

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA PAREDE
POLIMÉRICA DE NANOCÁPSULAS ATRAVÉS DE
SONDAS FLUORESCENTES

ALESSANDRO JÄGER

Porto Alegre, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA PAREDE
POLIMÉRICA DE NANOCÁPSULAS ATRAVÉS DE
SONDAS FLUORESCENTES

ALUNO: ALESSANDRO JÄGER
ORIENTADOR: ADRIANA R. POHLMANN
CO-ORIENTADOR: VALTER STEFANI

Agradecimentos

À Profa. Dra. Adriana R. Pohlmann pela oportunidade concedida, pela orientação, pela paciência e confiança. Principalmente pelos ensinamentos e discussões calorosas.

Ao Prof. Dr. Valter Stefani pela co-orientação e discussões sobre o trabalho e diversos outros temas. (E pela paciência quanto a tentativas de destruição da estufa e o desaparecimento das chaves).

A Prof. Dra. Silvia S. Guterres pelo apoio, sugestões no trabalho e amizade.

Ao Fabiano e a Leandra pela disposição em responder meus eternos questionamentos (contato visual, lá vem o Alessandro, vamos pro outro lado).

A todos os colegas do LMNO pela amizade, proporcionando sempre um excelente ambiente de conversa, risos e claro, trabalho.

Aos amigos do LINDIM (lá vem o Jäger pra usar o Laser, denovo, cuida a fonte de acetona !!!)

À CAPES, pelo meu sustento.

Abreviaturas e símbolos

AIBN	2,2'-azo-bis(isobutironitrila)
β -CD	β -ciclodextrina
γ -CD	γ -ciclodextrina
C	tautômero ceto
C*	tautômero ceto excitado
CCD	cromatografia em camada delgada
CMC	concentração micelar crítica
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônia
DSC	calorimetria exploratória diferencial
E _I	confômero enol- <i>cis</i>
E _I *	confômero enol- <i>cis</i> excitado
E _{II}	confômero enol- <i>cis</i> aberto
E _{III}	confômero enol- <i>trans</i>
E _{IV}	confômero enol- <i>trans</i> aberto
ESIPT	transferência protônica intramolecular no estado excitado
GPC	<i>gel permeation chromatography</i>
HBN	2-(5'- <i>N</i> -dietilmetilenomanolato-2'-hidroxifenil)benzimidazol
HBO	2-(4'- <i>N</i> -acriloilamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol
k_D	coeficiente de difusão aparente
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MMA	metacrilato de metila
MO	monoestearato de sorbitano
ND	nanodispersão
NC	nanocápsulas
NC1	nanocápsulas com PMMA e sonda HBN dispersa
NC2	nanocápsulas com PMMA e sonda HBO dispersa

NC3	nanocápsulas com PMMA e sonda 2-(4- <i>N</i> -dietilmetilenomalonato-2-hidroxifenil)benzoxazol dispersa
NC4	nanocápsulas com copolímero (4)
NC5	nanocápsulas com copolímero (5)
NC6	nanocápsulas com copolímero (6)
NE	nanoemulsão
NE2	nanoemulsão com sonda HBO dispersa
NS	nanoesfera
PCL	poli(ϵ -caprolactona)
PLA	poli(ácido láctico)
PLGA	poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PMMA	poli(metacrilato de metila)
PCS	espectroscopia de correlação de fótons
Pf.	Ponto de fusão
P80	polissorbato 80
S ₀	estado eletrônico fundamental
S ₁	estado eletrônico excitado
T ₁	estado eletrônico triplete
TGC	triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico
$\Delta\lambda_{ST}$	deslocamento de Stokes
SDS	dodecilsulfato de sódio
UV-vis	espectroscopia no ultravioleta
v/v	volume/volume
ϵ	coeficiente de extinção molar
°C	graus Celsius
λ_{abs}^{max}	comprimento de onda do máximo de absorção
λ_{em}^{max}	comprimento de onda do máximo de emissão

Índice Geral

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1.FLUORESCÊNCIA.....	5
3.1.1 Benzazolas fluorescentes.....	6
3.1.2.ESIPT e deslocamento de Stokes.....	7
3.1.3. Efeito do solvente na ESIPT.....	8
3.1.4. Polímeros fluorescentes.....	10
3.2. NANOPARTÍCULAS.....	10
3.2.1. Caracterização físico-química.....	10
3.2.2. Espectroscopia de correlação de fótons.....	11
3.2.3. Medidas de pH.....	11
3.2.4. Potencial zeta.....	11
3.2.5. Proposição de modelos de nanocápsulas.....	11
3.2.6. Nanopartículas fluorescentes.....	14
4. EXPERIMENTAL.....	17
4.1 SÍNTESE DAS BENZAZOLAS.....	17
4.1.1 Síntese da 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzimidazol.....	17
4.1.2 Síntese da 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol.....	17
4.2 SÍNTESE DOS MONÔMEROS FLUORESCENTES.....	17
4.2.1 Síntese do 2-(5'- <i>N</i> -dietilmetilenomanolato-2'-hidroxifenil)benzimidazol.....	17
4.2.2 Síntese do 2-(4'- <i>N</i> -acriloilamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol.....	18
4.2.3 Síntese do 2-(4'- <i>N</i> -dietilmetilenomalonato-2'-hidroxifenil)benzoxazol.....	18
4.3 COPOLIMERIZAÇÃO.....	18
4.4 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÃO	20

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	22
4.5.1 Caracterização fotofísica dos monômeros e copolímeros.....	22
4.5.2 Caracterização fotofísica das nanocápsulas e nanoemulsão.....	23
4.5.3 Caracterização fotofísica das nanocápsulas com adição de etanol.....	23
4.5.4 Teste de inchamento.....	23
4.5.5 Espalhamento de luz dinâmico.....	24
4.5.6 Medida do diâmetro das nanocápsulas após adição de quantidades crescentes de etanol.....	24
4.5.7 Medida de pH das suspensões de nanopartículas.....	24
4.5.8 Potencial zeta.....	25
4.5.9 Preparação das soluções de DMSO/água.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1. CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA DOS MONÔMEROS E COPOLÍMEROS.....	26
5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS.....	30
5.2.1 Espalhamento de luz dinâmico.....	30
5.2.2 Medidas de pH.....	30
5.2.4 Estudo fotofísico das Nanopartículas.....	31
5.2.4.1 NC1 e NC4.....	31
5.2.4.2 NC2, NC5 e NE2.....	43
5.2.4.3.1 Modelo de parede polimérica.....	49
5.2.4.3 NC3 e NC6.....	50
6. CONCLUSÃO.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
8. ANEXOS.....	58

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismo de ESIPT (x= O, S e NH).....	2
Figura 2. Diferentes confôrmeros estabilizados em solução.....	2
Figura 3. Diagrama hipotético mostrando um esquema de curvas de energia potencial para estados eletrônicos fundamental (S_0) e excitados singlete (S_1) e triplete (T_1).....	5
Figura 4. Estrutura dos 2(2'-hidroxifenil) benzazóis.....	6
Figura 5. Deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda_{ST}$).....	7
Figura 6. Esquema da obtenção dos copolímeros.....	20
Figura 7. Esquema de preparação das nanocápsulas e nanoemulsão.....	22
Figura 8. Esquema das reações de copolimerização.....	27
Figura 9. Espectros de absorção no UV-Vis (curvas em preto) e emissão de fluorescência (curvas em azul) em acetato de etila dos monômeros e copolímeros.....	29
Figura 10. Representação esquemática das formulações NC1 e NC4.....	32
Figura 11. Espectros de emissão de fluorescência das nanocápsulas e do monômero (1) em TGC.....	32
Figura 12. Espectros de emissão de fluorescência (a: NC1; b: NC4), obtidos após excitação em 327 nm.....	33
Figura 13. Variação da intensidade relativa de emissões de fluorescência ESIPT (NC1 e NC4) e normal (NC4).....	35
Figura 14. Espectro de emissão de fluorescência de NC4 60 dias e da extração de NC4 60 dias com $CHCl_3$	36
Figura 15. Deslocamento dos máximos da emissão de fluorescência ESIPT. (a) NC1 e (b) NC4.....	37
Figura 16. Espectros de emissão de fluorescência da sonda (1) dispersa em DMSO seguido da adição de água: (a) Variação da intensidade em função da adição de água (b) deslocamento da emissão ESIPT em função da adição de água. ($6,1 \times 10^{-6}$ M).....	37

Figura 17. Diâmetro efetivo em função do tempo para NC1 e NC4.....	38
Figura 18. Variação do potencial zeta das formulações NC1 e NC4.....	39
Figura 19. Variação do pH das formulações NC1 e NC4 em função do tempo.....	40
Figura 20. Variação das massas dos filmes de copolímero (4) em função do tempo: (a) em água e (b) em óleo.....	41
Figura 21. Variação das massas dos filmes de PMMA em função do tempo: (a) em água e (b) em óleo.....	41
Figura 22. Espectros de emissão de fluorescência do polímero (5) e da sonda (2) em triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TGC).....	43
Figura 23. Espectros de emissão de fluorescência da sonda (2) em DMSO e DMSO e água (1:1). 5×10^{-6} M.....	45
Figura 24. Esquema das formulações NC5, NE2 e NC2.....	46
Figura 25. Espectro de emissão de fluorescência das formulações de nanopartículas. (5×10^{-6} M).....	47
Figura 26. Esquema de modelos em nível molecular de uma nanocápsula (a) conceito teórico de nanocápsulas (b) modelo proposto.....	49
Figura 27. Variação do diâmetro efetivo com a adição de etanol.....	50
Figura 28. Espectros de emissão de fluorescência das formulações NC3, NC6 e da sonda (3) disperso em etanol (10^{-6} M).....	51
Figura 29. Espectros de emissão de fluorescência das nanocápsulas após adição de cada alíquota de 100 μ L de etanol (a: NC3; b: NC6) $\lambda_{ex} = 360$ nm.....	51
Figura 30. Espectros de emissão de fluorescência da sonda (3) em etanol e das nanopartículas após adição de 800 μ L de etanol. ($\lambda_{ex} = 360$ nm).....	52

Índice de Tabelas

Tabela 1. Composição de monômero fluorescente, iniciador radicalar e metacrilato de metila para a síntese dos copolímeros fluorescentes.....	19
Tabela 2. Composição quali-quantitativa das diferentes fases orgânicas utilizadas na preparação das nanocápsulas e da nanoemulsão.....	21
Tabela 3. Mn obtido por GPC, polidispersão e porcentagem de incorporação (I) do monômero fluorescente e quantidade de monômero na cadeia polimérica.....	28
Tabela 4. Máximos de absorção, emissão e absortividade molar dos monômeros e copolímeros.....	28
Tabela 5. Diâmetro efetivo e desvio padrão das nanopartículas.....	30
Tabela 6. Resultados das mediadas de pH para as nanocápsulas e para a nanoemulsão.....	31
Tabela 7. Área, λ_{max} de emissão e razão de áreas das emissões da NC4.....	33
Tabela 8. Intensidade das emissões normal e ESITP da sonda (2) no copolímero e no TGC.....	44
Tabela 9. Intensidades e λ máximo das emissões em DMSO e DMSO/água (1:1).....	46
Tabela 10. Intensidades e λ máximo das emissões das formulações de nanopartículas.....	47

RESUMO

Nanocápsulas são carreadores submicrométricos compostos por um núcleo lipofílico cercado por uma parede polimérica e estabilizados por tensoativos. O modelo de organização dos componentes da nanocápsula a nível molecular pode ser proposto somente após intenso estudo físico químico. Nanocápsulas (NC) ligadas a sondas benzazólicas fluorescentes foram preparadas para verificar a interação dos seus componentes a nível molecular. As sondas, benzimidazola (HBN) e benzoxazola (HBO), são capazes de diferenciar o ambiente químico (polar/apolar) através de decaimentos de fluorescência diferenciados, decaimento normal e por transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT), resultado da formação de um tautômero (emissão deslocada para o vermelho). Após 60 dias, o espectro de fluorescência para NC1 e NC4, preparadas com HBN disperso e com o copolímero, PMM-HBN, mostrou diferença na intensidade da emissão ESIPT, variando de 875 para 750 unid. arb., em NC1, e diminuindo de 700 para 200 unid. arb. em NC4. Para NC4, após 60 dias, a banda da emissão normal aumenta de 25 para 50 unid. arb. Adicionalmente, as formulações NC2 e NC5, preparadas com sonda HBO dispersa e respectivo copolímero, PMM-HBO, mostrou resultado similar após preparação. NC2, contendo HBO disperso na NC, demonstrou uma pequena emissão normal e uma emissão ESIPT predominante, enquanto que NC5 demonstrou uma intensa emissão normal e uma emissão ESIPT menos intensa. Estes resultados mostram que as sondas quimicamente ligadas aos polímeros foram afetados pela fase aquosa na interface. Além disso, o modelo para a interface nas NC pode ser uma parede polimérica onde o óleo e a água estão presentes. Experimentos de inchamento feitos com filmes de poli(metacrilato de metila) e copolímero com HBN não revelaram mudanças no peso dos filmes durante 60 dias. Os estudos mostraram que o inchamento ou dissolução dos polímeros não ocorreram, nem em água nem em óleo, durante os 60 dias a temperatura ambiente. No entanto, os estudos de fluorescência sugerem que a água interage com a parede das nanocápsulas preparadas com poli(metacrilato de metila). Finalmente, a permeabilidade da parede polimérica foi determinada através da adição de etanol as formulações de NC3 e NC6. Todos resultados indicam que as suspensões de NC apresentam uma interface de fase contínua composto por óleo polímero e água.

ABSTRACT

Nanocapsules are submicrometric drug carriers composed by a lipophilic core surrounded by a polymeric wall stabilized by surfactants. The model of the organization of nanocapsule components at a molecular level can only be proposed after a full physico-chemical study. Nanocapsules (NC) labeled with fluorescent benzazole probes were prepared and used in order to verify the interaction of their components at a molecular level. The probes, a benzimidazole (HBN) and a benzoxazole (HBO), are able to differentiate the chemical environment (polar or unpolar) through different fluorescence decays, normal and excited state intramolecular proton-transfer mechanism (ESIPT). The ESIPT fluorescence decay (red shifted emission) is resulted from a tautomer decay. The fluorescent spectra, after 60 days, for NC1 and NC4 prepared with the dispersed HBN and with the copolymer, PMM-HBN, showed difference in the ESIPT emission intensity ranging from 875 to 750 arb. units after 60 days for the former and a decreased from 700 to 200 arb. units for the latter. For NC4 a normal emission band rose from 25 to 50 arb. units after 60 days. Additionally, NC2 and NC5 formulations prepared with dispersed HBO and with the respective copolymer, PMM-HBO, showed the similar behaviors after preparation. NC2, the HBO-loaded NC, showed a small normal emission band and a predominant ESIPT band, while NC5 showed an intense normal emission and a weak ESIPT emission band. These results showed that the probes chemically bound to the polymers were affected by the aqueous phase at the interface. Furthermore, the model for the interface in NC systems could be a polymeric wall where the oil and the water are present. Swelling experiments carried out for films of poly(methyl methacrylate) and its copolymer with HBI showed that no difference in weight was detected after 60 days. The study showed that swelling or dissolution of the polymer did not occur either in water or in oil after 60 days at room temperature. However, the fluorimetric study suggested that water interacts with the wall of nanocapsules prepared with poly(methyl methacrylate). Finally, the permeability of this polymeric wall was determined by adding ethanol to NC3 and NC6 formulations. The overall results indicated that the NC aqueous suspensions present an interface particle/continuous phase composed by oil, polymer and water.

1. INTRODUÇÃO

Nanopartículas poliméricas são carreadores de fármacos, submicrométricos (nanométricos) geralmente classificados como nanoesferas ou nanocápsulas.¹ O modelo teórico proposto para as nanocápsulas corresponde a uma vesícula onde uma parede polimérica envolve um núcleo oleoso.² Por sua vez, as nanoesferas são consideradas matrizes poliméricas.² As formas de associação dos fármacos às nanocápsulas e às nanoesferas incluem dispersão, solubilização e/ou adsorção destes às nanopartículas.³ Para que se possa conhecer, aperfeiçoar, planejar para obter-se estes sistemas nanoestruturados, é necessário um completo estudo físico-químico do comportamento das estruturas em nível nanométrico.⁴⁻⁷ O uso de diferentes fases oleosas como núcleo das nanocápsulas influencia nas suas características físico-químicas e em alguns casos o melhor modelo para determinado nanocarreador seria uma gotícula de óleo, na qual o polímero está dissolvido.⁴ Desta forma, o conhecimento da natureza físico-química do sistema em nível nanométrico é de fundamental importância para que se possa ter controle sobre o perfil de liberação dos fármacos.^{2,3}

Uma técnica, amplamente empregada no estudo de sistemas micelares e emulsões, é a fluorimetria.^{8,9} O emprego de sondas fluorescentes que respondem à polaridade do ambiente tem propiciado o estabelecimento de modelos da organização desses sistemas em nível molecular.⁸ A família dos benzazóis é bastante utilizada para esse fim, uma vez que apresentam transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT), (**Figura 1**), tendo como consequência uma maior estabilidade fotoquímica.¹⁰ Através da absorção de luz UV pelo conformero enol-*cis* E_1 (no estado fundamental) tem-se a formação de uma espécie que no estado excitado, enol-*cis* (E_1^*), apresenta aumento da acidez da hidroxila e basicidade do nitrogênio dando origem ao tautômero ceto (C^*) de menor energia pela transferência do próton da hidroxila para o nitrogênio. O tautômero C^* emite fluorescência a maiores comprimentos de onda levando à espécie tautomérica ceto (C) que retorna à espécie E_1 sem qualquer alteração fotoquímica.^{10,11,16}

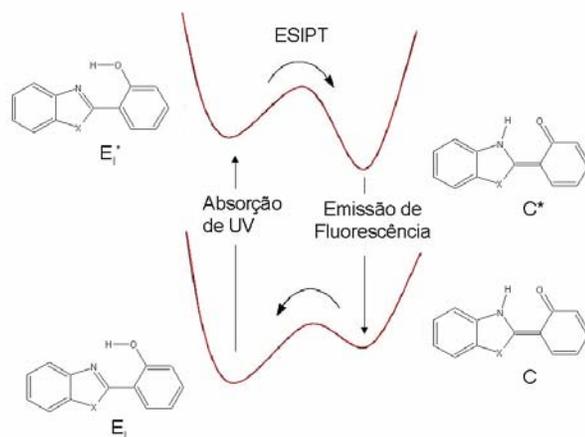


Figura 1. Mecanismo de ESIPT ($x = O, S$ e NH).

