



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA-FAENQUIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA- PPG -EQ

Título da Dissertação

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE
POLIMERIZAÇÃO RADICAL LIVRE CONVENCIONAL E
RADICAL LIVRE “VIVA” VIA RAFT PARA PRODUÇÃO DE
POLI(DIMETILAMINOETILMETACRILATO) – PDMAEMA**

ADRIANA GARCIA

Lorena – SP - Brasil

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE
POLIMERIZAÇÃO RADICAL LIVRE CONVENCIONAL E
RADICAL LIVRE "VIVA" VIA RAFT PARA PRODUÇÃO DE
POLI(DIMETILAMINOETILMET ACRILA TO) - PDMAEMA**

Dissertação de Mestrado apresentada
como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Engenharia
Química.

Banca Examinadora:

Prat. Dr. Pedro Cartos de Oliveira
(Presidente) Prof. Dr. Carlos Henrique
Schurachhio

Prat. Dr. Domingos Sávio Giordani

Estudante:

Adriana Garcia

Lorena - SP

2005

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Universitária - FAENQUIL

Garcia, Adriana

G165e Estudo comparativo entre as técnicas de polimerização radical livre convencional e radical livre “viva” via raft para produção de poli(dimetilaminoetilmetacrilato) - PDMAEMA / Adriana Garcia. Lorena, 2005.

77f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Departamento de Engenharia Química.

Orientador: Amilton Martins dos Santos

Co-orientador: Pedro Carlos de Oliveira

1. Polimerização. 2. Dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEMA). 3. RAFT. 4. Transferência de cadeia. 5. Terapia Gênica. I. Santos, Amilton Martins dos, orient. II. Oliveira, Pedro Carlos de, co-orient. III. Título.

CDU: 678.7

À minha querida família dedico, esse primeiro passo da minha vida profissional. Em especial a minha mãe Célia e ao meu pai Haroldo, os quais merecem essa vitória mais do que eu. Seria impossível retribuir todo o esforço dos meus pais, mesmo que eu carregasse o meu pai no meu ombro direito e a minha mãe no meu ombro esquerdo.

E ao meu amado noivo Adriano que tanto me ajudou, só ele sabe quantas lágrimas rolaram no meu rosto e sempre com muito amor e paciência me ajudou para o término dessa dissertação.

Agradecimentos

À Deus e ao meu anjo da guarda pelo amparo e proteção.

Ao Prof. Dr. Amilton pela orientação desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro por ser meu amigo antes de ser meu co-orientador.

Ao Prof. Dr. Domingos Sávio Giordani pelo apoio durante todo o trabalho.

À minha amiga Giza, que sempre me ajudou nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos que conviveram comigo e me ajudaram neste trabalho.

Ao meu amigo Sérgio que me ajudou com otimismo e muita paciência nos momentos mais difíceis dessa dissertação.

Ao prof. Dr. Biaggio por ter me ajudado com muita atenção e dedicação.

À prof. Dr^a. Jayne pelas análises de FTIR e RMN ¹H.

Ao Marcelo da FMUSP pelas análises de TEM

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Abreviações

A_0	Área do deslocamento do próton da dupla ligação no tempo zero
AA	Ácido acrílico
AIBN	Azo-bis-isobutironitrila
AIDS	Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida
A_t	Área de deslocamento do próton da dupla ligação num tempo conhecido
ATRP	Polimerização por Transferência Reversível de Átomo
BA	Acrilato de Butila
BMA	Metacrilato de Butila
CDI	Carbonildiimidazole
CPDB	2,2'-cianopropilditiobenzoato
CTA_c	Agente de transferência de cadeia convencional
CTA_{RAFT}	Agente de transferência de cadeia (mecanismo RAFT)
DCC	N,N diciclohexila carbodiimida
DEAE	Dextrano
DMA	N,N-dimetilacrilamida
DMAEMA	Dimetilaminoetilmetacrilato
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
EAAm	Etilacriamida
EtOAc	Acetato de Etila
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
H_{PI}	Número de prótons do padrão interno
IP	Índice de Polidispersidade
K_d	Coefficiente de dissociação do indicador
$K_{f,cta}$	Coefficiente de transferência por meio do agente de transferência de cadeia
$K_{f,m}$	Coefficiente de transferência por meio da molécula do monômero

$K_{f,rp}$	Coeficiente de transferência por meio do radical polimérico
$K_{f,s}$	Coeficiente de transferência por meio da molécula do solvente
K_p	Coeficiente de propagação
K_{pi}	Coeficiente de propagação do iniciador
K_{ta}	Coeficiente de terminação por acoplamento ou combinação
K_{td}	Coeficiente de terminação por desproporcionamento
MMA	Metacrilato de Metila
MM_{CTA}	Massa molar do CTA
MM_M	Massa molar do monômero
M_n	Massa molecular teórica
NIPAAm	N-isopropilacrilamida
N_M	Número de moles do monômero
N_{PI}	Número de moles do padrão interno
NVP	N-vinilpirrolidona
PAA	Poli-Ácido Acrílico
PAMAM	Poli-amidoamina
PBA	Poli-acrilato de butila
PDMAEMA	Poli-dimetilaminoetilmetacrilato
PDMAEMA-b-	Copolímero em bloco de poli(dimetiaminoetilmetacrilato) e
PBMA	poli(butilmetacrilato)
PDMAEMA-b-	Copolímero em bloco de poli(butilmetacrilato) e poli(etilenoglicol)
PEG	
PDMAEMA-b-	Copolímero em bloco de poli(dimetiaminoetilmetacrilato) e poli-3-
PHBV	hidroxibutirato-co-3-hidroxicvalerato
PDMAEMA-b-	Copolímero em bloco de poli(dimetiaminoetilmetacrilato) e poli-6-[4-
PPHM	fenilazo]fenoxiexilmetacrilato
PDMAEMA-b-PS	Copolímero em bloco de poli(dimetiaminoetilmetacrilato) e poli(estireno)
PEG	Poli-etilenoglicol
PEI	Poli-etilenimida
PHA's	Poli-hidroxiclcanoatos
PHB	Poli-3-hidroxibutirato

PHBV	Poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato
PMMA	Poli-metacrilato de metila
PNIPAAm	Poli-isopropilacrilamida
PPHM	Poli-6-[4-fenilazo]fenoxiexilmetacrilato
PSTy	Poli-estireno
RAFT	Transferência, fragmentação e adição reversíveis
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
SRP	Polimerização por Radical Estável
STy	Estireno
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TG	Terapia Gênica
THF	Tetrahidrofurano
triEGMA	Etoxitrietilenoglicolmetacrilato
TS	Teor de sólidos em um determinado tempo de reação
TS _{máx}	Teor de sólidos máximo

ÍNDICE GERAL

Índice de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	vi
RESUMO	vii
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1- Micro/nanoencapsulação na Indústria Farmacêutica	2
2.1.1- Liberação controlada de princípios ativos	3
2.1.2- Polihidroxicanoatos (PHAs)	7
<i>Aplicações dos PHAs em liberação controlada</i>	9
2.1.3- Terapia Gênica	10
<i>Vetores virais</i>	11
<i>Vetores não-virais</i>	11
<i>Métodos Físicos</i>	12
<i>Métodos Químicos</i>	13
2.2- Polimerização via radical livre convencional	20
2.3- Polimerização via radical livre “viva”	23
3- OBJETIVOS	29
3.1- Objetivo geral	29
3.2- Objetivos específicos	29
4- MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1- Materiais	30
4.2- Métodos	31
4.2.1- Purificação do monômero	31
4.2.2- Purificação de 2,2' azo-bis-isobutironitrila (AIBN)	31
4.2.3- Secagem do 1,4-Dioxano	32
4.2.4- Síntese do ácido 4-ciano-4-tiobenzoilsulfanilpentanóico-CTA ₃	32
<i>Secagem do THF</i>	32

<i>Síntese do agente de Grignard</i>	32
<i>Síntese do CTA₃</i>	33
<i>Purificação do CTA₃</i>	34
<i>Separação do CTA₃ utilizando coluna cromatográfica</i>	34
4.2.5- Síntese do PDMAEMA funcionalizado via radical livre convencional	35
4.2.6- Síntese do pDMAEMA funcionalizado via radical livre “viva”	37
<i>Cálculo da Massa Molar Teórica</i>	39
<i>Determinação da massa de padrão interno</i>	39
<i>Metodologia de estudo da Cinética de reação por RMN ¹H</i>	40
4.2.7- Purificação do PDMAEMA	41
4.2.8- Síntese dos copolímeros em bloco do PDMAEMAcóPHBV.	41
4.2.9- Miscelização dos copolímeros em bloco do PDMAEMAcóPHBV.	41
4.2.10- Caracterização do PDMAEMA	42
<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H)</i>	42
<i>Comatografia de Permeação em Gel (GPC)</i>	42
<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)</i>	42
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1- Síntese do PDMAEMA funcionalizado via radical livre convencional	44
5.2- Síntese do PDMAEMA funcionalizado via radical livre “viva”	51
5.2.1- Caracterização do PDMAEMA sintetizado via RAFT pela técnica de RMN ¹H	60
5.3- Síntese dos copolímeros em bloco do PDMAEMA-b-PHBV.	64
5.3.1- Caracterização morfológica das partículas obtidas a partir dos copolímeros em bloco do PDMAEMA-b-PHBV.	67

6- CONCLUSÃO GERAL	71
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
8-ANEXOS	77

LISTA DE FIGURAS

	Possíveis respostas de vias de administração de um princípio ativo: (a) dose oral; (b) overdose oral; (c) intra venosa; (b) liberação controlada ideal	4
Figura 1		
Figura 2	Estrutura dos polihidroxicanoatos.	7
Figura 3	Estrutura do poli-3-hidroxi-butirato (PHB)	8
Figura 4	Estrutura do poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (PHBV).	8
Figura 5	Complexação do DNA através das interações eletrostáticas entre o polímero catiônico e os grupos fosfatos do DNA	15
Figura 6	Estrutura química do PDMAEMA	16
Figura 7	Agente de transferência de cadeia utilizado nas polimerizações RAFT.	25
Figura 8	Esquema representativo da síntese do CTA ₃ .	33
Figura 9	Esquema representativo da purificação do CTA ₃ .	35
Figura 10	Síntese do PDMAEMA via radical livre convencional	36
Figura 11	Sistema de polimerização que está sendo utilizado na síntese do PDMAEMA.	36
Figura 12	Síntese do PDMAEMA pelo mecanismo RAFT com CTA ₁ .	37
Figura 13	Síntese do PDMAEMA pelo mecanismo RAFT com CTA ₂ .	38
Figura 14	Síntese do PDMAEMA pelo mecanismo RAFT com CTA ₃ .	38
Figura 15	Estrutura química genérica do monômero, a= próton cujo deslocamento foi integrado nos espectros de RMN ¹ H.	40
Figura 16	Agente de transferência de cadeia (CTA ₁) utilizado nas polimerizações RAFT.	51
Figura 17	<i>Agente de transferência de cadeia (CTA₂) utilizado nas polimerizações RAFT.</i>	54
Figura 18	Agente de transferência de cadeia (CTA ₃) utilizado nas polimerizações RAFT.	55
Figura 19	Espectro de RMN ¹ H do DMAEMA	61
Figura 20	Espectro de RMN ¹ H do CTA _{RAFT} , o ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico.	62

Figura 21	Espectro de RMN ^1H do PDMAEMA empregando o CTA ₁ .	63
Figura 22	Cromatograma de GPC do PDMAEMA, PHBV e da reação 1.	66
Figura 23	Cromatograma de GPC do PDMAEMA, PHBV e da reação 2.	66
Figura 24	Cromatograma de GPC do PDMAEMA, PHBV e da reação 3.	66
Figura 25	PDMAEMA-b-PHBV miscelizados em água.	68
Figura 26	PDMAEMA-b-PHBV miscelizados em água + acetona (1:1).	69
Figura 27	Micrografia das partículas formadas a partir de PDMAEMA sintetizado via RAFT e miscelizadas em água+acetona.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resultados obtidos nas polimerizações realizadas variando a quantidade de DMAEMA.	45
Tabela 2	Resultados obtidos nas polimerizações realizadas variando a quantidade de CTA _c .	46
Tabela 3	Resultados obtidos nas polimerizações realizadas variando a quantidade de AIBN.	48
Tabela 4	Resultados obtidos nas polimerizações do DMAEMA empregando o CTA _c .	49
Tabela 5	Formulação empregada na polimerização do DMAEMA em duas etapas.	50
Tabela 6	Resultados obtidos na polimerização do DMAEMA em duas etapas.	50
Tabela 7	Resultados obtidos na polimerização do DMAEMA empregando vários solventes.	53
Tabela 8	Resultados obtidos na polimerização do DMAEMA variando a razão molar CTA/AIBN.	54
Tabela 9	Resultados obtidos na polimerização do DMAEMA empregando o CTA ₁ , o CTA ₂ e o CTA ₃ .	56
Tabela 10	Resultados obtidos na polimerização do DMAEMA a 85°C.	57
Tabela 11	Resultados obtidos na polimerização empregando o ACP como iniciador.	58
Tabela 12	Resultados obtidos das massas molares reais e das massas molares teóricas.	59
Tabela 13	Formulação empregada na polimerização do DMAEMA via RAFT em duas etapas.	60
Tabela 14	Resultados obtidos na polimerização DMAEMA via RAFT em duas etapas.	60
Tabela 15	Formulação empregada na síntese dos copolímeros de PDMAEMA-b-PHBV.	65

Tabela 16 Resultados obtidos na síntese dos copolímeros de PDMAEMA-b-PHBV.

65

RESUMO

Terapia Gênica é a introdução de um gene através do uso de um vetor viral ou não viral em tecidos somáticos, cujo produto pode aliviar o defeito causado pela perda ou mau funcionamento de um gene vital ou de seu respectivo produto.

O uso de vetores não-virais consiste em utilizar polímeros ou lipídeos catiônicos que irão interagir com os grupos fosfatos do DNA (ácido desoxirribonucleico), formando um complexo que realizará a introdução do gene na região desejada. Vários polímeros de características catiônicas, os quais podem ser sintetizados via radical livre “viva”, estão sendo empregados como vetores não-virais. Dentre eles, destaca-se o Poli(dimetilaminoetilmetacrilato) - PDMAEMA e seus copolímeros, que, de acordo com a literatura poderiam ser empregados como vetores não-virais. Uma das principais vantagens de se utilizar o PDMAEMA é a possibilidade de sintetizá-lo por vários mecanismos de polimerização, inclusive por um novo mecanismo de polimerização via radical livre “viva”, o mecanismo RAFT (transferência, fragmentação e adição reversíveis), o qual permite o controle da massa molar do polímero e a sua polidispersidade, permitindo também, a construção de copolímeros complexos e funcionais (copolímeros em bloco). Neste caso poderia ser de fundamental importância, pois a citotoxicidade do PDMAEMA é uma função da sua massa molar assim como da possibilidade de sua polimerização com outros monômeros de menor citotoxicidade.

Com isso, neste trabalho está sendo estudada a síntese de um polímero catiônico, o poli(dimetilaminoetilmetacrilato) - PDMAEMA funcionalizado, que poderá ser utilizado como vetor não-viral na aplicação em Terapia Gênica ou na funcionalização de partículas biodegradáveis de aplicação na liberação controlada de fármacos. Este polímero está sendo sintetizado por dois mecanismos diferentes: polimerização via radical livre, empregando como iniciador a azo-bis-isobutironitrila (AIBN) e como agente de transferência de cadeia convencional (CTA_c), o ácido 3-mercaptopropiônico, o qual será responsável pela funcionalização do PDMAEMA ao final da síntese. O segundo mecanismo é um mecanismo via radical livre “viva”, o RAFT (transferência, fragmentação e adição

reversíveis), o qual utiliza um agente de transferência de cadeia (CTA_{RAFT}), do tipo ditioéster, que permite o controle da massa molecular do polímero e a polidispersidade das macro-cadeias. O CTA_{RAFT} que foi utilizado neste trabalho é o ácido 2-((2-fenil-1-tioaetil)tio)-propanóico, o qual foi sintetizado no Laboratório de Química Fina DEQUI/FAENQUIL, e que ao final da reação de polimerização também permite a funcionalização das extremidades das macro-cadeias com grupos carboxílicos. O polímero sintetizado será caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN 1H) e Cromatografia de Permeação em Gel (GPC). Uma característica importante do PDMAEMA sintetizado neste trabalho é a presença dos grupos funcionais (grupos carboxílicos) na extremidade das macro-cadeias. Estes grupos funcionais permitirão reações de acoplamento (esterificação ou amidação) do PDMAEMA com outros polímeros que apresentarem em sua estrutura hidroxilas ou grupos amínicos livres, formando copolímeros ramificados ou em bloco. Este tipo de reação é utilizado no caso em que o segundo polímero não pode ser sintetizado pela mesma via do PDMAEMA, como por exemplo, os polímeros naturais.

ABSTRACT

Gene therapy is the introduction of a gene by means of viral or non-viral vector in a somatic tissue which product can overcome the damage caused by the 1055 or bad working of a vital gene or its respective product.

The use of non-viral vectors consists in the utilization of polymers or cationic lipids that will interact with the phosphate groups of the DNA (deoxyribonucleic acid), forming a complex that will introduce the gene into the desired region.

Many cationic polymers that have been synthesized by living free-radical polymerization have been used as non-viral vectors. Between these new methacrylate polymers we can mentioned the poly(dimethylaminoethylmethacrylate) - PDMAEMA and they copolymers which, according to the literature, could be used as non-viral vectors.

One of the main advantages in using PDMAEMA is the possibility of its synthesis by specific mechanisms of polymerization including a new mechanism of living free-radical polymerization called RAFT (reversible additionfragmentation chain transfer) that offers exceptional versatility in providing polymers of predetermined molecular weight and very narrow polydispersity and the formation of complexes and functional copolymers (block copolymers). The control of such molecular weight of PDMAEMA is very important because its cytotoxicity is of molecular weight dependent.

This work presents the synthesis of a functionalized cationic polymer, the poly(dimethylaminoethylmethacrylate) - PDMAEMA that shall be used as non-viral vector in gene therapy or in the functionalization of biodegradable particles utilized in the drugs control delivery.

Two mechanisms of free-radical polymerization was used, using 2,2' azobis-isobutyronitrile (AIBN) as initiator and 3-mercaptopropionic acid as classic chain transfer agent (CT Ac) that will be responsible to the side chain functionality of the PDMAEMA in the end of the synthesis.

The second mechanism via living free radical polymerization, RAFT, which uses an RAFT agent (CT ARAFT) dithio compounds which acts as highly efficient reversible addition-fragmentation chain transfer agent. This mechanism

allows the molecular weight of the polymer as well as the polydispersity of the macro radicals.

The RAFT agent used in this work was the 2-(2-phenyl-1-tioxethyl)thio)propanoic acid, synthesized at FAENQUIL. This agent, at the end of the reaction, allowed the functionalization of macro-chain end by carboxylic groups. These groups allowed the coupling reactions (esterification or amidation reactions) of PDMAEMA and PHBV - poly(hidroxybutyrate-co-valerate).

This reaction is specific to the synthesis of a second polymer that cannot be formed by the same reaction of PDMAEMA, for example, the natural polymers.

PDMAEMA was characterized by ¹H NMR and GPC techniques.

1- INTRODUÇÃO

Na área farmacêutica, a micro/nanoencapsulação assume, na atualidade, uma das alternativas viáveis para o desenvolvimento de novas formulações, uma vez que possibilita, de maneira racional e efetiva, aumentar a eficiência terapêutica de substâncias já utilizadas no tratamento de uma grande variedade de doenças. Sistemas micro/nanoparticulados têm sido produzidos para direcionar sistemas coloidais para sítios específicos de ação farmacológica, proporcionando alta concentração do fármaco no órgão ou tecido pretendido.

A aplicação de sistemas micro/nanoparticulados na área farmacêutica está sendo amplamente estudada e tem sido utilizada para a obtenção de formas sólidas de óleos, no mascaramento do sabor e odor desagradáveis de substâncias ativas (alcalóides e sulfas), na diminuição da volatilização de fármacos líquidos (vitaminas, ácido acetilsalicílico, enzimas e hormônios), na prevenção de incompatibilidades entre substâncias ativas contidas na mesma formulação, para tornar materiais tóxicos manipuláveis de maneira segura, para aumentar características de fluxo de materiais sólidos em processos de compressão, para liberação controlada de fármacos (antibacterianos, antineoplásticos, analgésicos e imunossupressores), isolamento de tecidos (encapsulação de hemácias e ilhotas de Langerhans), conservação de sólidos em líquidos (óleos, aromatizantes e vitamina A) e em biotecnologia (diagnósticos, terapia gênica e biossíntese) (FILHO, 1999; DONBROW *et al.* 1991; KREUTER, 1992; LUZZI, 1985; OLIVEIRA, 1992).

O princípio básico subjacente à Terapia Gênica (TG), consiste simplesmente na introdução de um material genético no interior da célula para que o produto da sua expressão possa curar ou retardar a progressão de doenças. Mas para tal, é necessário fazê-lo chegar até às células defeituosas, surgindo assim o conceito de transfecção, processo de entrega e expressão de material genético com sucesso. A função da administração do gene correto é a de compensar o gene defeituoso que a célula contém, para deste modo conseguir recuperar a função celular. O tratamento da doença é feito em nível molar

eliminando o foco da doença enquanto a maior parte dos fármacos cura simplesmente os sintomas (VERMA *et al.* 1997; SIMÕES *et al.* 2001; MOUNTAIN, 2000; ANDONY *et al.* 2001)

O sistema de transfecção do gene consiste de um transportador (vetor) e do DNA (plasmídeo). O transportador viral é muito eficiente na introdução de genes no interior das células. Entretanto, estes vetores podem entregar seu material genético, agravando o estado imunológico do ser vivo (WETERING *et al.* 1997).

Para contornar esta limitação dos vetores virais, os polímeros catiônicos solúveis em água surgem como uma alternativa de sistemas de transfecção de gene não-viral. Estes polímeros quando ligados ao plasmídeo de DNA, o qual codifica as proteínas terapêuticas por interações eletrostáticas, gera complexos de polímero-plasmídeo chamados de poliplexos (WETERING *et al.* 2000). Embora apresente facilidade e versatilidade na produção, uma característica comum dos polímeros catiônicos é a sua citotoxicidade. Entretanto, a toxicidade depende da composição química e da massa molar do polímero. Um fator interessante para diminuir essa toxicidade pode ser a redução da densidade de carga dos polímeros catiônicos (WETERING *et al.* 2000).

Este trabalho tem como objetivo sintetizar e caracterizar um polímero catiônico, o poli(dimetilaminoetilmetacrilato) - PDMAEMA funcionalizado, que poderá ser utilizado futuramente na aplicação em Terapia Gênica ou na funcionalização de partículas biodegradáveis de aplicação em liberação controlada fármacos.

2- REVISÃO BIBLIGRÁFICA

2.1- Micro/nanoencapsulação na Indústria Farmacêutica

Durante a última década, o desenvolvimento de carreadores poliméricos de agentes ativos tem sido importante campo de pesquisa na área farmacêutica. Vários materiais podem ser utilizados na preparação de nanopartículas, nas quais o agente ativo pode estar adsorvido na superfície da nanopartícula ou encapsulado pela mesma. Um sistema carreador de drogas eficiente e versátil deve atender aos seguintes requisitos: (a) tamanho das partículas inferior a 1 μm ; (b) superfícies passíveis de modificação, (c) alta capacidade de carrear agente ativo; (d) estabilidade coloidal do látex em meio biológico; (e) ausência de toxicidade, provocada pelo carreador polimérico ou aditivo (WETERING *et al.* 2000; HENNINK *et al.* 2001).

Um problema associado com a liberação controlada de agentes ativos via oral é a sensibilidade das propriedades da forma de dosagem com a variação de pH e passagem pelo trato gastrointestinal humano. Conseqüentemente, em alguns casos, é difícil o encaminhamento do agente ativo para regiões específicas, como por exemplo o cólon. Para superar estes problemas, nanopartículas sensíveis a estímulos estão sendo utilizadas. Existem diferentes tipos de estímulos, tais como: temperatura, pH, pressão ou campo elétrico (THROMBRE, 1990).

