelo para a obtenção de sistemas porosos através da exposição destes à radiação ultravioleta. Assim, inicialmente, sistemas nanoparticulados foram obtidos pela (5) auto-associação do copolímero – maltoheptaose-*bloco*-poli(metacrilato de metila) – em água *via* nanoprecipitação. Em seguida, a corona (composta por segmentos de maltoheptaose) dos sistemas nanoparticulados obtidos foi (6) reticulada usando divinil sulfona como agente reticulante, e então fez-se à (7) remoção do núcleo *via* fotodegradação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho de tese tange a preparação e caracterização de sistemas nanoparticulados obtidos *via* auto-associação de um copolímero híbrido dibloco em água e acetona, investigando a capacidade destes em encapsular substâncias hidrofóbicas, alterar sua estrutura em resposta à mudança da polaridade do meio e atuar como modelo na obtenção de sistemas nanoparticulados porosos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ investigar o comportamento de auto-associação do copolímero maltoheptaose-*bloco*-poli(metil metacrilato) *via* diluição direta em água e acetona;
- ✓ avaliar os efeitos dos parâmetros moleculares e de solução sobre as características estruturais e dimensionais dos sistemas nanoparticulados;
- ✓ analisar a capacidade de encapsulação de um corante hidrofóbico aos sistemas nanoparticulados obtidos *via* nanoprecipitação e averiguar a liberação deste numa interface polar/apolar devido à mudança estrutural do sistema nanoparticulado;
- ✓ investigar a possibilidade de aplicação de LCMs reticuladas como modelos na obtenção de sistemas nanoparticulados porosos *via* fotodegradação do núcleo por exposição à radiação ultravioleta;

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOTECNOLOGIA

As bases conceituais da nanotecnologia foram apresentadas pela primeira vez em 1959, pelo físico Richard Feynman em sua palestra “*Há muito espaço na parte inferior*”. No entanto, o termo nanotecnologia foi citado pela primeira vez apenas em 1974 no trabalho conduzido por Norio Taniguchi e colaboradores, fazendo uso deste para descrever a capacidade de se projetar materiais em níveis nanométricos (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Desde então, visto a pluralidade de áreas que fazem uso dos conceitos relativos à nanotecnologia, tem-se buscado dos pesquisadores conhecimentos multidisciplinares baseados principalmente em química, física, biologia e ciências de materiais. Esta multidisciplinaridade visa estender a capacidade humana em manipular a matéria até os limites atômicos, e aplicá-las na solução de problemas tecnológicos assim como no aprimoramento de outras tecnologias (MANGEMATIN; WALSH, 2012).

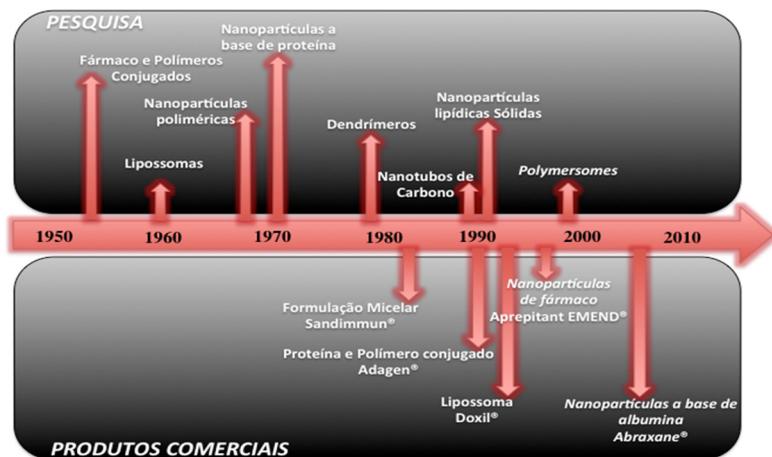
Tal multidisciplinaridade envolta na área de nanotecnologia pode ser facilmente traduzida em números. Assim, considerando a base de dados *Scopus*, até o corrente ano de 2015 foram publicados mais de 100 mil artigos na qual “*nanotechnology*” consta como palavra-chave. Deste total, aproximadamente $\frac{1}{4}$ estão vinculados à área temática de química e, embora a abordagem de conceitos referentes à nanotecnologia não ultrapasse mais que meio século, o estudo e aplicação de nanomateriais em diferentes áreas têm sido notória.

Este expressivo crescimento no número de estudos abordando o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados aplicáveis em diferentes áreas é resultado, em parte, das propriedades únicas associadas ao tamanho nanométrico – um bilionésimo de metro (ARIVALAGAN *et al.*, 2011). Aspectos como, fração de átomos na superfície e efeito de confinamento quântico estão diretamente relacionados à maior reatividade superficial, assim como às variações nas propriedades óticas, eletrônicas e magnéticas de sistemas nanoparticulados (CHAU; WU; YEN, 2007; SAVOLAINEN *et al.*, 2010). Esta dependência das propriedades frente à miniaturização do material é percebida nos três grandes grupos de materiais, *i.e.* metal, cerâmica e polímero.

No entanto, a se basear no número de publicações e nos produtos comerciais disponíveis, é indubitável que dentre os três grandes grupos

de materiais, os materiais poliméricos foram os que mostraram maior avanço no processo de miniaturização ao longo desse quase meio século. Razões que respaldem este cenário são inúmeras, considerando que as diferentes estratégias de síntese macromolecular acabaram por oferecer uma diversidade quase infinita de polímeros em termos de composição química, distribuição desta composição e massa molar (ELSABAHY; WOOLEY, 2012; NICOLAS *et al.*, 2013), tornando possível inclusive a funcionalização destes com peptídeos (XIANG *et al.*, 2014) e fármacos (LIANG; KIICK, 2014). Tal conjuntura, conforme visto na Figura 1, teve um efeito direto nos avanços relacionados à pesquisa e aplicabilidade de polímeros em produtos médicos e farmacêuticos.

Figura 1. Linha do tempo mostrando os avanços relativos à pesquisa e comercialização de sistemas nanoparticulados nos últimos 50 anos.



Fonte: Autora (2015)

A miniaturização de sistemas poliméricos na área farmacêutica têm sido especialmente vantajosa ante ao uso destes como sistemas nanocarreadores de agentes ativos, *i.e.*, fármacos, aromatizantes, extratos e óleos obtidos a partir de droga vegetal, *etc.* Tal conjuntura se deve à capacidade desses sistemas em encapsular, favorecer a internalização celular, e possibilitar o direcionamento e a modulação da liberação desses agentes ativos (HE *et al.*, 2010). Além disso, a aplicação de sistemas nanoparticulados poliméricos como sistemas nanocarreadores permite a dissolução em meio aquoso de agentes ativos

hidrofóbicos – que muitas vezes têm seu uso terapêutico limitado devido à sua baixa solubilidade aquosa – conferindo-lhe maior estabilidade frente a degradação por fatores externos (luz, umidade e calor) e internos (enzimas e microrganismos) (GUPTA *et al.*, 2010; KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

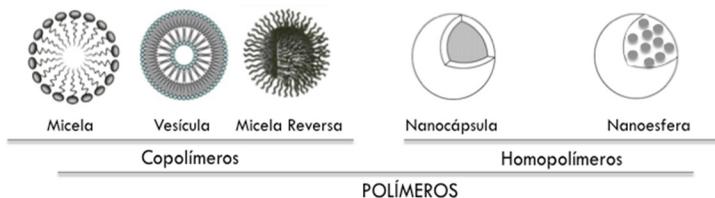
Vale a ressalva de que a aplicação de sistemas nanoparticulados poliméricos na área médica e farmacêutica não se limita somente a elaboração de sistemas nanocarreadores com liberação modulada e/ou direcionada, uma vez que alguns estudos reportam com sucesso o uso de sistemas poliméricos miniaturizados no diagnóstico por imagem (MIESZAWSKA *et al.*, 2013), em terapias fotodinâmicas (LEE; KOPELMAN, 2011) e reparação celular (KRATZ *et al.*, 2012).

2.2 ASPECTOS GERAIS – SISTEMAS NANOPARTICULADOS

2.2.1 Morfologia dos sistemas nanoparticulados

Sistemas nanoparticulados são sistemas coloidais sólidos com dimensões entre 1–1000 nm (DEVADASU; BHARDWAJ; KUMAR, 2013), sendo o termo compartilhado para denominar diferentes sistemas (RAO; GECKELER, 2011) que incluem, porém não se limitam a, nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas), vesículas poliméricas e micelas, estando as diferenças morfológica e dimensional apresentadas na Figura 2.

Figura 2. Exemplos de sistemas nanoparticulados obtidos a partir de homopolímeros e copolímeros.



Fonte: Autora (2015)

A partir de homopolímeros, *i.e.*, macromoléculas formadas pela repetição múltipla de grupos de átomos, obtém-se nanopartículas poliméricas, estando o agente ativo fisicamente disperso, dissolvido, ou quimicamente ligado às cadeias poliméricas. Dependendo do método

utilizado na preparação, tanto nanocápsulas ou nanoesferas podem ser obtidas a partir de homopolímeros, tendo por definição que:

- ❖ Nanocápsulas são sistemas nanovesiculares constituídos de um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo. O núcleo, que normalmente é composto por material hidrofóbico, atua como um reservatório de agentes ativos hidrofóbicos (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2011).

- ❖ Nanoesferas são sistemas matriciais constituídos de uma matriz polimérica, estando os agentes ativos – que podem ser hidrofílicos ou hidrofóbicos dependendo da natureza da matriz – dissolvidos no interior da matriz e/ou adsorvidos em sua superfície (VENKATARAMAN *et al.*, 2011).

A partir de copolímeros, *i.e.*, macromoléculas compostas por diferentes blocos de unidade monomérica, obtém-se nanopartículas copoliméricas com diferentes morfologias, sendo os sistemas micelares e vesiculares os mais comumente reportados, tendo por definição que:

- ❖ Micelas são sistemas caracterizados por uma estrutura do tipo núcleo-corona, na qual o núcleo micelar é composto pelos segmentos solvofóbicos (que não apresentam afinidade com o meio), enquanto que a corona é composta pelos segmentos solvofílicos (que apresentam afinidade com o meio) (KEDAR *et al.*, 2010; NICOLAS *et al.*, 2013). Neste sentido, a função primária da corona micelar é prover a estabilização do núcleo micelar. Já este, normalmente serve como contêiner para o transporte de substâncias com polaridade similar ao núcleo (MOHD-SETAPAR *et al.*, 2014).

- ❖ Vesículas são sistemas análogos as lipossomas, sendo estruturalmente formados por um núcleo envolto por uma bicamada composta por copolímeros anfifílicos (CHRISTIAN *et al.*, 2009). Essa estrutura permite que agentes ativos hidrofílicos sejam encapsulados no interior da cavidade vesicular (núcleo), enquanto que os agentes ativos hidrofóbicos são incorporados à bicamada polimérica (ADAMS *et al.*, 2008).

- ❖ *Large compound micelles* (LCMs) se caracterizam por possuir uma estrutura multicompartimental formada a partir do agrupamento de várias micelas (LIN *et al.*, 2013).

No entanto, estes representam apenas alguns exemplos reportados de morfologias obtidas a partir da auto-associação de copolímeros. Esta gama de possibilidades morfológicas é resultado da racionalização feita através do controle de parâmetros moleculares e de solução (DAL BÓ *et al.*, 2012; DU *et al.*, 2011; HOUGA *et al.*, 2009).

2.2.2 Racionalização morfológica e dimensional: parâmetros moleculares

Os parâmetros moleculares estão relacionados à composição química e fração em volume de cada bloco que compõe o copolímero.

2.2.2.1 Composição química

Em meados dos anos 50 do século passado, Jatzkewitz reportou pela primeira vez a preparação de um conjugado homopolímero-fármaco (JATZKEWITZ, 1954). Entretanto, somente em 1975 foi apresentando um primeiro conceito quanto ao uso de homopolímeros como sistemas nanocarreadores, *i.e.*, sistema nanoparticulado utilizado na veiculação de fármacos, sendo este conceito idealizado pelo químico alemão Helmut Ringsdorf (RINGSDORF, 1975). Desde então, inúmeros trabalhos têm sido publicados detalhando a preparação de sistemas nanocarreadores, na qual o fármaco está fisicamente aprisionado ou quimicamente ligado ao homopolímero. Destes, prepondera os estudos que reportam o uso de poliésteres devido às suas propriedades de biocompatibilidade, bioreabsorção e biodegradabilidade, destacando-se entre tais o poli(ácido lático), poli(L- ácido glicólico) e policaprolactona, entre outros (KUMARI; YADAV; YADAV, 2010).

Igualmente em meados dos anos 50, Szwarc descobre a polimerização ativa (do inglês, *living polymerization*), permitindo a preparação de copolímeros em bloco com estrutura bem definida (SZWARC, 1956). Poucos anos depois, os primeiros trabalhos abordando a auto-associação em solução de copolímeros em bloco começaram a ser publicados (KRAUSE, 1964; NEWMAN, 1962). Desde então, com o aperfeiçoamento e a democratização dos métodos reacionais envolvidos na preparação de copolímeros em bloco, o número de trabalhos publicados vêm aumentando ano após ano.

Este duradouro interesse quanto à síntese e auto-associação de copolímeros em bloco deve-se, em parte, a sua abrangente gama de aplicações (RAMANATHAN *et al.*, 2013). Como já destacado, as pesquisas nas áreas médica e farmacêutica evoluíram ao passo que o controle sobre a composição química do polímero também evoluiu. Esta evolução pode ser dividida em três diferentes gerações. Portanto, a primeira geração de sistemas nanocarreadores se caracteriza por sistemas nanoparticulados simples, tais como lipossomas – vesículas

constituídas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas – ou nanopartículas poliméricas, tendo essas muitas vezes sua superfície modificada a fim de evitar seu reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear. Na segunda geração, os nanocarreadores são capazes de sofrerem mudanças estruturais frente a alterações na temperatura, polaridade e pH do meio, sendo assim capazes de direcionar a liberação de fármacos. A terceira geração de nanocarreadores, tal qual a segunda, promove uma liberação direcionada dos fármacos. No entanto, estas interações são de caráter específico ocorrendo entre ligantes presentes na superfície dos nanocarreadores (anticorpos monoclonais, sacarídeos, entre outros) com receptores presentes na superfície das células (SOHNS; VOICU, 1999).

Os progressos atrelados à racionalização da composição química de copolímeros, que acabaram por se refletir na morfologia dos sistemas nanoparticulados obtidos a partir de sua auto-associação, permitiram ainda um maior controle sobre a biodisponibilidade do fármaco, *i.e.*, controle na quantidade e velocidade na qual o fármaco é absorvido (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012). Além disso, tornou possível a veiculação de moléculas hidrofóbicas em meio fisiológico, sendo esta característica proeminente considerando que mais de 40% das substâncias químicas ensaiadas como fármacos potenciais são hidrofóbicas (SHARMA *et al.*, 2009).

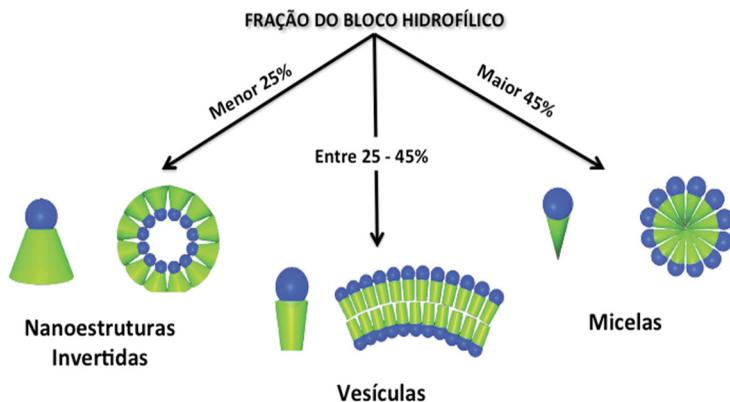
A racionalização química de copolímeros e o maior poder de compreensão das interações que ocorrem entre proteínas celulares e/ou anticorpos com os nanocarreadores (ERNST; MAGNANI, 2009) forneceu aos pesquisadores o *background* necessário para que copolímeros sejam sintetizados baseando-se numa função específica. Portanto, diferentes estratégias de síntese vêm sendo conduzidas destacando-se, em particular, as estratégias de síntese de copolímeros híbridos em bloco, *i.e.*, copolímero composto por um polímero sintético acoplado covalentemente a um polímero natural.

Tal conjuntura se favorece do fato de (1) todas as células estarem envoltas por uma fina camada de sacarídeos conjugados à lipídeos e proteínas, cuja função está relacionada principalmente com o biorreconhecimento celular e da (2) possibilidade de se combinar a versatilidade dos polímeros sintéticos com as propriedades únicas apresentadas por polímeros naturais tais como, biocompatibilidade, biodegradabilidade e biorreconhecimento (SCHATZ; LECOMMANDOUX, 2010).

2.2.2.2 Fração em volume dos blocos hidrofílico e hidrofóbico

Além da composição química, outro parâmetro molecular que permite a racionalização morfológica e dimensional de nanoestruturas diz respeito à razão entre o volume do bloco hidrofílico e hidrofóbico. Para tanto, tomando por referência os dados apresentados por Discher e Eisenberg (2002), tem-se como regra geral que, para copolímeros dibloco, quando o volume do bloco hidrofílico corresponde a menos de 25% do volume total do copolímero espera-se a formação de micelas reversas (segmentos hidrofílicos compondo o núcleo e os segmentos hidrofóbicos a corona). Já micelas esféricas são esperadas a partir da auto-associação de copolímeros cujo bloco hidrofílico corresponde a mais de 45% do volume total, enquanto que para copolímeros com volume de bloco hidrofílico entre 25 a 45% são esperados, a partir da sua auto-associação, a formação de vesículas conforme visto na Figura 3.

Figura 3. Regra empírica que relaciona a morfologia esperada a partir da auto-associação de copolímeros com diferentes porcentagens de volume do bloco hidrofílico (adaptado de DISCHER e AHMED, 2006).



2.2.3 Racionalização morfológica e dimensional: parâmetros de solução

Parâmetros de solução como, concentração do copolímero e a natureza do solvente usado na dissolução inicial do mesmo, tal qual os

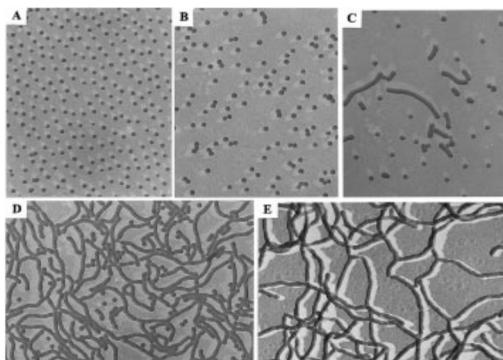
parâmetros moleculares, exercem forte influência sobre os aspectos dimensionais e morfológicos dos sistemas nanoparticulados.

2.2.3.1 Efeitos da concentração do copolímero em solução

Sistemas nanoparticulados preparados por auto-associação em solução são passíveis de sofrer tanto mudanças morfológicas como dimensionais perante as mudanças na concentração do copolímero (CHOUCAIR; EISENBERG, 2003). Por exemplo, Zhang e Eisenberg (1999) reportam a transição de micelas esféricas à filomicelas em decorrência do aumento gradativo na concentração do copolímero constituído de poli(ácido acrílico)-*b*-poli(estireno) (PAA-*b*-PS), conforme visto na Figura 4.

Entretanto, as mudanças não se limitam apenas a mudanças morfológicas, visto que micelas esféricas com diâmetro de 29 nm foram obtidas por diluição direta do PAA-*b*-PS em DMF/água em concentração igual a 1% da massa total. Entretanto, o aumento da concentração do copolímero para 2% da massa total da solução levou a um aumento de 5 nm no diâmetro micelar. Estas mudanças morfológicas e dimensionais, segundo os autores, podem ser atribuídas ao aumento no número de agregação, *i.e.*, número de cadeias copoliméricas que formam o sistema nanoparticulado, assim como ao aumento no tamanho do núcleo micelar devido ao aumento da concentração do copolímero.

Figura 4. Sistemas nanoparticulados obtidos pela dissolução do copolímero PAA-*b*-PS em uma mistura DMF/água igual a 94.5/5.5 (m/m) com diferentes concentrações: (A) 1.0; (B) 2.0; (C) 2.5; (D) 3.0 e (E) 3.5% em massa (ZHANG; EISENBERG, 1999a).



A extrapolação, para copolímeros de maior massa molecular, do comportamento em solução aplicado para pequenas moléculas anfífilas permite estabelecer uma relação entre o número de agregação (N_{ag}) e a concentração do copolímero (C), através da seguinte equação (1):

$$N_{ag} = 2\left(\frac{C}{CMC}\right)^{1/2} \quad (1)$$

Assim, o aumento no N_{ag} provoca um aumento no tamanho do núcleo micelar devido ao aumento do grau de estiramento dos blocos hidrofóbicos, ocasionando mudanças morfológicas dos sistemas nanoparticulados (CHOUCAIR; EISENBERG, 2003).

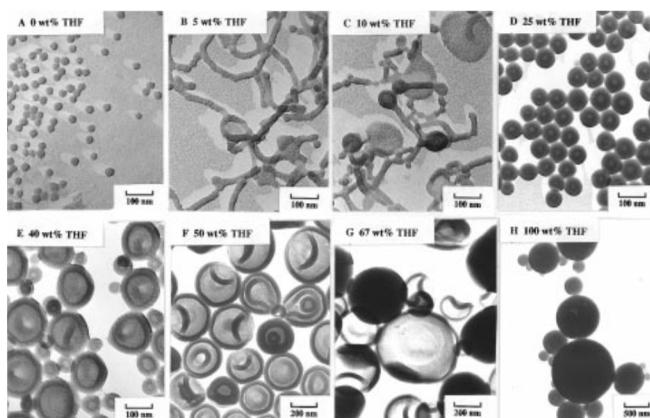
2.2.3.2 Efeitos do solvente na auto-associação em solução

A natureza do solvente usado para dissolver inicialmente os copolímeros em blocos, por vezes, afeta os aspectos dimensionais e morfológicos dos sistemas nanoparticulados (MAI; EISENBERG, 2012). A dissolução inicial faz-se necessária nas situações que os copolímeros são estruturalmente constituídos por longos blocos hidrofóbicos e pequenos blocos hidrofílicos, impossibilitando assim a sua dissolução direta em água. Com isso, inicialmente faz-se necessário o uso de um solvente que seja termodinamicamente bom para os dois blocos. No entanto, a natureza do solvente usado na dissolução inicial pode não só influenciar o diâmetro dos sistemas nanoparticulados, como a morfologia obtida a partir da sua auto-associação devido à adição de um solvente termodinamicamente ruim para um dos blocos (SHEN; EISENBERG, 1999).

Considerando este postulado, Yu *et al.*, (1998) visando investigar a influência do solvente sobre a morfologia dos sistemas nanoparticulados, prepararam soluções com concentração inicial de PS₂₀₀-*b*-PAA₁₈ igual a 0.5% em massa. Assim, observaram que a morfologia dos sistemas nanoparticulados obtidos após adição de água mudava progressivamente de micelas esféricas (DMF/THF 100/0%), para *wormlike* (DMF/THF 95/5%), uma mistura de lamelas, *wormlike* e vesículas (DMF/THF 90/10%), vesículas pequenas (DMF/THF 75/25%), vesículas de tamanho médio (DMF/THF 60/40%), vesículas grandes (DMF/THF 50/50%), uma mistura de vesículas e grandes aglomerados micelares (DMF/THF 33/67%), e finalmente grandes aglomerados micelares (DMF/THF 0/100%), conforme mostra a Figura 5. Segundo os autores, as mudanças morfológicas e dimensionais dos

sistemas nanoparticulados obtidos a partir da auto-associação do PS₂₀₀-*b*-PAA₁₈ estão relacionadas à dois fatores, sendo o primeiro decorrente da interação PS-solvente, que determina a quantidade de solvente no núcleo micelar. O segundo, diz respeito ao estiramento dos blocos de PS e a PAA-solvente que determina a repulsão entre os blocos de PAA que compõem a corona micelar (YU; ZHANG; EISENBERG, 1998).

Figura 5. Sistemas nanoparticulados obtidos a partir da auto-associação do copolímero PAA₁₈-*b*-PS₂₀₀ em diferentes misturas de DMF/THF igual a: (A) 100/0; (B) 95/5; (C) 90/10; (D) 75/25; (E) 60/40; (F) 50/50; (G) 33/67 e (H) 0/100% em massa (YU; ZHANG; EISENBERG, 1998).



Em suma, os avanços frente a compreensão dos efeitos dos parâmetros moleculares e de solução sobre os aspectos morfológicos e dimensionais dos sistemas nanoparticulados, possibilitou aos pesquisadores decidir por estratégias sintéticas, tendo em vista a busca por características específicas. Esta especificidade envolve desde as características físico-químicas do copolímero até uma possível resposta *in vivo* que o mesmo possa ter caso seja aplicado como nanocarreadores, por exemplo.

2.2.4 Propriedades morfológicas e dimensionais vs. resposta *in vivo*

Um dos principais obstáculos quanto à aplicação de sistemas nanoparticulados como nanocarreadores de agentes ativos, refere-se ao seu reconhecimento imunológico pelo sistema fagocitário mononuclear, estando este reconhecimento condicionado à presença de proteínas (denominadas e opsoninas) adsorvidas à superfície dos sistemas

nanoparticulados. Para tanto, sabe-se que a adsorção protéica está diretamente relacionada à natureza química do copolímero bem como aos aspectos morfológicos e dimensionais (GESSNER *et al.*, 2002; VENKATARAMAN *et al.*, 2011).

2.2.4.1 Efeito da geometria

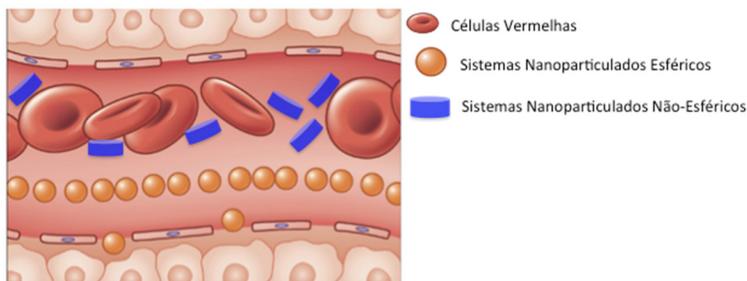
Conforme mencionado anteriormente, copolímeros anfífilos quando em solução aquosa e em concentração acima da CMC são capazes de se auto-associar formando sistemas nanoparticulados com morfologias diversas. Essa diferença estrutural entre os sistemas nanoparticulados acaba por inferir diretamente na sua resposta *in vivo* (CAI *et al.*, 2007).

Assim, Geng *et al.*, (2007) mostraram em seu trabalho, por exemplo, que filomicelas permanecem por tempo maior na circulação sanguínea quando comparado às micelas esféricas. Os autores não discutem a razão desta diferença, apenas destacam que o tempo de permanência das filomicelas foi maior apenas quando seu comprimento ultrapassou 8 μm , sendo este tamanho equivalente ao tamanho das células vermelhas do sangue.

Os efeitos da permanência do *wormlike* por tempo maior na circulação sanguínea foram discutidos através de modelos teóricos por Decuzzi *et al.*, (2009), na qual forneceram uma ideia quanto a diferença de tempo de permanência *in vivo* de sistemas nanoparticulados esféricos e não-esféricos. Segundo os autores, a caminhada dos sistemas nanoparticulados *in vivo* pode ser dividida em três etapas: (1) marginação – aproximação dos sistemas nanoparticulados ao endotélio – , (2) adesão ao endotélio e (3) controle da internalização. Destes eventos, o efeito de estrutura exerce maior influência no processo de marginação, uma vez que sistemas nanoparticulados esféricos tendem a deslocar-se para mais próximo da parede celular, enquanto que os não-esféricos tendem a permanecer no centro do lúmen do vaso sanguíneo como ilustra a Figura 6. Assim, considerando que o processo de adesão e internalização são etapas sucessivas e dependentes do processo de marginação, é de se esperar um tempo maior de permanência na circulação sanguínea dos sistemas nanoparticulados não-esféricos se comparado aos esféricos. Diante disso, é muito maior a probabilidade de ocorrer opsonização – processo caracterizado pela ligação não-específica de opsoninas à superfície dos sistemas nanoparticulados – e por consequência a remoção mais rápida dos sistemas nanoparticulados

não-esféricos (TODA *et al.*, 2008). Cabe destacar, que as opsoninas são moléculas que atuam facilitando o processo de fagocitose pelo sistema fagocitário mononuclear.

Figura 6. Comportamento de sistemas nanoparticulados esféricos e não-esféricos nos vasos sanguíneos (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015).



2.2.4.2 Efeito da carga superficial

O tamanho reduzido associado aos sistemas nanoparticulados lhe confere propriedades únicas, algumas destas contextualizadas na seção 2.1. No entanto, a remoção dos sistemas nanoparticulados, que pode ocorrer segundos ou dias após sua aplicação, representa um desafio no uso destes como nanocarreadores (DEVADASU; BHARDWAJ; KUMAR, 2013).

A primeira etapa na remoção *in vivo* de sistemas nanoparticulados envolve o processo de opsonização, sendo o contato entre ambos decorrente do movimento browniano e a adesão mediada, especialmente, por forças do tipo van der Waals, iônicas e hidrofóbicas (OWENS; PEPPAS, 2006). Logo, torna-se necessário o conhecimento quanto aos efeitos na carga superficial no processo de remoção de sistemas nanoparticulados.