Os corantes benzazólicos também escolhidos para este trabalho foram recentemente descritos.^{15,16} Dependendo do meio ao qual a sonda é exposta tem-se a formação de diferentes confôrmeros no estado fundamental, os quais darão origem a emissões características no estado excitado.^{12,13} Para ambientes polares e/ou próticos prevalecem a formação dos confôrmeros enol-*cis* aberto (E_{II}), (**Figura 2**), enol-*trans* (E_{III}) e enol-*trans* aberto (E_{IV}) para as benzimidazolas. Estes confôrmeros são responsáveis pela emissão de fluorescência de maior energia a menores comprimentos de onda, descrita como emissão normal. Para ambientes apolares, mesmo que os demais confôrmeros também possam estar presentes, prevalece a formação do confôrmero enol-*cis* (E_I), o qual é responsável pela emissão ESIPT a maiores comprimentos de onda.¹⁶

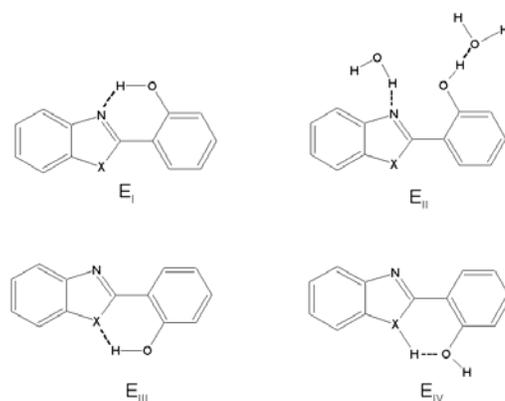


Figura 2. Diferentes confôrmeros estabilizados em solução.

Através de testes de inchamento/dissolução de polímeros foi demonstrado que nanocarreadores preparados com poli(ácido lático) ou com poli(ϵ -caprolactona) e benzoato de benzila, como óleo, seriam gotículas de óleo com polímero dissolvidos, ao invés de nanocápsulas.⁴ Quando os resultados de testes de inchamento do polímero em óleo e em água demonstram que não há modificação na massa, tem-se proposto que o modelo para as nanocápsulas seria uma parede polimérica envolvendo o núcleo oleoso.

Com o objetivo de verificar-se as propriedades nanoscópicas do polímero nas nanocápsulas propõe-se estudar através da espectroscopia de fluorescência, suspensões de nanocápsulas preparadas com poli[metacrilato de metila-co-2-(2'-hidroxifenil)benzazola], comparando-se os resultados com testes de inchamento dos mesmos copolímeros em óleo e em água.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do projeto é a avaliação das propriedades nanoscópicas de um polímero usado na preparação de nanocápsulas através de fluorimetria. Desta forma o projeto caracteriza-se pela síntese e funcionalização de sondas fluorescentes para sua copolimerização com metacrilato de metila, seguida da preparação de nanocápsulas fluorescentes. Considerando que as sondas funcionalizadas serão sensíveis ao meio, emitindo em diferentes comprimentos de onda dependendo do meio ao qual será exposto (polar, apolar, prótico ou aprótico), a utilização deste sistema propiciará estudos de caracterização físico-química das nanocápsulas. Considerando que a sonda fluorescente está covalentemente ligada ao polímero, este sistema poderá ser estudado em nível molecular. Cabe salientar que o ineditismo do trabalho está relacionado à caracterização físico-química da natureza da parede polimérica de nanocápsulas. Portanto, a aplicação dos resultados estará relacionada ao incremento de conhecimento necessário para controlar e desenhar dispositivos de liberação controlada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Síntese de corantes benzazólicos fluorescentes.
2. Funcionalização dos corantes para obtenção de monômeros benzazólicos fluorescentes.
3. Copolimerização dos monômeros benzazólicos fluorescentes com metacrilato de metila.
4. Caracterização físico-química dos polímeros fluorescentes.
5. Preparação de nanocápsulas utilizando os copolímeros fluorescentes.
6. Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas (pH, diâmetro e distribuição de partículas, potencial zeta e grau de incorporação de sonda).
7. Estudo fotofísico das formulações contendo os corantes incorporados ou ligados quimicamente através da emissão de fluorescência.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FLUORESCÊNCIA

A fluorescência é um processo relaxativo muito rápido (10^{-6} a 10^{-9} s) a partir de moléculas no estado excitado.¹⁷ O tempo de vida relativamente curto ($< 10^{-5}$ s) de uma molécula no estado excitado singlete se deve ao fato de o pareamento de *spins* ser favorável à sua desativação para o estado singlete fundamental.¹⁸ O diagrama de energia para as transições possíveis após a promoção dos elétrons a partir do estado fundamental é mostrado na **Figura 3**. A distribuição de energias características das transições do estado excitado singlete para o estado fundamental é observado na forma de espectro de fluorescência.

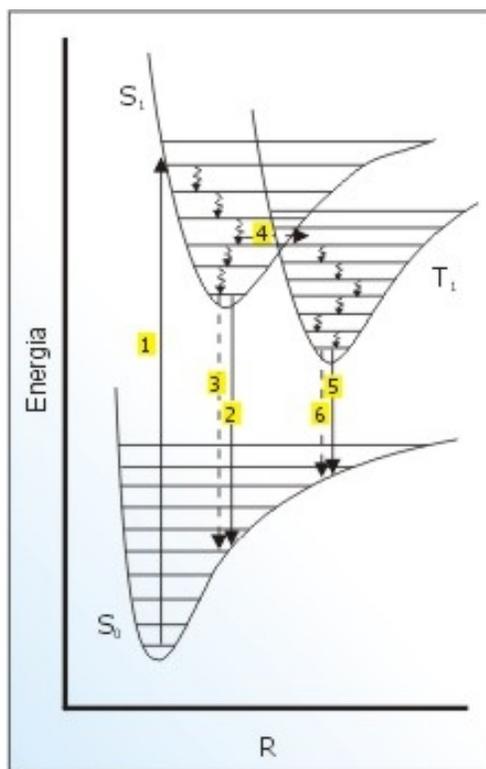


Figura 3. Diagrama hipotético mostrando um esquema de curvas de energia potencial para estados eletrônicos fundamental (S₀) e excitados singlete (S₁) e triplete (T₁), e os eventos radiativos e não radiativos que podem ocorrer: 1. Absorção de radiação (S₀ → S₁), 2. Emissão de fluorescência (S₁ → S₀), 3. Conversão interna e relaxação vibracional (S₁ → S₀), 4. Cruzamento intersistemas (S₁ → T₁), 5. Emissão de fosforescência (T₁ → S₀), 6. Cruzamento intersistemas (T₁ → S₀).

Exceto para moléculas pequenas (diatômicas) e moléculas rígidas (aromáticas), a fluorescência é um processo dissipativo não muito comum. Uma condição fundamental para que ocorra a fluorescência é uma estrutura suficientemente rígida minimizando perdas não-radiativas da energia absorvida e aumentando a probabilidade de transições radiativas.¹⁹ Uma ligação de hidrogênio intramolecular, como a existente nos heterociclos 2-(2'-hidroxifenil)benzazólicos, proporciona uma rigidez considerável para as moléculas.

3.1.1 Benzazóis fluorescentes

Heterociclos benzazólicos possuem em sua estrutura um anel azólico condensado a um anel benzênico. O anel azólico caracteriza-se por apresentar dois heteroátomos nas posições 1 e 3 de um anel de cinco membros, sendo que um deles sempre é o átomo de nitrogênio. A introdução de um grupamento fenila na posição 2 com uma hidroxila em posição *orto* em relação a esta ligação proporciona a formação dos heterociclos do tipo 2-(2'-hidroxifenil)benzazólicos (**Figura 4**). Através da variação do heteroátomo na posição 1 (X= O, S e NH) são produzidos diferentes derivados, sendo eles, os benzoxazóis, benzotiazóis e benzimidazóis, respectivamente.

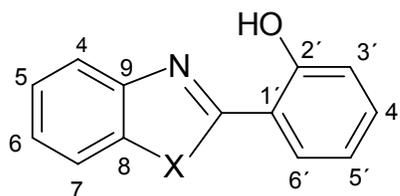


Figura 4. Estrutura dos 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis.

Os 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis caracterizam-se por apresentar propriedades fotofísicas muito interessantes como uma intensa emissão de fluorescência com grande deslocamento de Stokes, devido a um mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado (ESIPT).¹⁰⁻²³

3.1.2 ESIPT e Deslocamento de Stokes

Muitas moléculas orgânicas são capazes de absorver luz na região do visível ou ultravioleta, mas nem todas são capazes de exibir luminescência. Moléculas orgânicas que apresentam mecanismo de ESIPT são capazes de absorver na região do ultravioleta e emitir na região do visível, devido ao aparecimento de uma larga separação entre as bandas de absorção e de emissão de fluorescência. Esta separação entre as bandas é conhecida como deslocamento de Stokes, que é definido como a diferença entre os comprimentos de onda dos máximos de emissão e de absorção da molécula (**Figura 5**).

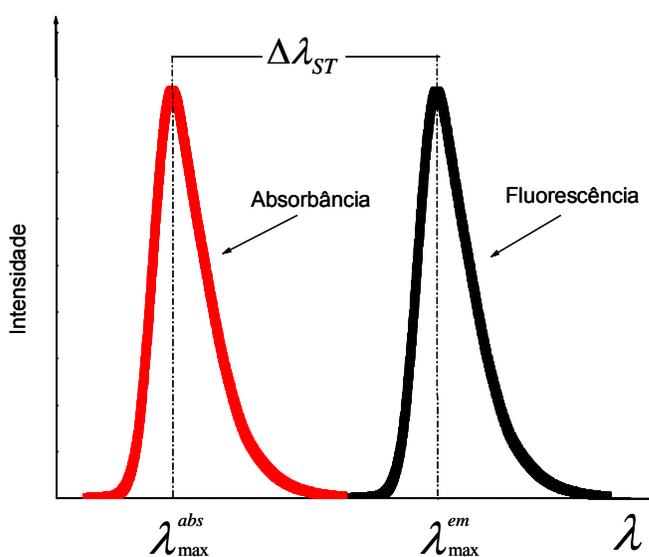


Figura 5. Deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda_{ST}$).

O deslocamento de Stokes da maioria das espécies fluorescentes encontra-se na faixa de 30 a 70 nm. Entretanto, quando a espécie envolvida sofre mudanças estruturais no estado excitado, como o fototautomerismo da ESIPT, assumindo uma estrutura de menor energia antes de emitir luz, o deslocamento de Stokes poderá se tornar maior, usualmente na faixa de 100 a 250 nm.²⁴

3.1.3 Efeito do solvente na ESIPT

O mecanismo da ESIPT é extremamente dependente da polaridade do solvente.^{25,13} Diversos estudos experimentais^{26,27} e teóricos^{28,29} têm sido realizados para melhor compreender a influência da polaridade do solvente na emissão ESIPT.

Sinha e colaboradores³⁰ realizaram estudo fotofísico das reações prototrópicas do 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol no estado fundamental e excitado utilizando solventes de diferentes polaridades (ciclohexano, éter, acetonitrila, metanol e água). A análise dos espectros de absorção mostrou quatro bandas características (330, 280, 240 e 210 nm), que se desestruturam e deslocam-se para menores comprimentos à medida que se aumenta a polaridade e a capacidade da formação de ligação de hidrogênio do solvente. Nos espectros de fluorescência, a emissão ESIPT foi observada em todos os solventes, apresentando deslocamento para menores comprimentos de onda com o aumento da polaridade do solvente e diminuição da intensidade na presença da água. Em metanol e água foi observado, a menores comprimentos de onda, o aparecimento da emissão normal, que se desloca para maiores comprimentos à medida que aumenta a capacidade de ligação de hidrogênio do solvente. A diminuição e o deslocamento da emissão ESIPT na água foi explicado pela existência de uma competição no estado excitado pela ligação de hidrogênio intramolecular da sonda com o solvente (água) o que leva à diminuição da formação da espécie tautômérica, responsável pela ESIPT e à formação de espécies que não fazem ligação de hidrogênio intramolecular (abertas), responsáveis pela emissão normal a menores comprimentos de onda. O mesmo comportamento foi observado e descrito por outros autores utilizando a mesma sonda.^{13,27,31,32}

Sarkar e colaboradores⁸ realizaram estudos em micelas de Triton X, dodecilsulfato de sódio (SDS) e brometo de cetiltrimetilamônia (CTAB) em água, utilizando o 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol como sonda. Concentrações crescentes de tensoativo foram adicionadas, com a sonda dispersa no meio, e medidas de fluorescência foram realizadas após cada adição. Os experimentos de fluorescência demonstraram, que abaixo da concentração micelar crítica (CMC), os valores de rendimento quântico, tanto para a emissão ESIPT quanto para a emissão normal, permaneceram inalterados. No entanto, próximo a CMC dos tensoativos foi verificado um aumento do rendimento quântico da

emissão ESIPT e um deslocamento para maiores comprimentos de onda, enquanto que na emissão normal de fluorescência foi observada uma diminuição no rendimento quântico. Os autores relacionaram os resultados do aumento da emissão ESIPT e diminuição da emissão normal ao processo de micelização verificado pela sonda através da mudança de polaridade sofrida por ela no meio. Abaixo da CMC, a sonda encontra-se sob a influência da água, favorecendo a ruptura da ponte de hidrogênio intramolecular, provocando diminuição da emissão de fluorescência ESIPT e formação de espécies, que emitem em menores comprimentos de onda. Próximo à CMC, inicia-se a formação dos agregados micelares e a sonda encontra-se dispersa em ambiente aprótico de menor polaridade, o qual favorece a espécie formadora de ligação de hidrogênio intramolecular, que emite por ESIPT em detrimento das demais que relaxam via emissão normal. Baseado nos resultados das variações dos rendimentos quânticos das emissões de fluorescência (normal e ESIPT) em função da mudança de polaridade do meio, os autores puderam calcular os valores das CMC para os tensoativos e chegaram a valores bastante exatos.

Roberts e colaboradores³³ realizaram estudos da transferência protônica inter e intramolecular na presença de ciclodextrinas para o 2-(2'-hidroxifenil)benzimidazol. As ciclodextrinas geralmente são utilizadas para facilitar a solubilização de compostos orgânicos hidrofóbicos, pois possuem característica externa hidrofílica e uma cavidade interna hidrofóbica. Foram realizados experimentos de fluorescência utilizando a β -CD_x, β -CD_m e γ -CD_x em água. À medida que as ciclodextrinas foram adicionadas ao meio, foi observado o aumento nas emissões de fluorescência ESIPT e meia vida (τ) em relação à água. O aumento na emissão e da meia vida foi maior para a β -CD_m do que para as demais. A explicação encontrada foi que os grupamentos dos álcoois secundários nas posições 2 e 3 do anel glicopiranosose da β -CD_x e γ -CD_x estariam em ligação de hidrogênio entre eles, resultando numa diminuição da solubilidade das ciclodextrinas. No caso da β -CD_m um dos hidrogênios alcoólicos (na posição 2) é substituído por uma metila, tornando a cavidade mais hidrofóbica e aumentando a possibilidades de ligação de hidrogênio com a água e a sonda. Simulando a polaridade do ambiente encontrado pela sonda na cavidade da ciclodextrina com dioxano, etanol e água foi proposta a formação de um tautômero de transição protônica intermolecular, estabilizado por ligações de hidrogênio intermoleculares

na cavidade da β -CD_m, enquanto que para a β -CD_x e γ -CD_x o tautômero responsável pela ESIPT seria originário da ligação de hidrogênio intramolecular na sonda.

3.1.4 Polímeros fluorescentes

Nos últimos anos, o uso de polímeros fluorescentes tem se intensificado nas mais diversas áreas da pesquisa^{15,16,34-42}. A maior parte das metodologias utiliza sistemas com sondas fluorescentes dispersas na matriz polimérica ou ligadas quimicamente à mesma. Suas aplicações vão desde o estudo das propriedades da matriz polimérica³⁴ ou interação entre matrizes,³⁵ ao desenvolvimento de novos materiais para laser de corantes,³⁶ materiais óptico-eletrônicos,³⁷ fotoprotetores,³⁸ e mais recentemente sua utilização como ferramenta de pesquisa na nanotecnologia como nanosensores³⁹ e nanocarreadores⁴⁰.

A utilização de polímeros fluorescentes na nanobiotecnologia como nanocarreadores tem sido de grande valia, visto que os polímeros fluorescentes permitem a visualização do percurso realizado pelos nanocarreadores. Diversos trabalhos foram publicados avaliando absorção, distribuição e eliminação destes sistemas em órgãos do corpo humano.^{41,42}

3.2 NANOPARTÍCULAS

3.2.1 Caracterização físico-química

A caracterização físico-química das suspensões de nanopartículas é dificultada pelo tamanho encontrado nos sistemas (inferior a 1 μ m).^{2,3,43} Para facilitar a avaliação físico-química dos sistemas nanométricos é utilizada a combinação de várias técnicas como análise morfológica, distribuição do tamanho de partículas, determinação de potencial zeta, pH e outras.³

3.2.2 Espectroscopia de Correlação de fótons (PCS)

Uma das técnicas mais utilizadas para a distribuição do tamanho das nanopartículas é a espectroscopia de correlação de fótons (PCS).⁴⁴ Através da determinação da intensidade da luz espalhada a um determinado ângulo em função do tempo pode-se obter o tamanho de partículas de 5 nm a 5 μ m e sua distribuição de tamanho.⁴⁵

3.2.3 Determinação de pH

O monitoramento do pH de suspensão de nanopartículas pode fornecer informações sobre o sistema como, por exemplo, indícios de degradação do polímero, relaxação das cadeias poliméricas e ionização de grupos carboxílicos funcionais, quando presentes.^{3,45,46}

3.2.4 Potencial zeta

Um método muito utilizado para a caracterização da superfície das nanopartículas é a medida do potencial zeta, que fornece uma boa aproximação do potencial de superfície das partículas. Geralmente para obter sistemas nanoparticulados fisicamente estáveis por períodos de tempo maiores o potencial zeta deve ser diferente de zero.^{2,45,46}

3.2.5 Proposição de modelos de nanocápsulas

El Samaligy⁴⁷ e colaboradores (1986) prepararam nanocápsulas de poli(cianoacrilato de alquila) contendo doxorrubicina. Através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) observaram que as nanocápsulas possuíam formato esférico e que o aumento da concentração de monômero aumentava a espessura da camada polimérica das nanocápsulas.

Nanocápsulas contendo Miglyol 812[®] como núcleo oleoso e poli(cianoacrilato de *iso*-butila) como polímero foram submetidas à criofatura e analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foi observada uma parede polimérica fina (cerca de 5,0 nm) e irregular ao redor do núcleo oleoso.⁴⁸ No entanto, Al Khouri e colaboradores⁴⁹

analisando a espessura da parede polimérica de nanocápsulas de poli(cianoacrilato de *iso*-butila) por MET, encontraram o valor de 3,0 nm e, por MEV uma morfologia na qual o invólucro das nanocápsulas era liso e uniforme. Adicionalmente, Guinebretiére e colaboradores⁵⁰ estimaram, através de MET, a espessura da parede polimérica para nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e Miglyol 812[®] na presença de fármaco com valores entre 1,5 e 2,0 nm.