Para a nanopartícula adquirir estas propriedades sensíveis, realizam-se reações de modificação química em sua superfície, visando a obtenção de partículas com polaridades diferentes (aniônica e catiônica) e até mesmo partículas com morfologia casca-núcleo (core-shell), do tipo cabeleira (hairy-layer), com propriedades específicas tais como sensibilidade ao pH e a variação de temperatura (partículas termosensíveis) (WETERING *et al.* 2000).

2.1.1- Liberação controlada de princípios ativos

Quando uma dose de um princípio ativo é administrada, por via parenteral ou enteral, em um organismo vivo a concentração do princípio ativo no órgão alvo

aumenta até um valor máximo e depois decresce devido ao processo de excreção ou pela conversão metabólica. Para conseguir um nível de concentração de princípio ativo terapeuticamente efetivo e por um tempo maior, são necessárias altas doses do mesmo o que leva à concentração do princípio ativo para um nível próximo da toxicidade (THROMBRE, 1990).

Convencionalmente, os princípios ativos são administrados periodicamente na forma de pílulas, líquidos ou injeções, não visando uma região específica onde o princípio ativo teria que atuar. A figura 1 apresenta possíveis respostas de várias vias de administração de uma droga. Nesta figura, a condição ideal seria a liberação controlada e gradativa da droga (d), ou seja, numa concentração constante que fosse efetiva, não tóxica e mantida por um longo tempo (THROMBRE, 1990).

Vários sistemas de liberação controlada estão sendo testados para o tratamento de doenças, tais como: glaucoma, angina, câncer, diabetes, malária, etc (YOSHIDA *et al.* 1992).

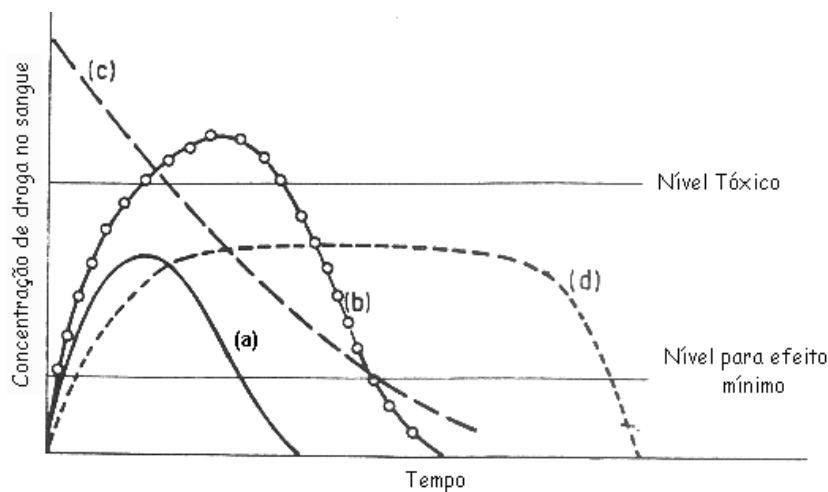


Figura 1: Possíveis respostas de vias de administração de um princípio ativo: (a) dose oral; (b) overdose oral; (c) intra venosa; (d) liberação controlada ideal (THROMBRE, 1990).

Algumas das vantagens da utilização dos sistemas de liberação controlada de princípios ativos são (THROMBRE 1990; Yoshida *et al.* 1990; LANGER *et al.* 1990; SAMOUR *et al.* 1978)

- ✓ Pontencialização da atividade pela união de uma ou mais drogas com um mesmo polímero;
- ✓ Melhor interação com a parede celular de bactérias e vírus;
- ✓ Não absorção do princípio ativo, nos casos em que o tratamento é localizado (ex: infecção na pele);
- ✓ Baixa toxicidade, dependendo do princípio ativo e do polímero utilizado;
- ✓ Redução dos efeitos colaterais, tais como: irritação, náusea e vômito;
- ✓ Aumento do conforto do paciente;
- ✓ Atividade prolongada do princípio ativo.

KIM *et al.* (2000) prepararam nanopartículas com morfologia casca-núcleo, constituídas respectivamente de poli(l-ácido láctico) (núcleo) e poli(N-isopropilacrilamida)- PNIPAAm (casca), para utilização na liberação controlada de indometacina. Inicialmente os autores sintetizaram PNIPAAm com grupos amínicos terminais em meio de cloreto de 2-aminoetanotiol. Em seguida, sintetizaram o copolímero, em meio orgânico, por meio da reação entre os grupos amínicos terminais do PNIPAAm com os grupos carboxílicos do poli(l-ácido láctico) utilizando como agente ativador a N,N'-diciclohexila carbodiimida (DCC). Finalmente, as nanopartículas foram preparadas pelo método de diafiltração, utilizando um saco de diálise para troca do solvente orgânico pela água.

KIM *et al.* (2001), estudaram a liberação controlada de uma droga modelo, a hidrocortizona, utilizando homopolímeros de dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEMA) ou copolímeros de DMAEMA e etilacrilamida (EAAm). Os copolímeros sintetizados apresentavam características de sensibilidade a variações de pH e temperatura devido à presença do DMAEMA e do EAAm, respectivamente. Neste trabalho os polímeros foram preparados empregando-se uma mistura binária de etanol/água como solvente, azo-bis-isobutironitrila (AIBN) como iniciador a uma temperatura de 75°C durante 15 horas. Os polímeros ou copolímeros preparados foram purificados por diálise a 4°C. Com este trabalho, os autores apresentaram

resultados interessantes com relação à “inteligência” das nanopartículas, pois de acordo com os resultados apresentados, quando as nanopartículas, em meio aquoso, eram aquecidas de 35°C para 40°C (temperatura acima da temperatura de transição do polímero) observava-se a liberação da droga pelas nanopartículas. Por outro lado, quando o sistema era resfriado de 40°C para 35°C cessava-se a liberação da droga, controlando desta forma a liberação da hidrocortizona para o meio aquoso. Este comportamento também foi observado com relação à variação de pH do meio aquoso, pois de acordo com os resultados apresentados pelos autores, as nanopartículas liberavam a droga apenas em pH's baixos (pH=4). Caso o pH do meio aquoso aumentasse, as nanopartículas impediam a difusão da droga, permitindo o controle da liberação.

HU *et al.* (2005), estudaram a formação de partículas a partir de copolímeros de DMAEMA e poli(estireno) – PS, miscelizadas em 20 mL de água e 20 mL de água/acetona na razão 10:10. Os homopolímeros foram sintetizados via radical livre “viva”, empregando o mecanismo ATRP. Na polimerização do PDMAEMA utilizaram como iniciador o AIBN e como solvente o tetrahidrofurano (THF) durante 15 horas a 60°C. Após o tempo de reação, o PDMAEMA foi precipitado em hexano gelado e seco em estufa a vácuo. Na polimerização do PS, foi empregado como solvente 50ml de uma solução de cloreto de cobre durante 10 horas a 120°C. Após o esse período de reação, o polímero foi dissolvido em THF, precipitado em metanol e seco a 55°C durante 48 horas em estufa a vácuo. Após a purificação do PDMAEMA e do PS, esses polímeros foram empregados como macroiniciadores para a formação dos copolímeros de PDMAEMA-b-PS. Os copolímeros formados foram sintetizados a 60°C durante 10 horas, precipitados em etanol e filtrados. Para a formação de partículas, os copolímeros foram solubilizados em dimetilformamida (DMF) na temperatura ambiente. Em um béquer com agitação mecânica contendo água deionizada, foi adicionada lentamente a solução de copolímeros, obtendo assim, a formação de partículas. O mesmo procedimento foi empregado para a formação de partículas em água/acetona.

De acordo com os autores, foi possível verificar a formação de partículas miscelizadas em água e água/acetona. As partículas obtidas tanto em água como na mistura de água/acetona apresentaram diâmetros de partículas da ordem de 100 a 200 nm e polidispersidades entre 0,20 e 0,50. Além da técnica de espalhamento de luz, as partículas formadas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

RAVI *et al.* (2005), pesquisaram a formação de partículas a partir de copolímeros formados de PDMAEMA e azo metacrilatos, como por exemplo, o 6-[4-fenilazo]fenoxiexilmetacrilato - (PPHM), miscelizadas em água. Na polimerização do PDMAEMA utilizaram como iniciador o AIBN e como solvente o THF durante 15 horas a 60°C. Após o tempo de reação, o PDMAEMA foi precipitado em hexano e seco em estufa a vácuo. Na polimerização do PPHM, foi empregado como solvente 25ml de uma solução de cloreto de cobre durante 12 horas a 85°C. Após o período de reação, o polímero foi diluído com THF e precipitado em metanol, filtrado e seco a 30°C durante 24 horas em estufa a vácuo. Após a purificação do PDMAEMA e do PPHM, esses polímeros foram empregados como macroiniciadores para a formação dos copolímeros PDMAEMA-b-PPHM. Os copolímeros formados foram sintetizados a 85°C durante 10 horas e sob atmosfera de argônio. Após o tempo de reação, os copolímeros formados foram precipitados em hexano e secos a 30°C em estufa a vácuo durante 15 horas. Para a formação de partículas, os copolímeros foram solubilizados em THF. A miscelização foi realizada em um béquer contendo 20 ml de água deionizada aos quais 1 ml da solução foi adicionado gota a gota sob agitação mecânica. A reação foi conduzida por um período de 24 horas para a formação de partículas.

Segundo os autores, foi possível verificar a formação de partículas miscelizadas em água por meio da técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC) e por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Por meio do cromatograma, foi possível identificar os copolímeros formados de PDMAEMA-b-PPHM verificando a ligação química entre o PDMAEMA e o PPHM. Já com as micrografias foi possível visualizar a morfologia e o tamanho das partículas.

2.1.2- Polihidroxicanoatos (PHAs)

Os polímeros bacterianos, denominados polihidroxicanoatos (PHAs), constituem uma categoria de poliésteres de ácidos hidroxi-alcanóicos, biodegradáveis, que podem ser obtidos a partir de fontes de carbono renováveis, sendo produzidos por diversas bactérias, como material de reserva, na forma de grânulos intracelulares (KREUTER, 2001). O seu acúmulo se dá no citoplasma da célula sob a forma de grânulos de 0,2-0,5 μm de diâmetro e sua função se assemelha ao glicogênio sintetizado e estocado pelos mamíferos (CHANDRA *et al.* 1998). As diferentes propriedades dos PHAs derivam do seu grupo constituinte R, podendo variar de um material duro e quebradiço até amorfo ou elastomérico, como é apresentado na figura 2.

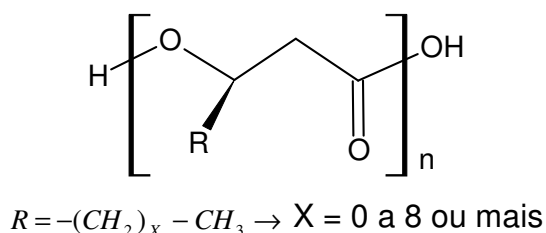


Figura 2: Estrutura dos polihidroxicanoatos.

A primeira observação de polihidroxicanoatos da qual se tem conhecimento foi no início do século XX (MEYER, 1903), acumulados em bactérias *Azotobacter chroococcum*, na forma de inclusões lipídicas, solúveis em clorofórmio (MEYER, 1903). Só mais tarde, a composição química dessas inclusões foi determinada por (LEMOIGNE *et al.* 1926) e identificada como poli-3-hidroxi-butirato (PHB). A estrutura do PHB é mostrada na figura 3.

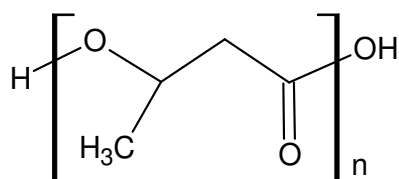


Figura 3: Estrutura do poli-3-hidroxi-butirato (PHB) (LEMOIGNE *et al.* 1926).

Até o final dos anos 50, alguns estudos com bactérias produtoras dessas inclusões mostraram que o PHB era estocado como fonte de reserva de carbono e energia (WILLIAMSON *et al.* 1958; MACRAE *et al.* 1958). Na seqüência dos estudos que se intensificaram para o entendimento das funções do PHB no metabolismo das células produtoras, foi publicada a primeira revisão científica sobre esse biopolímero, comparando a sua função à da gordura nos seres humanos (DAWES *et al.* 1973). Até aquele momento, PHB era o único polihidroxicanoato conhecido WALLEEN *et al.* (1974) reportaram a identificação de outras unidades HA, dentre elas, a unidade 3-hidroxicvalerato (3HV). Desta forma, foi identificado o copolímero poli-3-hidroxicbutirato-co-3-hidroxicvalerato (PHBV). A estrutura do PHBV é mostrada na figura 4.

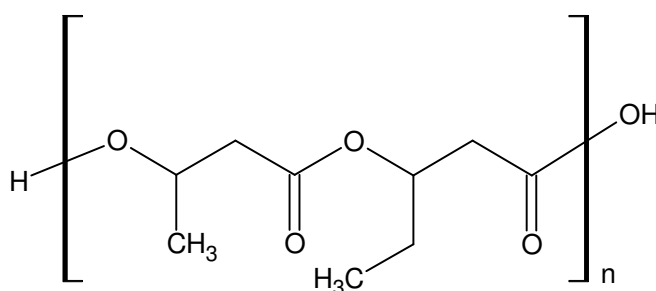


Figura 4: Estrutura do poli-3-hidroxicbutirato-co-3-hidroxicvalerato (PHBV).
(WALLEEN *et al.* 1974).

Aplicações dos PHAs em liberação controlada

No desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, o polímero utilizado tem uma função muito importante na disponibilidade ou liberação da droga que pode ocorrer por diferentes mecanismos, como por exemplo: sistemas difusivos, onde a liberação da droga é feita pela sua difusão através da membrana polimérica; sistemas erosivos, onde a liberação é baseada na erosão ou biodegradação do polímero ou por uma combinação de ambos os mecanismos – difusão e erosão ou biodegradação (PORTE *et al.* 1994).

A diferença entre erosão e biodegradação é estabelecida com base no mecanismo de degradação da macromolécula. A erosão da matriz polimérica resulta em perda de massa em nível macroscópico, sem alteração das unidades macromoleculares, que pode ocorrer de dois modos diferentes: por quebra de

ligações inter-moleculares em sistemas reticulados, onde a matriz é gradualmente erodida a partir da superfície externa ou pela hidrólise de grupos laterais à cadeia principal, resultando em dissolução do polímero sem redução de seu peso molecular (PORTE *et al.* 1994).

Polímeros biodegradáveis são aqueles em que a quebra das cadeias resulta em unidades monoméricas com peso molecular suficientemente pequeno para serem eliminadas pelas vias metabólicas normais e essa quebra das cadeias pode ocorrer por ação de hidrólise (degradação hidrolítica) ou de enzimas (degradação enzimática). Sistemas erosivos ou degradáveis e, mais particularmente, aqueles que se degradam em meio biológico (biodegradáveis) têm encontrado grande utilidade no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada. (LIMA *et al.* 1999).

A eliminação natural do polímero após liberação total do ativo tem a vantagem de dispensar o inconveniente da intervenção cirúrgica para a remoção de implantes. Sendo assim, sistemas micro e nano-estruturados biodegradáveis e biocompatíveis (microesferas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas) têm sido desenvolvidos para liberação controlada de drogas (SOPPIMATH *et al.* 2001; BENOIT *et al.* 1996)

O papel do polímero na formulação (modulação) desses sistemas de liberação controlada é muito diferente do papel de um excipiente inerte em formulações farmacêuticas. O polímero influencia não apenas na cinética de liberação do agente ativo como esperado, mas também na estabilidade da droga, na toxicidade e na compatibilidade entre o biopolímero e o organismo vivo (ANDERSON *et al.* 1997).

Trabalhos recentes encontrados na literatura já apresentam aplicações do PHBV na veiculação de antibióticos. SENDIL *et al.* (1999) utilizou PHBV para encapsular e veicular tetraciclina na forma ácida e na forma neutra. Segundo o autor, a encapsulação da tetraciclina na forma neutra foi mais eficiente que na forma ácida. Entretanto, nas duas formas em que a tetraciclina foi encapsulada a liberação foi rápida e as partículas de PHBV sofreram degradação durante a liberação da droga.

2.1.3- Terapia Gênica

Desde o século XIX que Gregor Mendel descobriu que algumas características poderiam ser herdadas de indivíduo para indivíduo, muitas foram as descobertas relacionadas com os genes e sua função na manutenção e regulação do organismo. De especial relevo são as descobertas que relacionam doença com o gene. Sabendo-se que a origem da doença estaria no gene, facilmente se ascendeu à idéia da utilização de terapias com intuito de usar o gene como agente ou alvo terapêutico. Assim, surge a Terapia Gênica (TG), a próxima grande revolução da medicina moderna (VERMA *et al.* 1997).

Atualmente a Terapia Gênica pode incluir outros tipos de estratégias para o tratamento de doenças. O gene transfectado pode não estar necessariamente em falta, mas o seu emprego ser terapêutico ou a administração exógena do produto da sua expressão ser difícil, como por exemplo são as citocinas anti-tumorais. Esta forma de TG tem como objetivo a produção *in vivo* de proteínas potencialmente terapêuticas (VERMA *et al.* 1997; SIMÕES *et al.* 2001).

Deste modo é fácil concluir que as possibilidades que se abrem para a aplicação da TG são inúmeras. Dentre as quais podemos realçar o tratamento de doenças hereditárias, doenças neurodegenerativas, cancro e AIDS (Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida (SIMÕES *et al.* 2001; MOUNTAIN, 2000). Para que se possa fazer expressar DNA exógeno numa população celular é necessário fazer com que este seja levado, já que, via de regra, poucas células recebem e expressam DNA exógeno. Assim são necessários os veículos, chamados de vetores. Ao longo do tempo foram surgindo vetores que se encaixam em duas famílias, os vetores virais e os vetores não-virais (VERMA *et al.* 1997).

Vetores virais

Como se pode imaginar, quem melhor que os vírus para promover a entrega genética às células. Esses pequenos organismos possuem como objetivo único de sua existência a entrega de seu material genético às células e promover

a sua replicação de modo a iniciar um novo ciclo. Deste modo, os vírus assumem-se como os melhores candidatos para promover a entrega genética. Quase todas as classes de vírus têm sido experimentadas para testar a sua eficácia para mediar a transfecção (VERMA *et al.* 1997; SIMÕES *et al.* 2001; MOUNTAIN, 2000; ANDONY *et al.* 2001).

Em todos os vírus pode-se encontrar uma componente genética que é essencial para sua propagação. Os vetores virais são derivados de vírus por substituição dessa componente genética por genes terapêuticos. No entanto, essa manipulação é morosa e dispendiosa, e nunca segura de um modo completo, pois se encontra sempre presente o risco de os genes virais e potencialmente patogênicos não serem completamente removidos.

Vetores não-virais

Tradicionalmente, os métodos de entrega genética por vetores não-virais podem ser classificados nas seguintes categorias: físicos ou mecânicos e químicos. Contudo existem outros métodos que não se “encaixam” bem nesta classificação, como é a utilização de DNA livre. A adição de DNA livre não resulta em transfecção de células *in vitro*, embora apareçam resultados surpreendentes após a injeção de DNA livre em vários tecidos *in vivo*, especialmente músculo e pele. Existem algumas descrições da expressão do transgene passados vários meses após a injeção de um plasmídeo em músculo esquelético de rato, enquanto que na pele a expressão só é detectável durante alguns dias. Por conseguinte, a vacinação através deste método parece ser a aplicação mais promissora desta técnica de entrega genética (MOUNTAIN, 2000; ANDONY *et al.* 2001).

Métodos Físicos

Dos métodos físicos, aqueles que se afiguram com uma concepção mais simples e mais apelativa são: a microinjeção, pó “gene gun”, “intraject” ou “jetgun”, bombardeamento de partículas e a eletroporação. No entanto, a maior e derradeira desvantagem destes métodos consiste na morosidade, o que implica

um trabalho laborioso que não se torna praticável para a entrega de DNA *in vivo* (VERMA *et al.* 1997; SIMÕES *et al.* 2001).

A microinjeção consiste em injetar DNA livre diretamente no núcleo celular que só pode atingir uma célula de cada vez. Apesar das contrariedades, várias técnicas têm sido apresentadas com o mesmo objetivo sem que seja necessária a aplicação de microinjeção. Uma das mais avançadas, designada pó “gene gun”, utiliza um fluxo de alta pressão de hélio para introduzir no citoplasma partículas de ouro envolvidas por DNA. Um procedimento semelhante chamado de “intraject” ou “jetgun”, utiliza um líquido sob alta pressão para a entrega genética nos espaços intersticiais. O bombardeamento com partículas, também designado como “entrega balística de partículas”, pode introduzir DNA em muitas células simultaneamente. Nesta técnica, partículas revestidas com DNA (compostas por metais como ouro ou tungstênio) são aceleradas a alta velocidade para penetrar as membranas celulares. Este tipo de procedimento é aplicado em vacinação de DNA, onde uma expressão local do DNA administrado (em células epidermais ou musculares) é o bastante para desencadear uma resposta imunitária primária. No entanto, devido à dificuldade de controlar a via de entrada do DNA, este procedimento é aplicado em células aderentes em cultura, não sendo ainda usado de um modo sistemático (SIMÕES *et al.* 2001; MOUNTAIN, 2000).

A eletroporação é outro método físico usado para a entrega de DNA. Este método baseia-se na aplicação de impulsos elétricos para permeabilizar a membrana celular de um modo transiente, o que permitirá a incorporação de macromoléculas pelas células. Este método foi usado pela primeira vez em 1982 para a entrega de DNA em células de mamífero. A incorporação intramuscular de DNA feita por este método resulta de expressão de um gene “repórter” várias vezes acima daqueles conseguidos com simples injeção intramuscular e cuja expressão pode ir até 9 meses. Comparada com outros métodos de entrega genética, a eletroporação é mais simples, segura e econômica. No entanto a sua aplicação *in vivo* é difícil, embora algum processo já tenha sido feito em vários tecidos: pele, endotélio da córnea e músculo. Neste contexto salientam-se os resultados obtidos por KIM *et al.*(2000) que conseguiram a recuperação de ratos

diabéticos com a administração de genes percursores da insulina por eletroporação.

Métodos Químicos

Os métodos de entrega genética química operam fundamentalmente em três níveis: condensação ou complexação do DNA, endocitose e endereçamento/entrada para o núcleo. As moléculas carregadas negativamente de DNA são normalmente condensadas e/ou complexadas com reagentes catiônicos antes da entrega genética. Esses complexos são incorporados pelas células, usualmente por endocitose, o que implica na subsequente libertação do endossoma e tráfego do DNA até ao núcleo. A endocitose é um processo com vários passos que envolvem ligação, internalização, formação do endossoma e posterior fusão com o lisossoma onde se verifica a degradação completa do seu conteúdo. O pH baixo e as enzimas presentes no endossoma, mas com maior incidência no lisossoma leva à degradação do DNA que se encontra associado com os complexos. Finalmente, o DNA que consegue escapar do endossoma e resistir as nucleases presentes no citoplasma, deverá conseguir dissociar-se do agente condensante, antes ou depois da entrada no núcleo. A entrada é feita através do poro nuclear ou durante a divisão celular. Uma vez dentro do núcleo, a eficiência da expressão dever-se-á fundamentalmente ao sistema de expressão (VERMA *et al.* 1997; MOUNTAIN, 2000; ANDONY *et al.* 2001).

Dos métodos químicos mais usados *in vitro* para a entrega de DNA em células ou mesmo a bactérias, destaca-se a precipitação do DNA com fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Este é o método mais versátil e fácil no conjunto de métodos de entrega de DNA, como tem sido demonstrado ao longo dos últimos 30 anos. No entanto, devido à formação dos precipitados, este sistema não é efetivo para ser utilizado *in vivo*.

O princípio geral dos métodos químicos mais utilizados se baseia na formação de um complexo entre as cargas positivas existentes geralmente em polímeros ou lipídeos catiônicos e as cargas negativas dos grupos fosfato do DNA. Outros protocolos para a transfecção *in vitro*, incluem a utilização de polieletrólitos.