Estudos reportam, por exemplo, que na circulação sanguínea o excesso de carga negativa ou positiva na superfície dos sistemas nanoparticulados acaba por ativar em maior grau o sistema complemento se comparado aos sistemas nanoparticulados com superfícies neutras (ELSABAHY; WOOLEY, 2012). Esta diferença, segundo alguns autores, advém da presença de grupos nucleofílicos, tais como grupos hidroxila e amina na superfície dos sistemas

nanoparticulados que acabam, por sua vez, ativando mais rapidamente o sistema complemento (DOBROVOLSKAIA *et al.*, ; TODA *et al.*, 2008).

2.2.4.3 Efeito da natureza química da coroa

Conforme destacado anteriormente, a adsorção protéica ocorre devido à presença de forças atrativas entre a superfície dos sistemas nanoparticulados e as proteínas, sendo principalmente atuante as forças do tipo van der Waals, hidrofóbicas e iônicas (VONARBOURG *et al.*, 2006).

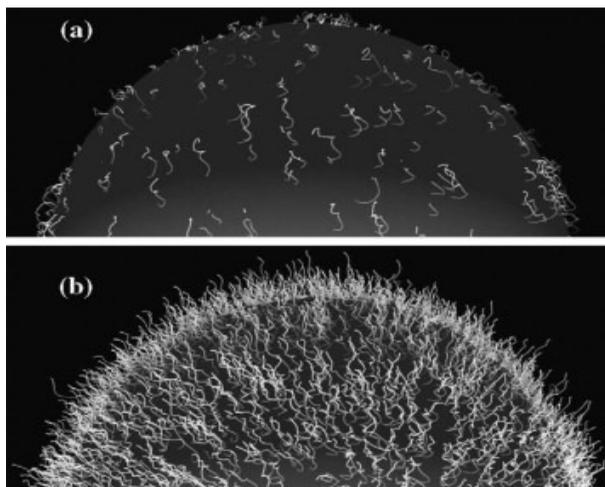
Por exemplo, a imunoglobulina G (IgG) que participa do processo de opsonização dos sistemas nanoparticulados *via* reconhecimento fagocitário mononuclear apresenta alta afinidade por regiões hidrofóbicas (OWENS; PEPPAS, 2006). Com isso, conforme reportado por Nimesh *et al.* (2006), sistemas nanoparticulados com superfície hidrofóbica são mais rapidamente removidos/engalfinhados pelas células de Kupffer presentes no fígado se comparados àqueles com superfície hidrofílica.

Diante disso, um modo de aumentar o tempo de permanência *in vivo* de sistemas nanoparticulados dá-se na inserção de moléculas hidrofílicas sobre a superfície das mesmas, criando assim uma barreira estérica que acaba por dificultar o processo de adesão das opsoninas (NIMESH *et al.*, 2006). Esta dificuldade decorre de um impedimento estérico devido à conformação mais estendida que as moléculas hidrofílicas assumem quando em meio aquoso. A aproximação das opsoninas na superfície dos sistemas nanoparticulados devido à ação das forças atrativas provoca uma compressão das moléculas hidrofílicas, obrigando-as a assumirem uma conformação de energia superior. Com isso, cria-se uma força repulsiva oposta suficiente o bastante para impedir que ocorra a adesão das opsoninas à superfície dos sistemas nanoparticulados (OWENS; PEPPAS, 2006).

OWENS e PEPPAS (2006) destacam ainda que a eficácia de repulsão contra a adesão das opsoninas está diretamente ligada ao comprimento e a quantidade de moléculas hidrofílicas presente na superfície dos sistemas nanoparticulados. Para tanto, conforme mostra a Figura 7, uma menor quantidade de moléculas hidrofílicas na superfície conduz à um arranjo caracterizado pela presença da maior parte das moléculas mais perto da superfície dos sistemas nanoparticulados. No entanto, quando em maior quantidade, as moléculas hidrofílicas se

dispõem de forma que a maior parte das moléculas encontram-se estendidas para fora da superfície dos sistemas nanoparticulados, dificultando assim a adsorção das opsoninas (OWEN; CHAN; SHOICHET, 2012).

Figura 7. Disposição das moléculas de poli(etileno glicol) sobre a superfície de sistemas nanoparticulados quando recoberta em (a) menor e (b) maior quantidade (OWENS; PEPPAS, 2006).



2.2.4.4 Efeito do tamanho dos sistemas nanoparticulados

O tamanho dos sistemas nanoparticulados também interfere no processo de opsonização e remoção *via* células fagocitárias (NIMESH *et al.*, 2006). A presença de opsoninas do tipo C3, C4 e C5 na superfície de sistemas nanoparticulados com diâmetros acima de 200 nm faz com que o mesmo, seja removido da circulação sanguínea em questão de minutos (VONARBOURG *et al.*, 2006).

Uma das possíveis razões que explicam o fato de sistemas nanoparticulados com menores tamanhos serem removidos mais lentamente da circulação sanguínea se comparado aos de maior tamanho, dá-se na diferença da curvatura de superfície. Isso porque, sistemas nanoparticulados com tamanhos menores que 100 nm apresentam uma superfície mais curva se comparado com os de maior tamanho. Esta maior curvatura dificulta a adesão protéica na superfície dos sistemas nanoparticulados menores, e por conseguinte, a ativação do

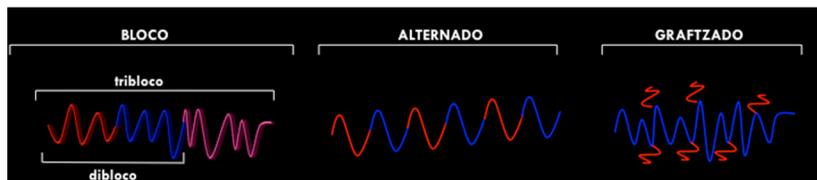
sistema complemento não se dá de forma eficiente, fazendo com que as mesmas permaneçam durante maior tempo na circulação sanguínea (OWENS; PEPPAS, 2006; VONARBOURG *et al.*, 2006).

2.3 COPOLÍMEROS EM BLOCO

2.3.1 Definição

Copolímeros são macromoléculas compostas por diferentes blocos de unidades de repetição na cadeia macromolecular (WYMAN; NJIKANG; LIU, 2011), na qual o tamanho, a forma e a disposição dos blocos na estrutura dos copolímeros podem ser previamente definidos através da natureza química das moléculas constituintes bem como do método sintético empregado (DARLING, 2007). Com isso, é possível obter diferentes tipos de copolímeros e classificá-los em grupos, de acordo com a disposição das unidades de repetição na cadeia, como mostra a Figura 8.

Figura 8. Classificação dos copolímeros considerando a disposição das unidades de repetição na cadeia macromolecular.



Fonte: Autora (2015)

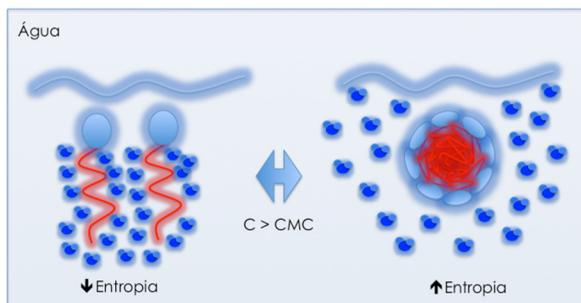
2.3.2 Princípios da auto-associação de copolímeros em solução

O termo auto-associação descreve o processo de formação espontânea de sistemas nanoparticulados, com o propósito de se atingir valores mínimos de energia livre através da minimização das forças repulsivas contrastada pela maximização das forças atrativas (FARRELL *et al.*, 2009). Diferentes tipos de forças intermoleculares estão envolvidas no processo de auto-associação, tais como forças polares – que incluem forças iônicas, dipolo-dipolo, íon-dipolo e ligações de hidrogênio –, interações não-covalentes e, principalmente, forças hidrofóbicas (WÜRTHNER, 2004).

As forças hidrofóbicas são resultado da contribuição de dois diferentes efeitos, o efeito entálpico e o efeito entrópico. Porém, acredita-se que a força mais atuante no processo de auto-associação de copolímeros com caráter anfifílico, *i.e.*, que possui um bloco de maior caráter polar (hidrofilico) e outro bloco de maior caráter apolar (hidrofóbico), são de natureza entrópica (SOUTHALL; DILL; HAYMET, 2002). Diz-se então, que do ponto de vista termodinâmico, a auto-associação de moléculas anfifílicas é um processo entropicamente dirigido.

O ganho entrópico, como ilustrado na Figura 9, está associado ao efeito hidrofóbico, caracterizado inicialmente (antes da auto-associação) pela disposição organizada das moléculas de água em torno do bloco hidrofóbico, sendo em seguida (após a auto-associação) essas moléculas de água expelidas resultando num aumento na desorganização destas na fase e, conseqüentemente, num ganho entrópico (ROTELLO; THAYUMANAVAN, 2008).

Figura 9. Efeito hidrofóbico: disposição das moléculas de água em torno do bloco hidrofóbico antes e após o processo de auto-associação de um copolímero dibloco.



Fonte: Autora (2015)

A auto-associação de copolímeros em solução também resulta num ganho entálpico, mesmo que em menor proporção se comparado ao ganho entrópico. Este ganho advém, no caso da água ser utilizado como solvente, da presença dos blocos hidrofílicos na corona do sistema nanoparticulado favorecendo a formação de ligações de hidrogênio com a água, ao invés do favorecimento de ligações entre os blocos hidrofílicos (SMART *et al.*, 2008).

No entanto, a auto-associação dos copolímeros anfífilos somente ocorre quando a concentração deste, em solução, ultrapassa o valor da sua CMC. Em concentrações inferiores à CMC, os copolímeros estão presentes na solução na forma de cadeias individuais. Porém, à medida que a concentração do copolímero aumenta, a sua estabilidade na solução na forma de cadeias individuais diminui a ponto das forças de repulsão entre os blocos hidrofílicos serem compensadas pela auto-associação dos blocos hidrofóbicos. Neste ponto, um aumento adicional na concentração do copolímero resulta na formação de quantidades crescentes de sistemas nanoparticulados, sendo essa concentração definida como a CMC do copolímero (VANCE; VANCE, 2008).

O valor da CMC de copolímeros está diretamente ligado ao tamanho do bloco hidrofóbico e hidrofílico. Por exemplo, um aumento no tamanho do bloco hidrofóbico em relação ao bloco hidrofílico leva à um significativo decréscimo no valor da CMC, e com isso um aumento na estabilidade do sistema nanoparticulado. Do contrário, um aumento no tamanho do bloco hidrofílico leva à somente um pequeno aumento no valor da CMC (AMIJI, 2006).

Em se tratando de valores, copolímeros que possuem valores de CMC menores que $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostram forte resistência à dissociação espontânea. Entretanto, copolímeros com valores da CMC maiores tornam-se mais susceptíveis à dissociação sob diluição, sendo então necessário utilizar uma maior concentração. No entanto, o uso de altas concentrações de copolímeros torna-se desvantajoso, pois pode inviabilizar sua aplicação *in vivo* devido aos limites de toxicidade (TRIVEDI; KOMPELLA, 2010).

Assim, faz-se de suma importância o conhecimento do valor da CMC de copolímeros com potencial aplicação como sistemas nanocarreadores, uma vez que a estabilidade, especialmente a estabilidade termodinâmica, destes sistemas *in vitro* e *in vivo* dependem diretamente da sua CMC (AMIJI, 2006).

2.3.2.1 Estabilidade termodinâmica de sistemas nanoparticulados constituídos por copolímeros anfífilos

A estabilidade termodinâmica descreve como os sistemas nanoparticulados são formados e como alcançam o equilíbrio. A estabilidade termodinâmica pode ser determinada pelo valor da CMC, que está diretamente relacionada à energia livre de micelização (ΔG_M), como mostra a equação (2),

$$\Delta G_M = RT * \ln(CMC) \quad (2)$$

sendo, R a constante universal dos gases e T a temperatura. O volume do bloco hidrofóbico no copolímero está diretamente relacionado à estabilidade termodinâmica, uma vez que o aumento deste leva à um aumento na coesão do núcleo devido à ação de forças hidrofóbicas, resultando assim em menores valores de CMC e maior estabilidade frente a diluição (OWEN; CHAN; SHOICHET, 2012).

A presença de moléculas hidrofóbicas no núcleo dos sistemas nanoparticulados influencia positivamente na sua estabilidade devido à formação de interações hidrofóbicas adicionais. Sistemas nanoparticulados com menores valores de CMC tendem a permanecer por um tempo maior, sem dissociar-se, quando expostas a condições de diluição (XIONG et al., 2011).

2.3.2.2 Estabilidade cinética de sistemas nanoparticulados constituídos por copolímeros anfifílicos

Após o processo de auto-associação, os sistemas nanoparticulados permanecem em equilíbrio pelo processo de troca entre as cadeias copoliméricas que compõem a estrutura do sistema nanoparticulado com as cadeias individuais presentes na solução, e *vice-versa*. Esta troca tipicamente ocorre em escalas de tempo diminutas (microsegundos a nanossegundos). O comportamento dos sistemas nanoparticulados em determinado solvente em função do tempo pode ser descrito através da estabilidade cinética (MORIGAKI *et al.*, 2003; OWEN; CHAN; SHOICHET, 2012).

Em equilíbrio, a constante de dissociação das micelas (K_m) é dada pela razão entre a concentração de cadeias individuais $[A]$ elevada a um expoente n (número de agregação das micelas) com a concentração de micelas $[micelas]$ (OWEN; CHAN; SHOICHET, 2012), conforme detalha a equação (3),

$$K_m = \frac{[A]^n}{[micelas]} \quad (3)$$

o valor da constante de dissociação das micelas depende da complexidade estrutural do sistema nanoparticulado. Por exemplo, para sistemas vesiculares, a velocidade de troca entre as cadeias individuais em solução com as cadeias que compõem sua estrutura é menor se

comparado às micelas, devido às características estruturais das vesículas que acabam por dificultar a inserção e a liberação das cadeias individuais (MORIGAKI *et al.*, 2003). Para o caso de sistemas nanoparticulados obtidos a partir da auto-associação de copolímeros responsivos, a complexidade estrutural também acaba por exercer influência direta sobre suas propriedades estímulo-responsivas.

2.3.3 Copolímeros responsivos

Copolímeros responsivos – como são conhecidos os copolímeros sensíveis as alterações de estímulos externos incluindo temperatura, pH, força iônica, polaridade do meio, *etc.* – têm sido aplicados na preparação de sistemas nanoparticulados com vistas a melhorar seu desempenho (MIYATA; CHRISTIE; KATAOKA, 2011). Tal desempenho envolve, em especial, o controle sobre o comportamento de liberação do fármaco (CHEN *et al.*, 2014) incorporado a esses sistemas nanoparticulados. Estes, por sua vez, mostram a peculiar habilidade em sofrer mudanças morfológicas/conformacionais como resposta a dado estímulo externo, sendo os sistemas nanoparticulados termo- e pH-responsivos os mais amplamente investigados.

A habilidade no controle da liberação de moléculas a partir de sistemas nanoparticulados termo-responsivos foi mostrada, por exemplo, por Dan *et al.* (2011) durante a investigação do comportamento de auto-associação de um copolímero anfifílico randômico composto de segmentos de metacrilato (hidrofóbico) e metacrilamida (hidrofílico). Assim, acima da temperatura crítica de transição morfológica (~40 °C), sistemas vesiculares foram reversivelmente convertidos em sistemas micelares. Para testar a habilidade no controle de liberação, rodamina 6G (corante hidrofílico) foi utilizado como sonda sendo, de início, adicionado à solução a 25 °C (*i.e.*, condição em que sistemas vesiculares estão presentes). Uma considerável redução na intensidade de fluorescência do corante foi observado após incorporação em decorrência ao efeito de supressão, o qual foi atribuído como sendo resultado de seu confinamento dentro dos sistemas vesiculares. Com o aumento da temperatura para valores acima da temperatura crítica de transição morfológica, foi observado um aumento da intensidade de fluorescência da rodamina 6G. Este aumento, por sua vez, foi associado à liberação da sonda em razão da conversão morfológica do sistema nanoparticulado de vesículas para micelas (DAN; BOSE; GHOSH, 2011).

Em se tratando de sistemas nanoparticulados pH-responsivos, os exemplos mais reportados se baseiam em copolímeros compostos por, ao menos, um segmento peptídico (LIU *et al.*, 2013). Esta abordagem é especialmente útil e promissora no diagnóstico e tratamento do câncer, considerando que o pH na região do tumor primário assim como na condição metastática é mais ácido se comparado ao pH de um tecido saudável (MANCHUN; DASS; SRIAMORNSAK, 2012). Assim, objetivando a liberação seletiva do antineoplásico doxorrubicina, Zhang *et al.* (2012) sintetizaram uma série de copolímeros tribloco a base de poli(etileno glicol) metil éter-*bloco*-(poli ácido láctico-*co*-poli (β -amino ésteres). Micelas foram obtidas a partir da adição do copolímero tribloco em água, cujo efeito do pH sobre a morfologia das micelas foi investigada tendo em conta dois diferentes valores de pH, 7.4 e 5.0. Os resultados de liberação revelaram que a diminuição do pH do meio (de 7.4 para 5.0) favoreceu uma liberação mais rápida de doxorrubicina a partir das micelas, devido à dissociação micelar decorrente da repulsão entre os blocos que compõem a corona da mesma (ZHANG *et al.*, 2012).

Entretanto, o conceito de sistemas nanoparticulado responsivos não abrange apenas os sistemas pH- e termo-responsivos. Embora em menor número, estudos que abordam mudanças morfológicas em sistemas nanoparticulados mediante alteração da polaridade do meio têm sido conduzidos em razão da transferência de fármacos dar-se, na maioria das vezes, numa interface polar (*e.g.*, corrente sanguínea)/apolar (*e.g.*, membrana celular) (HEVUS; KOHUT; VORONOV, 2011). Considerando as razões supracitadas, Hevus *et al.* (2012) prepararam micelas a partir da auto-associação em meio aquoso de um copolímero dibloco composto por poli(etileno glicol)-*bloco*-poli(tetrahidrofurano), incorporando curcumina ao núcleo do dito. Um sistema bifásico, contendo água e 1-octanol, foi escolhido para avaliar a transferência da curcumina a partir do núcleo micelar em direção ao 1-octanol. Os resultados apontaram a capacidade das micelas, numa interface polar/apolar, em transferir a curcumina para a fase 1-octanol em razão da mudança morfológica da micela devido à alteração da polaridade do meio (HEVUS *et al.*, 2012).

Os estudos aqui citados para sistemas nanoparticulados responsivos representam uma ínfima parcela daqueles reportados na literatura. Assim, se presume que sistemas cada vez mais sofisticados sejam elaborados em virtude da democratização dos métodos reacionais,

da diversidade de polímeros e do maior entendimento sobre o processo de biorreconhecimento celular.

2.3.4 Copolímeros híbridos em bloco

2.3.4.1 Visão Geral

Copolímeros híbridos consistem estruturalmente de um bloco sintético hidrofóbico acoplado covalentemente a um bloco natural hidrofílico – proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos e oligo- ou polissacarídeos –, sendo esta definição válida para copolímeros dibloco (OTSUKA *et al.*, 2013a; SCHATZ; LECOMMANDOUX, 2010). A síntese de copolímeros híbridos, tendo oligo- ou polissacarídeos como bloco natural, foi reportada pela primeira vez em meados dos anos 80 do século passado por Ziegast e Pfannemüller (ZIEGAST; PFANNEMÜLLER, 1984b), e desde então diferentes grupos de pesquisa vêm estudando a síntese e a auto-associação desta classe de copolímero.

Todo o interesse envolto no uso de oligo- ou polissacarídeos como bloco hidrofílico em copolímeros híbridos reflete, principalmente, a possibilidade de se obter sistemas nanoparticulados em que a corona é composta pelo carboidrato, considerando que a auto-associação ocorra em meio aquoso (OTSUKA *et al.*, 2013a). A presença do carboidrato na corona revela-se fundamental no processo de biorreconhecimento celular, uma vez que todas as células estão envoltas por uma camada de sacarídeos com espessura entre 10 a 100 nm, estando estes sacarídeos conjugados a lipídeos (glicolipídeos) e a proteínas (glicoproteínas e proteoglicanos) (MAGNANI; ERNST, 2009; SCHATZ; LECOMMANDOUX, 2010).

O biorreconhecimento, neste contexto, se soma a outras propriedades associadas aos carboidratos tais como, biodegradabilidade, e biocompatibilidade (GARCÍA-MARTÍN *et al.*, 2005), sem deixar de mencionar o fato de serem obtidos a partir de fontes renováveis. O resultado disso pode ser constatado pelo número de trabalhos publicados abordando a síntese e, muitas vezes, a auto-associação de copolímeros híbridos em meio aquoso e/ou orgânico.

Por exemplo, Otsuka *et al.* (2010) detalharam em seu trabalho a síntese e auto-associação de um copolímero híbrido dibloco termossensível constituído por maltoheptaose-*bloco*-poli(N-isopropilacrilamida) (Mal₇-*b*-PNIPAM_n). O método reacional usado na

síntese do Mal₇-*b*-PNIPAM_n foi a ciclo-adição 1,3-dipolar catalisada por cobre, conhecida como *click chemistry*. A auto-associação do Mal₇-*b*-PNIPAM_n em água foi induzida pelo aumento na temperatura, haja vista a propriedade termo-responsiva do PNIPAM que apresenta uma temperatura crítica inferior de solubilização (LCST), sendo o valor de LCST dependente do grau de polimerização do bloco NIPAM no copolímero. Com isso, em valores de temperatura acima do LCST, a auto-associação do Mal₇-*b*-PNIPAM_n foi favorecida devido à diminuição da hidrofilicidade do PNIPAM levando à formação de sistemas vesiculares e agregados globulares (OTSUKA *et al.*, 2010).

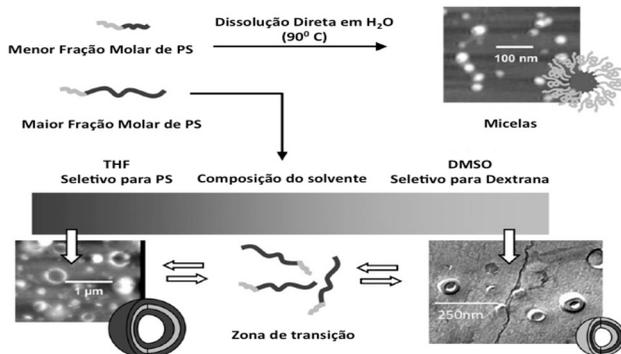
Soliman e Winnik (2008) descrevem em seu trabalho a auto-associação em água de um copolímero híbrido dibloco constituído por carboximetildextrana-*bloco*-poli(etileno glicol) (CMD_x-*b*-PEG_y). Sistemas micelares foram obtidos em concentrações acima da CMC para CMD_x-*b*-PEG_y com diferentes graus de polimerização. A capacidade dos sistemas micelares obtidos em carrear o diminazeno diacetato – um antiparasitário pouco solúvel em água – foi confirmada diante dos resultados de porcentagem de incorporação do fármaco, cujos valores estão relacionados com a razão entre as cargas positivas (relativo ao fármaco) e negativas (relativo à CMD) (SOLIMAN; WINNIK, 2008).

Ademais, a auto-associação de copolímeros híbridos em bloco não se limita apenas ao meio aquoso sendo possível, como mostrado no trabalho realizado por Akiyoshi *et al.* (2002), induzir a auto-associação em meio orgânico. Para tanto, copolímeros híbridos dibloco constituídos por metoxi-poli(óxido etileno)-*bloco*-amilose (MPEO-*b*-amilose) foram sintetizados *via* reação enzimática usando fosforilase de batata (AKIYOSHI *et al.*, 1999). A auto-associação do copolímero ocorreu em clorofórmio após lenta adição de uma solução contendo copolímero pré-solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO). Micelas reversas (*i.e.*, amilose compondo núcleo e MPEO a corona micelar) com diâmetros entre 20 a 60 nm foram obtidas, sendo o diâmetro diretamente relacionado ao grau de polimerização da amilose. Além disso, foi também avaliado a capacidade de incorporação do alaranjado de metila ao núcleo micelar, tendo em vista que tal corante é insolúvel em clorofórmio. Os resultados confirmaram o sucesso na incorporação do alaranjado de metila ao núcleo, levando os autores à creditar potencialidade de aplicação deste sistema nas áreas médica e farmacêutica (AKIYOSHI *et al.*, 2002).

Para alguns copolímeros híbridos, como reporta Loos *et al.* (2005), micelas normais e micelas reversas podem ser obtidas a partir da

auto-associação do mesmo copolímero constituído de amilose-*bloco*-poli(estireno) em água e tetraidrofurano, respectivamente. Houga *et al.* (2009) reportaram a capacidade de reversibilidade estrutural do copolímero híbrido constituído por dextrana-*bloco*-poli(estireno) ($\text{dex}_x\text{-b-PS}_y$) frente à alteração na polaridade do solvente. Neste caso, em DMSO puro, vesículas formadas por um núcleo composto de PS envoltas por uma bicamada de dextranas foram obtidas. Entretanto, em THF puro observa-se uma mudança morfológica na estrutura vesicular, estando agora a dextrana compondo o núcleo e o PS a corona vesicular. A inversão na estrutura vesicular é resultado da gradativa adição de THF à solução de DMSO, haja visto que o THF caracteriza-se como um solvente termodinamicamente bom para o PS, conforme ilustrado na Figura 10 (HOUGA *et al.*, 2009).

Figura 10. Comportamento em solução do copolímero dex-*b*-PS de acordo com a fração em mol de PS e o solvente (adaptado de HOUGA *et al.*, 2009).

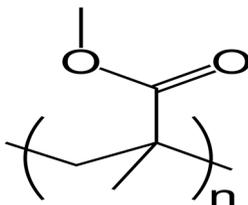


Assim, a seleção dos polímeros que irão compor o bloco natural e sintético dar-se-á mediante a definição das propriedades que se busca do copolímero ao final. Estas propriedades incluem biodegradabilidade, biocompatibilidade, fotodegradação, propriedades termo-sensíveis, pH-responsivas, *etc.* Dentre os inúmeros exemplos de polímeros naturais e sintéticos que apresentam uma ou mais das propriedades acima listadas, pode-se citar a maltoheptaose e o poli(metacrilato de metila).

2.3.4.2 Bloco Sintético – Poli(metacrilato de metila) (PMMA)

O primeiro estudo que reporta o uso do PMMA (Figura 11) como nanocarreador de agentes ativos data o ano de 1974, sendo este trabalho conduzido por Speiser e colaboradores (KREUTER, 1974). Este trabalho representa o primeiro dentre tantos que abordam o uso do PMMA nas áreas médica e farmacêutica, haja visto que o PMMA é considerado um polímero não-tóxico, sem relatos na literatura quanto à ocorrência de efeitos colaterais decorrentes de seu uso (BETTENCOURT; ALMEIDA, 2012). O bom histórico de segurança do PMMA devido à sua biocompatibilidade acaba por se somar ao seu baixo custo e facilidade de produção, sendo essas algumas das razões que ainda tornam o uso de nanopartículas de PMMA um campo de estudo em contínua expansão (CAPUTO *et al.*, 2009).

Figura 11. Representação esquemática da estrutura química do PMMA.



O uso do PMMA acoplado à diferentes polímeros naturais na preparação de copolímeros híbridos tem sido reportado em diferentes estudos. Zhu e Li (2003), por exemplo, prepararam micelas com diâmetro entre 80 a 130 nm a partir do copolímero graftizado constituído por PMMA-*g*-caseína em água. Através de medidas do ponto isoelétrico da caseína bem como de análises microscópicas pode-se confirmar a presença da caseína na corona micelar, enquanto que o PMMA constituía o núcleo micelar (ZHU; LI, 2003). Liu *et al.* (2011) obtiveram micelas com diâmetro médio de 183 nm para o copolímero graftizado constituído por PMMA-*g*-quitosana. O valor de potencial zeta positivo para os sistemas micelares obtidos foram um indicativo quanto à presença da quitosana na corona. A viabilidade em aplicar esses sistemas como nanocarreadores também foi estudada, sendo a insulina usada como substância modelo. Os resultados relevaram o sucesso na encapsulação de insulina nas micelas de PMMA-*g*-quitosana, estando a liberação desta condicionada a duas etapas caracterizadas, num primeiro momento, pela rápida liberação da insulina seguida de uma liberação controlada durante 10 horas (LIU *et al.*, 2011).

No entanto, o uso do PMMA na preparação de copolímeros não se limita apenas a copolímeros híbridos. Trabalhos como o conduzido por Perevyazko *et al.* (2010) reportam a obtenção de nanopartículas a partir da auto-associação dos copolímeros PMMA-*stat*-Pireno(metacrilato de metila) (PMMA-*stat*-PyMMA) e PMMA-*stat*-MMA usando a técnica de nanoprecipitação. Nanopartículas esféricas foram obtidas para ambos os copolímeros, porém em ambos os casos o diâmetro das nanopartículas alterou conforme a ordem de mistura dos solventes. Neste sentido, nanopartículas com maiores diâmetros foram obtidas quando água foi adicionada à solução de acetona contendo o copolímero dissolvido, ao passo que nanopartículas com menores diâmetros foram obtidas quando acetona foi adicionada à água. Os autores destacam que esta diferença no diâmetro diante da ordem de mistura foi decorrente da velocidade de precipitação do copolímero.