Em 1993, através da medida comparativa do potencial zeta de suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e de nanoemulsões (ausência de polímero na formulação), foi proposto por Losa e colaboradores⁵¹ que o polímero que reveste a gota de óleo (Miglyol 840[®]) é uma parede descontínua e que a natureza do núcleo oleoso é o principal fator determinante do potencial de superfície das nanocápsulas. Pelo mesmo método, Calvo e colaboradores,⁵² em 1996, observaram o efeito dos diferentes componentes dos nanocarreadores de poli(ϵ -caprolactona), em nanocápsulas, nanoesferas (ausência de núcleo oleoso) e nanoemulsão nos valores de potencial zeta. Verificaram que a presença da fase oleosa (Miglyol 840[®]) nas nanocápsulas e nanoemulsões provocou um aumento em módulo do potencial zeta, ocasionando valores mais negativos, em relação à formulação de nanoesferas que não possui o óleo. O fato dos resultados de potencial zeta encontrados para nanocápsulas e nanoesferas serem próximos levou os autores a concluir que nas nanocápsulas a parede polimérica, formada ao redor da gotícula de óleo, não seria uma parede consistente, mas um fino filme polimérico.

Em 2000, Mosqueira e colaboradores⁵³ avaliaram a influência de diferentes óleos (Miglyol 810[®], Miglyol 812[®], Miglyol 829[®], Miglyol 840[®], oleato de etila, óleo de soja, óleo mineral e dodecano) nas propriedades físico-químicas de nanocápsulas de poli(ácido láctico). Foi constatado que não houve variação significativa do potencial zeta em função da natureza do núcleo oleoso, sugerindo que o óleo não está localizado na interface, mas completamente encapsulado pelo polímero. Foi analisada também a influência da massa molar do polímero sobre o potencial zeta, com e sem tensoativo (lecitina). Foi constatado que com a ausência do tensoativo, o potencial zeta diminuía em módulo à medida que aumentava-se a massa molar do polímero, enquanto que na presença do tensoativo não houve variação significativa do potencial zeta em função da variação da massa molar do polímero. Com isso os autores concluíram que a lecitina (um fosfolípido) estaria

envolvendo o polímero e que seus grupamentos fosfato determinaram o potencial zeta das nanocápsulas.

Em 2001, Müller e colaboradores⁶ examinaram através de experimentos de calorimetria diferencial exploratória (DSC), o comportamento dos surfactantes (monoestearato de sobitano e polissorbato 80) nas formulações de nanocápsulas e nanoesferas de PCL frente a secagem por aspersão. O desaparecimento do pico de fusão do monoestearato de sorbitano nas formulações de nanocápsulas secas por aspersão, e a diminuição em 7°C do ponto de fusão do Miglyol[®], indicaram que o monoestearato estaria dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas. Enquanto que nas nanoesferas, que não possuem óleo, foi observado a presença do pico do monoestearato de sobitano no termograma.

Em 2002 Pohlmann e colaboradores,⁵⁴ através de espalhamento luz dinâmico, realizaram medidas do coeficiente de difusão aparente (k_D) em nanocápsulas e nanoesferas de PCL. As medidas de coeficiente de difusão relacionam a interação da nanopartícula com a água através da medida do raio hidrodinâmico a 90°. Quanto mais positivo o valor encontrado para o k_D , maior a interação do sistema com a água, enquanto que, quanto mais negativo, menor será a interação. Para as NC e NS os valores de k_D encontrados, -19 e -14, demonstraram uma baixa interação com a água. Entretanto, as medidas de k_D realizadas com fins comparativos em NS sem monoestearato (MO), tensoativo lipofílico, e nanodispersão (ND), ausência de polímero e óleo, revelaram valores positivos, +28 e +87, respectivamente. Segundo os autores a interação da água com as NS sem MO e a ND ocorre pela presença do polissorbato 80 (tensoativo hidrofílico) na formulação que estaria disperso na partícula (polímero ou MO, respectivamente) promovendo a absorção de moléculas de água e inchando a partícula resultando em valores de k_D positivos. A pouca interação ocorrida com as NC e NS com a água, foi atribuída a presença do MO disperso no polímero, que evitou o inchamento mesmo com a presença do polissorbato 80.

Mayer e colaboradores⁵⁵ avaliaram a aplicabilidade da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio na análise estrutural de nanocápsulas de poli(cianoacrilato de *n*-butila), contendo Mygliol 812[®]. A análise foi realizada após a formação das nanocápsulas, mas antes da evaporação do solvente orgânico (etanol). O modelo proposto foi definido como sendo uma fase externa contendo água, etanol e

tensoativo, separada da fase interna por uma parede de poli(cianoacrilato de *n*-butila) com o triglicerídeo (Miglyol 812[®]) e o tensoativo adsorvidos. A fase interna contém triglicerídeo e etanol.

Em 2003 Cauchetier e colaboradores⁵⁶ calcularam a espessura da parede polimérica de nanocápsulas contendo atovaquona, preparadas com benzoato de benzila e três diferentes polímeros: poli(ácido lático) (PLA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) ou poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA). Os valores teóricos para a espessura da parede polimérica foram determinados baseados na hipótese de que o polímero é o único componente da parede das nanocápsulas. A aproximação matemática forneceu um valor próximo a 20 nm para os três polímeros. Entretanto, em um trabalho realizado por Guterres e colaboradores⁴, foi demonstrado que o benzoato de benzila não é apropriado para formular nanocápsulas de PCL ou PLA, pois através de testes de inchamento/dissolução de filmes destes polímeros foi comprovado que o benzoato de benzila é capaz de dissolver ambos os polímeros.

3.2.6 Nanopartículas fluorescentes

Kim e colaboradores,⁴⁰ através do método de diálise, formularam nanopartículas utilizando o copolímero de poli(etilenoglicol) ligado covalentemente a biontina (PEGBio), e o ácido trans-retinóico como modelo de fármaco. Um estudo da concentração de associação crítica (CAC) durante a formação das nanopartículas foi realizado através de espectroscopia de fluorescência pela análise dos espectros de emissão e excitação do pireno. Antes da formação das nanopartículas uma mesma quantidade de pireno foi dispersa na presença de diferentes concentrações de PEGBio em água, e os respectivos espectros de fluorescência analisados. Como o pireno apresenta uma emissão de fluorescência de baixa intensidade em ambientes polares, que aumenta à medida que diminui a polaridade do meio, com o aumento da concentração de PEGBio aumentava-se a intensidade da emissão de fluorescência e o espectro de excitação apresenta deslocamento para menores comprimentos de onda (vermelho). Estes resultados indicam a formação de nanopartículas no meio, o que é demonstrado pela interação do pireno com os domínios hidrofóbicos emergentes das mesmas através dos estudos de fluorescência. A partir da

comparação entre as bandas do espectro de excitação e a razão de intensidade I_{337}/I_{334} , que demonstram a presença do pireno no meio polar (água) ou apolar (inteiramente nos domínios hidrofóbicos), pode ser calculado a concentração de PEGBio para a CAC.

Kang e colaboradores⁵⁷ através do método de diafiltração formularam nanopartículas fluorescentes contendo pireno utilizando copolímeros enxertados, como o metacrilóil-poli(*N*-isopropilacrilamida-co-*N,N*-dimetilacrilamida (MNDT) e os telômeros de metacrilóil-sulfametoxipiridazina (MSPT), sensíveis à variação de pH e temperatura, respectivamente. As nanopartículas foram formuladas sob duas condições de diafiltração, (I) a pH 7 e 35°C e (II) a pH 8 e 45°C. Analisando os resultados de transmitância óptica e a razão de intensidades das bandas de emissão de fluorescência I_{337}/I_{334} das nanopartículas os autores determinaram a provável organização do copolímero na nanoestrutura. Observou-se que os aumentos da razão I_{337}/I_{334} eram diferentes de acordo com a metodologia empregada, (I) ou (II), supondo a existência de duas estruturas. Constatou-se que quando era utilizado a condição (I) as razões de intensidades de fluorescência eram menores que na condição (II), o que levou à conclusão de que o núcleo da nanoestrutura em (II) era composto de MNDT, mais hidrofóbico, enquanto que na (I) o núcleo seria formado de MSPT mais hidrofílico. Desta forma, pela seleção do método empregado, os autores puderam selecionar as características do núcleo e da parede das nanopartículas a serem produzidas, mais hidrofóbicas ou mais hidrofílicas.

Lo e colaboradores⁵⁸ prepararam formulações de nanopartículas utilizando copolímeros enxertados de poli(ácido láctico) (PLA) com poli(*N*-isopropilacrilamida-co-ácido metacrílico) [(P(NIPAm-co-MMA)] biodegradável e sensível ao ambiente. O P(NIPAm) é um polímero hidrofílico, solúvel em água abaixo da temperatura crítica de solução (LCST), e que acima da LCST apresenta uma transição com agregação e diminuição da solubilidade, adquirindo características hidrofóbicas. A introdução randômica de pequenas proporções do MMA (até 7%) nos copolímeros de P(NIPAm) aumenta a sua LCST, e o torna sensível a variação do pH, o que faz com que possa ser aplicado em sistemas de liberação a nível intracelular. A partir destes copolímeros, nanopartículas foram preparadas através do método de diálise utilizando 5-fluorouracila (5-FU) como fármaco e pireno como sonda. A estrutura das nanopartículas foi avaliada em diferentes intervalos de tempo, após incubação em células de carcinoma hepático (HA22T),

através dos espectros de excitação de fluorescência em 340 nm e emissão de fluorescência em 370-500 nm (I_1/I_3). A variação nas intensidades das bandas I_1/I_3 , utilizadas como índice de polaridade, mostraram que as nanopartículas no pH 7,4 são mais hidrofóbicas que no pH 5, abaixo da LCST. Isto ocorre, segundo os autores, porque em meio ácido temos a diminuição da transição de fase/temperatura das nanopartículas, devido a diminuição das ligações de hidrogênio que ocorrem entre os grupos ácido do MMA-COOH e amida do NIPAm-CONH. Os resultados das razões das intensidades de fluorescência, após a incubação das nanopartículas a 37 °C nas células de carcinoma hepático, demonstraram as primeiras alterações após 90 minutos, tempo estimado para que as nanopartículas penetrassem nas células. Neste tempo a razão I_1/I_3 indica que o pireno encontra-se localizado em uma região hidrofóbica das nanopartículas, o núcleo de PLA. Com o passar do tempo, aos 150 min de incubação, temos uma alteração na razão de intensidade que chega ao máximo nos 180 minutos. A alteração na razão indica que o ambiente sondado pelo pireno na nanopartícula mudou de hidrofóbico para hidrofílico. A explicação dada pelos autores é a de que a exposição ao meio ácido intracelular causou uma deformação na nanopartícula expondo o pireno ao meio aquoso. O experimento de liberação da 5-FU, feito em pH ácido, demonstrou uma liberação significativa de mais de 25 % do fármaco em 1 hora, concordando com os resultados de emissão de fluorescência fornecidos pelo pireno.

4. EXPERIMENTAL

4.1 SÍNTESE DAS BENZAZOLAS

4.1.1 Síntese da 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzimidazol¹⁵

Uma solução de ácido polifosfórico (19 mL) e ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico (1,46g; 9,54 mmol) foi mantida sob agitação magnética e temperatura de 50 °C até a solubilização completa. Em seguida, adicionou-se *o*-aminofenol (2,00 g; 18,51 mmol). O sistema foi fechado com um “trap” secante contendo cloreto de cálcio e aquecido a 200°C. Após 4 horas, o meio reacional foi resfriado e a solução vertida em água gelada, o precipitado foi neutralizado com Na₂CO₃ (10%) e posteriormente filtrado. O produto foi seco à temperatura ambiente e purificado por cromatografia em coluna, utilizando-se o clorofórmio como eluente. Rendimento: 53 %, Pf. : 190-192 °C.

4.1.2 Síntese da 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol³⁸

Uma solução contendo ácido polifosfórico (15 mL), ácido 4-aminosalicílico (1,00 g; 6,54 mmol) e *o*-amino-fenol (0,70 g; 6,43 mmol) foi mantida a 180°C por 5 horas com agitação magnética sob atmosfera de N₂. A mistura reacional foi vertida em gelo picado, neutralizada com Na₂CO₃ (10%) e filtrada. O precipitado, produto bruto, foi seco à temperatura ambiente e purificado por cromatografia em coluna utilizando diclorometano como eluente. Rendimento: 61 %, Pf. : 226-228 °C

4.2 SÍNTESE DOS MONÔMEROS FLUORESCENTES

4.2.1 Síntese do 2-(5'-*N*-dietilmetilenomanolato-2'-hidroxifenil)benzimidazol (1)¹⁵

O 2-(5'-amino-2'-hidroxifenil)benzimidazol (1,69 g; 7,51 mmol) foi solubilizado em etanol (45 mL). Em seguida adicionou-se 1,52 mL (7,53 mmol) de β-etoximetilenomalonato de dietila e a solução foi aquecida sob agitação magnética à temperatura de refluxo. Após 4 horas, o produto precipitou no meio reacional e foi filtrado, lavado com etanol à quente e seco à temperatura ambiente. O produto bruto foi purificado

por cromatografia em coluna, utilizando diclorometano como eluente. Rendimento: 54 %, Pf. : 218-220 °C

4.2.2 Síntese do 2-(4'-*N*-acriloilamida-2'-hidroxifenil)benzoxazol (2)^{*16}

Após a solubilização de 0,50 g (2,21 mmol) de 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol em 10 mL de clorofórmio, o meio foi resfriado a 5 °C. Em seguida, adicionou-se à solução 0,169 g (2,21 mmol) de cloreto de acrilóila. A solução foi aquecida sob agitação magnética à temperatura de refluxo. Após 24 horas, o produto precipitado foi filtrado, lavado com etanol à quente e seco à temperatura ambiente. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando-se diclorometano como eluente. Rendimento: 44 %, Pf. : 255-257 °C

4.2.3 Síntese do 2-(4-*N*-dietilmetilenomalonato-2'-hidroxifenil)benzoxazol (3)¹⁶

Após solubilização do 2-(4'-amino-2'-hidroxifenil)benzoxazol (0,35 g; 1,53 mmol) em etanol (10 mL) o β-etoximetileno malonato de dietila (0,33 g; 1,53 mmol) foi adicionado à solução. O meio reacional foi aquecido sob agitação magnética à temperatura de refluxo. Após 24 horas, o produto precipitado, foi filtrado, lavado com etanol à quente e seco à temperatura ambiente. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando clorofórmio como eluente. Rendimento: 80 %, Pf. : 176-178 °C

4.3 COPOLIMERIZAÇÃO

Cada monômero fluorescente (1), (2) ou (3) foi dissolvido em metacrilato de metila (MMA), seguido da adição de iniciador radicalar, azobisisobutironitrila (AIBN), (**Tabela 1**). As misturas reacionais foram mantidas na estufa à temperatura de 60 °C por 4 horas. Após polimerização, os copolímeros foram retirados da estufa e dissolvidos em 100 mL de

* Este produto foi gentilmente cedido por Fabiano S. Rodembusch do Laboratório de Novos Materiais orgânicos (LMNO), coordenado pelo professor Valter Stefani.

clorofórmio e precipitados em 300 mL de éter de petróleo. O procedimento foi repetido até que após purificação não fosse detectada fluorescência no filtrado.

Paralelamente foi preparado o poli(metacrilato de metila) (PMMA) na ausência de monômero fluorescente, empregando-se AIBN (0,085 mmol) e MMA (49 mmol). O esquema da obtenção dos copolímeros e seus rendimentos são mostrados na **Figura 6**.

Tabela 1. Composição de monômero fluorescente, iniciador radicalar e metacrilato de metila para a síntese dos copolímeros fluorescentes.

Copolímero	Monômero fluorescente g(mmol)	AIBN g(mmol)	MMA mL(mmol)
(4)	(1) 0,0025 g ($5 \cdot 10^{-3}$ mmol)	0,0146 g ($9 \cdot 10^{-2}$ mmol)	5 mL (49 mmol)
(5)	(1) 0,0029 g (10^{-2} mmol)	0,0145 g ($9 \cdot 10^{-2}$ mmol)	5 mL (49 mmol)
(6)	(1) 0,0033 g ($8 \cdot 10^{-3}$ mmol)	0,0149 g ($9 \cdot 10^{-2}$ mmol)	5 mL (49 mmol)

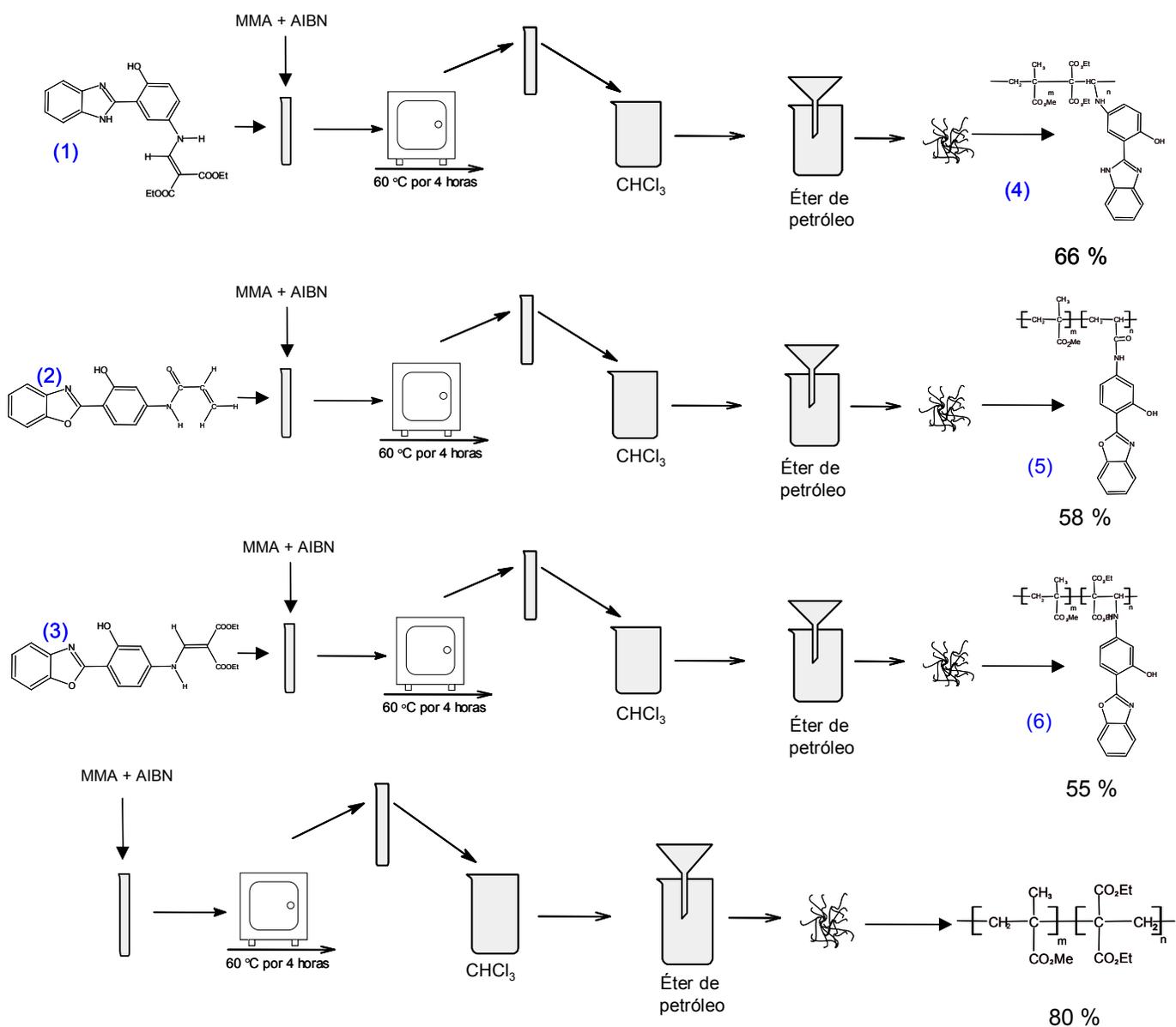


Figura 6. Esquema da obtenção dos copolímeros, (4), (5) e (6), PMMA e seus rendimentos.