Entre os polieletrólitos mais utilizados incluem-se os seguintes compostos: o dextrano-DEAE (Simões, *et al.* 2001; Wetering, *et al.* 2000) a poli-lisina (SIMÕES *et al.* 2001; WETERING *et al.* 2000; VERON *et al.* 2004), polietilenimina (PEI) (WETERING *et al.* 2000; VERON *et al.* 2004), e os dendrímeros (WETERING *et al.* 2000; VERON *et al.* 2004). Todos eles apresentam a capacidade para condensar o DNA por interações eletrostáticas entre os seus grupos carregados positivamente com as cargas negativas dos grupos fosfato das cadeias de DNA. O fosfato de cálcio tal como o dextrano-DEAE foram utilizados para mediar a transfecção *in vitro*. No entanto, a transição da aplicação *in vitro* para *in vivo* destes métodos tornou-se inviável devido a citotoxicidade revelada. Assim, outros polieletrólitos mereceram a sua aplicação e estudo em TG. A poli-lisina começou a ser usada devido ao seu poder de condensar DNA, levando a uma diminuição do tamanho final do complexo para valores entre 30-100nm de diâmetro, indo assim ao encontro à descrição de vetor ideal (tamanho reduzido). Mas por outro lado, a poli-lisina, e outros poli-peptídeos utilizados (por exemplo, poli-arginina e poli-histidina) são em geral tóxicos. Entretanto, a poli-L-lisina, em contraste com a poli-D-lisina, é biodegradável e logo menos tóxica. Mas com o advento de novos polímeros com maior densidade de carga, e logo, com maiores capacidades de condensação, a utilização da poli-lisina foi sendo pouco a pouco abandonada. A polietilenimina (PEI) possui uma das maiores densidades de carga apresentadas por polímeros catiônicos. Assim, em geral, a complexação de DNA com polímeros catiônicos com uma elevada densidade de carga, resulta na formação de partículas com tamanhos reduzidos, o que poderá influenciar a eficiência na transfecção. Além do mais, pensa-se que o aumento na transfecção mediada por PEI está de alguma forma relacionado com a capacidade que este polímero catiônico possui em se comportar como uma “esponja protônica” em condições acídicas. O perfil de protonação do PEI envolve um aumento de 20% para 45% entre o pH 7 e 5, condições semelhantes às encontradas no processo de maturação do endossoma. Este efeito resulta numa maior dificuldade de acidificação tanto do endossoma como do lisossoma. Deste modo, os complexos podem permanecer durante um tempo maior no endossoma após a endocitose,

evitando uma rápida degradação pelo lisossoma, favorecendo deste modo à liberação do material genético destas organelas. A capacidade que o PEI apresenta para tamponar o meio do endossoma foi recentemente relacionada com a sua capacidade de conduzir o DNA plasmídico através da membrana nuclear, ultrapassando assim uma das principais barreiras para a entrega genética com sucesso (WETERING *et al.* 2000; VERON *et al.* 2004; SIMÕES *et al.* 2001).

Outra classe de polímeros catiônicos que estão sendo implementados como sistemas de entregas genéticas são os dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), compostos por polímeros catiônicos altamente ramificados (VERON *et al.* 2004). Os dendrímeros de PAMAM apresentam na sua superfície aminas primárias que têm a capacidade de associar, condensar e transportar DNA para uma grande variedade de tipos celulares, sem que com isso induzam citotoxicidade significativa *in vitro*. A grande vantagem demonstrada por este sistema, é a facilidade de produção e a versatilidade apresentada na sua manufatura, podendo-se produzir polímeros desta natureza com vários tamanhos e densidades de carga superficial, o que simplifica o processo de transfecção. A figura 5 apresenta a complexação do DNA por polímeros catiônicos.

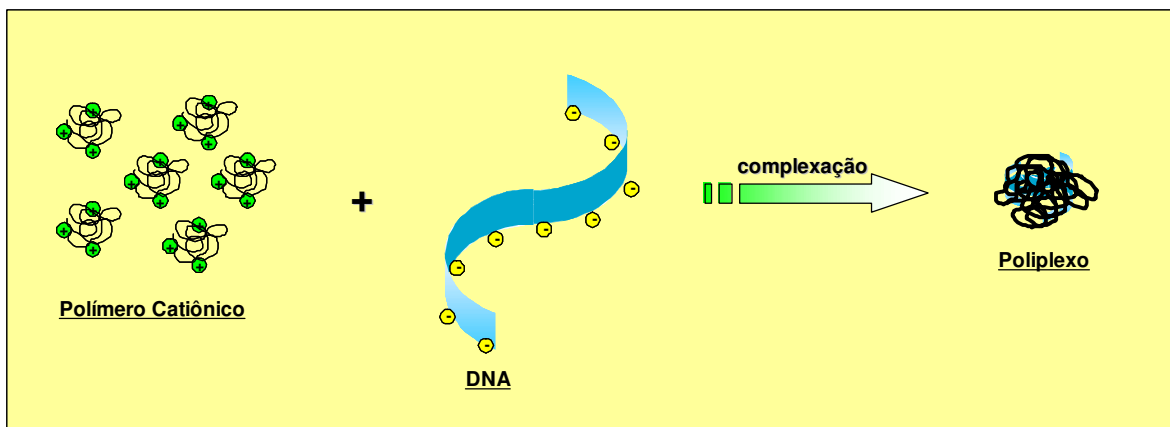


Figura 5. Complexação do DNA através das interações eletrostáticas entre o polímero catiônico e os grupos fosfatos do DNA (VERON *et al.* 2004).

Além do mais, o “efeito esponja” referido para a PEI também é característica destes polímeros. Esta potencialidade dos dendrímeros faz com que estes se comportem como bases fracas, o que retarda a acidificação do

endossoma, impedindo a maturação para o lisossoma. A redução do pH pode levar também ao “inchamento” (swelling) do dendrímero, provocando a ruptura da membrana do endossoma, uma das barreiras à entrega genética, permitindo a passagem do DNA para o espaço citoplasmático (VERMA *et al.* 1997; SIMÕES *et al.* 2001).

Por apresentar ramificações de grupos aminas terciárias passíveis de protonação as quais geram cargas positivas efetivas, o PDMAEMA está sendo muito estudado como vetor não-viral no campo da Terapia Gênica, devido as interações eletrostáticas entre as cargas positivas do PDMAEMA e das cargas negativas dos grupos fosfatos do DNA. O plasmídeo de DNA é complexado diminuindo o seu volume, sendo assim transportado para o interior da célula com maior eficiência. A figura 6 representa a estrutura química do PDMAEMA (VERON *et al.* 2004).

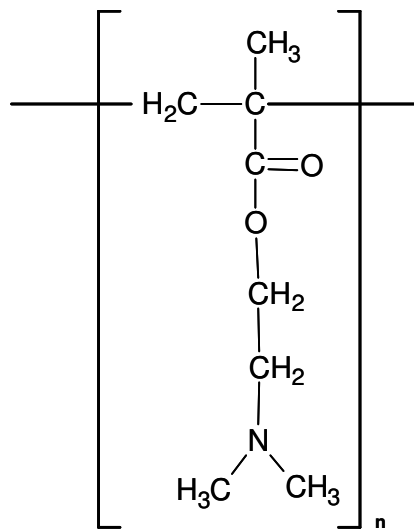


Figura 6. Estrutura química do PDMAEMA.

WETERING *et al.* (1997), estudaram a citotoxicidade de homopolímeros de DMAEMA com massas molares diferentes na transfecção de plasmídeo de DNA (PCMV-LACZ) em duas culturas de células padrões diferentes do tipo: COS-7 e células cancerígenas do tipo OVCAR 3. Os polímeros foram sintetizados via radical livre convencional empregando a AIBN como iniciador e tolueno como

solvente. As reações foram conduzidas sob atmosfera de nitrogênio à 60°C durante 22 horas. Após este período de reação, os polímeros formados foram precipitados em éter etílico e seco a vácuo. A condensação do plasmídeo (PCMV-LACZ) com o PDMAEMA consistiu na mistura física do plasmídeo e o polímero catiônico durante um período de 30 minutos. O primeiro experimento de transfecção consistiu na adição de células do tipo COS-7 em várias placas, sendo rinsadas com a solução de poliplexos e incubadas durante 24 horas. Após este tempo as culturas celulares foram “alimentadas” com glicose e novamente incubadas por mais 48 horas a 37°C sob atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂). O segundo experimento de transfecção foi realizado na adição de células do tipo OVCAR-3, cuja metodologia de transfecção foi realizada como descrita anteriormente.

Segundo os autores, o homopolímero de DMAEMA com baixa massa molar (4 KDa), apresentou menor citotoxicidade e maior eficiência de transfecção, viabilizando a atividade celular do tipo COS-7 em 79%. Entretanto, a citotoxicidade deste polímero, na cultura de células OVCAR-3, foi maior, visto que 68% dessas células permaneceram “vivas”. Quanto ao homopolímero de DMAEMA com alta massa molar (309 KDa), este apresentou maior citotoxicidade que aquele de menor massa molar (4 KDa), pois na transfecção do plasmídeo (PCMV-LACZ) em células COS-7, 56% das células permaneceram em atividade, porém no segundo experimento empregando as células OVCAR-3, o PDMAEMA apresentou uma citotoxicidade maior destruindo 52% da cultura celular.

Com este trabalho os autores puderam afirmar que a massa molar do PDMAEMA influenciou na eficiência da transfecção e neste caso quanto menor a massa molar do polímero, menor será a citotoxicidade. Outra conclusão foi com relação à eficiência de transfecção em tipos diferentes de células, pois como demonstrado pelos autores, o mesmo poliplexo poderia apresentar diferentes citotoxicidades conforme o tipo de célula na qual estava sendo realizada a transfecção.

WETERING *et al.* (2000) estudaram a citotoxicidade do PDMAEMA, copolímeros constituídos de etoxitrietenoglicolmetacrilato (triEGMA) ou ainda, DMAEMA e a N-vinilpirrolidona (NVP) na transfecção de plasmídeo de DNA.

Neste trabalho os autores avaliaram a influência da massa molar e a composição química dos polímeros na sua citotoxicidade. Os polímeros foram sintetizados por polimerização radicalar empregando-se AIBN como iniciador e tolueno como solvente. As reações foram conduzidas sob atmosfera de nitrogênio à 60°C durante 22 horas. Após este período de reação, o polímero formado foi precipitado em éter dietílico a 4°C e seco a vácuo. A complexação do plasmídeo (PCNV-LACZ) com os polímeros de DMAEMA foi realizada em meio de solução de NaCl em pH 7,4. Esta complexação consistiu na mistura física do plasmídeo e do polímero catiônico durante um período que variou de 30 a 75 minutos. O experimento de transfecção consistiu na adição de células do tipo OVCAR 3 em várias placas, sendo rinsadas e incubadas com solução de polímero-plasmídeo (poliplexos) durante 24 horas. Após este tempo as colônias celulares foram “alimentadas” com glicose e novamente incubadas por mais 48 horas. Este trabalho permitiu aos autores afirmarem que o PDMAEMA de alta ou baixa massa molar apresentava um alto grau de toxicidade durante a transfecção do gene. Entretanto, os copolímeros formados de DMAEMA e triEGMA ou NVP apresentaram menor citotoxicidade do PDMAEMA e com isso aumentou a eficiência de transfecção do polímero, viabilizando a atividade celular.

Segundo os autores, quanto maior a massa molar do homopolímero do PDMAEMA menor foi o diâmetro do poliplexo, no entanto maior foi a sua citotoxicidade. De acordo com os autores o menor diâmetro de poliplexo foi obtido empregando o copolímero de DMAEMA E NVP na proporção de 46/54. Assim, concluíram que copolímeros de DMAEMA e triEGMA ou copolímeros de DMAEMA e NVP diminuem significativamente o grau de toxicidade do DMAEMA. A redução de densidade de carga de DMAEMA é um dos atrativos para otimizar a razão entre eficiência/toxicidade dos polímeros como agentes transfectantes.

TAKEDA *et al.* (2004) pesquisaram a eficiência de transfecção *in vitro* de homopolímeros de DMAEMA ou copolímeros de DMAEMA, N-isopropilacrilamida

(NIPAAm) e butilmetacrilato (BMA). Os polímeros foram sintetizados utilizando a AIBN como iniciador e como solvente o tetrahidrofurano (THF). A temperatura de reação foi de 60°C durante 15 horas. Os copolímeros formados foram precipitados em éter etílico e seco sob vácuo. Após a secagem, foram dispersos em água a 4°C e dialisados por 24 horas. Para o homopolímero de DMAEMA, foi utilizado como solvente o dimetilformamida (DMF). Segundo os pesquisadores, todos os polímeros preparados apresentaram baixa citotoxicidade e o melhor resultado de transfecção foi obtido utilizando homopolímero de DMAEMA, o qual obteve 98% de viabilidade celular após a transfecção.

Dessa maneira é possível verificar que o tratamento de gene consiste em utilizar como vetor um polímero catiônico de baixa ou nula toxicidade para aumentar a eficiência de transfecção. Esse polímero deve apresentar baixa massa molar, pois diminui a toxicidade, viabilizando a atividade celular e conseguindo substituir o gene causador da doença, retardando ou até mesmo curando as doenças relacionadas às imperfeições ou ao mau funcionamento do DNA.

FUNHOFF *et al.* (2005) estudaram a eficiência de transfecção *in vitro* de copolímeros em bloco formados por dimetilaminoetilmetacrilato e butilmetacrilato - PDMAEMA-b-PBMA e o copolímero butilmetacrilato e etilenoglicol - PBMA-b-PEG. Os polímeros foram sintetizados por polimerização via radical livre "viva", empregando o mecanismo ATRP. Nas polimerizações utilizaram como iniciador o AIBN e como solvente o THF durante 15 horas a 60°C. Após a purificação do PDMAEMA, do PBMA e do PEG, esses polímeros foram empregados como macroiniciadores para a formação dos copolímeros de PDMAEMA-b-PBMA e dos copolímeros de PBMA-b-PEG. Os copolímeros formados foram sintetizados à 90°C, empregando Cu(I)Br e N-(n-propil)-2-Piridilmetanimina como metal e agente ligante, e tolueno como solvente. Após o tempo de reação, os copolímeros foram colocados na estufa para a evaporação do solvente e seco sob vácuo durante 8 horas.

Segundo os autores, os copolímeros de PDMAEMA-b-PBMA apresentaram o menor diâmetro de partícula devido a complexação das cargas positivas do PDMAEMA com as cargas negativas dos grupos fosfatos presentes na estrutura

química do DNA. Todos os polímeros sintetizados apresentaram baixa citotoxicidade e o copolímero de PDMAEMA-b-PBMA apresentou 95% de viabilidade celular após a transfecção.

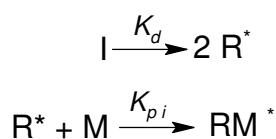
2.2- Polimerização via radical livre convencional.

As polimerizações radicalares são reações em cadeia iniciadas pela adição de um radical livre a um monômero que contenha uma ou mais duplas ligações primárias apresentando quatro diferentes componentes reacionais: a iniciação, a propagação, a transferência de cadeia e a terminação, todas com velocidade e mecanismos diferentes. A forma mais corrente de obter os radicais consiste na decomposição térmica de um iniciador que deve ter uma ligação química suficientemente frágil para se decompor homoliticamente, mas deve, por outro lado, ser suficientemente estável à temperatura ambiente para poder ser armazenado em segurança (SZWARC, 1956).

Os principais tipos de iniciadores químicos usados são os compostos azóicos, dos quais o mais conhecido é o AIBN que se decompõe com a perda de N_2 e dois radicais livres. Os peróxidos, hidroperóxidos e peroxiésteres além dos organometálicos que contêm um oxidante e um redutor que formam radicais intermediários capazes de iniciar a polimerização. Alguns desses iniciadores liberam radicais livres somente acima de determinadas temperaturas, enquanto outros se decompõem sob a ação da luz ultravioleta. Do conhecimento desse comportamento decorre a sua escolha, bem como as condições de polimerização (SZWARC, 1956).

O esquema abaixo apresenta as reações envolvidas a cada etapa em uma polimerização via radical livre convencional.

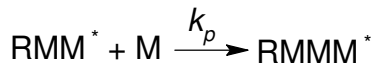
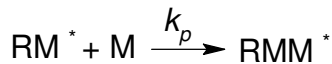
✦ Iniciação: decomposição do iniciador



K_d ...coeficiente de dissociação do iniciador.

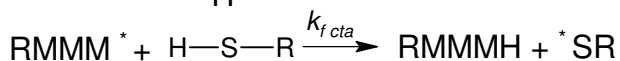
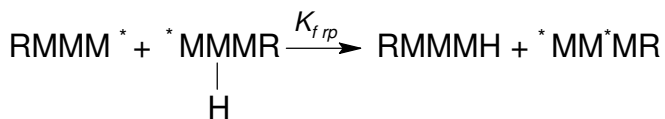
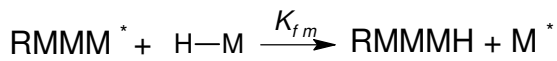
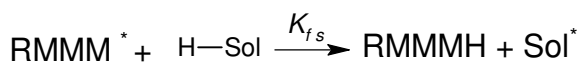
K_{pi} ...coeficiente de propagação do iniciador.

♦ Propagação: é a fase do crescimento da macromolécula, o radical monomérico formado na iniciação se adiciona à molécula do monômero, formando-se um novo radical monomérico, de cadeia maior, e assim sucessivamente (SZWARC, 1956).



K_p ...coeficiente de propagação

♦ Transferência de Cadeia: essa etapa envolve a transferência do átomo do radical com outras moléculas finalizando o sítio ativo da cadeia polimérica, por exemplo, a transferência de um átomo da molécula do solvente, do iniciador, do próprio radical polimérico ou de uma molécula colocada no meio reacional propositadamente, a qual é chamada de agente de transferência de cadeia (SZWARC, 1956).



$K_{f,s}$...coeficiente de transferência por meio da molécula do solvente.

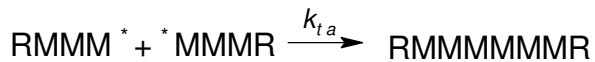
$K_{f,m}$...coeficiente de transferência por meio da molécula do monômero.

$K_{f,rp}$...coeficiente de transferência por meio do radical polimérico.

$K_{f,cta}$...coeficiente de transferência por meio do agente de transferência de cadeia.

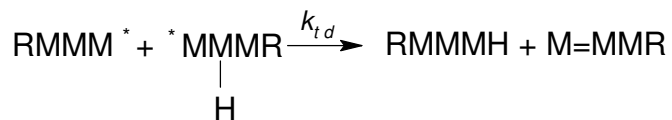
✦ Terminação: quando ocorre a desativação de uma macromolécula em crescimento chamamos de terminação, podendo ocorrer de duas maneiras distintas:

▲ por acoplamento ou combinação: quando a terminação ocorre pela reação de dois radicais livres, o processo é chamado de terminação por acoplamento ou combinação (SZWARC, 1956).



K_{ta} ...coeficiente de terminação por acoplamento.

▲ por desproporcionamento: quando é causada pela transferência de um átomo de hidrogênio de uma cadeia para outra cadeia em crescimento, saturando-se uma extremidade e criando-se uma dupla ligação na extremidade da outra cadeia, esse processo é chamado de desproporcionamento (BILLMEYER *et al.* 1962).



K_{td} ...coeficiente de terminação por desproporcionamento.

BOYER *et al.* (2004) estudaram a síntese de homopolímeros de DMAEMA empregando uma mercaptana como agente de transferência de cadeia. Os homopolímeros de DMAEMA foram sintetizados via radical livre clássica empregando AIBN como iniciador, 2-mercaptoetanol como agente de transferência de cadeia e como solventes, foram estudados quatro tipos: água, uma mistura contendo 25% de água e 75% de acetonitrila, acetonitrila e benzeno. As reações foram conduzidas à 70°C durante 14 horas. Após o período de reação, os polímeros sintetizados foram precipitados em hexano e secos a vácuo.

Segundo os autores, foi possível verificar que os homopolímeros sintetizados em água apresentaram uma massa molar de 11500 e índice de polidispersidade de 11,5. Já os homopolímeros sintetizados empregando como

solvente o benzeno, apresentaram uma massa molar de 860 e índice de polidispersidade de 1,6. De acordo com os autores, empregando solventes orgânicos, como o benzeno, é possível obter polímeros bem distribuídos com massa molar e polidispersidade bem menores quando comparados com polímeros obtidos a partir de solventes polares como a água.

2.3- Polimerização via radical livre “viva”

A polimerização via radical livre “viva” foi descoberta por (SZWARC, 1956; SZWARC *et al.* 1956) Segundo o autor, uma polimerização para ser considerada viva deve obedecer aos seguintes requisitos:

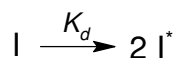
- ✓ O processo de polimerização deverá ter 100% de conversão. A adição de uma nova carga de monômero deverá dar continuidade à polimerização, ou seja, não existe a terminação das cadeias poliméricas;
- ✓ A massa molar média é linearmente dependente da conversão;
- ✓ O número de cadeias poliméricas é constante durante a polimerização;
- ✓ A massa molar pode ser controlada pela relação entre as concentrações de iniciador e de monômero;
- ✓ A polidispersão (distribuição de massas molares) do polímero é baixa;
- ✓ A funcionalidade das extremidades das cadeias poliméricas pode ser obtida quantitativamente;

Portanto, por definição, pela técnica de polimerização via radical livre “viva” é possível preparar macromoléculas complexas de maneira controlada. O grau de polimerização pode ser previamente definido pela razão entre a concentração de monômero e de iniciador.

A polimerização via radical livre “viva” pode ser iniciada e controlada por vários mecanismos: polimerização por radical estável (SRP) (SENDIL *et al.* 1999), polimerização por transferência reversível de átomo (ATRP) (MOES, 1989), polimerização por transferência, fragmentação e adição reversíveis (RAFT) (CAMMAS *et al.* 1992), etc. O mecanismo de RAFT é utilizado na polimerização de vários tipos de monômeros, podendo ser conduzida em diferentes solventes e

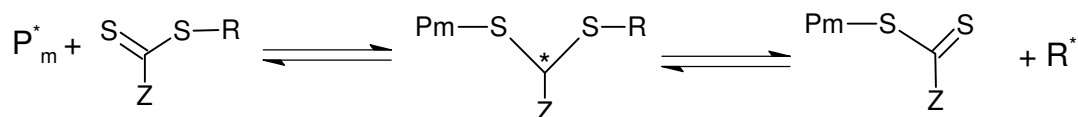
sob várias condições de reação. Neste mecanismo, um agente de transferência de cadeia (CTA_{RAFT}), do tipo ditioéster, S=C(Z)-SR, reage com um radical primário proveniente da decomposição de um iniciador ou com um macroradical (Pm*), dando origem a um novo CTA_{RAFT} e a um radical (R*), o qual é capaz de reiniciar a polimerização. A reação é então controlada pelo equilíbrio existente entre os estados de dormência e de atividade do CTA_{RAFT} na extremidade da cadeia polimérica. O controle da massa molar pode ser feito pela monitoração da quantidade de monômero adicionada no meio reacional. Já a funcionalização das extremidades das cadeias poliméricas dependerá da natureza dos substituintes Z e R, presentes no CTA_{RAFT}. O mecanismo a seguir apresenta as reações envolvidas a cada etapa em uma polimerização RAFT (YOSHIDA *et al.* 1992; SERRES *et al.* 1996; OKATATA *et al.* 1982; KOWOLLIK *et al.* 2001).

* Iniciação



K_d ...coeficiente de dissociação do iniciador.