Recentemente, Fayad *et al.* (2014) reportaram a auto-associação em metanol do copolímero em bloco composto de PMMA-*b*-PS. Micelas e agregados micelares com diferentes tamanhos foram obtidos, estando o tamanho condicionado a aspectos como, porcentagem do bloco de PMMA no copolímero bem como sua concentração na solução. O estudo também explorou a fotólise do bloco de PMMA quando irradiado por luz ultravioleta (UV). Os resultados revelaram uma diminuição no tamanho micelar mediante exposição à luz UV devido à reticulação dos segmentos de PS presentes no núcleo micelar e, principalmente, a diminuição do tamanho dos segmentos de PMMA presentes na corona micelar (FAYAD *et al.*, 2014).

O mecanismo de fotólise do PMMA ao ser irradiado por luz UV, pode ser sumarizado nas seguintes etapas: (i) cisão homolítica das ligações carbono-carbono da cadeia principal; (ii) fotólise do grupo lateral éster, gerando três possíveis radicais – $^*\text{COOCH}_3$; $^*\text{OCH}_3$; $^*\text{CH}_3$; e (iii) fotólise do grupo lateral metil, gerando radical metila – $^*\text{CH}_3$. Além desses radicais, produtos gasosos como gás metano, hidrogênio, monóxido e dióxido de carbono podem ser formados durante a fotólise do PMMA (ABOUELEZZ, 1978).

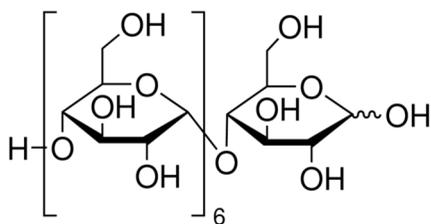
Porém, resultados obtidos por espectroscopia de massa revelaram que, apenas em comprimentos de onda (λ) em torno de 250 nm há a completa fotólise dos grupos laterais ésteres. Em valores de λ maiores que 250 nm a fotólise do grupo lateral éster não se dá de forma completa, havendo indícios de ocorrência de reações fotoquímicas como cura, reticulação e fotopolimerização que levam à um rearranjo molecular do PMMA (WOCHNOWSKI; ELDIN; METEV, 2005).

A fotólise do PMMA se mostra oportuna quando visado a aplicação deste como modelo, principalmente na obtenção de filmes ou matrizes macro- e mesoporosas. Neste caso, o PMMA mostra vantagens associadas à fácil remoção a partir das matrizes/filmes sem que haja fratura da estrutura porosa, além de ser perfeito para a deposição de outros materiais devido à sua superfície funcional. Tendo isso em conta, Bansyopadhyay *et al.* (2006), investigaram a viabilidade na deposição de nanoesferas de ouro funcionalizadas com DNA em matrizes mesoporosas obtidas a partir da exposição de filmes finos de PMMA-*b*-PS à radiação UV (λ , 254 nm). Os resultados mostraram que a deposição das nanoesferas deu-se de forma espontânea devido à ação de interações eletrostáticas (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2006).

2.3.4.3 Bloco Natural – Maltoheptaose

Maltoheptaose (Figura 12) é um malto-oligossacarídeo linear obtido a partir da abertura do anel da *beta*-ciclodextrina e consiste de sete unidade de glicose ligadas por pontes glicosídicas (α -1,4) (DE MEDEIROS MODOLON *et al.*, 2012).

Figura 12. Representação esquemática da estrutura química da maltoheptaose.



A síntese de copolímeros híbridos em blocos a partir da conjugação da maltoheptaose a diferentes polímeros sintéticos têm sido objeto de pesquisa e estudo para aplicações em diversas áreas, tais como, componentes eletrônicos (OTSUKA *et al.*, 2013b), surfactantes (DE MEDEIROS MODOLON *et al.*, 2012), nanocarreadores (OTSUKA *et al.*, 2013a), entre outros.

No que concerne a aplicação da maltoheptaose na elaboração de sistemas nanocarreadores, a presença de receptores malto-específicos na superfície de determinadas bactérias atribui a estas uma sensibilidade e especificidade sem precedentes no diagnóstico e tratamento de infecções

bacterianas. A elevada especificidade – mil vezes mais específico para bactérias em comparação às células de mamíferos – se deve principalmente a: (1) caráter hidrofílico dos sistemas nanoparticulados decorrente da presença da maltoheptaose na corona, que acaba por dificultar a absorção não-específica destes sistemas em células de mamíferos (NING *et al.*, 2011); (2) ao fato das células de mamíferos (incluindo células humanas) não expressarem os receptores malto-específicos, também conhecidos como maltoporinas ou LamB porin (GOPAL *et al.*, 2010).

Receptores do tipo maltoporinas são expressos na membrana externa de bactérias do tipo Gram-negativas, haja visto que essas bactérias apresentam duas membranas (uma externa e outra interna) ao invés de apenas uma membrana como ocorre para as bactérias Gram-positivas (KULLMAN; WINTERHALTER; BEZRUKOV, 2002). Na bactéria, a membrana externa (de caráter hidrofílico) atua como um filtro molecular controlando a permeação de solutos hidrofóbicos (BENZT; SCHMIDT; VOS-SCHEPERKEUTER, 1987). Assim, a permeação de solutos ocorre principalmente através de canais protéicos que podem ser divididos em duas categorias: soluto- e não soluto-específicos, sendo a maltoporina classificada como um canal soluto-específico (KULLMAN; WINTERHALTER; BEZRUKOV, 2002).

Os canais maltoporínicos atuam facilitando a difusão passiva de malto-oligossacarídeos através das membranas, sendo sua presença essencial para a sobrevivência das bactérias Gram-negativas. É sabido que a maltodextrina é a principal fonte de glicose utilizada pelas bactérias Gram-negativas em sua atividade metabólica (FERENCI, 1980). A maltoheptaose, dentre as maltodextrinas, se caracteriza como a maior fonte de carbono que pode ser transportada para o citoplasma e utilizado pelas bactérias Gram-negativas (KULLMAN; WINTERHALTER; BEZRUKOV, 2002).

A especificidade atribuída aos canais maltoporínicos vem fomentando estudos frente à elaboração de sistemas nanoparticulados, sendo a corona constituída pela maltoheptaose. Por exemplo, Jayawardena *et al.* (2013) investigaram o efeito da maltoheptaose – presente na superfície de nanopartículas preparadas a partir de diferentes materiais – durante o processo de internalização destas pela *Escherichia coli* (bactéria do tipo Gram-negativa). Nanopartículas com diâmetros inferiores a 100 nm foram obtidas e testadas frente a quatro diferentes tipos de cepas de *Escherichia coli*. Os resultados revelaram que a presença da maltoheptaose na superfície das nanopartículas facilitou sua

internalização pela *Escherichia coli*, levando os autores à creditar potencialidade quanto à aplicação destes no tratamento de infecções bacterianas (JAYAWARDENA *et al.*, 2013).

Em outro estudo, Ning *et al.* (2011) estudaram a aplicação como sonda para detecção de bactérias de sistemas elaborados a partir da maltohexaose conjugada à um corante fluorescente. Os resultados demonstraram uma especificidade do conjugado maltohexaose-corante mil vezes maior para células bacterianas se comparado às células de mamíferos (NING *et al.*, 2011).

CAPÍTULO 3. ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE AUTO-ASSOCIAÇÃO DE COPOLÍMEROS HÍBRIDOS DIBLOCOS EM MEIO AQUOSO E ORGÂNICO: TRANSIÇÃO MORFOLÓGICA INDUZIDA POR SOLVENTE

3.1 INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO

Nas últimas décadas, desde o pioneiro trabalho conduzido por Ziegast e Pfannemüller (ZIEGAST; PFANNEMÜLLER, 1984), têm crescido o interesse da comunidade científica quanto à auto-associação de copolímeros híbridos em bloco – copolímero composto por ao menos um bloco de polímero sintético acoplado à um bloco de polímero natural – visando obter sistemas nanoparticulados que mimetizem estruturas fisiológicas (ZEPON *et al.*, 2015).

Como os blocos natural e sintético são, na maioria dos casos, termodinamicamente incompatíveis, quando dissolvido em um solvente seletivo (*i.e.*, solvente termodinamicamente bom para um bloco, porém ruim para o outro) há a auto-associação espontânea destes em sistemas nanoparticulados com diferentes morfologias (MAI; EISENBERG, 2012). Estas morfologias, por sua vez, podem ser racionalizadas mediante controle de parâmetros moleculares (principalmente composição química e razão entre blocos hidrofóbico/hidrofílico) e parâmetros de solução (principalmente concentração do copolímero, velocidade de agitação e taxa de infusão). A racionalização morfológica também pode ser feita mediante alterações de estímulos externos, tais como temperatura, pH e polaridade do solvente (HOUGA *et al.*, 2009; OTSUKA *et al.*, 2012; ZHANG; EISENBERG, 1999b).

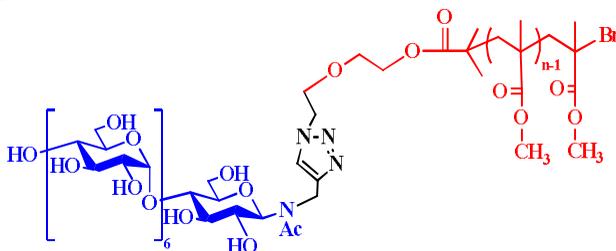
A habilidade exibida por alguns copolímeros em sofrer mudanças morfológicas em resposta a um dado estímulo externo tem sido amplamente estudado, especialmente para copolímeros termo- e pH-responsivos. Entretanto, há poucos estudos relacionados à copolímeros solvente-responsivos. Estes, por sua vez, são capazes de inverter sua estrutura em resposta a polaridade do solvente de micelas (corona hidrofílica) em meio aquoso para micelas do tipo reversa (corona hidrofóbica) em meio orgânico (HEVUS; KOHUT; VORONOV, 2011; HEVUS *et al.*, 2012).

Estes copolímeros mostram potencial aplicação como sistemas carreadores de fármacos, uma vez que possibilitam a transferência de fármacos hidrofóbicos incorporados ao núcleo micelar quando em

contato com uma interface polar (*e.g.*, corrente sanguínea)/apolar (*e.g.*, membrana celular).

Logo, este capítulo descreve o comportamento de auto-associação em solução do copolímero híbrido dibloco composto por maltoheptaose-*b*-poli(metacrilato de metila) (MH-*b*-PMMA) (Figura 13). No Apêndice A estão detalhadas as etapas reacionais envolvidas na síntese deste copolímero. Nesta primeira etapa, dois copolímeros com diferentes massas moleculares de PMMA foram selecionados e os efeitos da (1) concentração do copolímero, (2) da velocidade de agitação e (3) da polaridade do solvente sobre as características morfológicas e dimensionais dos sistemas nanoparticulados foram investigados. Além disso, foi investigado a capacidade dos sistemas nanoparticulados obtidos em transferir uma molécula hidrofóbica em uma interface polar/apolar. As técnicas de espalhamento de luz estático (SLS) e dinâmico (DLS), análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de transmissão (MET), ângulo de contato aparente (ACA) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) foram empregues na caracterização dos sistemas nanoparticulados.

Figura 13. Representação esquemática da estrutura química do copolímero MH-*b*-PMMA.



Os copolímeros selecionados nesta primeira etapa continham no seu bloco hidrofóbico (1) 24 unidades monoméricas de PMMA [MH(1.2 kDa)-*b*-PMMA(2.4 kDa)] ou (2) 48 unidades monoméricas de PMMA [MH(1.2 kDa)-*b*-PMMA(4.8 kDa)], enquanto que a massa molecular do bloco hidrofílico (maltoheptaose) foi mantida constante. Todas as análises de caracterização apresentadas neste capítulo foram realizadas utilizando equipamentos pertencentes ao CERMAV (Grenoble, França).

3.2 MATERIAIS

O corante vermelho do Nilo (VN) foi adquirido da Sigma-Aldrich, enquanto que os filtros Millex[®] politetrafluoretileno (PTFE – 0.45 µm) e Rotilabo[®] acetato de celulose (AC – 0.45 µm) foram adquiridos da Millipore e Carl Roth GmbH, respectivamente. A água utilizada neste estudo foi purificada através de um sistema Milli-Q[®] (Purelab, ELGA), com uma resistividade igual a 18.2 mΩ cm⁻¹. Acetona PA (99+% pureza) foi adquirida da Carlos Erba.

3.3 EFEITO DO SOLVENTE SOBRE O COMPORTAMENTO DE AGREGAÇÃO EM SOLUÇÃO DOS COPOLÍMEROS HÍBRIDO DIBLOCO

3.3.1 Avaliação do comportamento de agregação do MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) numa mistura binária dos solventes acetona e água por SLS

Soluções (1 g L⁻¹) foram preparadas *via* diluição direta dos copolímeros MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) em diferentes misturas binárias dos solventes acetona e água, sendo mantidas em agitação constante (500 rpm) durante 24 horas. Após este período, a intensidade de luz espalhada pelas soluções foi determinada por espalhamento de luz estático (SLS) em ângulo de detecção de 90° e com tempo de contagem de 120 segundos. Ao final, as intensidades de luz espalhada foram normalizadas $I_{SC}(90)^N = \frac{I}{I_{max}}$, onde I corresponde da luz espalhada por determinada solução enquanto que I_{max} corresponde ao maior valor obtido de intensidade de luz espalhada.

3.3.2 Determinação do tamanho relativo dos copolímeros MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) dissolvidos em uma mistura binária acetona e água

Soluções (3 g L⁻¹) foram preparadas a partir da diluição direta dos copolímeros em uma mistura binária dos solventes acetona e água igual a 0.70/0.30 (m/m) para MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k) e 0.78/0.22 (m/m) para MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k), sendo mantidas em agitação constante (500 rpm) durante 24 horas. Findando este período, as amostras foram analisadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) em ângulos de espalhamento do luz que variavam de 40° a 140° e com tempo de contagem de 300 segundos para cada ângulo avaliado. O valor do raio hidrodinâmico foi determinado aplicando a relação de Stokes-Einstein.

3.3.3 Investigação da conformação estrutural dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) dissolvidos em uma mistura binária acetona e água

Soluções (8 g L⁻¹) foram preparadas a partir da diluição direta dos copolímeros em uma mistura binária dos solventes acetona-d₆ e água deuterada (D₂O) igual a 0.70/0.30 (m/m) para MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e 0.78/0.22 (m/m) para MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k), sendo mantidas em agitação constante (500 rpm) durante 24 horas. Em seguida, a conformação estrutural dos copolímeros foi investigada através da técnica de RMN de ¹H.

3.4 AUTO-ASSOCIAÇÃO EM ÁGUA E ACETONA

3.4.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

Para o copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k), a determinação da CMC envolveu a preparação de soluções por diluição direta em água a temperatura ambiente, sendo estas soluções agitadas (500 rpm) durante 24 horas. No entanto, para o copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k), a determinação da CMC envolveu a preparação de soluções por diluição direta do copolímero em água a 85 °C, sendo estas soluções agitadas (500 rpm) durante 16 horas. Após isso, as soluções foram resfriadas a 5 °C e mantidas nessa temperatura sob agitação constante (500 rpm) durante 24 horas. Concentrações de copolímero entre 0.02 a 0.8 g L⁻¹ e 0.08 a 0.6 g L⁻¹ foram avaliadas para os copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k), respectivamente. A CMC dos copolímeros foi determinada por SLS num ângulo de espalhamento $\theta = 90^\circ$ e com tempo de contagem de 60 segundos. As intensidades de luz espalhada foram então normalizadas $I_{SC}(90)^N = \frac{I_C}{I_{C,max}}$, na qual I_C corresponde da luz espalhada por uma solução em concentração C e $I_{C,max}$ corresponde a luz espalhada pela solução mais concentrada.

3.4.2 Auto-associação *via* diluição direta em água

Primeiramente, quantidades pré-definidas do copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) foram diretamente dissolvidas em água a temperatura ambiente e agitadas por 24 horas a 100, 500 e 1000 rpm. No

entanto, para o copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k), quantidades pré-definidas foram diretamente adicionadas em água aquecida a 85 °C e agitadas 500 rpm durante 16 horas. Em seguida, as soluções foram resfriadas e mantidas à temperatura de 5 °C e agitadas durante 24 horas a 500 e 1000 rpm. Ao final, as soluções foram filtradas usando filtro AC 0.45 µm.

3.4.3 Auto-associação *via* diluição direta em acetona

Quantidades pré-definidas de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foram diretamente dissolvidas em acetona e agitadas a 500 rpm durante 24 horas. Ao final, as soluções foram filtradas usando filtro PTFE 0.45 µm.

3.4.4 Efeito da polaridade do solvente

3.4.4.1 Avaliação do efeito da polaridade do solvente sobre a morfologia dos sistemas nanoparticulados

Soluções (4 g L⁻¹, 1 mL) de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foram preparadas *via* diluição direta em acetona e agitadas (500 rpm) durante 24 horas. Após esse período, com auxílio de uma pipeta de Pasteur foi adicionado um excesso de água (9 mL) à solução, sendo então agitadas (500 rpm) durante 2 horas. Ao final, a acetona foi removida sob pressão reduzida e a concentração final das soluções foi de ~0.45 g L⁻¹.

3.4.5 Propriedade de encapsulação e transferência do corante vermelho do Nilo

3.4.5.1 Encapsulação do corante vermelho do Nilo nos sistemas nanoparticulados obtidos *via* técnica de nanoprecipitação

A técnica de nanoprecipitação (FESSI *et al.*, 1989) foi empregue na encapsulação do vermelho do Nilo, uma vez que o corante é pouco solúvel em água. Para tanto, primeiramente, uma solução de acetona contendo vermelho do Nilo (0.03% m/v) foi preparada e usada como fase orgânica. Após isso, 3 mg do copolímero foi dissolvido em uma solução contendo uma mistura binária de acetona (contendo vermelho do Nilo) e água igual a 0.70/0.30 (m/m) para MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k)

e 0.78/0.22 (m/m) para MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k), sendo então as soluções copoliméricas agitadas (500 rpm) durante 24 horas. Os sistemas nanoparticulados contendo vermelho do Nilo foram obtidos a partir da lenta adição da solução copolimérica (taxa de infusão, 0.5 mL h⁻¹) em 3 mL de água em temperatura ambiente e sob agitação constante (50 rpm). Ao final, a acetona foi então removida sob pressão reduzida a 30 °C.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS

3.5.1 Espalhamento de Luz Dinâmico e Estático (DLS e SLS)

As medidas de DLS e SLS foram realizadas usando um goniômetro ALV-5000/ALV, equipado com um laser He-Ne com potência igual a 35 mW ($\lambda = 632.8$ nm) como fonte de radiação. As funções de correlação temporal foram analisadas usando o correlator digital ALV/LSE-5004. Durante análise a temperatura das amostras foram mantidas a 25 ± 0.5 °C. Nas medidas de SLS, a intensidade de luz espalhada foi mensurada num ângulo de espalhamento de 90° com um tempo de contagem de 120 segundos. As misturas binárias de acetona e água contendo os copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foram colocadas em tubos cilíndricos e, em seguida, imersas num banho de tolueno a 25.0 ± 0.5 °C. Nas medidas de DLS, o tempo de análise de cada ângulo foi de 300 segundos para ângulos de espalhamento do luz que variavam de 40° a 140° (*i.e.*, $9.04 \cdot 10^{-3} \leq q = (4\pi n/\lambda) \text{sen}(\theta/2) \leq 2.48 \cdot 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$ em água pura, na qual q corresponde ao módulo do vetor de espalhamento, n representa o índice de refração do solvente puro (1.332 para água e 1.356 para acetona a 25 °C), θ é o ângulo de espalhamento (*i.e.*, ângulo de observação) e λ refere-se ao comprimento da luz incidente) com intervalos de 10°. A distribuição do tempo de relaxação (τ) foi obtido através da análise de CONTIN da função de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) (PROVENCHER, 1979).

Assim, a partir do coeficiente aparente de difusão (D) – determinado a partir da inclinação da reta obtida através da plotagem da frequência de relaxação $\Gamma \left(\frac{1}{\tau} \right)$ vs. o quadrado do módulo do vetor de espalhamento q^2 –, o raio hidrodinâmico (R_H) pôde ser determinado aplicando a relação de Stokes-Einstein (Equação 4);

$$R_H = \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta D} \quad (4)$$

sendo que κ_B representa a constante de Boltzmann, T a temperatura, D o coeficiente de difusão aparente e η a viscosidade da amostra.

3.5.2 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

As medidas de NTA foram realizadas usando o equipamento NanoSight LM10 (NanoSight, Salisbury, Inglaterra) equipado com uma câmera científica e operando a 25 °C. Os sistemas nanoparticulados foram visualizados a partir da luz espalhada decorrente da incidência de um laser azul ($\lambda = 488$ nm). Vídeos com 60 segundos de duração foram capturados e analisados através do software NTA 2.1. Para tanto, as soluções dos sistemas nanoparticulados foram preparadas em água (para as soluções preparadas em acetona não foi possível realizar a análise de NTA). Findado o preparo, cada solução foi injetada com auxílio de um seringa dentro de uma câmara num volume suficiente para ocupá-la totalmente. As soluções contendo os sistemas nanoparticulados foram diluídas quando ultrapassavam o limite de 1×10^8 partículas mL⁻¹.

3.5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises de MET foram conduzidas em um microscópio eletrônico CM200 Philips (Hillsboro, OR, EUA) operando a uma voltagem de 80 kV, sendo as imagens registradas em filmes Kodak SO163. As soluções contendo os sistemas nanoparticulados obtidos *via* diluição direta em água foram depositadas sobre *grid* de cobre revestida com uma fina camada de carbono e previamente tratada com ozônio. Todas as amostras analisadas foram negativamente coradas com acetato de uralina (2% m/v).

3.5.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As medidas de AFM foram conduzidas usando um microscópio de força atômica Innova™ Bruker (Billerica, MA, EUA). As soluções contendo sistemas nanoparticulados obtidos *via* diluição direta dos copolímeros em acetona foram primeiramente diluídas (~ 0.008 g L⁻¹), sendo em seguida depositadas sobre substrato de silício e secas em temperatura ambiente. Imagens de topografia e fase foram registradas com uma resolução de 512 x 512 pontos, sendo essas obtidas pelo modo

dinâmico (*tapping mode*) usando ponta de silício com uma constante elástica de 48 N m^{-1} e uma frequência de ressonância de $\sim 190 \text{ kHz}$. As imagens obtidas foram analisadas com auxílio do software *open source* Gwyddion.

3.5.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H)

Os espectros de RMN de ^1H foram realizados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ usando um espectrômetro Bruker Avance DRX-400 (Billerica, MA, EUA). Para a caracterização da estrutura núcleo-corona dos sistemas nanoparticulados obtidos a partir dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k), primeiramente foi feita a diluição direta destes em acetona- d_6 pura (16 g L^{-1}), sendo as soluções agitadas (500 rpm) durante 24 horas. Após isso, um excesso de D_2O foi adicionado as soluções preparadas em acetona- d_6 com auxílio de uma pipeta de Pasteur, sendo estas soluções agitadas (500 rpm) por 2 horas. Ao final, a acetona- d_6 foi removida sob pressão reduzida e a concentração final das soluções foi de $\sim 2 \text{ g L}^{-1}$. Os espectros obtidos foram analisados usando o programa ACD/NMR.

3.5.6 Ângulo de Contato Aparente (ACA)

As medidas de ACA foram realizadas de acordo com o método da gota séssil (gota do líquido sobre a amostra sólida) utilizando um analisador de ângulo de contato (OCA 20, Dataphysics Instruments, Alemanha). Assim, primeiramente, substratos de silício foram rinsados com acetona ($\theta \sim 55^\circ$) e secos a temperatura ambiente. Então, uma gota ($\sim 5 \text{ } \mu\text{L}$) de água Milli-Q[®] foi depositada sobre os substratos de silício previamente recobertos por um filme fino obtido por *spin coating* (2000 rpm , 30 segundos) das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparados em acetona (8 g L^{-1} , processo de *spin coating* repetido 4 vezes, espessura do filme $\sim 50 \text{ nm}$), e após adição de excesso de água ($\sim 1 \text{ g L}^{-1}$, processo de *spin coating* repetido 6 vezes, espessura do filme $\sim 5 \text{ nm}$), sendo então após equilíbrio (30 segundos) os dados registrados.

3.5.7 Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada na avaliação da capacidade de transferência numa interface polar/apolar do corante

vermelho do Nilo encapsulado aos sistemas nanoparticulados preparados *via* nanoprecipitação a partir dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k). Para tanto, 1 mL de solução de sistemas nanoparticulados contendo corante encapsulado foi misturado com um volume igual de tolueno. A mistura foi então agitada (2000 rpm) com auxílio de um agitador vortex por 10 minutos, sendo em seguida mantida em repouso a fim de promover a separação das fases oleosa/aquosa. Após o tempo necessário para separação, tolueno foi removido sob pressão reduzida a 45 °C. O volume aquoso final foi verificado com auxílio de uma pipeta para, se necessário, fazer a normalização de intensidade de fluorescência. As soluções obtidas a partir do MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) contendo o corante encapsulado foram diluídas 10 e 50 vezes, respectivamente. A intensidade de fluorescência (antes e após a transferência interfacial) foi lida num λ de 590 nm (λ de emissão), usando um espectrômetro Perkin-Elmer LS50B (Waltham, MA, EUA) a 25 °C. A porcentagem de corante transferido a partir dos sistemas nanoparticulados para a fase tolueno foi estimada considerando como 100% a intensidade de fluorescência da solução antes da transferência do corante vermelho do Nilo.

3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.6.1 Comportamento de agregação do MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em diferentes misturas binárias de acetona e água

Baseado nos valores de parâmetros de solubilidade de Hildebrand (δ) (J. H. HILDEBRAND, 1936), a acetona ($\delta_{AC} = 19.7 \text{ MPa}^{-2}$) representa um bom solvente para o bloco de PMMA ($\delta_{PMMA} = 19 \text{ MPa}^{-2}$) devido à similaridade dos valores, enquanto que a água ($\delta_{H_2O} = 47.9 \text{ MPa}^{-2}$), devido à disparidade entre os valores, não representa um bom solvente para PMMA (BRANDRUP *et al.*, 2003). Embora não se tenha ainda determinado o valor do parâmetro de solubilidade de Hildebrand para a maltoheptaose, os resultados experimentais revelaram que a água representa um bom solvente para maltoheptaose (OTSUKA *et al.*, 2013b).

Assim, presume-se que em acetona pura, o bloco de PMMA assumirá uma conformação mais estendida (corona) devido ao favorecimento de interações PMMA-acetona. Em contrapartida, uma

possível agregação do bloco de maltoheptaose seria esperado em acetona, uma vez que este solvente favorece interações maltoheptaose-maltoheptaose. Do contrário, em água pura, presume-se que o bloco de maltoheptaose agora assuma uma conformação mais estendida (corona) contrapondo-se a uma possível agregação do bloco de PMMA.

Logo, através da análise de SLS, foi avaliado o comportamento de agregação dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) (Figura 14) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) (Figura 15) em acetona e água pura, assim como em diferentes frações em massa de água.

Figura 14. Intensidade de espalhamento de luz normalizada (I_{SC}^N) vs. diferentes frações em massa de água obtida a partir de soluções (1 g L^{-1}) de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) monitorada em $\theta = 90^\circ$. Gráfico *inset* mostra a I_{SC}^N para soluções mais concentradas, 5 g L^{-1} .

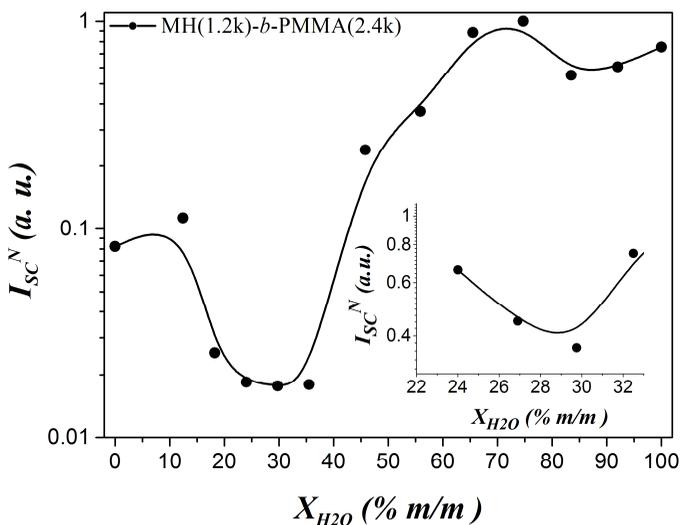
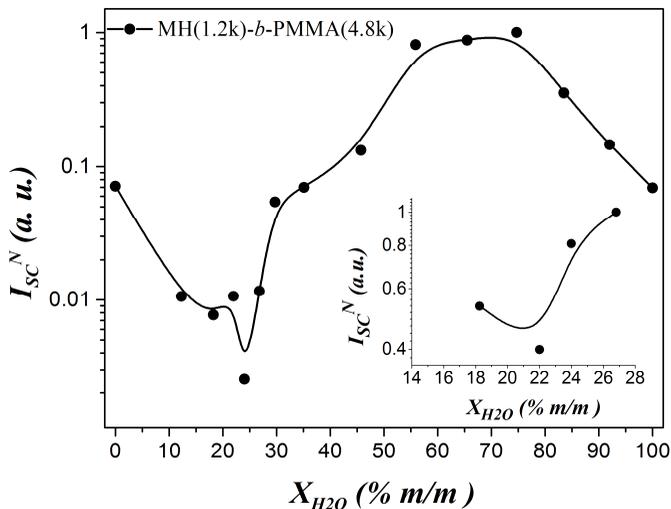


Figura 15. Intensidade de espalhamento de luz normalizada (I_{SC}^N) vs. diferentes frações em massa de água obtida a partir de soluções (1 g L^{-1}) de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) monitorada em $\theta = 90^\circ$. Gráfico *inset* mostra a I_{SC}^N para soluções mais concentradas, 5 g L^{-1} .