4.4 PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÃO

As nanocápsulas foram preparadas por deposição interfacial de polímero pré-formado e a nanoemulsão por emulsificação espontânea utilizando-se do método de

nanoprecipitação.⁵⁹ A fase aquosa foi preparada da mesma maneira para todas as formulações de nanocápsulas e nanoemulsão, dissolvendo-se o polisorbato 80 (P80) (0,076 g) em água destilada (53 mL). A fase oleosa varia de acordo com a formulação, nanocápsulas (NC) ou nanoemulsão (NE). Para as NC foram preparadas seis fases oleosas diferentes. Três delas contendo os copolímeros, (4), (5) e (6), foram chamadas respectivamente de NC4, NC5 e NC6, enquanto que as outras três contendo PMMA e as sondas dispersas, (1), (2) e (3), foram chamadas de NC1, NC2 e NC3. Para a preparação de cada fase oleosa das NC os copolímeros e/ou as sondas com o PMMA (**Tabela 2**) foram dissolvidos em acetona (27 mL), acrescidos de monoestearato de sorbitano (MO) (0,076 g) e triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (TGC) (0,33 mL). A fase orgânica da formulação de NE foi preparada sem a utilização de PMMA ou de copolímeros, com a presença de quantidades proporcionais da sonda (2) dispersa (**Tabela 2**) e chamada de NE2.

Após dissolução dos componentes, a fase orgânica foi vertida na fase aquosa. A mistura foi mantida sob agitação por 10 minutos e, em seguida, evaporou-se a acetona e parte da água, concentrando-se a suspensão a volume final de 10 mL, ajustado em balão volumétrico. Um esquema da preparação das nanopartículas é mostrado na **Figura 7**.

Tabela 2. Composição quali-quantitativa das diferentes fases orgânicas utilizadas na preparação das nanocápsulas e da nanoemulsão.

Formulação	PMMA (g)	Copolímero	Quantidade de copolímero (g)	Monômero	Quantidade de monômero disperso (g x 10 ⁻⁶)
NC1	0,032	–	–	(1)	24,0
NC2	0,030	–	–	(2)	15,5
NC3	0,031	–	–	(3)	12,0
NC4	–	(4)	0,029	–	–
NC5	–	(5)	0,032	–	–
NC6	–	(6)	0,031	–	–
NE2	–	–	–	(2)	15,5

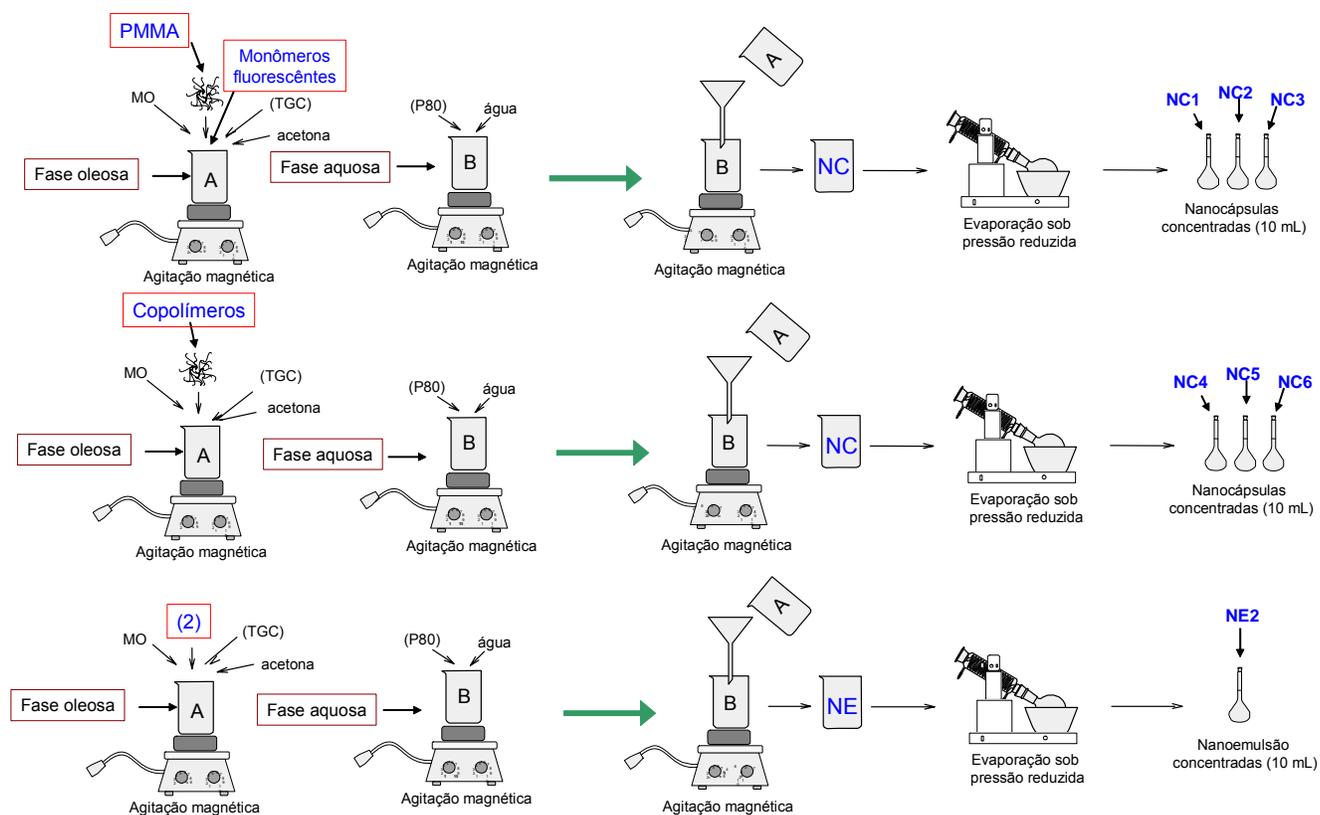


Figura 7. Esquema de preparação das nanocápsulas e nanoemulsões.

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.5.1 Caracterização fotofísica dos monômeros e copolímeros

Quantidades conhecidas dos monômeros foram pesadas e dissolvidas em acetato de etila. Para os copolímeros foram pesados com exatidão cerca de 0,030 g dos copolímeros e posteriormente dissolvidos em 3 mL de acetato de etila. Para a obtenção dos espectros de absorção dos monômeros e dos copolímeros foi utilizada cubeta de quartzo, 10 mm, tipo 101-S (Suprazil) e espectrofotômetro Shimadzu (UV-1601 PC). Para a análise fotofísica dos monômeros e copolímeros, os passos anteriores foram repetidos utilizando-se cubeta de quartzo, tipo 100-S (Suprazil) e um espectrofluorímetro Hitachi (F-4500).

4.5.2 Caracterização fotofísica das nanocápsulas e nanoemulsão

Com o objetivo de minimizar o espalhamento encontrado em amostras turbidas, como suspensões, as análises de emissão de fluorescência das nanocápsulas e nanoemulsão foram realizadas vertendo-se as amostras diretamente na cubeta triangular de quartzo (Hellma). As medidas de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro Hitachi (F-4500).

4.5.3 Caracterização fotofísica das nanocápsulas com adição de etanol

Os espectros de emissão de fluorescência após as adições de etanol foram realizados conforme item 4.5.2.

Primeiramente foi realizado um espectro de fluorescência, com 1 mL de suspensão de nanocápsula na ausência do etanol. Após o espectro inicial, 100 μ L de suspensão de nanocápsulas foram retirados da cubeta e 100 μ L de etanol foram adicionados em seu lugar, mantendo o volume final de 1 mL. As proporções subsequentes de etanol/suspensão foram preparadas da mesma forma a partir da suspensão original, retirando-se respectivamente 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 μ L de suspensão, para cada alíquota, e acrescentadas de mesmo volume de etanol, mantendo-se o volume final de 1 mL.

4.5.4 Teste de inchamento

Para preparação dos filmes do copolímero (4) e de PMMA os mesmos foram dissolvidos em clorofórmio. Posteriormente, evaporou-se o solvente até massa constante. Para as análises, foram pesadas 6 amostras de filmes de cada polímero. Para o copolímero (4) as massas dos filmes foram 0,4066 g, 0,6091 g, 0,4734 g, 0,2069 g, 0,5716 g e 0,2970 g e para o PMMA as massas foram 0,2800 g, 0,2871 g, 0,2534 g, 0,3001 g, 0,3734 g e 0,2809 g. As amostras foram divididas em duas baterias de triplicatas, sendo uma coberta com água e a outra com óleo (TGC). Os frascos foram fechados e deixados à temperatura ambiente. Diariamente, na primeira semana, as amostras foram secas com lenço de papel e

pesadas. Após a segunda semana, as amostras foram pesadas semanalmente até 60 dias de armazenamento.

4.5.5 Espalhamento de luz dinâmico

Uma alíquota de 50 μL de cada formulação foi diluída em balão volumétrico (25 mL) utilizando como solvente água MilliQ[®], filtrada em filtro de 0,45 μm (Millipore[®]). Aproximadamente 10 mL de cada solução foi transferida para cubetas de análise para medida do tamanho de partícula em ângulo fixo de 90°. Utilizou-se um equipamento Brokhaven (goniômetro BI-200 M, correlacionador digital BI-9000 AT e sistema de detecção BI-9863) com fonte laser Spectra-Physics He-Ne, modelo 127, $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ e 35 mW de potência.

4.5.6 Medida do diâmetro das nanocápsulas após adição de quantidades crescentes de etanol.

A medida do diâmetro das nanocápsulas, após adição de volumes crescentes de etanol, foi acompanhada por PCS, conforme descrito no item 4.5.5.

Foi medido inicialmente o diâmetro das NC antes da adição de etanol, através da diluição de 50 μL da suspensão até o volume de 25 mL com água. Foi adicionado, então, na mesma solução (5,0 mL), volumes crescentes de etanol (0,5 mL até 10 mL), sendo que, após cada adição, o diâmetro efetivo de partícula foi novamente medido. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.5.7 Medida de pH das suspensões de nanopartículas

O pH foi medido vertendo-se as suspensões em béquer de 15 mL. Para realização das medidas utilizou-se potenciômetro Micronal B-474, previamente calibrado com soluções tampão Digimed[®] pH 4,00 e 6,02.

4.5.8 Potencial zeta

O potencial zeta das suspensões de nanopartículas foi determinado através de Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600 (Malven, EUA). As determinações foram realizadas de 15 em 15 dias pelo período de 60 dias. As amostras foram preparadas diluindo-se 3 gotas das suspensões NC1 ou NC4 em 15 mL de solução NaCl (1 mM). As diluições foram feitas em triplicata para cada medida durante os 60 dias de análise.

4.5.9 Preparação das soluções de DMSO/água

As soluções de DMSO/água nas proporções 90:10, 80:20 e 60:40 foram preparadas a partir de uma solução padrão de DMSO com sonda benzimidazol na concentração de 360 µg/mL. Aliquotas de 24 µg, proporcional a concentração de sonda ligada ao copolímero na NC4, foram dissolvidos em balão de 10 mL na presença das proporções de DMSO citadas e completados com água MilliQ®. A concentração final das soluções foi de 2,4 µg/mL ($6,1 \times 10^{-6}$ M) de sonda benzimidazol.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA DOS MONÔMEROS E COPOLÍMEROS

Os monômeros (1), (2) e (3) foram copolimerizados com metacrilato de metila em presença de AIBN (**Figura 8**). Após purificação, os copolímeros (4), (5) e (6) foram obtidos com rendimentos de 66, 58, 55 %, respectivamente. A porcentagem de incorporação das sondas fluorescentes e as massas molares médias dos copolímeros são mostrados na **Tabela 3**. A determinação dos percentuais de incorporação dos monômeros nos copolímeros e as respectivas quantidades de mol de sonda por mol de polímero foram realizados a partir dos valores de absorbância de cada amostra, considerando os coeficientes de absorvidade molar ($\epsilon_{\text{máx}}$) dos corantes funcionalizados em acetato de etila (**Tabela 4**). Na **Tabela 4** também são descritos os $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção no UV e de emissão no visível dos monômeros e dos copolímeros. Os espectros de absorção no UV e de emissão de fluorescência dos monômeros e dos copolímeros estão normalizados e são mostrados na **Figura 9**. O espectro de absorção de UV-Vis do copolímero (4) comparado com o do monômero (1) (**Figura 9a**)¹⁵ não apresentou deslocamento significativo do comprimento de onda do máximo de absorção (**Tabela 4**). Quanto ao espectro de emissão de fluorescência, foi observado uma emissão ESIPT proveniente do confômero (E_I) no estado fundamental, tanto para o monômero quanto para o copolímero com máximos de emissão muito próximos. A ausência da emissão normal de fluorescência, em menores comprimentos de onda, evidencia que o equilíbrio conformacional está deslocado para a forma E_I , majoritariamente presente na solução. Por outro lado, os copolímeros (5) e (6) (**Figura 9 b e c**) apresentaram modificações em relação aos monômeros respectivos, (2) e (3). Ambos apresentaram deslocamento no comprimento de onda do máximo de absorção após a copolimerização. Esses resultados estão de acordo com resultados anteriores descritos para estes monômeros na literatura,¹⁶ indicando que os monômeros fluorescentes (4), (5) e (6) devem estar covalentemente ligados as matrizes poliméricas. Quanto aos espectros de emissão de fluorescência dos monômeros (2) e (3) e de seus respectivos copolímeros, (5) e (6) (**Figura 9 b e c**), é observado que além de apresentarem emissão ESIPT, todos apresentam emissão normal de fluorescência, a menores comprimentos de onda. Esses

deslocamentos estão relacionados a presença dos conformêros E_{II} e E_{IV} no estado fundamental.¹⁶

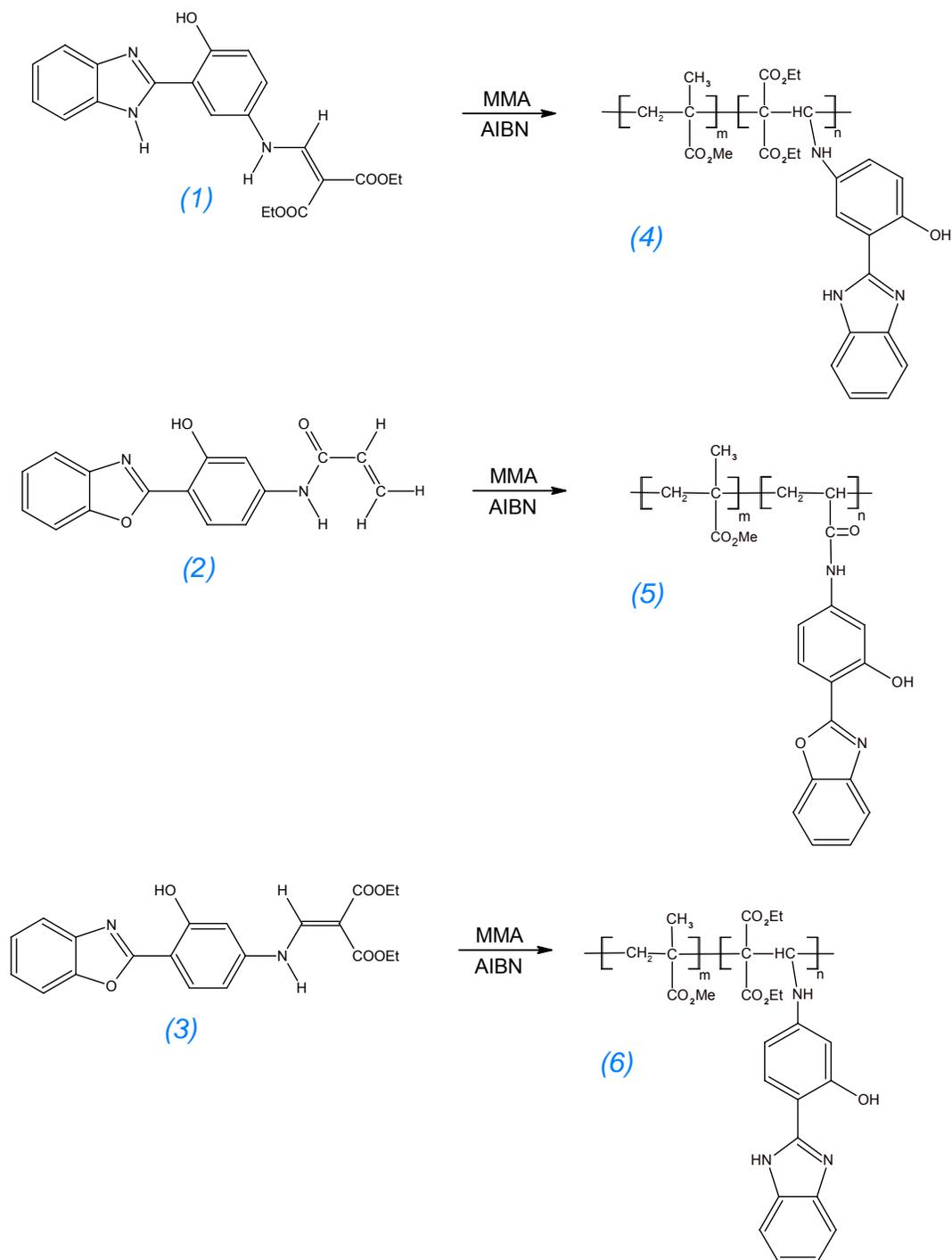


Figura 8. Esquema das reações de copolimerização.

Tabela 3. Mn obtido por GPC, polidispersão e porcentagem de incorporação (I) do monômero fluorescente e quantidade de monômero na cadeia polimérica.