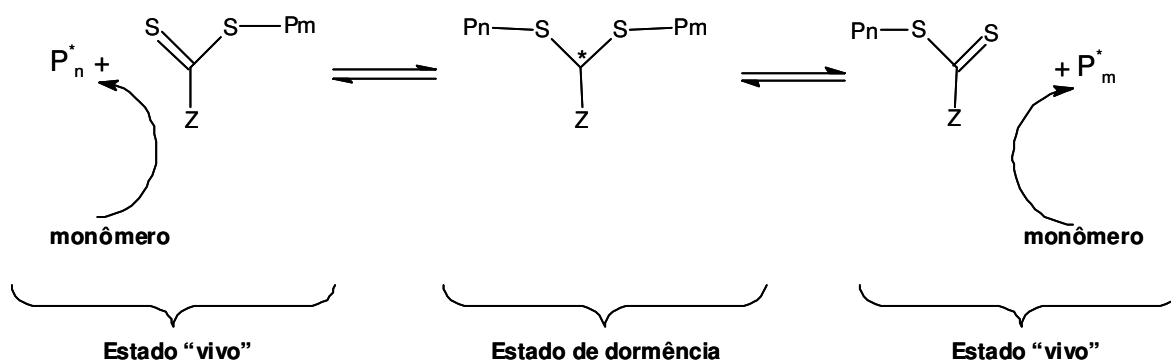
* Transferência de Cadeia



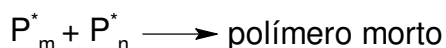
* Reiniciação e Propagação



* Etapa de Equilíbrio



* Terminação



Atualmente, vários pesquisadores estão sintetizando agentes de transferência de cadeia com grupos R e Z diferentes (KOWOLLIK *et al.* 2001). A figura 7 representa a estrutura genérica do CTA_{RAFT} utilizado nas polimerizações. De acordo com a literatura (CHIEFARI *et al.* 2003) a escolha das funcionalidades do CTA_{RAFT} é de fundamental importância para o sucesso da polimerização via RAFT.

Outra característica importante do CTA_{RAFT} é a sua afinidade química com determinados monômeros em relação a outros, como por exemplo, CTAs_{RAFT} que apresentam como grupos R e Z o fenil e o benzil são muito eficientes nas polimerizações de monômeros do tipo acrilatos. Com isso, vários trabalhos da literatura estudaram a síntese de diferentes CTAs_{RAFT}, testando sua eficiência com diversos monômeros.

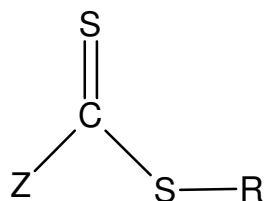


Figura 7. Agente de transferência de cadeia utilizado nas polimerizações RAFT.

CHONG *et al.* (1999) prepararam copolímeros em bloco de metacrilato de benzila e DMAEMA em duas etapas em meio de acetato de etila, empregando como CTA_{RAFT} uma molécula que apresentava Z = Fenil e R = -C(CH₃)₂Fenil. O

poli(metacrilato de benzila) foi sintetizado primeiro, apresentando massa molar de 1800 com polidispersidade 1,13 e em seguida foi polimerizado o DMAEMA, com massa molar de 3500 e polidispersidade de 1,06.

THANG *et al.* (1999) sintetizaram vários agentes de transferência de cadeia (CTA) do tipo ditioéster empregados nas polimerizações “vivas”. Segundo os autores, foram sintetizados CTA's substituindo o grupo R e o grupo Z por diferentes estruturas químicas. O grupo R foi substituído por vários radicais como por exemplo: fenil, $-C_4H_4N$, $-(CH_3)_2N$, $-CH_3CH_2O$ e $-CH_3S$ e o grupo Z foi substituído por $-C(CH_3)(CN)(CH_2CH_2COOH)$, $-C(CH_3)(CN)(CH_2CH_2CH_2OH)$ e $-C(CH_3)_2(CN)$. Na síntese dos CTA's com o substituinte R, foi empregado como solvente o acetato de etila em refluxo à $70^\circ C$ durante 18 horas e para os agentes com o substituinte Z, foi empregado como solvente o benzeno em refluxo à $70^\circ C$ durante 24 horas. De acordo com os autores, esses agentes foram sintetizados para reagirem com diferentes monômeros em polimerizações via radical “viva”, controlando a massa molar das cadeias poliméricas.

Dentre os trabalhos encontrados na literatura destaca-se o trabalho de CHONG *et al.* (2003). Neste trabalho os autores sintetizaram agentes de transferência de cadeia, substituindo o grupo R da extremidade por diferentes radicais, como por exemplo: $-C(Alquil)_2CN$, $-C(Me)_2Ar$, $-C(Me)_2C(=O)O(Alquil)$, $-C(Me)_2C(=O)NH(Alquil)$, $-C(Me)_2CH_2C(Me)_3$, $-C(Me)HFenil$, $-C(Me)_3$, $-CH_2Fenil$, $-C(Me)_2Fenil$, $-C(Me)_2CN$. Após a síntese desses agentes, foi estudada a eficiência desses grupos funcionais no controle da massa molar e da polidispersidade durante a polimerização via radical livre “viva”. Para efetuar este estudo, os autores utilizaram o metacrilato de metila- (MMA), estireno-(Sty) e o acrilato de butila-(BA) como monômeros. As polimerizações foram realizadas à $60^\circ C$ durante 8 horas sob atmosfera de nitrogênio, utilizando AIBN como iniciador e benzeno como solvente. De acordo com os autores, na polimerização do MMA, apenas os CTAs_{RAFT} que continham como radical R os grupos $-C(Me)_2Fenil$ e $-C(Me)_2CN$ apresentaram bons resultados de controle de massa molar e polidispersidade. Os CTAs_{RAFT} que continham os grupos $C(Me)_2C(=O)O(Alquil)$, -

$C(Me)_2C(=O)NH(Alquil)$, $-C(Me)_2CH_2C(Me)_3$, $-C(Me)HFenil$, $-C(Me)_3$ e $-CH_2Fenil$ apresentaram baixo coeficiente de transferência e por este motivo não foram eficientes na polimerização do MMA. No caso da polimerização do Sty e do BA, de acordo com os autores, todos os $CTAs_{RAFT}$ apresentaram alto coeficiente de transferência polimerizando com eficiência estes monômeros.

Em um outro estudo, CHIEFARI *et al.* (2003), sintetizaram vários agentes de transferência de cadeia, substituindo o grupo Z da extremidade por diferentes grupos funcionais, a fim de verificar a eficiência destes na polimerização via radical livre “viva”. Os grupos Z utilizados por estes autores foram: -Fenil, -SCH₂Fenil, -SMe, -Me, -N-pirrol, -OC₆F₅, -N-lactam, -OC₆H₅, -O(Alquil), -N(Alquil)₂. Para avaliar a reatividade dos $CTAs_{RAFT}$ os autores utilizaram estireno (Sty) como monômero e AIBN como iniciador. As polimerizações foram conduzidas em massa na temperatura de 110°C. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o desempenho dos $CTAs_{RAFT}$ na polimerização via radical livre “viva” do STy decresce conforme a seguinte série de grupos Z: ditiobenzoatos > tritiocarbonatos > ditioalcanoatos > ditiocarbonatos > ditiocarbamatos.

Já existem alguns trabalhos encontrados na literatura que empregaram o mecanismo RAFT para polimerizar o DMAEMA. No entanto, o objetivo maior destes trabalhos não foi o estudo detalhado da síntese do PDMAEMA, mas sim o estudo da síntese de vários polímeros, tais como: Poli(metacrilato de metila)-PMMA, Poli(metacrilato de butila)-PBA, Poli(ácido acrílico)-PAA, Poli(estireno)-PSty, Poli(estireno sulfonato de sódio)-STySO₃Na, Poli(benzoato de vinila), e copolímeros em bloco de Sty e N,N-dimetilacrilamida (DMA); BA e (ácido acrílico)-AA; Metacrilato de benzila e DMAEMA. Com estes trabalhos já foram possíveis obter informações importantes sobre, como primeiramente, a possibilidade da síntese deste polímero pelo mecanismo RAFT, o solvente empregado na polimerização (acetato de etila) e o mais importante, os resultados encontrados por estes autores na polimerização do DMAEMA via RAFT.

CHIEFARI *et al.* (2003) obtiveram uma conversão de 62% em 16 horas de reação, formando um polímero com massa molar média igual a 21.500 e

polidispersidade de 1,13. Neste trabalho os autores utilizaram um CTA_{RAFT} com as seguintes funcionalidades: Z = Fenil e R = $C(CH_3)(CN)CH_2CH_2CO_2H$.

D'AGOSTO *et al.* (*in press*), estudaram a síntese do PDMAEMA via polimerização via radical livre “viva”, empregando o mecanismo RAFT. Os homopolímeros de DMAEMA foram sintetizados utilizando AIBN como iniciador, dioxano como solvente e como agente de transferência de cadeia o 2-cianopropil ditiobenzoato (CPDB). As reações foram conduzidas sob atmosfera de nitrogênio à 90°C durante 6 horas. Após o período de reação, o dioxano foi evaporado sob pressão reduzida e o polímero foi solubilizado em 20 ml de dicloroetano. A solução de polímero foi então precipitada em 600ml de éter etílico gelado por 4 horas. O sobrenadante foi removido e o polímero viscoso foi re-solubilizado por 3 vezes em 20 ml de dicloroetano. O solvente foi evaporado à baixo vácuo e o polímero foi seco por 8 horas a 0°C. De acordo com esta metodologia, foram sintetizados vários homopolímeros de DMAEMA, variando a concentração de monômero e a razão de agente de transferência de cadeia/iniciador ($CTA_{RAFT}/AIBN$) verificando a influência destes parâmetros na síntese do PDMAEMA.

Segundo os autores, quanto menor for a razão entre $CTA_{RAFT}/monômero$, maior será a conversão das reações considerando que a relação entre $CTA_{RAFT}/AIBN$ permaneça constante. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, em duas horas de reação é possível obter um rendimento de 80%, apesar de existir um tempo de inibição apresentado por todas as polimerizações.

Os autores utilizaram a técnica MALDITOF para determinar as massas molares dos polímeros. Segundo eles, os valores das massas molares reais foram próximos dos valores das massas molares teóricos e todas as polimerizações apresentaram baixo índice de polidispersidade. Com esta análise, os autores puderam concluir que, empregando o CPDB como agente de transferência de cadeia, este controla o crescimento dos polímeros garantindo o sucesso da polimerização.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Este projeto tem como objetivo sintetizar e caracterizar um polímero catiônico, o poli(dimetilaminoetilmetacrilato)-PDMAEMA que poderá ser utilizado como vetor não-viral para utilização em tratamento em Terapia Gênica ou na funcionalização de partículas biodegradáveis de aplicação na liberação controlada de fármacos.

3.2- Objetivos específicos

Para cumprir o objetivo geral foram realizadas as seguintes etapas:

- ✓ Purificação dos reagentes (monômero, iniciador)
- ✓ Síntese do PDMAEMA funcionalizado, via radical livre clássica empregando como CTA_c, o ácido 3-mercaptopropiônico;
- ✓ Síntese do PDMAEMA funcionalizado, via radical livre “viva” usando o ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico como CTA 1;
- ✓ Síntese do PDMAEMA funcionalizado, via radical livre “viva” usando o ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico como CTA 2;
- ✓ Síntese de um novo agente de transferência de cadeia, o ácido 4-ciano-4-tiobenzoilsulfanilpentanóico – CTA 3;
- ✓ Síntese do PDMAEMA funcionalizado, via radical livre “viva” usando o ácido 4-ciano-4-tiobenzoilsulfanilpentanóico – CTA 3;
- ✓ Síntese de copolímeros em bloco do DMAEMA e do poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) - PHBV;
- ✓ Formação de partículas a partir de copolímeros em bloco de PDMAEMA-b-PHBV;
- ✓ Caracterização da funcionalidade do PDMAEMA por Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H)
- ✓ Determinação das massas molares dos polímeros e copolímeros sintetizados por meio da técnica de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC);

✓ Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) das partículas formadas.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Materiais

O monômero utilizado na síntese do polímero catiônico funcionalizado foi o 2-dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEMA) (Aldrich, 98%).

Na síntese do polímero via radical livre convencional foi utilizado um CTA_c, o ácido 3-mercaptopropiônico (Sigma, 99%), que promove a funcionalização carboxílica das extremidades das cadeias do PDMAEMA e o 2,2'-azo-bis-isobutironitrila (AIBN) como iniciador. A reação foi realizada em meio orgânico utilizando o solvente 1,4-dioxano (Carlo Erba).

O PDMAEMA, foi sintetizado via radical livre “viva” empregando o mecanismo (RAFT). Nessa síntese foram utilizados três CTA's_{RAFT} funcionalizados: o ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico – CTA₁, o ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico – CTA₂, ambos sintetizados no Laboratório de Química Fina do DEQUI-FAENQUIL. O terceiro agente de transferência de cadeia, o ácido 4-ciano-4-tiobenzoilsulfanilpentanóico – CTA₃, foi sintetizado no Laboratório de Polímeros do DEQUI-FAENQUIL. Nessa síntese foram utilizados os seguintes reagentes: dissulfeto de carbono (Merck), ácido 4,4'-azobis(4-cianopentanóico) (Dupont) e brometo de benzil magnésio. O brometo de benzil magnésio (Agente de Grignard) foi sintetizado utilizando magnésio metálico e brometo de benzila (Aldrich). Estas reações foram realizadas em meio de tetrahidrofurano (THF) anidro. O THF (Carlo Erba) de grau HPLC foi seco utilizando sódio metálico e benzofenona como indicador. Na etapa de purificação do CTA₃ foram utilizados acetato de etila e hexano na razão 2:3 (Anidrol), sulfato de magnésio (Merck), sílica 70/230 mesh (Aldrich) e metanol (Carlo Erba). Após a purificação, o CTA₃ foi caracterizado utilizando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H).

Ao final das polimerizações os agentes de transferência de cadeia RAFT (CTA₁, CTA₂ ou CTA₃), funcionalizam as extremidades das cadeias dos polímeros com grupos carboxílicos. Na síntese do polímero via radical livre “viva”, foi empregado AIBN como iniciador e como solvente o 1,4-dioxano (Anidrol), o tetrahydrofurano (THF) (Carlo Erba 99%), o etanol absoluto (Anidrol), o acetato de etila (EtOAc) (Anidrol), e o metanol (Anidrol).

Para a preparação das nanopartículas foi utilizado como comonômeros, o poli(hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato) – PHBV com massa molar de 15672 e índice de polidispersidade – IP - igual a 1,85 e o PDMAEMA purificado e sintetizado anteriormente pelas técnicas de polimerização via radical livre convencional e via radical livre “viva”. O solvente empregado nesta síntese foi o clorofórmio – CHCl₃ (Anidrol), e como agentes ativadores o 1.1'-carbonildiimidazole (CDI) e o 4-dimetilaminopiridina (DMAP).

Na caracterização dos polímeros por análises de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) foi utilizado como eluente THF HPLC (Mallinckrodt-Baker). E na caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi utilizado como solvente clorofórmio deuterado (CDCl₃) (Aldrich 99%) e água deuterada (D₂O) (Aldrich 99%).

4.2- Métodos

4.2.1- Purificação do monômero

O DMAEMA foi purificado por destilação simples a 60°C sob pressão reduzida.

4.2.2- Purificação de 2,2' azo-bis-isobutironitrila (AIBN)

O AIBN foi purificado por recristalização em etanol absoluto, de acordo com a seguinte metodologia: 7g de AIBN foram dissolvidas em 70mL de etanol absoluto e a mistura foi colocada sob agitação e refluxo (45°C) por 30 minutos. Em

seguida a solução foi resfriada a 0°C e após 1 hora de resfriamento os cristais foram filtrados em filtro de vidro sinterizado (Porosidade 0) e secos sob vácuo durante 11 horas a temperatura ambiente.

4.2.3- Secagem do 1,4-Dioxano

O 1,4-dioxano foi primeiramente deixado sob refluxo na presença de hidreto de lítio e alumínio (AlLiH₄) por 30 minutos e posteriormente destilado sob pressão atmosférica local, ainda na presença deste hidreto, para remoção da água.

4.2.4- Síntese do ácido 4-ciano-4-tiobenzoilsulfanilpentanóico - CTA₃.

Secagem do THF

O THF utilizado nesta síntese foi submetido a um processo de secagem utilizando sódio metálico e benzofenona. A secagem do THF foi realizada de acordo com a seguinte metodologia: em um balão de 1000 mL foram colocados 500 mL de THF, sódio metálico e benzofenona. O sistema foi mantido sob agitação magnética e aquecimento na temperatura de ebulição do THF. O sistema ficou em refluxo, até que ocorresse a mudança de coloração do indicador, passando de incolor para azul. Após a mudança de coloração o THF foi destilado sob pressão atmosférica local e transferido para o meio reacional utilizando seringa de vidro.

Síntese do agente de Grignard

O brometo de benzil magnésio foi obtido através da reação entre o brometo de benzila e magnésio metálico. Esta síntese foi realizada em meio de THF anidro em um balão de 100 mL. Neste balão foram colocados 40 mL de THF e 1,24g de magnésio metálico; em seguida, com o auxílio de um funil de adição, foram adicionados 8,7g (6,1 mL) de brometo de benzila diluídos em 20 mL de THF anidro. Esta adição foi realizada gota a gota, sob agitação magnética e banho de gelo. A reação foi conduzida por 16 horas a temperatura ambiente e ao final deste

tempo, o magnésio metálico que não reagiu foi filtrado e o produto transferido para um segundo balão de 100 mL, onde foi realizada a síntese do CTA₃.

Síntese do CTA₃

O ácido 4-ciano-4-tiobenzóisulfanilpentanóico foi sintetizado de acordo com a metodologia descrita por D'Agosto, *et al.* (2003). Em um balão de 100 mL, foram adicionados 10 g do agente de Grignard e 5,80g (4,60 mL) de dissulfeto de carbono, lentamente, sob agitação e em banho de gelo. Após a adição, o sistema reacional ficou sob agitação até o aparecimento de uma coloração vermelha. Decorrido este tempo, foram adicionados 7,83g (4,60 mL) de ácido 4,4'-azobis(4-cianopentanóico), lentamente, sob agitação e em banho de gelo. Após a adição do ácido, a reação foi conduzida por 18 horas em éter etílico e ao final deste tempo, o produto da reação foi submetido a um processo de purificação. A figura 8 representa o esquema da síntese do CTA₃.

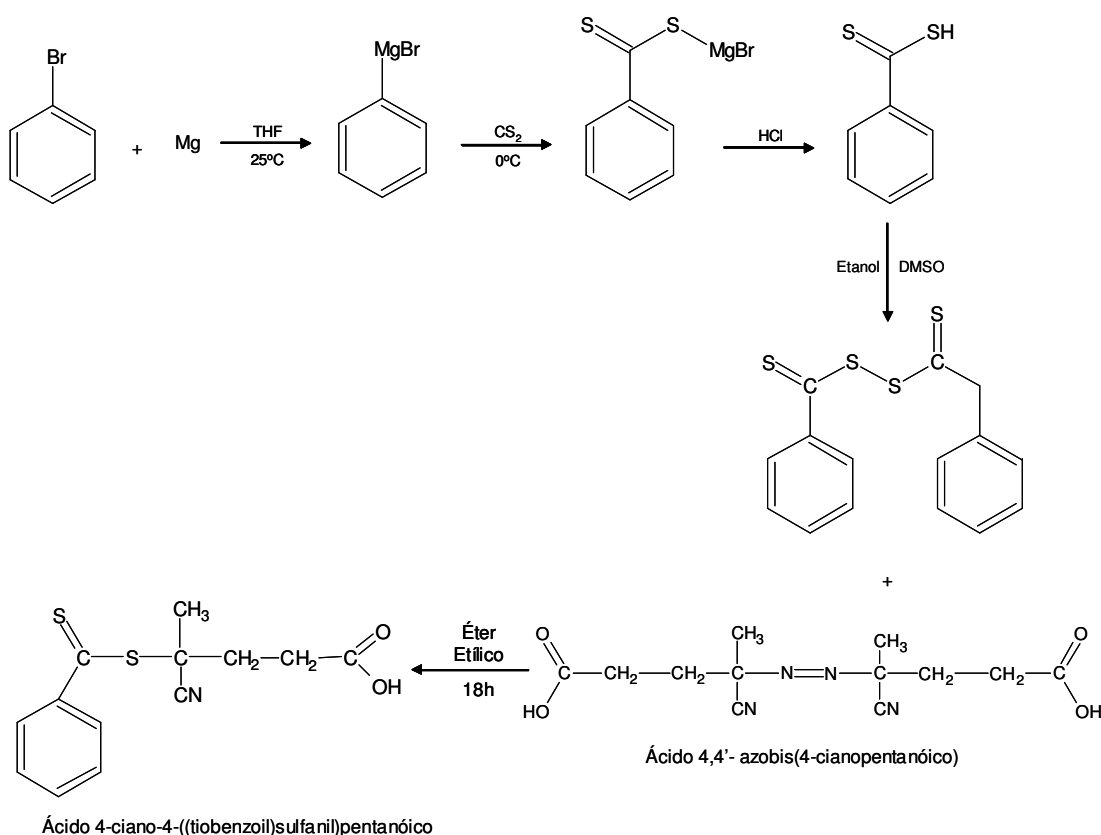


Figura 8. Esquema representativo da síntese do CTA₃.

Purificação do CTA₃

Este processo de purificação consistiu na diluição do produto em 200 mL de acetato de etila. Após esta diluição, o acetato de etila e o éter etílico foram evaporados utilizando um rota-vapor. A reação foi acompanhada utilizando-se a técnica de Cromatografia de Camada Delgada.

Separação do CTA₃ utilizando coluna cromatográfica

O CTA₃ foi separado dos subprodutos de reação por meio de uma coluna cromatográfica de sílica utilizando uma mistura na razão de 2:3 de acetato de etila e hexano como eluente. A coluna foi preenchida com sílica com granulometria de 70/230 mesh, numa proporção de 30g de sílica por grama de amostra e deixada em repouso por uma noite. Decorrido este tempo, 3g de amostra purificada, foi colocada na coluna e uma primeira fração de produto foi separada, com o auxílio de uma mistura de acetato de etila/hexano (2:3) como eluente. As frações foram concentradas utilizando rota-vapor e submetidas a análise de RMN ¹H para identificar a estrutura química do produto obtido. A figura 9 representa o esquema de purificação do CTA₃.

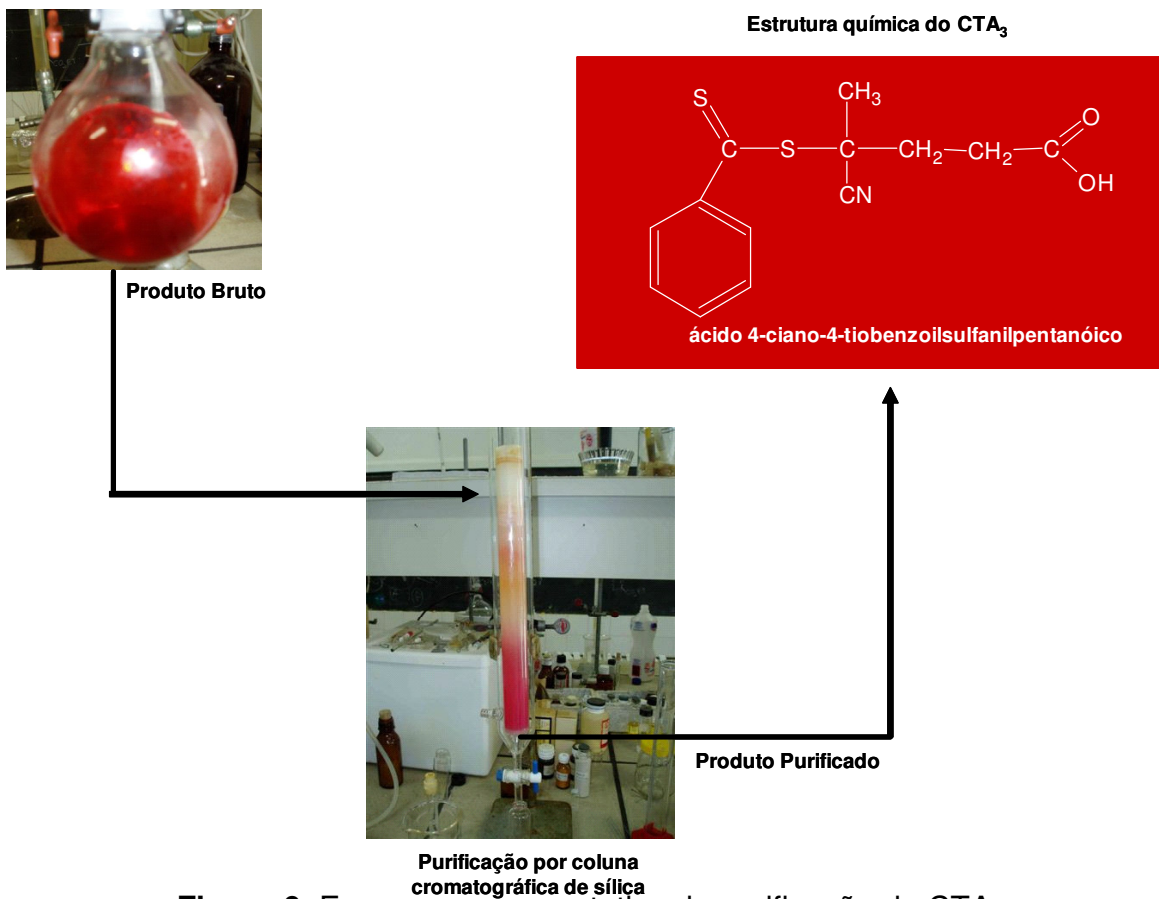


Figura 9. Esquema representativo da purificação do CTA₃.