Como observado nas Figuras 14 [copolímero MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k)] e 15 [copolímero MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k)], o valor de I_{SC}^N altera dependendo da fração de cada solvente na mistura binária acetona/água. De modo geral, duas regiões de variação de I_{SC}^N puderam ser distinguidas para ambos os copolímeros. A primeira região se caracteriza por uma redução acentuada nos valores de I_{SC}^N com a adição de ~30 e 20% de água para os copolímeros MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k), respectivamente. A segunda região, no entanto, se caracteriza por um aumento apreciável nos valores de I_{SC}^N com o contínuo aumento na fração de água na mistura binária na qual os copolímeros estão diluídos.

O aumento da quantidade de água no meio altera diferentemente a solubilidade de cada bloco no sentido de aumentar a solubilidade para a maltoheptaose (bloco hidrofílico) e diminuir para o PMMA (bloco hidrofóbico). Este comportamento leva à uma diminuição nos valores de I_{SC}^N com um valor mínimo observado na mistura binária de acetona/água igual a 0.70/0.30 (m/m) para o copolímero MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k) e 0.78/0.22 (m/m) para o copolímero MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k). Segundo Schmidt *et al.*, (2009), esta diminuição representa a dissociação dos agregados copolímeros em cadeias individuais. Este comportamento decorre do fato da I_{SC} pelas cadeias individuais ser menor quando comparado aos agregados copoliméricos, uma vez que em regime diluído a intensidade de luz espalhada (I_{SC}) é proporcional ao produto da concentração do copolímero (C) e a massa

molecular dos agregados (M) ($I_{SC} \propto C.M$) (LOMAX, 1996). Desta forma, em condição de concentração dos copolímeros constante, qualquer mudança na intensidade de luz espalhada reflete alterações da massa molecular dos agregados copoliméricos (YU; EISENBERG, 1998).

Curiosamente, a fração em massa do bloco hidrofóbico (*i.e.*, do PMMA) nos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) ($f_{PMMA} = 0.69$) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) ($f_{PMMA} = 0.82$) é similar a fração em massa de acetona na mistura binária necessária para induzir a dissociação dos agregados. Resultado semelhante foi reportado por Otsuka *et al.*, (2013b) para o copolímero constituído por maltoheptaose-*bloco*-poli(estireno) (OTSUKA *et al.*, 2013b).

O contínuo aumento na quantidade de água na mistura binária a partir do valor de I_{SC}^N mínimo [0.70/0.30 (m/m) para MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e 0.78/0.22 (m/m) para MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k)], provoca um aumento na I_{SC} em virtude da re-agregação das cadeias individuais copolímero (SCHMIDT; BORSALI; GIACOMELLI, 2009)

3.6.2 Determinação do tamanho relativo das cadeias individuais dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k)

Partindo do pressuposto que na mistura binária acetona e água igual a 0.70/0.30 (m/m) (MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k)) e 0.78/0.22 (m/m) (MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k)) os copolímeros estão presentes em solução na forma de cadeias individuais, análises de DLS foram conduzidas visando determinar o tamanho relativo das cadeias individuais conforme mostra as Figuras 16 e 17.

Figura 16. (A) – (■) Função de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) e (●) correspondente distribuição do raio hidrodinâmico ($A(q,t)$) (z -average) monitorada em $\theta = 90^\circ$; (B) Frequência de relaxação Γ ($1/\tau$) vs. o quadrado do módulo do vetor de espalhamento q^2 para MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k).

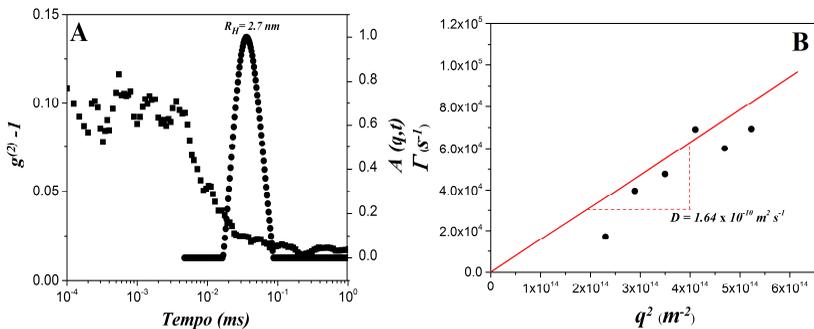
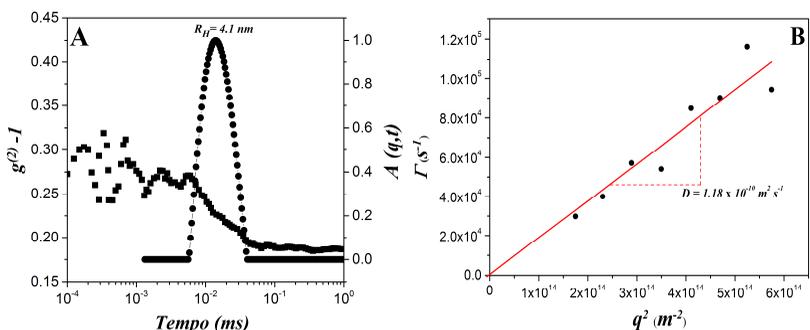


Figura 17. (A) – (■) Função de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) (●) e correspondente distribuição do raio hidrodinâmico ($A(q,t)$) (z -average) monitorada em $\theta = 90^\circ$; (B) Frequência de relaxação Γ ($1/\tau$) vs. o quadrado do módulo do vetor de espalhamento q^2 para MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k).



A partir das funções de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) adquiridas entre $\theta = 40$ a 140° com intervalo de 10° , foram determinadas as distribuições de tempo de relaxação (τ) através do algoritmo CONTIN. O valor de D para cada solução foi determinado a partir do plote ($1/\tau$) vs. q^2 . Os valores calculados foram iguais a $1.64 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ para MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k) e $1.18 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ para MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k). O valor de R_H foi determinado aplicando a relação de Stokes-Einstein (Eq. 4). Logo, um valor de R_H de ca. 2.7 nm foi determinado para MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k), enquanto que para MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) o valor de R_H obtido foi de ca. 4.1 nm.

O valor de R_H determinado experimentalmente, para ambos os copolímeros, foi similar ao valor de R_H determinado teoricamente. Este cálculo, por sua vez, se baseia na distância média imperturbável entre as

extremidades de uma cadeia polimérica $\langle r \rangle$, onde $\langle r \rangle = \ell * \sqrt{N}$, onde ℓ é referente ao comprimento de uma unidade de repetição ($\ell_{\text{PMMA}} \sim 0.3$ nm e $\ell_{\text{Maltose}} \sim 0.5$ nm) e N é referente ao número de unidades de repetição que compõe cada bloco (FELDMAN, 1984). Assim, os valores teóricos de R_H foram de *ca.* 2.7 nm para MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e *ca.* 3.6 nm para MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k).

A similaridade entre os valores de R_H teórico e experimental indica que a gradativa adição de água, até 30% para MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e 22% para MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k), induz à dissociação dos agregados copoliméricos permanecendo estes, em solução, na forma de cadeias individuais.

3.6.3 Conformação estrutural dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k)

A técnica de RMN de ^1H , nas últimas duas décadas, tem-se sido convenientemente utilizada na investigação da conformação de macromoléculas em solução (KOHUT; VORONOV, 2009). Desta forma, visando confirmar a presença dos copolímeros na conformação de cadeias individuais, soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foram preparadas numa mistura binária acetona- d_6 /D $_2$ O igual a 0.70/0.30 e 0.78/0.22 (m/m) respectivamente, e analisadas por RMN de ^1H . Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 18 e 19.

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H do copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) dissolvido numa mistura binária de acetona- d_6 /D $_2$ O na proporção de 0.70/0.30 (m/m).

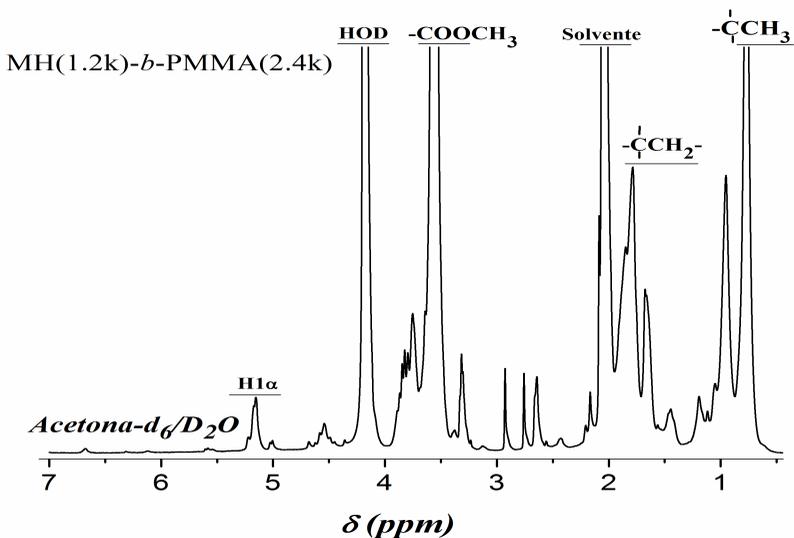
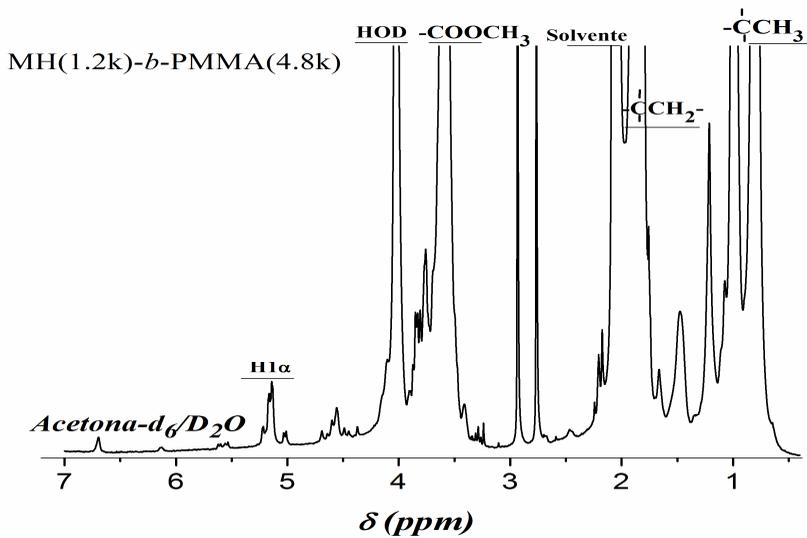


Figura 19. Espectro de RMN de 1H do copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) dissolvido numa mistura binária de acetona- d_6 e D_2O na proporção 0.78/0.22 (m/m).

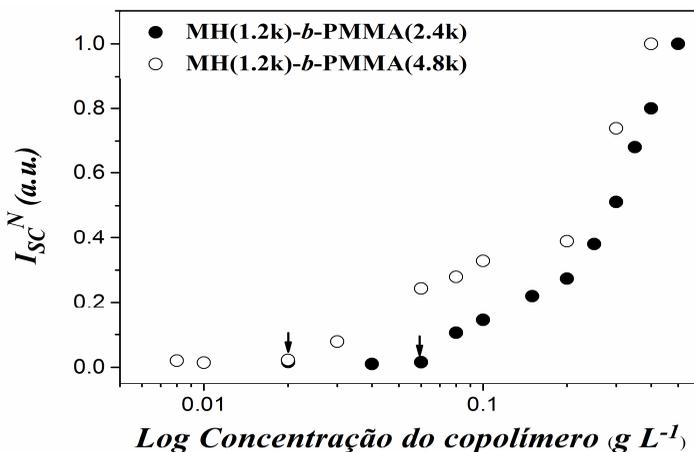


Os espectros RMN de ^1H , para os copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) dissolvidos na mistura binária de acetona- d_6/D_2O , mostram os principais grupos de cada blocos, *i.e.*, do PMMA e da maltoheptaose. A presença dos sinais em $\delta = 5.0 - 5.6$ ppm, correspondentes às ligações H1 [α -1,4] (KRALJ *et al.*, 2011) presentes na estrutura da maltoheptaose, indicam que esse bloco está completamente solvatado na mistura binária de acetona- d_6/D_2O . Além disso, a presença dos sinais referentes ao PMMA em $\delta \sim 3.7$ ppm ($-\text{COOCH}_3$), $\delta \sim 1.8$ e 0.7 ppm ($-\text{CCH}_3$) (ALDOSARI; OTHMAN; ALSHARAEH, 2013) indicam que este bloco, tal qual o bloco hidrofílico, está completamente solvatado na mistura binária acetona- d_6/D_2O . Portanto, estes resultados confirmam que na mistura binária de acetona e água igual a 0.70/0.30 [MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k)] e 0.78/0.22 (MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k)) (m/m) os copolímeros estão dispostos, em solução, na forma de cadeias individuais. Logo, a auto-associação dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em solução 100% acetona e 100% água, assim como sua transição morfológica induzida por solvente serão exploradas no decorrer deste primeiro capítulo.

3.6.4 Determinação da CMC dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k)

A determinação da CMC de copolímeros e surfactantes por espectroscopia de fluorescência é, indubitavelmente, a técnica mais amplamente reportada na literatura. Porém, nos últimos anos, tem se mostrado igualmente promissor na determinação da CMC o uso da técnica de espalhamento de luz (SLS) (TOPEL *et al.*, 2013). Assim, soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) (concentrações entre 0.02 a 0.8 g L^{-1}) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) (concentrações entre 0.008 a 0.6 g L^{-1}) foram preparadas por diluição direta em água e analisadas por SLS ($\theta = 90^\circ$). O valor da CMC, como mostrado na Figura 20, foi determinado como a concentração do copolímero que corresponde ao início do aumento da intensidade de luz espalhada obtida a partir do gráfico da I_{SC}^N vs. o logaritmo da concentração do copolímero.

Figura 20. Gráfico da I_{SC}^N vs. logaritmo da concentração dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k).



Os resultados de SLS revelam que os valores de I_{SC}^N , para os copolímeros MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k), mantiveram-se praticamente constante em concentrações menores que 0.05 g L^{-1} e 0.01 g L^{-1} respectivamente, indicando a ausência de agregados copoliméricos. No entanto, o aumento na concentração do copolímero promoveu um aumento na I_{SC}^N devido à formação de agregados copoliméricos. Este comportamento foi observado para ambos os copolímeros, porém em valores diferentes de concentração.

Logo, o valor da CMC determinado foi de $1.57 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ [MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k)] e $3.33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ [MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k)]. Como esperado, o valor da CMC do copolímero MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) foi menor comparado ao valor obtido para MH(1.2k)-b-PMMA(2.4k), uma vez que o aumento na massa molecular do PMMA leva à um aumento no número de interações hidrofóbicas que se reflete na diminuição do valor da CMC (LOMAX, 1996). Menores valores de CMC implicam numa maior resistência dos sistemas nanoparticulados em sofrer dissociação mediante diluição, sendo esta característica oportuna quando almejado a aplicação deste *in vivo* (D'ADDIO; PRUD'HOMME, 2011; TRIVEDI; KOMPELLA, 2010).

3.6.5 Auto-associação em água *via* diluição direta

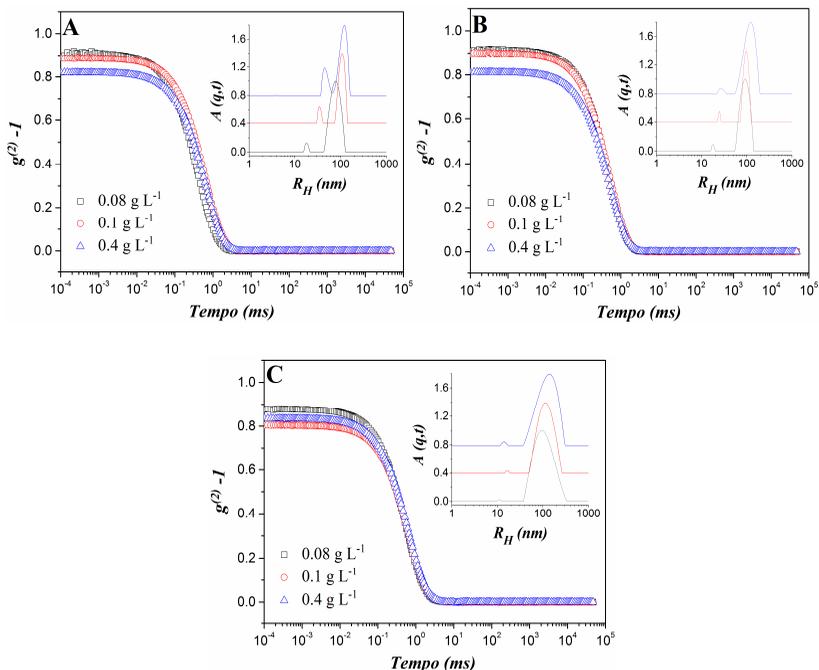
3.6.5.1 Auto-associação em água – DLS

A habilidade dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em se auto-associar em água levando à formação de nanoestruturas organizadas foi inicialmente investigada por DLS. A considerar o caráter hidrofílico da maltoheptaose contrapondo-se ao caráter hidrofóbico do PMMA, espera-se que em água os copolímeros se auto-associem formando sistemas nanoparticulados cuja corona é composta pela maltoheptaose, enquanto que o núcleo é composto pelo PMMA.

Desta forma, soluções obtidas a partir da diluição direta em água dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foram analisadas por DLS, visando avaliar o efeito da (1) velocidade de agitação e da (2) concentração do copolímero sobre os aspectos morfológicos e dimensionais. A Figura 21 (A-C) apresenta as funções de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) ($\theta = 90^\circ$) e suas respectivas distribuições de raio hidrodinâmico ($A(q,t)$) adquiridos a partir das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) preparadas em diferentes valores de concentração e velocidade de agitação.

As funções de correlação temporal para MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k), para as diferentes concentrações (0.08, 0.1 e 0.4 g L⁻¹) e velocidade de agitação (100, 500 e 1000 rpm), são caracterizadas por um decaimento exponencial simples. As distribuições de raio hidrodinâmico mostraram a ocorrência de uma distribuição bimodal (caracterizada pela presença de dois modos de relaxação, rápido e lento) para todas as condições avaliadas. Diante disso, a considerar o valor experimental de R_H determinado para as cadeias individuais de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e os valores de R_H obtidos após auto-associação em água (Tabela 1), torna-se plausível atribuir ao modo rápido de relaxação, como sendo resultado da difusão dos *large compound micelles* (LCMs). Ao que tange o modo lento de relaxação, presume-se que este corresponda à difusão dos agregados micelares.

Figura 21. Funções de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) para as soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) com diferentes concentrações preparadas por diluição direta em água sob agitação igual a: (A) 100 rpm; (B) 500 rpm; e (C) 1000 rpm. Gráfico *inset* apresenta as distribuições de raio hidrodinâmico ($A(q,t)$) (*z-average*) monitoradas em $\theta = 90^\circ$.



A determinação do R_H para sistemas monodispersos e esféricos pode ser conduzida de modo confiável apenas usando R_H aparente obtido em $\theta = 90^\circ$. No entanto, para sistemas polidispersos, na qual se enquadra a grande maioria dos sistemas nanoparticulados, a determinação do R_H demanda o monitoramento das funções de correlação temporal em diferentes ângulos, sendo D obtido através da inclinação de Γ vs. q^2 . Portanto, medidas multi-ângulo ($\theta = 40^\circ - 140^\circ$, intervalo 10°) foram conduzidas visando determinar o valor de D . Para todas as soluções avaliadas, uma relação linear Γ vs. q^2 foi observada, indicando que ambos os modos difusivos são decorrentes do movimento browniano dos sistemas nanoparticulados em solução (STRANDMAN *et al.*, 2008). A Tabela 1, apresenta os valores de R_H determinados a partir de D aplicando a relação de Stokes-Einstein (Eq. 4).

De modo geral, para os LCMs (modo rápido de relaxação), o aumento na concentração e na velocidade de agitação levou à um aumento no valor do R_H . Este aumento pode ser resultado da combinação de dois fatores: (1) efeito ortocinético (oriundo do processo de agitação mecânica) e (2) aumento no número de agregação micelar (devido ao aumento da concentração do copolímero) (ALLEN;

MAYSINGER; EISENBERG, 1999; BALES; ALMGREN, 1995; LIU *et al.*, 2008). No entanto, para os agregados micelares (modo lento de relaxação), os valores de R_H não mostraram uma tendência óbvia de aumento e/ou diminuição em resposta a mudanças nos valores de concentração do copolímero e da velocidade de agitação.

Estes agregados micelares – visto em todas as condições investigadas – são acreditados serem *clusters* formados por micelas individuais que interagem dinamicamente entre si, devido à (1) natureza e ao tamanho do corona micelar e (2) as interações hidrofóbicas oriundas dos núcleos micelares. O menor tamanho relativo do bloco hidrofílico (maltoheptaose) comparado ao bloco hidrofóbico (PMMA) e o baixo valor de potencial zeta (*ca.* -7 mW) são alguns dos fatores envolvidos na tendência apresentada por estes copolímeros em formar agregados em solução. A natureza dinâmica de tais interações pôde ser confirmada, uma vez que a presença de agregados micelares foi imediatamente detectada após a solução ser filtrada com filtro Nylon 0.1 μm .

Ainda explorando as distribuições de tempo de relaxação, embora o pico correspondente ao modo de relaxação lento apresente uma área de superfície maior comparado ao pico referente ao modo rápido de relaxação, não significa que um número maior de nanopartículas estão presentes. Deve ser considerado que a intensidade de luz espalhada é proporcional ao produto da concentração de nanopartículas multiplicado pela sua massa molar de acordo com o espalhamento de Rayleigh ($2R_H \ll \lambda$) para partículas esféricas. Neste caso, o DLS é muito mais sensível à presença de grandes agregados do que a pequenas nanopartículas (GIACOMELLI *et al.*, 2011).

Assim, assumindo que os LCMs comportam-se como esferas-duras em água, e que o diâmetro hidrodinâmico dos agregados micelares (D_{H-AG}) e dos LCMs (D_{H-LCMs}) tenham a mesma densidade, pode-se determinar a porcentagem de LCMs presente na solução usando a equação (5);

$$\frac{N_{LCMs}}{N_{AG}} = \left(\frac{D_{H-AG}}{D_{H-LCMs}} \right)^3 \left(\frac{A_{LCMs}}{1-A_{LCMs}} \right) \quad (5)$$

na qual, N_{LCMs} representa o número de LCMs (modo rápido de relaxação), N_{AG} representa o número de agregados micelares (modo lento de relaxação) e A_{LCMs} representa a área de superfície do pico referente ao modo rápido de relaxação (DAL BÓ *et al.*, 2012).

Tabela 1. Valores de R_H das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) com diferentes valores de concentrações obtidas a partir da diluição direta em água em diferentes velocidades de agitação.

Concentração do copolímero ($g L^{-1}$)	Raio hidrodinâmico (nm) ^{a)}					
	100 rpm		500 rpm		1000 rpm	
	$R_{H1}^{b)}$	$R_{H2}^{b)}$	$R_{H1}^{b)}$	$R_{H2}^{b)}$	$R_{H1}^{b)}$	$R_{H2}^{b)}$
MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(2.4k) – 0.08	14	79	15	86	16	96
MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(2.4k) – 0.1	16	117	19	88	18	110
MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(2.4k) – 0.4	20	114	21	87	20	111

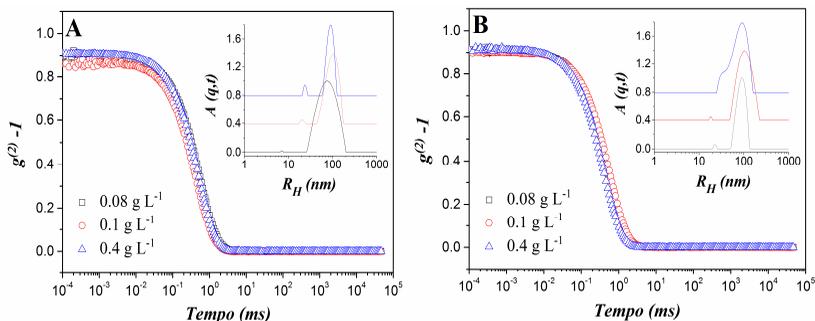
^{a)}Determinado a partir da relação de Stokes-Einstein; ^{b)} R_{H1} e R_{H2} representam os modos de relaxação rápido e lento, respectivamente.

O percentual de agregados micelares presentes nas soluções com concentração igual a 0.1 g L^{-1} foram de *ca.* 0.75% (100 rpm), 3% (500 rpm) e 8% (1000 rpm). Neste caso, o aumento na velocidade de agitação provocou um aumento na porcentagem de agregados micelares. Este comportamento, possivelmente, se deve ao fato da alta velocidade de agitação favorecer o contato entre as micelas de modo mais rápido do que o movimento browniano o faz. Logo, torna-se plausível dizer que os processos de agregação ortocinético (devido ao cisalhamento) e pericínético (devido ao movimento browniano) contribuem para a presença de agregados micelares nas soluções copolímeras em questão (LIU *et al.*, 2008).

Para o copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k), devido ao seu maior caráter hidrofóbico, a diluição direta em água a temperatura ambiente não foi possível em razão da pouca solubilidade do PMMA em meio aquoso (HOOGENBOOM *et al.*, 2010). Assim, considerando o fato do PMMA ser conhecido por exibir uma temperatura crítica superior de solução (USCT), *i.e.*, em baixas temperaturas o PMMA é insolúvel em água, porém pode ser dissolvido quando aquecido (CAN *et al.*, 2011; HOOGENBOOM *et al.*, 2010), as soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foram primeiramente aquecidas por 16 horas a $85 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo esta temperatura próxima a USCT reportada para o PMMA quando dissolvido em metanol e etanol (COWIE; MCEWEN; GARAY, 1986). Em seguida, as soluções foram resfriadas a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ e mantidas sob agitação durante 24 horas a 500 e 1000 rpm, uma vez que a 100 rpm não houve auto-associação do copolímero.

A Figura 22 (A-B) apresenta as funções de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) ($\theta = 90^\circ$) e suas respectivas distribuições de raio hidrodinâmico (A (q,t)) adquiridos a partir das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparadas em diferentes valores de concentração e velocidade de agitação.

Figura 22. Funções de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) para as soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) com diferentes concentrações preparadas por diluição direta em água sob agitação igual a: (A) 500 rpm e (B) 1000 rpm. Gráfico *inset* apresenta as distribuições de raio hidrodinâmico (A (q,t)) (*z-average*) monitoradas em $\theta = 90^\circ$.



Para ambas as soluções avaliadas, as funções de correlação temporal são caracterizadas por um decaimento exponencial simples. As distribuições de raio hidrodinâmico apontam a ocorrência de uma distribuição bimodal (caracterizada pela presença de dois modos de relaxação, rápido e lento) nas diferentes condições de concentração e velocidade de agitação avaliadas. Neste caso, o modo rápido de relaxação provavelmente corresponde à difusão dos LCMs, enquanto que o modo lento de relaxação está provavelmente relacionado à difusão dos agregados micelares. A presença de agregados, conforme discutido anteriormente, se deve ao baixo valor de potencial zeta apresentado pelos copolímeros e da alta taxa de cisalhamento.

As medidas multi-ângulos ($\theta = 40^\circ - 140^\circ$, intervalo 10°) revelaram que ambos os modos de relaxação, rápido e lento, exibem uma relação linear Γ vs. q^2 , confirmando o movimento browniano dos sistemas nanoparticulados em solução (STRANDMAN *et al.*, 2006). A Tabela 2 apresenta os valores de R_H determinados a partir de D (obtido através da inclinação de Γ vs. q^2) aplicando a relação de Stokes-Einstein (Eq. 4).

Tabela 2. Valores de R_H das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) com diferentes valores de concentrações obtidas a partir da diluição direta em água em diferentes velocidades de agitação.

Concentração do copolímero (g L^{-1})	Raio hidrodinâmico (nm) ^{a)}			
	500 rpm		1000 rpm	
	$R_{H1}^{b)}$	$R_{H2}^{b)}$	$R_{H1}^{b)}$	$R_{H2}^{b)}$
MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(4.8k) – 0.08	16	97	18	80
MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(4.8k) – 0.1	20	75	17	100
MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(4.8k) – 0.4	23	88	19	79

^{a)}Determinado a partir da relação de Stokes-Einstein; ^{b)} R_{H1} e R_{H2} representam os modos de relaxação rápido e lento, respectivamente.