Amostra	$M_n \times 10^3$ (g/mol)	$M_w \times 10^3$ (g/mol)	M_w/M_n	I (%)	mol de sonda/mol de polímero
Copolímero (4)	195	624	3,2	85	0,39
Copolímero (5)	162	890	5,2	67	0,28
Copolímero (6)	290	725	2,5	51	0,29
PMMA	170	595	3,5	0	0

Tabela 4. Máximos de absorção, emissão e absortividade molar dos monômeros e copolímeros.

Amostra	λ_{abs}^{max}	λ_{em}^{max} ES IPT	$\Delta\lambda_{st}$ ES IPT	λ_{em}^{max} Normal	$\Delta\lambda_{st}$ Normal	ϵ_{max} (L.mol ⁻¹ cm ⁻¹)
monômero (1)	327	504	177	–	–	$3,20 \times 10^4$
copolímero (4)	326	503	177	–	–	–
monômero (2)	337	472	135	380	43	$3,81 \times 10^4$
copolímero (5)	331	473	142	370	39	–
monômero (3)	357	468	111	394	37	$7,21 \times 10^4$
copolímero (6)	360	469	109	392	32	–

Considera-se que para a existência de confôrmeros (E_{II}), (E_{III}) e (E_{IV}) em equilíbrio no estado fundamental com enol-*cis* (E_I), as energias de solvatação devem favorecer a interconversão entre os confôrmeros.^{12,15,27,29} Considerando que o confôrmero (E_{IV}) provém de (E_I) pelo rompimento da ligação de hidrogênio intramolecular entre o nitrogênio azólico e o hidrogênio fenólico a estabilidade relativa da ligação de hidrogênio nas sondas (1) e (4) provavelmente é maior que a estabilidade relativa das ligações de hidrogênio nas sondas (2), (5), (3) e (6), pois estas sondas apresentaram emissões normais em solução de acetato de etila.

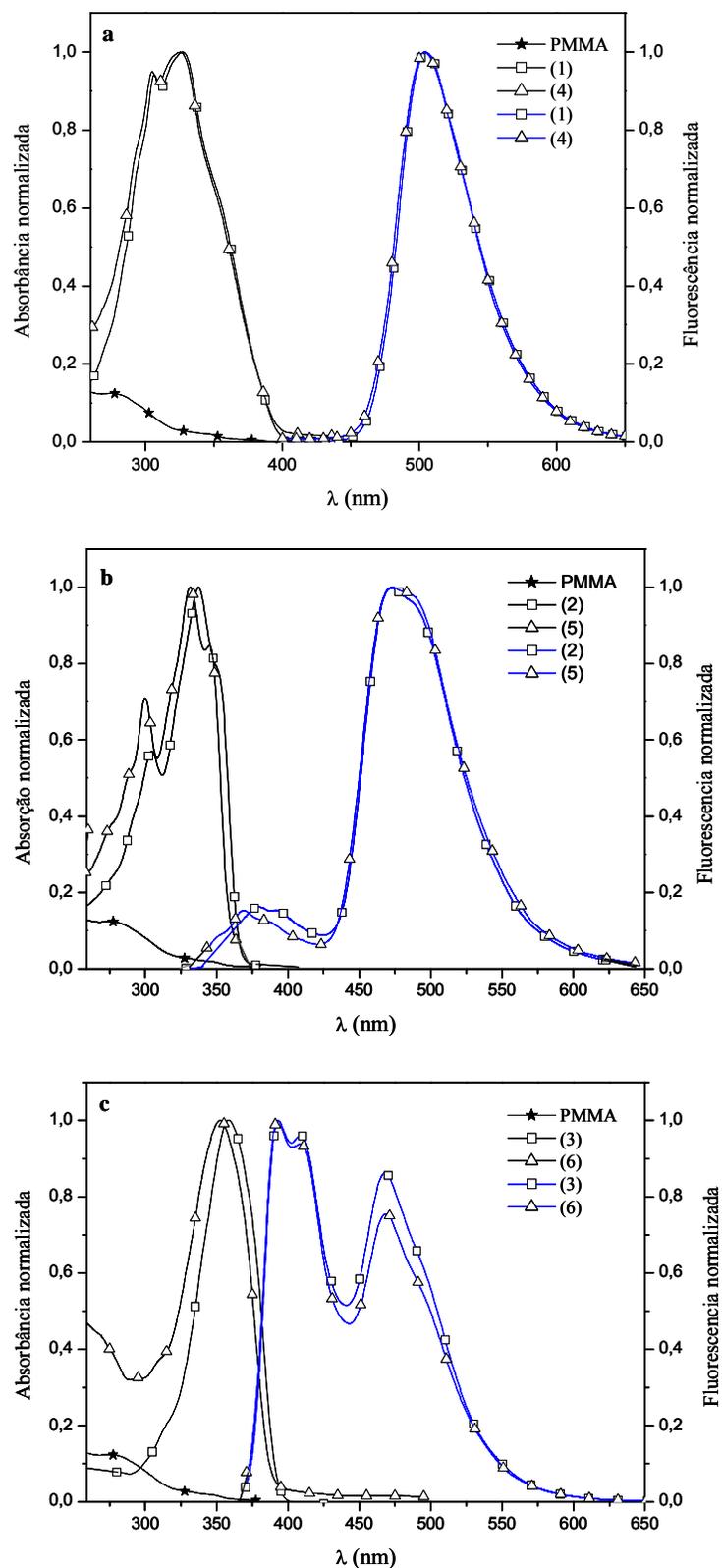


Figura 9. Espectros de absorção no UV-Vis (curvas em preto) e emissão de fluorescência (curvas em azul) em acetato de etila dos monômeros e copolímeros.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS E NANOEMULSÃO

5.2.1 Espalhamento de luz dinâmico

Os diâmetros efetivos e a polidispersão das nanocápsulas e da nanoemulsão obtidos através de espalhamento de luz dinâmico são mostrados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Diâmetro efetivo e desvio padrão das nanopartículas.

Formulação	Diâmetro efetivo (Polidispersão)
NC1	234 (0,128)
NC2	245 (0,087)
NC3	210 (0,160)
NC4	215 (0,090)
NC5	224 (0,085)
NC6	220 (0,122)
NE2	260 (0,093)

Todas as formulações apresentaram diâmetro de partículas menores que 260 nm e polidispersão menor que 0,16.

5.2.2 Medidas de pH

Os resultados das medidas de pH após preparação das formulações de nanocápsulas e da formulação de nanoemulsão são mostrados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Resultados das medidas de pH para as nanocápsulas e para a nanoemulsão.

Formulação	pH	Desvio padrão
NC1	6,25	± 0,04
NC2	6,16	± 0,13
NC3	5,98	± 0,09
NC4	6,06	± 0,19
NC5	6,31	± 0,06
NC6	6,03	± 0,05
NE2	5,55	± 0,12

Os resultados de pH para as formulações de nanocápsulas encontraram-se entre 6,25 e 5,98 com o maior desvio padrão de 0,13. A formulação de nanoemulsão apresentou um pH de 5,55 e desvio padrão de 0,12.

5.2.4 Estudo fotofísico das nanopartículas

5.2.4.1 NC1 e NC4

Para melhor compreensão dos sistemas, um esquema das formulações NC1 e NC4 é mostrado na **figura 10**.

Os espectros de emissão de fluorescência das formulações NC1 e NC4 e do monômero (1) disperso no óleo (**Figura 11**) mostram os λ_{\max} de emissão de fluorescência em 504 nm, indicando que em todos os sistemas a emissão ESIPT é preferencial. Além disso, para a formulação NC4 pode-se verificar, em torno de 406 nm, a emissão normal de baixa intensidade, indicando a presença de confôrmeros E_{II}, E_{III} e/ou E_{IV} nesse meio.

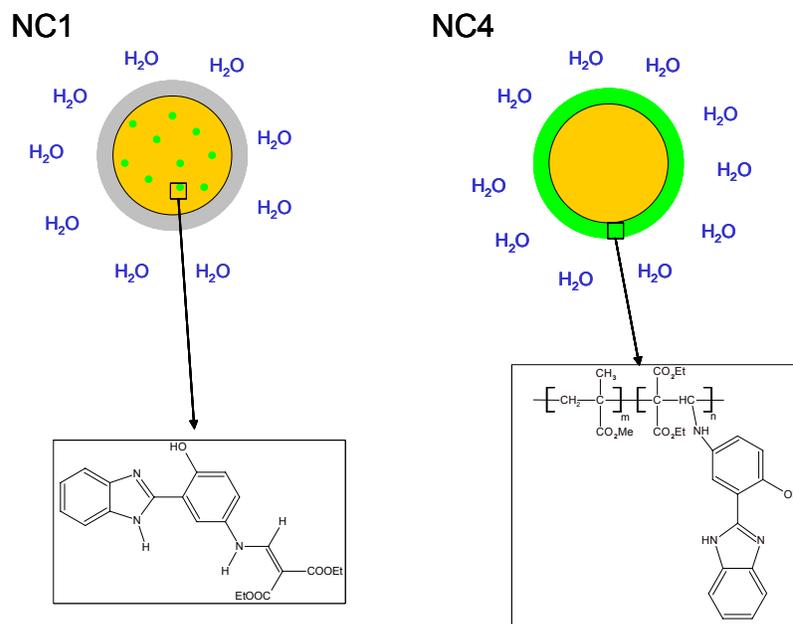


Figura 10. Representação esquemática das formulações NC1 e NC4.

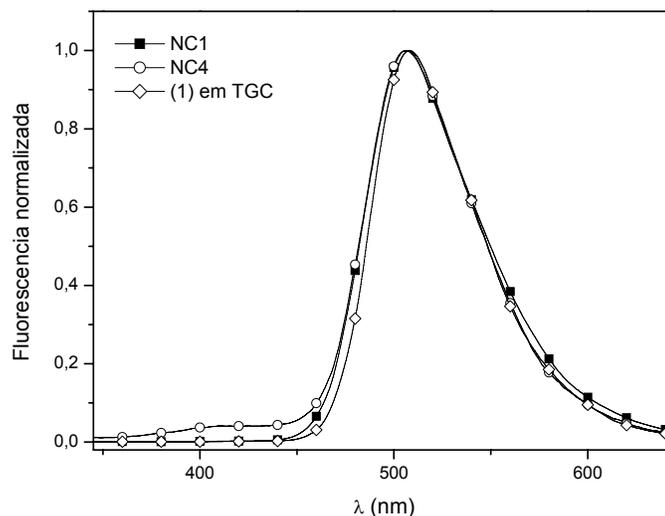


Figura 11. Espectros de emissão de fluorescência das nanocápsulas e do monômero (1) em TGC.

As emissões das formulações NC1 e NC4 em função do tempo (**Figura 12**) foram determinadas. Pode-se verificar que a intensidade da emissão normal da NC4 aumenta (**Figura 12b**) em função do tempo, enquanto que a intensidade da emissão ESIPT diminui.

Por outro lado a formulação NC1 não apresentou emissão normal (**Figura 12b**) e a variação na intensidades da emissão ESIPT em função do tempo não foi significativa, quando comparado a NC4. Este resultado mostra que a sonda incorporada fisicamente à NC1 está preferencialmente localizada em ambiente que não sofre interferência do meio externo, e ainda, que a emissão ESIPT apresenta área constante em 60 dias. A **Tabela 7** mostra as razões de área das emissões ESIPT e normal da NC4.

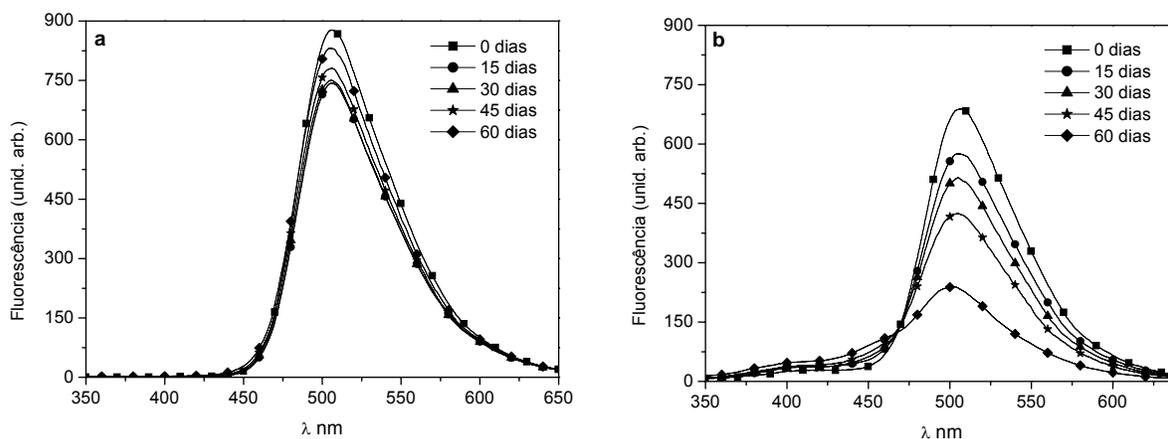


Figura 12. Espectros de emissão de fluorescência (a: NC1; b: NC4), obtidos após excitação em 327 nm.

Tabela 7. Área, λ_{\max} de emissão e razão de áreas das emissões da NC4.

Tempo	Área da emissão normal	λ_{em}^{\max} normal (nm)	Área da emissão ESIPT	λ_{em}^{\max} ESIPT (nm)	Razão das áreas ESIPT/normal
0 dia	1326	402	49437	506	37
15 dias	2019	404	42104	504	21
30 dias	2062	404	37563	503	18
45 dias	2457	403	32102	499	13
60 dias	3236	401	20181	496	6

Apesar da área da emissão de fluorescência da ESIPT manter-se superior a área da emissão de fluorescência normal (**Figura 12b**), a diminuição da razão da área do ESIPT em

relação à área da emissão normal em função do tempo para NC4 é um indício da presença da água na interface polímero/água, levando à ruptura da ligação de hidrogênio intramolecular e conseqüente formação de confôrmeros que emitem fluorescência em menores comprimentos de onda, (E_{IV}) e (E_{II}), pela formação de ligações de hidrogênio intermolecular com a água. A formação dos conformeros (E_{II}) e (E_{IV}) leva à diminuição da forma (E_I), no estado fundamental, responsável pela emissão ESIPT. No caso de NC4, esse equilíbrio ocorre entre a forma (E_I) e a forma (E_{II}) ou entre (E_I) e (E_{IV}) devido à presença do ponto de isoemissão em 470 nm (**Figura 12b**). Essa interpretação está de acordo com relatos anteriores que definem que a presença de um ponto de isoemissão indica o equilíbrio dinâmico entre duas espécies.^{62,63} Apesar dos dados da literatura indicarem principalmente a formação do confôrmero E_{II} na presença de solventes próticos e polares, o que indicaria um equilíbrio entre E_I e E_{II} , a possibilidade da isoemissão partir do equilíbrio entre E_I e E_{IV} não pode ser descartada.

Percebe-se também, tanto para NC1 quanto para NC4, que a interação do copolímero formador da nanocápsula com a água não é estática, aumentando em função do tempo. Sua dinâmica é facilmente demonstrada em NC4 pela diminuição da razão entre a emissão ESIPT e a normal, mas também pode ser percebida por NC1 através de pequenas variações nas intensidades da emissão ESIPT. Em NC1 é observado uma diminuição da emissão ESIPT nos primeiros 15 dias seguida de posterior recuperação após 30 dias (**Figura 13**). Isto pode ser explicado pela presença de sonda dispersa na parede polimérica que acaba por sofrer a influência da água. À medida que a água difunde através da parede polimérica, e encontra a sonda dispersa, ocorre a interação da mesma com a água fazendo com que a intensidade diminua nos primeiros 15 a 30 dias (de 1 para 0,80). Como a sonda é de natureza hidrofóbica (insolúvel em água) e não está ligada covalentemente ao polímero, como em NC4, encontrando-se dispersa, acaba por difundir para o óleo, provocando o aumento nas intensidades de fluorescência observado após 30 dias (de 0,80 para 0,95). Por outro lado, para a sonda em NC4, ligada covalentemente ao polímero, as intensidades da emissão ESIPT diminuem bruscamente em 60 dias (de 1 para 0,30), enquanto que as intensidades da emissão normal aumentam (de 1 para 1,90). A proporcionalidade dos valores relativos da diminuição da emissão ESIPT e aumento da emissão normal podem ser um indicativo de que grande parte dos confôrmeros que são responsáveis pelo aumento da

emissão normal (E_{III}), (E_{IV}) e, principalmente, (E_{II}) provem da diminuição do confômero (E_I) responsável pela emissão ESIPT.

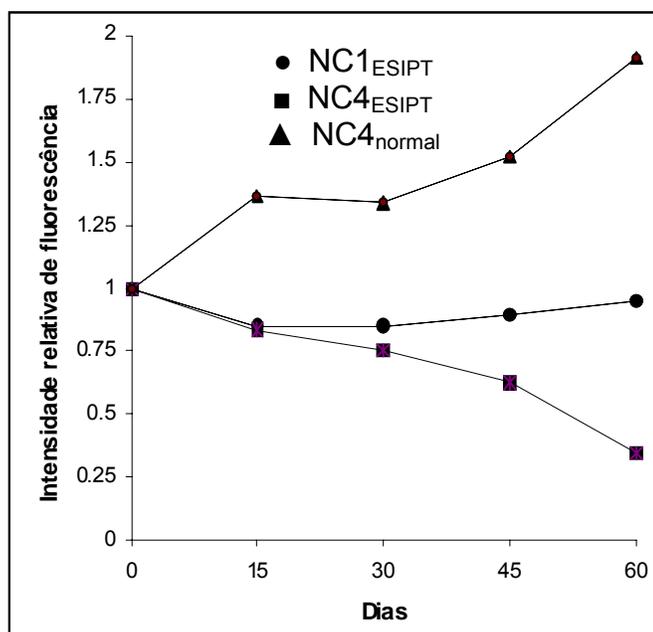


Figura 13. Variação da intensidade relativa das emissões de fluorescência ESIPT (NC1 e NC4) e emissão normal (NC4).

Para verificar se a interação da água está aumentando e que a diminuição da emissão ESIPT não é decorrente de degradação química ou fotoquímica, mas sim desta interação, uma alíquota de 1 mL da suspensão NC4 de 60 dias foi extraída na presença de 1 mL de $CHCl_3$ e submetida à análise por emissão de fluorescência.

