

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	polissorbatato 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}

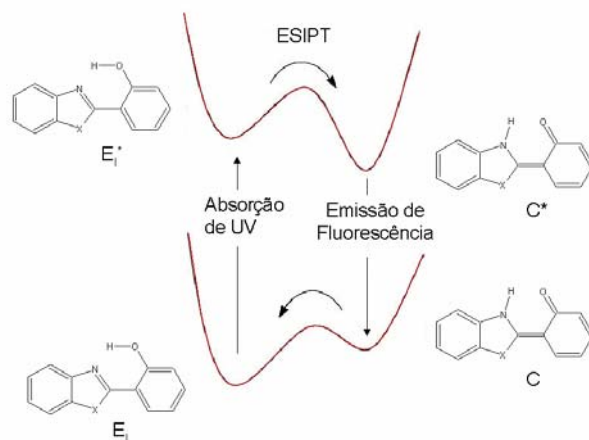


Figura 1. Mecanismo de ESIPT ($x = O, S$ e NH).

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 conformeros 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 conformeros enol-*cis* aberto (E_{II}), (**Figura 2**), enol-*trans* (E_{III}) e enol-*trans* aberto (E_{IV}) para as benzimidazolas. Estes conformeros 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 conformeros também possam estar presentes, prevalece a formação do conformero enol-*cis* (E_I), o qual é responsável pela emissão ESIPT a maiores comprimentos de onda.¹⁶

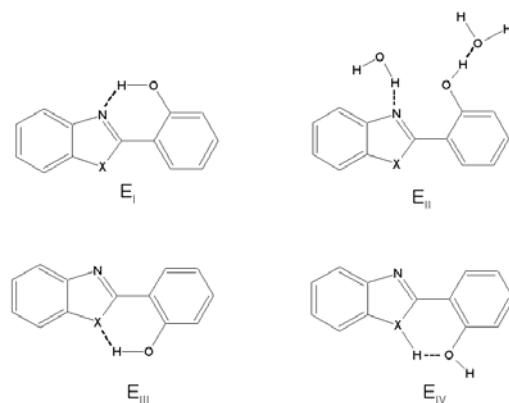


Figura 2. Diferentes conformeros estabilizados em solução.

Através de testes de inchamento/dissolução de polímeros foi demonstrado que nanocarreadores preparados com poli(ácido láctico) 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.

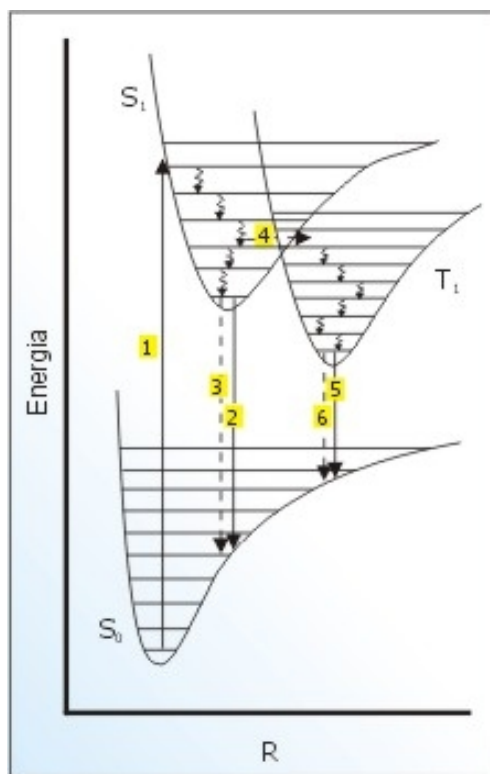


Figura 3. Diagrama hipotético mostrando um esquema de curvas de energia potencial para estados eletrônicos fundamental (S₀) e excitados singlete (S₁) e triplete (T₁), e os eventos radiativos e não radiativos que podem ocorrer: 1. Absorção de radiação (S₀ → S₁), 2. Emissão de fluorescência (S₁ → S₀),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

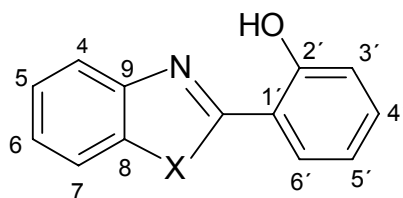


Figura 4. Estrutura dos 2-(2'-hidroxifenil)benzazóis.

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**).

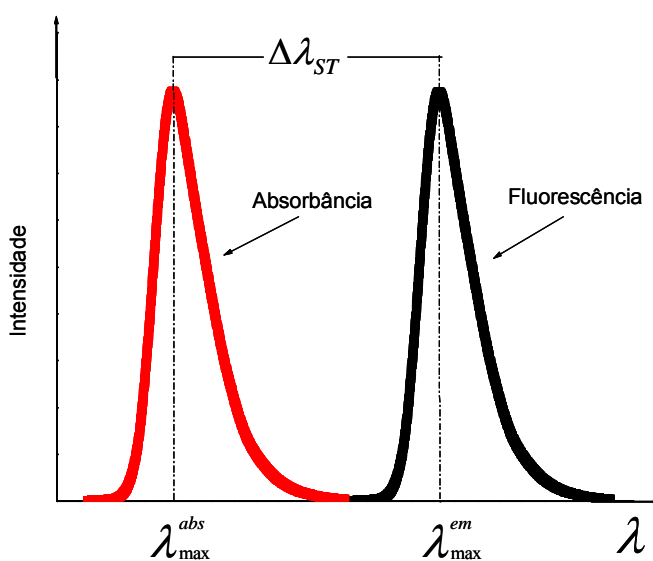


Figura 5. Deslocamento de Stokes ($\Delta\lambda_{ST}$).

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 μm).^{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 láctico) (PLA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) ou poli(ácido láctico-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.

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.; Debeveb, 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	