Para as soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k), os valores de R_H referentes aos LCMs (modo rápido de relaxação) aumentaram com aumento da concentração do copolímero, embora o mesmo efeito não tenha sido observado diante do aumento da velocidade de agitação. Para os agregados micelares (modo lento de relaxação), os valores de R_H obtidos não mostraram uma tendência óbvia que pudesse ser relacionada às mudanças nos parâmetros de solução. Como esperado, os valores de R_H dos LCMs obtidos para MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foram ligeiramente maiores se comparados àqueles obtidos para MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k), uma vez que a massa molecular do PMMA é maior no copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k).

A presença de agregados micelares foi observada em todas as condições de concentração e velocidade de agitação investigadas. Porém, a nível de comparação, para a solução 0.1 g L^{-1} de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) agitada a 500 rpm foi observada uma porcentagem de agregados micelares de ~17%, enquanto que nas mesmas condições, para MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k), a porcentagem de agregados micelares observada foi de ~3%. Como discutido anteriormente, acredita-se que estes agregados micelares sejam *clusters* formados por micelas individuais que interagem entre si e que mostra, para este caso, o aumento do bloco de PMMA no copolímero de 24 para 48 unidades pode estar leve à um aumento das interações hidrofóbicas, resultando num aumento na porcentagem de agregados micelares (ALLEN; MAYSINGER; EISENBERG, 1999). As análises de SLS para determinação, por exemplo, do raio de giração (R_G) e do número de agregação não puderam ser conduzidas devido à distribuição de tamanho

bimodal apresentadas pelas soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k).

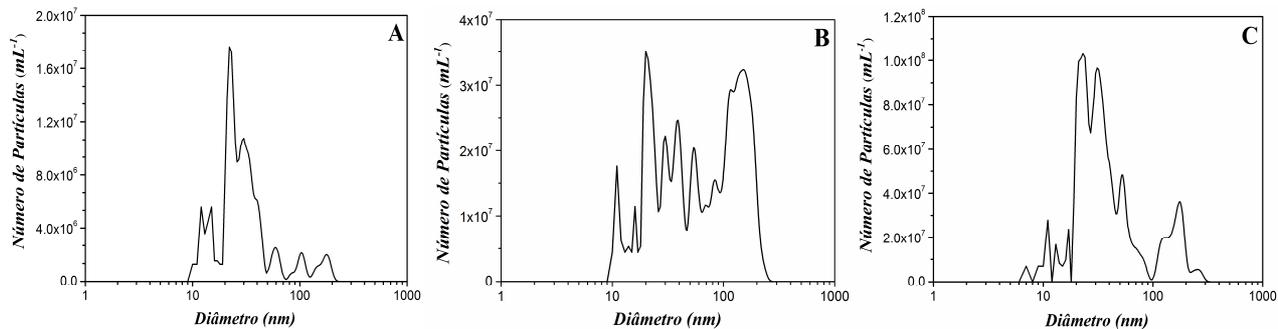
3.6.5.2 Auto-associação em água – NTA

A análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) possibilita a visualização direta do movimento browniano nas soluções contendo sistemas nanoparticulados. A luz espalhada por cada sistema nanoparticulado, diante da irradiação da luz, é detectada e rastreada individualmente por um software de análise de imagem através de um campo de visão bidimensional. O tamanho do sistema nanoparticulado pode então ser calculado usando a relação de Stokes-Einstein (*MUN et al.*, 2014; *PATTERSON et al.*, 2014).

De base dessa informação, soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) preparadas em concentração igual a 0.4 g L^{-1} sob agitação de 100, 500 e 1000 rpm foram caracterizadas por NTA e os resultados estão apresentados na Figura 23 (A-C). As soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) (0.4 g L^{-1}) preparadas a 100, 500 e 1000 rpm apresentaram pico máximo de diâmetro em *ca.* 22, 23 e 25 nm, respectivamente. Apesar do reduzido efeito sob o diâmetro, o aumento na velocidade de agitação promoveu um aumento na dispersidade de tamanho dos sistemas nanoparticulados, sendo este fenômeno caracterizado pelo alargamento na distribuição de tamanho. Este aumento na dispersidade de tamanho pode ser atribuído ao processo de agregação ortocinético (*i.e.*, induzida pelo cisalhamento) que favorece o contato entre os sistemas nanoparticulados e, por sua vez, pode levar à formação de sistemas nanoparticulados com tamanhos distintos.

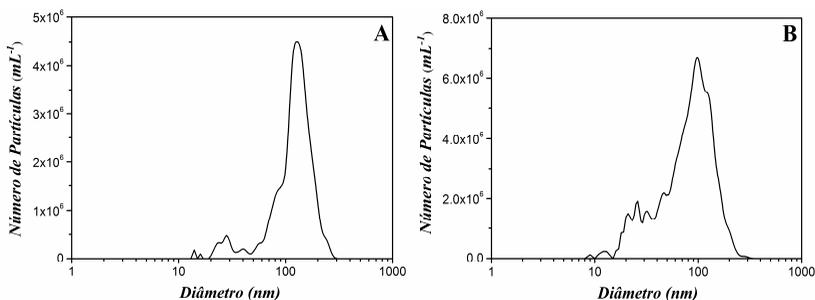
Para ambos os copolímeros, o aumento na concentração de 0.08- 0.4 g L^{-1} não promoveu um aumento significativo nos valores de diâmetro dos LCMs (dados não apresentados). Como esperado, os diâmetros médios dos sistemas nanoparticulados obtidos por NTA foram menores daqueles obtidos por DLS. Esta diferença no diâmetro pode ser explicado considerando que o valor obtido por DLS advém da distribuição de tamanho por intensidade, enquanto que por NTA o cálculo se baseia na distribuição de tamanho por número (*JAKOBSEN; VOGEL*, 2013).

Figura 23. Distribuição de tamanho por número para soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) com concentração igual a 0.4 g L⁻¹ obtidas por diluição direta em água sob agitação de: (A) 100; (B) 500; e (C) 1000 rpm.



No entanto, quando considerado a distribuição de tamanho por número, os valores de diâmetros obtidos pelas técnicas de NTA e DLS foram semelhantes (dados não apresentados) e igualmente menores daqueles obtidos por DLS a partir da distribuição de tamanho por intensidade. As soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparadas em concentração igual a 0.4 g L^{-1} por diluição direta em água sob agitação de 500 e 1000 rpm foram igualmente caracterizadas por NTA, estando os resultados apresentados na Figura 24 (A-B).

Figura 24. Distribuição de tamanho por número para soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) com concentração igual a 0.4 g L^{-1} obtidas por diluição direta em água sob agitação de: (A) 500 e (B) 1000.

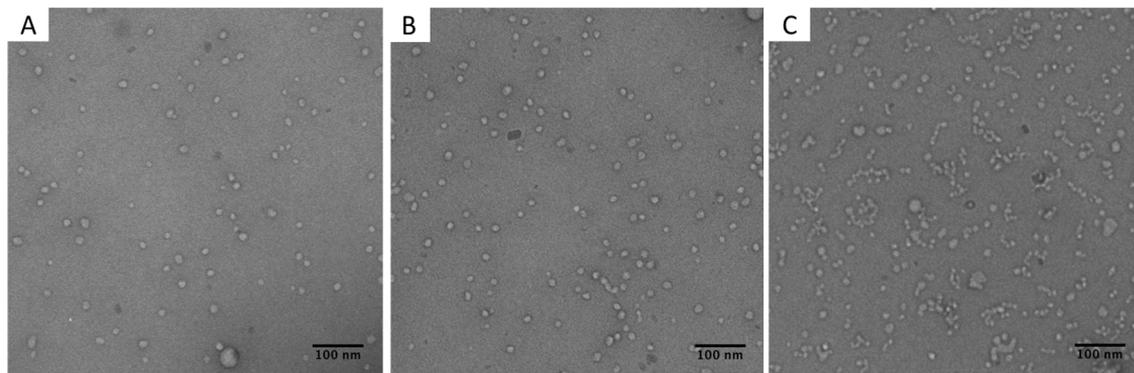


Observa-se, a partir das distribuições de tamanho, que as soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparadas sob agitação de 500 e 1000 rpm apresentam um pico máximo de diâmetro em *ca.* 98 e 99 nm, respectivamente. A presença de um maior número de agregados micelares nas soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em relação as soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) vem por corroborar os resultados obtidos por DLS, no que diz respeito ao aumento do bloco de PMMA favorecer um aumento nas interações hidrofóbicas e, conseqüentemente, na porcentagem de agregados micelares.

3.6.5.3 Auto-associação em água – MET

Análises de MET foram conduzidas para a caracterização das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) com concentração igual a 0.4 g L^{-1} preparadas nas diferentes condições de velocidade de agitação, estando as micrografias obtidas apresentadas na Figura 25 (A-C).

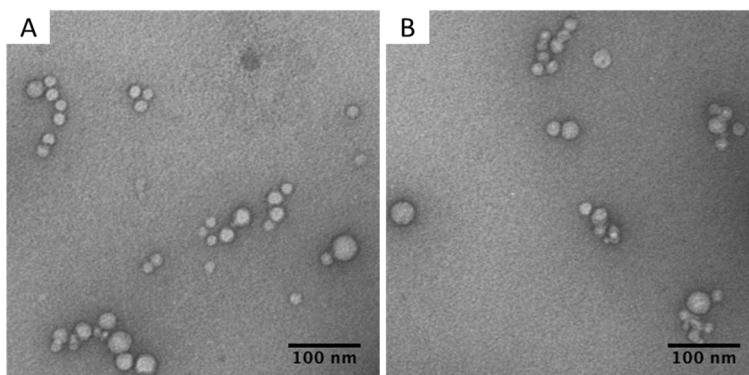
Figura 25. Micrografias obtidas por MET das soluções (0.4 g L^{-1}) de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) preparadas por diluição direta em água sob agitação igual a: (A) 100; (B) 500; e (C) 1000 rpm.



A análise das micrografias revelou a presença de LCMs esféricas com diâmetros menores que 20 nm para as soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) preparadas sob agitação de 100 e 500 rpm. A ausência de agregados micelares respalda a ideia quanto a sua natureza dinâmica das interações intermicelares. No entanto, a solução preparada a 1000 rpm se caracteriza pela presença de LCMs esféricos e agregados micelares com tamanhos bastantes polidispersos.

Para o copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k), soluções com concentração igual a 0.4 g L⁻¹ foram preparadas sob agitação de 500 e 1000 rpm, estando as micrografias obtidas apresentadas na Figura 26 (A-B).

Figura 26. Micrografias das soluções (0.4 g L⁻¹) de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparadas por diluição direta em água sob agitação igual a: (A) 500; e (B) 1000 rpm.



A análise das micrografias revela para ambas as condições de velocidade de agitação investigadas a presença de LCMs esféricos com valores de diâmetro entre 25 a 40 nm.

3.6.6 Auto-associação em acetona *via* diluição direta

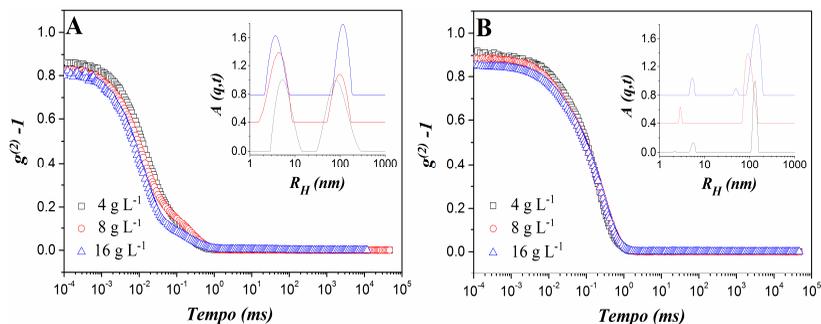
3.6.6.1 Auto-associação em acetona – DLS

A capacidade de auto-associação dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em acetona foi investigada em um primeiro momento por DLS. Em acetona, por sua vez, se espera a formação de sistemas nanoparticulados na qual os segmentos de

PMMA (bloco hidrofóbico) estejam compondo a corona, enquanto que os segmentos de maltoheptaose (bloco hidrofílico) estejam compondo o núcleo.

Logo, soluções com diferentes valores de concentração (4, 8 e 16 g L⁻¹) de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foram preparadas a partir da diluição direta destes em acetona. A Figura 27 (A-B) apresenta as funções de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) ($\theta = 90^\circ$) e suas respectivas distribuições de raio hidrodinâmico (A (q,t)) adquiridos a partir das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparadas em acetona sob agitação constante (500 rpm) e em diferentes valores de concentração.

Figura 27. Funções de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) para as soluções de (A) MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e (B) MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) com diferentes concentrações preparadas por diluição direta em acetona. Gráfico *inset* apresenta as distribuições de raio hidrodinâmico (A (q,t)) monitoradas em $\theta = 90^\circ$.



As funções de correlação temporal referentes às soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) apresentaram dois decaimentos exponenciais nos diferentes valores de concentração. Em contrapartida, as funções de correlação temporal das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) mostraram um decaimento exponencial simples. As distribuições de raio hidrodinâmico revelaram a ocorrência de uma distribuição bimodal (caracterizada por dois modos de relaxação, rápido e lento) nas diferentes concentrações investigadas e para ambos os copolímeros. Esta distribuição bimodal está associada à presença de duas populações de sistemas nanoparticulados com tamanhos distintos. Logo, o valor de R_H de cada população foi determinado aplicando a relação de Stokes-Einstein (Eq. 4) e estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de R_H das soluções obtidas a partir da diluição direta em acetona dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) nas diferentes concentrações investigadas.

		Raio hidrodinâmico (nm) ^{a)}			
		MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(2.4k)		MH(1.2k)- <i>b</i> -PMMA(4.8k)	
Concentração copolímero (g L ⁻¹)		R_{H1} ^{b)}	R_{H2} ^{b)}	R_{H1} ^{b)}	R_{H2} ^{b)}
	4	5	70	5	112
	8	6	91	5	117
	16	8	123	6	125

^{a)}Determinado a partir da relação de Stokes-Einstein; ^{b)} R_{H1} e R_{H2} representam os modos de relaxação rápido e lento, respectivamente.

Para as soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k), os valores de R_H referentes ao modo rápido de relaxação variaram entre *ca.* 5 nm (4 g L⁻¹) a 8 nm (16 g L⁻¹), enquanto que para as soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) os valores foram de *ca.* 5 nm, sofrendo pouca variação com o aumento da concentração. Conforme discutido na seção 4.5.2, os valores de R_H determinados teoricamente para os copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) na forma de cadeia individual foram de *ca.* 2.7 e *ca.* 3.6 nm, respectivamente.

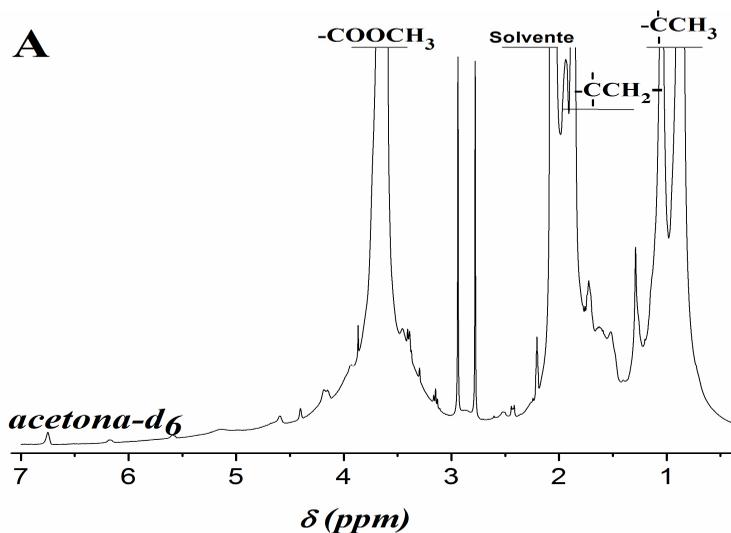
No entanto, partindo do pressuposto que após auto-associação em acetona os segmentos de maltoheptaose – que estão compondo o núcleo – se comportam como uma estrutura rígida (*rod-like*), temos $\langle r \rangle$ sendo igual a $\ell_{MH}N_{MH} + \ell_{PMMA} \cdot \sqrt{N_{PMMA}}$, onde ℓ representa o comprimento de uma unidade de repetição ($\ell_{PMMA} \sim 0.3$ nm e $\ell_{Maltose} \sim 0.5$ nm) e N representa o número de unidades de repetição que compõe cada bloco. Logo, o valor teórico de R_H determinado foi de *ca.* 5 nm para MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e *ca.* 5.6 nm para MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k). Diante disso, torna-se plausível relacionar o modo rápido de relaxação ao movimento difusivo de micelas do tipo reversa, na qual os segmentos de PMMA estão compondo a corona e os segmentos de maltoheptaose o núcleo micelar. Agregados de micelas do tipo reversa (relacionados ao modo lento de relaxação) foram também observados

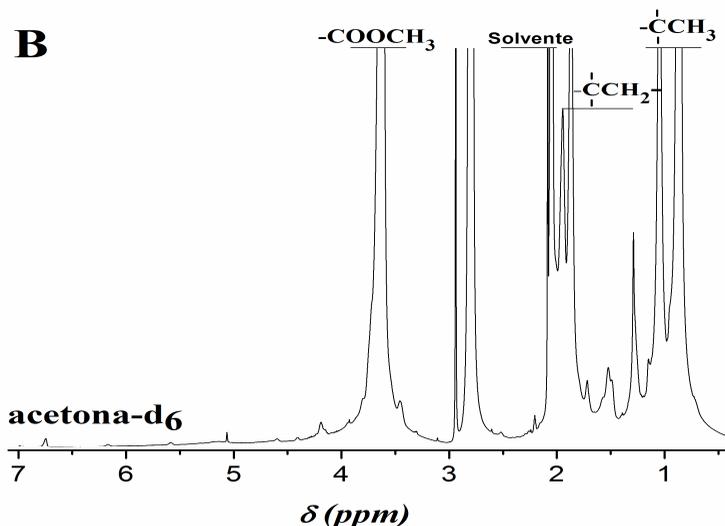
nas soluções para ambos os copolímeros e nas diferentes concentrações investigadas.

3.6.6.2 Auto-associação em acetona – RMN de ^1H

Visando confirmar a formação de micelas do tipo reversa, soluções (16 g L^{-1}) preparadas por diluição direta dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em acetona, foram analisadas por RMN de ^1H com os respectivos espectros apresentados na Figura 28 (A-B).

Figura 28. Espectros de RMN de ^1H obtidos a partir das soluções de (A) MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e (B) MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparadas *via* diluição direta em acetona- d_6 .





Os espectros de RMN de ^1H referentes às soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparadas em acetona mostram claramente sinais em $\delta \sim 3.7$, 1.8 e 0.7 ppm, sendo esses correspondentes aos grupos $-\text{COOCH}_3$, $=\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$, respectivamente (ALDOSARI; OTHMAN; ALSHARAEH, 2013). Conforme já mencionado, estes sinais são associados à grupos químicos do PMMA. Logo, presume-se que em acetona o bloco de PMMA esteja totalmente solvatado, *i.e.*, condição que permite a livre mobilidade dos prótons. Em contrapartida, o desaparecimento e/ou alargamento dos sinais associados à maltoheptaose ($\delta = 5.0 - 5.6$ ppm), indica que este bloco está evitando contato com o solvente, *i.e.*, condição que reduz a mobilidade dos prótons (PODARALLA *et al.*, 2012). Logo, estes resultados confirmam a formação de micelas do tipo reversa a partir da diluição direta dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em acetona.

3.6.6.3 Auto-associação em acetona – AFM

As Figuras 29 (A-C) e 30 (A-C) apresentam as imagens de AFM obtidas a partir das soluções dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k), respectivamente, após sua diluição direta em acetona.

Figura 29. Imagem topográfica (A) com a respectiva imagem de fase (B) e secção transversal (C) para a solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) preparada *via* diluição direta em acetona.

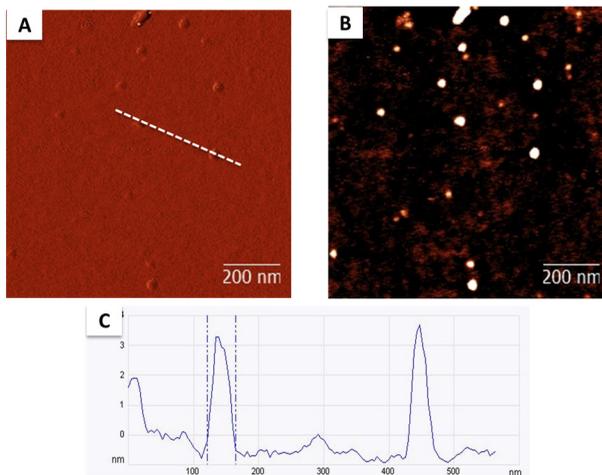
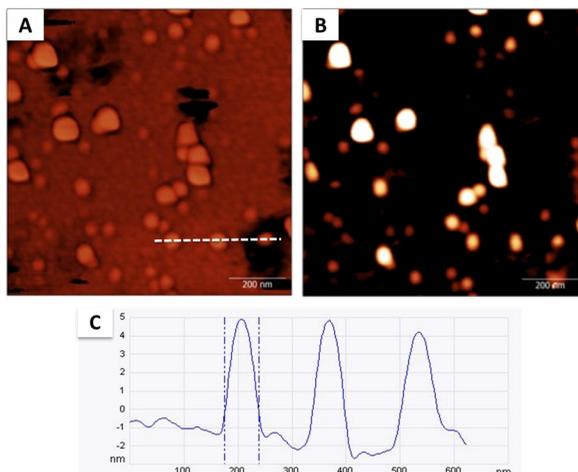


Figura 30. Imagem topográfica (A) com a respectiva imagem de fase (B) e secção transversal (C) para a solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparada *via* diluição em acetona.



A análise das imagens obtidas a partir da solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) revelaram a presença de micelas do tipo reversa esféricas

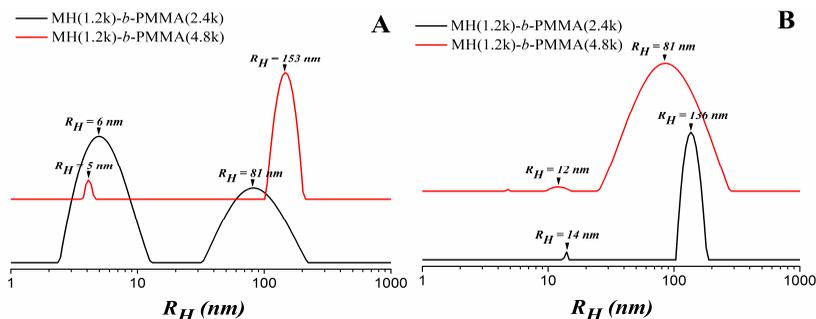
e agregados micelares com valores de diâmetro menores que 45 nm. Para a solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foram observadas micelas do tipo reversa esféricas e agregados micelares com valores de diâmetro menores que 70 nm. Cabe destacar que os diâmetros obtidos por AFM foram consideravelmente menores daqueles obtidos por DLS. Esta diferença no diâmetro pode ser atribuída à alta solvatação dos segmentos de PMMA – bloco que compõe a corona micelar – pela acetona, quando em solução. No entanto, o processo de secagem ao qual estes sistemas nanoparticulados são expostos ao serem depositados sobre o substrato *a priori* da análise, podem levar à um “encolhimento” dos segmentos de PMMA devido à ausência de solvatação, resultando assim numa diminuição acentuada no seus valores de diâmetro médio.

3.6.7 Efeito da polaridade do solvente

3.6.7.1 Propriedade solvente-responsiva – DLS e ACA

O efeito da polaridade do solvente sobre a morfologia dos sistemas nanoparticulados obtidos a partir da auto-associação dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foi inicialmente investigadas por DLS e ACA. A Figura 31 mostra a distribuição do raio hidrodinâmico aparente ($\theta = 90^\circ$ a 25°C) das soluções dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparados *via* diluição direta em acetona (A) e após adição de um excesso de água a essa solução (B).

Figura 31. Distribuição do raio hidrodinâmico aparente para as soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) obtidas por diluição direta em acetona (A) e após adição de excesso de água à essa solução (B).



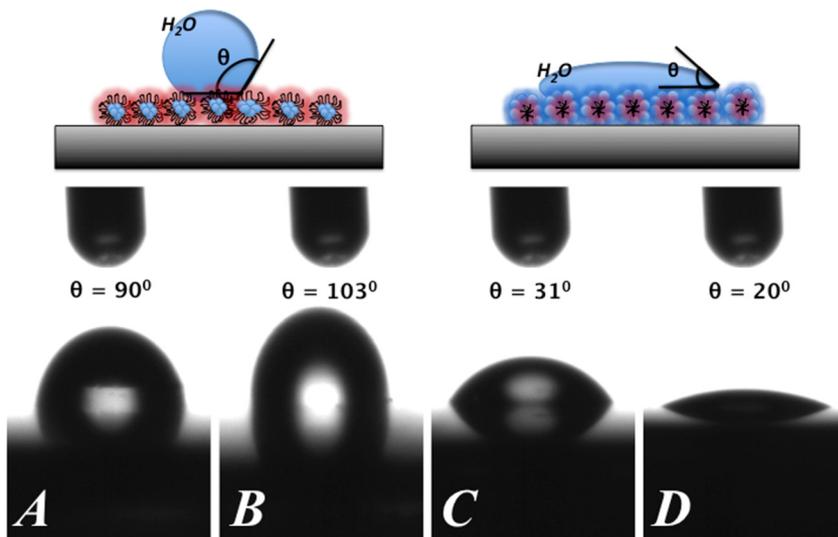
Para ambos os copolímeros ou condição de solvente observa-se uma distribuição de tamanho bimodal, cujo os valores de R_H aparente para a solução em acetona do copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) foram de 6 nm (micela do tipo reversa) e 81 nm (agregados micelares). Para a solução em acetona do copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) os valores de R_H aparente foram de 5 nm (micela do tipo reversa) e 150 nm (agregados micelares). Após adição de excesso de água (9 mL) a solução de acetona, os valores de R_H aparente observados foram de 14 nm (LCMs) e 136 nm (agregados micelares) para MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k), enquanto que para o copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) os valores observados foram de 12 nm (LCMs) e 81 nm (agregados micelares).

Diante disso, análises de ACA foram conduzidas visando investigar a natureza da corona micelar. Considerando o caráter hidrofílico e hidrofóbico associado à maltoheptaose e ao PMMA respectivamente, água foi usada como líquido que age como uma sonda sensível a natureza da superfície do substrato. Dessa forma, a Figura 32 (A-D) mostra os resultados de ACA referente às soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) obtidas em acetona e após adição de um excesso de água.

Os valores de ângulo de contato (θ) para uma gota molhante sobre os substratos recobertos com um filme (espessura de ~50 nm) das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparadas em acetona foram de $\theta \sim 90^\circ$ e $\sim 103^\circ$, respectivamente. Considerando que, o substrato apenas rinsado com acetona apresenta um valor de $\theta \sim 55^\circ$, o recobrimento deste com as soluções preparadas em acetona tornou a superfície mais hidrofóbica, uma vez que consensualmente valores de θ superiores à 90° caracterizam superfícies hidrofóbicas.

Em contrapartida, os valores de θ sobre os substratos recobertos com um filme (espessura de ~5 nm) das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) obtidas após adição de excesso de um água foram de $\theta \sim 31^\circ$ e $\sim 20^\circ$ respectivamente. Estes valores de ϕ , no caso inferiores a 90° , são característicos de superfícies hidrofílicas. Sendo assim, de base dos valores de ϕ obtidos, pode-se presumir que inicialmente em acetona, os segmentos de PMMA estão compondo a corona micelar (micelas do tipo reversa). Porém, a adição de um excesso de água promoveu uma inversão conformacional levando então aos segmentos de maltoheptaose comporem a corona micelar (micelas normais).

Figura 32. Imagem da gota de água sobre o substrato recoberto com soluções de (A) MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e (B) MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparadas em acetona; e soluções de (C) MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e (D) MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) obtidas após adição de 9 mL de água.