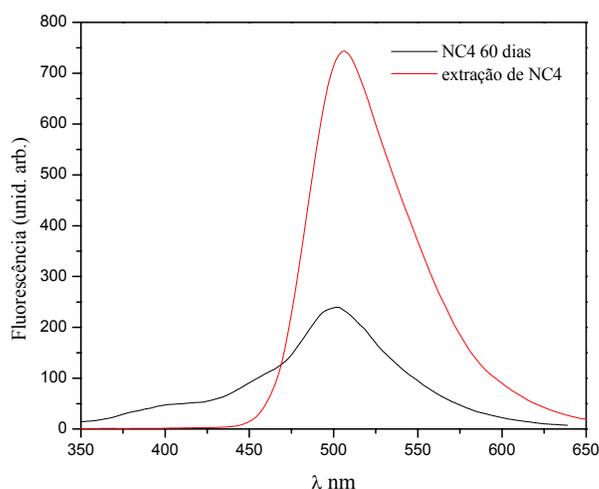


Figura 14. Espectro de emissão de fluorescência de NC4 60 dias e da extração de NC4 60 dias com CHCl_3

Após a extração, foi observado (**Figura 14**) o desaparecimento da emissão normal e a recuperação na intensidade da emissão de fluorescência ESIPT, demonstrando que a sonda mantém-se estável durante o período de análise e que a diminuição da emissão ESIPT provém da interação da sonda com a água.

Outra observação relevante foi o deslocamento no máximo de emissão de fluorescência ESIPT, observado em NC4 quando comparado a NC1 (**Figura 15**). Enquanto que para NC1 o máximo da emissão ESIPT manteve-se em torno de 506 nm durante os 60 dias (**Figura 15 a**), para NC4 foi observado um deslocamento de 10 nanômetros no máximo da ESIPT, de 506 para 496 nm (**Figura 15 b**). O comportamento descrito para NC4, com o deslocamento do máximo de emissão de fluorescência para menores comprimentos de onda, se deve ao aumento da polaridade na parede polimérica causado pela presença da água durante os 60 dias.

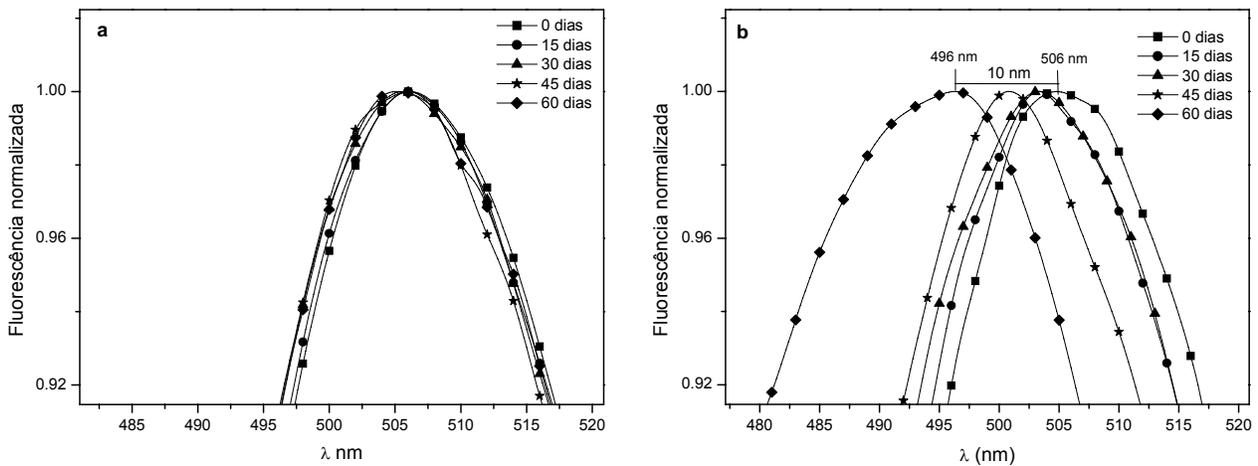


Figura 15. Deslocamento dos máximos da emissão de fluorescência ESIPT. (a) NC1 e (b) NC4.

Para simular o comportamento da sonda na presença da água na parede polimérica foram realizados experimentos com a sonda (1) dispersa em DMSO/água (**Figura 16**). Foi observado um comportamento similar ao da sonda (1) ligada covalentemente ao polímero na formulação NC4.

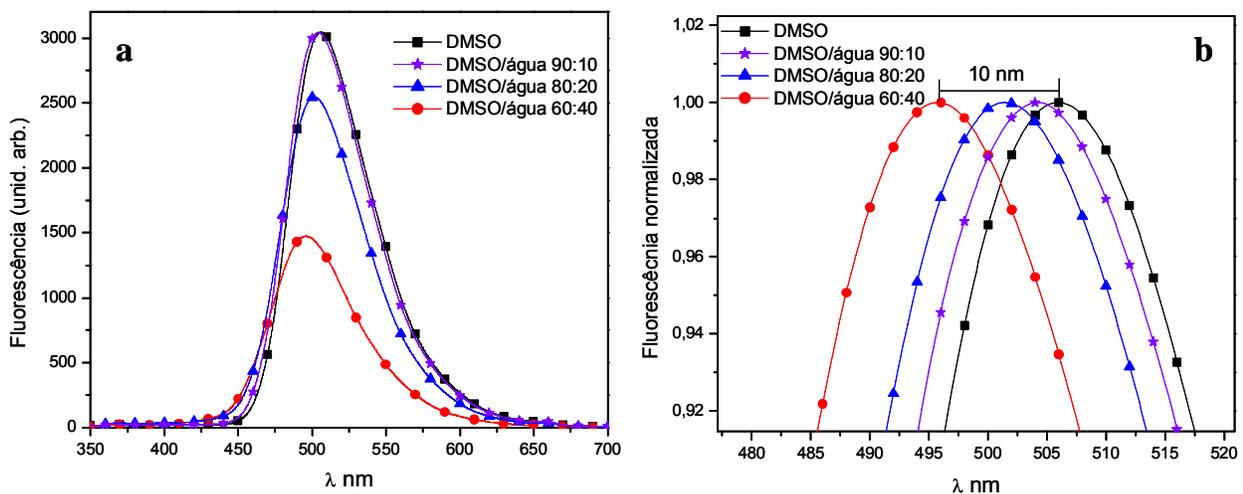


Figura 16. Espectros de emissão de fluorescência da sonda (1) dispersa em DMSO seguido da adição de água: (a) Variação da intensidade em função da adição de água (b) deslocamento da emissão ESIPT em função da adição de água. ($6,1 \times 10^{-6}$ M)

Pode-se observar que à medida que aumenta a quantidade de água tem-se uma diminuição na intensidade e um deslocamento da emissão de fluorescência ESIPT (**Figura 16 a**). Nota-se que o deslocamento apresentado pela sonda dispersa em DMSO na presença das adições de água (**Figura 16 b**) foi similar ao deslocamento descrito para NC4 nos 60 dias (**Figura 15 b**), o que indica a interação da parede polimérica na presença da água. O não aparecimento da emissão normal, para a mistura DMSO/água e (1) pode ser devido à baixa solubilidade da sonda em água e a contínua adição de água faz com que ela precipite no meio, fazendo com que a emissão normal não possa ser evidenciada.

Com o objetivo de monitorar a estabilidade das suspensões de nanopartículas NC1 e NC4 ao longo dos 60 dias foram realizadas caracterizações físico-químicas complementares, como medidas da variação do diâmetro efetivo, potencial zeta e pH.

A **Figura 17** mostra a variação dos diâmetros efetivos das formulações de nanopartículas NC1 e NC4 durante o período de 60 dias.

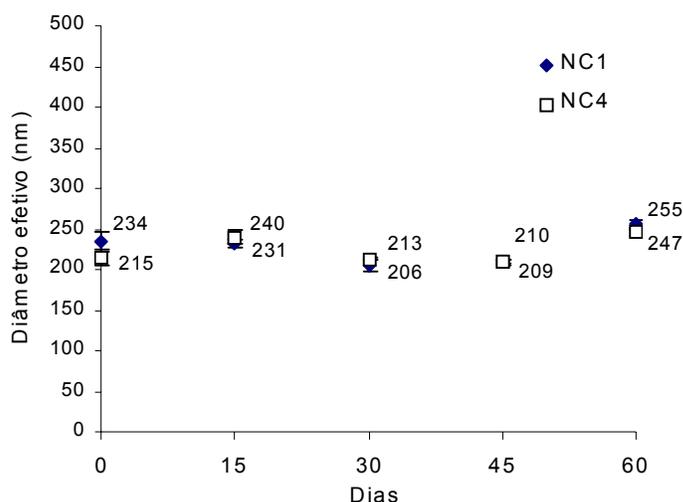


Figura 17. Diâmetro efetivo em função do tempo para NC1 e NC4.

Não foi verificada variação significativa no tamanho de partícula durante os 60 dias demonstrando que as suspensões mantiveram-se fisicamente estáveis durante este período.

Os resultados das medidas de potencial zeta para as formulações de suspensões NC1 e NC4 durante os 45 dias são mostrados na **Figura 18**.

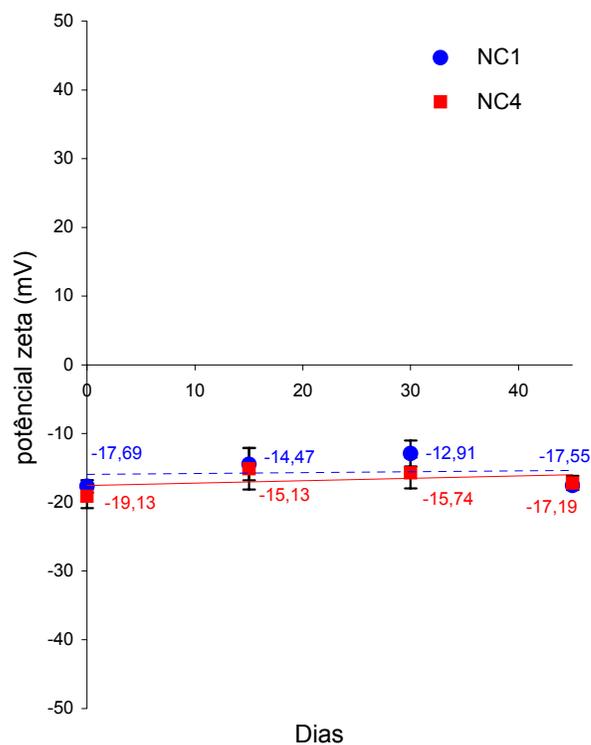


Figura 18. Variação do potencial zeta das formulações NC1 e NC4.

O potencial zeta manteve-se constante durante os 45 dias. Os valores de potencial zeta encontrados para NC1 variaram de -17,69 mV a -17,55 mV, e em NC4 de -19 mV a -17 mV.

Os resultados da variação do pH das formulações de suspensões NC1 e NC4 avaliados durante os 60 dias são mostrados na **Figura 19**.

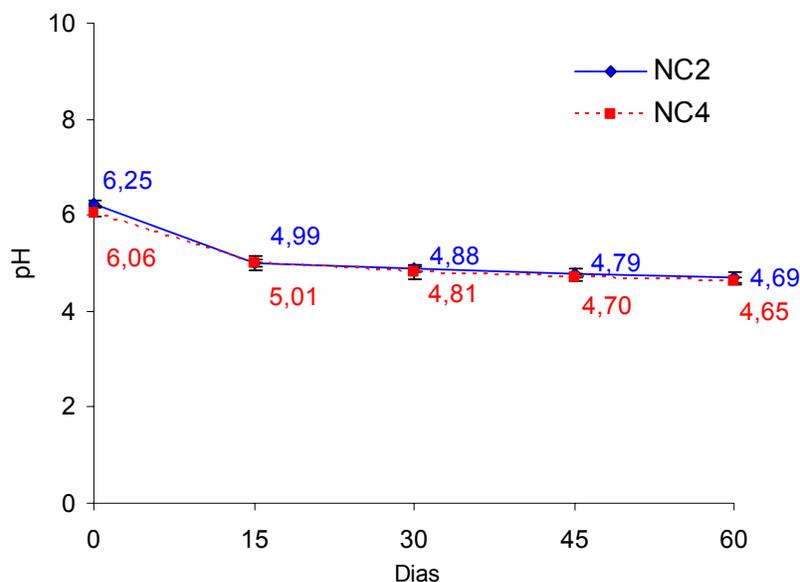


Figura 19. Variação do pH das formulações NC1 e NC4 em função do tempo.

Os resultados encontrados demonstram uma diminuição do pH para as formulações em 15 dias, NC1 que passa de 6,06 para 5,01 e NC4 6,16 para 5,02. Após 15 dias a variação do pH não é estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e observa-se a formação de um platô. A diminuição do pH ocorrida nos primeiros 15 dias pode ser atribuída a um processo de relaxação das cadeias poliméricas, uma vez que Lopes e colaboradores⁴⁵ explicaram a diminuição do pH de uma suspensão de nanocápsulas de Eudragit S90[®] devido à mobilidade das cadeias poliméricas, através do aumento da concentração de hidrônio, originado pela dissociação dos grupos carboxílicos presentes na superfície polímero/água. Neste caso para as amostras NC1 e NC4 uma pequena taxa de hidrólise pode ter sido acompanhada por uma relaxação de grupos pendentes da cadeia dos polímeros.

Relacionando o pH com o potencial zeta, seria esperado que com a queda no pH durante os 60 dias ocorresse, também, uma diminuição do potencial zeta ao longo do tempo. Entretanto, essa diminuição não foi observada, e o potencial zeta manteve-se constante durante os 60 dias. Este fato pode ser explicado pela diferença entre os valores de pH do meio e da superfície das nanopartículas, conforme anteriormente relatado para nanoemulsões de triglicérides de cadeia média estabilizados por tensoativo catiônico.⁶⁴

Os resultados dos testes de inchamento realizados com os filmes do copolímero (4) e do PMMA a fim de verificar possíveis interações destes filmes com a água ou com o óleo durante os 60 dias são mostrados na **Figura 20** e **Figura 21**, respectivamente.

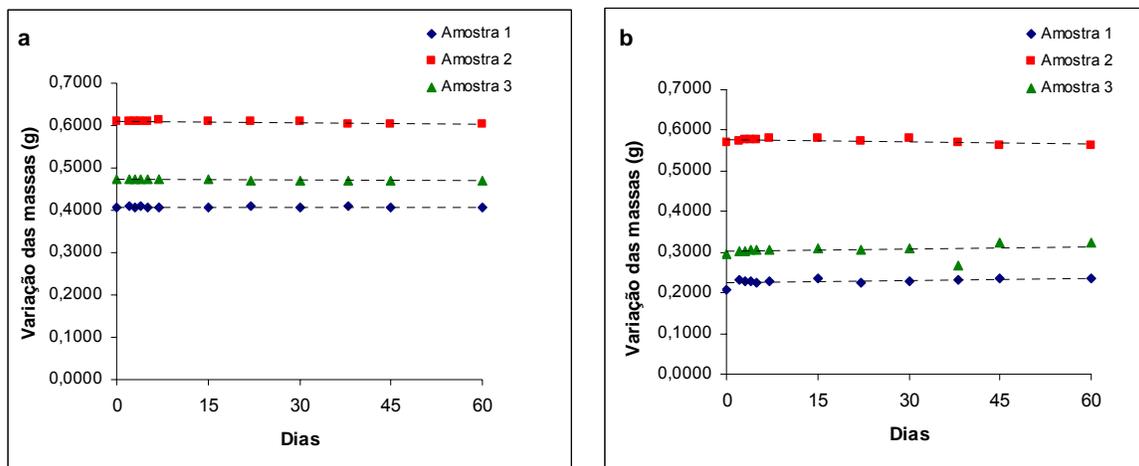


Figura 20. Variação das massas dos filmes de copolímero (4) em função do tempo: (a) em água e (b) em óleo.

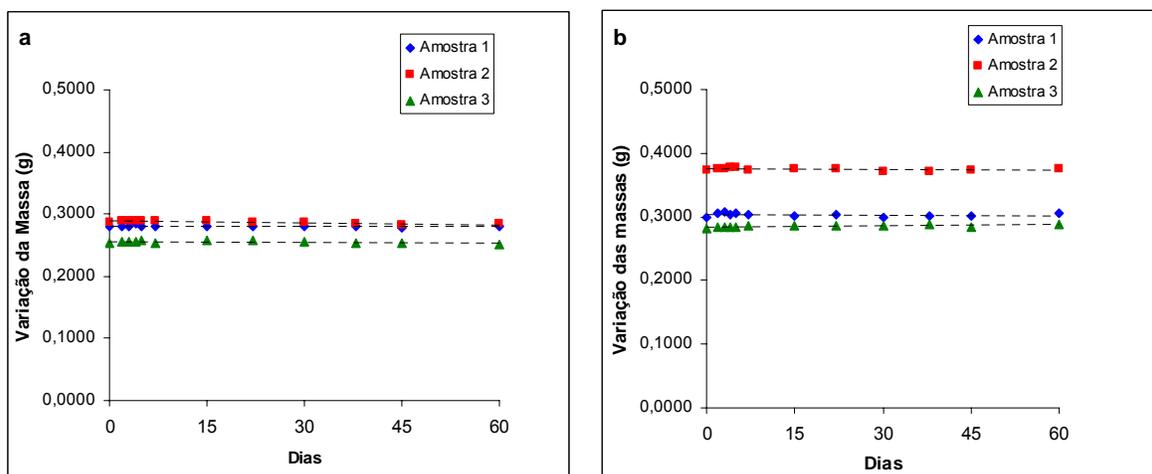


Figura 21. Variação das massas dos filmes de PMMA em função do tempo: (a) em água e (b) em óleo.

Os resultados demonstram que as massas de todas as amostras são constantes durante os 60 dias de armazenagem à temperatura ambiente. Os dados dos testes de inchamento podem servir para a escolha do sistema óleo-polímero para a preparação de nanocápsulas. No entanto, na escala nanoscópica não se tem sensibilidade para detectar as interações de superfície, polímero-água ou polímero-óleo. Por outro lado, em nível

nanoscópico a utilização do copolímero (4) mostrou-se eficaz para a detecção das interações intermoleculares na interface das nanocápsulas.

5.4.2.2 NC2, NC5 e NE2

O emprego da sonda (1) mostrou que a interação da água com a parede polimérica aumenta em função do tempo, e que a presença da discreta emissão normal no tempo zero é um indício de que a água está presente na parede polimérica logo após a preparação. Levando em conta esses resultados, foram preparados sistemas similares contendo a sonda (2). A benzazola (2) apresenta uma ligação de hidrogênio intramolecular menos intensa que na sonda (1),¹⁵ o que facilita a observação dos confôrmeros que decaem emitindo fluorescência normal. Portanto, pela presença dos diferentes confôrmeros da sonda (2) em equilíbrios conformacionais, respondendo ao ambiente, espera-se verificar a presença da água na parede polimérica logo após formulação. Vislumbra-se, também, verificar possíveis interações da parede polimérica com o óleo.

Para que se possa verificar a possibilidade das interações descritas, o comportamento das emissões de fluorescência da sonda (2) foi analisado.

Os espectros de emissão de fluorescência do polímero (5) e da sonda (2) dispersa em TGC (5×10^{-6} M) são mostrados na **Figura 22**.