4.2.5- Síntese do PDMAEMA funcionalizado via radical livre convencional

O PDMAEMA foi sintetizado via radical livre convencional em meio ao 1,4-Dioxano, utilizando o ácido 3-mercaptopropiônico como agente de transferência de cadeia e como iniciador o AIBN. A figura 10 apresenta o esquema de reação. As polimerizações foram conduzidas a 70°C durante 5 horas em um reator com três bocas, de vidro e encamisado, de 100 mL de capacidade. Este reator foi equipado com um sistema de agitação magnética, um condensador de refluxo, e um borbulhador de nitrogênio (todas as reações foram realizadas em atmosfera inerte, ou seja, livre de oxigênio, que é um forte inibidor). O controle da temperatura foi realizado por intermédio de um banho termostático (figura 11).

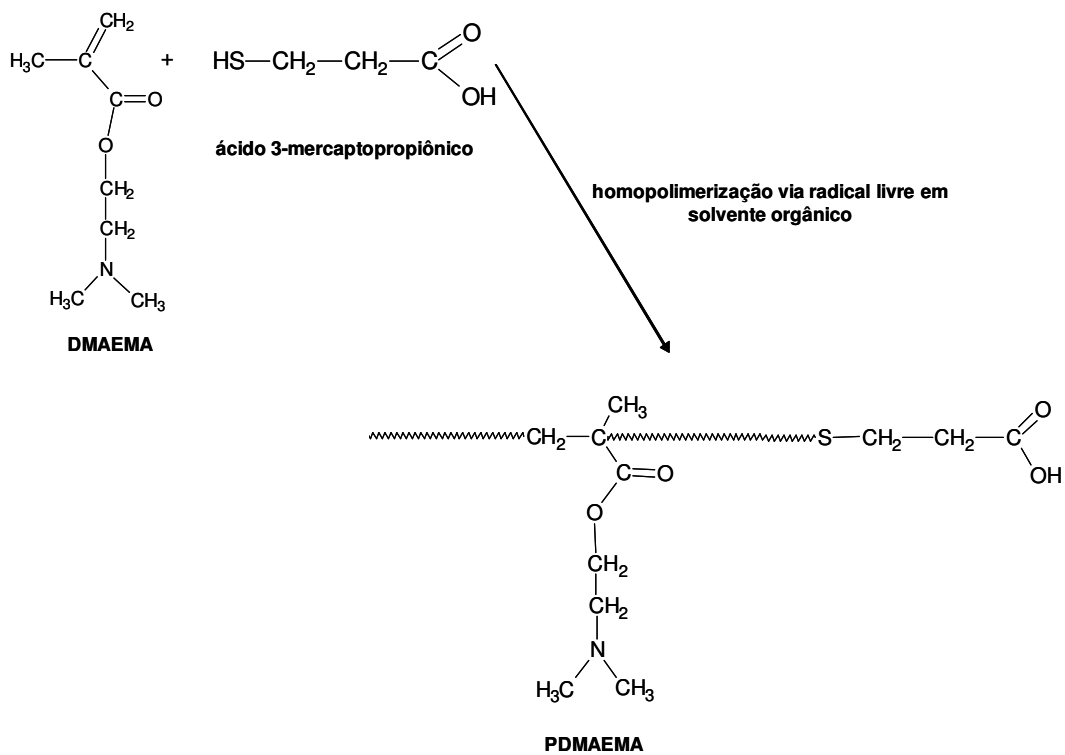


Figura 10. Síntese do PDMAEMA via radical livre convencional

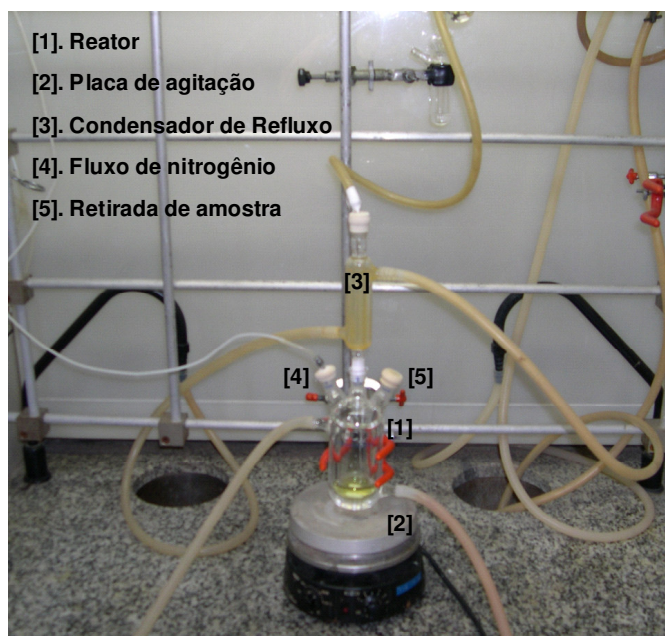


Figura 11. Sistema de polimerização que esta sendo utilizado na síntese do PDMAEMA.

4.2.6– Síntese do pDMAEMA funcionalizado via radical livre “viva”

Nessa etapa, utilizou-se como iniciador o AIBN e como agentes de transferência de cadeia (CTA_{RAFT}), ou o (ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico), (ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico) e o (ácido 4-ciano-4-tiobenzoilsulfanilpentanóico) que reagiram com as unidades de monômero DMAEMA de acordo com os esquemas descritos nas figuras 12, 13 e 14 (mecanismo RAFT).

As polimerizações foram realizadas em um reator de vidro encamisado, de capacidade igual a 100mL (figura 11). As reações foram conduzidas sob atmosfera de nitrogênio e agitação magnética a uma temperatura de 70°C. Primeiramente, o reator foi carregado com o monômero, CTA e o padrão interno (trioxano), e em seguida foi adicionado aproximadamente 75% do volume total de solvente e purgado com nitrogênio durante 20 minutos. Enquanto isso, o iniciador (AIBN) foi pesado separadamente e solubilizado nos 25% restantes do volume total de solvente e purgado com nitrogênio durante 20 minutos. Atingida a temperatura desejada, a reação foi então iniciada pela adição da solução de iniciador ao meio reacional. A quantidade de iniciador utilizada nas reações foi calculada em função da quantidade de CTA_{RAFT} .

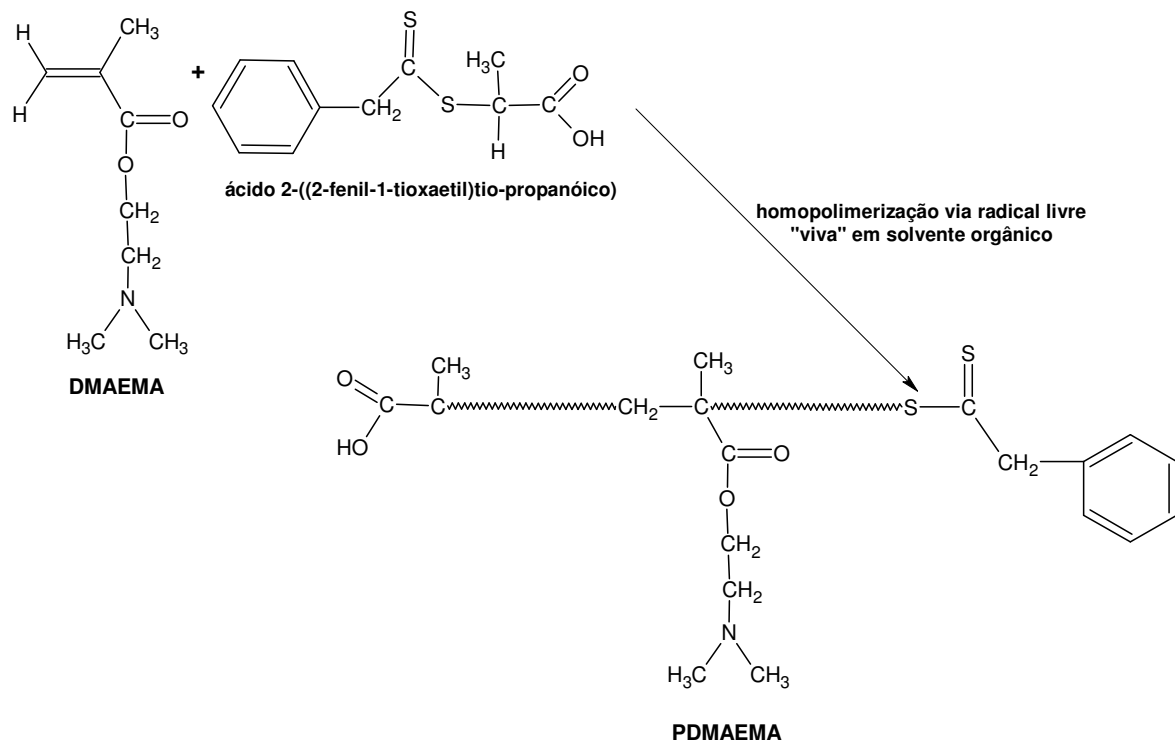


Figura 12. Síntese do PDMAEMA pelo mecanismo RAFT com CTA₁.

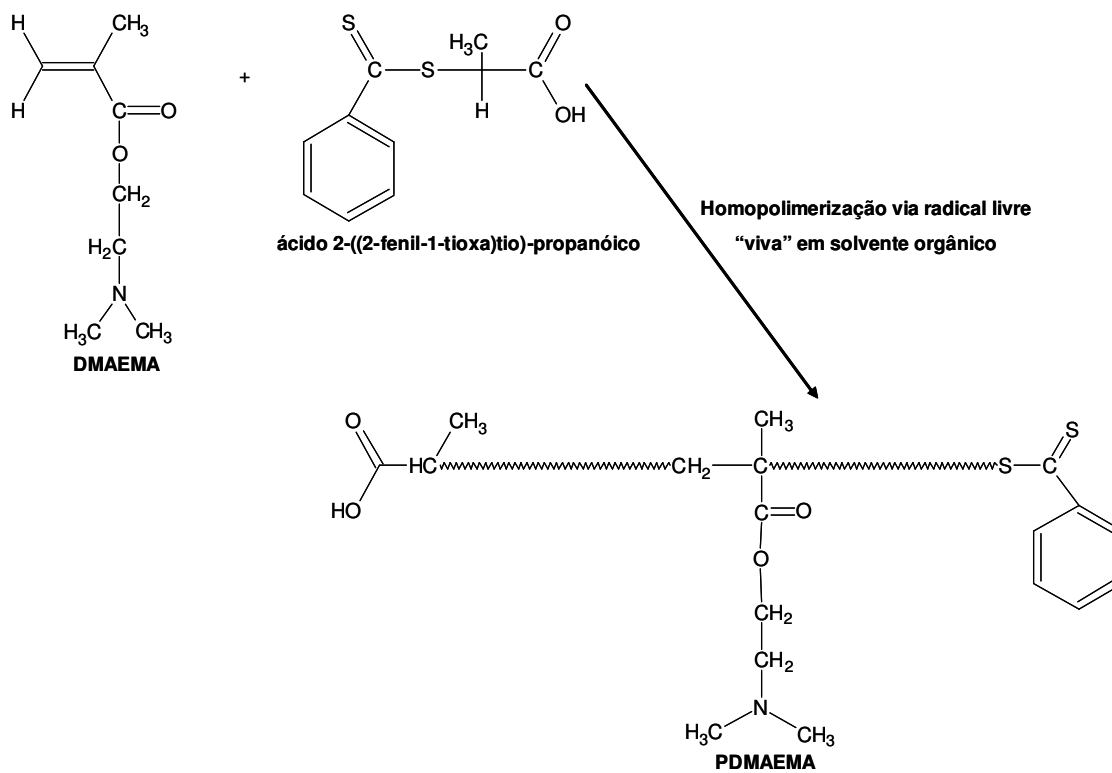


Figura 13. Síntese do PDMAEMA pelo mecanismo RAFT com CTA₂.

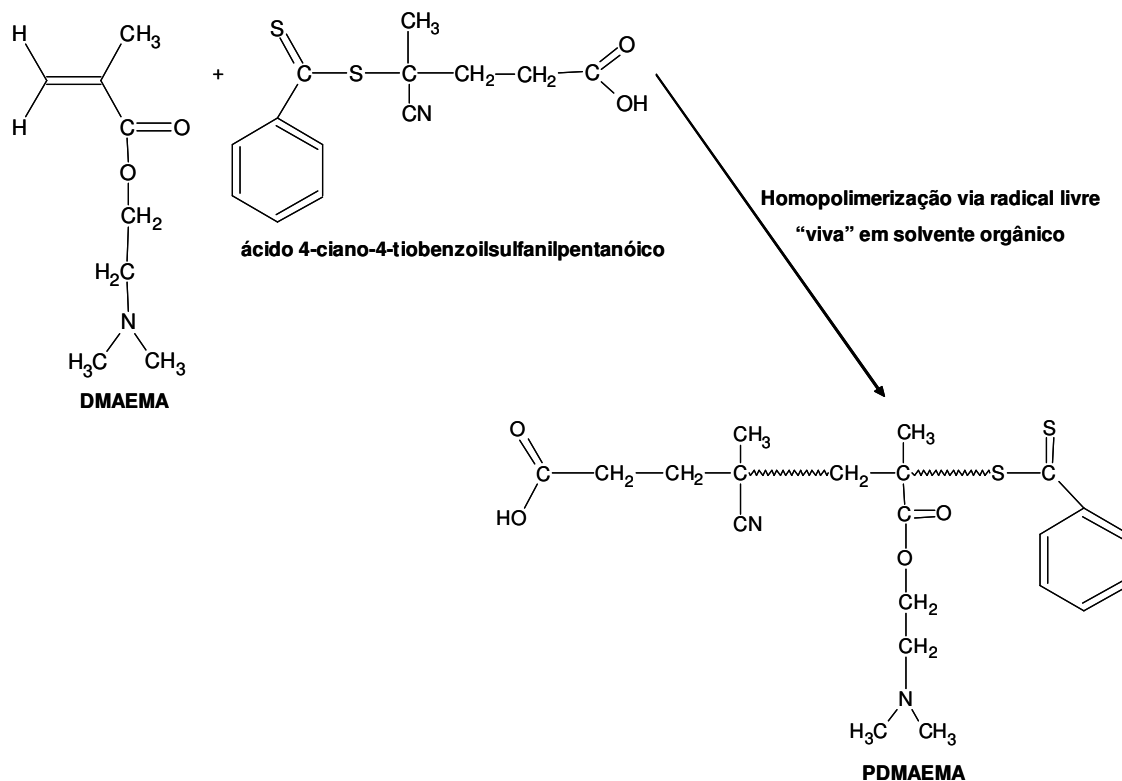


Figura 14. Síntese do PDMAEMA pelo mecanismo RAFT com CTA₃.

Cálculo da Massa Molar Teórica

A massa molar teórica foi calculada empregando-se a seguinte equação (CHONG *et al.* 1999):

$$M_n = \frac{[M] \cdot MM_M}{[CTA]} + MM_{CTA} \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

M_n = Massa Molar teórica;

[M] = concentração molar do monômero (mol/L);

[CTA] = concentração molar do CTA (mol/L);

MM_M = massa molar do monômero (g/mol);

MM_{CTA} = massa molar do CTA (g/mol).

Determinação da massa de padrão interno

A determinação da massa de padrão interno empregado em cada reação foi determinada em função do número de moles do monômero e o número de prótons do padrão interno, para uma equivalência de área de picos nos espectros de RMN ^1H :

$$N_{\text{PI}} = \frac{N_{\text{M}}}{H_{\text{PI}}} \quad (\text{Equação 2})$$

onde:

N_{PI} = Número de moles do padrão interno;

N_{M} = Número de moles do monômero;

H_{PI} = Número de prótons do padrão interno (6 para o trioxano)

Metodologia de estudo da Cinética de reação por RMN ^1H

A cinética das reações de polimerização foram estudadas empregando-se a técnica de RMN ^1H , por meio de amostras coletadas em diferentes tempos de reação. Ao serem retiradas das reações, as amostras foram introduzidas em um banho de gelo para finalizar a reação, e pequenas alíquotas destas amostras foram solubilizadas em um solvente adequado (CDCl_3) e submetidas às análises.

Nos espectros de RMN ^1H das amostras, o deslocamento correspondente ao trioxano (5,1 ppm) foi integrado e à sua área foi atribuído o valor 1,00. Este valor permanece constante ao longo de toda reação, pois o trioxano não participa da reação. Com este valor de área como referência, foram integrados os

deslocamentos correspondentes aos prótons da dupla ligação do monômero (5,6-6,2 ppm) (figura 15). Os valores das áreas obtidas por integração dos prótons da dupla ligação diminuem ao longo da reação, indicando assim o consumo dos monômeros e formação dos polímeros. Dessa forma foi possível calcular a conversão da reação, utilizando a seguinte equação:

$$X[\%] = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

$X[\%]$ = conversão da reação de polimerização;

A_0 = Área do deslocamento do próton da dupla ligação no tempo zero (0);

A_t = Área do deslocamento do próton da dupla ligação num tempo conhecido (t).

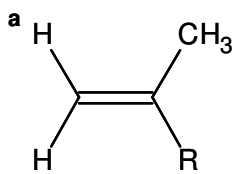


Figura 15: Estrutura química genérica do monômero, a= próton cujo deslocamento foi integrado nos espectros de RMN ^1H .

4.2.7- Purificação do PDMAEMA

O polímero sintetizado foi purificado por precipitação em éter etílico por três vezes e em banho de gelo, para garantir a purificação total do polímero sintetizado. Após a purificação, o polímero precipitado e purificado foi seco em estufa de circulação de ar a 40°C.

4.2.8- Síntese dos copolímeros em bloco do PDMAEMA-b-PHBV.

Na síntese dos copolímeros em bloco foi empregado o poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) – PHBV e os homopolímeros de PDMAEMA sintetizados via radical livre convencional ou o PDMAEMA sintetizado pelo mecanismo RAFT.

Em um reator de vidro encamisado com capacidade de 100ml e sob agitação magnética (figura11), foram adicionados 8ml de clorofórmio (CHCl_3), 0,100g de PDMAEMA purificado, e 0,0100g de 1,1'carbonildiimidazole (CDI) para ativação dos grupos carboxílicos presentes na estrutura química do PDMAEMA. Após a adição, a reação ficou agitando por 1 hora a temperatura ambiente e fluxo de nitrogênio para a ativação. Decorrido o tempo de ativação, a temperatura foi elevada para 55°C e foi adicionado no sistema reacional uma solução contendo 7 ml de CHCl_3 , 0,050g de PHBV, 0,005g de 4-dimetilaminopiridina (DMAP). O DMAP foi usado para a ativação das hidroxilas que constituem a estrutura química do PHBV. O tempo de reação após a adição da solução de PHBV foi de 24 horas.

4.2.9- Miscelização dos copolímeros em bloco do PDMAEMA-b-PHBV.

Os copolímeros em bloco de PDMAEMA-b-PHBV, foram miscelizados em água e em uma mistura de água e acetona (1:1). Em um béquer e sob forte agitação magnética, foram adicionados 20 ml de água deionizada e 1 ml da reação de copolímeros foi gotejado lentamente. Após a adição dos copolímeros, o sistema ficou agitando por 24 horas para a evaporação do CHCl_3 . O mesmo procedimento foi realizado na miscelização com água e acetona.

4.2.10- Caracterização do PDMAEMA

Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H)

As amostras de PDMAEMA sintetizadas via RAFT foram caracterizadas empregando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H) em um

equipamento da marca Varian, modelo Oxford 300 do Laboratório de Química Fina do DEQUI/FAENQUIL. A preparação das amostras foi feita do seguinte modo: 50µL de cada amostra foram adicionadas a um tubo específico para RMN ^1H e diluídas em 400 µL de clorofórmio deuterado (CDCl_3).

Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

As massa molares do PDMAEMA foram determinadas utilizando a técnica de Cromatografia de Permeação de Gel (GPC) em um equipamento da Waters, modelo Breeze com detector RI modelo 2414 e injetor automático 717 do Laboratório de Polímeros/DEQUI/FAENQUIL e as curvas de calibração foram realizadas empregando padrões de poli(metacrilato de metila) - PMMA. Foram preparadas soluções poliméricas com THF HPLC a uma concentração de 10mg/mL, usando filtros para solventes orgânicos com membrana PTFE modificada 0,45µm (Millipore). As amostras foram filtradas e adicionadas em frasco de 2ml antes de serem injetadas no aparelho. A quantidade injetada de solução polimérica foi de 100µL durante 40 minutos. Utilizou-se como eluente THF HPLC num fluxo de 1ml/min e temperatura interna das colunas de 35°C.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As análises de microscopia eletrônicas foram realizadas na faculdade de medicina da USP em um equipamento marca JEOL, modelo JEM – 1010. As amostras foram diluídas e gotejadas sob uma grade de cobre e colocadas em uma estufa para secagem durante 10 minutos. Após o tempo de secagem, a amostra foi colocada no porta-espécime do microscópio eletrônico de transmissão, pelo qual foi possível visualizar a morfologia das partículas.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Síntese do PDMAEMA funcionalizado via radical livre convencional

Nesta etapa do projeto foi realizada uma série de experimentos nos quais procurou-se variar os seguintes parâmetros: quantidade monomérica, quantidade de CTA_c e quantidade de AIBN.

O objetivo desse trabalho como já mencionado foi sintetizar e caracterizar o PDMAEMA via radical livre “viva”, empregando o mecanismo RAFT e comparar com o PDMAEMA sintetizado e caracterizado pelo mecanismo convencional.

A primeira fase desse trabalho foi avaliar a influência da quantidade monomérica e da quantidade de CTA_c no meio reacional. Primeiramente, foram realizadas 5 reações variando a quantidade de monômero no meio reacional, e posteriormente, foram realizadas 4 reações variando a quantidade de CTA_c. Por meio da técnica de GPC foi possível verificar os valores das massas molares e índice de polidispersidade - IP dos produtos obtidos. Com base nesses resultados foi possível então, dependendo da quantidade de monômero e da quantidade de CTA_c empregados no sistema reacional, sintetizar o PDMAEMA com outros valores de massas molares e IP.

A Tabela 1 apresenta os dados de formulação, conversão e massa molar de cada uma das cinco reações realizadas variando a concentração de monômero. Os valores de conversão foram obtidos a partir da técnica de RMN ¹H e os valores de massas molares e IP das análises de GPC.

De acordo com os resultados apresentados pela análise de RMN ¹H da Tabela 1, foi possível verificar que todas as reações de polimerização apresentaram conversão entre 50 e 60% e que o aumento da concentração monomérica no meio reacional influenciou a massa molar final das cadeias poliméricas. A análise dos resultados de GPC do produto da reação 1 na qual foi utilizada 1,00g de monômero permitiu obter uma massa molar de 2297 com índice de polidispersidade IP de 1,75. A adição de uma quantidade cinco vezes maior de monômero no meio reacional provocou um aumento da massa molar para 8086

com pouca variação no IP, o qual nesse caso foi de 1,77. Com esse estudo, pode-se verificar que o aumento da quantidade de monômero no meio reacional, aumentou a massa molar final dos polímeros, conforme esperado. Com relação aos valores de IP, verificou-se que em todas as reações, os polímeros formados apresentaram tamanhos diferentes, ou seja, várias famílias de PDMAEMA com uma larga distribuição.