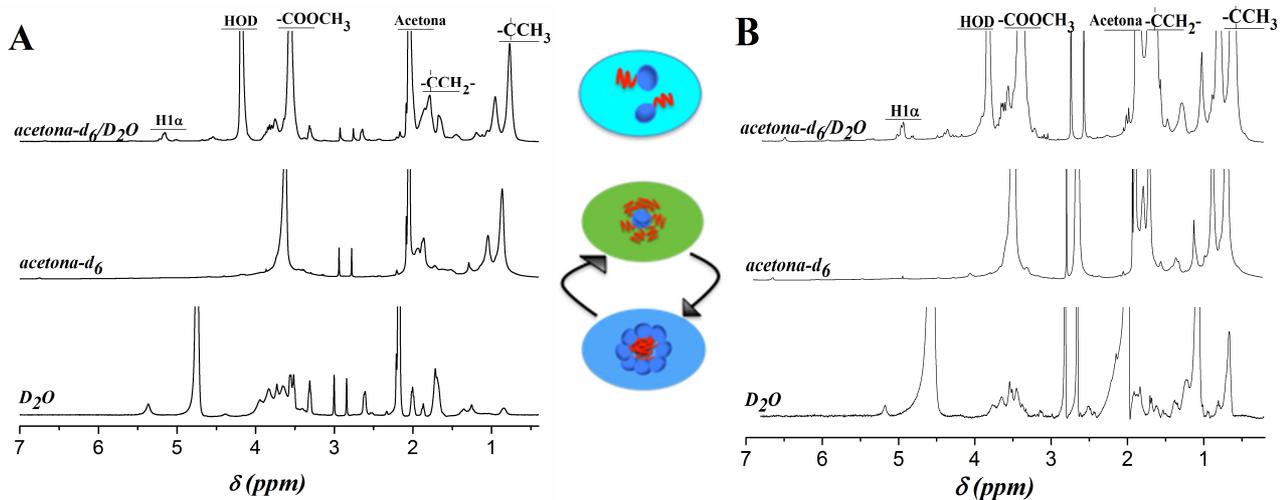
Outra observação diz respeito aos valores de ϕ obtidos para os substratos recobertos com as soluções preparadas em acetona serem consideravelmente superiores daquele observado para um filme de PMMA puro ($\theta \sim 68^\circ$) (MA *et al.*, 2007), sendo esta diferença atribuída ao efeito da rugosidade (LEE *et al.*, 2013).

3.6.7.2 Propriedade solvente-responsiva – RMN de ^1H

Análises de RMN de ^1H foram conduzidas visando confirmar a propriedade solvente-responsiva (*i.e.*, mudança morfológica mediada pela alteração da polaridade do solvente) dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k). Os espectros de RMN de ^1H obtidos das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) preparadas pela diluição direta em acetona- d_6 e após adição de um excesso de D_2O foram comparados aos espectros obtidos a partir da mistura binária de acetona- d_6 e D_2O , *i.e.*, mistura na qual os copolímeros se comportam como cadeias individuais. Logo, os espectros dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) dissolvidos na mistura binária de acetona- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$, em acetona- d_6 pura e após adição de um excesso de D_2O estão compilados na Figura 33 (A-B).

Como discutido na seção 4.5.6.2, os sinais relativos à maltoheptaose não foram observados nos espectros de RMN de ^1H obtidos para os copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) quando dissolvidos em acetona. No entanto, os sinais referentes ao PMMA podem ser claramente vistos, principalmente o sinal em $\delta \sim 3.7$ ppm, sinal este correspondente ao grupo $-\text{COOCH}_3$. Porém, após adição de um excesso de água os sinais relativos ao PMMA quase desaparecem em virtude da redução na mobilidade dos prótons (PODARALLA *et al.*, 2012). Entretanto, os sinais em $\delta = 5.0 - 5.6$ ppm correspondentes à maltoheptaose (ligações α -1,4) (KRALJ *et al.*, 2011) puderam ser claramente observados, confirmando assim a presença da maltoheptaose na corona micelar após adição de um excesso de água à solução de acetona. Logo, estes resultados corroboram a ideia quanto a capacidade destes copolímeros em alterar sua morfologia de micelas do tipo reversa à LCMs mediante alterações na polaridade do meio em que o mesmo está dissolvido.

Figura 33. Espectros RMN de ^1H das soluções do (A) copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) quando dissolvido na mistura binária acetona- d_6 / D_2O , em acetona- d_6 (por diluição direta) e após adição de um excesso de D_2O e do (B) copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) quando dissolvido na mistura binária acetona- d_6 / D_2O , em acetona- d_6 (por diluição direta) e após adição de um excesso de D_2O .



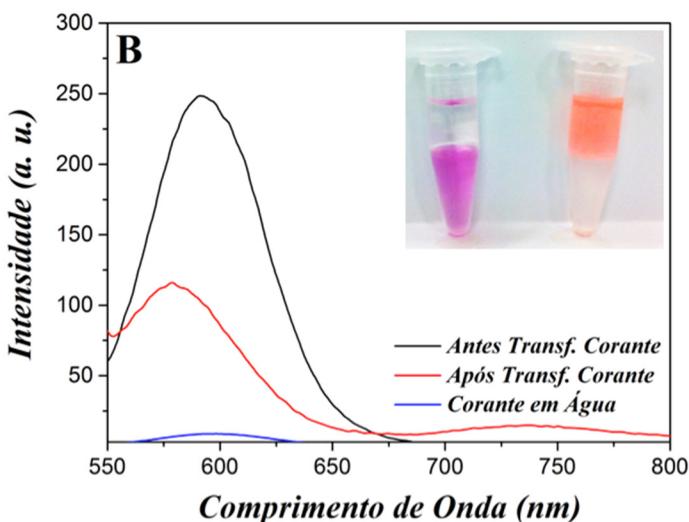
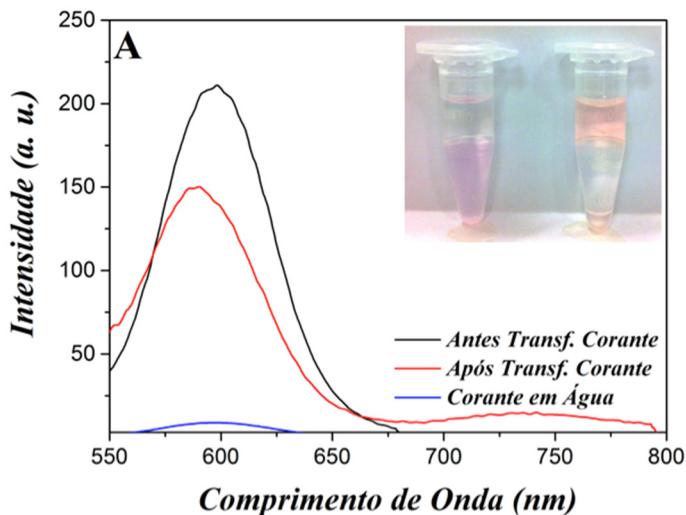
3.6.7.3 Propriedade solvente-responsiva – Espectroscopia de fluorescência

A habilidade dos sistemas nanoparticulados obtidos pela auto-associação dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em carrear substâncias hidrofóbicas em seu núcleo num meio aquoso, e então liberá-lo numa interface polar-apolar foi investigada por espectroscopia de fluorescência. O corante vermelho do Nilo (praticamente insolúvel em água) foi usado como modelo de substância hidrofóbica. Em ambientes hidrofóbicos, o vermelho do Nilo que é um corante solvatocrômico, mostra forte fluorescência. Entretanto, em ambientes hidrofílicos, apresenta fraca fluorescência (HEVUS; KOHUT; VORONOV, 2011).

Os sistemas nanoparticulados contendo vermelho do Nilo encapsulado apresentaram um valor de R_H aparente ($\theta = 90^\circ$) de *ca.* 14 nm, valor este observado para ambos os copolímeros. A presença do vermelho do Nilo no núcleo micelar (com caráter hidrofóbico) foi confirmada por espectroscopia de fluorescência, haja visto os altos valores de intensidade observados, como mostra a Figura 34 (A-B).

Visando avaliar a capacidade de transferência do corante vermelho do Nilo a partir dos sistemas nanoparticulados para uma interface polar/apolar, tolueno foi escolhido como solvente apolar. Para tanto, conforme observado nas imagens *inset*, a transferência do corante a partir do núcleo micelar ocorreu com sucesso, haja visto a mudança na coloração da fase orgânica devido ao efeito solvatocrômico associado ao vermelho do Nilo.

Figura 34. Espectros de fluorescência do corante vermelho do Nilo em água (linha azul) e encapsulado nos sistemas nanoparticulados obtidos a partir dos copolímeros (A) MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e (B) MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) antes (linha preta) e após (linha vermelha) transferência numa interface polar/apolar. *Inset* aparência da solução antes (lado esquerdo) e após (lado direito) transferência do corante a partir dos sistemas nanoparticulados presente em água (fase inferior) para o tolueno (fase superior).



Ademais, uma significativa diferença na intensidade da coloração da fase tolueno após transferência do corante a partir das soluções de MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foi observada e pode ser atribuída a diferenças na capacidade de encapsulação e eficiência de transferência (HEVUS; KOHUT; VORONOV, 2011), sendo ambos os aspectos relacionados ao tamanho da cadeia do bloco

hidrofóbico (WANG; JIA; LI, 2013). Cabe destacar ainda que esta diferença na intensidade de coloração da fase tolueno não pode ser simplesmente limitada à quantidade de corante transferido a partir dos sistemas nanoparticulados, uma vez que não se pode ignorar a possível presença de corante disperso em água devido ao particionamento entre sistemas nanoparticulados e o meio aquoso, na qual pode facilmente migrar da água para o tolueno (HEVUS; KOHUT; VORONOV, 2011; HEVUS *et al.*, 2012).

Embora uma quantificação mais apurada quanto à quantidade de corante transferida não tenha sido feita, comparando os valores de intensidade antes e após a transferência, pode-se observar que ~30% e 50% do corante vermelho do Nilo foi transferido para o tolueno. Afora isso, após transferência do corante, para ambos copolímeros se observa no espectro um largo ombro (670 – 800 nm). A presença deste pode ser atribuída a um deslocamento solvatocrômico positivo devido à formação de uma camada de solvatação em torno das moléculas de vermelho do Nilo.

3.7 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

Os copolímeros investigados neste primeiro capítulo – MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) – mostraram-se capazes de se auto-associar em LCMs e micelas do tipo reversa quando dissolvidos diretamente em água e acetona, respectivamente. Os parâmetros moleculares (razão entre os blocos hidrofóbico/hidrofílico) e os parâmetros de solução (concentração do copolímero e velocidade de agitação) afetaram diretamente no tamanho das LCMs e também na porcentagem de agregados micelares na solução. Além disso, os sistemas nanoparticulados obtidos mostraram-se capazes de inverter sua estrutura em resposta a mudança na polaridade do solvente de micelas normais (água) para micelas do tipo reversa (acetona). Essa habilidade mostrada pelos sistemas nanoparticulados em inverter sua estrutura foi também confirmada usando o corante vermelho do Nilo (corante hidrofóbico). Assim, micelas obtidas a partir da auto-associação dos copolímeros *via* nanoprecipitação em água mostraram-se capazes de encapsular o corante e então transferi-lo numa interface polar/apolar. Esta habilidade torna a aplicação dos sistemas nanoparticulados obtidos a partir da auto-associação desses copolímeros potencialmente vantajosa, uma vez que possibilita a preparação de sistemas para a liberação direcionada de fármacos.

CAPÍTULO 4. OBTENÇÃO DE LCMs POROSOS A PARTIR DA FOTODEGRADAÇÃO DO NÚCLEO MICELAR INDUZIDA POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

4.1 INTRODUÇÃO DO CAPÍTULO

A habilidade apresentada pelos copolímeros em bloco em se auto-associar em um solvente seletivo tem se mostrado uma poderosa ferramenta no preparo de sistemas nanoparticulados com diferentes morfologias, tais como: micelas esféricas e filomicelas, vesículas e bicamadas. Estes sistemas nanoparticulados podem ser aplicados como sistemas de liberação de fármacos (ALIBOLANDI *et al.*, 2015; WANG, 2013), nanoreatores (CHEN; SCHÖNHERR; VANCOSO, 2009; KHULLAR *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2011) e modelos (CHANG *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 1999; SAMARAJEEWA *et al.*, 2012; TURNER; WOOLEY, 2004; ZHANG *et al.*, 2005). A aplicação como modelos (tradução do termo em inglês *template*) têm ganhado atenção dos pesquisadores devido à possibilidade em se preparar estruturas do tipo núcleo-corona, onde o núcleo é composto pelos segmentos hidrofóbicos e a corona composta pelos segmentos hidrofílicos do copolímero. Esta configuração estrutural permite que reações de reticulação possam ocorrer tanto no núcleo (SCHMIDT; BORSALI; GIACOMELLI, 2009; WANG; HENSELWOOD; LIU, 1998) como na corona micelar (HUANG *et al.*, 1999; TURNER; WOOLEY, 2004; ZHANG; REMSEN; WOOLEY, 2000). A reticulação da corona micelar fornece aos sistemas nanoparticulados a estabilidade estrutural necessária para a obtenção de sistemas porosos a partir da remoção do núcleo *via* procedimentos químico e/ou físico (MENG *et al.*, 2010).

Sistemas nanoparticulados porosos procedentes de micelas foram reportados pela primeira vez em meados dos anos 90. Neste caso, micelas obtidas a partir da auto-associação do copolímero poli(ácido acrílico)-*b*-poliisopreno foram usadas como modelos no preparo de sistemas porosos através da remoção do núcleo *via* procedimento químico (HUANG *et al.*, 1999). Estes sistemas porosos, por sua vez, apresentam propriedades únicas que incluem, grande área superficial (CHANGEZ *et al.*, 2013), maior capacidade de encapsulação de agentes ativos (MENG *et al.*, 2010), baixa densidade e excelentes características de permeação e penetração (FUJI; TAKAI; RIVERA VIRTUDAZO, 2014). Assim, a basear-se nestas propriedades, este capítulo teve por intento avaliar a viabilidade de preparação de sistemas nanoparticulados porosos usando os sistemas nanoparticulados obtidos a partir da auto-

associação do copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) como modelos. Para tanto, os sistemas nanoparticulados obtidos tiveram primeiramente seus segmentos de MH (corona) covalentemente reticulados *via* adição de Michael usando o divinil sulfona (DVS) como agente reticulante. Em seguida, os segmentos de PMMA (núcleo) foram removidos *via* fotodegradação decorrente da exposição destes à luz UV em comprimento de onda igual a 254 nm (FAYAD *et al.*, 2014). As técnicas de espalhamento de luz estático (SLS) e dinâmico (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo (MEV-FEG), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) foram empregues na caracterização dos sistemas nanoparticulados sólidos e porosos. Todas as análises de caracterização apresentadas neste capítulo foram realizadas utilizando equipamentos pertencentes ao CERMAV (Grenoble, França).

4.2 MATERIAIS

A água utilizada neste estudo foi purificada através de um sistema Milli-Q[®] (Purelab, ELGA), com uma resistividade igual a $18.2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$. Acetona PA (99+% pureza) foi adquirida da Carlos Erba Reagentes, enquanto que o DVS foi adquirido da Sigma-Aldrich. O filtro Rotilabo[®] acetato de celulose (AC – 0.20 μm) foi adquirido da Carl Roth GmbH.

4.3 AUTO-ASSOCIAÇÃO DO COPOLÍMERO MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k)

A auto-associação do copolímero foi proporcionada a partir do uso de um protocolo de nanoprecipitação (FESSI *et al.*, 1989). Para tanto, 3 mg de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foi dissolvido numa mistura binária de acetona e água (0.78/0.22% m/m), sendo esta mantida sobre agitação até completa dissolução do copolímero. A solução foi então adicionada gradualmente (0.5 mL h^{-1}) em 3 mL de água Milli-Q[®] e agitada (50 rpm) durante 3 horas. Acetona foi removida sob pressão reduzida a 30 °C e a solução filtrada usando filtro AC - 0.2 μm .

4.4 RETICULAÇÃO DA CORONA DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS

Para a reticulação da corona, 0,5 mL da solução contendo os sistemas nanoparticulados obtidos a partir da auto-associação do MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) (1 g L^{-1}) foi adicionada a 1,5 mL de água Milli-Q[®] contendo 10 μL de DVS previamente solubilizado. A solução foi mantida sobre agitação constante (150 rpm) a temperatura ambiente durante 24 horas, e então filtrada usando filtro AC – 0.2 μm .

4.5 RADIAÇÃO UV

A solução reticulada de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foi condicionada em um tubo cilíndrico de quartzo (10 mm de diâmetro) e então exposta à radiação UV em diferentes tempos ($\lambda = 254 \text{ nm}$ e com uma densidade de laser de $\sim 2.5 \text{ J cm}^{-2}$). Como controle, uma solução não-reticulada de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foi preparada e exposta à radiação UV seguindo o mesmo protocolo aplicado a solução reticulada.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS

4.6.1 Espalhamento de Luz Dinâmico e Estático (DLS e SLS)

As análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS) foram conduzidas usando um goniômetro ALV-5000/ALV, equipado com um laser He-Ne com potência igual a 35 mW ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$) como fonte de radiação e um correlator digital ALV/LSE-5004. Nas medidas de SLS, a intensidade de luz espalhada foi mensurada num ângulo de espalhamento de 90° com um tempo de contagem de 120 segundos. Nas medidas de DLS, os tubos cilíndricos de quartzo contendo separadamente a solução reticulada e não-reticulada de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foram imersos num banho de tolueno a $25.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Os dados foram adquiridos usando o correlator digital ALV/LSE-5004 e o tempo de contagem para cada ângulo avaliado ($40^\circ - 140^\circ$, intervalo de 10°) foi de 300 segundos. A distribuição do tempo de relaxação (τ) foi obtido através da análise CONTIN da função de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) (PROVENCHER, 1979). A partir do coeficiente aparente de difusão (D), obtido pela inclinação da reta do plote de Γ vs. q^2 , o raio hidrodinâmico (R_H) foi determinado aplicando a relação de Stokes-Einstein (Eq. 4). O raio de giração (R_G) foi determinado a partir da parte elástica da luz espalhada ($I(q)$) usando a aproximação de Guinier (Eq. 6);

$$\ln I = \ln I_0 - \frac{1}{3} q^2 R_G^2 \quad (6)$$

na qual I corresponde a luz espalhada e I_0 a luz espalhada em $q = 0$.

4.6.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A solução contendo sistemas nanoparticulados de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) obtida usando um protocolo de nanoprecipitação foi, primeiramente, reticulada com DVS. O excesso de DVS foi então removido a partir da solução por diálise contra água deionizada em membrana de diálise (*cut-off* 2 kDa) durante 48 horas. Neste período, a água foi trocada 4 vezes em intervalos regulares. A amostra resultante foi então liofilizada durante 24 horas. Assim, pastilhas da amostra liofilizada da solução reticulada de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k), do copolímero puro e do DVS puro foram separadamente moídas, misturadas a 100 mg de KBr e então prensadas em alta pressão. O espectro de FTIR foi registrado usando um espectrômetro de infravermelho Perkin-Elmer Spectrum RXI na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.6.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H)

Solução copolimérica de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) (3 g L^{-1}) foi preparada em uma mistura binária de acetona- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (0.78/0.22% m/m) e gradualmente adicionada (0.5 mL h^{-1}) em 3 mL de D_2O e agitada (50 rpm) durante 3 horas. Em seguida, a solução contendo sistemas nanoparticulados foi exposta à radiação UV e a presença de subprodutos oriundos da fotodegradação do PMMA foi monitorada por RMN de ^1H em diferentes tempos de exposição (0, 4 e 24 horas) usando um espectrômetro Bruker Avance DRX-400 (Billerica, MA, EUA). Os espectros obtidos foram analisados usando o programa ACD/NMR.

4.6.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises de MET foram conduzidas em um microscópio eletrônico CM200 Philips (Hillsboro, OR, EUA) operando a uma voltagem de 80 kV, sendo as imagens registradas em filmes Kodak SO163. A solução reticulada de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) (1) exposta e (2) não-exposta à radiação UV foram depositadas sobre *grid* de cobre

revestida com uma fina camada de carbono e previamente tratada com ozônio. As amostras analisadas foram negativamente coradas com acetato de uranila (2% m/v).

4.6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura com canhão de emissão de campo (MEV-FEG)

As análises de MEV-FEG foram conduzidas num microscópio FEI/QUANTA FEG 250 (Hillsboro, OR, EUA) operando em uma voltagem de 8 kV. A solução reticulada de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) (1) exposta e (2) não-exposta à radiação UV foram depositadas sobre substratos de silício e recobertas com uma fina camada (1 nm) de carbono/platina.

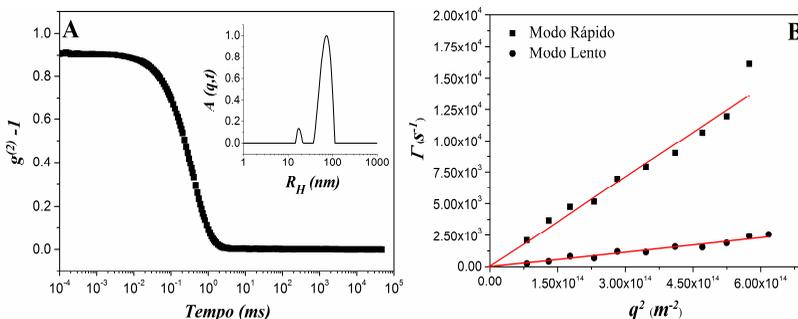
4.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.7.1 Auto-associação por nanoprecipitação do copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) – DLS e MET

A solução contendo sistemas nanoparticulados de MH(1.2k)-PMMA(4.8k) foi preparada usando um protocolo típico de nanoprecipitação. Seguindo este protocolo, a primeira etapa trata da escolha de um solvente ou de uma mistura de solventes que sejam termodinamicamente “bons” para ambos os blocos que compõem o copolímero. Esta condição permite que o copolímero se comporte como cadeias individuais em solução (OTSUKA *et al.*, 2013c). Com base nos resultados apresentados no Capítulo 4, sabe-se que na mistura binária acetona/água 0.78/0.22% (m/m) o copolímero MH(1.2k)-PMMA(4.8k) comporta-se como cadeias individuais em solução. Logo, a adição desta solução em água foi escolhida para induzir a auto-associação deste copolímero conforme protocolo típico de nanoprecipitação.

A Figura 35 (A-B) apresenta a função de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) ($\theta = 90^\circ$) e a distribuição de raio hidrodinâmico ($A(q,t)$) adquiridos a partir da solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) e sua respectiva dependência da frequência de relaxação (Γ) vs. o quadrado do módulo do vetor de espelhamento (q^2).

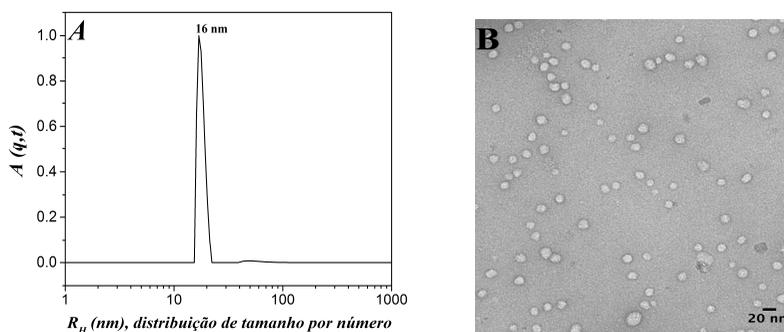
Figura 35. (A) Função de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) e correspondente distribuição do raio hidrodinâmico ($A(q,t)$) (z -average) monitorada em $\theta = 90^\circ$; (B) Γ vs. q^2 para a solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k).



A função de correlação temporal mostrou um decaimento exponencial simples com dois modos difusivos, *i.e.*, um modo rápido e um lento. O modo difusivo rápido provavelmente corresponde as micelas, enquanto que o modo lento é correspondente aos agregados micelares. Além disso, para ambos os modos difusivos, o movimento browniano dos sistemas nanoparticulados em solução pôde ser confirmado através da relação linear entre Γ vs. q^2 . Logo, aplicando o valor de D obtido através do plote de Γ vs. q^2 (D modo rápido = $2.37 \cdot 10^{11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$; D modo lento = $3.84 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) na relação de Stokes-Einstein foi possível se determinar os valores de R_H , sendo esses de *ca.* 10 nm (micelas) e 64 nm (agregados micelares).

Entretanto, deve-se notar que a maior intensidade do pico relativo aos agregados micelares (modo lento de relaxação) não significa que estes estão em maior número na solução. Pelo contrário, o número de agregados micelares representa menos que 2% do número total de sistemas nanoparticulados na solução, uma vez que esta é composta majoritariamente (98+%) por micelas (modo rápido de relaxação). O menor número de agregados micelares na solução pôde ser confirmado a partir das análises de DLS e MET, estando os resultados apresentados na Figura 36 (A-B). Os resultados de distribuição de tamanho por número obtido por DLS e a micrografia obtida por MET revelaram que o copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) se auto-associa em micelas esféricas com valor de R_H de *ca.* 16 nm. Logo, a considerar o meio aquoso, presume-se que essas micelas tenham seu núcleo composto por PMMA e sua corona composta pela maltoheptaose.

Figura 36. (A) DLS, distribuição de tamanho por número e (B) MET, micrografia dos sistemas nanoparticulados obtidos da auto-associação do MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em água.



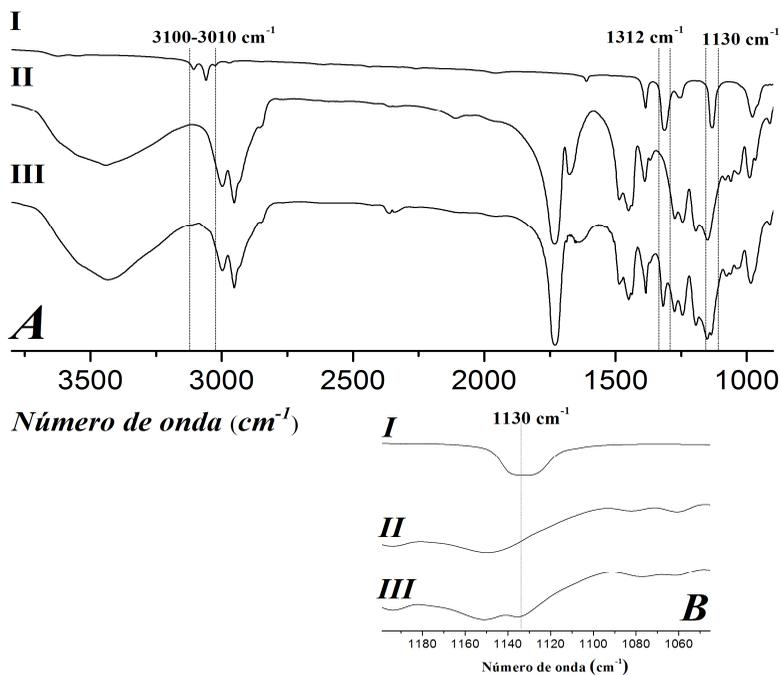
4.7.2 Reticulação da corona micelar - FTIR

A abordagem de reticulação da corona micelar teve por intento fornecer ao sistema nanoparticulado o suporte estrutural necessário para manter a estrutura oca após remoção do PMMA presente no núcleo *via* fotodegradação. Logo, os segmentos de maltoheptaose que compõem a corona micelar foram reticulados usando DVS como agente reticulante. Para tanto, visando minimizar a ocorrência de reticulação intermicelar (*i.e.*, entre micelas), 0.5 mL da solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foi diluída em 1.5 mL de água Milli-Q[®] contendo DVS previamente solubilizado na razão molar DVS:MH de 1:1. Assim, através da análise dos espectros de FTIR pôde-se investigar a ocorrência da reticulação intramicelar (*i.e.*, entre os segmentos de maltoheptaose presentes na corona), conforme mostra a Figura 37.

A reticulação dos segmentos da maltoheptaose presentes na corona micelar foi proporcionada pelo agente reticulante DVS *via* adição de Michael entre os grupos hidroxilas. As bandas observadas no espectro de FTIR do DVS puro (Fig. 37A-I) estão distribuídas da seguinte forma (ELLZY; JENSEN; KAY, 2003): uma banda de forte intensidade em 1312 cm⁻¹ é atribuída à vibração de estiramento assimétrico do grupo ν[S=O], enquanto que a banda em 1130 cm⁻¹ está relacionada à vibração de estiramento simétrico do grupo ν[S=O]. As bandas em 1610 cm⁻¹ e 3010-3100 cm⁻¹ são atribuídas à vibração dos grupos ν[C=C] e ν[=CH], respectivamente. No espectro de FTIR da solução não-reticulada de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) (Fig. 37A-II) foram observadas bandas em 3440 cm⁻¹, 2952 cm⁻¹, 1150 cm⁻¹ e 1030 cm⁻¹ que estão associadas ao estiramento simétrico e antissimétrico de

$\nu[\text{OH}]$, $\nu[\text{CH}_2]$, $\nu[\text{C-C}]$ e a vibração de flexão de $\nu[\text{C-OH}]$, respectivamente (SAMBASEVAM *et al.*, 2013).

Figura 37. (A) Espectros de FTIR para (I) DVS puro, (II) solução não-reticulada e (III) solução reticulada de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) e (B) espectros de FTIR na região de 1045-1200 cm^{-1} .

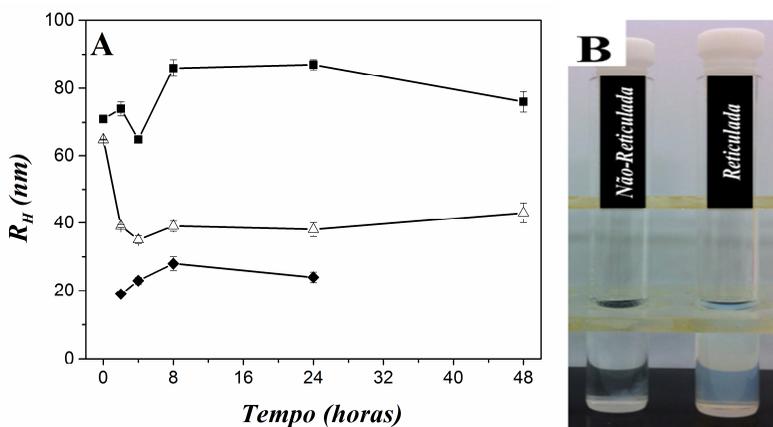


O espectro de FTIR referente à solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) reticulada com DVS (Fig. 37A-III) mostra uma banda intensa em 1312 cm^{-1} que corresponde à vibração de estiramento assimétrico do grupo $\nu[\text{S=O}]$. Além disso, a ausência da banda em 1610 cm^{-1} referente à ligação $\nu[\text{C=C}]$ e o deslocamento da vibração de estiramento do grupo $\nu[=\text{CH}]$ para menor valor de comprimento de onda indica a abertura da dupla ligação do DVS durante a reação de reticulação formando assim a ligação C-O-C (TOLSTOY; CHERNYSHOVA; SKRYSHEVSKY, 2003). Logo, estes resultados acabam por confirmar o sucesso na reticulação dos segmentos de maltoheptaose usando DVS.