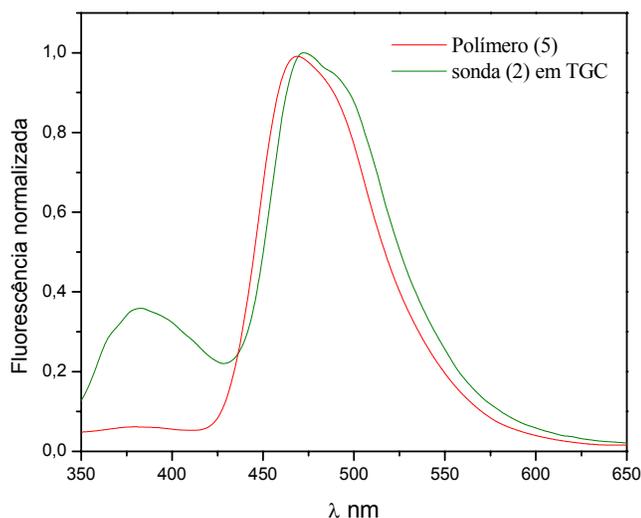


Figura 22. Espectros de emissão de fluorescência do polímero (5) e da sonda (2) em triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TGC).

Com a análise dos espectros, pode ser observado que a presença da emissão de fluorescência ESIPT, em torno de 470 nm (**Tabela 8**) é predominante, tanto no TGC quanto no polímero.

Tabela 8. Intensidades da emissão normal e ESIPT da sonda (2) no copolímero e no TGC.

Amostra	Intensidade da emissão normal	λ_{em}^{max} normal	Intensidade da emissão ESIPT	λ_{em}^{max} ESIPT
Copolímero	0,06	380	1	468
TGC	0,36	382	1	472

A presença da emissão normal da sonda (2) no óleo em comprimento de onda máximo em 382 nm demonstra que o equilíbrio conformacional está deslocado em relação ao que apresentava a sonda (1) no óleo. A análise do polímero mostra a emissão ESIPT e uma discreta emissão normal com comprimento de onda máximo em 380 nm. Considerando a natureza dos meios e levando em conta a semelhança dos espectros, a presença da emissão normal mais intensa da sonda no óleo é um indicativo de que este é um ambiente de maior polaridade do que o polímero puro.

O comportamento da sonda (2), demonstrada pelos espectros de fluorescência do polímero e da solução em TGC, componentes utilizados na formulação das nanopartículas, evidenciou características de ambientes de baixa polaridade para esses componentes. A **Figura 23** demonstra o comportamento da sonda na presença do meio aquoso. Devido à insolubilidade da sonda (2) em água o espectro de emissão de fluorescência foi realizado na presença do dimetilsulfóxido.

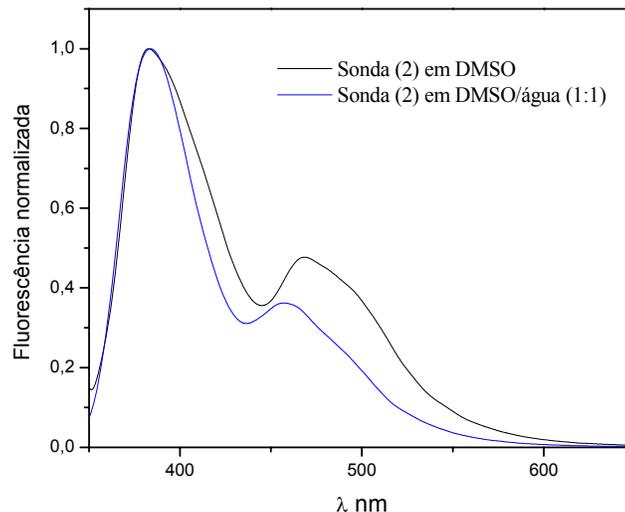


Figura 23. Espectros de emissão de fluorescência da sonda (2) em DMSO e DMSO e água (1:1). 5×10^{-6} M.

A análise dos espectros de emissão de fluorescência da sonda (2) nos meios polar e polar/prótico demonstra um comportamento oposto ao observado nos espectros de emissão nos meios apolares. A emissão de fluorescência ESIPT, predominante nos meios de menor polaridade, diminui e a emissão de fluorescência normal aumenta proporcionando uma inversão nos máximos de emissão de fluorescência. O espectro de emissão de fluorescência da sonda em DMSO apresentou uma emissão normal com um comprimento de onda máximo em 382 nm e uma emissão ESIPT menos intensa com um comprimento de onda máximo em 468 nm (**Tabela 9**).

A sonda em DMSO/água (1:1) apresentou uma emissão normal com um comprimento de onda máximo em 384 nm e uma diminuição e deslocamento da emissão ESIPT (12 nm) para menores comprimentos de onda, quando comparado com o DMSO, com um comprimento de onda máximo em 456 nm. Este comportamento apresentado pela sonda no DMSO/água (1:1), aumento e deslocamento da emissão normal para maiores comprimentos de onda e diminuição e deslocamento da emissão ESIPT para menores comprimentos é esperado e bastante relatado na literatura para benzazolas em presença de água.^{13,27,31-33} Na presença de solventes próticos e polares é comum a competição do solvente pela ligação de hidrogênio intramolecular da sonda da espécie E_1 no estado

excitado levando à ruptura da ligação de hidrogênio intramolecular e formação de espécies que emitem em menores comprimentos de onda.

Tabela 9. Intensidades e λ máximo das emissões em DMSO e DMSO/água (1:1)

Amostra	Intensidade da emissão normal	λ_{em}^{max} normal	Intensidade da emissão ESIPT	λ_{em}^{max} ESIPT
(2) em DMSO	1	382	0,47	468
(2) em DMSO e água (1:1)	1	384	0,35	456

Para avaliar-se o comportamento da sonda ligada quimicamente ao polímero, formulou-se NC5 e, paralelamente, preparou-se duas formulações nas quais a sonda (2) está fisicamente incorporada, NC2, na qual o PMMA foi empregado, NE2, disperso no TGC na qual o PMMA está ausente. O esquema das formulações NC2, NC5 e NE2 é mostrado na **Figura 24**. Os espectros de emissão de fluorescência das formulações NC2, NC5, NE2 são mostrados na **Figura 25**.

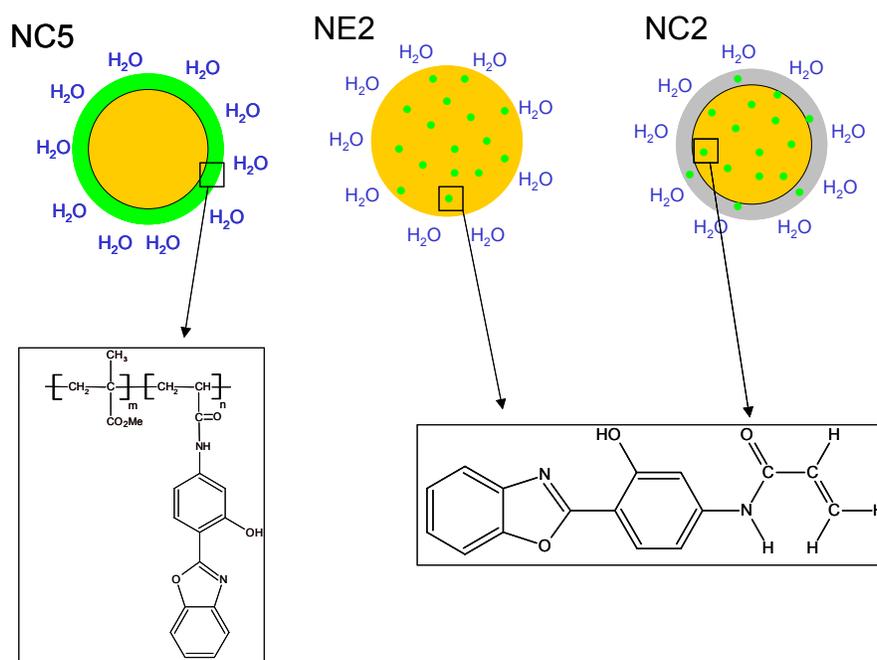


Figura 24. Esquema das formulações NC5, NE2 e NC2.

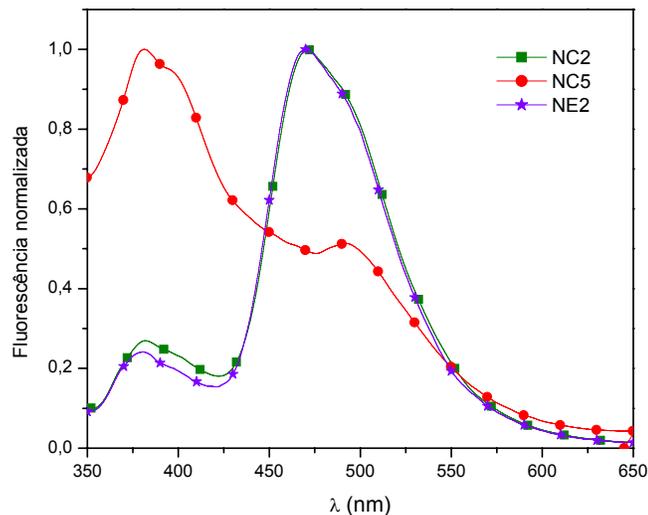


Figura 25. Espectro de emissão de fluorescência das formulações de nanopartículas. (5×10^{-6} M)

O espectro de emissão da NC2 apresentou um comportamento similar ao espectro da sonda (2) quando dispersa na NE2, corroborando com os resultados obtidos para NC1. No espectro da NC2 foi observado duas bandas principais com comprimento de onda máximo de emissão em 382 nm (**Tabela 10**), correspondente à emissão normal, e outro em 472 nm, relativo à emissão ESIPT. NE2 apresentou um espectro de fluorescência com um máximo da emissão normal em 381 nm e um máximo da emissão ESIPT em 471 nm.

Tabela 10. Intensidades e λ máximo das emissões das formulações de nanocápsulas e nanoemulsão.

Amostra	Intensidade da emissão normal	λ_{em}^{max} normal	Intensidade da emissão ESIPT	λ_{em}^{max} ESIPT
NC2	0,26	382	1	472
NC5	1	380	0,51	491
NE2	0,24	381	1	471

Os resultados das emissões de fluorescência em NC2 e NE2 (**Tabela 10**) demonstram a similaridade dos ambientes e indicam que a sonda encontra-se em ambiente de baixa polaridade. No entanto, a inversão dos máximos de emissão no espectro de fluorescência da formulação NC5, indica que a sonda ligada quimicamente ao polímero está exposta a um ambiente diferente que o da sonda (2) dispersa em NC2 e NE2.

O resultado apresentado para a emissão de fluorescência em NC5 demonstra um comportamento diferenciado dos demais sistemas nanoparticulados e característico de ambientes polares (**Figura 23**). O comportamento diferenciado apresentado por NC5 também foi evidenciado para NC4 em presença de água, mas em menor proporção. Quanto às características espectrais de NC5, pode ser observado uma inversão dos máximos de emissão nas bandas normal e ESIPT, com aumento da banda originária da emissão normal (máximo em 378 nm) e diminuição e deslocamento da banda responsável pela emissão ESIPT (491 nm).

O experimento realizado com a sonda (2) dispersa em DMSO e DMSO/água, meio polar e polar-prótico (**Figura 23**), para demonstrar o comportamento da sonda em relação a meios aquosos e estabelecer uma comparação com o comportamento de NC5, revela que os comprimentos de onda máximos dos espectros de emissão de fluorescência das emissões ESIPT em NC5 apresentam-se deslocados em relação aos valores no DMSO e DMSO/água (**Tabelas 10 e 9**). NC5 apresenta um deslocamento batocrômico do máximo da emissão ESIPT de 23 nm, quando comparado com a sonda dispersa em DMSO, e 35 nm quando dispersa em DMSO/água (1:1), enquanto que a emissão normal manteve-se próxima a 380 nm para todos os sistemas (**Tabela 9 e 10**). O aumento da emissão normal para NC5 (**Tabela 10**) e a diminuição na intensidade da emissão de fluorescência ESIPT são contribuições decorrentes da presença da água na parede polimérica das nanocápsulas. No entanto, a manutenção da intensidade da emissão ESIPT, principalmente quando comparados com os ambientes polares apróticos e próticos (**Tabela 9**), e principalmente o deslocamento batocrômico observado na emissão de fluorescência ESIPT para NC5, são resultados típicos de interações com ambientes de menor polaridade. Estes indicativos na emissão de fluorescência ESIPT sugerem que a parede polimérica está sujeita ao ambiente do polímero e do óleo, ambos de baixa polaridade.

5.4.2.2.1 MODELO DE PAREDE POLIMÉRICA

Considerando os resultados de fluorescência em NC5, que indicam que a parede polimérica está exposta a ambientes de polaridade oposta, um modelo de parede polimérica pode ser proposto. Desta forma, o modelo proposto é um modelo de parede polimérica sendo uma interface composta por óleo, polímero e água (**Figura 26**). O modelo teórico considera que o polímero é insolúvel em óleo e em água (**Figura 26 a**), no entanto o presente estudo indica que o melhor modelo é considerar a interface óleo-polímero-água como uma das pseudofases do sistema (**Figura 26 b**).

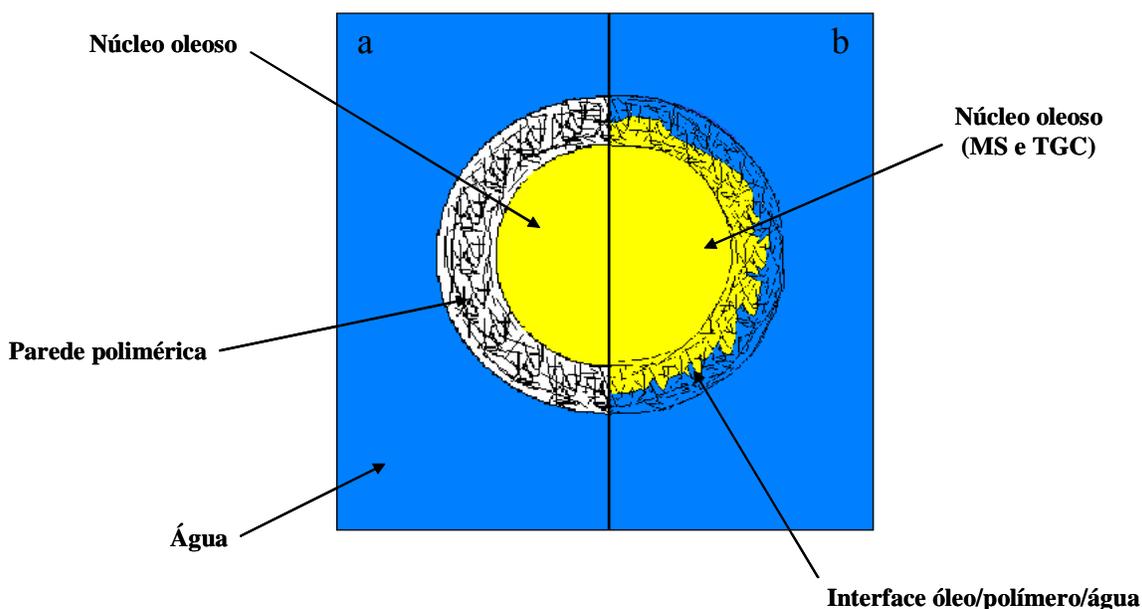


Figura 26. Esquema de modelos em nível molecular de uma nanocápsula: (a) conceito teórico de nanocápsulas (b) modelo proposto.

5.4.2.3 NC3 e NC6

Mayer e colaboradores⁵⁵ e Pohlmann e colaboradores⁶¹ comprovaram que a parede polimérica de NC é permeável ao etanol. O experimento foi repetido para a formulação de nanocápsulas NC6, **Figura 27**.

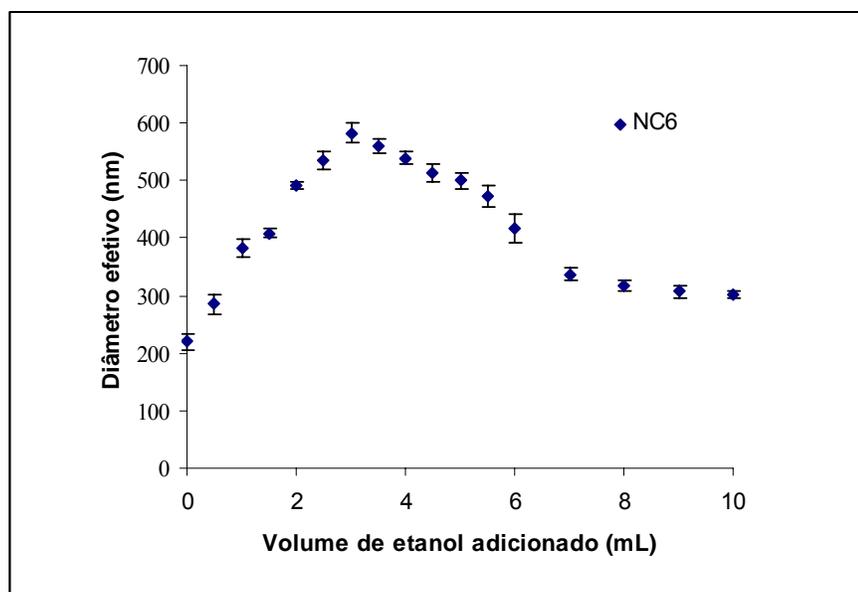


Figura 27. Variação do diâmetro efetivo com a adição de etanol.

Pode-se observar, através das adições consecutivas de 0,5 mL de etanol, um aumento no diâmetro efetivo de NC6, de 220 ± 15 nm para 570 ± 17 nm, após adição de 3,0 mL de etanol, seguido de um decréscimo até 301 ± 7 nm. O aumento ocorrido é explicado pela difusão do etanol através de parede polimérica da nanocápsula, enquanto que diminuição está relacionado com a difusão do etanol da fase interna para a fase externa. Quando temos a mesma concentração de etanol dentro e fora da nanocápsula (± 5 mL, **Figura 27**), com uma proporção de etanol e água 1:1 (v/v), a fase interna pode difundir para o meio externo ocasionando a diminuição do tamanho da nanocápsula em cada adição de solvente, devido a afinidade da fase interna pelo solvente.

Com o intuito de verificar se as análises por fluorescência corroborariam com os resultados anteriores, a sonda (3) foi dispersa em NC3 e ligada covalentemente em NC6. A sonda (3) possui um comportamento diferenciado na presença do etanol,¹⁵ apresentando

uma emissão ESIPT considerável (**Figura 28**) quando comparado à sonda nas nanopartículas.