É característica da polimerização convencional, obter polímeros com alto índice de polidispersidade, devido o crescimento desordenado das macromoléculas. Desse modo, os resultados apresentados na tabela 1 demonstram que os polímeros formados apresentaram uma larga dispersão, variando de 1,71 até 1,77 e quanto maior for a polidispersidade, maior é o número de famílias poliméricas.

Esses resultados foram coerentes com os resultados encontrados na literatura. YOSHIDA *et al.* (1993), estudaram a síntese do MMA empregando como agente de transferência de cadeia o ácido 3- mercaptoetanóico, AIBN como iniciador e THF como solvente, durante 8 horas a 60°C. Os autores sintetizaram o MMA com diferentes concentrações no meio reacional. De acordo com os resultados, ao empregar uma concentração de 2 mol/L, o polímero formado apresentou massa molar de 3246 e IP de 1,68 e ao empregar uma concentração de quatro molar, a massa molar foi 7235 e IP de 2,03.

Tabela 1. Resultados obtidos nas polimerizações realizadas variando a quantidade de DMAEMA.

Reação	Monômero (g)	CTA _c (g)	AIBN (g)	Trioxano (g)	Conversão [%]	Massa Molar	IP
1	1,000	0,0213	0,0023	0,0956	59,14	2297	1,75
2	2,000	0,0213	0,0023	0,2130	51,09	5061	1,72
3	3,000	0,0213	0,0023	0,2866	52,78	5872	1,73
4	4,000	0,0213	0,0023	0,3822	53,33	6357	1,71
5	5,000	0,0213	0,0023	0,4777	52,31	8086	1,77

Temperatura: 70°C; Solvente: 8,5 mL de Dioxano; Tempo de reação: 5 horas e atmosfera de N₂

O agente de transferência de cadeia - CTA tem como função controlar o crescimento das macromoléculas no meio reacional e dependendo do tipo do CTA empregado, funcionalizar as extremidades dos polímeros formados, para serem empregados como macrorradicais.

O CTA_c empregado neste estudo foi o ácido 3- mercaptopropiônico que além de controlar o crescimento das macromoléculas, funcionaliza as extremidades das cadeias com grupos carboxílicos.

A Tabela 2 apresenta os dados de formulação, conversão e massa molar das reações realizadas variando a quantidade de CTA_c. De acordo com os resultados apresentados, a conversão da reação 1 foi de 51,09% com massa molar de 5061 e IP 1,72, enquanto que empregando uma quantidade de CTA_c quatro vezes maior (reação 4), pode-se verificar que a massa molar final do polímero formado foi de 2817 e IP 1,73 com uma conversão de 54,92%. Desse modo, conclui-se que o aumento da quantidade de CTA_c empregado diminui e controla o crescimento das cadeias poliméricas.

Esses resultados foram satisfatórios quando comparados com os resultados obtidos por Boyer *et al.* (2004) que estudaram a influência do CTA_c 2-mercaptoetanol empregando o monômero DMAEMA, AIBN como iniciador e benzeno como solvente, durante 8 horas a 70°C . Segundo os resultados obtidos pelos autores, ao empregar o triplo da concentração de CTA_c, a massa molar do PDMAEMA foi de 6140 com IP de 1,73 e conversão monomérica de 78% para 3230 com IP de 1,75 e conversão monomérica de polimerização de 80%. De acordo com esses resultados, quanto maior for a adição do CTA_c no meio reacional, maior será o coeficiente de transferência de cadeia.

Tabela 2. Resultados obtidos nas polimerizações realizadas variando a quantidade de CTA_c.

Reação	Monômero (g)	CTA _c (g)	AIBN (g)	Trioxano (g)	Conversão [%]	Massa Molar	IP
1	2,230	0,0213	0,0023	0,2130	51,09	5061	1,72
2	2,230	0,0426	0,0023	0,2130	54,34	3924	1,76

3	2,230	0,0639	0,0023	0,2130	55,71	3190	1,74
4	2,230	0,0852	0,0023	0,2130	54,92	2817	1,73

Temperatura: 70°C; Solvente: 8,5 mL de Dioxano; Tempo de reação: 5 horas e atmosfera de N₂

A segunda fase desse trabalho foi avaliar a influencia da quantidade de AIBN no sistema reacional. Nesse estudo foram realizadas 4 reações aumentando a massa de AIBN e por meio de GPC foi observado que nesse caso, o aumento de iniciador não influenciou, significativamente, a massa molar final e IP do polímero formado, e por meio de RMN ¹H, foi possível verificar as conversões das polymerizações, as quais não variaram com o aumento de AIBN.

A Tabela 3 apresenta os dados de formulação, conversão e massa molar das reações realizadas nesse estudo. De acordo com os resultados apresentados, pode-se verificar que a conversão na reação 1 foi de 51,09% com massa molar de 5061 e IP 1,72 e com o aumento da concentração de AIBN, reação 4, a conversão foi de 56,71% com massa molar de 5501 e IP 1,73. Com esse estudo, conclui-se que o aumento da quantidade de AIBN no meio reacional não influencia a polymerização.

ROBIN, *et al.* (2003) sintetizaram o PDMAEMA empregando AIBN como iniciador, 2-mercaptoetanol como CTA_c, 1,4-dioxano como solvente e o tempo de reação para atingir 90% de conversão foi de 14 horas a 70°C. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, a massa molar do PDMAEMA foi de 5156 com IP 1,74 e 87% de conversão e ao adicionar uma concentração cinco vezes maior, a massa molar final do DMAEMA foi de 5873 com IP de 1,76 e conversão monomérica de 90%.

Segundo os autores, os radicais formados na decomposição do AIBN, na etapa de iniciação, reagem com as unidades monoméricas presentes no meio reacional durante o tempo de reação. Quando aumenta a concentração de AIBN no meio reacional, aumenta a formação de radicais que reagem com as unidades monoméricas, logo o consumo de monômero é mais rápido no início da polymerização. Entretanto, nas condições experimentais citadas anteriormente, as reações com DMAEMA via radical livre convencional são lentas, precisando de 14 horas para obter 90% de conversão.

Tabela 3. Resultados obtidos nas polimerizações realizadas variando a quantidade de AIBN.

Reação	Monômero (g)	CTA _c (g)	AIBN (g)	Trioxano (g)	Conversão [%]	Massa Molar	IP
1	2,230	0,0213	0,0023	0,2130	51,09	5061	1,72
2	2,230	0,0213	0,0046	0,2130	52,38	4986	1,76
3	2,230	0,0213	0,0069	0,2130	51,18	5088	1,78
4	2,230	0,0213	0,0092	0,2130	56,71	5501	1,73

Temperatura: 70°C; Solvente: 8,5 mL de Dioxano; Tempo de reação: 5 horas e atmosfera de N₂.

Devido o tempo reacional ter sido de 5 horas, todas as reações da primeira e segunda etapa apresentaram valores de conversão entre 50% e 60%. Entretanto, como foi citado no início deste capítulo, o objetivo desse trabalho foi de comparar os resultados obtidos com o PDMAEMA sintetizado pelo mecanismo RAFT, com os resultados obtidos na síntese do PDMAEMA via radical livre convencional, sem levar em conta a velocidade de polimerização.

De acordo com os resultados satisfatórios obtidos na primeira e segunda fase desse trabalho, foi dado início à terceira fase em que foi realizada uma série de experimentos estimando a massa molar de 1000, 3000, 10000 e 40000. Os polímeros sintetizados e caracterizados foram empregados em reações de acoplamento com o PHBV, e posteriormente, na formação de partículas biodegradáveis.

Nessas reações, optou-se por variar a quantidade de CTA_c mantendo constantes as massas de monômero e de AIBN, pois, quanto maior a quantidade de CTA_c no meio reacional, menor foi o tamanho das macromoléculas.

A Tabela 4 apresenta os dados de formulação, conversão e massa molar das reações realizadas nesse estudo. Os valores de conversões apresentados foram obtidos pela técnica de RMN ¹H e os valores de massa molar foram obtidos por GPC.

De acordo com os resultados apresentados, os polímeros sintetizados apresentaram um desvio nos valores de massa molar real quando comparados com os valores de massas molares estimados.

Esses resultados foram coerentes com os resultados obtidos por FUNHOFF *et al.* (2005) em que sintetizaram o PDMAEMA para ser empregado como macroradical em reações de acoplamento com o PBMA. Após a purificação do PDMAEMA, este foi caracterizado pela técnica de GPC, utilizando como eluente o THF HPLC e para a calibração foi empregado o PMMA.

De acordo com os resultados de GPC, os valores de massas molares obtidos do PDMAEMA foram maiores que os valores estimados. Segundo os autores, o valor de massa molar teórico seria de 2000 e o valor da massa molar real foi de 3800. De acordo com os autores, ao empregar o PMMA como padrão de calibração, por conta desse possuir um volume hidrodinâmico menor quando comparado com o volume hidrodinâmico do PDMAEMA, ocorre um desvio do valor da massa molar real com o valor da massa molar teórica.

Tabela 4. Resultados obtidos nas polymerizações do DMAEMA empregando o CTA_c.

Reação	Monômero (g)	CTA _c (g)	AIBN (g)	Trioxano (g)	Conversão [%]	Massa Molar	IP
1 ^a	2,230	0,1278	0,0023	0,2130	55,17	2805	1,73
2 ^b	2,230	0,0852	0,0023	0,2130	54,43	2817	1,77
3 ^c	2,230	0,0325	0,0023	0,2130	56,81	8834	1,75
4 ^d	2,230	0,0153	0,0023	0,2130	55,85	21034	1,74

Temperatura: 70°; Solvente: 8,5 mL de Dioxano; Tempo de reação: 5 horas e atmosfera de N₂; massas molares estimadas: ^a1000; ^b3000; ^c10000 e ^d40000.

Na quarta etapa desse trabalho foi realizado um experimento para verificar o comportamento da reação de polymerização via radical livre convencional ao adicionar uma nova carga de monômero. A reação foi conduzida a 85°C sob atmosfera de N₂ durante 5 horas. A tabela 5 apresenta a formulação empregada nessa síntese. No início da reação foi retirada uma alíquota e após o tempo de reação (5h), foi retirada a segunda alíquota. Em seguida, foi adicionada a mesma quantidade de monômero no meio reacional, mantendo as mesmas condições

experimentais e deixou-se reagir por mais cinco horas. Assim o tempo reacional final foi de 10 horas. Após as 10 horas de reação foi retirada a terceira alíquota.

As alíquotas retiradas foram caracterizadas pelas técnicas de RMN ^1H e GPC. De acordo com os resultados apresentados na tabela 6, pode-se verificar que no primeiro intervalo de 5 horas de reação, a conversão foi de 62% com massa molar de 7410 e IP de 1,71. Já no segundo intervalo de 5 horas de reação, a conversão foi de 79% e a massa molar final foi de 9650 e IP de 2,5. Com esse estudo, verificou-se que haviam sido formadas várias famílias de polímeros com massas molares diferentes, apresentando uma larga faixa de distribuição, e por conseqüência, um aumento no valor do IP.

Tabela 5. Formulação empregada na polimerização do DMAEMA em duas etapas.

Reação	Monômero (g)	CTA _c (g)	AIBN (g)	Trioxano (g)
1	2,230	0,0213	0,0023	0,2130

Temperatura: 85°C; Solvente: 8,5 mL de Dioxano; Tempo de reação: 5 horas e atmosfera de N₂.

Tabela 6. Resultados obtidos na polimerização do DMAEMA em duas etapas.

Conversão [%]	MM	IP
62	7410	1,71
79	9650	2,52

5.2– Síntese do PDMAEMA funcionalizado via radical livre “viva”

Nesta fase do trabalho experimental foram realizadas algumas reações preliminares de preparação de PDMAEMA via RAFT. Estas reações foram realizadas empregando como agente de transferência de cadeia o ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico, o CTA₁. A figura 16 apresenta o agente de transferência de cadeia utilizado no primeiro estudo do projeto.

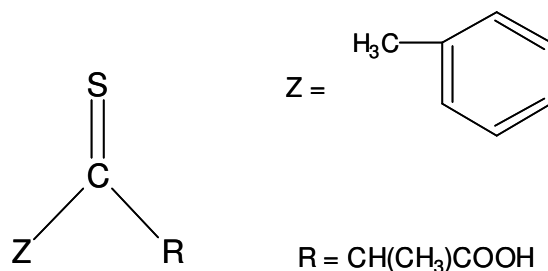


Figura 16. Agente de transferência de cadeia (CTA₁) utilizado nas polimerizações RAFT.

Neste primeiro estudo foram utilizados cinco solventes diferentes: 1,4-dioxano, THF, acetato de etila, etanol e uma mistura de metanol e água na proporção de 4:1. Os valores de conversão foram obtidos a partir da técnica de RMN ¹H empregando como padrão interno o trioxano e os valores de massas molares e IP foram caracterizados por GPC. A Tabela 7 apresenta as formulações, as conversões e os valores das massas molares finais das reações de síntese do PDMAEMA via radical livre “viva” (RAFT). De acordo com estes resultados foi possível verificar que a reação 4 foi aquela que apresentou a maior conversão, pois em 5 horas de reação esta atingiu uma conversão de 54,68%. A reação 1 empregou 1,4-dioxano como solvente e apresentou a menor conversão e atingiu 48,17%.

Esta diferença nos valores de conversão poderia ser atribuída, à primeira vista, aos solventes utilizados, pois na maioria dos trabalhos da literatura que

empregaram RAFT como mecanismo de polimerização utilizaram 1,4-dioxano como solvente. RIZZARDO *et al.* (2000), utilizaram o 1,4-dioxano como solvente para sintetizar o N-isopropilacrilamida (NIPAM). Segundo os autores, deve-se empregar um solvente com baixo coeficiente de transferência de cadeia, pois na etapa de dormência do mecanismo RAFT, o radical intermediário deve entrar em ressonância para garantir o crescimento controlado das macromoléculas.

O resultado obtido na reação 3 foi bastante satisfatório, uma vez que a literatura apresenta resultados de conversão na ordem de 62% em 16 horas de reação (CHIEFARI *et al.* 2003). Neste caso, o aumento na conversão na polimerização do DMAEMA, comparado ao resultado encontrado na literatura, poderia ser atribuído à mudança do solvente empregado na síntese, uma vez que na reação 1 foi utilizado 1,4-dioxano e CHIEFARI *et al.* (2003), nos seus estudos, utilizaram acetato de etila como solvente.

De acordo com LOISEAU *et al.* (2003), a polaridade influencia significativamente a taxa de polimerização pelo mecanismo RAFT. Segundo os autores, quanto maior a polaridade do solvente maior é a conversão de polimerização. Neste caso, a polaridade do 1,4-dioxano é de $K' = 4,8$ e do acetato de etila é de $k' = 4,3$, e esta informação pode ser utilizada para confirmar a influência do tipo de solvente no mecanismo RAFT, deixando evidente que o 1,4-dioxano é mais indicado que o acetato de etila para a polimerização do DMAEMA pelo mecanismo RAFT. Um outro resultado que poderia ser utilizado para confirmar esta hipótese (tipo de solvente) seria o apresentado pela reação 3, a qual foi conduzida em meio acetato de etila, e apresentou uma conversão de 52,71% com 5 horas de reação, resultado este próximo aquele obtido por CHIEFARI *et al.* (2003).

Tabela 7. Resultados obtidos na polimerização do DMAEMA empregando vários solventes.

Reação	Monômero (g)	CTA ₁ (g)	AIBN (g)	Trioxano (g)	Conversão [%]	Massa Molar	IP
1 ^a	1,557	0,0150	0,0024	0,1490	48,17	20284	1,12
2 ^b	1,557	0,0150	0,0024	0,1490	53,14	21471	1,24
3 ^c	1,557	0,0150	0,0024	0,1490	52,71	32381	1,30
4 ^d	1,557	0,0150	0,0024	0,1490	54,68	30968	1,34
5 ^e	1,557	0,0150	0,0024	0,1490	53,27	20310	1,13

Temperatura: 70°; Tempo de reação: 5 horas e atmosfera de N₂; 8,5 mL de Solvente: ^a1,4- Dioxano, ^bTHF, ^cEtOAc, ^d Etanol, ^eMetanol/água (4:1).

De acordo com os resultados e com os dados da literatura, a síntese do PDMAEMA via RAFT foi empregado 1,4-dioxano como solvente e AIBN como iniciador.

Em seguida, foi realizada uma série de experimentos para estudar a influencia da concentração de AIBN na síntese do PDMAEMA pelo mecanismo RAFT. A Tabela 8 apresenta os dados experimentais e os resultados de conversão final, massa molar e índice de polidispersidade da homopolimerização do DMAEMA empregando-se duas concentrações diferentes de iniciador (AIBN). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8 é possível verificar que para a reação 1, a conversão final foi maior (58,23% em 5 horas de reação) enquanto que a da reação 2 foi de 48,64% em 5 horas de reação. Este resultado demonstrou a influência da concentração do iniciador na homopolimerização do DMAEMA via RAFT. ZHU *et al.*(*in press*) avaliaram a influência da razão molar CTA_{RAFT}/AIBN na polimerização via RAFT do metacrilato de metila (MMA). De acordo com os autores, quanto menor a razão molar CTA_{RAFT}/AIBN, maior era a conversão. No entanto, nesse estudo o autor mostra que, o aumento da concentração de AIBN no meio reacional provocou um aumento na polidispersidade do polímero formado. Este aumento na velocidade de polimerização e na polidispersidade também foi observado no presente estudo para os homopolímeros de DMAEMA, sendo que para a reação realizada com a

menor razão molar $CTA_{RAFT}/AIBN$ (reação 1) foi obtido um Índice de Polidispersidade (IP) de 1,39 e para a reação 2, realizada com uma razão molar $CTA_{RAFT}/AIBN$ maior, o IP obtido foi de 1,15. Esta diferença no IP pode ser atribuída ao fato de que em maiores concentrações de AIBN mais radicais estariam sendo formados, aumentando desta maneira a quantidade de macrocadeias formadas e conseqüentemente a probabilidade destas macrocadeias sofrerem terminação, desviando desta maneira o mecanismo da reação RAFT para o convencional.

Tabela 8. Resultados obtidos na polimerização do DMAEMA variando a razão molar CTA/AIBN.

Reação	Razão CTA/AIBN	Monômero (g)	CTA_1 (g)	AIBN (g)	Trioxano (g)	Conversão [%]	Massa Molar	IP
1	2/1	0,1952	0,0048	0,0016	0,0187	58,23	8702	1,39
2	4/1	0,4117	0,0098	0,0016	0,0381	48,64	9193	1,15

Temperatura: 70°; Tempo de reação: 5 horas e atmosfera de N_2 e como Solvente: 8,5 mL de 1,4- Dioxano.

De acordo com os resultados obtidos na síntese do PDMAEMA pelo mecanismo RAFT, empregando o CTA_1 (Tabela 7 e 8) e em busca de melhores resultados, foram realizados dois experimentos utilizando dois novos agentes de transferência de cadeia, o ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico como CTA_2 e o ácido 4-ciano-4-tiobenzoilsulfanilpentanóico – CTA_3 . As figuras 17 e 18 representam a estrutura química do CTA_2 e do CTA_3 . A Tabela 9 apresenta a formulação e resultados desse estudo com CTA_2 e CTA_3 .

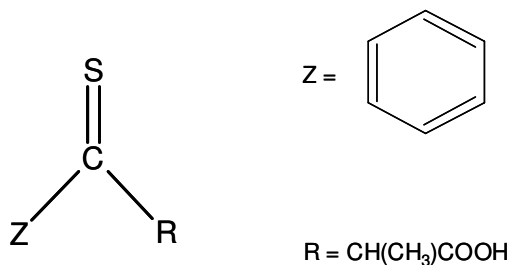


Figura 17. Agente de transferência de cadeia (CTA_2) utilizado nas polimerizações RAFT.

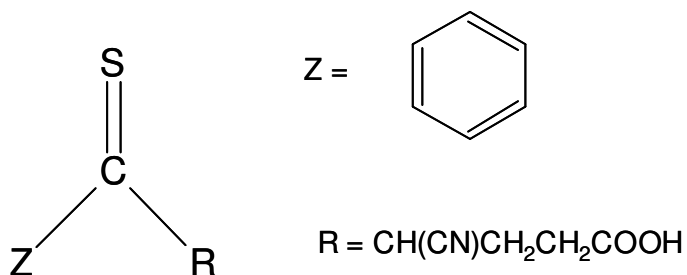


Figura 18. Agente de transferência de cadeia (CTA₃) utilizado nas polimerizações RAFT.

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 9, verifica-se que na presença do CTA₂ e do CTA₃ não ocorreu reação nas mesmas condições daquelas nas quais foram realizadas as polimerizações empregando o CTA₁.

Na síntese do PDMAEMA empregando o CTA₂ não correu reação, pois o grupo “Z” presente na estrutura química do CTA₂ é constituído por um grupo benzila, e na etapa de equilíbrio do mecanismo RAFT, que garante o controle do crescimento da massa molar, o radical intermediário entra em estado de dormência, ou seja, o elétron permanece em ressonância. Ao empregar o CTA₂, o elétron presente do radical intermediário na etapa de dormência entra em ressonância com o grupo benzil. Esse elétron em ressonância no grupo benzil permanece estável e não ocorrem as reações reversíveis, que dariam origem aos polímeros.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos no trabalho realizado por D'AGOSTO *et al.*(2003), onde a utilização do CTA 1 na polimerização da N-acrililormolina (NAM) resultou em uma maior conversão quando comparada com a polimerização deste mesmo monômero utilizando o CTA₂. Segundo estes autores, a diferença de reatividade destes dois CTA's poderia ser explicada pela diferença do grupo “Z” do CTA_{RAFT}, pois o CTA 1 apresenta um grupo fenil e o CTA 2 apresenta um grupo benzil. Como descrito no estudo realizado por FUKUDA *et al.* (2002) os CTA's que apresentam radicais benzil tendem a retardar a polimerização devido a reações reversíveis ou irreversíveis de terminação

promovidas pelos radicais intermediários, dando origem a moléculas ou macromoléculas chamadas de “estrelas”.

Na síntese do PDMAEMA empregando o CTA₃ foi citado o estudo realizado por D’AGOSTO *et al.* (*in press*), no qual os autores estudaram a síntese do PDMAEMA empregando como agente de transferência de cadeia o 2,2’-cianopropilditiobenzoato (CPDB), AIBN como iniciador e como solvente o 1,4-dioxano, durante 6 horas a 90°C e conversão de 90%.

Segundo os autores, os monômeros da família dos metacrilatos são polimerizados pelo mecanismo RAFT empregando um agente de transferência de cadeia, que apresente na sua estrutura química um carbono terciário (grupo “R”). Na etapa de equilíbrio do mecanismo RAFT, o elétron gerado no radical intermediário ao atingir o estado de dormência é repelido pelos grupos presentes do carbono terciário, tornando-se um radical mais reativo e com tempo de vida maior quando comparado com os radicais intermediários gerados por carbono secundário e carbono primário.

De acordo com os resultados da Tabela 9, mesmo o CTA₃ possuindo um carbono terciário, na temperatura que foi sintetizado o PDMAEMA, não ocorreu reação química, visto que esse CTA₃ no mecanismo RAFT se decompõe em altas temperaturas.

Tabela 9. Resultados obtidos na polimerização do DMAEMA empregando o CTA₁, o CTA₂ e o CTA₃.

Reação	Monômero (g)	CTA _{RAFT} (g)	AIBN (g)	Trioxano (g)	Conversão [%]	Massa Molar	IP
1 ^a	1,557	0,0150	0,0024	0,1490	48,17	20284	1,12
2 ^b	1,557	0,0150	0,0024	0,1490	-	-	-
3 ^c	1,557	0,0150	0,0024	0,1490	-	-	-

Temperatura: 70°; Tempo de reação: 5 horas e atmosfera de N₂ e como Solvente: 8,5 mL de 1,4- Dioxano.^aCTA₁, ^bCTA₂ e ^cCTA₃.