4.7.3 Exposição dos sistemas nanoparticulados de MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) à radiação UV – DLS, SLS e RMN de ^1H

O efeito da exposição à radiação UV sobre as propriedades morfológicas e dimensionais das soluções reticulada e não-reticulada de MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) foi, inicialmente, avaliada por DLS como mostra a Figura 38 (A-B).

Figura 38. (A) Valores de R_H aparente para a (■) solução não-reticulada de MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) (modo de relaxação lento), (◆) solução não-reticulada de MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) (modo de relaxação rápido) e (Δ) solução reticulada de MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) em função do tempo de exposição à radiação UV ($\theta = 90^\circ$) e (B) aparência das soluções não-reticulada (lado esquerdo) e reticulada (lado direito) de MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) após 48 horas de exposição à radiação UV.



A fotodegradação do PMMA presente no núcleo micelar foi realizada através da exposição das soluções reticulada e não-reticulada de MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) à uma radiação UV com densidade de energia de $\sim 2.5 \text{ J cm}^{-2}$. Antes de proceder a diluição que visou minimizar a ocorrência de reticulação intermicelar, a porcentagem de micelas com R_H de *ca.* 10 nm na solução de MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) representava 98+% do número total de sistemas nanoparticulados. Entretanto, após a solução de MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) ser diluída, somente uma única população micelar foi observada para as soluções reticulada e não-reticulada (Fig. 38A). O valor de R_H aparente determinado por DLS para as soluções reticulada e não-reticulada de

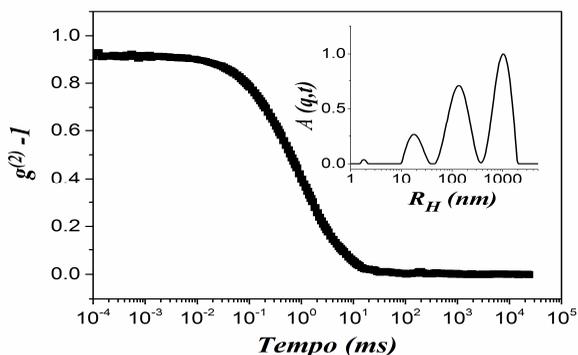
MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) foi de *ca.* 65 nm e 70 nm, respectivamente. Este comportamento pode estar associado à indução de uma transição morfológica de micelas à LCMs (caracterizada por um tipo de estrutura multicompartmental formada de várias micelas individuais) mediante diluição. Este comportamento, inclusive, já foi relatado em outros estudos, que reportaram a ocorrência de transição morfológica induzida por diluição (HU *et al.*, 2005; SHEN; EISENBERG, 1999; VERMA *et al.*, 2011).

A solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) reticulada, após 2 horas de exposição à radiação UV, mostrou um notável decréscimo no valor de R_H aparente de *ca.* 65 para 40 nm, mantendo este valor aproximadamente constante durante as 48 horas de exposição. Visualmente, ao final das 48 horas, a solução reticulada apresenta uma tonalidade azulada normalmente associada ao efeito Tyndall (SHAW, 1992) devido à presença de “grandes” sistemas nanoparticulados (DAVIES; KETNER; RAGHAVAN, 2006).

Por outro lado, após 2 horas de exposição à radiação UV, a solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) não-reticulada apresentou dois diferentes valores de R_H aparente. O primeiro (relativo ao modo de relaxação rápido) tem um valor de *ca.* 19 nm, enquanto que o segundo (relativo ao modo de relaxação lento) tem um valor de *ca.* 74 nm. Com o decorrer do tempo de exposição à radiação UV esses valores de R_H aparente acabaram por sofrer mudanças, sendo observado ao final apenas um modo difusivo. Após 48 horas, a presença de agregados na solução pôde ser confirmado a olho nu (Fig. 38B).

Ainda no que diz respeito a solução não-reticulada de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k), acredita-se que os grandes agregados vistos após 48 horas de exposição à radiação UV são oriundos da agregação de segmentos de maltoheptaose na qual o PMMA está (1) parcialmente ou (2) totalmente fotodegradado. De modo geral, tal situação se deve ao fato dos LCMs não-reticulados não disporem do suporte estrutural necessário para impedir sua dissociação após o início da fotodegradação do PMMA presente no núcleo. Desta forma, é de se esperar que em alguns casos, a dissociação das LCMs não-reticuladas dar-se-á antes dos segmentos de PMMA estarem totalmente fotodegradados. Neste caso, a presença de pequenos fragmentos insolúveis em água de PMMA nos segmentos de maltoheptaose pode acabar por induzir novamente sua auto-associação levando à formação de agregados. Além disso, conforme mostra a Figura 39, mesmo a maltoheptaose pura quando dissolvida em água a 25 °C forma agregados com valores de R_H aparente que variam de *ca.* 15 à 650 nm.

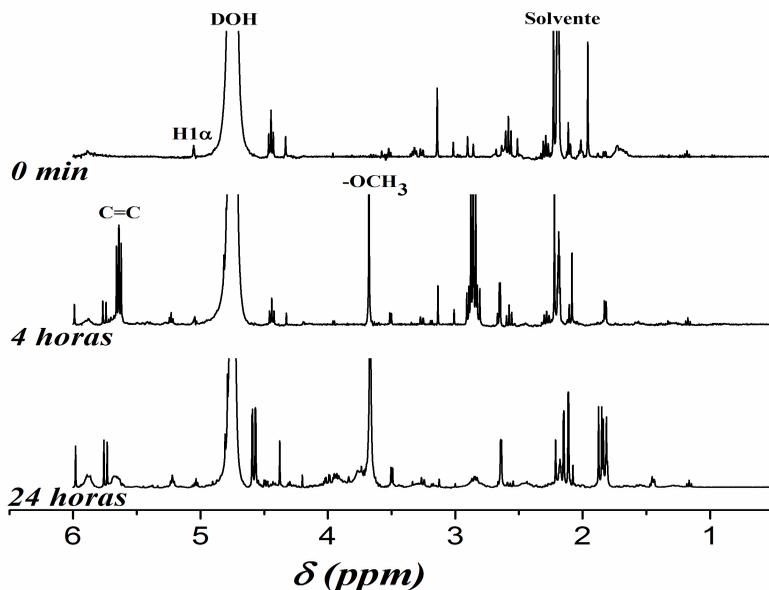
Figura 39. (A) Função de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) e (B) distribuição do raio hidrodinâmico aparente ($\theta = 90^\circ$) de uma solução de maltoheptaose pura em concentração igual a 2 g L^{-1} .



Com base nesses resultados, análises de RMN de ^1H foram conduzidas a fim de monitorar a fotodegradação do PMMA a partir do núcleo dos sistemas não-reticulados obtidos pela auto-associação do MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em água.

Para o tempo zero, a ausência do sinal atribuído ao grupo $-\text{OCH}_3$ do PMMA ($\delta \sim 3.7 \text{ ppm}$) no espectro da solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) não-reticulada antes da exposição à radiação UV indica que o bloco de PMMA está compondo o núcleo micelar, sendo esta condição associada à uma redução na mobilidade do próton (PODARALLA *et al.*, 2012). Em contrapartida, o sinal correspondente ao próton da maltoheptaose (H1, ligação α -1,4) (KRALJ *et al.*, 2011) pode ser claramente visto em $\delta \sim 5.1 \text{ ppm}$, indicando que os segmentos da maltoheptaose presentes na corona estão completamente solvatados em água.

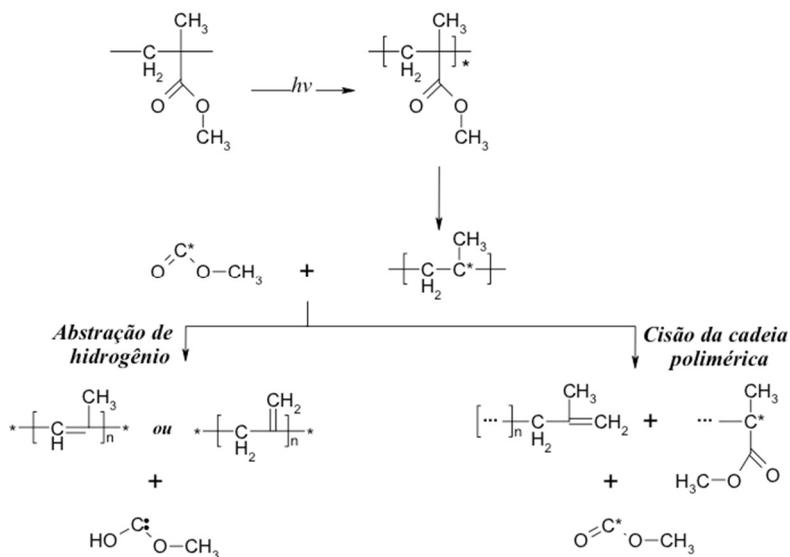
Figura 40. Espectros de RMN de ^1H para a solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) quando exposta à radiação UV em diferentes tempos.



Após 4 horas de exposição à radiação UV, o sinal atribuído ao próton do grupo $-\text{OCH}_3$ do PMMA ($\delta \sim 3.7$ ppm) e o sinal atribuído ao próton do grupo $-\text{C}=\text{CH}_2$ derivado dos grupos terminais dos oligômeros do PMMA ($\delta \sim 5.6$ ppm) (BOND; EBDON, 1994) podem ser claramente observados. Estes sinais foram igualmente observados no espectro obtido após 24 horas de exposição à radiação UV.

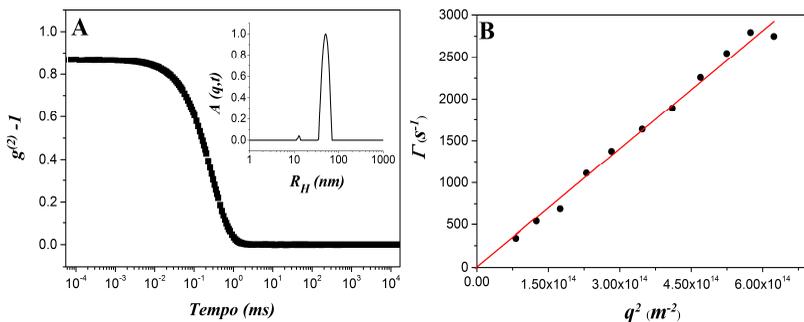
Desta forma, estes resultados acabam por confirmar o sucesso na fotodegradação do PMMA, uma vez que a presença do sinal relativo ao grupo $-\text{C}=\text{CH}_2$ vem por corroborar com o mecanismo de fotólise do PMMA proposto por Wochnowski *et al.*, (2005), conforme visto na Figura 41 (WOCHNOWSKI; ELDIN; METEV, 2005).

Figura 41. Mecanismo de fotólise do PMMA induzido pela exposição à radiação UV ($\lambda = 254$ nm) (adaptado de WOCHNOWSKI; ELDIN; METEV, 2005).



Após 24 horas de exposição à radiação UV, análises de espalhamento de luz (DLS e SLS) foram conduzidas a fim de se obter uma maior compreensão sobre o impacto da radiação UV nas propriedades morfológicas e dimensionais dos LCMs reticulados, sendo os resultados obtidos por DLS apresentados na Figura 42 (A-B).

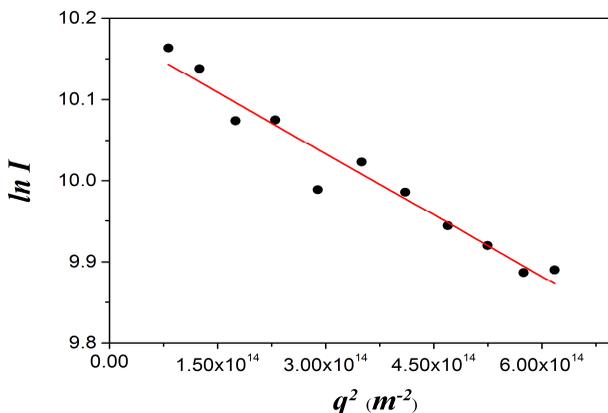
Figura 42. (A) Função de correlação temporal ($g^{(2)} - 1$) e correspondente distribuição do raio hidrodinâmico ($A(q,t)$) (z -average) monitorada em $\theta = 90^\circ$; (B) Γ vs. q^2 para a solução de MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) reticulada após exposição à radiação UV por 24 horas.



A função de correlação temporal mostrou um decaimento exponencial simples com apenas um modo de relaxação. Este modo de relaxação provavelmente corresponde à difusão dos LCMs fotodegradados. Uma relação linear de Γ vs. q^2 pôde ser observada para este modo de relaxação, confirmando o movimento browniano dos LCMs fotodegradados em solução (BERNE; PECORA, 2000). O valor de D determinado a partir da inclinação de Γ vs. q^2 foi aplicado na relação de Stokes-Einstein e, com isso, o valor de R_H pôde ser calculado como sendo de *ca.* 44 nm.

O efeito da irradiação UV sobre a propriedade morfológica dos LCMs foi ainda investigada por SLS através da determinação do valor do parâmetro ρ (ρ -value). O valor do parâmetro $\rho = \frac{R_G}{R_H}$ fornece uma importante indicação sobre a topologia de sistemas nanoparticulados. É sabido que, para esferas homogêneas, o valor do parâmetro ρ é 0.775 ao passo que para esferas ocas o valor do parâmetro ρ é 1 (SCHÄRTL, 2007). Portanto, o valor do raio de giração (R_G) dos LCMs reticulados após exposição à radiação UV foi determinado usando a aproximação de Guinier, da qual se assume que em pequenos ângulos ($R_G q < 1.3$) a intensidade de luz espalhada pode ser bem representada pela Equação 6. Logo, a Figura 43 apresenta o gráfico obtido a partir da aproximação de Guinier.

Figura 43. Gráfico de Guinier obtido da parte elástica da luz espalhada da solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) reticulada após exposição à radiação UV por 24 horas.



O valor de R_G determinado a partir da inclinação do gráfico de $\ln I$ vs. q^2 usando a aproximação de Guinier foi de *ca.* 38 nm. Desta forma, o valor do parâmetro ρ é $= \frac{38}{44} = 0.86$, sendo este valor menor daquele esperado para esferas ocas. Este valor do parâmetro ρ , embora menor, já foi reportado por outros autores (LIN *et al.*, 2013; ZHANG; REMSEN; WOOLEY, 2000) em estudos relacionados à preparação de sistemas nanoparticulados ocas. Diferentes razões têm sido levantadas para explicar este menor valor do parâmetro ρ . Estas, por sua vez, relacionam este menor valor de ρ à (1) possibilidade dos LCMs não estarem totalmente ocas (LIN *et al.*, 2013), ao (2) tipo de estrutura multicompartmental associada ao LCMs, assim como a (3) larga espessura da parede dos sistemas nanoparticulados ocas (ZHANG; REMSEN; WOOLEY, 2000).

Para este último caso, o cálculo teórico para determinação do valor de R_G de nanoestruturas ocas com parede espessa pode ser feito assumindo que a nanoestrutura tem uma espessura de parede equivalente a $\frac{R_H}{3}$ e que a densidade da parede é homogênea. Neste caso, o valor de R_G obtido experimentalmente é igual àquele determinado a partir de cálculos teóricos, como mostra a equação (7) (ZHANG; REMSEN; WOOLEY, 2000):

$$\langle R_G^2 \rangle = \frac{\int_{2R/3}^R 4\pi r^2 \cdot \rho \cdot r^2 dr}{\int_{2R/3}^R 4\pi r^2 \cdot \rho dr} = \frac{3r^5}{5r^3} \left| \frac{R}{2R/3} \right| = 0.74R^2 \quad (7)$$

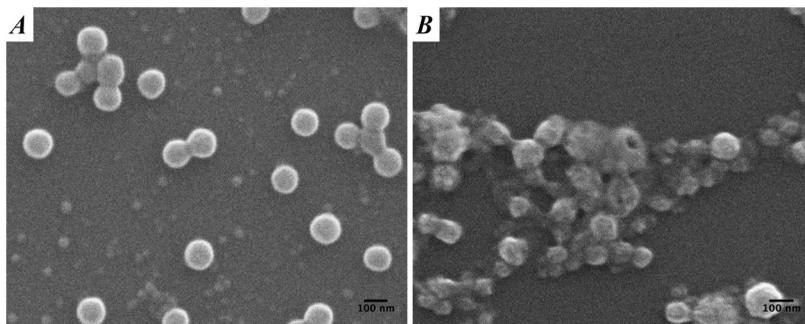
$$\frac{\langle R_G \rangle}{\langle R_H \rangle} = \frac{\sqrt{\langle R_G^2 \rangle}}{\langle R_H \rangle} = \frac{\sqrt{0.74R^2}}{R} \approx 0.86$$

4.7.4 Caracterização morfológica dos sistemas nanoparticulados de MH(1.2k)-b-PMMA(4.8k) após exposição à radiação UV – MEV-FEG e MET

Considerando o tipo de estrutura multicompartmental dos LCMs (ZHANG; EISENBERG, 1996) e tendo em vista as hipóteses anteriormente listadas, acredita-se que a exposição à radiação UV leva à formação de LCMs porosos ao invés de simples micelas ocas. Com isso, visando investigar mais profundamente o efeito da radiação UV sobre a propriedade morfológica dos LCMs reticulados antes e após exposição à

radiação UV, análises de MEV-FEG foram conduzidas e as fotomicrografias obtidas apresentadas na Figura 44 (A-B).

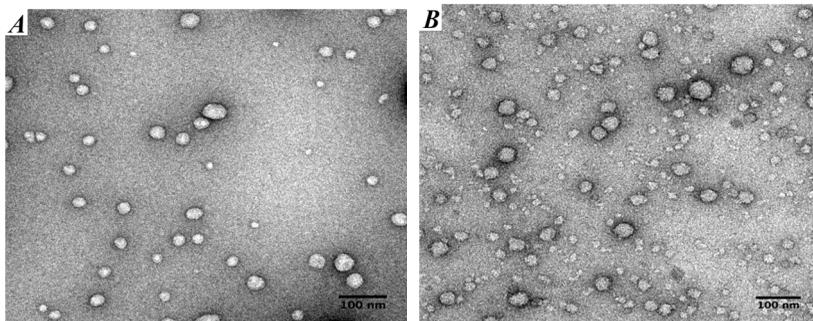
Figura 44. Fotomicrografias de MEV-FEG obtidas a partir da solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) reticulada antes (A) e após (B) exposição à radiação UV.



Antes da exposição à radiação UV (Fig. 45A), a fotomicrografia obtida por MEV-FEG revelou a presença de LCMs reticulados com forma esférica e diâmetro de *ca.* 100 nm. Na mesma fotomicrografia se observa também pequenas partículas esféricas com diâmetro de *ca.* 25 nm, da qual acredita-se estarem relacionadas à micelas individuais oriundas da ruptura dos LCMs. Após exposição à radiação UV (Fig. 45B), se observa na fotomicrografia LCMs parcialmente colapsadas e para algumas a estrutura oca pôde ser confirmada a julgar pela presença de pequenas cavidades. Ademais, nota-se ainda na mesma fotomicrografia a presença de alguns LCMs que não estão totalmente colapsados, possivelmente em razão do apoio estrutural oriundo da parede das micelas ocas que compõem sua estrutura interna.

Análises por MET foram igualmente conduzidas a fim de obter informações adicionais sobre o efeito da radiação UV na morfologia dos LCMs, estando as fotomicrografias apresentadas na Figura 45 (A-B).

Figura 45. Fotomicrografias de MET obtidas a partir da solução de MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) reticulada antes (A) e após (B) exposição à radiação UV.



As imagens de MET mostraram, antes da exposição à radiação UV (Fig. 45A), LCMs reticulados com forma esférica tendo diâmetro de *ca.* 45 nm assim como micelas com diâmetro de *ca.* 20 nm. Em contrapartida, após exposição à radiação UV (Fig. 45B), LCMs porosos com forma esférica tendo diâmetro de *ca.* 34 nm e estruturas com formas irregulares foram visualizadas. Infelizmente, uma caracterização mais apurada da estrutura interna dos LCMs não pôde ser feita em razão do baixo contraste entre o PMMA e a maltoheptaose, mesmo quando negativamente coradas. De modo geral, os resultados obtidos por MET foram bastantes consistentes com aqueles obtidos por MEV-FEG.

4.8 CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

O copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) se auto-associa em micelas esféricas (R_H *ca.* 10 nm) e agregados micelares (R_H *ca.* 65 nm) usando a técnica de nanoprecipitação. Os segmentos de MH que compõem a corona micelar foram com sucesso reticulados usando o DVS como agente reticulante, como mostraram os resultados de FTIR. Além disso, o núcleo micelar composto de segmentos de PMMA foi fotodegradado mediante exposição à radiação UV, evidenciado pelas análises de MET e MEV-FEG. Estes resultados acabam por confirmar o sucesso no uso dos sistemas nanoparticulados como modelos para a obtenção de sistemas porosos. Estes sistemas porosos mostram-se promissores frente à aplicação nas áreas médica e farmacêutica, uma vez que após a remoção do núcleo o mesmo é constituído inteiramente pelo oligossacarídeo maltoheptaose, denotando a este características como biorreconhecimento, biocompatibilidade e biodegradabilidade.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho reportou o comportamento de auto-associação em solução de um copolímero híbrido dibloco constituído de maltoheptaose (bloco hidrofílico) e PMMA (bloco hidrofóbico).

Na primeira etapa deste trabalho de tese, os copolímeros foram com sucesso auto-associados em LCMs e micelas do tipo reversa através da sua diluição direta em água e acetona, respectivamente. Em água, a fração do volume hidrofóbico, a concentração do copolímero e a velocidade de agitação afetaram diretamente o tamanho das LCMs, bem como a porcentagem de agregados micelares. Entretanto, em acetona, este comportamento mediante a alteração dos parâmetros moleculares ou de solução não mostraram uma tendência óbvia. Além disso, mudanças na polaridade do solvente promoveram a inversão na conformação dos sistemas nanoparticulados de LCMs à micelas do tipo reversa. A habilidade dos sistemas nanoparticulados em inverter sua estrutura em resposta a mudanças na polaridade do meio foi confirmada usando vermelho do Nilo (corante hidrofóbico). Logo, micelas carregadas com o corante foram obtidas a partir da nanoprecipitação dos copolímeros MH(1.2k)-*b*-PMMA(2.4k) e MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em água. Estas, por sua vez, mostraram num primeiro momento a capacidade de encapsular o corante e então transferi-lo numa interface polar/apolar.

Na segunda etapa deste trabalho, micelas e agregados micelares foram obtidos a partir da nanoprecipitação do copolímero MH(1.2k)-*b*-PMMA(4.8k) em água. Os segmentos de maltoheptaose que compunham a corona micelar foram com sucesso reticulados usando DVS como agente reticulante. As micelas reticuladas tiveram seu núcleo (composto pelos segmentos de PMMA) removido após fotodegradação induzida pela exposição à radiação UV. Esta abordagem permitiu que sistemas nanoparticulados porosos fossem obtidos confirmando a aplicabilidade das micelas reticuladas como modelo na obtenção de sistemas ocus.

Logo, considerando as habilidades peculiares aos sistemas nanoparticulados investigados neste trabalho, no que tange a capacidade de inversão da estrutura micelar e possibilidade de obtenção de um sistema poroso constituído apenas por oligossacarídeos (após fotodegradação do núcleo), diferentes propostas de aplicação nas áreas médica e farmacêutica podem ser vislumbradas.

6. REFERÊNCIAS

ABOUELEZZ, M. Studies on the Photodegradation of Poly(Methyl Methacrylate). **National Technical Information Service**, 1978.

ADAMS, D. J. et al. Impact of mechanism of formation on encapsulation in block copolymer vesicles. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 128, n. 2, p. 165–70, 4 jun. 2008.

AKIYOSHI, K. et al. Enzymatic synthesis and characterization of amphiphilic block copolymers of poly(ethylene oxide) and amylose. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 20, n. 3, p. 112–115, 1 mar. 1999.

AKIYOSHI, K. et al. Amphiphilic Block Copolymer with a Molecular Recognition Site: Induction of a Novel Binding Characteristic of Amylose by Self-Assembly of Poly(ethylene oxide)-block-amylose in Chloroform. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 280–283, 2002.

ALDOSARI, M. A.; OTHMAN, A. A.; ALSHARAEH, E. H. Synthesis and characterization of the in situ bulk polymerization of PMMA containing graphene sheets using microwave irradiation. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 3, p. 3152–67, 11 jan. 2013.

ALIBOLANDI, M. et al. Comparative evaluation of polymersome versus micelle structures as vehicles for the controlled release of drugs. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 2, p. 76, 6 fev. 2015.

ALLEN, C.; MAYSINGER, D.; EISENBERG, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 16, n. 1-4, p. 3–27, nov. 1999.

AMIJI, M. M. **Nanotechnology for Cancer Therapy**. [s.l.] CRC Press, 2006.

ARIVALAGAN, K. et al. Nanomaterials and its potential applications. **International journal of chemtech research**, v. 3, n. 2, p. 534–538, 2011.

BALES, B. L.; ALMGREN, M. Fluorescence Quenching of Pyrene by Copper(II) in Sodium Dodecyl Sulfate Micelles. Effect of Micelle Size as Controlled by Surfactant Concentration. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 41, p. 15153–15162, out. 1995.

BANDYOPADHYAY, K. et al. Deposition of DNA-functionalized gold nanospheres into nanoporous surfaces. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 22, n. 11, p. 4978–84, 23 maio 2006.

BENZI, R.; SCHMIDT, A.; VOS-SCHEPERKEUTER, G. H. Mechanism of Sugar Transport Through the Sugar-Specific LamB Channel of Escherichia coli Outer Membrane. **The Journal of Membrane Biology**, v. 100, p. 21–29, 1987.

BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics**. [s.l.: s.n.].

BETTENCOURT, A.; ALMEIDA, A. J. Poly (methyl methacrylate) particulate carriers in drug delivery. **Journal of Microencapsulation**, v. 29, n. 4, p. 353–367, 2012.

BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 941–951, 2015.

BOND, S. G.; EBDON, J. R. Photolysis of methyl methacrylate-methyl vinyl ketone copolymers. A new route to acrylic macromonomers? **Polymer**, v. 35, n. 3, p. 451–460, fev. 1994.

BRANDRUP, J. et al. Polymer handbook. **John Wiley & Sons**, v. 4th edn, 2003.

CAI, S. et al. Micelles of different morphologies--advantages of worm-like filomicelles of PEO-PCL in paclitaxel delivery. **Pharmaceutical research**, v. 24, n. 11, p. 2099–109, nov. 2007.

CAN, A. et al. Upper critical solution temperature switchable micelles based on polystyrene-block-poly(methyl acrylate) block copolymers. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 49, n. 17, p. 3681–3687, 1 set. 2011.

CAPUTO, A. et al. Induction of humoral and enhanced cellular immune responses by novel core-shell nanosphere- and microsphere-based vaccine formulations following systemic and mucosal administration. **Vaccine**, v. 27, n. 27, p. 3605–15, 2 jun. 2009.

CHANG, C. et al. Construction of mixed micelle with cross-linked core and dual responsive shells. **Polymer Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 923, 2011.

CHANGEZ, M. et al. Hollow flower micelles from a diblock copolymer. **Nanoscale**, v. 5, p. 11554–60, 2013.

CHAU, C.-F.; WU, S.-H.; YEN, G.-C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 269–280, maio 2007.

- CHEN, L. et al. Polypeptide-based “smart” micelles for dual-drug delivery: a combination study of experiments and simulations. **Advanced healthcare materials**, v. 3, n. 9, p. 1508–17, set. 2014.
- CHEN, Q.; SCHÖNHERR, H.; VANCISO, G. J. Block-copolymer vesicles as nanoreactors for enzymatic reactions. **Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 5, n. 12, p. 1436–45, jun. 2009.
- CHOUCAIR, A.; EISENBERG, A. Control of amphiphilic block copolymer morphologies using solution conditions. **The European Physical Journal E**, v. 44, p. 37–44, 2003.
- CHRISTIAN, D. A. et al. Polymersome carriers: from self-assembly to siRNA and protein therapeutics. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 71, n. 3, p. 463–74, mar. 2009.
- COWIE, J. M. G.; MCEWEN, I. J.; GARAY, M. T. Polymer-cosolvent systems: synergism and antisnergism of solvent mixtures for poly(methyl methacrylate). **Polymer communications**, v. 27, n. 5, p. 122–124, 1986.
- D’ADDIO, S. M.; PRUD’HOMME, R. K. Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 417–426, 30 maio 2011.
- DAL BÓ, A. G. et al. Self-assembly of amphiphilic glycoconjugates into lectin-adhesive nanoparticles. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 28, n. 2, p. 1418–26, 17 jan. 2012.
- DAN, K.; BOSE, N.; GHOSH, S. Vesicular assembly and thermo-responsive vesicle-to-micelle transition from an amphiphilic random copolymer. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 47, n. 46, p. 12491–3, 14 dez. 2011.
- DARLING, S. B. Directing the self-assembly of block copolymers. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 10, p. 1152–1204, out. 2007.
- DAVIES, T. S.; KETNER, A. M.; RAGHAVAN, S. R. Self-assembly of surfactant vesicles that transform into viscoelastic wormlike micelles upon heating. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 20, p. 6669–75, 24 maio 2006.
- DE MEDEIROS MODOLON, S. et al. Sweet block copolymer nanoparticles: preparation and self-assembly of fully oligosaccharide-based amphiphile. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 4, p. 1129–35, 9 abr. 2012.