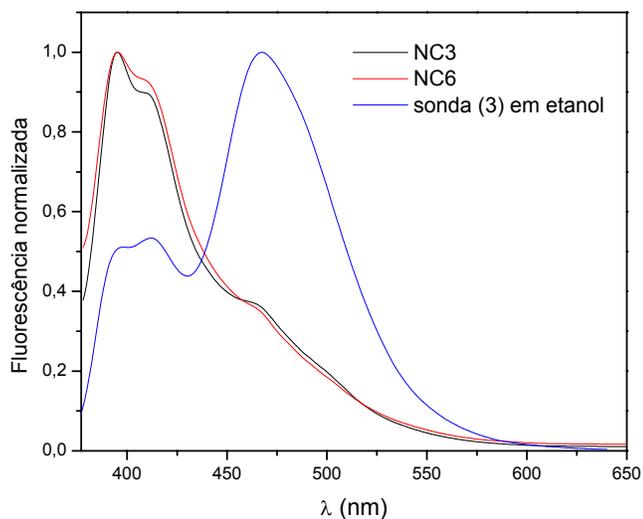


Figura 28. Espectros de emissão de fluorescência das formulações NC3, NC6 e da sonda (3) disperso em etanol (10^{-6} M).

O experimento consiste na adição de quantidades crescentes de etanol às formulações de nanocápsulas NC3 e NC6, mantendo o volume final constante de 1 mL (**Figura 29**).

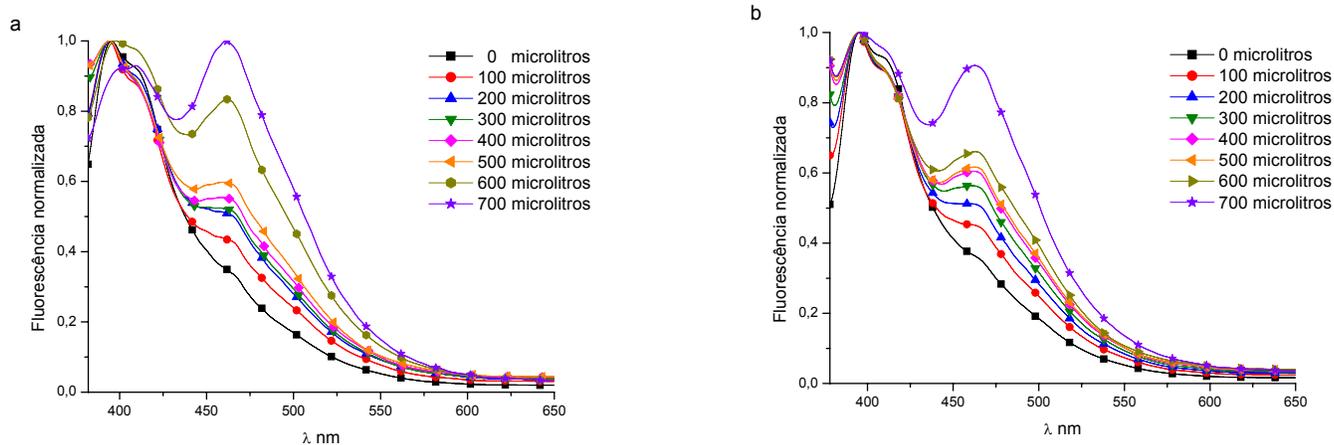


Figura 29. Espectros de emissão de fluorescência das nanocápsulas após adição de cada alíquota de 100 μ L de etanol (a: NC3; b: NC6) $\lambda_{ex} = 360$ nm.

O aumento da emissão ESIPT em 470 nm para ambos os sistemas (**Figura 29**) demonstra a mudança de ambiente das sondas. Observa-se pelos espectros que sua interação é diferenciada. Na NC3 (**Figura 29 a**) é observado que após a adição de 500 μL de etanol ocorrem mudanças nos espectro de emissão de fluorescência, normal e ESIPT, que se intensificam com as adições subseqüentes. Por outro lado nos espectros da NC6, para a mesma diluição, as emissões, principalmente a normal, não se alteram significativamente. A diferença de comportamento se deve ao fato de que na NC3 a sonda encontra-se dispersa na nanocápsula podendo facilmente difundir para o etanol, adquirindo nova conformação exigida pela sua presença no meio (**Figura 30**). Por outro lado, a sonda ligada covalentemente na NC6, apesar de demonstrar a presença do etanol na parede pelo aumento da emissão ESIPT, essa apresenta dificuldade para interagir com o novo ambiente (menor grau de liberdade), tendo em vista a indiferença apresentada pela emissão normal em relação ao espectro de NC3. Este fato demonstra que a parede polimérica continua estruturada, enquanto o etanol é adicionado e mostra que esse solvente permeia pelas pseudo fases do sistema através do polímero na interface, concordando com os estudos já realizados anteriormente. Para diluições superiores a 700 μL , ambos sistemas apresentaram a presença de precipitado indicando a desestruturação das nanocápsulas, comportamento observado também através das emissões de fluorescência (**Figura 30**).

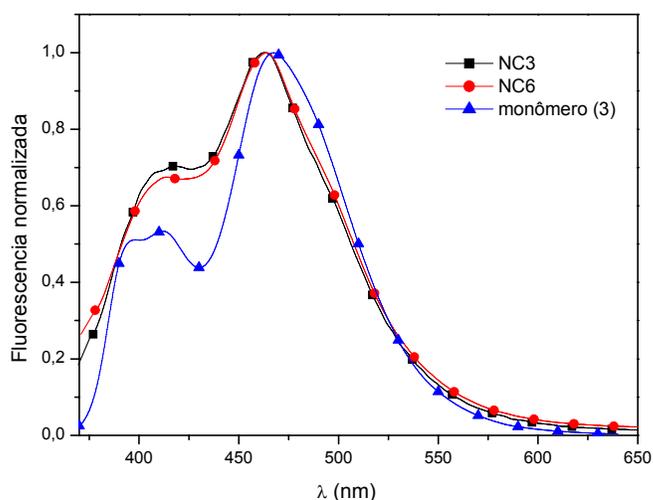


Figura 30. Espectros de emissão de fluorescência da sonda (3) em etanol e das nanopartículas após adição de 800 μL de etanol. ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$).

6. CONCLUSÃO

Apesar dos estudos de inchamento durante 60 dias não apresentarem sensibilidade para demonstrar a interação do polímero com a água e o óleo, os resultados de emissão de fluorescência apresentados por ambas as sondas, (1) e (2), ligadas covalentemente à parede polimérica de PMMA nas nanocápsulas, NC4 e NC5 demonstraram que estes encontram-se sob influência tanto da água quanto do núcleo oleoso. Além disso, os dados obtidos com estudos de estabilidade para NC1 e NC4 indicam que para esses sistemas por um período de análise de 60 dias, a parede polimérica das nanocápsulas estaria sendo inchada pela água. A emissão ESIPT diminui após os 60 dias, não se extinguindo o que pode indicar que parte do corante mantém-se solvatada pelo óleo. Estes resultados indicam que as propriedades do filme macroscópico não estão correlacionadas com suas propriedades nanoscópicas, para um mesmo período de observação (60 dias). Desta forma, os dados dos testes de inchamento podem servir para a escolha de um sistema polímero-óleo que irá compor a nanocápsula, mas não fornecerão informação quanto as interações desses componentes em nível molecular.

O modelo proposto para as nanocápsulas estudadas, considerando os resultados desse trabalho, seria um núcleo lipofílico, revestido por uma parede polimérica, que interage com ambos os ambientes, núcleo e água (fase contínua).

Finalmente, os resultados do estudo de adição de etanol às suspensões de NC (NC3 e NC6) mostraram que o filme polimérico é permeável ao etanol, corroborando com estudos anteriores do grupo e independentes.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Couvreur, P.; Dubernet, C.; Puisieux, F. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1995**, *41*, 2.
2. Couvreur, P.; Barratt, G.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C. *Critic. Rev. Drug Carriè Syst.* **2002**, *19*, 99.
3. Schaffazick, S.R.; Guterres, S.S.; De Luca Freitas, L.; Pohlmann, A.R. *Quím. Nova.* **2003**, *26*, 726.
4. Guterres, S.S.; Weiss, V.; De Lucca Freitas, L.; Pohlmann, A.R. *Drug Delivery* **2000**, *7*, 199.
5. Pohlmann, A.R.; Weiss, V.; Mertins, O.; Pesce da Silveira, N.; Guterres, S.S. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, *16*, 305.
6. Muller, C.R., Schaffazick, S.R., Pohlmann, A.R., Dalla Costa, T.; Pesce da Silveira, N.; De Luca Freitas, L.; Guterres, S.S. *Pharmazie* **2001**, *56*, 864.
7. Soares, L.U. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ-UFRGS, Porto Alegre, Brasil **2003**.
8. Sarkar, N.; Das, K.; Das, S.; Datta, A.; Nath, D.; Bhattacharyya, K. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17714.; Douhal, A.; Amat-Guerri, F.; Lillo, M.P.; Acuña, A.U. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem* **1994**, *78*, 127.
9. Missirlis, D.; Tirelli, N.; Hubbell, J.A. *Langmuir* **2005**, *21*, 2605.
10. Formosinho, S.J.; Arnaut, L.G. *Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1993**, *75*, 21
11. Mikin, V.I.; Gamovskii, A.D.; Elguero, J.; Ktritzky, A.R.; Denisko, O.V. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2000**, *76*, 157.
12. Nagaoka, S.; Itoh, A.; Mukai, K. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 11385.
13. Das, K.; Sarkar, N.; Gosh, A., K.; Majumdar, D.; Nath, D., N.; Bhattacharyya, K. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 9126.
14. Barni, E.; Savarino, P.; Marzona, M.; Piva, M. *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, *20*, 1517.
15. L. F. Campo, D. S. Corrêa, M. A. de Araújo, V. Stefani. *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 832.; Campo, L. F. Dissertação de Mestrado. PPGQ-UFRGS, Porto Alegre, Brasil **1999**.
16. Rodembusch, F. S.; Leusin, F. P.; Bordignon, L. B.; Gallas, M. R.; Stefani, V. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2005**, *173*, 81.

17. Cundall, R. B.; Gilbert, A. *Photochemistry*; Nelson: London, 1970.
18. Wayne R. P. *Photochemistry*; Camelot Press: London, 1970.
19. Slavik, J. *Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology*; CRC Press: London, 1994.
20. Williams, D.L.; Heller, A. *J. Phys. Chem.* **1970**, 74, 4473.
21. Acuña, A.U.; Costela, A.; Muños, J.M. *J. Phys. Chem.* **1986**, 90, 2807.
22. Domingues Jr., N.S.; Krug, C.; Livotto, P.R.; Stefani, V. *J. Soc. Perkin Trans. II* **1997**, 9, 1861.
23. Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1993**, 75, 1.
24. Krasovitskii, B.M.; Bolotin, B.M. *Organic Luminescent Materials*. VCH: Weinheim, 1998, p88.
25. Nagaoka, S.; Itoh, A.; Mukai, K. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 11385.
26. Dogra, S. K.; Balamurali, M.M. *J. Photochem. A: Chem.* **2002**, 154, 81.
27. Klymchenko, A.S.; Pivovarenko, V.G.; Demchenko, A.P. *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 4211.
28. Santra, S.; Dogra, S.K. *Chem. Phys.* **1998**, 226, 285.
29. Purkayastha, P.; Chattopadhyay, N. *Int. J. Mol. Sci.* **2003**, 4, 335.
30. Sinha, H.K.; Dogra, S.K. *Chem. Phys.* **1986**, 102, 337.
31. Mosqueira, J.; Penedo, J.C.; Rodrigues, M.C.R.; Rodríguez-Prieto, F. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 5398.
32. Das, K.; Srkar, N.; Majumdar, D.; Bhattacharyya, K. *Chem. Phys. Lett.* **1992**, 198, 443.
33. Roberts, E.L.; Dey, J.; Warner, I.M. *J. Phys. Chem A* **1997**, 101, 5296.
34. Grabchev, I.; Bojinov, V. *Polym Degrad Stab.* **2000**, 70, 147.; Bayrakçeken F. *Spectrochi. Acta Part A.* **2004**, 60, 3033.
35. Schulze, J.S.; Moon, B.; Lodge, T.P.; Macosko, C.W. *Macromolecules* **2001**, 34, 200.
36. Duarte, F. J.; Taylor, T. S.; Costela, A.; García-Moreno, I.; Sastre, R. *Appl. Opt.* **1998**, 37, 18.
37. Lee, J.; Hwang, D.; Hwang, J.; Jung, H.; Zyung, T.; Park, S., Y. *Synth. Met.* **2000**, 111, 489.
38. Pan, F.; Wang, ; Lee, K.; Wu, A.; Turro, N. J.; Koberstein, J. T. *Langmuir* **2005**, 21, 3605.

39. Wang, X.Y.; Lee, S.H.; Ku, B.C.; Samuelson, L. A.; Kumar, J. *J. Macrom. Scienc. Appl. Chem.* **2002**, 10, 1241.; Hu, H.; Larson, R.G. *Langmuir* **2004**, 20, 7436.
40. Kim, I.S.; Kim, S. *Int. J. Pharm.* **2002**, 245, 67.(b) Kim, I.; Kim, S. *Int. J. Pharm.* **2003**, 257, 195.
41. Bosma, G.; Pathmamanoharan, C.; Hoog, E.H.A.; Kegel, W. K.; Blaaderen, A.; Lekkerkerker, H.N.W. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, 245, 292.; Saxena, V.; Sadoqi, M.; Shao, J. *Int. J. Pharm.* **2004**, 278, 293.
42. Eley , J. G; Pujari, V. D.; McLane, J. *J. Drug Delivery* **2004**, 11, 255; Vargasa, A.; Pegazb, B.; Debefveb, E.; Konan-Kouakoub, Y. . *Int. J. Pharm.* **2004**, 286, 131–145.
43. Magenheim, B.; Benita, S. *S. T. P. Pharma Sci.* **1991**, 1(4), 221.
44. Chu, B.; Liu, T. *J. Nanopart. Res.* **2000**, 2, 29.
45. Legrand, P.; Barratt, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J-Ph. *S. T. P. Pharma Sci.* **1999**, 9, 414.
46. Lopes, E.; Pohlmann, A.R.; Basani, V.; Guterres, S.S. *Pharmazie* **2000**, 55, 527.
47. El-Samaligy, M.S.; Rohdewald, P.; Mahmoud, H.A. *J. Pharm. and Pharmacol.* **1986**, 38, 216.
48. Rollot, J.M.; Couvreur, P.; Roblot-Treupel, L.; Puisieux, F. *J. Pharm. Sci.* **1986**, 74, 361.
49. Al khouri, N.; Roblot-Treupel, L.; Fessi, H; Devissaguet, J-Ph.; Puisieux, F. *Int. J. Pharm.* **1986**, 28, 125.
50. Guinebretiére, S.; Brianon, S.; Fessi, H.; Teodorescu, V.S.; Blanchin, M. G. *Mat. Sci. Engin. C* **2002**, 21, 137.
51. Losa, C.; Marchal-Hesseler, L.; Orallo, F.; Vila Jato, J. L.; Alonso, M. J. *Pharm. Res.* **1993**, 10, 80.
52. Calvo, P.; Vila-Jato, J.L.; Alonso, M.J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85, 530.
53. Mosqueira, V.C.F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barrat, G. *J. Pharm. Sci.* **2000**, 89, 614.
54. Pohlmann, A.R.; Weiss, V., Mertins, O.; Pesce da Silveira, N.; Guterres, S. S. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, 6, 305.
55. Mayer, C.; hoffman, D.; Wohlgemuth, M. *Int. J. Pharm.* **2002**, 242, 37.

56. Cauchetier, E.; Denieau, M.; Fessi, H.; Astier, A.; Paul, M. *Int. J. Pharm.* **2003**, 250, 273.
57. Kang, S. I.; Na, K.; Bae, Y. H. *Col. Surf. A* **2003**, 231, 103.
58. Lo, C.L.; Lin, K.M.; Hsiue, G.H. *J. Contr. Rel.* **2005**, 104, 477.
59. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-Ph.; Ammoury, N.; Benita, S. *Int. J. Pharm.* **1989**, 55, r1.
60. Tucker, S.A.; Amszi, V.L.; Acree, W.E.J. *J. Chem. Edu.* **1992**, 69, A11.
61. Pohlmann, A.R.; Soares, L.U.; Cruz, L.; Da Silveira, N.P.; Guterres, S. S. *Current Drug Delivery* **2004**, 1, 103.
62. Mukherjee, T.K.; Panda, D.; Datta, A. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 18895.
63. Rodríguez, M.C.R.; Penedo, J.C.; Willemse, R.J.; Mosquera, M.; Prieto, F.R. *J. Phys. Chem. A* **1999**, 103, 7236.
64. Rabinovich-Guilatt, L.; Couvreur, P.; Lambert, G.; Goldstein, D.; Benita, S.; Dubernet, C. *Chem. Phys. Lipids* **2004**, 131,1.

8. ANEXOS

Valores e variação das massas dos filmes de copolímero
(4) em função do tempo em água e em óleo.

	Dias	Massa 1 (g)	Masa 2 (g)	Massa 3 (g)
Á G U A	0	0,4066	0,6091	0,4734
	2	0,4090	0,6116	0,4741
	3	0,4080	0,6109	0,4740
	4	0,4085	0,6115	0,4738
	5	0,4078	0,6111	0,4737
	7	0,4070	0,6120	0,4740
	15	0,4083	0,6094	0,4737
	22	0,4100	0,6087	0,4709
	30	0,4075	0,6087	0,4709
	38	0,4094	0,6041	0,4700
45	0,4066	0,6050	0,4690	
60	0,4062	0,6047	0,4699	
Ó L E O	0	0,2069	0,5716	0,2970
	2	0,2324	0,5745	0,3012
	3	0,2302	0,5753	0,3022
	4	0,2287	0,5761	0,3062
	5	0,2241	0,5785	0,3058
	7	0,2270	0,5790	0,3070
	15	0,2365	0,5803	0,3085
	22	0,2264	0,5745	0,3070
	30	0,2302	0,5792	0,3100
	38	0,2330	0,5683	0,2688
45	0,2344	0,5640	0,3220	
60	0,2350	0,5645	0,3230	

Valores e variação das massas dos filmes de PMMA em função do tempo em água e em óleo.

	Dias	Massa 1 (g)	Masa 2 (g)	Massa 3 (g)	
Á G U A	0	0,2800	0,2871	0,2534	
	2	0,2809	0,2885	0,2560	
	3	0,2803	0,2882	0,2556	
	4	0,2839	0,2883	0,2549	
	5	0,2812	0,2885	0,2579	
	7	0,2810	0,2890	0,2541	
	15	0,2801	0,2887	0,2582	
	22	0,2798	0,2866	0,2571	
	30	0,2805	0,2871	0,2565	
	38	0,2800	0,2850	0,2540	
	45	0,2787	0,2832	0,2527	
	60	0,2801	0,2843	0,2520	
	Ó L E O	0	0,3001	0,3734	0,2809
		2	0,3065	0,3760	0,2840
		3	0,3070	0,3753	0,2832
4		0,3030	0,3770	0,2837	
5		0,3057	0,3769	0,2836	
7		0,3032	0,3730	0,2860	
15		0,3010	0,3747	0,2870	
22		0,3029	0,3749	0,2870	
30		0,3001	0,3722	0,2868	
38		0,3010	0,3719	0,2880	
45		0,3015	0,3728	0,2847	
60		0,3056	0,3756	0,2872	