Nessa fase do trabalho, foi realizado um estudo para avaliar a influência da temperatura no meio reacional, empregando o CTA₁, o CTA₂ e o CTA₃ e comparar os resultados com os valores obtidos da Tabela 9. Os três experimentos foram

realizados a 85°C, durante 5 horas na presença de 1,4-dioxano e AIBN como iniciador. A Tabela 10 apresenta a formulação e os resultados de velocidade de polimerização, massas molares e IP dos polímeros formados.

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a reação empregando o CTA₂ (reação 2) não apresentou reação, mesmo fornecendo mais energia ao meio reacional, confirmando o resultado obtido da reação 2 da Tabela 9. Entretanto, a síntese do PDMAEMA empregando o CTA₃ (reação 3) a 85°C apresentou conversão monomérica de 65,13% com valor de massa molar de 9644 e IP de 1,07.

D'AGOSTO *et al.* (*in press*), sintetizaram o PDMAEMA a 90°C com conversão de 90% durante 6 horas, empregando o CPBD como agente de transferência de cadeia. Segundo os autores, a temperatura de reação influencia a capacidade de reação do CTA_{RAFT} empregado nas polimerizações “vivas”. O aumento na temperatura de reação, automaticamente, fornece mais energia ao meio reacional, fazendo com que o CTA_{RAFT} seja mais ativo para reagir e controlar a massa molar dos polímeros.

Tabela 10. Resultados obtidos na polimerização do DMAEMA a 85°C.

Reação	Monômero (g)	CTA _{RAFT} (g)	AIBN (g)	Trioxano (g)	Conversão [%]	Massa Molar	IP
1 ^a	0,3660	0,0150	0,0090	0,0350	52,68	11227	1,11
2 ^b	0,3660	0,0150	0,0090	0,0350	-	-	-
3 ^c	0,3660	0,0150	0,0090	0,0350	65,13	9644	1,07

Temperatura: 85°C; Tempo de reação: 5 horas e atmosfera de N₂ e como Solvente: 8,5 mL de 1,4- Dioxano.^aCTA₁, ^bCTA₂ e ^cCTA₃.

A seguir, foi sintetizado o PDMAEMA empregando como iniciador o ácido 4,4'azobis(4-ciano pentanóico) – ACP, 1,4-dioxano como solvente e como agente de transferência de cadeia o CTA₁ e o CTA₃.

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 11, o PDMAEMA sintetizado empregando CTA₁ apresentou conversão de 57,70% e massa molar de 12071 com IP de 1,12. De acordo com os resultados obtidos o uso de ACP como

iniciador não influenciou na conversão do PDMAEMA. Porém, empregando o ACP como iniciador na síntese do PDMAEMA empregando o CTA₃ apresentou uma conversão de 55,27% e massa molar de 12784 com IP de 1,01. Ao comparar com o resultado obtido na reação 3 da Tabela 10, a conversão monomérica foi menor e os valores de massa molar e IP foram próximos.

GANACHAUD *et al.* (2000), sintetizaram o PNIPAM via RAFT empregando AIBN como iniciador, 1,4-dioxano como solvente durante 6 horas a 70°C. Segundo os autores, o iniciador indicado na polimerização via radical livre “viva”, deve ser o AIBN, já que no mecanismo RAFT a decomposição do iniciador deve ser lenta, para evitar a rápida formação de radicais, e conseqüentemente, aumentar a quantidade de macrocadeias formadas e a probabilidade destas macrocadeias sofrerem terminação, desviando desta maneira o mecanismo da reação RAFT para o convencional.

Tabela 11. Resultados obtidos na polimerização empregando o ACP como iniciador.

Reação	Monômero (g)	CTA _{RAFT} (g)	ACP (g)	Trioxano (g)	Conversão [%]	Massa Molar	IP
1 ^a	0,3660	0,0150	0,0090	0,0350	57,70	12071	1,12
2 ^b	0,3660	0,0150	0,0090	0,0350	55,27	12784	1,01

Temperatura: 85°; Tempo de reação: 5 horas e atmosfera de N₂ e como Solvente: 8,5 mL de 1,4-Dioxano.^aCTA₁, ^bCTA₃.

Para comparar os valores de massas molares reais e os valores de massas molares teóricos, foram sintetizados quatro polímeros com a massa molar final de 1000, 3000, 10000 e 40000. A Tabela 12 apresenta a formulação e resultados obtidos nesse estudo.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o PDMAEMA sintetizado pelo mecanismo RAFT, apresentou valores de massas molares reais próximas dos valores de massas molares teóricos, além de apresentar valores de

IP baixos. A reação 1 apresentou massa molar real de 1871 e IP igual a 1,09, sendo que a massa molar teórica seria de 1000.

Nesse estudo deve ser citado o trabalho de D'AGOSTO *et al.* (*in press*), que sintetizaram o PDMAEMA nessas mesmas condições e ao caracterizar o polímero purificado pela técnica de GPC, empregando como eluente o THF HPLC e PMMA como padrão de calibração, verificaram um desvio da massa molar real com o valor da massa molar teórico. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, o valor da massa molar teórico seria de 14350 e o valor da massa molar real foi de 19200. Os autores justificaram que o volume hidrodinâmico do PMMA empregando como padrão de calibração, é menor quando comparado com o volume hidrodinâmico do PDMAEMA.

Tabela 12. Resultados obtidos das massas molares reais e das massas molares teóricas.

Reação	Monômero (g)	CTA ₁ (g)	AIBN (g)	Trioxano (g)	Conversão [%]	Massa Molar	IP
1 ^a	2,230	0,1278	0,0023	0,2130	56,24	1871	1,09
2 ^b	2,230	0,0966	0,0023	0,2130	55,71	4320	1,12
3 ^c	2,230	0,0213	0,0023	0,2130	57,10	13570	1,13
4 ^d	2,230	0,0130	0,0023	0,2130	55,84	42730	1,16

Temperatura: 70°C; Tempo de reação: 5 horas e atmosfera de N₂; como Solvente: 8,5 mL de 1,4- Dioxano; massas molares teóricas: ^a1000, ^b3000, ^c10000 e ^d40000.

Nessa etapa do trabalho foi realizado um experimento para verificar o comportamento da reação de polimerização via radical livre “viva” ao adicionar uma nova carga de monômero. A reação foi conduzida a 85°C sob atmosfera de N₂ e o tempo de reação foi de 5 horas. A Tabela 13 apresenta a formulação empregada nessa síntese. No início da reação, foi retirada uma alíquota e após o tempo de reação de 5 horas foi retirada a segunda alíquota. Em seguida foi adicionada a mesma quantidade de monômero no meio reacional, mantendo as mesmas condições experimentais e deixou-se reagir por mais cinco horas, sendo

assim o tempo reacional final foi de 10 horas. Após o tempo de reação foi retirada a terceira alíquota.

As alíquotas retiradas foram caracterizadas pelas técnicas de RMN ^1H e GPC. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 14, pode-se verificar que no primeiro intervalo de 5 horas de reação, a velocidade de polimerização foi de 55,21% com massa molar de 8759 e IP de 1,23. Já no segundo intervalo de 5 horas de reação, a velocidade de polimerização foi de 58,73% e a massa molar final foi de 14322 e IP de 1,38. Com esse estudo, provavelmente, não ocorreu a formação de um novo grupo de macromoléculas, mas, o crescimento das macromoléculas já existentes no meio reacional.

Tabela 13. Formulação empregada na polimerização do DMAEMA via RAFT em duas etapas.

Reação	Monômero (g)	CTA ₁ (g)	AIBN (g)	Trioxano (g)
1	2,230	0,0213	0,0023	0,2130

Temperatura: 85°C; Solvente: 8,5 mL de Dioxano; Tempo de reação: 5 horas e atmosfera de N₂. Após o tempo de reação foram adicionadas 2,230g de DMAEMA e deixou-se agitando por mais 5 horas.

Tabela 14. Resultados obtidos na polimerização DMAEMA via RAFT em duas etapas.

Conversão [%]	MM	IP
55,21	8759	1,23
58,73	14322	1,38

5.2.1- Caracterização do PDMAEMA sintetizado via RAFT pela técnica de RMN ¹H.

A composição química do polímero sintetizado nas condições experimentais da reação 2 da Tabela 12 foi determinada por RMN ¹H.

As figuras 19, 20 e 21 apresentam os espectros de RMN ¹H do monômero DMAEMA, do CTA_{RAFT} e do PDMAEMA, respectivamente. Com o espectro de RMN ¹H apresentado na figura 21 foi possível verificar a estrutura química do polímero formado pela polimerização do DMAEMA via RAFT. Comparando-se os deslocamentos obtidos neste espectro com aqueles inerentes ao monômero (figura 19) foi possível determinar todos os deslocamentos do DMAEMA, incluindo os deslocamentos referentes à dupla ligação do monômero residual. Verificou-se também alguns deslocamentos que poderiam ser atribuídos ao ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico – CTA₁ (figura 20), sugerindo a presença deste ligado quimicamente à macromolécula.

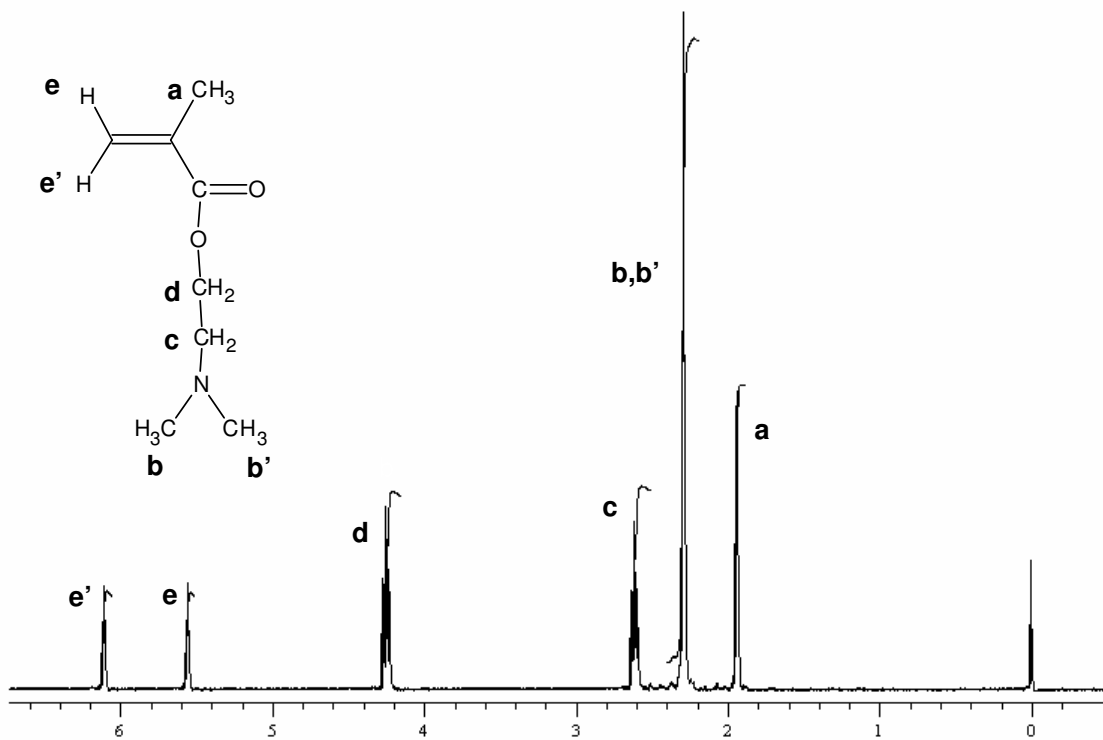


Figura 19. Espectro de RMN ¹H do DMAEMA.

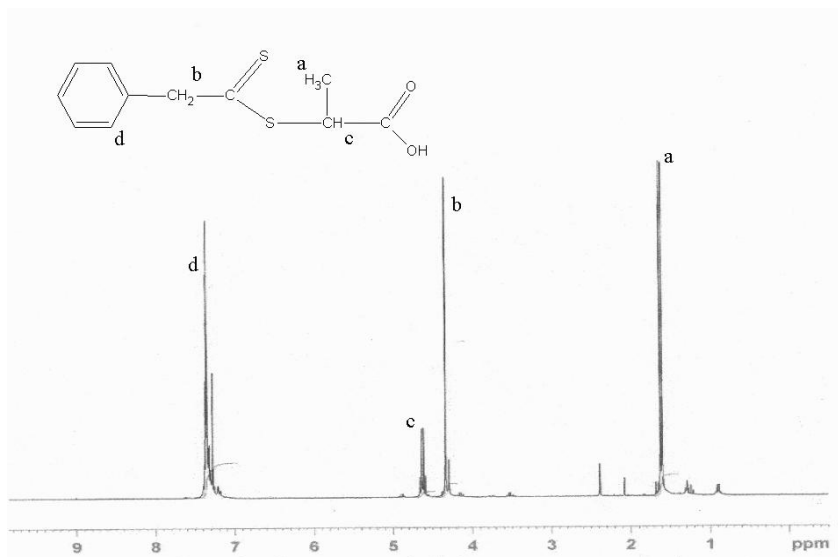


Figura 20. Espectro de RMN ¹H do CTA_{RAFT}, o ácido 2-((2-fenil-1-tioacetil)tio)propanóico.

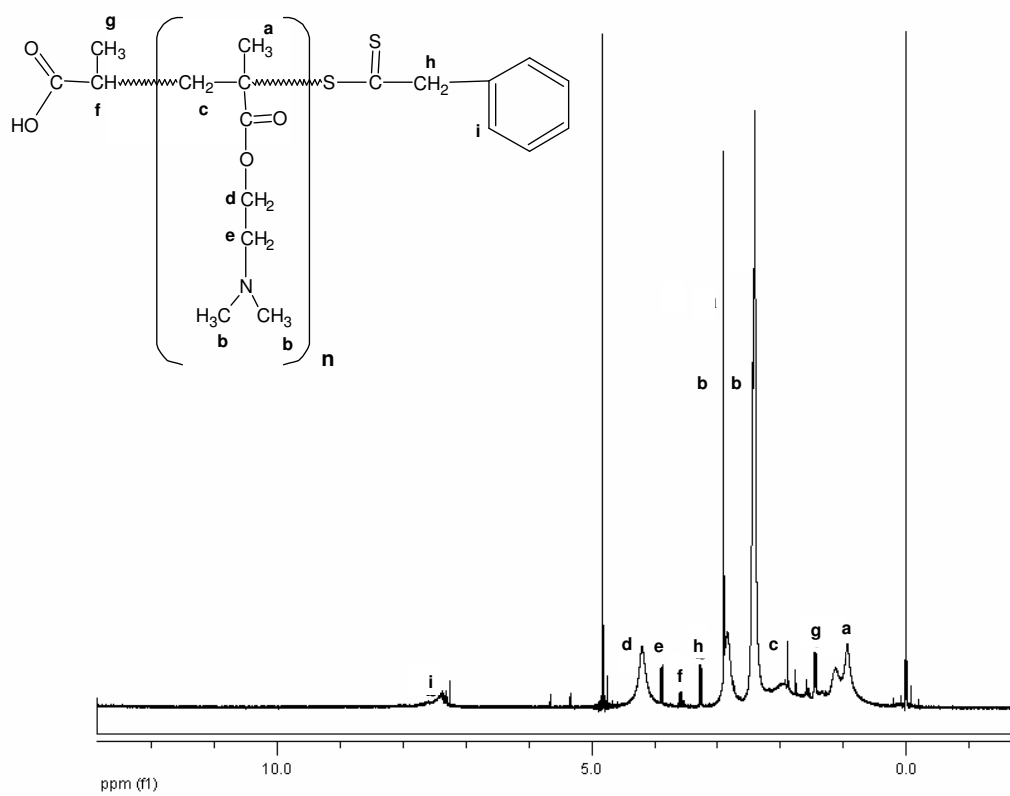


Figura 21. Espectro de RMN ¹H do PDMAEMA empregando o CTA₁.

5.3- Síntese dos copolímeros em bloco do PDMAEMA-b-PHBV.

Na síntese dos copolímeros em bloco foi empregado o poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) – PHBV e os homopolímeros de PDMAEMA sintetizados via radical livre convencional ou o PDMAEMA sintetizado pelo mecanismo RAFT. Nessa síntese foi empregado o PDMAEMA com três valores de massa molar e PHBV com MM de 15672 e IP de 1,85. A Tabela 15 apresenta a formulação da reação de acoplamento do PDMAEMA sintetizado via radical livre convencional e via radical livre “viva”.

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 15 e 16, verificou-se um aumento da massa molar do polímero final. Esse aumento na massa molar final é atribuído à reação de acoplamento do PDMAEMA-b-PHBV. Por exemplo, a reação 1 foi conduzida empregando o PDMAEMA com massa molar de 4436 e IP igual a 1,73 e o PHBV com massa molar de 15672 e IP de 1,85. Ao final da copolimerização a massa molar final do copolímero em bloco foi de 21029 com IP de 3,14. Dessa maneira, pôde-se verificar que ocorreu reação de acoplamento. No entanto, o aumento do índice de polidispersidade indica a presença dos copolímeros formados e dos polímeros de partida (PDMAEMA e PHBV) que não reagiram. Esses resultados são demonstrados nas figuras 22, 23 e 24 que apresentam os cromatogramas obtidos pela técnica de GPC constituídos pelas curvas do PDMAEMA, PHBV e do PDMAEMA-b-PHBV.

Esses resultados foram coerentes com os resultados obtidos por HU *et al.*(2005) que sintetizaram copolímeros em bloco de poli(estireno) e polidimetilaminoetilmetacrilato – (PE-b-PDMAEMA) com massa molar de 24489 e IP de 2,89. Esses copolímeros foram miscelizados em água sob agitação mecânica a temperatura ambiente. As partículas formadas foram caracterizadas pela técnica de TEM. Segundo os autores, foi possível visualizar a morfologia “core-shell” (casca-núcleo) das partículas e observar que quanto maior as cadeias de PDMAEMA, maior foi a camada ao redor das partículas (“core”).

Tabela 15. Formulação empregada na síntese dos copolímeros de PDMAEMA-b-PHBV.

Reação	PDMAEMA (g)	MM _{PDMAEMA}	CDI (g)	PHBV (g)	DMAP (g)
1 ^a	0,100	4436	0,0100	0,0500	0,0050
2 ^b	0,100	8834	0,0100	0,0500	0,0050
3 ^c	0,100	13570	0,0100	0,0500	0,0050

Temperatura de reação: 55°C; atmosfera de N₂, tempo de reação: 24 horas e 15 mL de CHCl₃; ^aPDMAEMA convencional (3000); ^bPDMAEMA convencional (10000) e ^cPDMAEMA raft (10000).

Tabela 16. Resultados obtidos na síntese dos copolímeros de PDMAEMA-b-PHBV.

Reação	MM	IP
1 ^a	21029	3,14
2 ^b	19203	3,42
3 ^c	27570	3,19

^aPDMAEMA convencional (3000); ^bPDMAEMA convencional (10000) e ^cPDMAEMA raft (10000).

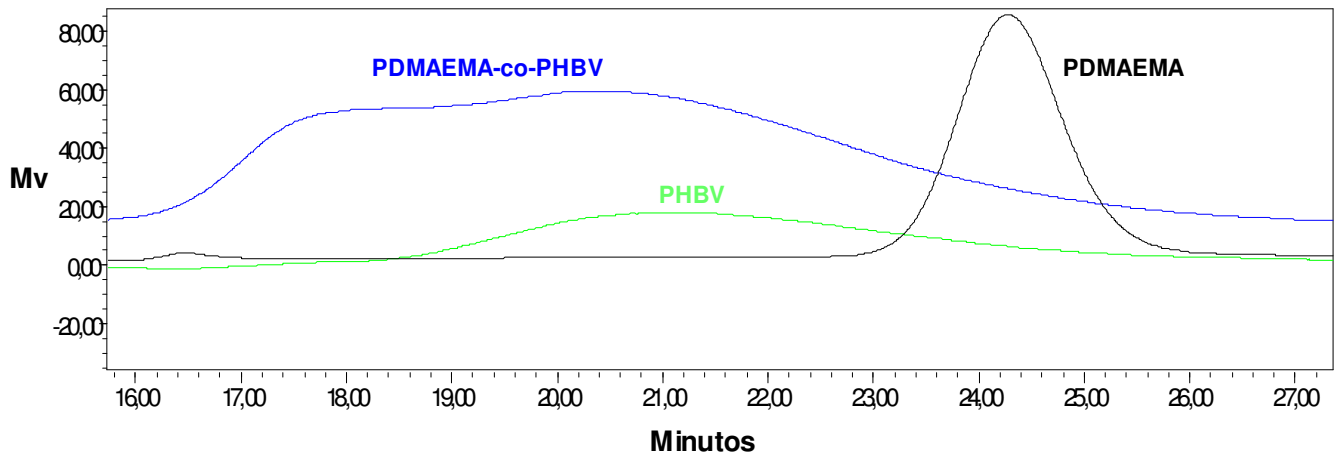


Figura 22. Cromatograma de GPC do PDMAEMA, PHBV e da reação 1.

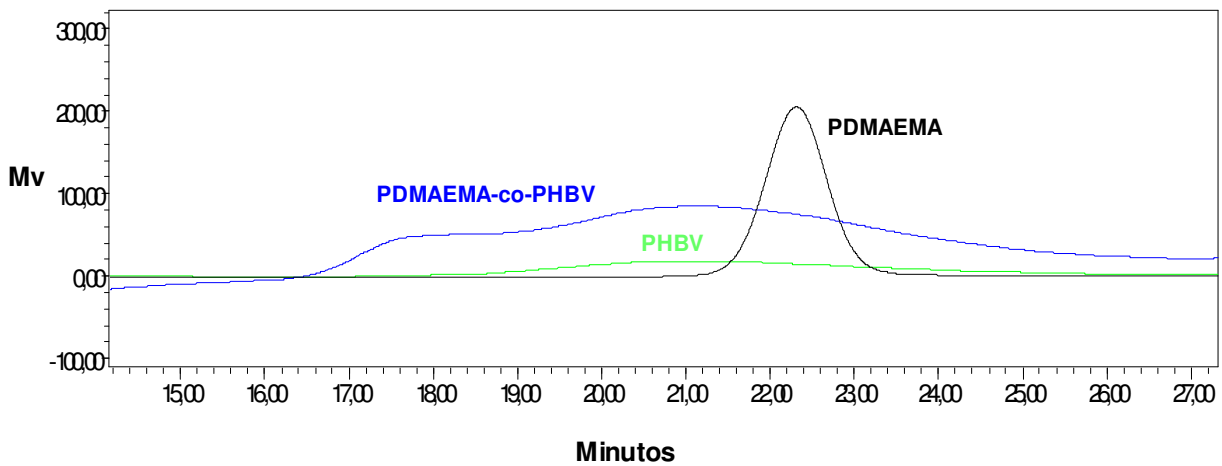


Figura 23. Cromatograma de GPC do PDMAEMA, PHBV e da reação 2.

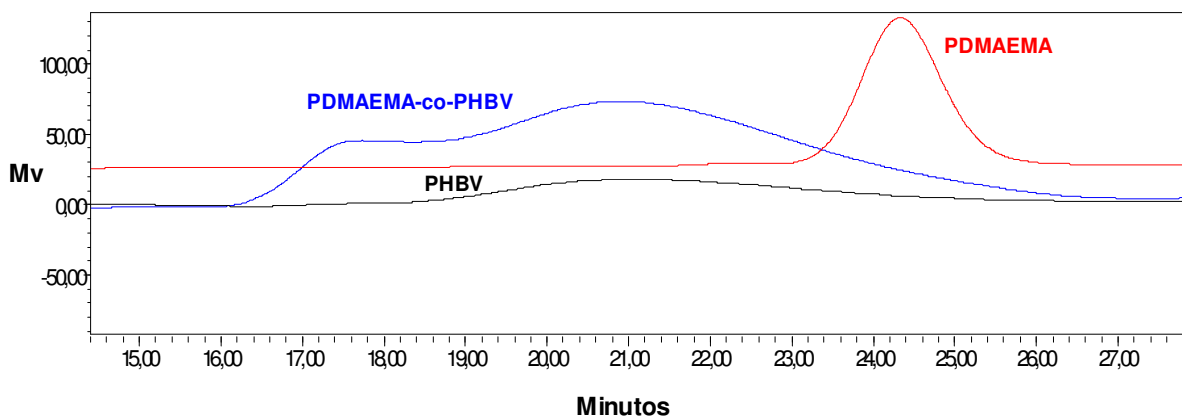


Figura 24. Cromatograma de GPC do PDMAEMA, PHBV e da reação 3.