DECUZZI, P. et al. Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter? **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 1, p. 235–43, jan. 2009.

DEVADASU, V. R.; BHARDWAJ, V.; KUMAR, M. N. V. R. Can Controversial Nanotechnology Promise Drug Delivery ? 2013.

DISCHER, D. E.; AHMED, F. Polymersomes. **Annual review of biomedical engineering**, v. 8, p. 323–41, 11 jan. 2006.

DISCHER, D. E.; EISENBERG, A. Polymer vesicles. **Science (New York, N.Y.)**, v. 297, n. 5583, p. 967–73, 9 ago. 2002.

DOBROVOLSKAIA, M. A. et al. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. **Molecular pharmaceuticals**, v. 5, n. 4, p. 487–95, jan. .

DONG, C.-M. Glyconanoparticles for Biomedical Applications. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 14, p. 173–181, 2011.

DU, J. et al. Self-assembly of hydrophilic homopolymers: a matter of RAFT end groups. **Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 7, n. 14, p. 2070–80, 18 jul. 2011.

ELLZY, M. W.; JENSEN, J. O.; KAY, J. G. Vibrational frequencies and structural determinations of di-vinyl sulfone. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, n. 4, p. 867–881, mar. 2003.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society reviews**, v. 41, n. 7, p. 2545–61, 7 abr. 2012.

ERNST, B.; MAGNANI, J. L. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 8, p. 661–677, 2009.

FARRELL, R. A. et al. Chemical interactions and their role in the microphase separation of block copolymer thin films. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 9, p. 3671–712, set. 2009.

FAYAD, S. J. et al. Transition from star-like to crew-cut micelles induced by UV radiation. **Journal of colloid and interface science**, v. 416, p. 54–8, 15 fev. 2014.

FELDMAN, D. Polymer chemistry—The basic concepts, P. C. Hiemenz, Marcel Dekker, New York, 1984, 738 pp. No price given. **Journal of**

Polymer Science: Polymer Letters Edition, v. 22, n. 12, p. 673–673, dez. 1984.

FERENCI, T. Methyl-alpha-maltoside and 5-thiomaltose: analogs transported by the Escherichia coli maltose transport system. **Journal of bacteriology**, v. 144, n. 1, p. 7–11, out. 1980.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, out. 1989.

FILIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. **Pharmaceutical research**, v. 27, n. 5, p. 796–810, maio 2010.

FUJI, M.; TAKAI, C.; RIVERA VIRTUDAZO, R. V. Development of new templating approach for hollow nanoparticles and their applications. **Advanced Powder Technology**, v. 25, n. 1, p. 91–100, jan. 2014.

GARCÍA-MARTÍN, M. G. et al. Carbohydrate-Based Polycarbonates. Synthesis, Structure, and Biodegradation Studies. **Macromolecules**, v. 38, n. 21, p. 8664–8670, out. 2005.

GENG, Y. et al. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. **Nature nanotechnology**, v. 2, n. 4, p. 249–55, abr. 2007.

GESSNER, A. et al. Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by two-dimensional electrophoresis. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 54, n. 2, p. 165–70, set. 2002.

GIACOMELLI, F. C. et al. pH-triggered block copolymer micelles based on a pH-responsive PDPA (poly[2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate]) inner core and a PEO (poly(ethylene oxide)) outer shell as a potential tool for the cancer therapy. **Soft Matter**, v. 7, n. 19, p. 9316, 20 set. 2011.

GOPAL, S. et al. Maltose and maltodextrin utilization by *Listeria monocytogenes* depend on an inducible ABC transporter which is repressed by glucose. **PLoS one**, v. 5, n. 4, p. e10349, 27 jan. 2010.

GRÖSCHEL, A. H.; MÜLLER, A. H. E. Self-assembly concepts for multicompartament nanostructures. **Nanoscale**, v. 7, n. 28, p. 11841–76, 28 jul. 2015.

GUPTA, V. K. et al. Nanoparticle Formulation for Hydrophilic & Hydrophobic Drugs. n. 2, p. 163–169, 2010.

HE, C. et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3657–66, maio 2010.

HEIN, C. D.; LIU, X.-M.; WANG, D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 10, p. 2216–30, out. 2008.

HEVUS, I. et al. Invertible micellar polymer assemblies for delivery of poorly water-soluble drugs. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 8, p. 2537–45, 13 ago. 2012.

HEVUS, I.; KOHUT, A.; VORONOV, A. Interfacial micellar phase transfer using amphiphilic invertible polymers. **Polymer Chemistry**, v. 2, n. 12, p. 2767, 9 nov. 2011.

HOOGENBOOM, R. et al. Solubility and Thermoresponsiveness of PMMA in Alcohol-Water Solvent Mixtures. **Australian Journal of Chemistry**, v. 63, n. 8, p. 1173, 10 ago. 2010.

HOUGA, C. et al. Micelles and polymersomes obtained by self-assembly of dextran and polystyrene based block copolymers. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 1, p. 32–40, 12 jan. 2009.

HU, Z. et al. Dilution-induced spheres-to-vesicles morphological transition in micelles from block copolymer/surfactant complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 18, p. 6526–7, 11 maio 2005.

HUANG, H. et al. Nanocages derived from shell cross-linked micelle templates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 16, p. 3805–3806, 1999.

J. H. HILDEBRAND. Solubility of non-electrolytes. **Journal of the Society of Chemical Industry**, v. 55, n. 34, p. 665–665, 21 ago. 1936.

JAKOBSEN, U.; VOGEL, S. Assembly of liposomes controlled by triple helix formation. **Bioconjugate chemistry**, v. 24, n. 9, p. 1485–95, 18 set. 2013.

JATZKEWITZ, H. [Incorporation of physiologically-active substances into a colloidal blood plasma substitute. I. Incorporation of mescaline peptide into polyvinylpyrrolidone]. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 297, n. 3-6, p. 149–56, jan. 1954.

JAYAWARDENA, H. S. N. et al. Maltoheptaose promotes nanoparticles internalization by Escherichia coli. **Chemical Communications**, v. 49, p. 3034–3036, 2013.

- KEDAR, U. et al. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 6, n. 6, p. 714–29, dez. 2010.
- KHULLAR, P. et al. Block copolymer micelles as nanoreactors for self-assembled morphologies of gold nanoparticles. **The journal of physical chemistry. B**, v. 117, n. 10, p. 3028–39, 14 mar. 2013.
- KIM, A. et al. Double-hydrophilic block copolymer nanoreactor for the synthesis of copper nanoparticles and for application in click chemistry. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 11, n. 7, p. 6162–6, jul. 2011.
- KOHUT, A.; VORONOV, A. Hierarchical micellar structures from amphiphilic invertible polyesters: ¹H NMR spectroscopic study. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 25, n. 8, p. 4356–60, 21 abr. 2009.
- KRALJ, S. et al. 4,6- α -glucanotransferase, a novel enzyme that structurally and functionally provides an evolutionary link between glycoside hydrolase enzyme families 13 and 70. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 22, p. 8154–63, nov. 2011.
- KRATZ, K. et al. Probing and repairing damaged surfaces with nanoparticle-containing microcapsules. **Nature nanotechnology**, v. 7, n. 2, p. 87–90, fev. 2012.
- KRAUSE, S. Dilute Solution Properties of a Styrene—Methyl Methacrylate Block Copolymer. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 68, n. 7, p. 1948–1955, jul. 1964.
- KREUTER, J. **Neue adjuvantien auf polymethylmethacrylatbasis**. [s.l.] ETH Zurich, 1974.
- KULLMAN, L.; WINTERHALTER, M.; BEZRUKOV, S. M. Transport of Maltodextrins through Maltoporin : A Single-Channel Study. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 2, p. 803–812, 2002.
- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p. 1–18, 1 jan. 2010.
- KUMARI, P. et al. Amphiphilic and Thermoresponsive Conjugated Block Copolymer with Its Solvent Dependent Optical and Photoluminescence Properties: Toward Sensing Applications. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 23, p. 12348–12354, 20 jan. 2015.

LEE, BYUNG KOOK; YUN, YEON HEE; PARK, K. Smart Nanoparticles for Drug Delivery: Boundaries and Opportunities. **Chemical Engineering Science**, v. 125, n. 24, p. 158–164, 2015.

LEE, C. H. et al. Synthesis and characterization of solvent-invertible amphiphilic hollow particles. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 29, n. 25, p. 7583–90, 25 jun. 2013.

LEE, Y.-E. K.; KOPELMAN, R. Polymeric nanoparticles for photodynamic therapy. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 726, p. 151–78, jan. 2011.

LI, Y. et al. A smart and versatile theranostic nanomedicine platform based on nanoporphyrin. **Nature communications**, v. 5, p. 4712, 26 jan. 2014.

LIANG, Y.; KIICK, K. L. Heparin-functionalized polymeric biomaterials in tissue engineering and drug delivery applications. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 4, p. 1588–600, abr. 2014.

LIN, S. et al. Multicompartmental hollow micelles formed by linear ABC triblock copolymers in aqueous medium. **The journal of physical chemistry. B**, v. 117, n. 8, p. 2586–93, 28 fev. 2013.

LIU, Y. et al. pH-sensitive polymeric micelles triggered drug release for extracellular and intracellular drug targeting delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 159–167, jun. 2013.

LIU, Z. et al. Intramolecular and intermolecular association during chemical cross-linking of dilute solutions of different polysaccharides under the influence of shear flow. **The journal of physical chemistry. B**, v. 112, n. 4, p. 1082–9, 31 jan. 2008.

LIU, Z. et al. Preparation and properties of chitosan-graft-poly(methyl methacrylate) nanoparticles using potassium doperiodatocuprate (III) as an initiator. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, n. 5, p. 2707–2715, 5 jun. 2011.

LOMAX, E. G. **Amphoteric Surfactants**. [s.l: s.n.].

LOOS, K. et al. Micellar Aggregates of Amylose- block -polystyrene Rod-Coil Block Copolymers in Water and THF. **Macromolecules**, v. 38, n. 3, p. 873–879, fev. 2005.

MA, Y. et al. Fabrication of super-hydrophobic film from PMMA with intrinsic water contact angle below 90°. **Polymer**, v. 48, n. 26, p. 7455–7460, dez. 2007.

MAGNANI, J. L.; ERNST, B. Glycomimetic Drugs - A New Source of Therapeutic Opportunities. **Discovery Medicine**, v. 8, n. 43, p. 247–252, 3 dez. 2009.

MAI, Y.; EISENBERG, A. Self-assembly of block copolymers. **Chemical Society reviews**, v. 41, n. 18, p. 5969–85, 21 set. 2012.

MANCHUN, S.; DASS, C. R.; SRIAMORNSAK, P. Targeted therapy for cancer using pH-responsive nanocarrier systems. **Life sciences**, v. 90, n. 11–12, p. 381–7, 10 mar. 2012.

MANGEMATIN, V.; WALSH, S. The future of nanotechnologies. **Technovation**, v. 32, n. 3–4, p. 157–160, 2012.

MENG, X.-W. et al. Degradable hollow spheres based on self-assembly inclusion. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 46, p. 643–645, 2010.

MIESZAWSKA, A. J. et al. Synthesis of polymer-lipid nanoparticles for image-guided delivery of dual modality therapy. **Bioconjugate chemistry**, v. 24, n. 9, p. 1429–34, 18 set. 2013.

MIYATA, K.; CHRISTIE, R. J.; KATAOKA, K. Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. **Reactive and Functional Polymers**, v. 71, n. 3, p. 227–234, mar. 2011.

MOHD-SETAPAR, S. H. et al. A REVIEW OF MIXED REVERSE MICELLE SYSTEM FOR ANTIBIOTIC RECOVERY. **Chemical Engineering Communications**, v. 201, n. 12, p. 1664–1685, 23 jun. 2014.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods: Critical comparison. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 163, n. 2, p. 90–122, 14 abr. 2011.

MORIGAKI, K. et al. Thermodynamic and kinetic stability. Properties of micelles and vesicles formed by the decanoic acid/decanoate system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 213, n. 1, p. 37–44, fev. 2003.

MUN, E. A. et al. On the role of specific interactions in the diffusion of nanoparticles in aqueous polymer solutions. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 30, n. 1, p. 308–17, 14 jan. 2014.

NEWMAN, S. Note on colloidal dispersions from block copolymers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 6, n. 21, p. S15–S16, maio 1962.

NICOLAS, J. et al. Chem Soc Rev polymer-based nanocarriers for drug delivery. p. 1147–1235, 2013.

NIMESH, S. et al. Preparation, characterization and in vitro drug release studies of novel polymeric nanoparticles. **International journal of pharmaceuticals**, v. 323, n. 1-2, p. 146–52, 12 out. 2006.

NING, X. et al. Maltodextrin-based imaging probes detect bacteria in vivo with high sensitivity and specificity. **Nature Materials**, v. 10, n. 8, p. 602–607, 2011.

OTSUKA, I. et al. Thermoresponsive Vesicular Morphologies Obtained by Self-Assemblies of Hybrid Oligosaccharide- block -poly (N - isopropylacrylamide) Copolymer Systems. **Langmuir**, v. 26, n. 19, p. 2325–2332, 2010.

OTSUKA, I. et al. Thermoresponsive self-assemblies of cyclic and branched oligosaccharide-block-poly(N-isopropylacrylamide) diblock copolymers into nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 5, p. 1458–65, 14 maio 2012.

OTSUKA, I. et al. Self-Assembly of Maltoheptaose- block -Polystyrene into Micellar Nanoparticles and Encapsulation of Gold Nanoparticles. **Langmuir**, 2013a.

OTSUKA, I. et al. Control of 10 nm scale cylinder orientation in self-organized sugar-based block copolymer thin films. **Nanoscale**, v. 5, n. 7, p. 2637–41, 7 abr. 2013b.

OTSUKA, I. et al. Self-assembly of maltoheptaose-block-polystyrene into micellar nanoparticles and encapsulation of gold nanoparticles. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 29, n. 49, p. 15224–30, 10 dez. 2013c.

OWEN, S. C.; CHAN, D. P. Y.; SHOICHET, M. S. Polymeric micelle stability. **Nano Today**, v. 7, n. 1, p. 53–65, fev. 2012.

OWENS, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International journal of pharmaceuticals**, v. 307, n. 1, p. 93–102, 3 jan. 2006.

PATTERSON, J. P. et al. The analysis of solution self-assembled polymeric nanomaterials. **Chemical Society reviews**, v. 43, n. 8, p. 2412–25, 21 abr. 2014.

PODARALLA, S. et al. Synthesis of novel biodegradable methoxy poly(ethylene glycol)-zein micelles for effective delivery of curcumin. **Molecular pharmaceuticals**, v. 9, n. 9, p. 2778–86, 4 set. 2012.

- PROVENCHER, S. W. **Inverse problems in polymer characterization: Direct analysis of polydispersity with photon correlation spectroscopy.** Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/macp.1979.021800119/references>>. Acesso em: 16 fev. 2015.
- RAMANATHAN, M. et al. Amphiphile nanoarchitectonics: from basic physical chemistry to advanced applications. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 15, n. 26, p. 10580–611, 14 jul. 2013.
- RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887–913, jul. 2011.
- RINGSDORF, H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. **Journal of Polymer Science: Polymer Symposia**, v. 51, n. 1, p. 135–153, 8 mar. 1975.
- ROTELLO, V. M.; THAYUMANAVAN, S. **Molecular Recognition and Polymers: Control of Polymer Structure and Self-Assembly.** [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.
- SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 3, n. 1, p. 20–31, 3 mar. 2007.
- SAMARAJEEWA, S. et al. Degradability of poly(lactic acid)-containing nanoparticles: Enzymatic access through a cross-linked shell barrier. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 1235–1242, 2012.
- SAMBASEVAM, K. P. et al. Synthesis and Characterization of the Inclusion Complex of β -cyclodextrin and Azomethine. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 2, p. 3671–82, jan. 2013.
- SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. **ISRN pharmaceutics**, v. 2012, p. 195727, jan. 2012.
- SAVOJI, M. T.; ZHU, X. X. Temperature- and pH-controlled encapsulation and release of guest molecules from invertible carriers. **Polymer**, v. 68, p. 35–40, jun. 2015.
- SAVOLAINEN, K. et al. Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies--a review. **Toxicology**, v. 269, n. 2-3, p. 92–104, 10 mar. 2010.
- SCHÄRTL, W. **Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions.** [s.l.: s.n.].

SCHATZ, C.; LECOMMANDOUX, S. Polysaccharide-Containing Block Copolymers: Synthesis, Properties and Applications of an Emerging Family of Glycoconjugates. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 31, p. 1664–1684, 2010.

SCHMIDT, V.; BORSALI, R.; GIACOMELLI, C. Aggregation of a versatile triblock copolymer into pH-responsive cross-linkable nanostructures in both organic and aqueous media. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 25, n. 23, p. 13361–7, 1 dez. 2009.

SHARMA, D. et al. Solubility Enhancement – Eminent Role in Poorly Soluble Drugs. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 2, n. 2, p. 220–224, 2009.

SHAW, D. J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. [s.l.: s.n.].

SHEN, H.; EISENBERG, A. Morphological Phase Diagram for a Ternary System of Block Copolymer PS 310 - b -PAA 52 / Dioxane / H₂O. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 44, p. 9473–9487, 1999.

SMART, T. et al. Block copolymer nanostructures. v. 3, n. 3, p. 38–46, 2008.

SOHNS, T.; VOICU, V. A. **NBC Risks: Current Capabilities and Future Perspectives for Protection**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 1999.

SOLIMAN, G. M.; WINNIK, F. M. Enhancement of hydrophilic drug loading and release characteristics through micellization with new carboxymethyl-dextran-PEG block copolymers of tunable charge density. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, p. 248–258, 2008.

SOUTHALL, N. T.; DILL, K. A.; HAYMET, A. D. J. A View of the Hydrophobic Effect. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 3, p. 521–533, jan. 2002.

STRANDMAN, S. et al. Supramolecular assemblies of amphiphilic PMMA- block -PAA stars in aqueous solutions. v. 47, p. 6524–6535, 2006.

STRANDMAN, S. et al. Effect of the Number of Arms on the Association of Amphiphilic Star Block Copolymers. **Macromolecules**, v. 41, n. 22, p. 8855–8864, 25 nov. 2008.

SZWARC, M. “Living” Polymers. **Nature**, v. 178, p. 1168–1169, 1956.

TODA, M. et al. Complement activation on surfaces carrying amino groups. **Biomaterials**, v. 29, n. 4, p. 407–17, fev. 2008.

TOLSTOY, V. P.; CHERNYSHOVA, I.; SKRYSHEVSKY, V. A. **Handbook of Infrared Spectroscopy of Ultrathin Films**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2003.

TOPEL, Ö. et al. Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering. **Journal of Molecular Liquids**, v. 177, p. 40–43, jan. 2013.

TRIVEDI, R.; KOMPELLA, U. B. Nanomicellar formulations for sustained drug delivery: strategies and underlying principles R eview. **Nanomedicine**, v. 5, n. 3, p. 485–505, 2010.

TURNER, J. L.; WOOLEY, K. L. Nanoscale Cage-Like Structures Derived from Polyisoprene-Containing Shell Cross-linked Nanoparticles Templates. **Nano Letters**, v. 4, n. 4, p. 683–688, 2004.

VANCE, D. E.; VANCE, J. E. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes**. [s.l.] Elsevier, 2008.

VENKATARAMAN, S. et al. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 14-15, p. 1228–46, nov. 2011.

VERMA, G. et al. Dilution induced thickening in hydrotrope-rich rod-like micelles. **Journal of colloid and interface science**, v. 359, n. 1, p. 163–70, 1 jul. 2011.

VONARBOURG, A. et al. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. **Biomaterials**, v. 27, n. 24, p. 4356–73, ago. 2006.

WANG, A. Q. **Preparation of polymersome and its applications in drug delivery system** **Chinese Journal of Pharmaceutical Biotechnology**, 2013. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84892946260&partnerID=tZOtx3y1>>

WANG, G.; HENSELWOOD, F.; LIU, G. Water-Soluble Poly(2-cinnamoyl ethyl methacrylate)- block -poly(acrylic acid) Nanospheres as Traps for Perylene. **Langmuir**, v. 14, n. 7, p. 1554–1559, mar. 1998.

WANG, Z.; JIA, L.; LI, M.-H. Gold nanoparticles decorated by amphiphilic block copolymer as efficient system for drug delivery. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 9, n. 1, p. 61–8, jan. 2013.

WOCHNOWSKI, C.; ELDIN, M. A. S.; METEV, S. UV-laser-assisted degradation of poly (methyl methacrylate). **Polymer degradation and Stability**, v. 89, p. 252–264, 2005.

WÜRTHNER, F. Perylene bisimide dyes as versatile building blocks for functional supramolecular architectures. **Chemical communications (Cambridge, England)**, n. 14, p. 1564–79, 21 jul. 2004.

WYMAN, I.; NJIKANG, G.; LIU, G. When emulsification meets self-assembly: The role of emulsification in directing block copolymer assembly. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 9, p. 1152–1183, set. 2011.

XIANG, X. et al. Peptide-Directed Self-Assembly of Functionalized Polymeric Nanoparticles. Part II: Effects of Nanoparticle Composition on Assembly Behavior and Multiple Drug Loading Ability. **Macromolecular bioscience**, 4 dez. 2014.

XIONG, X.-B. et al. Engineering of amphiphilic block copolymers for polymeric micellar drug and gene delivery. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 155, n. 2, p. 248–61, 30 out. 2011.

YU, G.; EISENBERG, A. Multiple Morphologies Formed from an Amphiphilic ABC Triblock Copolymer in Solution. **Macromolecules**, v. 31, n. 16, p. 5546–5549, ago. 1998.

YU, Y.; ZHANG, L.; EISENBERG, A. Morphogenic Effect of Solvent on Crew-cut Aggregates of Amphiphilic Diblock Copolymer. **Macromolecules**, v. 9297, n. 31, p. 1144–1154, 1998.

ZEPON, K. M. et al. Glyco-Nanoparticles made from self-assembly of maltoheptaose-block-poly(methyl methacrylate): micelle, reverse micelle and encapsulation. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 7, p. 2012–2024, 14 maio 2015.

ZHANG, C. Y. et al. Self-assembled pH-responsive MPEG-b-(PLA-co-PAE) block copolymer micelles for anticancer drug delivery. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 6273–83, set. 2012.

ZHANG, L.; EISENBERG, A. Multiple Morphologies and Characteristics of “Crew-Cut” Micelle-like Aggregates of Polystyrene- b -poly(acrylic acid) Diblock Copolymers in Aqueous Solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 13, p. 3168–3181, jan. 1996.

ZHANG, L.; EISENBERG, A. Thermodynamic vs Kinetic Aspects in the Formation and Morphological Transitions of Crew-Cut Aggregates Produced by Self-Assembly of Polystyrene- b -poly(acrylic acid) Block Copolymers in Dilute Solution. **Macromolecules**, v. 32, p. 2239–2249, 1999a.

ZHANG, L.; EISENBERG, A. Thermodynamic vs Kinetic Aspects in the Formation and Morphological Transitions of Crew-Cut Aggregates Produced by Self-Assembly of Polystyrene- b -poly(acrylic acid) Block Copolymers in Dilute Solution. **Macromolecules**, v. 32, n. 7, p. 2239–2249, abr. 1999b.

ZHANG, Q.; REMSEN, E. E.; WOOLEY, K. L. Shell cross-linked nanoparticles containing hydrolytically degradable, crystalline core domains. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 4, p. 3642–3651, 2000.

ZHANG, Y. et al. A novel route to thermosensitive polymeric core-shell aggregates and hollow spheres in aqueous media. **Advanced Functional Materials**, v. 15, n. 4, p. 695–699, 2005.

ZHU, J.; LI, P. Synthesis and characterization of poly(methyl methacrylate)/casein nanoparticles with a well-defined core-shell structure. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 41, n. 21, p. 3346–3353, 1 nov. 2003.

ZIEGAST, G.; PFANNEMÜLLER, B. Linear and star-shaped hybrid polymers, 2 Coupling of mono- and oligosaccharides to α,ω -diamino substituted poly(oxyethylene) and multifunctional amines by amide linkage. **Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications**, v. 5, n. 7, p. 373–379, 1 jul. 1984a.

ZIEGAST, G.; PFANNEMÜLLER, B. Linear and star-shaped hybrid polymers, 3. An improved purification procedure for coupling products of oligosaccharides by amide linkage. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 185, n. 9, p. 1855–1866, 1 set. 1984b.

7. APÊNDICE



Article

pubs.acs.org/Biomac

Glyco-Nanoparticles Made from Self-Assembly of Maltoheptaose-*block*-Poly(methyl methacrylate): Micelle, Reverse Micelle, and Encapsulation

Karine M. Zepou,^{†,‡,§} Issei Otsuka,^{†,‡} Cécile Bouilhac,^{||} Edvani C. Muniz,[⊥] Valdir Soldi,[§] and Redouane Borsali^{†,*,‡}

[†]University Grenoble Alpes, CERMAV, F-38000 Grenoble, France

[‡]CNRS, CERMAV, F-38000 Grenoble, Cedex 9, France

[§]Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040-900, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^{||}Institut Charles Gerhardt Montpellier UMR5253 CNRS-UM-ENSCM, Equipe Ingénierie et Architectures Macromoléculaires, Université Montpellier, Bâtiment 17—cc1702, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, Cedex 5, France

[⊥]Grupos de Materiais Poliméricos e Compósitos, GMPC—Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil

Supporting Information

ABSTRACT: The synthesis and the solution-state self-assembly of the “hybrid” diblock copolymers, maltoheptaose-*block*-poly(methyl methacrylate) (MH-*b*-PMMA), into large compound micelles (LCMs) and reverse micelle-type nanoparticles, are reported in this paper. The copolymers were self-assembled in water and acetone by direct dissolution method, and the morphologies of the nanoparticles were investigated by dynamic light scattering (DLS), nanoparticle tracking analysis (NTA), transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM), proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR), and fluorescence spectroscopy as a function of the volume fraction of the copolymer hydrophobic block, copolymer concentration, stirring speed, and solvent polarity. The DLS measurements and TEM images showed that the hydrodynamic radius (R_h) of the LCMs obtained in water increases with the copolymer concentration. Apart from that, increasing the stirring speed leads to polydispersed aggregations of the LCMs. On the other hand, in acetone, the copolymers self-assembled into reverse micelle-type nanoparticles having R_h values of about 6 nm and micellar aggregates, as revealed the results obtained from DLS, AFM, and ¹H NMR analyses. The variation in micellar structure, that is, conformational inversion from LCMs to reverse micelle-type structures in response to polarity of the solvent, was investigated by apparent water contact angle (WCA) and ¹H NMR analyses. This conformational inversion of the nanoparticles was further confirmed by encapsulation and release of hydrophobic guest molecule, Nile red, characterized by fluorescence spectroscopy.

INTRODUCTION

During the past decades, since the pioneer study carried out by Ziegand and Pfannemüller,¹ increasing number of studies on block copolymers (BCPs) consisting of oligo- or polysaccharides, such as maltoheptaose,^{2–5} dextran,^{6–8} and amylose,^{9–14} have been reported for the purpose of developing, specially, biomimetic and bioinspired nanomaterials. Thus, considering the biodegradability and biocompatibility properties exhibited by the polysaccharides,¹⁵ several synthetic polymers have been covalently coupled to the polysaccharides using different approach such as combinations of controlled living radical polymerizations (e.g., reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization and atom transfer radical polymerization (ATRP)) and click-chemistry,¹⁶ forming saccharide hybrid block copolymers.

As the synthetic and the natural blocks are, in most cases, thermodynamically incompatible,¹⁷ when dissolved in a selective solvent (i.e., a solvent that is thermodynamically good for one block but poor for the other), they spontaneously self-assemble into diverse morphologies in solution-state such as spherical micelles, cylindrical micelles, vesicles, bilayers, among others.¹⁸ These morphologies can be rationalized in terms of hydrophilic/hydrophobic block ratio,¹⁹ copolymer concentration,²⁰ stirring speed,²¹ and also by changing external stimulus such as temperature,^{2,22} pH,²³ or solvent polarity.^{20,24}

The ability exhibited by some copolymers (known as “smart” polymers) of undergoing conformational changes in response

Received: April 5, 2015

Revised: May 11, 2015

Published: May 14, 2015

ACS Publications | © 2015 American Chemical Society

2012

DOI: 10.1021/acs.biomac.5b00443
Biomacromolecules 2015, 16, 2012–2024