5.3.1- Caracterização morfológica das partículas obtidas a partir dos copolímeros em bloco do PDMAEMA-b-PHBV.

Os copolímeros em bloco de PDMAEMA-b-PHBV foram miscelizados para a formação de partículas com morfologia core-shell do tipo hairy layer. Essa morfologia apresenta um núcleo hidrofóbico constituído de PHBV e ao redor uma “cabeleira” constituída pelo polímero hidrofílico, o PDMAEMA. As figuras 25 e 26 apresentam as micrografias obtidas por TEM das partículas obtidas a partir dos copolímeros em bloco de PDMAEMA-b-PHBV (reação 2, Tabela 16). As partículas foram miscelizadas em um béquer contendo 20 mL de água deionizada sob agitação magnética e, lentamente, foi adicionado 1 mL da reação. Após a adição, foi deixado agitar por 48 horas à temperatura ambiente para volatilizar todo clorofórmio presente. De acordo com a imagem da figura 25 foi possível verificar a morfologia das partículas formadas a partir dos copolímeros de PDMAEMA-b-PHBV miscelizadas em água. A figura 26 apresenta a imagem das partículas miscelizadas em água + acetona (1:1) empregando o mesmo procedimento de miscelização citado anteriormente.

De acordo com as micrografias, foi possível visualizar a morfologia do tipo núcleo-casca (“core-shell”) das partículas. O núcleo das partículas é formado pelo PHBV e a casca é formada pelo PDMAEMA.

Comparando essas figuras, verificou-se que os copolímeros em bloco miscelizados em água apresentaram partículas de vários tamanhos com a alta polidispersidade, já as partículas miscelizadas em água+acetona apresentaram tamanhos de partículas e polidispersidade menores.

O copolímero em bloco empregando o PDMAEMA sintetizado pelo mecanismo RAFT, foi miscelizado em água+acetona. A figura 27 apresenta a micrografia das partículas obtidas a partir do copolímero em bloco de PDMAEMA-b-PHBV (reação 3, Tabela 16). De acordo com a imagem, foi possível verificar partículas pequenas da ordem de 40 a 100nm até partículas de 500nm, além de apresentar a morfologia do tipo “core-shell”.

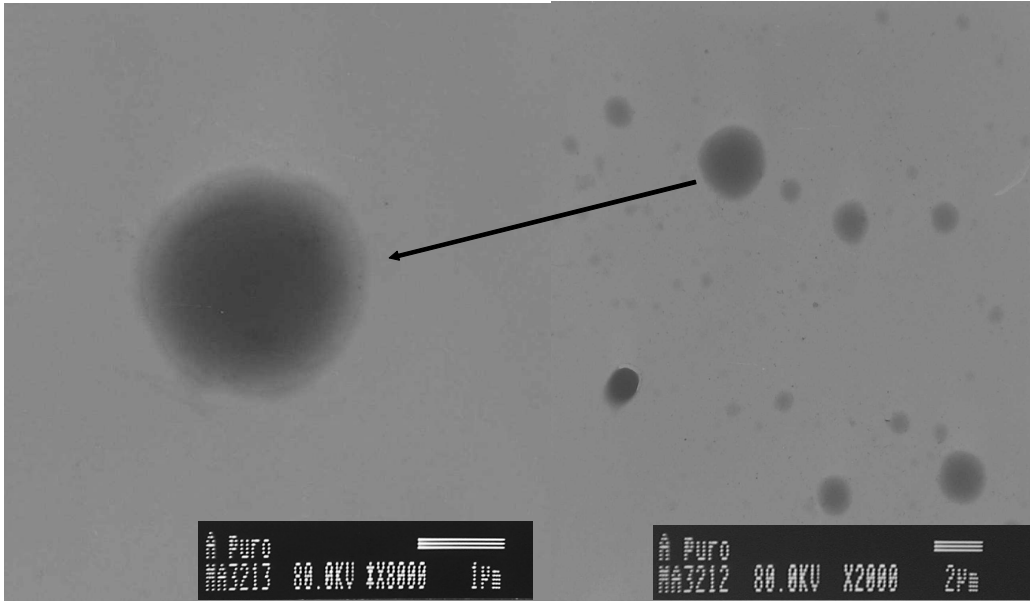


Figura 25. PDMAEMA-b-PHBV miscelizados em água.

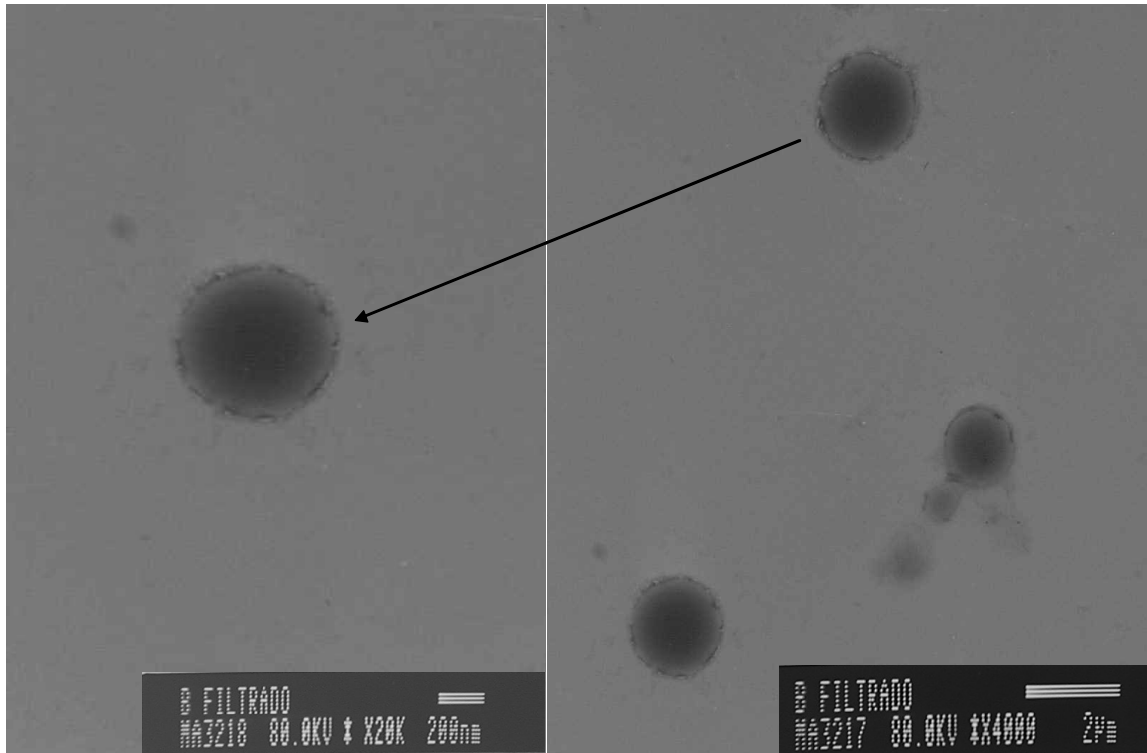


Figura 26. PDMAEMA-b-PHBV miscelizados em água + acetona (1:1).

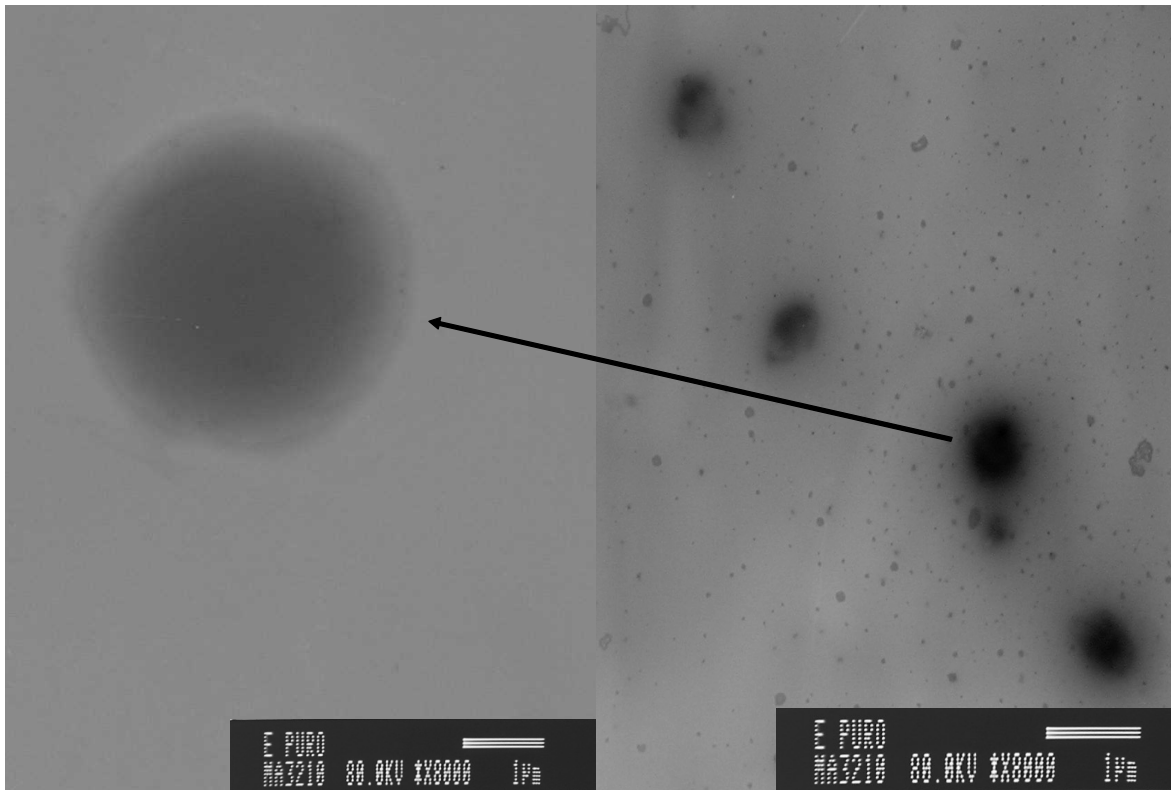


Figura 27. Micrografia das partículas formadas a partir de PDMAEMA sintetizado via RAFT e miscelizadas em água+acetona.

6- CONCLUSÃO GERAL

Essa dissertação de tese visou sintetizar e caracterizar um polímero catiônico (PDMAEMA), para posteriormente, ser aplicado em estudos de Transfecção Gênica (TG) e na liberação controlada de drogas. Na aplicação em Terapia Gênica, o polímero deve ser catiônico para a complexação do DNA, por isso o PDMAEMA está sendo pesquisado. Já em liberação controlada, o PDMAEMA está sendo muito estudado, pois é um polímero que possui facilidade de protonação, assim, facilita a liberação gradativa da droga.

O primeiro estudo, foi sintetizar e caracterizar o PDMAEMA empregando a polimerização via radical livre convencional. O segundo estudo foi sintetizar e caracterizar o PDMAEMA sintetizado e caracterizado via radical livre “viva”.

De acordo com os estudos realizados, foi possível comparar os resultados dos polímeros de DMAEMA sintetizados via radical livre convencional com os resultados desses polímeros sintetizados via radical livre “viva” empregando o mecanismo RAFT.

Na síntese do PDMAEMA via radical livre convencional empregando como agente de transferência de cadeia o ácido 3-mercaptopropiônico – CTA_c, foi possível verificar a formação de macromoléculas com as extremidades funcionalizadas com os grupos carboxílicos provenientes da estrutura química do CTA_c. As macrocadeias sintetizadas por essa via, crescem de maneira descontrolada e apresentam uma alta polidispersidade, que são características intrínsecas desse mecanismo de polimerização.

Na polimerização do DMAEMA via radical livre “viva”, foram utilizados agentes de transferência de cadeia do tipo ditioéster. De acordo com os resultados apresentados, verificou-se que só ocorreram as reações de polimerização quando foram empregados o ácido 2-((2-fenil-1-tioxaetil)tio)-propanóico – CTA₁ e o ácido 4-ciano-4-tiobenzoilsulfanilpentanóico – CTA₃. Na síntese do PDMAEMA empregando o ácido 2-((2-fenil-1-tioxa)tio)-propanóico – CTA₂ não ocorreu reação química, pois a estrutura química desse CTA_{RAFT}, apresenta um grupo benzil que nesse mecanismo RAFT, não polimeriza o PDMAEMA. Os polímeros sintetizados

pelo mecanismo RAFT apresentaram um crescimento controlado das macromoléculas e um baixo índice de polidispersidade, que são características desse mecanismo.

De acordo com os resultados obtidos pela técnica de ressonância magnética nuclear de prótons - RMN ^1H e pela técnica de cromatografia em permeação em gel - GPC. Foi possível verificar as conversões das polymerizações, além das massas molares e índice de polidispersidade das macromoléculas sintetizadas via radical livre convencional e pelo mecanismo RAFT.

Os resultados de massas molares e índice de polidispersidades mostrados nos cromatogramas dos PDMAEMA sintetizados via radical livre convencional foram satisfatórios e demonstraram que a massa molar real não foi próxima da massa molar estimada, com os valores de índice de polidispersidade foram altos, caracterizando a polymerização convencional.

Os resultados de GPC, do PDMAEMA sintetizado pelo mecanismo RAFT, foram bastante favoráveis e demonstraram o controle do crescimento das macromoléculas, pois os valores das massas molares reais foram próximos dos valores das massas molares teóricas, mesmo diante da utilização de PMMA como padrão de calibração. Além disso, as polidispersidades desses polímeros foram baixas, o que caracteriza, a síntese via radical livre "viva".

Com os polímeros sintetizados e caracterizados, foi realizado um estudo preliminar de formação de partículas biodegradáveis. As reações de acoplamento entre as hidroxilas livres do PHBV e os grupos carboxílicos do PDMAEMA, deram origem ao copolímero em bloco (PDMAEMA-b-PHBV), e que foram, posteriormente, miscelizados em água para a formação das partículas biodegradáveis.

A relevância deste projeto de dissertação e sua importante contribuição para o meio acadêmicos e industrial se devem à apresentação de resultados de síntese de um polímero catiônico - PDMAEMA. Esse polímero pode ser empregado como veículo de material gênico ou como partícula biodegradável aplicável na cura ou retardamento de doenças que afetam a população, principalmente, na eficiência do tratamento terapêutico contra o câncer. Até o

momento, em todos os trabalhos realizados nessa área os autores apresentaram excelentes resultados empregando o PDMAEMA em funções nobres, tornando uma esperança para a cura de muitas doenças que afetam a população mundial.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J.M.; SHIVE, M.S., <i>Advanced Drug Delivery Reviews</i> , v.28, p.5-24, 1997.
ANDONY, A., HOEKSTRA, D., <i>Molecular Membrane Biology</i> , 18 129-143, 2001.
BENOIT, M. A. Advances in Production Technology, In: BENITA, S. (ed). Marcel Dekker Inc., NY, p.35-72, 1996.
BILLMEYER, F.W.J., <i>Textbook of Polymer Science</i> , Wiley International Edition, 262, 1962.
BOYER, C., BOUTEVIN, G., ROBIN, J.J., BOUTEVIN, B., <i>Polymer</i> , 45 , 7863-7876, 2004
CAMMAS, S., SUZUKI, K., SONE, C., SAKARAI, Y., KATAOKA, K., OKANO, T., <i>J. Control. Rel.</i> , 19 , 121-130, 1992.
CHANDRA, R.; RUSTGI, R. <i>Prog. Polym. Sci.</i> , v.23, p.1273-1335, 1998.
CHIEFARI, J., CHONG, Y. K., ERCOLE, F., KRSTINA, J., LE, T. P. T., MAYADUNNE, R. T. A., MEIJS, G. F., MOAD, G., MOAD, C. L., RIZZARDO, E., THANG, S. H., <i>Macromolecules</i> , 31 , 5559-5562, 2003.
CHIEFARI, J., MAYADUNNE, R.T.A., MOAD, C.L., MOAD, G., RIZZARDO, E., POSTMA, A., SKIDMORE, A.M., THANG, S.H., <i>Macromolecules</i> , 36 , 2273-2283, 2003.
CHONG, Y. K , KRSTINA, J. LE, T.P.T., MOAD, G., POSTMA, A., RIZZARDO, E., THANG, S.H., <i>Macromolecules</i> , 36 , 2256-2272, 2003.
CHONG, Y. K., LE, T. P. T., MOAD, G., RIZZARDO, E., THANG, S. H., <i>Macromolecules</i> , 32 , 2071-2074, 1999.
D'AGOSTO F., HUGHES R., CHARREYRE M. T., PICHOT, C., GILBERT, R. G., <i>Macromolecules</i> , 36 , 621-629, 2003.
D'AGOSTO, F., SAHNOUN, M., CHARREYRE, M. T. <i>J. Polymer. In press.</i>
DAWES, E.A; SENIOR, P.J. <i>Adv. Microb. Physiol.</i> , v.10, p.135-266, 1973.
DONBROW, M., MAYADUNNE, R.T.A. Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy. <i>Boca Raton: CRC Press</i> , 1-13, 1991.
FILHO, N. A., OLIVEIRA, A. G., <i>INFARMA</i> , Brasilia, 9 , 18-21, 1999.

FUKUDA, T., KWAK, Y., GOTO, A., TSUJII, Y., MURATA, Y., KOMATSU, K., <i>Macromolecules</i> , 35 , 3026, 2002 .
FUNHOFF, A.M., MONGE, S., TEEUWEN, R., <i>J. Controlled Release</i> , 102, 711-724, 2005.
GANACHAUD, A., THANF, S.H., MOAD, C.L., <i>J. Controlled Release</i> , 56, 124-147, 2000
HENNINK, W.E., WETERING, P.V., SCHUURMANS. <i>J. Control. Rel.</i> 67 ,254-272, 2001.
HU, D. ,CHENG, Z., ZHU, J., ZHU, X., <i>Polymer</i> , 21, 235-256, 2005.
KIM, E.J., CHO, S.H., YUK, S.H., <i>Biomaterials</i> , 22 , 2495-2499, 2001.
KIM, I. S., JEONG, Y. I., CHO, C. S., KIM, S. H., <i>Intern. J. Pharmac.</i> , 211 , 1-8, 2000.
KOWOLLIK, C.B., QUINN, J.F., NGUYEN, T.L.U., HEUTS, J.P.A., DAVIS, T.P., <i>Macromolecules</i> , 34 , 7849-7857, 2001.
KREUTER J. <i>Boca Raton: CRC Press</i> , 125-147, 1992.
KREUTER, J. <i>Adv. Drug Delivery Rev.</i> , v.47, n.1, p.65-81, 2001.
LANGER, R., BERNSTEIN, H., BROWN L., CIMA, L., <i>Chemical Eng. Sci.</i> , 45 , 1967-1978, 1990.
LEMOIGNE, M., WILKINSON, J.R. <i>Chim. Bio.</i> , v.8, p.770-782, 1926.
LIMA, K. M., RODRIGUES-JÚNIOR, J. M. <i>Braz. J. Med. Biol. Res.</i> , v.2, n.32, p.171-180, 1999.
LOISEAU, J., DOËRR, SUAU, J.M., EGRAZ, J.B., LLAURO, M.F., LADAVIÈRE, C. <i>Macromolecules</i> , 36 , 3066-3077, 2003.
LUZZI, L., PALMIERI, A., An Overview of Pharmaceutical Applications in LIM, F. Biomedical Applications of Microencapsulation. Boca Raton: CRC Press, 2-14, 1985.
MACRAE, R.M.; WILKINSON, J.R. <i>J. Gen. Microbiol</i> , v.19, p.210-222, 1958.
MEYER, A. Jena, 1903.
MOES, A. J., <i>J. Pharm. Belg.</i> , 44 (1), 60-70, 1989.
MOUNTAIN, A., <i>Trends biotechnol</i> , 18 , 119-128, 2000.

OKATATA, J., NOGUCHI, H., SEKI, T., <i>Macromolecules</i> , 20 , 15-21, 1982.
OLIVEIRA, A.G., SCARPA, M.V., BUENO, J. H. F., Evangelista, R. C., <i>Rev. Ciên. Farm.</i> , 14 , 37-49, 1992.
PORTE, H.; COUARRAZE, G.; CHULIA, D.; DELAIL, M.; POURCELOT, Y.. Elsevier Science, Amsterdam, p.513-543, 1994
RAVI, P., SIN, S.L., GAN, Y.Y.,TAM, K.C.,XIA, X.L., HU, X., <i>Polymer</i> , 46 , 137-146, 2005
RIZZARDO, E., CHONG, Y., THANG, S. <i>Macromolecules</i> , 21 , 1543-1571, 2000.
ROBIN, S., CHONG, Y., RIZZARDO, E. <i>J. Controlled Release</i> , 115 , 813-840, 2003.
SAMOUR, C. M., LEVY, M., <i>Academic Press</i> , New York, 161-184, 1978.
SENDIL, D., GURSEL, I., WISE, D. L., HASIRCI, V., <i>J. Control. Rel.</i> , 59 , 207-217, 1999.
SENDIL, D., GURSEL, I., WISE, D. L., HASIRCI, V., <i>J. Control. Rel.</i> , 59 , 207-217, 1999.
SERRES, A., BAUDYS, M., KIM, S. W., <i>Pharm. Res.</i> , 13 , 196-201, 1996.
SIMOES, S., LIMA, P.M.C., PIRES, P., FANEGA, H., <i>Adv Drug Deliv. Rev.</i> , 47 , 277-294, 2001.
SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, J. <i>Control. Release</i> , v.1, n.70, p.1-20, 2001
SZWARC, M., LEVY, M., MILKOVICH, R. M., <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 78 , 2656, 1956.
SZWARC, M., <i>Nature</i> , 178 , 1168, 1956.
TAKEDA, N., NAKAMURA, E., YOKOYAMA, M., OKANO, T., <i>J. Control. Rel.</i> , 2004.
THANG, S.H., CHONG, R., MAYADUNNE, A.T., MOAD, G., <i>Tetrahedron Letters</i> , 40 , 2435-2438, 1999.
THROMBRE, A.G., <i>Polymeric Mat. Sci. and Eng.</i> , 63 , 322-326, 1990.
VERMA, I.M., SOMIA, N., <i>Nature</i> , 389 , 239-242, 1997.
VERON, L., GANNÉE, A., CHARREYRE, M.T., PICHOT, C.,DELAIR, T., <i>Macromolecular Bioscience</i> , 4 , 431-444, 2004

WALLEN, L.L.; ROHWEDDER, W.K. <i>Environ Sci Technol</i> , v.8, p.576- 579, 1974.
WETERING, P.V., CHERNG, J.Y., TALSMA, H., HENNIK, W.C.J., <i>J. Control. Rel.</i> , 49 , 59-69, 1997.
WETERING, P.V., SCHUURMANS, N.M.E., STEENBERGEN, M.J., CROMMELIN, D.J.A., HENNINK, W.E., <i>J. Control. Rel.</i> , 64 , 193-203, 2000.
WILLIAMSON, D.H.; WILKINSON, J.F. <i>J Gen Microbiol.</i> , v.19, p.198-209, 1958.
YOSHIDA R., SAKAI, K., OKANO, T., SAKURAI, Y., <i>Ind. Eng. Chem. Res.</i> , 31 , 2339-2345, 1992.
YOSHIDA, M., SAKAI, K., <i>Colloid Polym. Sci.</i> , 268 , 726-730, 1990.
ZHU, J., ZHU, X., ZHOU, D. CHEN, J., WANG, X., <i>J. European Polymer</i> , 40 , 743-749, <i>in press</i> .